

**IPICYT**

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**POSGRADO EN CIENCIAS APLICADAS**

**Espectroscopía Óptica Aplicada al Análisis  
Químico de la Sangre**

Tesis que presenta

**Cuauhtémoc Araujo Andrade**

Para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias Aplicadas**

En la opción de

**Nanociencias y Nanotecnología**

Codirectores de la Tesis:

Dr. Humberto Terrones Maldonado

Dr. Facundo Ruiz (UASLP)

San Luis Potosí, S.L.P., Agosto de 2005.



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

COPIA CERTIFICADA

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 014 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias Aplicadas en la opción de Nanociencias y Nanotecnología está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 30 días del mes de agosto del año 2005, se reunió a las 19:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Humberto Terrones Maldonado</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Mauricio Terrones Maldonado</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Facundo Ruiz</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>UASLP</b>
<b>Dr. Hugo Cabrera Ibarra</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. José Refugio Martínez Mendoza</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>UASLP</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS APLICADAS  
EN LA OPCIÓN DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA**

sustentó el C.

**Cuauhtémoc Araujo Andrade**

sobre la Tesis intitulada:

*Espectroscopía Óptica Aplicada al Análisis Químico de la Sangre*

que se desarrolló bajo la dirección de

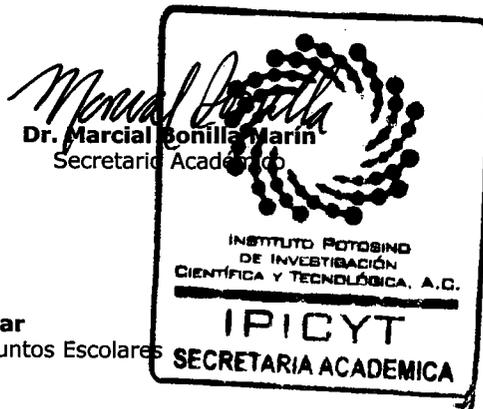
**Dr. Humberto Terrones Maldonado**  
**Dr. Facundo Ruiz (UASLP)**

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 21:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 30 días del mes agosto de 2005.



  
**Mtra. Ma. Elisa Lucio Aguilar**  
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

# Comité Tutorial

---

**ASESORES:**

Dr. Facundo Ruiz  
Facultad de Ciencias, UASLP

Dr. Humberto Terrones M.  
Materiales Avanzados, IPICYT

**MIEMBROS LOCALES:**

Dr. Mauricio Terrones M.  
Materiales Avanzados, IPICYT

Dr. Hugo Cabrera Ibarra  
Matemáticas Aplicadas y Sistemas  
Computacionales, IPICYT

**MIEMBRO EXTERNO:**

Dr. José Refugio Martínez Mendoza  
Facultad de Ciencias, UASLP

---

# Optical spectroscopy applied to the chemical analysis of blood

Cuauhtémoc Araujo Andrade

Submitted for the degree of Doctor in Applied Sciences

July, 2005

---

## Summary

The analysis of the some blood analytes, can provide an important information for clinical procedures. For this reason, the medical community is very interested in the development of novel spectroscopic methods or techniques to obtain concentrations of some analytes in the blood, in a non invasive way. In this thesis we show the experimental and theoretical bases for the non invasive prediction of glucose concentration in blood using absorption spectroscopy in the near infrared (NIR) and chemometric techniques as multivariate analysis, particularly the partial least square method (PLS). Our experiments, show that it is possible to calibrate prediction models capable to predict glucose in a turbid medium composed of an analytes mixture, like the human tissue and the blood. The obtained spectra for all the volunteers in the Facultad de Medicina of Universidad Autónoma de San Luis Potosí and the Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto" of San Luis Potosí, were used to create and calibrate the glucose prediction models in tissue, observing the capability of them for detection and quantification of blood analytes in vivo and the possibility to make an "universal" model working for all.

# Espectroscopía óptica aplicada al análisis químico de la sangre

**Cuauhtémoc Araujo Andrade**

Presentado para obtener el grado de Doctor en Ciencias Aplicadas

Julio, 2005

## Resumen

El análisis de algunos constituyentes de la sangre provee información de diagnóstico en los procedimientos clínicos. Motivo por el cual es de gran interés en la comunidad médica el desarrollo de métodos ópticos mediante los cuales sea posible obtener las concentraciones de algunos de los analitos más importantes en la sangre, de una manera no invasiva. En esta tesis, se describen las bases teóricas y experimentales para la predicción no invasiva de la concentración de glucosa en sangre, utilizando la técnica espectroscópica de absorción en el cercano infrarrojo (NIR) y técnicas estadísticas (análisis multivariante), en particular, la de mínimos cuadrados parciales (PLS). Los experimentos realizados muestran con buenos resultados, que es posible generar modelos de calibración para la predicción de analitos en medios turbios como el tejido humano y la sangre, en los cuales el analito a determinar se encuentra inmerso en una mezcla de otros componentes o analitos. Los espectros obtenidos para los diversos voluntarios en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y el Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto" de San Luis Potosí, fueron utilizados para la generación de los modelos de predicción de la concentración de glucosa en tejido, obteniendo resultados que muestran la factibilidad del método para la detección y cuantificación de analitos *in vivo*, así como la generación de un modelo "universal", el cual funcione para diversas personas.

# Agradecimientos

Quisiera agradecer en primer lugar a mis asesores, el Dr. Facundo Ruiz y el Dr. Humberto Terrones, por su apoyo y la confianza depositada en mi para la realización de esta tesis. Al IPICyT que me permitió académicamente realizar el doctorado como miembro de esta gran institución, así como al Dr. Emilio Muñoz Sandoval quien estuvo siempre al pendiente de mi trabajo como coordinador del postgrado. A mi comité Tutorial, el Dr. Mauricio Terrones y el Dr. Hugo Cabrera Ibarra, que dispusieron de su tiempo para asistir a mis avances y hacerme indicaciones y comentarios acerca de mi trabajo. Al director de la Facultad de Ciencias, Fis. Benito Pineda Reyes, por permitirme realizar esta investigación en las instalaciones de esta Facultad y en particular al Dr. José Refugio Martínez Mendoza (Flash), el Dr. Gerardo Ortega (el chino) y a todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Materiales de la Facultad de Ciencias y de servicio social, por el apoyo recibido y prestarse como conejillos de indias para mis experimentos (Mónica Glz, Ana, Gabriel, Angelito, Gil, Palomares, Rosalina, Elizabeth, Martha y Enrique). También agradezco profundamente al equipo de trabajo del Laboratorio de Medicina Nuclear de la Facultad de Medicina, a la QFB. Esperanza de la Cruz, QFB. Jorge Flores Sánchez, Lupita y Macrina. Asimismo a el Dr. Antonio Gordillo Moscoso, Dr. Juan Francisco Hernández Sierra y en gran manera al Dr. Francisco Escalante Padrón, ya que sin su ayuda, esta investigación hubiera sido una labor muy difícil de realizar.

A mi esposa Alma, por su apoyo incondicional y a todos mis familiares y amigos.

Al CONACYT, por la beca otorgada durante estos tres años del doctorado.

En general, agradezco a Dios y todos lo que de una u otra forma me apoyaron para la realización de esta tesis.

*Dedicada a mi esposa*

*Alma, a mis padres*

*y hermanos*

# Contenido General

	Pagina
Portada	
Aprobación	
Comité Tutorial	
Summary	
Resumen	
Agradecimientos	
Dedicatorias	
Contenido general .....	i
Lista de figuras .....	v
Lista de tablas .....	vii
<b>Capítulo 1 Introducción</b>	
1.1 Monitoreo de la glucosa en sangre .....	1
1.2 Objetivos .....	4
1.3 Organización de la tesis .....	6
<b>Capítulo 2 Análisis Multivariante</b>	
2.1 Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) .....	8
2.2 Preprocesamiento de datos .....	13
2.2.1 Centrado .....	13
2.2.2 Corrección de la línea base .....	15
2.2.3 Derivadas .....	16
2.2.4 Normalizado .....	16
2.3 Selección del conjunto de muestras de calibración .....	16
2.4 Establecimiento del modelo .....	17
2.5 Detección de "Outliers" .....	18

---

2.6 Validación del modelo .....	19
2.7 Predicción de muestras desconocidas .....	20
2.8 Conclusiones .....	20
<b>Capítulo 3 Espectroscopía</b>	
3.1 Introducción .....	21
3.2 Espectroscopía NIR .....	21
3.3 Proceso de absorción de luz .....	23
3.3.1 Agua .....	26
3.3.2 Hemoglobina .....	27
3.3.3 Lípidos .....	28
3.4 Reflectancia difusa .....	28
3.5 Conclusiones .....	30
<b>Capítulo 4 Cálculos ab initio</b>	
4.1 Introducción .....	31
4.2 Métodos computacionales .....	32
4.3 Métodos experimentales .....	32
4.4 Resultados y discusión .....	33
4.5 Conclusiones .....	38
<b>Capítulo 5 Soluciones Simples</b>	
5.1 Introducción .....	39
5.2 Procedimiento experimental .....	39
5.3 Calibración del modelo de predicción .....	40
5.4 Resultados experimentales .....	42
5.5 Conclusiones .....	46
<b>Capítulo 6 Soluciones modelo</b>	
6.1 Introducción .....	47
6.2 Procedimiento experimental .....	48

6.2.1	Calibración del modelo de predicción .....	50
6.2.2	Resultados experimentales .....	50
6.3	Detección y predicción de concentraciones bajas de glucosa .....	52
6.3.1	Procedimiento experimental .....	53
6.3.2	Calibración del modelo de predicción para concentraciones bajas de glucosa .....	53
6.4	Conclusiones .....	55
<b>Capítulo 7 Mediciones in vivo</b>		
7.1	Introducción .....	56
7.2	Desarrollo experimental .....	58
7.3	Resultados y discusión .....	59
7.4	Conclusiones .....	67
<b>Capítulo 8 Modelos cruzados</b>		
8.1	Introducción .....	68
8.2	Desarrollo experimental .....	68
8.3	Resultados y discusión .....	69
8.4	Conclusión .....	69
<b>Capítulo 9 Mediciones en neonatos</b>		
9.1	Introducción .....	73
9.2	Desarrollo experimental .....	75
9.2.1	Predicción de espectros NIR .....	75
9.3	Resultados y discusión .....	76
9.4	Conclusiones .....	81

<b>Contenido General</b>	iv
<b>Capítulo 10 Conclusiones y Perspectivas</b> .....	93
<b>Bibliografía</b> .....	96
<b>ANEXO 1</b> .....	106

---

# Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Representación grafica de la calibración del modelo de predicción .....	9
<b>Figura 2.</b> Modelo de predicción .....	10
<b>Figura 3.</b> Representación gráfica de las relaciones internas y externas del modelo PLS .....	11
<b>Figura 4.</b> Centrado. a) Espectros NIR sin centrar, b) Espectros NIR de tejido centrados, c) objetos definidos por dos variables sin centrar, d) los mismos objetos centrados .....	14
<b>Figura 5.</b> Proceso de corrección de la línea base utilizando un modelo explícito lineal a) Señal medida (espectro), b) Línea base, c) Señal corregida .....	15
<b>Figura 6.</b> Visualización de los “scores” obtenidos aplicando el análisis de componentes principales (PCA) .....	17
<b>Figura 7.</b> Grafica del residual frente al “leverage”. A) Objetos con varianza residual elevada son considerados “outliers”, B) también se consideran “outliers” debido a su “leverage” alto, C) se consideran muestras influyentes, mas no necesariamente “outliers”, el criterio del investigador es importante en esta medición .....	19
<b>Figura 8.</b> Espectro NIR de agua en el rango de los 850 a los 1700 nm ..	27
<b>Figura 9.</b> Representación grafica del fenómeno de absorción, por la técnica de transmisión .....	29
<b>Figura 10.</b> Representación grafica del fenómeno de absorción por la técnica de reflectancia difusa .....	30
<b>Figura. 11.</b> Representación estructural de la D-glucopiranososa (glucosa), (a) Representación de silla y (b) representación de Haworth, los átomos de carbón y oxígenos fueron enumerados de acuerdo a la numeración estándar .....	32
<b>Figura 12.</b> Espectros Infrarrojos experimentales y teóricos de (a) alfa glucosa y (b) beta glucosa .....	34

<b>Figura 13.</b> Espectros Raman experimentales y teóricos para los anómeros $\alpha$ y $\beta$ de la glucosa en (a), (b) agua como medio y (c), (d) vacío .....	35
<b>Figura 14.</b> Gráfica de la varianza de X contra el número de componentes principales para el modelo de azúcar en agua, donde se indica cuanta de la variación en los datos esta descrita por las diferentes componentes principales .....	41
<b>Figura 15.</b> Gráfica de la varianza de X contra el número de componentes principales para el modelo de etanol en agua, donde se indica cuanta de la variación en los datos esta descrita por las diferentes componentes principales .....	41
<b>Figura 16.</b> Espectros de absorción en el cercano infrarrojo para el rango entre 900 nm y 1700 nm de las muestras con diferente concentración de azúcar .....	42
<b>Figura 17.</b> Validación cruzada para el modelo de predicción de concentración de azúcar en agua con un coeficiente de correlación de 0.99 y un RMSEP de 0.012 g/cm <sup>3</sup> .....	43
<b>Figura 18.</b> Representación grafica del vector de coeficientes de regresión del modelo de predicción de la concentración de azúcar en agua, comúnmente llamado B vector .....	43
<b>Figura 19.</b> Cinco espectros de absorción en el cercano infrarrojo, para diferentes concentraciones en % en volumen de etanol en agua .....	44
<b>Figura 20.</b> Validación cruzada para la predicción de etanol en agua, con un coeficiente de correlación de 0.99 y un RMSEP de 2.1 %Vol .....	45
<b>Figura 21.</b> Representación grafica del vector de coeficientes de regresión del modelo de predicción de la concentración de etanol en agua, comúnmente llamado B vector .....	45
<b>Figura 22.</b> Espectros de absorción en el cercano infrarrojo (NIR), de tejido humano y de intralípido al 2% de lípidos en solución .....	48
<b>Figura 23.</b> Espectros NIR de las componentes individuales de la solución intralípida .....	49
<b>Figura 24.</b> Validación cruzada para bajas concentraciones de glucosa en la solución intralípida, con un $r^2= 0.993$ , y un RMSEP de 3.9 mg/dL ...	55

<b>Figura 25.</b> Curva de hiperglucemia donde se muestra el cambio en concentración respecto el tiempo después de ingerir una bebida alta en glucosa .....	59
<b>Figura 26.</b> Espectros de absorción NIR de tejido a diferentes concentraciones de glucosa .....	60
<b>Figura 27.</b> Validación cruzada para el voluntario 1 utilizando el modelo 1 .....	60
<b>Figura 28.</b> Validación cruzada para la predicción de glucosa del voluntario 5 utilizando el modelo 2 (auto-predicción) .....	62
<b>Figura 29.</b> Validación cruzada de los resultados obtenidos para el voluntario 6, utilizando el modelo de predicción 2 .....	63
<b>Figura 30.</b> Validación cruzada para los espectros NIR medidos en la yema del dedo, utilizando el modelo 3, con un $r^2$ de 0.98 y un RMSEP de 4.8 mg/dL .....	64
<b>Figura 31.</b> Validación cruzada para la predicción de glucosa obtenida de los espectros NIR utilizando el modelo 4, con un $r^2$ de 0.86 y un RMSEP de 15.1 mg/dL .....	65
<b>Figura 32.</b> Validación cruzada para la predicción de glucosa obtenida de los espectros NIR en la palma de la mano, utilizando el modelo 5, obteniendo un $r^2$ de 0.76 y un RMSEP de 17.4 mg/dL .....	66
<b>Figura 33.</b> Validación cruzada para la predicción de glucosa obtenida de los espectros NIR de la vena utilizando el modelo 6, con un $r^2$ de 0.68 y un RMSEP de 22.7 mg/dL .....	67
<b>Figura 34.</b> Validación cruzada para las predicciones en la yema del dedo en neonatos, con un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de 0.61 y un RMSEP de 10.05 g/dL .....	77
<b>Figura 35.</b> Validación cruzada entre las predicciones en Dm, Dp y Yd frente a la referencia del estándar clínico .....	78
<b>Figura 36.</b> Validación cruzada para las concentraciones obtenidas por el glucómetro 1 y el método clínico .....	80
<b>Figura 37.</b> Validación cruzada para los valores de la concentración de glucosa obtenidos por el glucómetro 2 contra el método de clínico .....	80

# Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Ejemplo de arreglo matricial de un grupo de espectros NIR . . . .	9
<b>Tabla 2.</b> Métodos computacionales y valores de energía de los anómeros de la glucosa . . . . .	35
<b>Tabla 3.</b> Distancias de enlace en ángstroms entre los átomos de ambos anómeros de la glucosa . . . . .	36
<b>Tabla 4.</b> Cantidades necesarias para la preparación de 500 ml de solución intralípida al 2% . . . . .	48
<b>Tabla 5.</b> Predicción de la concentración de glucosa para cada solución intralípida . . . . .	50
<b>Tabla 6.</b> Coeficientes de correlación y RMSEP para cada intralípido . . . .	51
<b>Tabla 7.</b> Predicción de la concentración de glucosa para cada solución intralípida, con procesamiento de datos . . . . .	51
<b>Tabla 8.</b> Coeficientes de correlación y RMSEP para cada intralípido después del preprocesamiento de datos . . . . .	52
<b>Tabla 9.</b> Predicción de la concentración de glucosa en solución intralípida, sin preprocesamiento de datos . . . . .	54
<b>Tabla 10.</b> Predicción de la concentración de glucosa utilizando el modelo 1 . . . . .	61
<b>Tabla 11.</b> Predicción de la concentración de glucosa en los voluntarios 7 y 8 usando el modelo 1 . . . . .	63
<b>Tabla 12.</b> Predicción para las concentraciones de glucosa del voluntario 1 utilizando los 8 modelos . . . . .	70
<b>Tabla 13.</b> Predicción para las concentraciones de glucosa del voluntario 2 utilizando los 8 modelos . . . . .	70
<b>Tabla 14.</b> Predicción para las concentraciones de glucosa del voluntario 3 utilizando los 8 modelos . . . . .	70

---

<b>Tabla 15.</b> Predicción para las concentraciones de glucosa del voluntario 4 utilizando los 8 modelos .....	71
<b>Tabla 16.</b> Predicción para las concentraciones de glucosa del voluntario 5 utilizando los 8 modelos .....	71
<b>Tabla 17.</b> Predicción para las concentraciones de glucosa del voluntario 6 utilizando los 8 modelos .....	7
<b>Tabla 18.</b> Predicción para las concentraciones de glucosa del voluntario 7 utilizando los 8 modelos .....	72
<b>Tabla 19.</b> Predicción para las concentraciones de glucosa del voluntario 8 utilizando los 8 modelos .....	72
<b>Tabla 20.</b> Valores de la concentración de glucosa en sangre obtenidos por estándar clínico, glucómetro 1 y glucómetro 2 .....	79
<b>Tabla 21.</b> Comparación entre métodos de cuantificación para glucosa en sangre .....	81
<b>Tabla 22.</b> Neonato 1 .....	82
<b>Tabla 23.</b> Neonato 2 .....	83
<b>Tabla 24.</b> Neonato 3 .....	83
<b>Tabla 25.</b> Neonato 4 .....	84
<b>Tabla 26.</b> Neonato 5 .....	84
<b>Tabla 27.</b> Neonato 6 .....	85
<b>Tabla 28.</b> Neonato 7 .....	85
<b>Tabla 29.</b> Neonato 8 .....	86
<b>Tabla 30.</b> Neonato 9 .....	86
<b>Tabla 31.</b> Neonato 10 .....	87
<b>Tabla 32.</b> Neonato 11 .....	87
<b>Tabla 33.</b> Neonato 12 .....	88
<b>Tabla 34.</b> Neonato 13 .....	88

---

<b>Tabla 35.</b> Neonato 14 .....	89
<b>Tabla 36.</b> Neonato 15 .....	89
<b>Tabla 37.</b> Neonato 16 .....	90
<b>Tabla 38.</b> Neonato 17 .....	90
<b>Tabla 39.</b> Neonato 18 .....	91
<b>Tabla 40.</b> Neonato 19 .....	91
<b>Tabla 41.</b> Neonato 20 .....	92
<b>Tabla 42.</b> Neonato 21 .....	92

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1 Monitoreo de la glucosa en sangre

El monitoreo constante de la concentración de glucosa en pacientes diabéticos y en neonatos prematuros es de vital importancia, pero los métodos actuales de monitoreo (medición) implican extracción de sangre con agujas o lancetas (métodos invasivos), causando incomodidad y en ocasiones dolor en la medición, sobre todo cuando se trata de múltiples extracciones diarias, lo cual es una de las limitantes para el monitoreo eficaz. Se ha demostrado que utilizando técnicas espectroscópicas tales como la de absorción en el cercano infrarrojo (NIR) y de dispersión Raman en el cercano infrarrojo, aunadas a técnicas de análisis multivariante, en particular el de mínimos cuadrados parciales (PLS) es posible identificar y cuantificar analitos o componentes como la glucosa en medios turbios como la sangre [1-3].

El monitoreo de los niveles de glucosa en la sangre es una parte esencial en el cuidado de la diabetes. Sin embargo, los métodos convencionales confiables para medir la concentración de glucosa en sangre implica el pinchazo de alguna parte del cuerpo. Es decir, la lanceta tiene que atravesar las capas protectoras de la piel hasta llegar al tejido blando debajo de ella, lo cual es un procedimiento no deseado y en ocasiones doloroso, motivo por el cual se buscan nuevas técnicas que impliquen menos dolor y no-invasivas. En estos últimos años se han propuesto diversas técnicas lo menos invasivas posible, como por ejemplo: la implantación subcutánea de bio-sensores [3], iontoforesis inversa [11] y el monitoreo in vivo no-invasivo de la glucosa en sangre y en tejido, utilizando técnicas

espectroscópicas como la de absorción en el cercano infrarrojo, Raman y fotoacústica [6]. Varios grupos de investigación alrededor del mundo han realizado investigaciones acerca de este tema, las cuales se enfocan en los aspectos clínicos para mediciones no invasivas utilizando técnicas espectroscópicas, describiendo algunas técnicas ópticas, sus ventajas o desventajas [4]. De igual manera, trabajos anteriores reportan el uso de técnicas espectroscópicas generalmente de absorción en el cercano infrarrojo (NIR) y de dispersión Raman para la cuantificación de glucosa ya sea en tejido humano, en sangre o en plasma [8], utilizando técnicas de análisis multivariante; reportando resultados no satisfactorios para una aplicación de monitoreo clínico confiable debido a que la correlación es muy baja y el error cuadrático medio de la predicción (RMSEP) es muy grande, del orden de los 35 mg/dL como lo reportado por Hopkins [3]. También existen trabajos los cuales se enfocan en la cuantificación de algunos otros analitos presentes en la sangre, como la urea y el colesterol, incluso estos métodos de detección y cuantificación se han propuesto para la detección de tumores cancerígenos [2,5]. Otros trabajos reportados muestran el uso de la espectroscopía NIR para medir el grado de oxigenación cerebral en neonatos [1]. La ventaja de utilizar la espectroscopía de absorción en el cercano infrarrojo radica en el hecho de que no es necesario ningún tipo de agente reactivo, las mediciones son llevadas a cabo mediante una fibra óptica. La región NIR tiene algunas propiedades, las cuales son ideales para el diagnóstico de la glucosa en sangre in vivo y de forma no invasiva, principalmente porque representa una ventana óptica entre la región en la cual la luz visible es absorbida por la sangre y los pigmentos de la piel; y las longitudes de onda mayores en las cuales la absorción del agua es predominante.

Actualmente, algunos grupos de investigación, laboratorios y compañías han mostrado la posibilidad de utilizar reflectancia difusa en la espectroscopía en el cercano infrarrojo (NIR) para determinar la concentración de glucosa en sangre de forma no invasiva en pacientes diabéticos. Además se han anunciado instrumentos con estas tecnologías, pero aún existen problemas para alcanzar un cierto grado de confiabilidad y resultados precisos. Por lo cual, en este trabajo de investigación se

plantearon una serie de experimentos con el fin de contribuir al desarrollo de técnicas ópticas para el análisis de sangre in vivo y de manera no invasiva.

En esta tesis, se presenta el fundamento, desarrollo y resultados experimentales obtenidos al utilizar las técnicas espectroscópicas como son NIR (Near InfraRed) para el análisis químico de la sangre. Las técnicas espectroscópicas tales como la de absorción infrarroja, de dispersión Raman y visible, entre otras, han sido utilizadas principalmente para el estudio y caracterización de semiconductores y materiales inorgánicos, debido a que estas técnicas han demostrado ser una herramienta poderosa en la determinación de la estructura cristalina, tipos de enlaces, tamaño de partícula, identificación de esfuerzos y para cuantificar concentraciones de alguna sustancia o material. También se ha visto, que estas técnicas tienen una gran aplicación en la caracterización de materiales orgánicos, entre los cuales se encuentra gran cantidad de analitos presentes en el tejido humano y la sangre (Glucosa, Urea, colesterol, etc.) ya que debido a las propiedades ópticas de estos componentes en el rango de longitud de onda del cercano infrarrojo y a las características de las técnicas espectroscópicas, es posible identificar y cuantificar analitos en medios turbios, es decir, medios que son una mezcla de múltiples componentes. Las técnicas más utilizadas para este propósito son la espectroscopia de dispersión Raman y de absorción en el cercano infrarrojo (NIR). En este trabajo de investigación doctoral nos enfocaremos en el uso de la espectroscopía de absorción (NIR) para este fin. Una de las principales motivaciones de este trabajo es el de crear las bases experimentales y teóricas para la medición y cuantificación de analitos en el tejido humano, de una forma confiable, en particular de la glucosa, sin la necesidad de utilizar reactivos químicos y sobre todo de una forma no invasiva, es decir, sin la extracción de sangre para un monitoreo frecuente o constante, como pueden ser personas diabéticas o recién nacidos, en los cuales las variaciones drásticas en la concentración de glucosa (glucemia), puede llevar a consecuencias graves en su salud y en algunos casos la muerte [7,9,10]. Una de las metas de este trabajo es el de servir como fuente de información para otros investigadores los cuales se interesen en la cuantificación de algún analito utilizando técnicas ópticas.

## 1.2 Objetivos

A continuación se describen los objetivos planteados al inicio de esta tesis:

Uno de los primeros objetivos planteados para la realización de esta tesis, fue el de investigar, entender y aplicar los conceptos y técnicas de análisis multivariante o quimiometría al análisis de espectros Raman y de absorción en el cercano infrarrojo, con el fin de obtener información acerca de la concentración de algún analito en particular inmerso en una mezcla compleja de múltiples analitos como la sangre o el tejido humano, de una forma confiable y no invasiva. El siguiente objetivo planteado en esta investigación fue el de diseñar una metodología experimental y teórica para la medición de los espectros de absorción NIR, ya sea in vitro o in vivo en el laboratorio o en clínica. Asimismo, se planteo la necesidad de observar la capacidad de la técnica espectroscópica de absorción en el cercano infrarrojo, para la detección de analitos en una solución o medio dispersor, con la intención de ver la capacidad de las técnicas multivariantes para la calibración de modelos de predicción, para la cuantificación de estos analitos. Para esto, se planteo una serie de experimentos utilizando lo que nosotros llamamos soluciones “simples” (azúcar en agua y etanol en agua). Después de comprobadas las capacidades de ambas técnicas para la detección y predicción de la concentración de alcohol y azúcar en soluciones “simples”, era necesario comprobar esto mismo pero para un medio dispersor semejante a la sangre o al tejido humano, el cual era nuestro objetivo final. Para este objetivo, se prepararon soluciones intralíquidas las cuales tienen propiedades ópticas semejantes a las del tejido humano y se calibraron modelos de predicción de la concentración de glucosa para bajas y altas concentraciones de glucosa dentro del rango fisiológico humano. Una vez comprobada la capacidad de detección las técnicas espectroscópicas y de análisis multivariante para la detección y cuantificación de glucosa en soluciones complejas, se procedió a realizar mediciones in vivo, para la calibración de modelos de predicción de la concentración de glucosa en sangre de forma no invasiva en adultos y neonatos, observar su factibilidad, así como su posible aplicación clínica y analizar la posibilidad de calibrar un modelo de predicción “universal”, el cual trabajara para la mayoría de personas, por lo cual se realizo un

---

análisis entre voluntarios y modelos de predicción de cada voluntario para tal fin. Nuestro ultimo objetivo planteado en el transcurso de esta tesis, fue la aplicación de todos los resultados experimentales y conocimientos teóricos de una forma tangible y de una gran aplicación en el campo de la neonatología, donde se planteo analizar la capacidad de predicción de la concentración de glucosa en neonatos prematuros de una forma rápida y no invasiva, utilizando un modelo de predicción calibrado para un adulto.

### 1.3 Organización de la tesis

A continuación, se describe brevemente la organización de este trabajo de tesis:

En el capítulo 2 se describen los fundamentos teóricos de las técnicas multivariantes para la calibración de modelos de predicción utilizando datos espectroscópicos, también algunas técnicas de preprocesamiento de datos, los cuales son un conjunto de algoritmos y operaciones matemáticas aplicadas a un conjunto de datos, para minimizar los errores sistemáticos causados en la medición experimental que afectan la capacidad predictiva del modelo. Además, se describen las etapas que son llevadas a cabo para la calibración de un modelo de predicción utilizando técnicas multivariantes. En el capítulo 3 se provee información sobre las técnicas espectroscópicas y teorías de absorción de luz, también se describen brevemente algunos de los absorbentes más importantes e influyentes en las mediciones de absorción infrarroja. Por completés se realizo un estudio teórico mediante cálculos de primeros principios de los anómeros de la glucosa, para obtener los espectros teóricos Raman e Infrarrojos de la glucosa e identificar las frecuencias de vibración molecular, las energías de amarre, las configuraciones más estables para los dos anómeros, tanto en agua como en vacío. Los resultados teóricos obtenidos fueron comparados con resultados experimentales descritos en la literatura, así como los realizados en el laboratorio y mostrados en el capítulo 4.

Posteriormente en los capítulo 5 y 6 se describen los primeros experimentos realizados para la calibración de modelos de predicción de analitos en soluciones simples y complejas, donde se intenta observar la capacidad de las técnicas multivariantes aplicadas a los espectros de absorción NIR, para calibrar modelos de predicción. Por ultimo en los capítulos 7, 8 y 9 se presentan los resultados experimentales obtenidos para la calibración de modelos de predicción de glucosa en tejido de forma no invasiva, utilizando espectroscopia NIR. Se describen algunos aspectos teóricos relacionados con la medición, el error de la medición y aspectos técnicos a superar para medición in vivo, los resultados obtenidos al intercalar los modelos de predicción individuales de cada voluntario con las mediciones espectroscópicas de cada uno de ellos, con el fin de observar el

comportamiento de cada modelo para espectros obtenidos en diferentes personas y poder evaluar la posibilidad de generar un modelo “universal”, el cual prediga aceptablemente las concentraciones de cualquier persona. Finalmente se muestran los resultados obtenidos de las predicciones de la concentración de glucosa in vivo y de forma no invasiva en neonatos, utilizando un modelo de predicción calibrado con espectros de un voluntario adulto. El propósito principal de estas mediciones fue observar la influencia de factores tales como la edad, en la predicción de la glucosa en tejido, utilizando un modelo ajeno a las muestras a predecir, explorar la factibilidad de una posible aplicación clínica tanto en instrumentación experimental, medición in vivo, procesamiento de datos y precisión clínica, así como hacer un estudio de la precisión y correlación de medición entre glucómetros comerciales frente al estándar de laboratorio. En el capítulo 10 se plasman las conclusiones general del trabajo de investigación doctoral realizado en esta tesis, en función de los múltiples resultados experimentales obtenidos, los cuales pueden servir como base a otros investigadores en esta área. Por ultimo se anexan al final de esta tesis, los datos técnicos y las configuraciones experimentales utilizadas del espectrofotómetro NIR utilizado en esta tesis y el titulo de algunos de los trabajos de investigación derivados de esta tesis, publicados y enviados para su revisión en revistas científicas arbitradas.

# Capítulo 2

## Análisis multivariante

### 2.1 Mínimos Cuadrados Parciales (PLS)

Las técnicas de calibración multivariante, tales como regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS: por sus siglas en inglés “Partial Least Square”) han sido utilizadas para el procesamiento de espectros y su cuantificación [21]. Una vez que la calibración ha sido realizada, la predicción (determinación de concentraciones en muestras desconocidas por regresión) de futuras muestras con concentraciones es meramente una multiplicación de matrices. El método de regresión parcial de mínimos cuadrados es un método muy popular en aplicaciones industriales de modelación suave [20,14]. Investigaciones en ciencias e ingeniería comúnmente involucran el uso de variables controlables y/o fáciles de medir (factores) que explican, regulan, o predicen el comportamiento de otras variables (respuestas). Cuando los factores son pocos en número, no son significativamente redundantes (colineales) y tienen una bien entendida relación a las respuestas, una regresión lineal múltiple puede ser una buena manera de procesar los datos. PLS es un método útil para la construcción de modelos de predicción cuando los factores son muchos y altamente colineales. Nótese que el énfasis es sobre la predicción de las respuestas y no necesariamente en tratar de entender las relaciones existentes entre variables. Asimismo, es una herramienta útil cuando el objetivo es la predicción y no existe una necesidad práctica de limitar el número de factores medidos. Por lo cual, PLS es un método de calibración multivariante, el cual es capaz de relacionar concentración de elementos directamente con espectros medidos (o porciones de ellos), particularmente con NIR [17,29]. Las variables espectrales son colectadas

como una matriz **X** con número de filas igual al número de muestras y el número de columnas igual al número de canales o longitudes de onda en el espectro como se ejemplifica en la tabla 1.

**Tabla 1. Ejemplo de arreglo matricial de un grupo de espectros NIR.**

<b>Y</b>	<b>X<sub>1</sub></b>	<b>X<sub>2</sub></b>	<b>X<sub>3</sub></b>	<b>X<sub>4</sub></b>	<b>X<sub>5</sub></b>	<b>X<sub>6</sub></b>	<b>X<sub>7</sub></b>	<b>X<sub>8</sub></b>	...	<b>X<sub>n</sub></b>
5	0.4727	0.4737	0.4747	0.4767	0.4777	0.4787	0.4807	0.4807	...	0.4727
10	0.4737	0.4737	0.4747	0.4757	0.4777	0.4787	0.4797	0.4797	...	0.4737
15	0.4739	0.4739	0.4759	0.4769	0.4799	0.4799	0.4819	0.4819	...	0.4739
20	0.4729	0.4739	0.4749	0.4759	0.4779	0.4779	0.4799	0.4809	...	0.4729
25	0.4727	0.4737	0.4747	0.4767	0.4777	0.4777	0.4797	0.4797	...	0.4727
30	0.4747	0.4737	0.4757	0.4747	0.4767	0.4767	0.4807	0.4807	...	0.4747
35	0.4727	0.4737	0.4757	0.4767	0.4787	0.4777	0.4797	0.4797	...	0.4727
40	0.4740	0.4740	0.4760	0.4750	0.4770	0.4780	0.4800	0.4810	...	0.4740
45	0.4737	0.4737	0.4757	0.4767	0.4787	0.4797	0.4817	0.4827	...	0.4737
<b>S</b>	0.4729	0.4739	0.4749	0.4759	0.4779	0.4779	0.4799	0.4809	...	0.4727

Asimismo, existe una matriz **Y** la cual consiste de las concentraciones (No. de filas = No. de muestras; No. de columnas = No. de elementos). La relación puede ser escrita como  $Y = XB + F$ , en la cual la matriz **F** es la matriz que contiene los residuales, es decir, variaciones no descritas por el modelo. El coeficiente **B** puede ser calculado de diferentes maneras (figura 1).

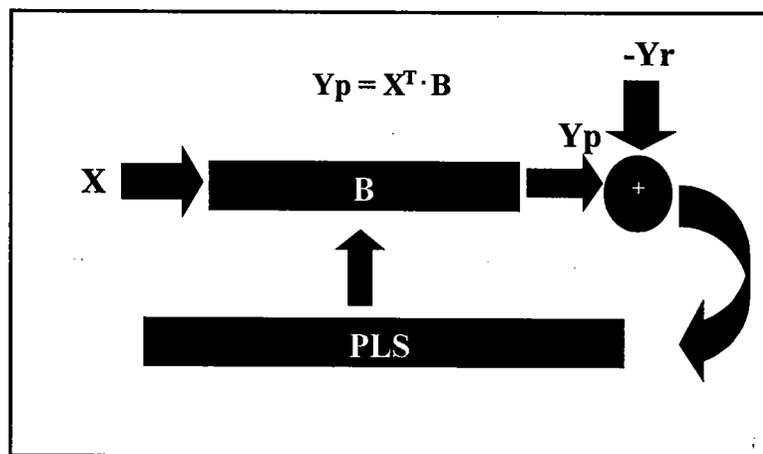


Figura 1. Representación grafica de la calibración del modelo de predicción.

Un método frecuentemente usado es el de regresión lineal múltiple (MLR) en el cual la solución de mínimos cuadrados es dada por  $B=(X^T X)^{-1} X^T Y$ . Sin embargo, cuando el número de variables  $X$  excede el número de muestras o cuando existe un alto grado de colinealidad entre las variables, la solución resultante no es estable. Matemáticamente esto significa, que la inversa de  $X^T X$  no existe. El método PLS maneja este problema de colinealidad comprimiendo la matriz  $X$  de datos que contiene  $p$  canales para las  $n$  muestras, en un número de  $A$  variables latentes ortogonales o componentes principales (PC's) llamadas "scores" y representados por  $T = [t_1, t_2, \dots, t_A]$  para la matriz  $X$  y  $U$  para la matriz  $Y$  [19].

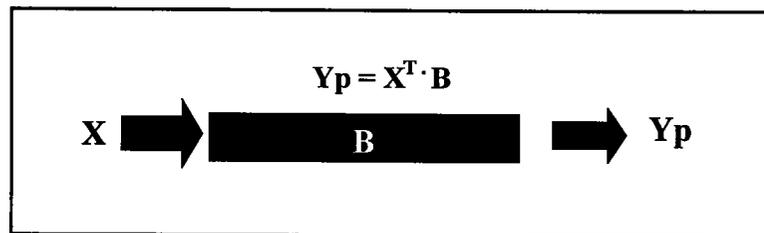


Figura 2. Modelo de predicción

El número de variables latentes es usualmente mucho más pequeño que el número original de variables  $p$ . Estos "scores"  $T$  y  $U$  son usados para ajustar un conjunto de  $n$  observaciones o muestras a  $m$  variables dependientes de concentración  $Y = [y_1, y_2, \dots, y_m]$ . Debido a que las variables latentes son ortogonales (linealmente independientes unas de otras) el inverso de  $X^T X$  puede ser obtenido fácilmente, resolviendo así el problema de colinealidad [12].

El modelo PLS puede considerarse como consistente de dos relaciones externas y una relación interna. Existe una relación externa para la matriz  $X$  donde:

$$X = TP^T + E = \sum_a^A t_a p_a^T + E \tag{1}$$

y para la matriz  $Y$

$$Y = UQ^T + F = \sum_a^A u_a q_a^T + F \tag{2}$$

En donde **P** y **Q** son los “loadings” del bloque de variables **X** y **Y** respectivamente y **E** y **F** son matrices que contienen los residuales. **A** representa el número de variables latentes retenidas en el modelo PLS. Los “loadings” describen cómo las variables **X** y **Y** originales están relacionadas con los “scores” **T** y **U**. La relación interna es escrita como:

$$u_a = b_a t_a \tag{3}$$

En esencia, la relación interna es un ajuste de mínimos cuadrados entre el bloque de “scores” de **X** y el bloque de “scores” de **Y** con  $b_h = u'_h t_h / t'_h t_h$ . Cuando todos los “scores” y “loadings” son calculados, el modelo PLS final queda como

$$Y = BTQ^T + F \tag{4}$$

La figura 3 muestra estas relaciones gráficamente.

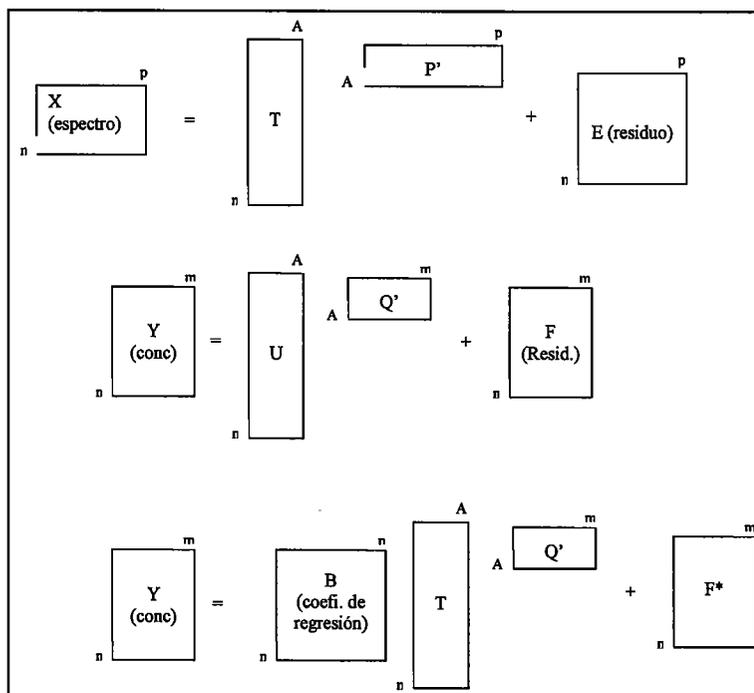


Figura 3. Representación gráfica de las relaciones internas y externas del modelo PLS.

Como mencionamos, el método PLS comprime las variables originales en un número de variables latentes o componentes principales (scores y loadings). La primer componente (PC1) tiende a describir la variancia sistemática en los datos (i.e. la relación entre espectros y concentraciones) y en menor extensión el ruido. Entonces cuando el número de “scores” se incrementa, la contribución del ruido se incrementa también, por lo cual podemos decir que no se está modelando la variancia sistemática en los datos, sino que se está modelando el ruido, resultando un modelo con una pobre capacidad de predicción. Por lo cual es de gran importancia seleccionar el número óptimo de componentes principales o “scores”. El número óptimo de PCs es calculado a partir de la raíz cuadrada del error cuadrático medio de la predicción o (RMSEP) para las diferentes PCs usadas en el modelo PLS. Este valor de RMSEP es una medida de lo bueno del ajuste entre las concentraciones conocidas y las predichas.

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^N (Y_{pred,n} - Y_{ref,n})^2}{N}} \quad (5)$$

Cuando los valores de RMSEP alcanzan un mínimo, se dice que el número “scores” correspondientes es óptimo. Existe un número límite de componentes principales, que pueden ser derivadas de una matriz  $X$ . El máximo número de componentes principales debe ser de  $(n-1)$  o  $p$  número de variables, dependiendo cual sea menor [19,21].

El cálculo del RMSEP comúnmente se puede realizar mediante una validación cruzada LOOCV (Leave One Out Cross Validation) [16], o a través de la separación de un conjunto de datos. La técnica LOOCV es generalmente utilizada cuando solamente un número limitado de muestras está disponible para construir y validar un modelo. En esta técnica, cada muestra es excluida del conjunto de datos y el modelo PLS es construido basado en las muestras remanentes. Una vez construido, la muestra excluida es predicha y la desviación almacenada, este procedimiento se realiza hasta que todas las muestras son excluidas una vez, finalmente el valor RMSEP es la media de las desviaciones almacenadas.

En el caso del conjunto separado de datos, el modelo PLS es construido del llamado conjunto de entrenamiento y usado para predecir las muestras del llamado conjunto de predicción. Además del valor RMSEP, el coeficiente de correlación ( $r$ ) es otro valor importante que nos indica la medida o grado de relación lineal entre dos variables, el cual es un número absoluto sin unidades. Así cuando la covariancia,  $cov(x,y)$  de dos variables se aproxima a  $-1$  ó  $1$ , se dice que existe una correlación lineal entre ellas. Los casos en donde la  $cov(x,y) = 1$ , representa una correlación perfecta positiva, y para la  $cov(x,y) = -1$ , representa una correlación perfecta negativa. El coeficiente de correlación refleja el grado de relación o efecto que tiene el cambio de una variable sobre la otra.

Otra parte importante en el análisis multivariante, es el preprocesamiento de datos para la calibración de modelos de predicción, los cuales se describe en la siguiente sección.

## 2.2 Preprocesamiento de datos

A cualquier grupo de operaciones matemáticas aplicadas a los datos espectroscópicos prior el análisis es llamado preprocesamiento. El preprocesamiento de datos mejora la exactitud y robustece nuestros análisis cuantitativos, haciendo que los datos analíticos sean más fáciles de entender y de procesar. El preprocesamiento puede separar la señal del ruido, tomando ventaja de las diferencias en sus propiedades. Las propiedades utilizadas comúnmente para estos propósitos son: La información contenida en un segmento del espectro, la frecuencia contenida de la transformada de Fourier del espectro, la intensidad de variancia en la replica del espectro, la intensidad de variancia en un grupo de espectros teniendo diferentes concentraciones de analito y conocimiento o patrones de intensidad predecible en los espectros [28].

### 2.2.1 Centrado

El centrado de una variable consiste en la sustracción del valor medio a todos sus elementos. En el caso de los datos espectrales el centrado consiste en restar al

espectro de cada una de las muestras el espectro promedio. Este pretratamiento pone de relieve las diferencias entre espectros, al haber eliminado la tendencia común, es decir el espectro promedio [21].

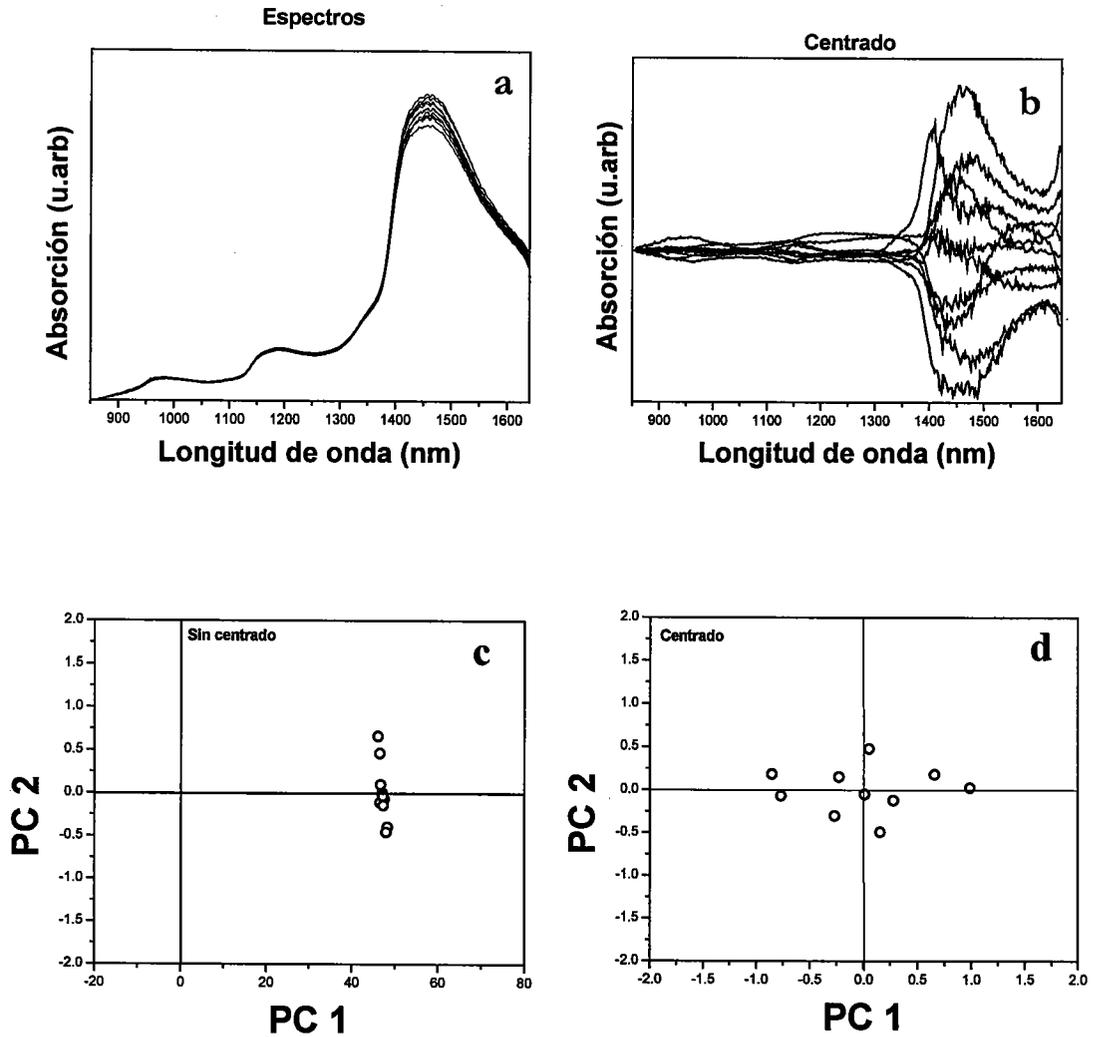


Figura 4. Centrado. a) Espectros NIR sin centrar, b) Espectros NIR de tejido centrados, c) objetos definidos por dos variables sin centrar, d) los mismos objetos centrados.

### 2.2.2 Corrección de la línea base

Aparte del ruido contenido en el espectro o señal medida, también puede contener otras fuentes de variación no relacionadas con la propiedad de interés, a estas se les denominan variaciones de la línea base. Uno de los métodos utilizados en esta tesis es el modelado explícito de la línea base. Este método consiste en aproximar la línea base del espectro, con una función polinomial, que se resta posteriormente al espectro, para obtener el espectro corregido. El caso más sencillo sería el polinomio de grado 0 (constante), también denominada offset correction y consiste en restar a cada espectro la absorbancia medida a una determinada longitud a una determinada longitud de onda. La selección de esta longitud de onda se puede hacer en base al conocimiento químico de la muestra, tomando la longitud de onda de menor variabilidad entre muestras [18], o la longitud de onda que al realizar un modelo PLS tiene un valor en "loadings" próximo a cero [27]. Se pueden utilizar polinomios de grado superior, para adaptar la corrección a las características de la variación de la línea base. Los más habituales son el uso de una línea recta (polinomio de grado 1) o de una curva (polinomio de grado 2). Cuando se utilizan los polinomios de grado 1 o 2, se le conoce como corrección detrending.

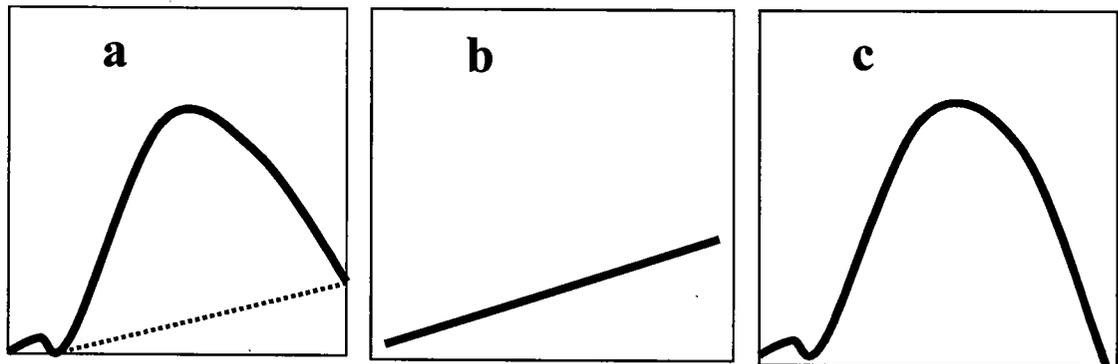


Figura 5. Proceso de corrección de la línea base utilizando un modelo explícito lineal a) Señal medida (espectro), b) Línea base, c) Señal corregida.

### 2.2.3 Derivadas

El uso de derivadas permite diferenciar mejor los picos solapados y elimina desplazamientos lineales y cuadráticos de la línea base. La primera derivada se obtiene como la diferencia entre absorbancias, a dos longitudes de onda consecutivas.

$$dA = \frac{A_{\lambda_1} - A_{\lambda_1 + \delta}}{\Delta\lambda} \quad (6)$$

La derivada reduce la correlación entre variables. Presenta el inconveniente de magnificar el ruido en la señal, por lo que habitualmente se utilizan métodos de suavizado de la señal. Derivadas de orden superior, se obtienen aplicando sucesivamente la derivada, aunque no suelen utilizarse superiores a orden 2 (segunda derivada), ya que decrece la relación señal-ruido [19, 21, 25].

### 2.2.4 Normalizado

Es una familia de transformaciones, con el propósito de dar a los espectros, la misma escala. La utilizada en esta tesis es la mean normalization (normalización media), donde el área bajo la curva de cada espectro, es la misma.

## 2.3 Selección del conjunto de muestras de calibración

Para la selección del conjunto de calibración, también denominado conjunto de entrenamiento, se deben contemplar todas las fuentes de variabilidad del sistema [22], las cuales pueden ser físicas o químicas. Para este efecto se utilizan técnicas de selección de muestras basadas en el análisis de agrupaciones (cluster análisis) [26], con el fin de seleccionar los espectros que representen en mayoría la población total. La presencia de agrupaciones importantes en el conjunto de calibración puede conducir a errores si no son tomadas en cuenta, por lo que es

importante analizar los datos con el fin de detectar alguna agrupación importante y definir si es factible crear un modelo en general para todas las muestras o si es necesario dividir en grupos las muestras y crear modelos de calibración para los diferentes grupos. La detección de agrupaciones, puede realizarse mediante simple inspección de los “scores” al utilizar el análisis de componentes principales (PCA).

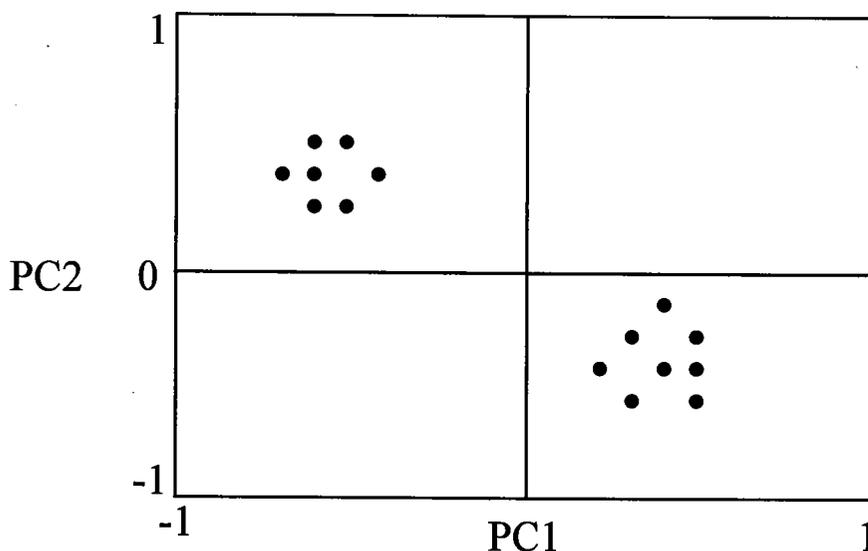


Figura 6. Visualización de los “scores” obtenidos aplicando el análisis de componentes principales (PCA).

## 2.4 Establecimiento del modelo

En los modelos multivariantes, la concentración o cualquier otra propiedad de la muestra, se modela en función de la respuesta, en nuestro caso los espectros NIR, mediante la siguiente expresión[12, 13, 14].

$$c_k = \sum_{j=1}^p x_j b_{j,k} + e_k \quad (7)$$

Donde  $c_k$  es la concentración del analito  $k$  en la muestra,  $x_j$  es la respuesta de la muestra variable  $j$ ,  $b_{j,k}$  es el coeficiente que relaciona la variable  $p$  con la concentración del analito  $k$  y  $e_k$  es el termino del error no modelado por el modelo. Utilizando una notación matricial, en la etapa de calibración con  $n$  muestras, y puede escribirse como:

$$\mathbf{c} = \mathbf{X}\mathbf{b} + \mathbf{e} \quad (8)$$

donde  $\mathbf{c}$  es el vector de las concentraciones del analito para las  $n$  muestras de calibración,  $\mathbf{X}$  es la matriz de espectros de las  $n$  muestras en las  $p$  variables,  $\mathbf{b}$  es el vector de los coeficientes de regresión y  $\mathbf{e}$  el error de los residuales. Los métodos de regresión como PLS, solucionan los problemas de colinealidad que suelen ser común en los datos espectroscópicos, debido a que la matriz de respuestas  $\mathbf{X}$  es descompuesta en factores ortogonales entre si.

## 2.5 Detección de “outliers”

Una de la ventajas del análisis multivariante, frente a otras técnicas de análisis univariante, es la capacidad de para detectar “outliers” o mediciones inconsistentes con el resto de las mediciones.[15, 23]. La detección de los “outliers” se lleva a cabo mediante información obtenida en la etapa del establecimiento del modelo, utilizando la información obtenida del “leverage” y los residuales. Así con la detección de los “outliers” en esta etapa es importante, ya que estos degradan la capacidad predictiva del modelo. El “leverage” es una medida de la influencia de una muestra en relación al modelo, motivo por el cual, muestras con un “leverage” alto están muy alejadas del centro del modelo y tienen gran influencia en el [24]. Este valor se calcula mediante la siguiente expresión

$$h_n = \frac{1}{N} + t_n^T (T^T T)^{-1} t_n \quad (9)$$

donde  $t_n$  representa el vector de “scores” de la muestra  $n$ ,  $T$  es la matriz de “scores” del modelo y  $N$  el numero de muestras de calibración. Los residuales, son el reflejo de la falta de ajuste al reconstruir el espectro con un cierto numero de factores o componentes principales ( $\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{P}^T$ ), es decir

$$\mathbf{E} = \mathbf{X} - \mathbf{T}\mathbf{P}^T \quad (10)$$

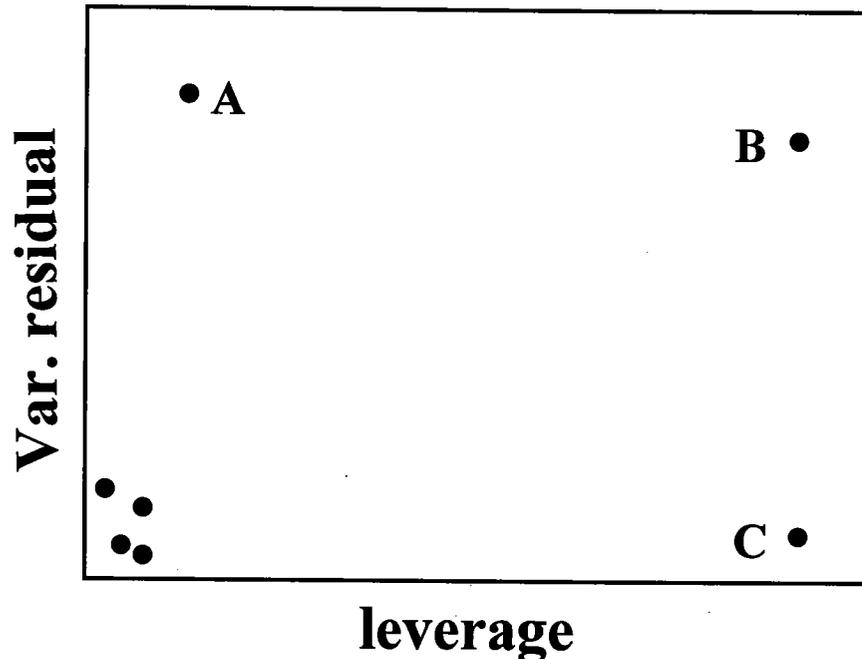


Figura 7. Gráfica del residual frente al “leverage”. A) Objetos con varianza residual elevada son considerados “outliers”, B) también se consideran “outliers” debido a su “leverage” alto, C) se consideran muestras influyentes, más no necesariamente “outliers”, el criterio del investigador es importante en esta medición.

## 2.6 Validación del modelo

Debido a que los modelos de calibración como PLS no se apoyan directamente en un modelo teórico, y pueden incorporar variabilidad de los datos, no necesariamente relacionada con la propiedad de interés, deben ser validados cuantitativamente o cualitativamente. Esta validación como se menciona en la sección 2.1 puede realizarse analizando un grupo de muestras independientes al utilizado en la calibración, con el fin de comprobar que no exista un error sistemático entre las predicciones que realiza el modelo y los valores proporcionados por el método de referencia. También puede realizarse mediante una validación cruzada LOOCV (Leave One Out Cross Validation) descrita

anteriormente. El coeficiente de correlación ( $r$ ) y el error cuadrático medio de la medición (RMSEP), son cantidades que nos indican el grado de concordancia entre las predicciones del modelo y los valores del método de referencia, por lo cual nos dan conocimiento de la validez del modelo para la predicción.

## **2.7 Predicción de muestras desconocidas**

Una vez que el modelo ha sido aceptado, es posible hacer las predicciones de muestras desconocidas, ajenas a las utilizadas para la calibración del modelo, que es precisamente lo mostrado en los capítulos 7, 8 y 9.

## **2.8 Conclusiones**

Como se vio a través de este capítulo, las técnicas de análisis multivariante son una herramienta importante y poderosa para el análisis y procesamiento de datos con gran cantidad de variables; y son utilizadas en diversas áreas del conocimiento como: química, electrónica, economía, espectroscopía, etc. En espectroscopía, el análisis multivariante se utiliza, cuando el objetivo es obtener información cuantitativa o cualitativa de un componente o analito inmerso en una matriz de múltiples componentes. Sin embargo, se debe ser muy cuidadoso al utilizar estas técnicas para la calibración de un modelo de predicción, para modelar solo la estructura espectral que esta relacionada con la propiedad de interés y no el ruido.

# Capítulo 3

## Espectroscopía

### 3.1 Introducción

Actualmente, las espectroscopias ópticas, han despertado gran interés como una herramienta útil para el análisis cuantitativo de muestras biológicas. En particular la espectroscopía en el cercano infrarrojo (NIR), la cual ha sido aplicada para el análisis de algunos parámetros de la sangre, tales como la oxigenación en el tejido y la sangre [43]. La radiación en el cercano infrarrojo entre los 700 y 1300 nm, tiene relativamente una profunda penetración ( $>1\text{cm}$ ) en el tejido, ofreciéndonos la posibilidad de realizar análisis in vivo de una forma no invasiva de este [31].

### 3.2 Espectroscopía NIR

La espectroscopia de absorción en el infrarrojo, es una espectroscopia molecular que se basa en la interacción de la radiación electromagnética con las moléculas. Debido a que la energía de la radiación depende de su longitud de onda, la interacción molecular comprende la excitación de electrones, vibraciones moleculares y rotaciones moleculares [40]. Así, cuando la molécula absorbe radiación infrarroja, su estado de energía vibracional y rotacional cambia, esta última solo puede observarse en muestras gaseosas debido a que las transiciones requieren de muy poca energía, a diferencia de las vibracionales, las cuales pueden observarse en muestras sólidas y líquidas. Las bandas de absorción en el infrarrojo se forman debido a las transiciones entre niveles de energía vibracionales, de modo que cuando el número cuántico vibracional cambia en una unidad, se obtiene lo

que conocemos como banda fundamental (mediano IR) y si cambia en más de una unidad, se le denominan sobretonos (cercano infrarrojo), aunque experimentalmente solo es posible observar tres transiciones [40]. Los modos de vibración de una molécula de  $n$ -átomos es igual a  $(3n-6)$  modos y de  $(3n-5)$  modos, si el lineal y producen cambios en la distancia de enlace o elongaciones, las cuales pueden ser simétricas o asimétricas. También se producen cambios de los ángulos de enlace, los cuales pueden ser simétricos o asimétricos.

Un espectro de absorción infrarrojo nos da simultáneamente información de los múltiples analitos contenidos en una mezcla, es decir, un espectro infrarrojo es una suma de bandas de absorción de los espectros infrarrojos individuales de cada especie química contenida en esa mezcla. Las intensidades relativas de cada espectro individual, es proporcional a la concentración de estos en la mezcla, por lo cual, es posible cuantificar la proporción de ellos. Generalmente se le nombra como cercano infrarrojo, a la región espectral comprendida entre los 780-2500 nm. Las frecuencias vibracionales predominantes en el cercano infrarrojo corresponden principalmente a vibraciones de estiramiento de grupos C-H, O-H, y en menor grado a grupos N-H. Una de las ventajas de la técnica NIR sobre otras técnicas vibracionales es que penetra fácilmente en el tejido de plantas y animales, lo cual tiene aplicaciones biomédicas. Los espectros NIR consisten generalmente como ya se mencionó de una superposición de bandas, las cuales en apariencia no aportan gran información, sin embargo, el uso de técnicas de análisis multivariante para el procesamiento de estos datos espectrales son utilizados para un análisis cuantitativo. Tradicionalmente, la espectroscopia NIR es utilizada en el análisis de polímeros, parafinas, polímeros basados en glucosas como la celulosa, aminoácidos, carbohidratos, y en nuestro caso de tejido humano, sangre y suero. Hay que recalcar el hecho de que un espectro NIR es la unión de las funciones instrumentales de la medición y las características ópticas de la muestra analizada, es decir, la muestra es un elemento ópticamente activo del espectrómetro. Un espectro NIR, puede o no puede contener información relacionada con la muestra analizada por un determinado método de referencia. De esta forma, la estructura espectral nos permite conocer la relación causa y efecto entre la respuesta del

instrumento y los datos de referencia, lo cual sienta las bases científicas para la calibración multivariante utilizando espectroscopia NIR. [42, 45].

### 3.3 Proceso de absorción de luz

Cuando la radiación de luz incide sobre la materia compuesta de cargas eléctricas discretas, las cargas se ven forzadas a oscilar a una frecuencia igual a la del campo eléctrico de esta radiación incidente. El rango de estas frecuencias en la región infrarroja del espectro electromagnético (aprox. 300THz – 300GHz), es comparable a las frecuencias naturales de los átomos o moléculas en ausencia de un campo aplicado. De esta forma, cuando la radiación infrarroja incide en la materia, ocurre un fenómeno de resonancia, lo cual origina que la amplitud aumente para esas frecuencias. Aunque el tiempo de excitación de la molécula es de alrededor de  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$  segundos, los átomos y moléculas sufren pérdidas debido a su vecindad con otros átomos en  $10^{-12}$  segundos y por consecuencia, existe una pérdida de energía cinética de las otras partículas involucradas en las colisiones. Por lo tanto, la energía asociada a la radiación electromagnética incidente es a menudo disipada en forma de calor y a este proceso se le conoce como absorción. [ 32, 44]. La relación entre la intensidad de la luz absorbida en un medio y el espesor de este, fue determinada por primera por Bouguer. Algunos años después Lambert dedujo la siguiente expresión matemática, conocida como Ley de Lambert-Bouguer:

$$\frac{dI}{I} = \mu_a dl \quad (11)$$

esta ecuación, nos describe como las capas sucesivas del medio absorben la misma fracción  $dI/I$  de la intensidad incidente para una constante  $\mu_a$ , el cual es conocido como coeficiente de absorción, el cual tiene longitud del inverso de la longitud de onda. De forma que para la intensidad de luz incidente  $I_0$ , la intensidad de luz transmitida para una cierta distancia  $l$  es:

$$I = I_0 e^{-\mu_a l} \quad (12)$$

El coeficiente de absorción  $\mu_a$ , puede ser interpretado como la probabilidad de que un fotón sea absorbido por el medio por unidad de longitud. Al recíproco del coeficiente de absorción, se le conoce como longitud de absorción y es la distancia requerida para que la intensidad de luz decaiga en  $e^{-1}$  veces la intensidad inicial. Si esta expresión se expresa en forma logarítmica base 10, la expresión es la siguiente:

$$I = I_0 10^{-Kl} \quad (13)$$

donde  $K$  es una constante conocida como constante de extinción. Así, la absorbancia del medio es definida como el  $\log_{10}$  de la razón entre la intensidad incidente y la transmitida.

$$A = \log_{10} \left( \frac{I_0}{I} \right) = Kl \quad (14)$$

las unidades para la absorbancia son la “densidad óptica” (DO). Las unidades para  $K$  son DO por unidad de longitud. Conceptualmente, podemos decir que el coeficiente de extinción y el de absorción son lo mismo, solo que difieren en la base del logaritmo utilizado en la expresión de Lambert-Bouguer. De lo cual, para la misma unidad de longitud, el coeficiente de extinción está relacionado de forma cuantitativa al coeficiente de absorción, por un factor de 0.434.

Años después Beer determinó que el coeficiente de un compuesto, está linealmente relacionado con su concentración  $c$  diluida en un medio sin absorción. [ 30.].

$$\mu_a = \alpha c \quad (15)$$

donde  $\alpha$  es un coeficiente de absorción específico. Entonces, substituyendo en la ley de Lambert-Bouguer, se obtiene la expresión conocida como la ley de Beer-Lambert.

$$I = I_0 e^{-\alpha c l} \quad (16)$$

expresando esta ecuación en  $\log_{10}$  se obtiene

$$I = I_0 10^{-\epsilon c l} \quad (17)$$

donde  $\epsilon$  es un coeficiente de extinción específico con unidades de OD sobre unidades de longitud. Por ejemplo, para una solución compuesta de  $n$  componentes absorbentes, la absorbancia total es la suma de los coeficientes de absorción individuales multiplicados por la distancia  $l$

$$\begin{aligned} A &= (K_1 + K_2 + \dots + K_n)l \\ &= (\epsilon_1 c_1 + \epsilon_2 c_2 + \dots + \epsilon_n c_n)l \end{aligned} \quad (18)$$

La ley de Beer-Lambert solo es válida bajo ciertas condiciones, una de ellas es que la luz incidente debe ser monocromática y perfectamente colimada y el medio de absorción debe ser puro y uniforme. Por lo cual, al aplicar la ley existen ciertos errores debidos a la luz de incidencia, ya que generalmente no es perfectamente monocromática. [ 34 ].

Existen muchos compuestos en los tejidos biológicos, los cuales absorben radiación, estos son conocidos como cromóforos, cada uno de los cuales tiene un espectro único. De forma que, como se explico anteriormente, el coeficiente de extinción de una mezcla de compuestos, es igual a la suma de sus coeficientes de extinción individuales dados por sus concentraciones relativas, por lo tanto, si tratamos al tejido como una mezcla homogénea de compuestos, la absorción de radiación en el tejido para una longitud de onda dada, depende del tipo y de la

concentración del cromóforo presente en el tejido. A continuación, se discutirán algunos cromóforos presentes en la sangre para los espectros de absorción NIR.

### 3.3.1 Agua

El agua es la sustancia química mas abundante en el cuerpo humano, la cual va de un 60 a 80% de la masa total del cuerpo [39]. El contenido de agua en el tejido, varia según el tipo de piel, la edad y el sexo de la persona [44]. Debido a su alta concentración en la mayoría de los tejidos biológicos, el agua es considerada como uno de los cromóforos mas importantes en las mediciones espectroscópicas de tejido. En la figura 8 se muestra un espectro NIR de agua en el rango de los 850 a los 1700 nm. En este espectro se pueden observar 3 bandas de absorción bien definidas, centradas en aproximadamente 970, 1180 y 1500 nm, estas bandas son asignadas a sobretonos de vibración de las frecuencias fundamentales de grupos OH y CH de los componentes principales del tejido, como lo son agua, glucosa, hemoglobina , lípidos y proteínas. Se ha reportado que la absorción en 939 nm, es debida a un sobretono  $3\nu\text{OH}$ , la absorción en 1126 nm a un sobretono  $3\nu\text{CH}$ , asimismo la absorción en 1408 nm es asignada a un primer sobretono  $2\nu\text{OH}$ . La banda en 1500 nm es debida a una combinación de vibración de grupos OH y CH ( $\nu\text{OH} + \nu\text{CH}$ ), la absorción en 1688 nm es asignada a un sobretono  $2\nu\text{CH}$  [33, 36]. Cabe recalcar que en el tejido, el agua no se encuentra en una forma “pura”, sino que se encuentra ligada con otras bio-moléculas, iones y formando puentes de hidrógeno, por lo cual el agua en el tejido puede ser clasificada en tres tipos: de enlace fuerte, de enlace débil, y agua no enlazada, por lo cual estas interacciones de las moléculas de agua dan como resultado diferencias en los espectros del agua no enlazada y la enlazada [38]. Pero no profundizaremos en este tema.

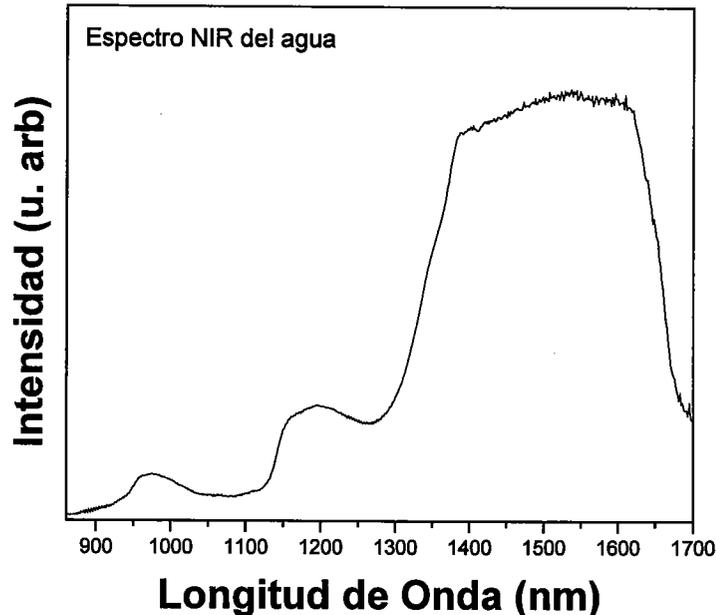


Figura 8. Espectro NIR de agua en el rango de los 850 a los 1700 nm.

### 3.3.2 Hemoglobina

Mientras que el agua muestra una ventana transparente o de baja absorción de los 200 a los 900 nm, la hemoglobina presenta sus bandas de absorción más intensas en esta región. La hemoglobina, es transportada por los glóbulos rojos o eritrocitos y constituye cerca del 40-45% del total de la sangre. La hemoglobina es la responsable de transportar el oxígeno a todas las partes del cuerpo y de atrapar gases como el dióxido de carbono al exhalar. La hemoglobina está formada por una proteína llamada Globin, la cual está enlazada a cuatro grupos heme, estos tienen una estructura tipo anillo, la cual contiene un átomo central de hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Debido a la gran afinidad que existe entre el hierro y el oxígeno, la molécula de la hemoglobina puede transportar cuatro moléculas de oxígeno y cuando ocurre esto, se dice que la molécula está 100% saturada. Así, para el caso en que la hemoglobina está oxigenada se le denomina oxihemoglobina ( $\text{HbO}_2$ ) y cuando no está unida a oxígeno, se le denomina desoxihemoglobina (Hb). Estos dos estados de la hemoglobina, presentan espectros NIR totalmente diferentes uno de otro [34].

### 3.3.3 Lípidos

La mayoría de los lípidos en el cuerpo, se encuentran en forma de triglicéridos y se encuentran en el tejido subcutáneo, cubriendo órganos internos. Los fosfolípidos, es otro grupo de lípidos, estos forman parte importante de la membrana celular, motivo por el cual se encuentran en cada órgano del cuerpo. La presencia de lípidos en el cerebro varía de acuerdo con la edad, desde el 2.6% para un recién nacido, hasta un 11.6% en adultos. [44]. En el tejido adiposo, en la subdermis, la concentración de lípidos varía también con la edad, en un rango de 23-47% para recién nacidos y de 68-87% para adultos.[44].

## 3.4 Reflectancia difusa

Las mediciones por reflectancia difusa, están basadas en el fenómeno de reflexión. Cuando la luz se hace incidir sobre una muestra opaca no absorbente, se da el fenómeno de reflexión especular, este fenómeno se rige por las ecuaciones de Fresnel, donde la intensidad reflejada depende de los índices de refracción del aire y de la muestra. Cuando la luz incide sobre una superficie irregular, la frontera entre el medio y la muestra, se puede considerar como una serie de interfases orientadas a diferentes ángulos, de modo que el efecto de reflexión global es una reflexión de la luz a cualquier ángulo. Por lo tanto, la radiación que se transmite a través de la primera interfase puede sufrir absorción, causando que la intensidad de la luz incidente se vea atenuada por la ley de Beer. La radiación que ha atravesado la primera capa de partículas, se difunde a las siguientes mediante reflexiones, refracciones y dispersiones aleatorias, sufriendo a su vez, nuevos fenómenos de atenuación. Debido a la complejidad matemática para describir el recorrido seguido por la luz en este tipo de fenómeno, se han propuesto teorías empíricas como; la de Kubelka-Munk [35, 37], la cual supone una capa opaca y de grosor infinito, donde la reflectancia viene dada por la siguiente expresión:

$$R_{\infty} = 1 + \frac{K}{S} - \left( \frac{K^2}{S^2} + 2 \frac{K}{S} \right)^{1/2} \quad (19)$$

donde  $R_{\infty}$  es la reflectancia de la capa infinita y gruesa.  $K$  y  $S$  son las constantes de dispersión y absorción.

El coeficiente de absorción,  $K$ , es igual a la concentración multiplicada por el coeficiente de absorción definidos en la ley de Beer ( $\epsilon c$ ). La reflectancia difusa se mide respecto a un estándar no absorbente, calculando después el logaritmo para llegar a una relación lineal con la concentración [41].

$$\log \frac{R_{stand}}{R} = \log \frac{1}{R} + \log R_{stand} \propto \frac{\epsilon}{S} \quad (20)$$

donde  $R$  y  $R_{stand}$  representan la reflectancia de la muestra y el estándar respectivamente. Para una luz monocromática,  $R_{stand}$  es constante y puede ser ignorado. Si se cumple la condición de aditividad del espectro, la expresión anterior puede ser reescrita como:

$$c = K + \frac{S}{\epsilon} \log \frac{1}{R} \quad (21)$$

Donde como en la ley de Beer, existe una relación entre la concentración ( $c$ ) y la radiación medida del espectro.

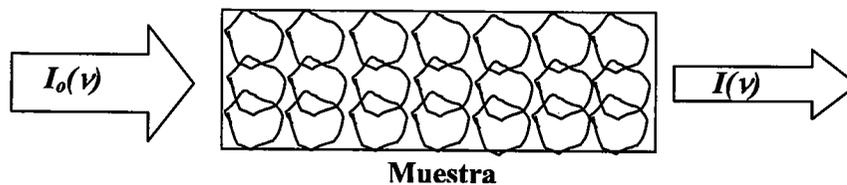


Figura 9. Representación grafica del fenómeno de absorción, por la técnica de transmisión.

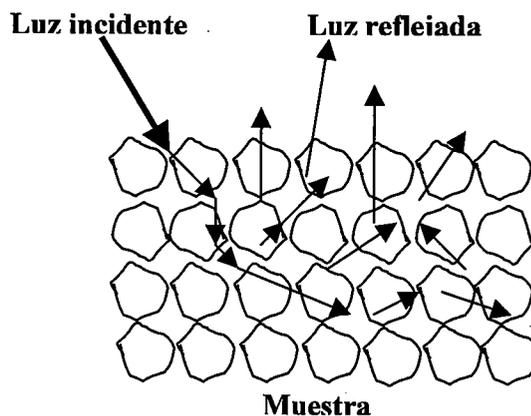


Figura 10. Representación gráfica del fenómeno de absorción por la técnica de reflectancia difusa.

### 3.5 Conclusiones

La espectroscopía de absorción en el cercano infrarrojo, es una técnica muy útil para la caracterización de materiales biológicos. Debido a sus propiedades, utilizando espectroscopía NIR, es posible detectar y cuantificar de una forma sencilla, rápida y no destructiva, analitos inmersos en una matriz de múltiples componentes, haciendo el uso de una óptica muy versátil, que nos permite el uso de fibras ópticas para la medición de espectros de absorción. Además, las bandas de absorción NIR presentes en el rango de los 780 a los 2500 nm, provee abundante información química comparable a la que se obtiene en la región del mediano infrarrojo (MIR), pero sin las limitaciones instrumentales que esta presenta.

# Capítulo 4

## Cálculos ab initio

### 4.1 Introducción

La glucosa constituye uno de los carbohidratos esenciales en el cuerpo humano, ya que funciona como fuente de energía para las células del cuerpo, como soporte estructural, controlador de agua, actúa en la función de reconocimiento molecular y crea resistencia contra ciertos fármacos y organismos. En la actualidad existen algunas interrogantes relacionadas con carbohidratos como la glucosa o glucopiranosas, los cuales aun no han sido explicados del todo. Una de estas interrogantes son su comportamiento en una solución acuosa. [53]. La fórmula de la glucosa es  $C_6H_{12}O_6$ , y su estructura principal, consiste de un anillo de seis miembros en una conformación de silla  $C_1$ , con un grupo hidroximetil y cuatro grupos hidroxilo. La glucosa puede ser encontrada en dos formas anoméricas, alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ), las cuales difieren en la orientación del enlace  $C_1-O_1$ . Tradicionalmente se ha creído que el anómero alfa es más estable que el anómero beta en fase gaseosa, debido al llamado “efecto anomérico”. [48,49,52]. Pero los resultados experimentales muestran que la razón del anómero alfa respecto al beta en solución acuosa a temperatura ambiente es de 36:64. Esta abundancia del anómero beta en agua, solo puede ser explicada, si se consideran los efectos de solvatación. [50,54,56].

## 4.2 Métodos computacionales

Para los cálculos teóricos de la molécula de glucosa, se utilizó la teoría funcional de la densidad (DFT) utilizando el método de correlación funcional Becke-Lee-Yang-Parr (BLYP), y el método Hartree-Fock Restringido (RHF), llevados a cabo en el programa de computación Gaussian 98, utilizando funciones base tipo Gausianas. [51]. Los cálculos fueron realizados para ambos anómeros, en vacío y en agua, utilizando los métodos autoconsistentes de reacción de campo (SCRF) para los cálculos en solvente y DFT para los cálculos en vacío. Para todos los casos se optimizó la geometría de la molécula de cada anómero. El número asignado a los átomos de la glucosa, fueron tomados de la notación estándar, como se muestra en la figura 11.

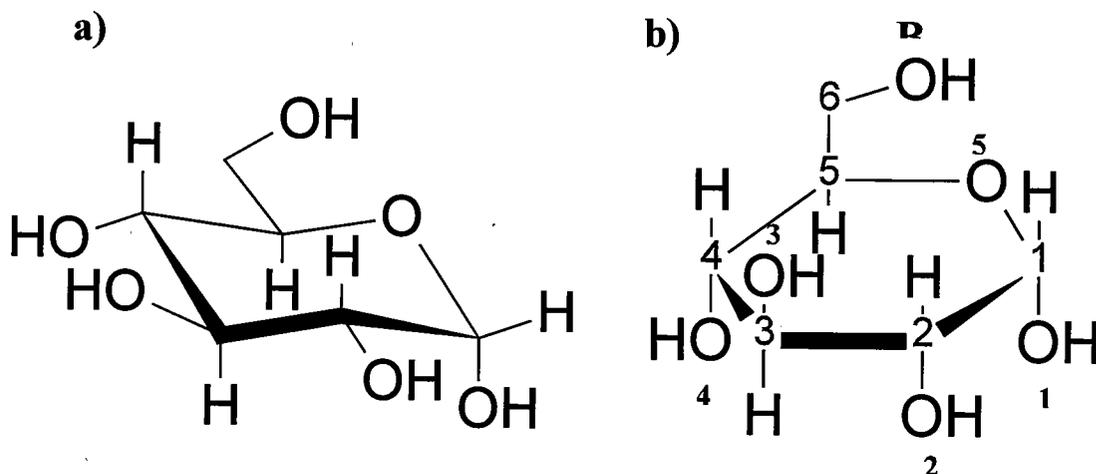


Figura. 11. Representación estructural de la D-glucopiranos (glucosa), (a) Representación de silla y (b) representación de Haworth, los átomos de carbón y oxígenos fueron enumerados de acuerdo a la numeración estándar.

## 4.3 Métodos experimentales

Los espectros Raman y de absorción IR, fueron colectados utilizando un espectrómetro Infrarrojo Nicolet Avatar 360, y un sistema Micro Raman de Jobin-Yvon SPEX, equipado con un CCD-3000 enfriado con nitrógeno líquido, un

microscopio Olympus BX41, y un láser de 532 nm con una potencia máxima de salida de 50mW, respectivamente.

## 4.4 Resultados y Discusión

Se encontró que la energía obtenida para la estructura optima para el anómero alfa de la glucosa en vacío como medio, fue de  $-431058.91$  Kcal/mol, de  $-428809.92$  Kcal/mol en agua como medio, obteniéndose una diferencia energética de  $2248.98$  Kcal/mol. También se obtuvieron diferencias en el ángulo diedral, formado por los átomos O5-C5-C6-O6 (grupo hidroximetil), los cuales fueron de  $59.8^\circ$  en agua como medio, y de  $58.3^\circ$  en vacío, para el anómero alfa. Estos ángulos pertenecen a la configuración (gauche) G<sup>+</sup> ( $\approx 60^\circ$ ), la cual es asociada con una rotación interna de los carbonos C5-C6. [54]. Para la beta glucosa los parámetros energéticos de optimización estructural fueron de  $-431057.731$  Kcal/mol en vacío, y de  $-428809.086$  Kcal/mol en agua, obteniendo una diferencia en energía de  $2248.64$  Kcal/mol. El ángulo diedral calculado para la beta glucosa en agua fue de  $59.7^\circ$ , y de  $58.4^\circ$  en vacío. Los cálculos para ambos anómeros en vacío, fueron llevados a cabo bajo la siguiente sentencia en el programa de computo, realizada en dos pasos.

Paso 1: #BLYP/6-31g(d) foft freq=Raman gfprint pop=full

Paso 2: #N Geom=AllCheck Guess=Tcheck RBLYP/6-31G(d) Freq

El tiempo CPU requerido para llevar a cabo los cálculos fue de aproximadamente 12 horas, en una estación de trabajo Compaq EVO W6000 con doble procesador. De acuerdo con los resultados anteriores y con los calculados para los anómero alfa y beta de la glucosa en agua, llevados a cabo utilizando el método de isodensidad (SCRF=IPCM) y el B3LYP, los resultados en energía para el anómero alfa de la glucosa fue de  $-431231.19$  Kcal/mol y de  $-431237.25$  Kcal/mol, para el anómero beta, lo cual nos da una diferencia en energía de  $6.06$  Kcal/mol. Los valores de frecuencia predichos por el método HF/6-31G(d) contienen un error sistemático debido a la correlación de repulsión electrónica, lo cual nos da un

corrimiento de aproximadamente del 10 al 12% del valor real. Debido a este corrimiento, las frecuencias predichas por el método de Hartree-Fock se escalan en un factor de 0.8929 y para el método BLYP/6-31G(d) por un factor de 0.9940. [51]. Se ha demostrado que estos factores de escalamiento, producen buenos ajustes con los datos experimentales. En las figuras 12 y 13, se muestran los espectros infrarrojos y Raman para ambos anómeros de la glucosa.

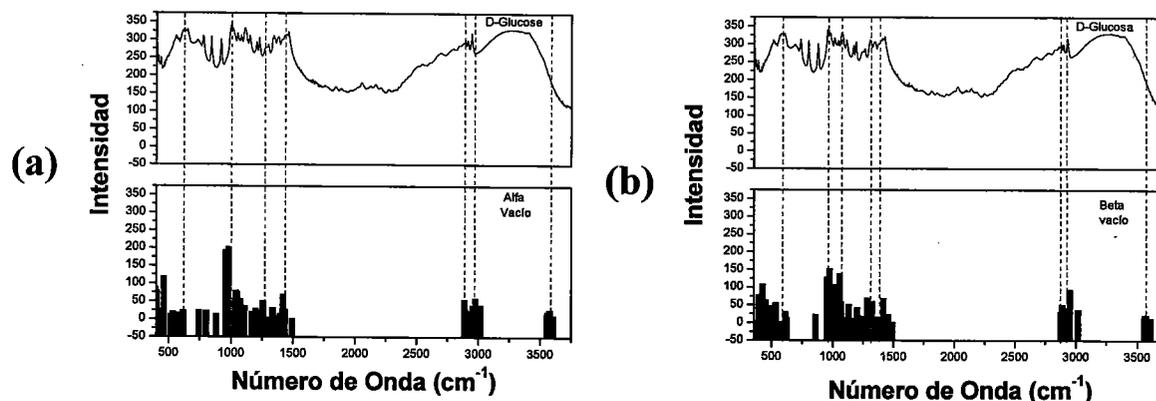


Figura 12. Espectros Infrarrojos experimentales y teóricos de (a) alfa glucosa y (b) beta glucosa.

Los cálculos para los anómeros de la glucosa en agua, fueron procesados utilizando un modelo SCRF (Self-Consistent Reaction Field), en particular el modelo de campo de reacción de Osanger. [ 51 ]. Estos métodos modelan el solvente como un continuo de constante dieléctrica  $\epsilon$  (Campo de reacción), y el soluto es colocado en una cavidad dentro del solvente. Las aproximaciones SCRF difieren en la manera como definen la cavidad y el campo de reacción. Los cálculos fueron realizados mediante las siguientes sentencias:

Paso 1: # RHF/6-31+G(D) SCRF=Dipole Opt test

Paso 2: # RHF/6-31+G(D) SCRF=Dipole Freq test Guess=Read Geom=Allcheck

Para los cálculos, se utilizó una constante dieléctrica para el agua  $\epsilon = 79.39$  y un radio de la cavidad  $a_0 = 6.95 \text{ \AA}$ . El tiempo de cálculo CPU fue de aproximadamente cuatro horas, para ambas moléculas.

En las figuras 12(a) y 12(b) se muestran los espectros infrarrojos experimentales y las frecuencias vibracionales teóricas para ambos anómeros de la glucosa en vacío. En la figura 13 y la tabla 3, se muestran los espectros Raman experimentales, y las frecuencias Raman activas calculadas para ambos anómeros, en agua y en vacío.

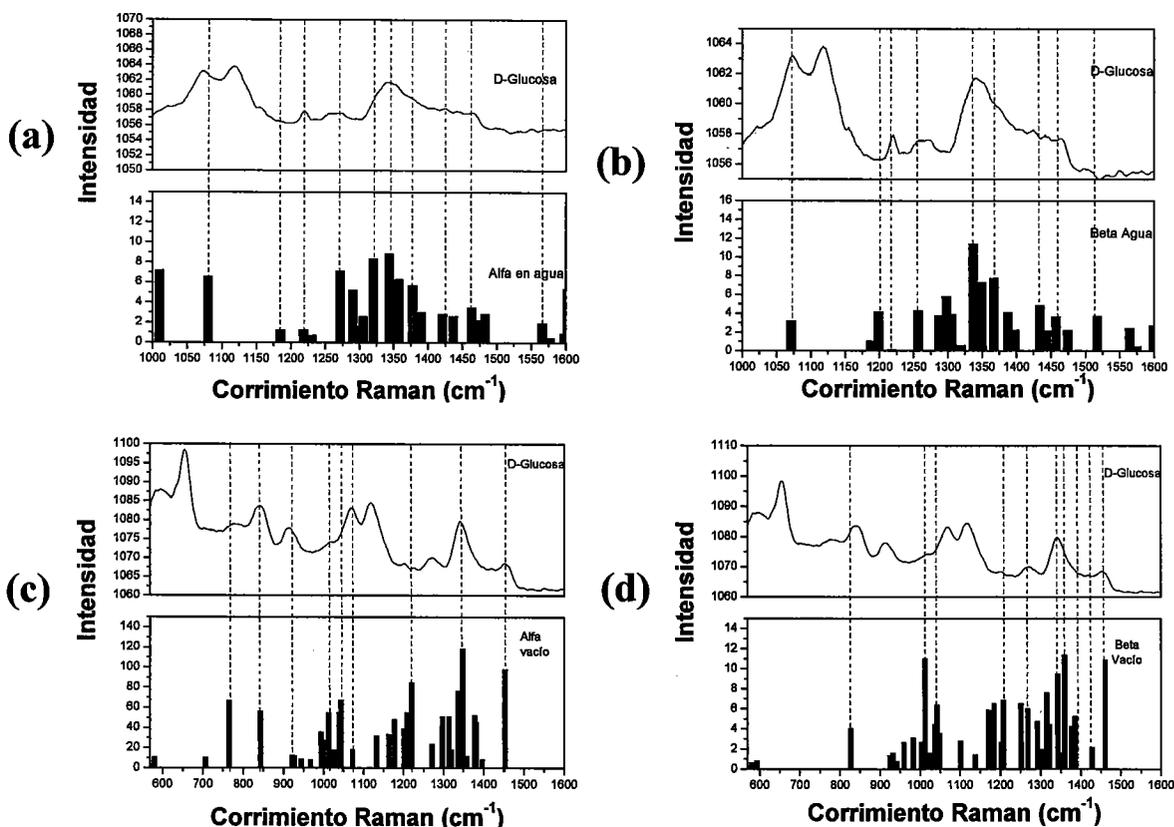


Figura 13. Espectros Raman experimentales y teóricos para los anómeros  $\alpha$  y  $\beta$  de la glucosa en (a), (b) agua como medio y (c), (d) vacío.

Tabla 2. Métodos computacionales y valores de energía de los anómeros de la glucosa.

ANOMERO	METODO	ENERGÍA (Kcal / mol)	MEDIO
Alfa	BLYP/6-31g(d)	-431058.910	Vacío
Beta	BLYP/6-31g(d)	-431057.731	Vacío
Alfa	RHF/6-31+G(D) SCRF=Dipole	-428809.925	Agua
Beta	RHF/6-31+G(D) SCRF=Dipole	-428809.086	Agua
Alfa	B3LYP/6-31+G(d) SCRF(IPCM)	-431231.195	Agua
Beta	B3LYP/6-31+G(d) SCRF(IPCM)	-431237.259	Agua

**Tabla 3. Distancias de enlace en ángstroms entre los átomos de ambos anómeros de la glucosa**

Enlace	Distancia de enlace $\alpha$ -glucose/vacío (Å)	Distancia de enlace $\alpha$ -glucose/agua (Å)	Distancia de enlace $\beta$ -glucose/vacío (Å)	Distancia de enlace $\beta$ -glucose/agua (Å)
C <sub>1</sub> -O <sub>5</sub>	1.447	1.399	1.458	1.404
C <sub>1</sub> -H	1.104	1.081	1.112	1.089
C <sub>1</sub> -C <sub>2</sub>	1.545	1.523	1.541	1.521
C <sub>1</sub> -O <sub>1</sub>	1.418	1.382	1.400	1.371
C <sub>2</sub> -O <sub>2</sub>	1.429	1.392	1.433	1.395
C <sub>2</sub> -H	1.111	1.088	1.109	1.087
C <sub>2</sub> -C <sub>3</sub>	1.539	1.520	1.540	1.523
C <sub>3</sub> -C <sub>4</sub>	1.538	1.521	1.536	1.519
C <sub>3</sub> -O <sub>3</sub>	1.443	1.404	1.440	1.401
C <sub>3</sub> -H	1.107	1.085	1.111	1.088
C <sub>4</sub> -H	1.108	1.087	1.107	1.087
C <sub>4</sub> -C <sub>5</sub>	1.548	1.530	1.548	1.528
C <sub>4</sub> -O <sub>4</sub>	1.452	1.409	1.452	1.408
C <sub>5</sub> -O <sub>5</sub>	1.464	1.418	1.452	1.409
C <sub>5</sub> -C <sub>6</sub>	1.536	1.519	1.537	1.519
C <sub>5</sub> -H	1.104	1.084	1.110	1.089
C <sub>6</sub> -O <sub>6</sub>	1.431	1.397	1.430	1.396
C <sub>6</sub> -H	1.112	1.088	1.112	1.088
C <sub>6</sub> -H	1.103	1.082	1.103	1.082
O <sub>8</sub> -H	0.982	0.948	0.982	0.948
O <sub>9</sub> -H	0.983	0.949	0.983	0.949
O <sub>10</sub> -H	0.982	0.948	0.983	0.949
O <sub>11</sub> -H	0.980	0.946	0.980	0.946
O <sub>12</sub> -H	0.983	0.948	0.984	0.948

En las gráficas se observa una gran coincidencia con las frecuencias calculadas y los espectros medidos en el rango de los 400 a los 3700  $\text{cm}^{-1}$ , para los espectros de absorción infrarrojo y de los 600 a los 1600  $\text{cm}^{-1}$ , para los espectros Raman. En los espectros IR, figuras 12(a) y 12(b), observamos que la región de absorción de la D-glucosa, ajusta muy bien con las frecuencias calculadas en el rango de los 450 a los 3700  $\text{cm}^{-1}$  para ambos anómeros y un medio continuo, sin complejos de agua. La región entre los 450 y 1500  $\text{cm}^{-1}$ , presenta diferencias debido a la orientación axial y ecuatorial de los modos vibracionales de los grupos C-O y C-C, estos modos vibracionales muestran bandas características, las cuales están presentes en la mayoría de los carbohidratos.

Las bandas en el rango de los 2700 a los 3700  $\text{cm}^{-1}$ , son asignadas a vibraciones de grupos C-H y O-H, y son muy similares en los espectros calculados para ambos anómeros. De acuerdo con los espectros calculados y los experimentales, la principal diferencia espectral entre los anómeros alfa y beta de la glucosa, viene dada en los picos centrados en 774, 841 y 918  $\text{cm}^{-1}$ , este último pico es asociado con ambos anómeros, pero los primeros dos, están asociados solo al anómero alfa. Asimismo, los picos en 995, 1046, 1148, 1203 y 1290  $\text{cm}^{-1}$  coinciden con los picos para la alfa glucosa, mientras que los picos en 1016, 1080, 1110, 1332 y 1340  $\text{cm}^{-1}$ , coinciden con los del anómero beta. Estos resultados concuerdan, con lo reportado por Suzuki y Sota. [57]. Estos autores reportaron espectros IR calculados en el rango de los 950 a los 1200  $\text{cm}^{-1}$  para complejos de agua. Sin embargo, nuestras conclusiones son diferentes, ya que nosotros reproducimos los espectros IR sin tomar en cuenta las moléculas de agua alrededor de la molécula de glucosa. En las figuras de la 13(a) a la 13(d), se muestran los espectros Raman calculados y experimentales de la glucosa, en la región comprendida de los 600 a los 1600  $\text{cm}^{-1}$ , para ambos anómeros en un medio continuo y en complejos de agua para el anómero alfa de la glucosa. En general, se obtuvo una muy buena concordancia con los espectros experimentales y los calculados. Las principales diferencias entre la alfa y beta glucosa, se encuentra en la llamada región anomérica, la cual comprende de los 600 a los 950  $\text{cm}^{-1}$ . La región de los 950 a los 1200  $\text{cm}^{-1}$ , y de los 1200 a los 1500  $\text{cm}^{-1}$ , es asignada a la deformación de los grupos  $\text{CH}_2$  y C-O-H respectivamente y se muestra una gran correspondencia entre los espectros teóricos y los experimentales. En esta región ambos anómeros contribuyen. En la región anomérica, se observan unas bandas que exhiben cinco picos, en aproximadamente 596, 654, 780, 839 y 913  $\text{cm}^{-1}$ , de los cuales, la mayor similitud de estos corresponde al anómero alfa de la glucosa, mientras que el anómero beta casi no presenta actividad óptica para esta región. De igual forma, los picos centrados en los 780, 839 y 913  $\text{cm}^{-1}$ , ajustan muy bien con los espectros calculados, lo cual está en acuerdo con lo reportado previamente por Baker et al [46]. Para el pico de 913  $\text{cm}^{-1}$ , el cual atribuye este modo a la vibración del anillo del anómero alfa. [46, 47]. El pico en 839  $\text{cm}^{-1}$ , muestra un hombro que se corre

hacia bajas longitudes de onda, esta doble contribución es indicativo de la presencia de ambos anómeros, lo cual va en acuerdo con nuestros resultados; la vibración calculada para el anómero beta se encuentra en alrededor de los  $827\text{cm}^{-1}$ .

## 4.5 Conclusiones

Utilizando DFT junto con el modelo B3LYP y el de reacción de Osanger, fue posible obtener las geometrías energéticamente óptimas para los anómeros alfa y beta de la glucosa en agua y en vacío, de lo cual se pudieron comprobar los resultados experimentales obtenidos para la mayor estabilidad en agua del anómero beta. También se obtuvieron los espectros infrarrojos y Raman para ambos anómeros, obteniendo gran concordancia con los resultados experimentales. Además, con las frecuencias de vibración obtenidas teóricamente, para la región del mediano infrarrojo, podemos dar una interpretación de las bandas de absorción en el NIR.

# Capítulo 5

## Soluciones Simples

### 5.1 Introducción

En esta sección se presentan los resultados experimentales obtenidos para la predicción de la concentración de azúcar en agua y de etanol en agua, utilizando espectroscopía de absorción en el cercano infrarrojo (NIR). Estos resultados nos dieron las bases experimentales para la generación de modelos de calibración y la predicción de azúcar y etanol en una solución acuosa, para después extrapolarlo a soluciones mas complejas, como se mostrará en capítulos mas adelante.

### 5.2 Procedimiento experimental

Para el experimento con azúcar en agua, se prepararon catorce soluciones en un rango de concentraciones de azúcar en agua de los  $0.02 \text{ g/cm}^3$  a los  $0.36 \text{ g/cm}^3$ . Las cantidades agregadas de azúcar fueron de 1g a los 18g disuelta en 50 ml de agua destilada. La temperatura de las soluciones se mantuvo constante para todas las concentraciones. Para el experimento con etanol, se prepararon once soluciones de etanol grado reactivo en agua destilada en un rango de concentraciones de etanol de 0 a 100 % en volumen.

El procedimiento de preparación de las soluciones de azúcar en agua fue el siguiente: primeramente se calentó el agua en una estufa a  $50^\circ\text{C}$ , posteriormente se le agregaba el azúcar y se agitaba con un agitador magnético, hasta que se disolviera toda el azúcar. Una vez realizado lo anterior, se colectaron los espectros

de absorción en el cercano infrarrojo para las diferentes concentraciones de azúcar en agua.

Las soluciones de etanol en agua fueron preparadas a temperatura ambiente, mezclando solo la concentración de etanol en agua, para un volumen total de 50 ml. Inmediatamente después de esto la solución era medida en el espectrofotómetro NIR.

### 5.3 Calibración del modelo de predicción

Para la calibración del modelo de predicción de azúcar en agua de las 14 muestras, se generó una matriz  $X$  de 14 x 512 elementos, donde cada una de las 14 filas pertenecía a un espectro de absorción NIR de 512 variables, asimismo se generó una matriz  $Y$  de concentraciones de azúcar en agua de cada espectro, de 14 x 1 elementos. Para la calibración del modelo y la predicción se eligieron dos componentes principales (PC's) de acuerdo con la gráfica de la figura 14, donde se grafica la varianza total contra el número de componentes, donde el mínimo localizado en esta gráfica, nos indica el número óptimo de PCs para la calibración del modelo de predicción. La validación cruzada (LOOCV) o full cross validation para este modelo se muestra en la figura 17. También en la figura 18 se muestra el vector de regresión o vector  $B$  obtenido para este modelo.

Para el experimento de etanol en agua, la matriz  $X$  de espectros utilizada para la calibración fue de 11 x 512 elementos, con una matriz  $Y$  de concentraciones de 11 x 1, se eligieron cuatro componentes principales (figura 15), debido a que son las que representan la mayor varianza explicada del modelo. La validación cruzada para este modelo se muestra en la gráfica 20. El vector de regresión o B-vector se muestra en la figura 21. En la siguiente sección se muestran los resultados obtenidos para cada modelo de predicción.

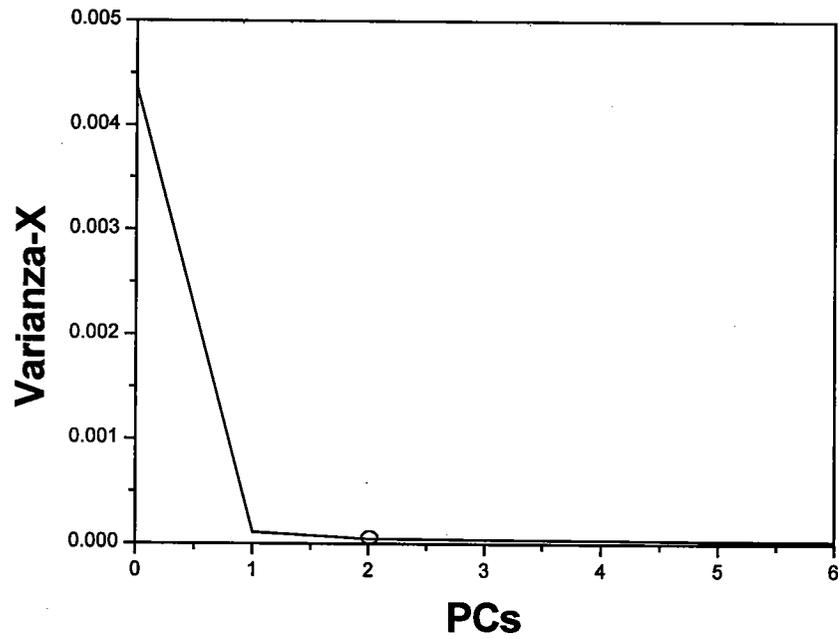


Figura 14. Gráfica de la varianza de X contra el número de componentes principales para el modelo de azúcar en agua, donde se indica cuanta de la variación en los datos esta descrita por las diferentes componentes principales.

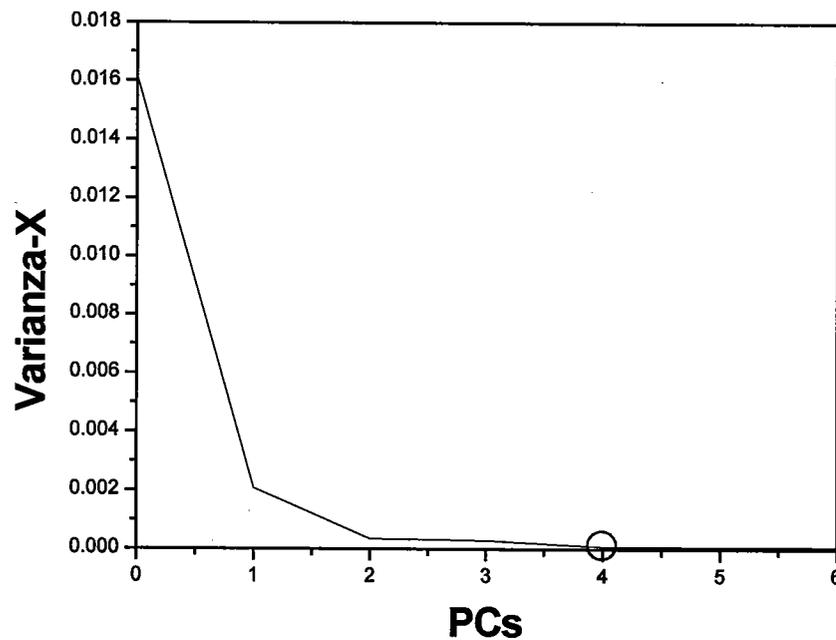


Figura 15. Gráfica de la varianza de X contra el número de componentes principales para el modelo de etanol en agua, donde se indica cuanta de la variación en los datos esta descrita por las diferentes componentes principales.

## 5.4 Resultados experimentales

Los espectros de absorción en el cercano infrarrojo de las mezclas de azúcar con agua, se presentan en la figura 16. Para el rango entre 850 nm y 1750 nm, los espectros presentan bandas de absorción localizadas en 960 nm, 1200 nm y 1500 nm. La banda centrada en 1500 nm es debida a sobretonos de vibraciones de grupos OH, la banda centrada en 1200 nm es asociada a sobretonos de vibraciones de grupos OH y CH y la banda centrada en 960 nm es asociada a sobretonos de vibraciones de grupos OH también, esto de acuerdo con observaciones experimentales realizadas por nosotros y según lo reportado por Yoon G. y colaboradores [4,11,58].

Una vez realizada la predicción, para la validación del modelo se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.99, y un error RMSEP de  $0.012 \text{ g/cm}^3$ , como se observa en la figura 17.

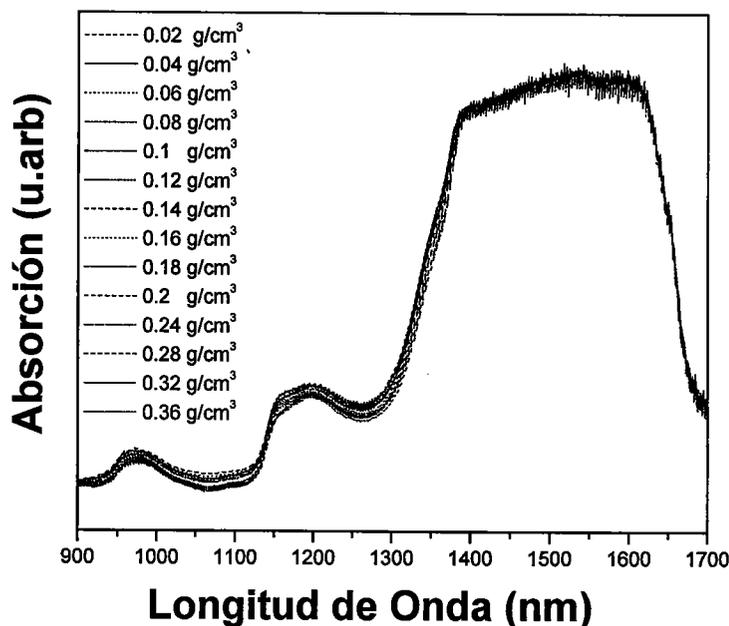


Figura 16. Espectros de absorción en el cercano infrarrojo para el rango entre 900 nm y 1700 nm de las muestras con diferente concentración de azúcar.

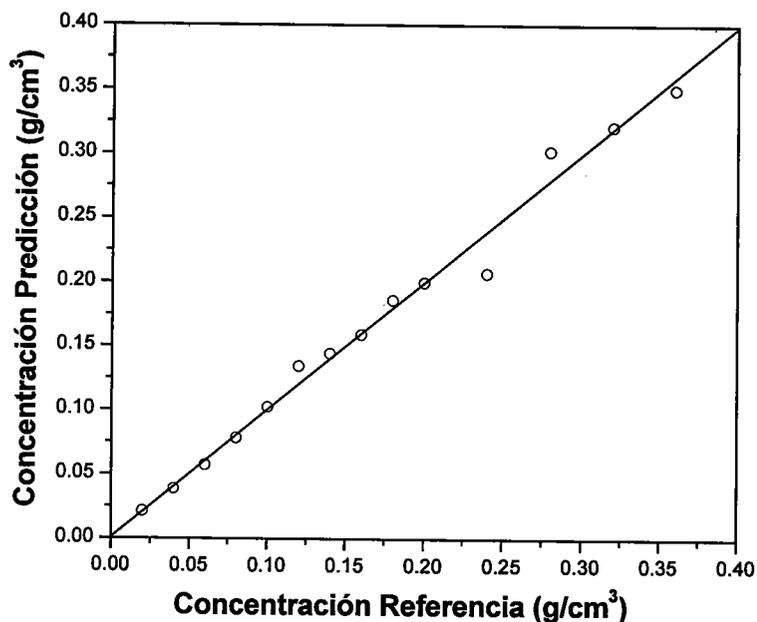


Figura 17. Validación cruzada para el modelo de predicción de concentración de azúcar en agua con un coeficiente de correlación de 0.99 y un RMSEP de 0.012 g/cm<sup>3</sup>..

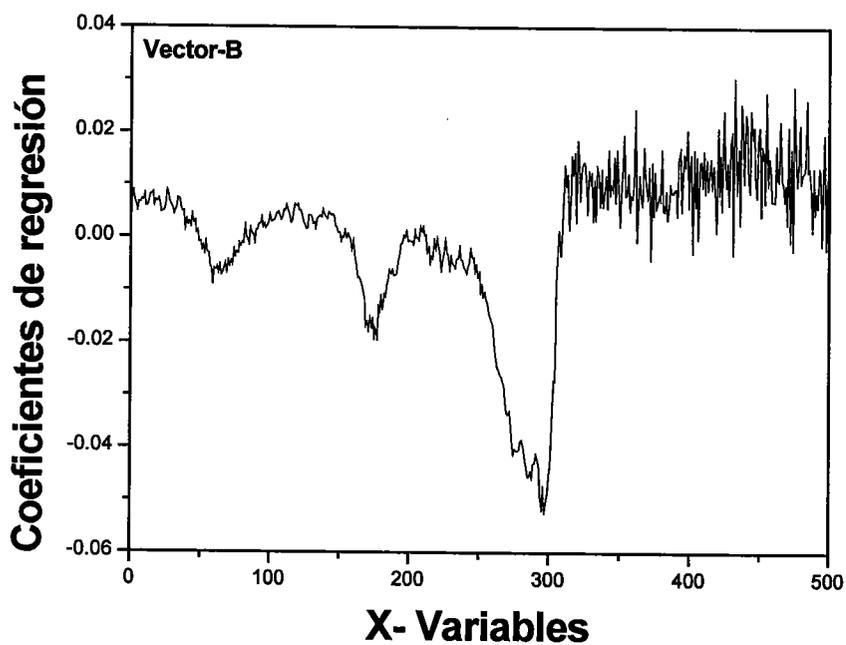


Figura 18. Representación grafica del vector de coeficientes de regresion del modelo de predicción de la concentración de azúcar en agua, comunmente llamado B vector.

En la figura 19, se muestran algunos de los espectros de absorción en el cercano infrarrojo de las mezclas de etanol en agua para diferentes concentraciones. Como se puede observar en esta gráfica, los cambios en las bandas de absorción debido al aumento en la concentración de etanol son muy evidentes para las bandas de los 960, 1200 y 1500 nm y se puede dar a simple vista una estimación cualitativa del porcentaje o presencia de etanol en una solución acuosa, a diferencia de los espectros de las mezclas de azúcar en agua, donde los cambios asociados a la concentración de azúcar, no se pueden apreciar a simple vista. En la validación cruzada del modelo de predicción de la concentración de etanol en agua, se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.99 y un RMSEP de 2.1 %Vol (figura 19).

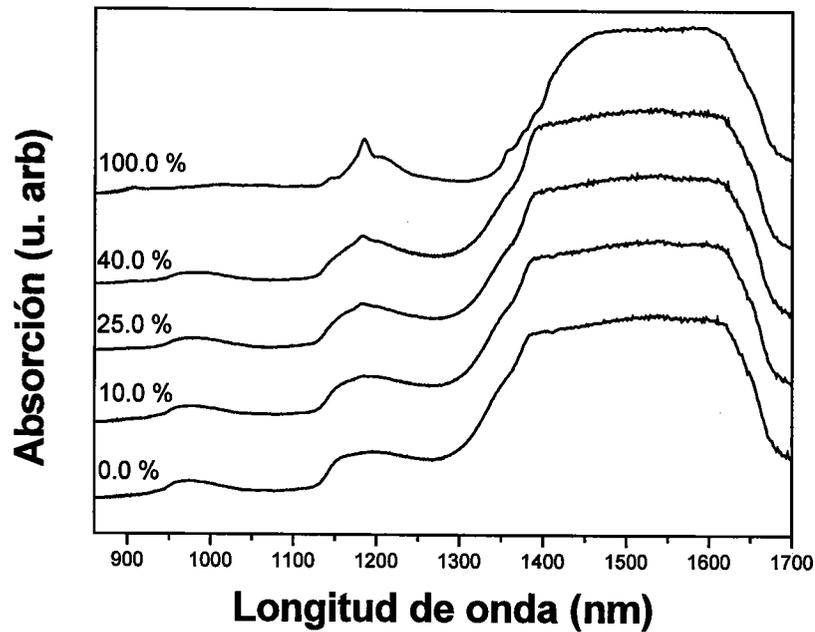


Figura 19. Cinco espectros de absorción en el cercano infrarrojo, para diferentes concentraciones en % en volumen de etanol en agua.

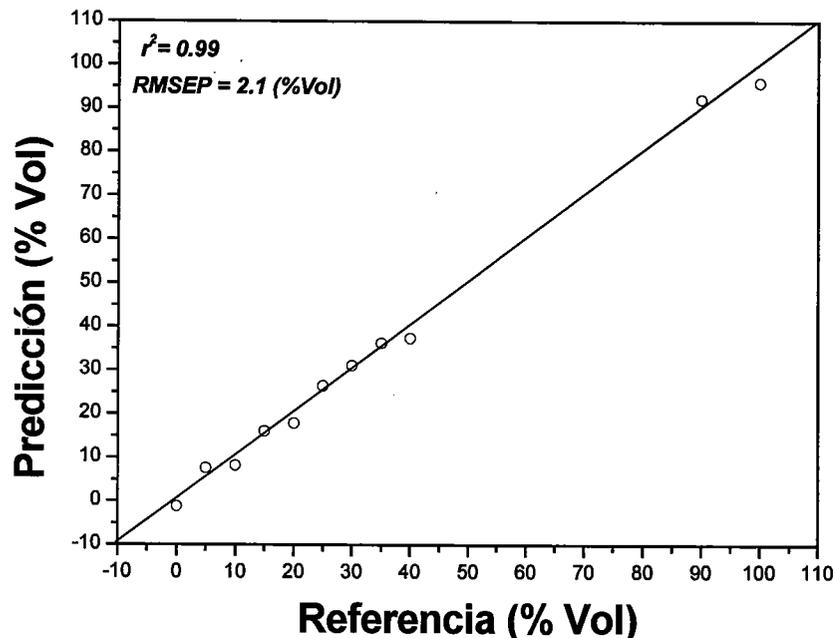


Figura 20. Validación cruzada para la predicción de etanol en agua, con un coeficiente de correlación de 0.99 y un RMSEP de 2.1 %Vol.

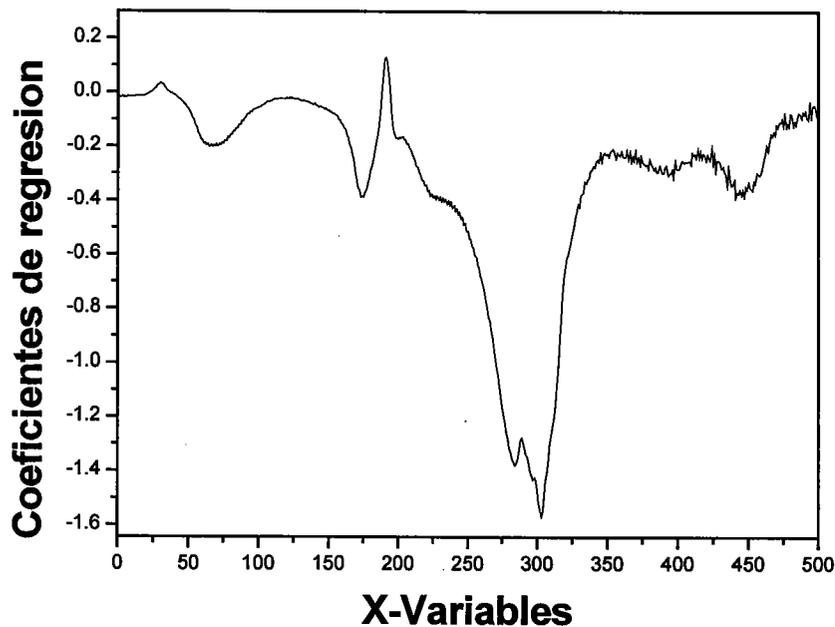


Figura 21. Representación grafica del vector de coeficientes de regresion del modelo de predicción de la concentración de etanol en agua, comunmente llamado B vector.

## 5.5 Conclusiones

Las técnicas espectroscópicas y en particular la de absorción en el cercano infrarrojo han demostrado ser una técnica eficiente para la detección de compuestos orgánicos en solución, debido a que en el cercano infrarrojo los efectos de fluorescencia son minimizados. Así, combinado con las técnicas de quimiometría es posible cuantificar y monitorear in situ de una forma rápida y sencilla la concentración de diversos analitos, como el azúcar o el etanol. También podemos observar que los vectores de regresión (B-vector) para cada modelo de predicción, mantienen una cierta similitud con los espectros originales, aunque cabe resaltar que no son iguales debido a que como se ha mencionado en capítulos anteriores, se trabaja con los pseudoespectros o espectros centrados. Los resultados obtenidos, han sido aplicados para cuantificar la cantidad de etanol en bebidas alcoholicas, principalmente mezcales, tequilas y whiskies, así como un estudio por análisis de componentes principales (PCA) para detectar adulteraciones en mezcales y bebidas alcoholicas destiladas.

# Capítulo 6

## Soluciones modelo

### 6.1 Introducción

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos al utilizar soluciones al 2% de lípidos en volumen como un simulador óptico de tejido para la calibración de modelos de predicción de la concentración de glucosa en un medio turbio similar al tejido humano. El propósito de estos experimentos, es el de observar la viabilidad de la técnica espectroscópica NIR para la detección de analitos a diferentes concentraciones, en un medio turbio. Asimismo, identificar el rango de detección del espectrofotómetro NIR y establecer una metodología para la medición y cuantificación de la concentración de la glucosa en este medio dispersor, antes de iniciar experimentos en tejido y sangre. Médicamente, los intralípidos o lípidos intravenosos son sustancias utilizadas para la alimentación parenteral periférica en pacientes en los cuales no existe un buen soporte calórico, ni de ácidos grasos esenciales por la vía oral. Pero en la comunidad biomédica se ha reportado que los intralípidos al 2% pueden ser utilizados como un medio dispersor de luz en el cercano infrarrojo, con propiedades ópticas muy similares a las del tejido humano. [59,61], como se muestra en la figura 22, donde se aprecia un espectro de absorción NIR para el intralípido al 2% y otro para tejido humano.

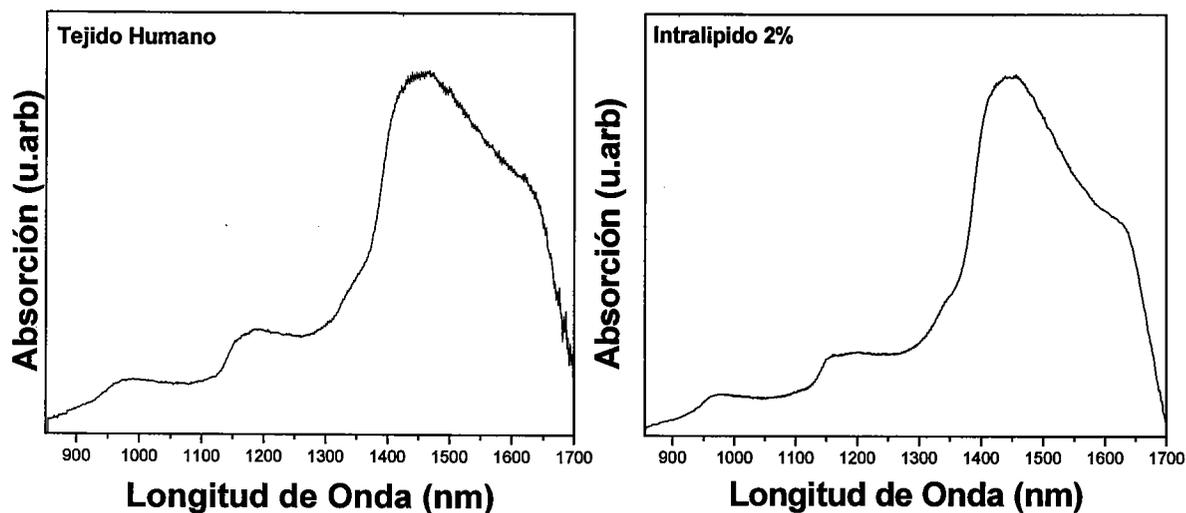


Figura 22. Espectros de absorción en el cercano infrarrojo (NIR), de tejido humano y de intralípido al 2% de lípidos en solución.

## 6.2 Procedimiento experimental

Para la realización de este experimento, se utilizaron tres soluciones intralípidas, una de las cuales fue preparada en el laboratorio en base a lo reportado por Jaques y Flock [60], los otros dos intralípidos, fueron soluciones comerciales patentadas de intralípidos al 20 % distribuidas por Baxter S.A de C.V, para el sector salud de México y fabricado por Clinic Parenteral, las cuales fueron diluidas en agua destilada para obtener una concentración del 2% en lípidos. La preparación de 500 ml de solución intralípida al 2% de lípidos en agua, se realizó en base a las siguientes cantidades reportadas por Jaques en la literatura, utilizando productos comerciales.

Tabla 4. Cantidades necesarias para la preparación de 500 ml de solución intralípida al 2%.

Sustancia	Cantidad
Aceite de Soya	10.75 ml
Lecitina de Soya	6.0 g
Glicerina	11.25 g
Agua destilada	474.4 ml

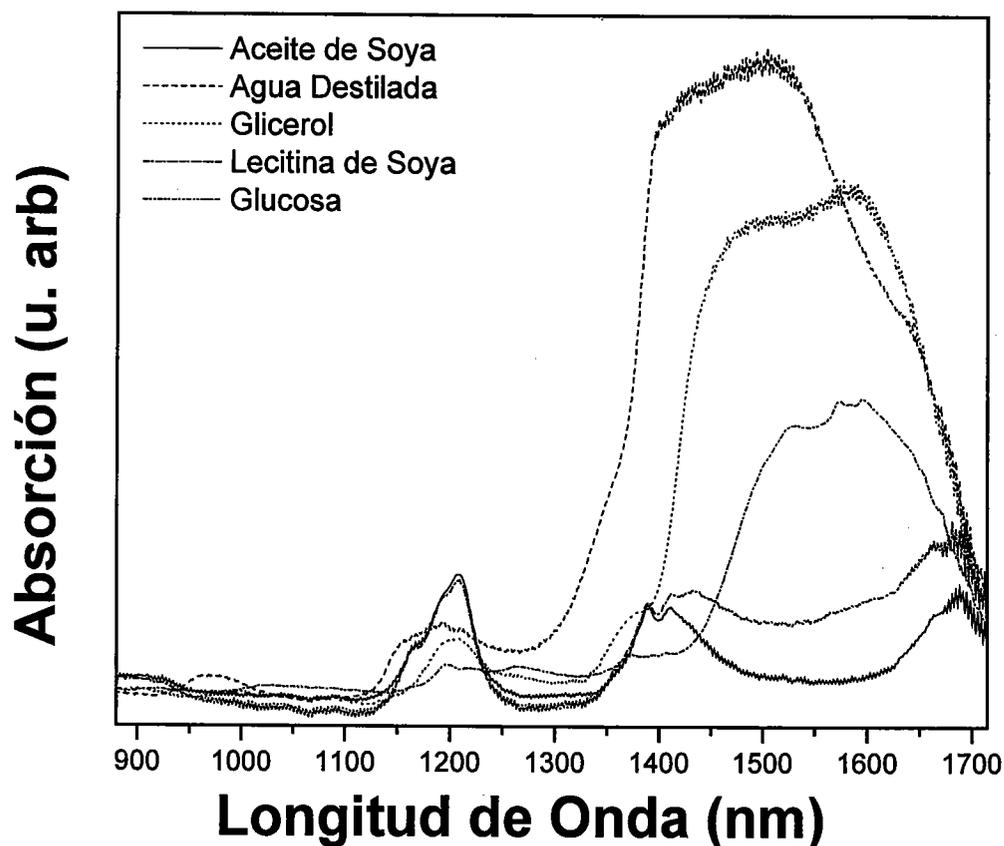


Figura 23. Espectros NIR de las componentes individuales de la solución intralípida.

Para la preparación de 500 ml de la solución, primeramente se calentó el agua hasta una temperatura de 35°C y se mantuvo en agitación, posteriormente se le agregó el aceite de soya, la glicerina y por último la lecitina de soya. La agitación fue constante hasta lograr una solución homogénea. Después de preparado el intralípido, se agregó la glucosa grado reactivo a la solución en cantidades dentro del rango fisiológico de concentración de glucosa en el humano (100 mg/dL hasta 500 mg/dL), la glucosa se agregó en concentraciones de 20 mg/dL y se dejaba agitar por un lapso de 5 minutos manteniéndose la temperatura constante a 35°C, transcurrido el tiempo de agitación se hacían las mediciones de absorción NIR en un rango de 850 a 1750 nm.

### 6.2.1 Calibración del modelo de predicción

Para la calibración de los modelo de predicción para las soluciones intralípidas se eligieron ocho componentes principales (PC's). El modelo fue validado mediante una full cross validation o LOOCV obteniéndose los resultados descritos en la siguiente sección.

### 6.2.2 Resultados experimentales

Para la predicción utilizando los modelos de predicción construidos para cada intralípido se obtuvieron los valores mostrados en la tabla 5.

**Tabla 5. Predicción de la concentración de glucosa para cada solución intralípida.**

Concentración (mg/dL) Referencia	Intralípido No. 1 (mg/dL) Predicción	Intralípido No. 2 (mg/dL) Predicción	Intralípido No. 3 (mg/dL) Predicción
100	100.1	102.5	91.6
120	120.0	88.2	126.4
140	140.0	224.6	129.1
160	160.8	181.2	167.9
180	180.3	173.6	179.6
200	198.6	222.8	192.1
220	220.5	188.1	220.3
240	239.3	206.0	232.9
260	259.2	249.5	272.6
280	279.0	-	-
300	301.5	342.6	317.3
320	320.2	-	-
340	338.8	364.7	339.3
360	-	-	-
380	382.0	374.1	392.9
400	-	-	-
420	419.4	387.2	407.3
440	-	-	-
460	460.3	404.2	468.5
480	-	-	-
500	499.4	509.6	494.5

Los valores de predicción faltantes en la tabla 5, corresponden a soluciones no preparadas para esa concentración, por lo cual no existe predicción.

En la tabla 8 se muestran los coeficientes de correlación ( $r^2$ ) y el error cuadrático medio de la predicción (RMSEP) para cada intralípido.

**Tabla 6. Coeficientes de correlación y RMSEP para cada intralípido.**

	Intralípido No. 1	Intralípido No. 2	Intralípido No. 3
$r^2$	0.99	0.85	0.99
<i>RMSEP (mg/dL)</i>	0.88	66.8	9.54

Al observar estos datos, se puede ver que tanto el error y el coeficiente de correlación para el intralípido No. 2, no son tan buenos como los del No. 1 y No. 3. Esto es atribuido a las variaciones en la medición o error de medición experimental, los cuales no están correlacionados con el cambio en la concentración, y son fuente de “ruido”, y también a la falta del preprocesamiento de datos. Por lo cual, los espectros NIR de los 3 intralípidos fueron preprocesados y se calibró un nuevo modelo de predicción para cada uno de ellos y se predijo la concentración de glucosa para cada uno de los intralípidos, obteniéndose los resultados mostrados en la tabla 7.

**Tabla 7. Predicción de la concentración de glucosa para cada solución intralípida, con procesamiento de datos.**

Concentración (mg/dL) Referencia	Intralípido No. 1 (mg/dL) Predicción	Intralípido No. 2 (mg/dL). Predicción (procesado)	Intralípido No.3 (mg/dL) Predicción (Procesado)
100	100.1	100.8	98.0
120	120.0	outliers	Outliers
140	140.0	outliers	143.1
160	160.8	159.3	160.0
180	180.3	183.0	179.2
200	198.6	198.8	200.4
220	220.5	221.2	218.8
240	239.3	240.5	Outliers
260	259.2	257.1	Outliers
280	279.0	-	-
300	301.5	300.4	Outliers
320	320.2	-	-
340	338.8	338.7	340.0
380	382.0	380.1	380.9
420	419.4	415.3	419.2
460	460.3	Outliers	458.9
500	499.4	504.32	500.8

De los valores mostrados en la tabla 7, existen algunas mediciones, las cuales al realizar el análisis de componentes principales y graficar la varianza residual contra el “leverage”, fueron señaladas como “outliers”, es decir muestras erróneas o inconsistentes, según lo descrito en el capítulo 2.

En la tabla 8 se muestran la variación del coeficiente de correlación y del error cuadrático medio de la predicción, antes y después del procesamiento de datos, reduciéndose este último considerablemente.

**Tabla 8. Coeficientes de correlación y RMSEP para cada intralípido después del pre-procesamiento de datos**

Intralípido	$r^2$	RMSEP (mg/dL)
2	0.85	66.8
2 (procesado)	0.99	2.3
3	0.99	9.5
3 (Procesado)	0.99	1.3

### 6.3 Detección y predicción de concentraciones bajas de glucosa

De los experimentos realizados se encontró que para concentraciones arriba de los 100 mg/dL de glucosa, los modelos de predicción son muy confiables y están dentro de un rango de error con RMSEP inferiores a 5 mg/dL y coeficientes de correlación muy cercanos a 1. Estas concentraciones fueron propuestas pensando en concentraciones dentro del rango fisiológico de personas diabéticas adultas. Pero es conocido, que en neonatos las concentraciones de glucosa son debajo de los 60 mg/dL, y cambios drásticos en la variación de la concentración de glucosa puede traer como consecuencia problemas en la salud del neonato e incluso la muerte del mismo, por lo cual, es necesario un monitoreo constante de glucosa en ellos [7, 9, 10]. En esta sección abordaremos el caso de la detección y predicción de bajas concentraciones de glucosa en un medio turbio, las cuales oscilan de los 20 mg/dL hasta 80 mg/dL. Uno de los principales objetivos de este experimento, fue el de conocer la sensibilidad de detección del equipo NIR utilizado en los experimentos, ya que si el espectrofotómetro no es capaz de detectar los ligeros

cambios correlacionados con los cambios en las concentraciones de glucosa, no sería posible la calibración de un modelo de predicción.

### 6.3.1 Procedimiento experimental

Para los experimentos, se utilizaron los intralípidos comerciales al 20 %, los cuales fueron aforados en agua destilada para obtener un porcentaje de lípidos en solución del 2%. Uno de los principales puntos a verificar para la construcción del modelo de predicción, fue saber cual era el nivel de sensibilidad del detector NIR, ya que para construir un modelo de predicción, deben de existir diferencias entre espectros a diferentes concentraciones. Para la realización de las mediciones de absorción, se utilizó la técnica de reflectancia difusa, manteniendo una configuración estable durante todas las mediciones, con el fin de mantener constantes todos los parámetros, asimismo se realizaron 10 mediciones continuas para cada concentración, con el fin de observar la estabilidad del intralípido, el cual se mantuvo en agitación constante y a una temperatura de 30°C aproximadamente.

En total se colectaron 60 espectros, en un rango de concentraciones de 0 a 100 mg/dL, agregándose 20 mg/dL por medición. Así, con esta información se generó el modelo de calibración para la predicción de bajas concentraciones de glucosa.

### 6.3.2 Calibración del modelo de predicción para concentraciones bajas de glucosa.

Para la calibración del modelo de predicción de concentraciones bajas de glucosa en solución intralípida, así como para la predicción se eligieron seis componentes principales como las óptimas para describir la matriz  $X$ . En este experimento, debido a la gran cantidad de mediciones, se eligió un conjunto de 10 muestras de validación (60 mg/dL), las cuales no fueron incluidas para la calibración del modelo de predicción. Después de generado el modelo, las muestras fueron predichas obteniéndose los resultados mostrados en la siguiente sección.

**Tabla 9. Predicción de la concentración de glucosa en solución intralípida, sin pre-procesamiento de datos.**

Concentración (mg/dL) Referencia	Concentración (mg/dL) Predicción	Concentración (mg/dL) Referencia (procesado)	Concentración (mg/dL) Predicción (Procesado)
0	0.0	60	57.3
0	9.7	60	60.0
0	-6.1	60	61.8
0	1.6	60	57.9
0	0.5	60	62.5
0	-4.8	60	59.5
0	-4.7	60	67.5
0	-1.0	60	58.7
0	7.3	60	57.8
0	-0.4	60	59.2
20	18.2	80	82.2
20	18.8	80	82.0
20	23.0	80	75.4
20	17.6	80	81.5
20	15.0	80	86.1
20	23.2	80	75.4
20	20.0	80	82.5
20	18.0	80	71.6
20	25.8	80	77.0
20	31.4	80	84.9
40	47.4	100	93.4
40	38.3	100	100.8
40	37.3	100	98.5
40	33.3	100	98.6
40	39.8	100	99.2
40	41.8	100	100.8
40	39.5	100	98.2
40	35.9	100	101.1
40	43.5	100	97.7
40	39.9	100	99.8

Como se observa en la tabla anterior, los resultados de la predicción son muy cercanos a los de referencia, lo cual no indica que el nuestro detector NIR, es capaz de detectar las diferencias que están correlacionadas con la variación en concentración de la glucosa en la solución intralípida. Con los datos obtenidos, se realizó la validación cruzada obteniéndose un coeficiente de correlación de 0.99 y un RMSEP de 3.96 mg/dL. La grafica obtenida es mostrada en la figura 24.

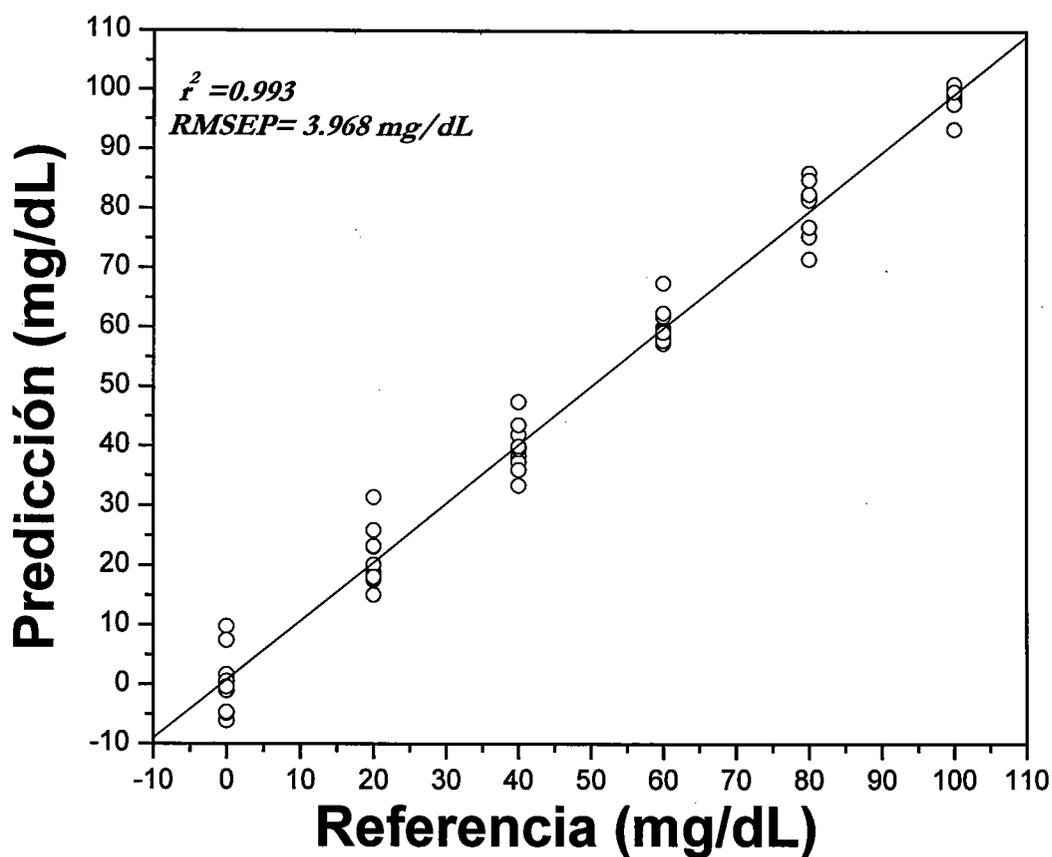


Figura 24. Validación cruzada para bajas concentraciones de glucosa en la solución intralípida, con un  $r^2 = 0.993$ , y un RMSEP de 3.9 mg/dL.

## 6.4 Conclusiones

Los experimentos llevados a cabo muestran que el espectrofotómetro NIR tiene la capacidad de detectar las variaciones correlacionadas con los cambios en la concentración de glucosa en un medio turbio, obteniéndose una buena correlación para las mediciones en cada uno de los experimentos realizados. También se obtuvieron errores de predicción aceptables inferiores a 5 mg/dL. Estos resultados nos muestran la factibilidad de detección y cuantificación de glucosa en medios turbios como el tejido o la sangre, para su aplicación médica en el monitoreo de la concentración de glucosa, de pacientes adultos con diabetes y recién nacidos prematuros.

# Capítulo 7

## Mediciones in-vivo

### 7.1 Introducción

Una muestra de sangre, es una mezcla uniforme de glóbulos rojos (células Sanguíneas) y plasma, la composición estructural y química de la matriz de tejido-sangre, no es homogénea y varia en cada parte del cuerpo. Debido a esto, la composición estructural de la matriz afecta los patrones de dispersión, determina la distribución de ciertos analitos, lo cual nos da como resultado, regiones favorables y desfavorables para las mediciones transcutáneas, por lo cual es importante determinar la parte del cuerpo mas optima para este tipo de mediciones. La piel es un sistema de capas múltiples, la cual se divide principalmente en dos, la epidermis y la dermis. La epidermis esta formada por el stratum corneum, stratum lucidum, stratum granulosum, stratum malpighii (tambien llamado stratum spinosum), y el stratum germinativum (o stratum basal). [63]. El espesor de la piel puede variar en un rango normal de los 40 a 150  $\mu\text{m}$  (labios delgados) o de los 800 hasta 1400  $\mu\text{m}$  en la palma de las manos y la planta de los pies. La keratina es una de las principales proteínas en la epidermis, pelo y uñas en los humanos [66].

La dermis consiste de tejido interconectado de fibras elásticas, vasos sanguíneos y nervios. El colágeno es el componente mayoritario de la dermis (70%) seguido por la elastina. El fluido intersticial, es otro componente importante de la matriz de tejido y sangre, estos fluidos intersticiales se encargan de llenar el espacio entre células en la epidermis y la dermis. Por lo cual, la medición de analitos en el fluido intersticial es mas simple que en la sangre entera, esto debido a que ciertos analitos

se difunden dentro de este fluido, uno de los cuales es precisamente la glucosa [65].

Al utilizar métodos de análisis multivariante para la predicción de concentraciones utilizando espectroscopias ópticas, hay que tener en cuenta el método de referencia que se va a utilizar para obtener las concentraciones de los analitos. Para esto hay que considerar el medio o tejido, en el cual va a ser determinada la referencia. Las mediciones de referencia a menudo se llevan a cabo ya sea en suero o en plasma obtenido de la sangre entera de una vena, arteria o un capilar [2,64,65]. También pueden realizarse en los fluidos intersticiales. La sangre entera puede ser obtenida por la perforación de una vena, arteria y la piel. Ciertos analitos tienen concentraciones proporcionales en estos medios, pero existen otros que no, por ejemplo los gases de la sangre, los cuales varían su concentración drásticamente. La sangre obtenida de cualquiera de las formas anteriormente descritas, puede ser analizada en laboratorios de una clínica, con analizadores de sangre (estándar de oro), o puede ser analizada utilizando un analizador portátil (glucómetros), para el caso de ciertos analitos como el colesterol, y la glucosa. Aunque los analizadores de los hospitales son más precisos y exactos que los analizadores portátiles, estos últimos son una herramienta útil para obtener valores de referencia. La determinación de analitos en la sangre provee información de la concentración de estos en una forma simple para la comunidad médica, sin embargo, la mezcla de analitos en una matriz de tejido y sangre, pueden tener diferentes escalas de concentraciones. Por lo cual, la concentración en la sangre entera requiere de ciertas correcciones para servir como referencia de una matriz de tejido y sangre.

En este capítulo se presentan los resultados experimentales obtenidos para la calibración de un modelo de predicción de glucosa en tejido de forma no invasiva, utilizando espectroscopia NIR, también algunos aspectos teóricos relacionados con la medición, el error de la medición y aspectos técnicos a superar para medición in vivo.

## 7.2 Desarrollo experimental

Las mediciones experimentales fueron realizadas en la Facultad de Ciencias de la UASLP y en el laboratorio de Medicina Nuclear de la Facultad de Medicina. Los espectros de absorción se colectaron utilizando el espectrofotómetro NIR512 mediante la técnica de reflectancia difusa, para lo cual, la sonda de fibra óptica era puesta en contacto directo con el tejido de la zona a medir, que en este caso fue la yema del dedo. Las concentraciones de glucosa en sangre de referencia en fueron obtenidas utilizando un glucómetro comercial de la marca Ascencia Elite de Bayer, para las mediciones realizadas en la Facultad de Ciencias y un analizador clínico (Reflotron) para las realizadas en la Facultad de Medicina.

Para la calibración del modelo de predicción de la concentración de glucosa en sangre primeramente se colectaba el espectro NIR al mismo tiempo que era extraída la sangre del voluntario, para obtener el espectro y la concentración de referencia basal. Inmediatamente después de esto, al voluntario se le inducía un aumento en la concentración fisiológica de glucosa (hiperglucemia) mediante una bebida alta en glucosa, para generar lo que llamamos una curva de glucosa como la mostrada en la figura 25, realizándose mediciones espectroscópicas y sanguíneas en intervalos de tiempo regulares, con el fin de obtener el mayor número de mediciones a diferentes concentraciones de glucosa. Este procedimiento era repetido para cada voluntario. Posteriormente, los datos eran preprocesados para la calibración del modelo de predicción de glucosa para cada voluntario, obteniéndose los resultados mostrados en la siguiente sección.

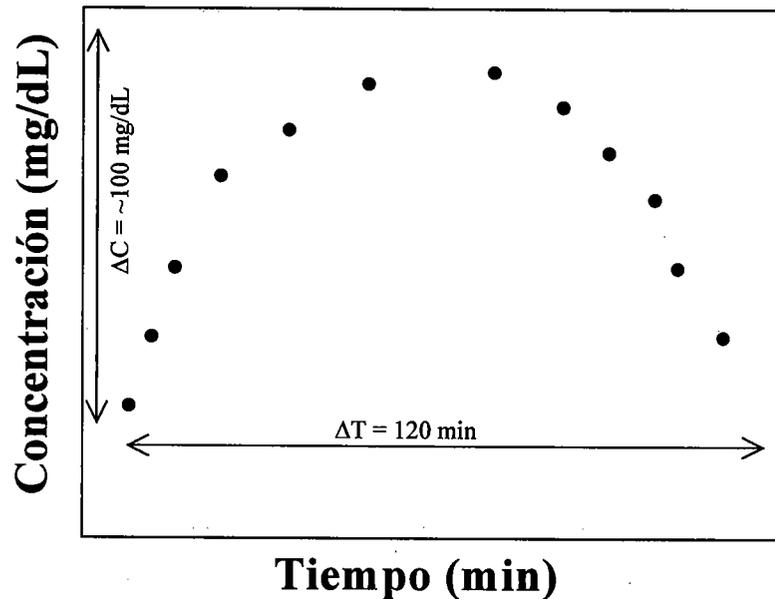


Figura 25. Curva de hiper glucemia donde se muestra el cambio en concentración respecto al tiempo después de ingerir una bebida alta en glucosa.

### 7.3 Resultados y discusión

Se realizó una curva de concentración de glucosa que varió entre los 80 y 150 mg/dL. Para esta curva, se obtuvieron y se recolectaron 14 espectros de absorción en el cercano infrarrojo a diferentes concentraciones de glucosa, para la calibración del modelo de predicción.

El modelo de calibración para la predicción (modelo 1) fue construido utilizando los espectros NIR para un voluntario (voluntario 1), ver figura 26. Utilizando este modelo se predijeron las concentraciones de glucosa del voluntario 1, obteniéndose los resultados mostrados en la figura 27. En la figura, se muestran los resultados obtenidos para la validación cruzada de la predicción (LOOCV) de los espectros NIR del voluntario 1 utilizando el modelo 1, obteniéndose un coeficiente de correlación  $r^2$  de 0.99 y RMSEP de 5.82 mg/dL, lo cual nos dice que existe correlación entre las variaciones espectrales y la concentración de glucosa.

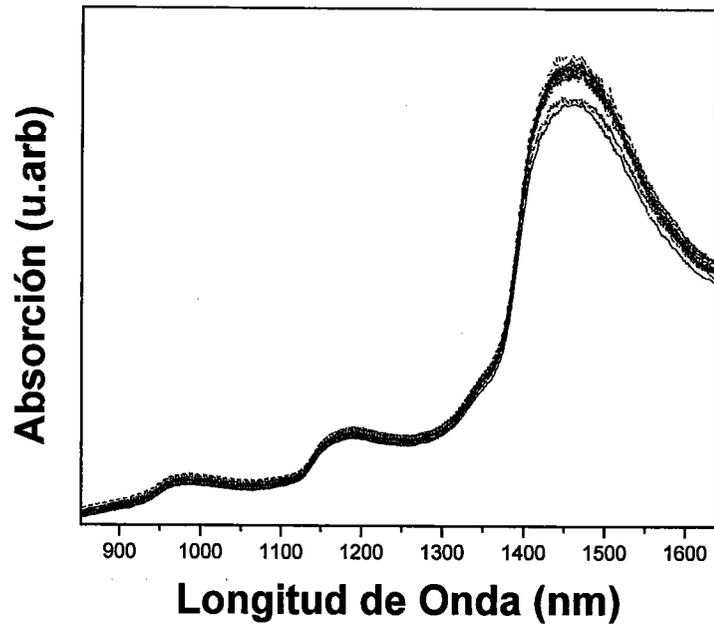


Figura 26. Espectros de absorción NIR de tejido a diferentes concentraciones de glucosa.

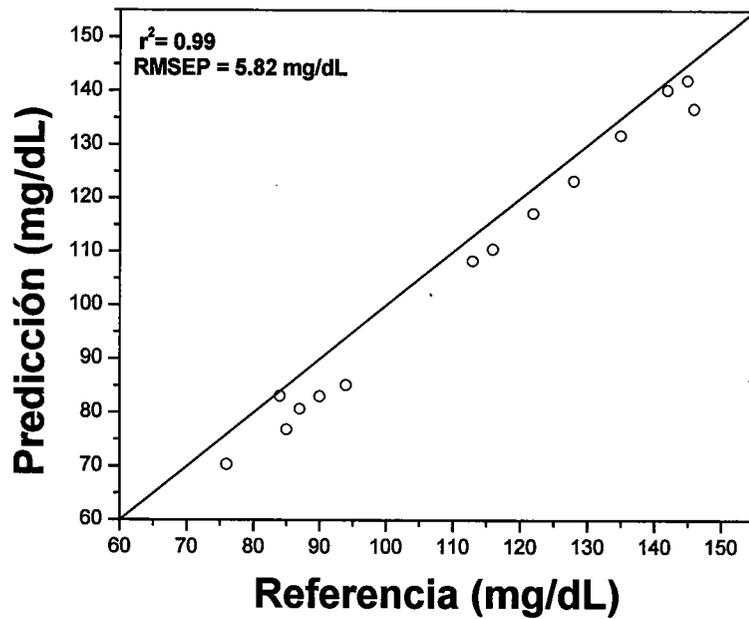


Figura 27. Validación cruzada para el voluntario 1 utilizando el modelo 1.

Con el fin de probar la efectividad del modelo de predicción generado, se midieron los niveles de glucosa a tres voluntarios ajenos al modelo (V2, V3, V4) de diferentes tonalidades de piel y sexo. La medición de referencia utilizando el glucómetro y los espectros de absorción se colectaron al mismo tiempo. A estos espectros se les aplicó el modelo 1, obteniéndose los valores de predicción mostrados en la tabla 10.

**Tabla 10. Predicción de la concentración de glucosa utilizando el modelo 1.**

Voluntario	Referencia (mg/dL)	Predicción (mg/dL)
V2	88	93.5
V2	88	102.9
V2	88	93.1
V2	88	82.6
V3	118	122.2
V3	118	110.0
V3	118	119.0
V3	118	129.8
V4	81	96.9
V4	81	96.7
V4	81	94.6

Los valores mostrados en la tabla 10 muestran a simple vista que algunos valores de la predicción son cercanos a los de valores de referencia, pero por el momento no podemos afirmar que el modelo es válido para predicción de muestras desconocidas, debido a la poca cantidad de voluntarios. De igual forma, se generó otro modelo de calibración para la predicción (modelo 2) utilizando los espectros NIR y mediciones de referencia de otro voluntario (voluntario 5), siguiendo la metodología descrita en párrafos anteriores, mejorando la técnica de medición, manteniendo la presión constante de la sonda en el dedo. Para este paciente se colectaron 10 espectros NIR a diferentes concentraciones de glucosa, en un rango de 90 a 135 mg/dL, obteniéndose los resultados mostrados en la validación cruzada de la figura 28.

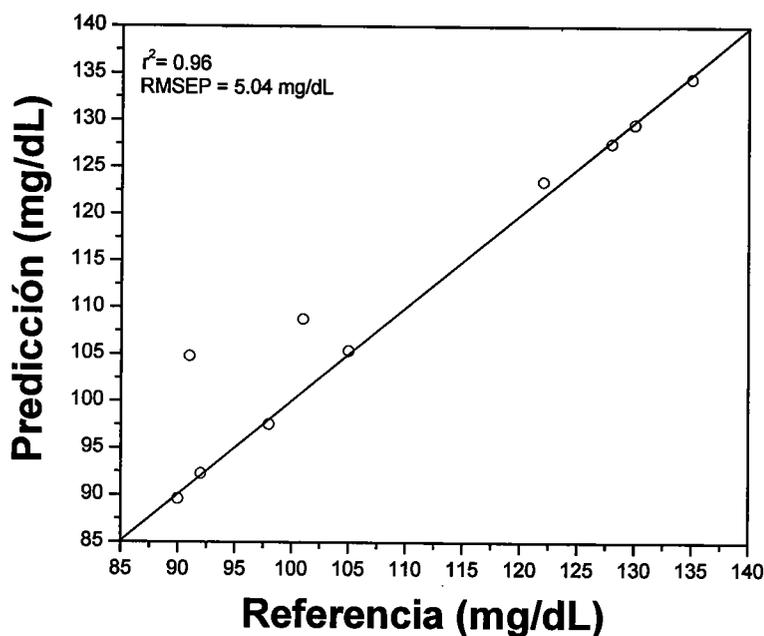


Figura 28. validación cruzada para la predicción de glucosa del voluntario 5 utilizando el modelo 2 (auto-predicción).

De la validación cruzada para el voluntario 5 utilizando el modelo 2 generado a partir de sus espectros, se obtuvo un coeficiente de correlación  $r^2$  de 0.96 y un RMSEP de 5.04 mg/dL. Después de esto, se colectaron 6 espectros NIR a diferentes concentraciones de glucosa en sangre en un rango de los 98 a los 100 mg/dL, de otro voluntario (voluntario 6). Posteriormente se les aplicó el modelo 2, obteniéndose los resultados mostrados en la figura 29.

Los resultados hasta ahora encontrados nos muestran la posible factibilidad de encontrar un modelo de predicción capaz de predecir muestras desconocidas ajenas a las utilizadas para la calibración del modelo de predicción. De igual forma y aunado a esta observación se realizaron mediciones a dos voluntarios totalmente distintos entre sí, (un neonatos y a una mujer adulta), nombrados como voluntarios 7 y 8, con el fin de observar las implicaciones que tiene una medición en clínica y observar la eficiencia de los modelos de predicción generados en el laboratorio

bajo parámetros experimentales mas controlados, obteniéndose los resultados mostrados en la tabla 11.

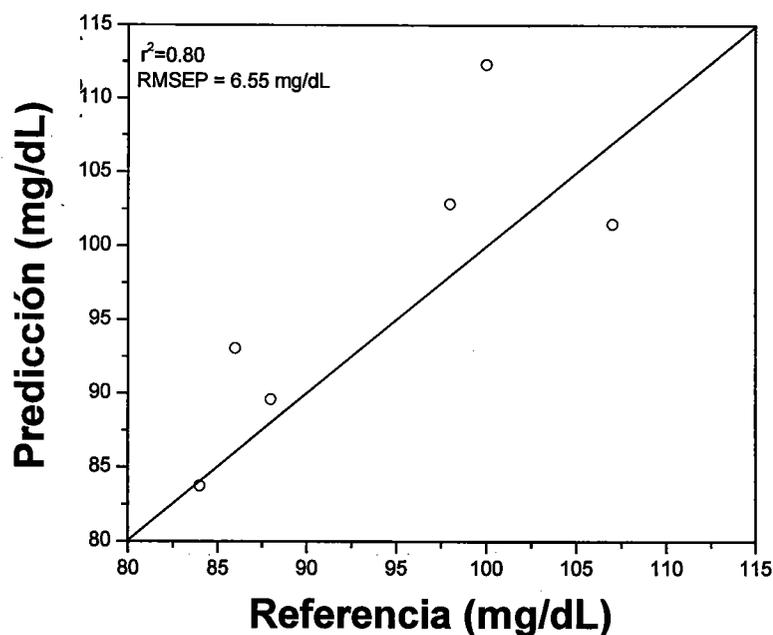


Figura 29. Validación cruzada de los resultados obtenidos para el voluntario 6, utilizando el modelo de predicción 2.

**Tabla 11. Predicción de la concentración de glucosa en los voluntarios 7 y 8 usando el modelo 1.**

Voluntario	Sitio de medición	Referencia (mg/dL)	Predicción (mg/dL)
7	Palma mano	49	87.0
7	Dorso del Pie	49	38.5
7	Pierna	49	-4.5
7	Dorso de mano	49	48.9
8	Yema dedo	95.2	89.7
8	Yema dedo	95.2	97.0

De los resultados mostrados en la tabla 11 se observa que el mejor sitio de medición para el voluntario 7 (neonato) fue en el dorso del pie y el dorso de la mano. También se observa que la predicción para el voluntario 8 fue muy cercana al valor de referencia, estas predicciones fueron realizadas utilizando el modelo 1. Trabajos de investigación realizados por otros grupos en esta área, reportan que la

lengua es un buen sitio para realizar las mediciones NIR [62], pero nuestro objetivo es realizar mediciones lo menos invasivas posible y fácil de medir, por lo cual se eligió la mano como un lugar de fácil acceso para las mediciones, por esta razón se decidió investigar cual sitio de la mano era el mejor para la medición de los espectros NIR. Para este propósito se colectaron espectros NIR a 14 concentraciones diferentes de glucosa en sangre y en cuatro diferentes partes de la mano (yema del dedo, falange proximal, palma de la mano, vena de la mano) de otro voluntario (voluntario 9). Con estos espectros se calibró un modelo de predicción para cada conjunto de espectros de los sitios de medición, para la yema del dedo (modelo 3), la falange proximal (modelo 4), palma de la mano (modelo 5) y vena de la mano (modelo 6), realizando una auto-predicción para cada zona de la mano. Las concentraciones de referencia de la glucosa fueron en un rango de los 89 a los 178 mg/dL, con un total de 14 mediciones y se obtuvieron los resultados mostrados a continuación.

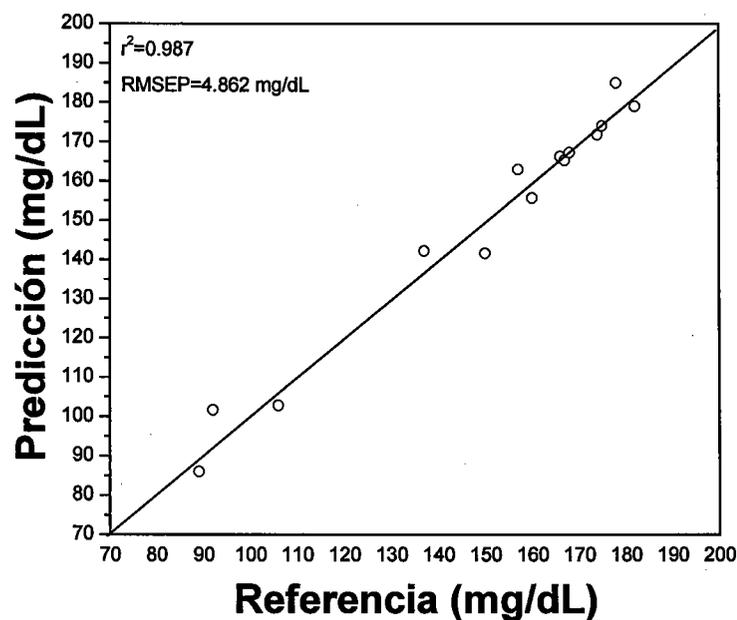


Figura 30. Validación cruzada para los espectros NIR medidos en la yema del dedo, utilizando el modelo 3, con un  $r^2$  de 0.98 y un RMSEP de 4.8 mg/dL.

Para la auto-predicción de los espectros NIR de la yema del dedo, utilizando el modelo 3 se obtuvieron un  $r^2$  de 0.98 y un RMSEP de 4.8 mg/dL. Para los espectros NIR obtenidos de la falange proximal se realizó una auto predicción utilizando el modelo 4, obteniendo los resultados mostrados en la figura 31.

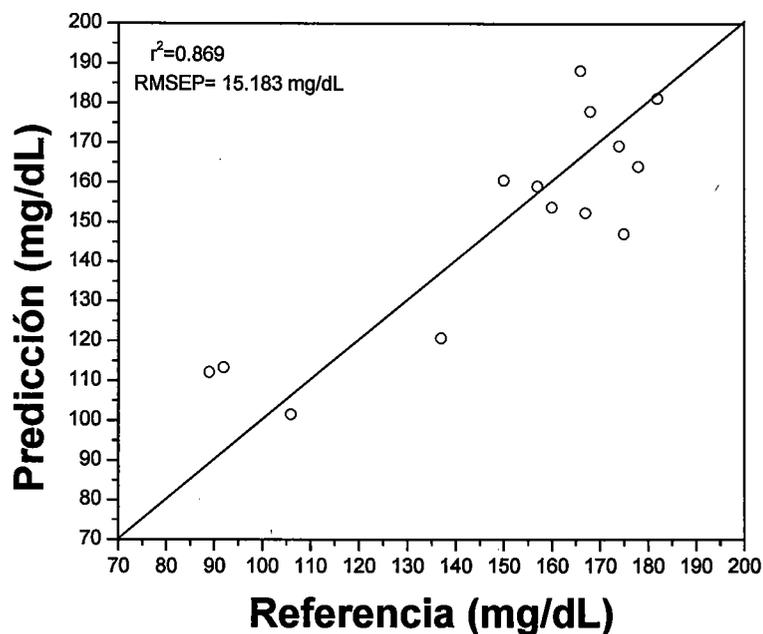


Figura 31. Validación cruzada para la predicción de glucosa obtenida de los espectros NIR utilizando el modelo 4, con un  $r^2$  de 0.86 y un RMSEP de 15.1 mg/dL.

Los resultados de predicción obtenidos para los espectros NIR de la falange proximal utilizando el modelo 4, muestran un coeficiente de correlación  $r^2$  de 0.86 y un RMSEP de 15.1 mg/dL. De la misma forma se realizó la predicción para la palma de la mano y la vena, obteniéndose los resultados mostrados a continuación.

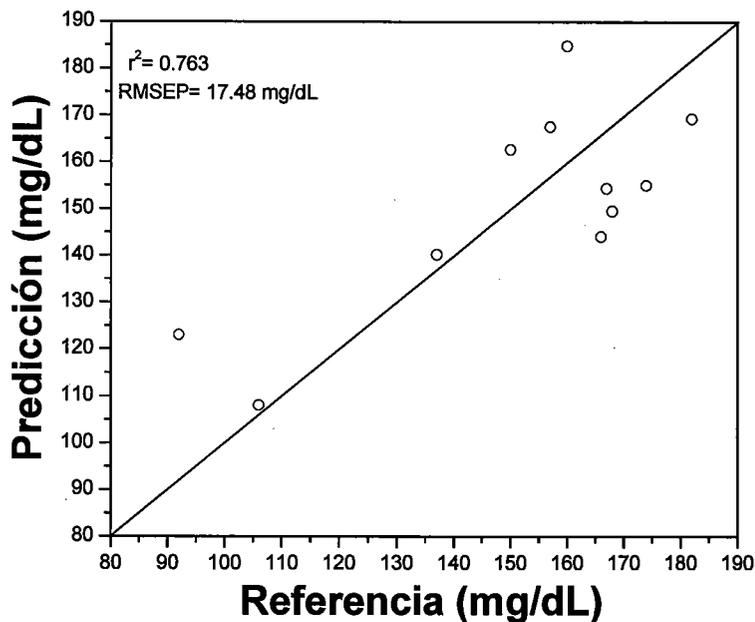


Figura 32. Validación cruzada para la predicción de glucosa obtenida de los espectros NIR en la palma de la mano, utilizando el modelo 5, obteniendo un  $r^2$  de 0.76 y un RMSEP de 17.4 mg/dL.

Para la creación del modelo de predicción 5 se extrajeron las concentraciones de 75, 78 y 89 mg/dL, ya que en la calibración, estas muestras fueron calificadas como “outliers”, es decir como mediciones inconsistentes o erróneas, lo cual en la mayoría de los casos es debido a un error en la medición, obteniéndose para esta predicción un  $r^2$  de 0.76 y un RMSEP de 17.4 mg/dL al realizar la validación cruzada.

Al igual que los resultados para la palma de la mano, para las mediciones en vena, se detectaron 6 “outliers” (92, 157, 166, 167, 174 y 178 mg/dL), las cuales no fueron tomadas en cuenta para la calibración del modelo de predicción. Al realizar la validación cruzada, se obtuvo un coeficiente de correlación  $r^2$  de 0.68 y un RMSEP de 22.7 mg/dL.

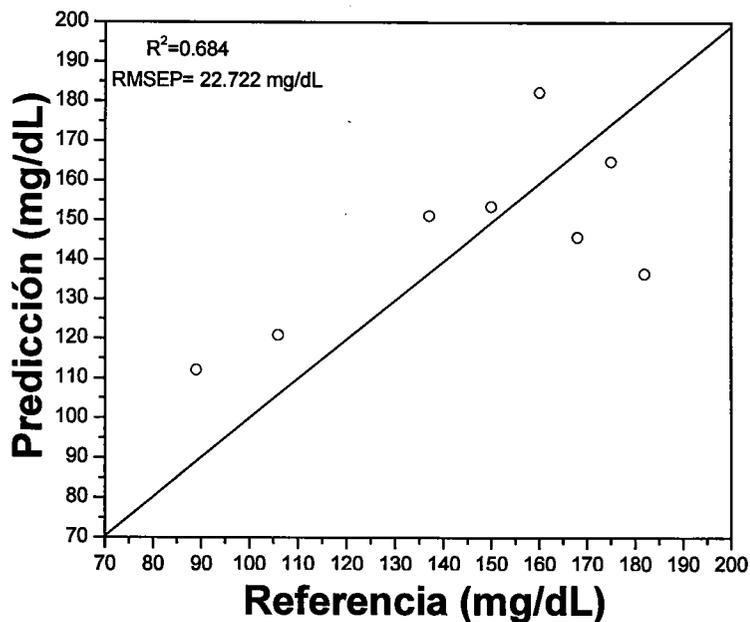


Figura 33. Validación cruzada para la predicción de glucosa obtenida de los espectros NIR de la vena utilizando el modelo 6, con un  $r^2$  de 0.68 y un RMSEP de 22.7 mg/dL.

## 7.4 Conclusiones

De los resultados obtenidos, podemos concluir que existen diversos factores, principalmente instrumentales y experimentales, los cuales afectan de manera significativa las mediciones espectroscópicas NIR. Sin embargo, utilizando técnicas de análisis multivariante, es posible calibrar modelos de predicción, los cuales como se ha mostrado arrojan a la vista resultados alentadores para esta investigación. Asimismo, se pudo observar que el mejor sitio de medición NIR en la mano es la yema del dedo.

# Capítulo 8

## Modelos Cruzados

### 8.1 Introducción

En este capítulo, se muestran los resultados obtenidos al intercalar ocho diferentes modelos de predicción, calibrados para ocho diferentes voluntarios, con las mediciones espectroscópicas de cada uno de ellos. El propósito de este experimento fue el de evaluar la factibilidad de calibrar un modelo “universal” capaz de predecir aceptablemente la concentración de glucosa de cualquier persona o grupos de personas.

### 8.2 Desarrollo experimental

Utilizando espectroscopía de absorción en el cercano infrarrojo (NIR) y técnicas de análisis multivariante, se calibraron los modelos de predicción para ocho voluntarios, a los cuales nombraremos numéricamente del uno al ocho, esta numeración es independiente de la mencionada en capítulos anteriores. A estos voluntarios se les indujo un cambio en la concentración de glucosa en el organismo, ya sea para aumentar o disminuir sus niveles de glucosa (curva hipoglucemia e hiperglucemia). A cada voluntario se le tomaba muestra sanguínea aproximadamente cada media hora, para cuantificar la glucosa con el método estándar de laboratorio (Estándar de oro) y para cada concentración se realizaban un total de cuatro mediciones NIR. Una vez obtenidos los espectro y las concentraciones se calibraba un modelo de predicción para cada voluntario. Posteriormente el modelo generado para el voluntario 1 era utilizado para predecir

las concentraciones de los 7 voluntarios restantes y de igual manera este proceso se repetía para cada voluntario.

### 8.3 Resultados y discusión

En las tablas de la 12 a la 19, se muestran los resultados al intercalar los modelos de predicción para cada voluntario, donde se han resaltado en **negrita y cursiva** los valores de predicción mas cercanos al valor de concentración de glucosa de referencia, en un rango de error de  $\pm 10\text{mg/dL}$ . Así, de los resultados obtenidos se observa que algunos modelos ajenos a los voluntarios arrojan valores de predicción cercanos al de referencia, pero de una forma aleatoria, es decir predice para algún voluntario pero solo para algunos espectros y para otros no. Estos valores de predicción acertados de algunos modelos podría ser debido a que las condiciones de medición experimentales de los espectros NIR de esa persona para esa concentración, son muy similares a los espectros con los cuales fue calibrado el modelo, así como también ciertas características físicas de la zona de medición como son grosor de la piel, contenido de grasa, hematocrito, etc. o simplemente en algunos casos podría ser coincidencia. Pero, debido a el numero limitado de voluntarios no podemos aventurarnos a decir que algunos modelos puedan ser utilizados de forma universal. Para tal efecto se necesitan un mayor numero de voluntarios para hacer un análisis estadístico, el cual nos muestre alguna tendencia mas clara de que es lo que sucede, o si alguno de los modelos tiene una posible aplicación clínica para el monitoreo de glucosa de cualquier paciente.

### 8.4 Conclusión

De los resultados anteriores podemos concluir que es necesario un mayor numero de mediciones y voluntarios, para poder entender la tendencia de estos resultados para las predicciones cruzadas. Los resultados muestran para algunos modelos, predicciones cercanas al valor de referencia, lo que nos podría indicar que para ciertas condiciones de medición y rangos de concentración, los modelos funcionan. Pero no podemos evaluar su confiabilidad ni su reproducibilidad para

este numero de voluntarios y mediciones, por lo cual es necesario incrementar el numero de voluntarios para las mediciones y poder evaluar esta posibilidad de la calibración universal.

**Tabla 12. Predicción para las concentraciones de glucosa del voluntario 1 utilizando los 8 modelos.**

<i>Voluntario 1</i> <i>Ref (mg/dL)</i>	<i>M1</i> <i>Pred</i>	<i>M2</i> <i>Pred</i>	<i>M3</i> <i>Pred</i>	<i>M4</i> <i>Pred</i>	<i>M5</i> <i>Pred</i>	<i>M6</i> <i>Pred</i>	<i>M7</i> <i>Pred</i>	<i>M8</i> <i>Pred</i>
75.2	<b>77.0</b>	105.2	<b>66.0</b>	59.7	<b>69.3</b>	<b>71.0</b>	<b>80.5</b>	N
78.0	<b>76.7</b>	113.4	<b>73.2</b>	<b>80.2</b>	65.9	66.0	95.3	N
78.9	<b>79.8</b>	116.0	<b>74.5</b>	<b>73.7</b>	<b>84.0</b>	<b>67.4</b>	<b>80.5</b>	N
82.8	<b>81.0</b>	105.6	<b>92.2</b>	61.1	66.2	<b>80.4</b>	<b>84.3</b>	N
89.2	<b>89.4</b>	<b>88.2</b>	71.9	68.3	66.3	68.0	<b>80.0</b>	N
90.5	<b>90.4</b>	<b>96.2</b>	60.0	57.0	64.8	68.5	73.6	N
106.0	<b>106.0</b>	<b>99.7</b>	91.1	75.2	76.1	83.1	79.8	N

**Tabla 13. Predicción para las concentraciones de glucosa del voluntario 2 utilizando los 8 modelos.**

<i>Voluntario 2</i> <i>Ref (mg/dL)</i>	<i>M1</i> <i>Pred</i>	<i>M2</i> <i>Pred</i>	<i>M3</i> <i>Pred</i>	<i>M4</i> <i>Pred</i>	<i>M5</i> <i>Pred</i>	<i>M6</i> <i>Pred</i>	<i>M7</i> <i>Pred</i>	<i>M8</i> <i>Pred</i>
36.3	N	<b>36.2</b>	68.5	49.6	54.6	N	<b>37.3</b>	83.2
40.9	N	<b>40.9</b>	84.5	<b>46.2</b>	48.2	N	<b>33.7</b>	69.8
46.6	N	<b>46.6</b>	72.0	<b>48.6</b>	<b>45.2</b>	N	31.9	77.0
55.3	N	<b>55.3</b>	72.9	<b>52.7</b>	<b>53.5</b>	N	33.2	82.2
56.5	N	<b>56.5</b>	69.4	<b>57.6</b>	68.3	N	40.3	91.5
63.8	N	<b>63.8</b>	80.4	46.9	<b>63.7</b>	N	31.8	91.1
73.8	N	<b>73.7</b>	<b>80.1</b>	51.	<b>67.5</b>	N	39.6	<b>74.5</b>

**Tabla 14. Predicción para las concentraciones de glucosa del voluntario 3 utilizando los 8 modelos.**

<i>Voluntario 3</i> <i>Ref (mg/dL)</i>	<i>M1</i> <i>Pred</i>	<i>M2</i> <i>Pred</i>	<i>M3</i> <i>Pred</i>	<i>M4</i> <i>Pred</i>	<i>M5</i> <i>Pred</i>	<i>M6</i> <i>Pred</i>	<i>M7</i> <i>Pred</i>	<i>M8</i> <i>Pred</i>
52.6	N	<b>59.6</b>	<b>52.5</b>	65.8	N	N	<b>54.2</b>	N
63.0	N	<b>58.3</b>	<b>63.1</b>	<b>69.0</b>	N	N	<b>57.6</b>	N
79.0	N	63.4	<b>78.8</b>	67.5	N	N	54.7	N
81.5	N	59.5	<b>81.4</b>	66.4	N	N	56.4	N
81.8	N	61.7	<b>81.8</b>	62.9	N	N	59.4	N
88.4	N	63.5	<b>88.4</b>	65.5	N	N	55.4	N
89.1	N	64.2	<b>89.0</b>	62.6	N	N	61.7	N

**Tabla 15. Predicción para las concentraciones de glucosa del voluntario 4 utilizando los 8 modelos.**

<i>Voluntario 4 Ref (mg/dL)</i>	<i>M1 Pred</i>	<i>M2 Pred</i>	<i>M3 Pred</i>	<i>M4 Pred</i>	<i>M5 Pred</i>	<i>M6 Pred</i>	<i>M7 Pred</i>	<i>M8 Pred</i>
31.6	N	69.4	74.6	<b>30.31</b>	<b>27.5</b>	63.9	65.1	N
40.0	N	75.1	67.8	<b>50.4</b>	<b>31.3</b>	71.8	63.4	N
48.7	N	69.6	70.3	<b>45.4</b>	<b>32.3</b>	74.8	<b>59.0</b>	N
59.1	N	70.0	<b>61.9</b>	<b>59.9</b>	30.9	70.3	<b>63.7</b>	N
59.9	N	70.4	<b>67.1</b>	<b>56.0</b>	28.7	70.6	<b>65.1</b>	N
63.2	N	76.0	<b>70.1</b>	<b>60.2</b>	34.4	<b>71.4</b>	<b>67.6</b>	N

**Tabla 16. Predicción para las concentraciones de glucosa del voluntario 5 utilizando los 8 modelos.**

<i>Voluntario 5 Ref (mg/dL)</i>	<i>M1 Pred</i>	<i>M2 Pred</i>	<i>M3 Pred</i>	<i>M4 Pred</i>	<i>M5 Pred</i>	<i>M6 Pred</i>	<i>M7 Pred</i>	<i>M8 Pred</i>
28.2	N	N	77.2	50.1	<b>28.1</b>	N	60.9	85.7
35.0	N	N	62.6	59.5	<b>35.0</b>	N	59.2	72.0
54.2	N	N	83.0	<b>59.1</b>	<b>54.1</b>	N	<b>56.3</b>	81.6
58.2	N	N	<b>61.9</b>	39.7	<b>58.2</b>	N	<b>58.1</b>	39.8
59.4	N	N	<b>67.1</b>	<b>54.4</b>	<b>59.3</b>	N	<b>65.3</b>	<b>59.3</b>
65.9	N	N	78.4	53.6	<b>65.9</b>	N	51.8	94.7
69.1	N	N	<b>73.1</b>	<b>65.2</b>	<b>69.1</b>	N	<b>59.6</b>	<b>76.0</b>
73.3	N	N	<b>77.8</b>	54.5	<b>73.2</b>	N	61.7	<b>77.3</b>

**Tabla 17. Predicción para las concentraciones de glucosa del voluntario 6 utilizando los 8 modelos.**

<i>Voluntario 6 Ref (mg/dL)</i>	<i>M1 Pred</i>	<i>M2 Pred</i>	<i>M3 Pred</i>	<i>M4 Pred</i>	<i>M5 Pred</i>	<i>M6 Pred</i>	<i>M7 Pred</i>	<i>M8 Pred</i>
44.6	84.0	92.4	N	N	67.5	<b>44.6</b>	69.7	N
53.8	94.0	86.2	N	N	<b>60.0</b>	<b>53.9</b>	84.5	N
70.9	95.4	84.1	N	N	<b>65.4</b>	<b>70.6</b>	<b>75.2</b>	N
77.3	92.3	89.6	N	N	60.7	<b>77.3</b>	61.9	N
93.4	<b>94.6</b>	<b>98.6</b>	N	N	70.3	<b>93.5</b>	80.0	N

**Tabla 18. Predicción para las concentraciones de glucosa del voluntario 7 utilizando los 8 modelos.**

<i>Voluntario 7 Ref (mg/dL)</i>	<i>M1 Pred</i>	<i>M2 Pred</i>	<i>M3 Pred</i>	<i>M4 Pred</i>	<i>M5 Pred</i>	<i>M6 Pred</i>	<i>M7 Pred</i>	<i>M8 Pred</i>
50.0	95.4	74.3	62.1	86.6	N	83.9	63.9	105.7
80.3	95.0	<b>80.8</b>	67.0	<b>88.9</b>	N	<b>90.5</b>	<b>81.2</b>	132.2
89.5	<b>100.1</b>	78.7	<b>83.2</b>	<b>84.3</b>	N	<b>92.6</b>	<b>90.7</b>	101.0
93.4	<b>98.9</b>	<b>86.5</b>	<b>97.0</b>	<b>83.1</b>	N	<b>89.4</b>	<b>85.5</b>	<b>100.1</b>
97.9	<b>98.4</b>	73.7	70.2	<b>101.4</b>	N	83.9	<b>118.7</b>	111.9

**Tabla 19. Predicción para las concentraciones de glucosa del voluntario 8 utilizando los 8 modelos.**

<i>Voluntario 8 Ref (mg/dL)</i>	<i>M1 Pred</i>	<i>M2 Pred</i>	<i>M3 Pred</i>	<i>M4 Pred</i>	<i>M5 Pred</i>	<i>M6 Pred</i>	<i>M7 Pred</i>	<i>M8 Pred</i>
78.6	N	N	31.3	N	N	105.1	N	<b>78.4</b>
78.8	N	N	42.0	N	N	102.2	N	<b>79.1</b>
88.9	N	N	<b>84.0</b>	N	N	107.5	N	<b>88.8</b>
98.2	N	N	37.7	N	N	<b>96.5</b>	N	<b>98.4</b>
122	N	N	48.7	N	N	96.0	N	<b>121.7</b>
160	N	N	46.1	N	N	105.0	N	<b>159.5</b>
187	N	N	18.2	N	N	103.6	N	<b>186.6</b>
190	N	N	64.7	N	N	113.6	N	<b>190.6</b>

# Capítulo 9

## Mediciones en Neonatos

### 9.1 Introducción

La glucosa es el sustrato primario del metabolismo del cerebro, este órgano utiliza 20 veces más glucosa que el músculo y la grasa. En el lactante el porcentaje del peso corporal que corresponde al cerebro es muy alto, aproximadamente un 12% frente a un 2% en el adulto [67], también su metabolismo es tres veces mayor. Además, en el niño el 90% de la glucosa disponible es utilizada por el cerebro. La mayoría de los niños sanos nacidos en término (9 meses), tras el cese de flujo transplacentario de nutrientes, inician rápidamente la producción hepática de glucosa para satisfacer su elevada demanda y al término de las dos primeras horas de vida, la concentración de glucosa aumenta gradualmente hasta establecer y mantener sus niveles normales [77]. Esto es posible en parte por la gluconeogénesis, resultado del aumento inmediato de la lipólisis y de la oxidación de los lípidos, como indica el incremento postnatal de la concentración plasmática del glicerol y ácidos grasos libres, el elevado índice metabólico del glicerol y la disminución del cociente respiratorio [68,72,73,79,81]. Cabe mencionar que algunos niños nacidos en término, presentan un metabolismo alterado de la glucemia, con riesgo de hipoglucemia.

La hipoglucemia es un problema neonatal frecuente ya que aproximadamente el 10% de los recién nacidos normales no logran mantener una concentración plasmática de glucosa arriba de 30 mg/dL (1.7 mmol/L) si la primera toma de alimento se retrasa de 3 a 6 horas después del nacimiento [80]. El niño muy prematuro nace antes de que exista una acumulación suficiente de glucógeno,

grasa o proteínas, lo que le condiciona una escasa disponibilidad de sustratos y limita su capacidad de mantener la producción de glucosa, a través de la glucogenolisis durante cortos periodos de ayuno, y como consecuencia de esto, los niños muy prematuros corren un mayor riesgo de hipoglucemia [69]. Las condiciones de hipoglucemia y la hiperglucemia en un neonato pueden tener serias consecuencias, como la neurogluopenia, la cual desencadena convulsiones, alteraciones del desarrollo neurológico, retraso mental e incluso la muerte [7,9,10]. La hiperglucemia también se acompaña de padecimientos como la glucosuria, diuresis osmótica e hiperosmolaridad con riesgo de hemorragia cerebral [70,78,76]. Todos los neonatos que se encuentran en riesgo de desarrollar hipoglucemia e hiperglucemia deben someterse a mediciones frecuentes de la concentración de glucosa en plasma. Este monitoreo de la concentración de glucosa se lleva a cabo por medio de la glucemia capilar utilizando generalmente un glucómetro comercial. Se ha demostrado que los glucómetros son sensibles y exactos cuando se usan en adultos, sin embargo en los neonatos en donde la hipoglucemia y la variación del hematocrito es frecuente, la exactitud de estos instrumentos de medición es impredecible, por lo que en las unidades de neonatología deben utilizarse glucómetros que hayan sido validados para neonatos [71]. Esta forma de monitoreo de la glucosa en el recién nacido es invasiva y dolorosa, requiriéndose en ocasiones de múltiples punciones del talón, teniendo como consecuencia la consecutiva pérdida de sangre y el riesgo de infección. Por lo cual la búsqueda de técnicas no invasivas ofrece varias ventajas, tales como un monitoreo continuo e indoloro de la concentración de glucosa, reducción de material de desecho por las mediciones, evitar el riesgo de infección en la zona de punción, etc.

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos de las predicciones no invasivas por espectroscopía NIR, en neonatos prematuros. Las predicciones fueron realizadas utilizando un modelo de predicción calibrado con espectros de absorción en el cercano infrarrojo de un voluntario adulto. El propósito principal de estas mediciones fue observar cuales factores experimentales tienen influencia en la predicción de analitos en tejido utilizando un modelo ajeno a las muestras a

predecir, explorar la factibilidad de una posible aplicación clínica, tanto en instrumentación experimental, medición in vivo, procesamiento de datos y precisión clínica, así como también hacer un estudio de la precisión y correlación de medición entre glucómetros comerciales frente al estándar de laboratorio.

## 9.2 Desarrollo experimental

Para este estudio, se seleccionaron 21 recién nacidos de cualquier género, los cuales ingresaron al servicio de neonatología del hospital central “Dr. Ignacio Morones Prieto” y necesitaban un monitoreo continuo de la concentración de glucosa (glucemia), con un peso mayor a los 1500 g, sin malformaciones congénitas mayores o lesiones en la piel que impidan la medición y con el consentimiento de los padres. Para cada neonato se colectaron 5 espectros de absorción NIR para la misma concentración de glucosa en tres diferentes partes del cuerpo del neonato, las cuales fueron el dorso de la mano (Dm), el dorso del pie (Dp) y la yema del dedo (Yd). Las mediciones eran realizadas de forma simultánea con la extracción de sangre del neonato, la cual era requerida para otro tipo de análisis clínico o cuando le era medida la glucosa. Las concentraciones de referencia fueron obtenidas utilizando un analizador clínico de laboratorio (estándar de oro) con un  $r = 0.99$  y dos glucómetros de diferentes marcas (one touch ultra, accu-check) con el fin de observar de manera simultánea la correlación existente entre glucómetros y el estándar clínico para mediciones en neonatos, estos valores se mostraran más adelante. Los espectros NIR fueron colectados utilizando el espectrofotómetro miniatura NIR 512 utilizando la técnica de reflectancia difusa. Para la medición espectroscópica, la punta de la sonda era colocada en contacto con la piel del neonato en la zona de medición.

### 9.2.1 Predicción de espectros NIR

Debido a la imposibilidad de calibrar un modelo de predicción para un neonato, por la implicación ética que representa punzar múltiples veces a un recién nacido,

con el fin de medir los cambios en la concentración de glucosa para esta investigación, se propuso investigar la factibilidad de usar un modelo de predicción calibrado con espectros NIR de un adulto, para predecir la concentración de glucosa en neonatos. De los modelos de predicción calibrados con adultos, se encontró un modelo capaz de predecir de forma aceptable la glucemia en neonatos. Este modelo fue calibrado con 14 muestras en un rango de concentraciones de los 70 a los 150 mg/dL, utilizando 9 componentes principales (PCs). Los resultados obtenidos al realizar la predicción con este modelo se muestran en las tablas 22 a la 42 para cada neonato, al final del capítulo.

### 9.3 Resultados y discusión

Los resultados obtenidos nos muestran que el modelo utilizado para la predicción de la glucemia mediante la información espectral de los neonatos, arroja valores de predicción concordantes con los valores de referencia para cada uno de ellos. Se observa que la mayoría de las predicciones para los neonatos del 1 al 12 es para las mediciones realizadas en la yema del dedo, haciéndose evidente esta predicción por la tendencia de los valores predichos para el dorso de la mano y dorso del pie, donde la predicción es errónea. Sin embargo para los neonatos del 13 al 21, las predicciones son en su mayoría para las mediciones colectadas en el dorso del pie, el dorso de la mano y en pocas ocasiones en la yema del dedo. Este comportamiento puede ser atribuido a varios factores aun no explorados, como pueden ser la temperatura ambiente al momento de la medición debido a que el detector NIR debe trabajar a una temperatura aproximada de  $-5^{\circ}\text{C}$ , para una temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  debido al sistema de enfriamiento electrónico del detector (Anexo técnico), si la temperatura al momento de la medición es más elevada de los  $25^{\circ}\text{C}$  puede afectar sensibilidad y funcionamiento del detector NIR, por esta razón cabe mencionar que las primeras mediciones de los neonatos del 1 al 12 fueron realizadas a una temperatura menos cálida que las restantes, aunado al hecho de que algunas de las mediciones fueron realizadas con el niño en la incubadora. Otro factor puede ser debido a que para ciertos recién nacidos las mediciones espectroscópicas en el dorso de la mano o dorso del pie sean similares

a las de la yema del dedo, pero falta un mayor análisis y experimentación para determinar las causas. Con los datos obtenidos se realizó una validación cruzada para cada zona de medición y otra general para todas las partes de predicción, con el fin de ver la correlación de las predicciones y el RMSEP de las mismas, así como ver su posible aplicación clínica, ya que a primera vista los resultados obtenidos son alentadores y las predicciones buenas.

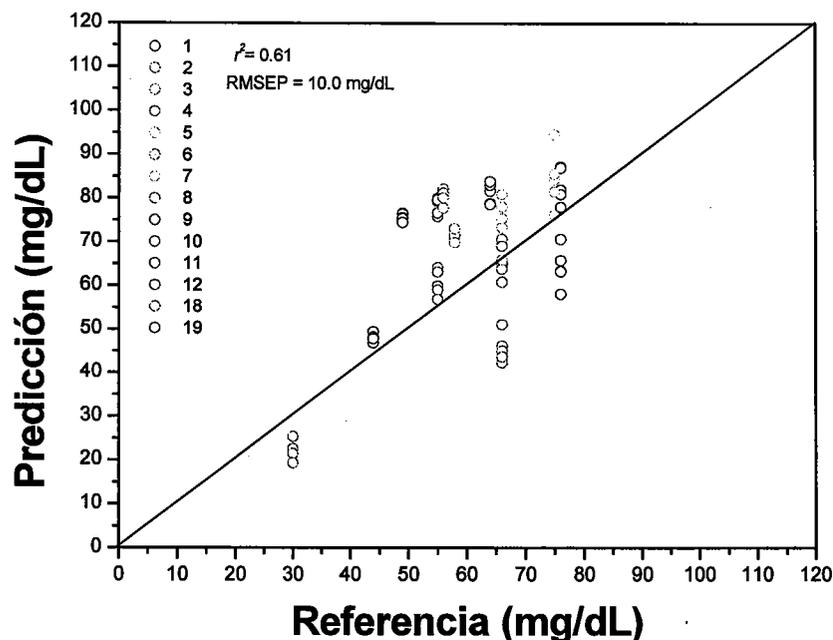


Figura 34. Validación cruzada para las predicciones en la yema del dedo en neonatos, con un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de 0.61 y un RMSEP de 10.05 g/dL.

De la figura 34 se puede observar que la correlación entre las predicciones y la referencia puede considerarse substancial de acuerdo con la escala propuesta por Landis y Koch [74], y el error cuadrático medio de la predicción (RMSEP) podemos considerarlo como aceptable. También se realizó una validación cruzada de los 21 neonatos para las predicciones obtenidas, sin importar el lugar de medición debido a que nuestro interés principal es en conocer la correlación de la

predicción frente al estándar de oro y no la probabilidad de predicción en alguna zona del cuerpo, ya que existen factores que se tienen que analizar para justificar el por que de la predicción en zonas diferentes como: el peso del niño, edad del bebe (días después de nacido), gravedad clínica del bebe, etc. En la figura 35 se muestra la validación cruzada para la predicción frente al estándar clínico.

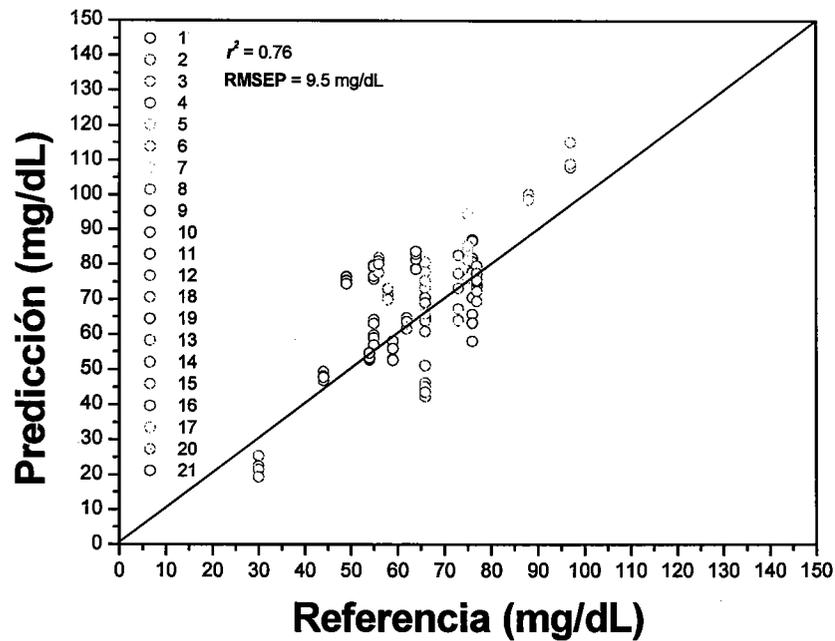


Figura 35. Validación cruzada entre las predicciones en Dm, Dp y Yd frente a la referencia del estándar clínico.

De los resultados mostrados en la figura 35, se obtuvo un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de 0.76 y un RMSEP de 9.5 mg/dL entre las predicciones y las concentraciones de referencia. Este coeficiente de correlación también puede ser considerado como substancial.

Asimismo y con los datos obtenidos para los dos diferentes glucómetros se analizó el coeficiente de correlación versus el estándar clínico de cada glucómetro. Los datos tomados para el análisis, se muestran en la tabla 20 a continuación.

**Tabla 20. Valores de la concentración de glucosa en sangre obtenidos por estándar clínico, glucómetro 1 y glucómetro 2.**

Estándar Clínico	Glucómetro 1 (mg/dL)	Glucómetro 2 (mg/dL)
76	85	66
66	83	67
58	59	77
55	62	45
66	81	60
56	80	60
75	95	73
64	53	98
76	87	102
66	75	82
44	58	52
88	86	92
30	37	61
55	56	82
97	75	112
77	61	96
73	63	83
59	78	91

Para estos resultados se realizaron las validaciones cruzadas de ambos glucómetros con el estándar clínico y los resultados se muestran en las figuras 36 y 37.

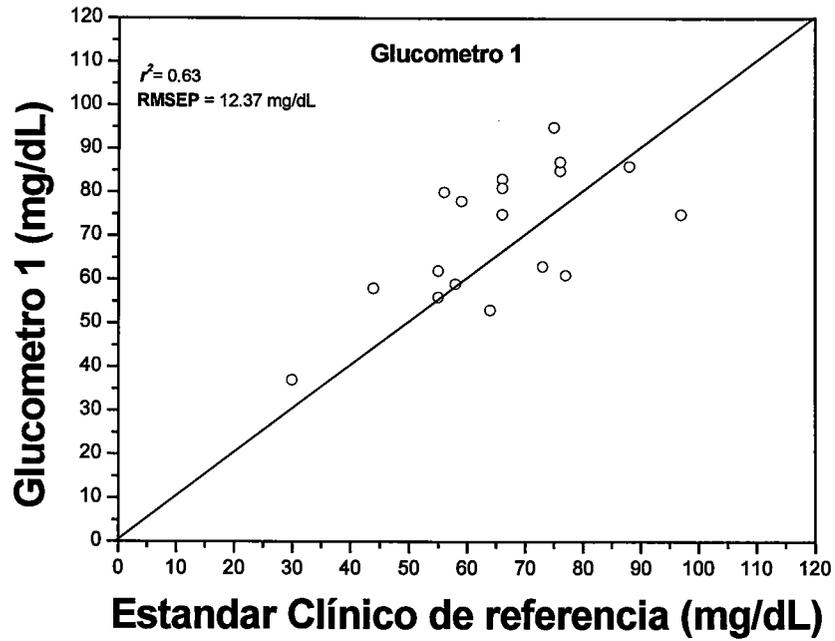


Figura 36. Validación cruzada para las concentraciones obtenidas por el glucómetro 1 y el método clínico.

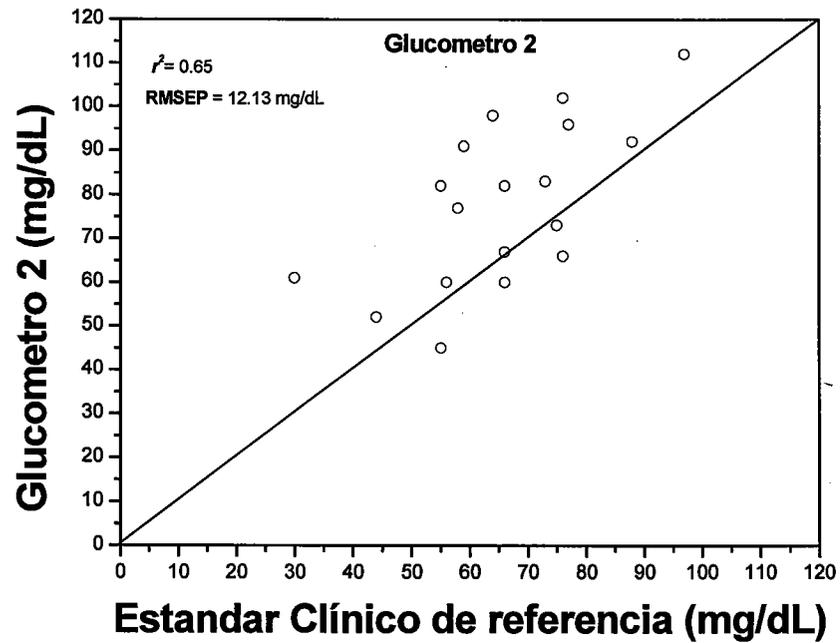


Figura 37. Validación cruzada para los valores de la concentración de glucosa obtenidos por el glucómetro 2 contra el método de clínico.

De las graficas anteriores se obtuvieron para el glucómetro 1 un  $r^2= 0.63$  con un RMSEP de 12.37 mg/dL y para el glucómetro 2 un  $r^2= 0.65$  y un RMSEP de 12.13 mg/dL. Estos resultados nos muestran que la correlación existente entre los glucómetros y el estándar clínico, es menor a lo que se esperaría, que seria un  $r^2$  de 0.9 según lo reportado en las características de ambos glucómetros. Estos valores de  $r^2$  podrían deberse a el numero de muestras para hacer el análisis (n=18 muestras), ya que la correlación reportada en el manual de los glucómetros es en base a un gran numero de muestras (n > 100 muestras), sin embargo también se infiere que para ambos glucómetros en este rango de concentraciones de glucosa (~ de 30 a 100 mg/dL) los glucómetros presentan cierta dispersión que aunque no es totalmente mala, no es tan buena como para lo establecido en el manual de cada uno de ellos, comprobándose esta tendencia en los dos glucómetros. Asimismo, cabe mencionar, que los glucómetros no mencionan entre sus características la incapacidad o diferencia de predicción al medir neonatos frente a la medición de adultos, como se menciona en algunos otros glucómetros comerciales. A continuación se muestra una tabla comparativa entre los métodos de cuantificación utilizados para el numero de muestras mencionado.

**Tabla 21. Comparación entre métodos de cuantificación para glucosa en sangre.**

Método de cuantificación	$r^2$	RMSEP (mg/dL)
NIR	0.76	9.5
Glucómetro 1	0.63	12.37
Glucómetro 2	0.65	12.13

## 9.4 Conclusiones

De los resultados obtenidos en este estudio podemos resaltar primeramente el hecho de que las predicciones de la concentración de glucosa fueron realizadas mediante un modelo de predicción calibrado con los espectros NIR de un adulto, lo cual es una gran ventaja, ya que no es necesario calibrar un modelo de predicción con espectros de un neonato, ya que no es posible realizar una curva de glucosa en un neonato. También podemos observar que las mediciones para los 21

neonatos todas arrojan datos de predicción cercanos a la referencia ya sea en el dorso de la mano, dorso del pie o yema del dedo, y que el coeficiente de correlación de predicción de la predicción frente al estándar clínico es considerado como bueno según Lawrence y Lin (0.76) [75] y mayor que el arrojado por los glucómetros frente al estándar clínico (~0.65), lo cual nos dice que realmente las predicciones arrojadas para el NIR tienen relación con la referencia, de no ser este el caso, la correlación sería muy baja. Por otro lado, aun no podemos concluir que la técnica espectroscópica pueda ya ser aplicada clínicamente, ya que falta todavía un estudio más amplio para determinar esto, lo que si podemos concluir, es que los resultados son muy alentadores y de gran relevancia para la comunidad científica en esta área de investigación y sobretodo podemos comprobar que la colaboración interdisciplinaria puede arrojar grandes avances en la investigación, ya sea de este tipo o de cualquier otro, enriqueciendo la investigación con diferentes puntos de vista y una nueva visión de las cosas.

Tabla 22. Neonato 1

Sitio de medición	Concentración de referencia (mg/dL)	Concentración de predicción (mg/dL)
Dm	76, 85, 66	121.843
Dm	76, 85, 66	120.666
Dm	76, 85, 66	123.937
Dm	76, 85, 66	120.841
Dm	76, 85, 66	123.604
Dp	76, 85, 66	117.520
Dp	76, 85, 66	116.202
Dp	76, 85, 66	116.713
Dp	76, 85, 66	117.155
Dp	76, 85, 66	117.837
Yd	76, 85, 66	77.964
Yd	76, 85, 66	81.964
Yd	76, 85, 66	80.917
Yd	76, 85, 66	87.204
Yd	76, 85, 66	86.921

Tabla 23. Neonato 2

Sitio de medición	Concentración de referencia (mg/dL)	Concentración de predicción (mg/dL)
Dm	66, 83 67	156.149
Dm	66, 83 67	155.587
Dm	66, 83 67	147.513
Dm	66, 83 67	145.967
Dm	66, 83 67	147.692
Dp	66, 83 67	132.589
Dp	66, 83 67	132.353
Dp	66, 83 67	131.677
Dp	66, 83 67	130.551
Dp	66, 83 67	130.466
Yd	66, 83 67	70.576
Yd	66, 83 67	69.061
Yd	66, 83 67	60.834
Yd	66, 83 67	65.046
Yd	66, 83 67	63.885

Tabla 24. Neonato 3

Sitio de medición	Concentración de referencia (mg/dL)	Concentración de predicción (mg/dL)
Dm	58, 59, 77	136.032
Dm	58, 59, 77	135.117
Dm	58, 59, 77	134.136
Dm	58, 59, 77	134.299
Dp	58, 59, 77	120.691
Dp	58, 59, 77	122.153
Dp	58, 59, 77	119.648
Dp	58, 59, 77	112.801
Dp	58, 59, 77	117.513
Yd	58, 59, 77	70.980
Yd	58, 59, 77	71.605
Yd	58, 59, 77	69.936
Yd	58, 59, 77	73.065

Tabla 25. Neonato 4

Sitio de medición	Concentración de referencia (mg/dL)	Concentración de predicción (mg/dL)
Dm	55, 62, 45	150.710
Dm	55, 62, 45	151.839
Dm	55, 62, 45	151.069
Dm	55, 62, 45	151.036
Dm	55, 62, 45	139.062
Dp	55, 62, 45	139.973
Dp	55, 62, 45	139.898
Dp	55, 62, 45	142.010
Dp	55, 62, 45	143.248
Dp	55, 62, 45	143.460
Yd	55, 62, 45	75.825
Yd	55, 62, 45	76.668
Yd	55, 62, 45	79.285
Yd	55, 62, 45	79.967
Yd	55, 62, 45	79.604

Tabla 26. Neonato 5

Sitio de medición	Concentración de referencia (mg/dL)	Concentración de predicción (mg/dL)
Dm	66, 81, 60	124.841
Dm	66, 81, 60	119.888
Dm	66, 81, 60	118.847
Dm	66, 81, 60	126.501
Dm	66, 81, 60	136.816
Dp	66, 81, 60	116.683
Dp	66, 81, 60	124.975
Dp	66, 81, 60	121.481
Dp	66, 81, 60	120.987
Dp	66, 81, 60	118.743
Yd	66, 81, 60	65.961
Yd	66, 81, 60	78.064
Yd	66, 81, 60	80.861
Yd	66, 81, 60	73.323
Yd	66, 81, 60	75.363

Tabla 27. Neonato 6

Sitio de medición	Concentración de referencia (mg/dL)	Concentración de predicción (mg/dL)
Dm	56, 80, 60	127.090
Dm	56, 80, 60	125.736
Dm	56, 80, 60	121.915
Dm	56, 80, 60	122.127
Dm	56, 80, 60	122.419
Dp	56, 80, 60	124.912
Dp	56, 80, 60	124.641
Dp	56, 80, 60	123.844
Dp	56, 80, 60	124.497
Dp	56, 80, 60	123.381
Yd	56, 80, 60	82.076
Yd	56, 80, 60	81.174
Yd	56, 80, 60	77.732
Yd	56, 80, 60	81.085
Yd	56, 80, 60	80.134

Tabla 28. Neonato 7

Sitio de medición	Concentración de referencia (mg/dL)	Concentración de predicción (mg/dL)
Dm	75, 95, 73	136.814
Dm	75, 95, 73	127.303
Dm	75, 95, 73	134.006
Dm	75, 95, 73	125.944
Dm	75, 95, 73	123.407
Dp	75, 95, 73	120.452
Dp	75, 95, 73	124.771
Dp	75, 95, 73	112.962
Dp	75, 95, 73	127.874
Dp	75, 95, 73	126.253
Yd	75, 95, 73	76.137
Yd	75, 95, 73	81.475
Yd	75, 95, 73	94.584
Yd	75, 95, 73	84.251
Yd	75, 95, 73	85.521

Tabla 29. Neonato 8

Sitio de medición	Concentración de referencia (mg/dL)	Concentración de predicción (mg/dL)
Dm	66, 75, 82	97.456
Dm	66, 75, 82	96.057
Dm	66, 75, 82	95.829
Dm	66, 75, 82	95.707
Dm	66, 75, 82	91.098
Dp	66, 75, 82	89.910
Dp	66, 75, 82	91.182
Dp	66, 75, 82	91.015
Dp	66, 75, 82	90.079
Dp	66, 75, 82	89.334
Yd	66, 75, 82	51.101
Yd	66, 75, 82	46.156
Yd	66, 75, 82	45.066
Yd	66, 75, 82	42.317
Yd	66, 75, 82	43.613

Tabla 30. Neonato 9

Sitio de medición	Concentración de referencia (mg/dL)	Concentración de predicción (mg/dL)
Dm	44, 58, 52	160.984
Dm	44, 58, 52	151.253
Dm	44, 58, 52	148.694
Dm	44, 58, 52	147.495
Dm	44, 58, 52	146.420
Dp	44, 58, 52	115.616
Dp	44, 58, 52	115.568
Dp	44, 58, 52	117.325
Dp	44, 58, 52	118.593
Dp	44, 58, 52	117.563
Yd	44, 58, 52	46.895
Yd	44, 58, 52	49.375
Yd	44, 58, 52	48.139
Yd	44, 58, 52	47.730

**Tabla 31. Neonato 10**

Sitio de medición	Concentración de referencia (mg/dL)	Concentración de predicción (mg/dL)
Dm	64, 53, 98	146.374
Dm	64, 53, 98	143.023
Dm	64, 53, 98	139.812
Dm	64, 53, 98	140.766
Dm	64, 53, 98	138.570
Dp	64, 53, 98	143.682
Dp	64, 53, 98	133.141
Dp	64, 53, 98	138.331
Dp	64, 53, 98	135.831
Dp	64, 53, 98	136.212
Yd	64, 53, 98	78.912
Yd	64, 53, 98	81.568
Yd	64, 53, 98	83.024
Yd	64, 53, 98	78.622
Yd	64, 53, 98	83.826

**Tabla 32. Neonato 11**

Sitio de medición	Concentración de referencia (mg/dL)	Concentración de predicción (mg/dL)
Dm	76, 87, 102	134.582
Dm	76, 87, 102	134.497
Dm	76, 87, 102	132.340
Dm	76, 87, 102	125.662
Dm	76, 87, 102	118.003
Dp	76, 87, 102	100.170
Dp	76, 87, 102	124.449
Dp	76, 87, 102	113.632
Dp	76, 87, 102	117.678
Dp	76, 87, 102	118.065
Yd	76, 87, 102	70.577
Yd	76, 87, 102	65.742
Yd	76, 87, 102	63.423
Yd	76, 87, 102	63.206
Yd	76, 87, 102	58.037

**Tabla 33. Neonato 12**

Sitio de medición	Concentración de referencia (mg/dL)	Concentración de predicción (mg/dL)
Dm	55, 56, 82	59.162
Dm	55, 56, 82	58.809
Dm	55, 56, 82	59.410
Dm	55, 56, 82	60.989
Dm	55, 56, 82	61.724
Dp	55, 56, 82	89.394
Dp	55, 56, 82	87.332
Dp	55, 56, 82	87.369
Dp	55, 56, 82	86.846
Dp	55, 56, 82	87.623
Yd	55, 56, 82	64.103
Yd	55, 56, 82	63.173
Yd	55, 56, 82	59.886
Yd	55, 56, 82	58.971
Yd	55, 56, 82	56.902

**Tabla 34. Neonato 13**

Sitio de medición	Concentración de referencia (mg/dL)	Concentración de predicción (mg/dL)
Dm	97, 75, 112	132.594
Dm	97, 75, 112	132.964
Dm	97, 75, 112	131.453
Dm	97, 75, 112	129.409
Dm	97, 75, 112	126.321
Dp	97, 75, 112	115.269
Dp	97, 75, 112	107.948
Dp	97, 75, 112	108.068
Dp	97, 75, 112	108.183
Dp	97, 75, 112	109.069
Yd	97, 75, 112	60.999
Yd	97, 75, 112	60.400
Yd	97, 75, 112	57.469
Yd	97, 75, 112	57.745
Yd	97, 75, 112	57.780

**Tabla 35. Neonato 14**

Sitio de medición	Concentración de referencia (mg/dL)	Concentración de predicción (mg/dL)
Dm	77, 61, 96	74.505
Dm	77, 61, 96	74.311
Dm	77, 61, 96	76.024
Dm	77, 61, 96	73.446
Dm	77, 61, 96	75.033
Dp	77, 61, 96	79.690
Dp	77, 61, 96	77.492
Dp	77, 61, 96	75.464
Dp	77, 61, 96	72.406
Dp	77, 61, 96	69.425
Yd	77, 61, 96	26.576
Yd	77, 61, 96	25.239
Yd	77, 61, 96	25.198
Yd	77, 61, 96	12.762
Yd	77, 61, 96	8.813

**Tabla 36. Neonato 15**

Sitio de medición	Concentración de referencia (mg/dL)	Concentración de predicción (mg/dL)
Dm	73, 63, 83	96.485
Dm	73, 63, 83	94.577
Dm	73, 63, 83	97.675
Dm	73, 63, 83	99.925
Dm	73, 63, 83	101.223
Dp	73, 63, 83	82.736
Dp	73, 63, 83	77.571
Dp	73, 63, 83	73.244
Dp	73, 63, 83	67.280
Dp	73, 63, 83	64.017
Yd	73, 63, 83	39.124
Yd	73, 63, 83	39.483
Yd	73, 63, 83	37.043
Yd	73, 63, 83	39.047
Yd	73, 63, 83	37.355

**Tabla 37. Neonato 16**

Sitio de medición	Concentración de referencia (mg/dL)	Concentración de predicción (mg/dL)
Dm	59, 78, 91	56.100
Dm	59, 78, 91	58.040
Dm	59, 78, 91	55.979
Dm	59, 78, 91	52.930
Dm	59, 78, 91	52.594
Dp	59, 78, 91	111.351
Dp	59, 78, 91	111.147
Dp	59, 78, 91	91.074
Dp	59, 78, 91	91.114
Dp	59, 78, 91	91.981
Yd	59, 78, 91	43.292
Yd	59, 78, 91	39.824
Yd	59, 78, 91	39.624
Yd	59, 78, 91	38.708
Yd	59, 78, 91	38.248

**Tabla 38. Neonato 17**

Sitio de medición	Concentración de referencia (mg/dL)	Concentración de predicción (mg/dL)
Dm	88, 86, 92	100.541
Dm	88, 86, 92	99.056
Dm	88, 86, 92	100.285
Dm	88, 86, 92	98.811
Dm	88, 86, 92	98.765
Dp	88, 86, 92	123.444
Dp	88, 86, 92	125.002
Dp	88, 86, 92	124.627
Dp	88, 86, 92	126.026
Dp	88, 86, 92	126.154
Yd	88, 86, 92	61.165
Yd	88, 86, 92	64.236
Yd	88, 86, 92	59.444
Yd	88, 86, 92	60.843
Yd	88, 86, 92	63.099

**Tabla 39. Neonato 18**

Sitio de medición	Concentración de referencia (mg/dL)	Concentración de predicción (mg/dL)
Dm	30, 37, 61	95.169
Dm	30, 37, 61	94.219
Dm	30, 37, 61	96.327
Dm	30, 37, 61	96.676
Dm	30, 37, 61	95.672
Dp	30, 37, 61	92.333
Dp	30, 37, 61	88.154
Dp	30, 37, 61	93.376
Dp	30, 37, 61	74.562
Dp	30, 37, 61	76.763
Yd	30, 37, 61	25.395
Yd	30, 37, 61	22.513
Yd	30, 37, 61	22.481
Yd	30, 37, 61	21.414
Yd	30, 37, 61	19.282

**Tabla 40. Neonato 19**

Sitio de medición	Concentración de referencia (mg/dL)	Concentración de predicción (mg/dL)
Dm	49.000	129.459
Dm	49.000	129.186
Dm	49.000	128.450
Dm	49.000	129.110
Dm	49.000	128.892
Dp	49.000	152.845
Dp	49.000	151.924
Dp	49.000	146.029
Dp	49.000	132.584
Dp	49.000	132.418
Yd	49.000	76.608
Yd	49.000	76.361
Yd	49.000	75.563
Yd	49.000	75.365
Yd	49.000	74.436

**Tabla 41. Neonato 20**

Sitio de medición	Concentración de referencia (mg/dL)	Concentración de predicción (mg/dL)
Dm	62.000	78.629
Dm	62.000	83.054
Dm	62.000	82.682
Dm	62.000	80.366
Dm	62.000	81.193
Dp	62.000	61.624
Dp	62.000	63.576
Dp	62.000	63.454
Dp	62.000	64.787
Dp	62.000	63.638
Yd	62.000	48.329
Yd	62.000	41.005
Yd	62.000	29.056
Yd	62.000	34.567
Yd	62.000	36.341

**Tabla 42. Neonato 21**

Sitio de medición	Concentración de referencia (mg/dL)	Concentración de predicción (mg/dL)
Dm	54.000	65.577
Dm	54.000	66.042
Dm	54.000	63.200
Dm	54.000	62.588
Dm	54.000	63.034
Dp	54.000	53.459
Dp	54.000	52.770
Dp	54.000	52.832
Dp	54.000	53.338
Dp	54.000	54.623
Yd	54.000	-14.929
Yd	54.000	-37.571
Yd	54.000	-30.662
Yd	54.000	-28.425
Yd	54.000	-6.771

# Capítulo 10

## Conclusiones y Perspectivas

El uso de técnicas de análisis multivariante como PLS, aplicadas al análisis de espectros absorción en el cercano infrarrojo (NIR), para la calibración de modelos de predicción de la concentración de analitos en soluciones acuosas, demostró ser una técnica eficaz para la detección y cuantificación de analitos en soluciones acuosas in-vitro. Además tiene la ventaja de ser una técnica no invasiva, de medición rápida y con la posibilidad de realizar mediciones en línea de forma continua, evitando también el uso de reactivos o agentes químicos de desecho utilizados en los métodos tradicionales de detección y cuantificación.

Para la detección y cuantificación de la glucosa en adultos in vivo y de forma no invasiva, podemos decir que la técnica es factible, pero presenta ciertos inconvenientes que no lo hacen clínicamente aceptable como un método alternativo de detección y cuantificación. Algunos de los inconvenientes son: Los modelos de predicción no son “universales”, es decir, solo funcionan de una forma aceptable para los espectros de la persona con la cual fue calibrado el modelo de predicción, aunado al hecho de que factores externos como la forma de medición, grosor de la piel, temperatura corporal y del ambiente, pueden llevarnos a una pobre calibración del modelo. Sin embargo el preprocesamiento de datos, además de una metodología experimental adecuada, ayudan a reducir las fuentes de error para las mediciones espectroscópicas, así como para la calibración del modelo de predicción. En conclusión, la técnica funciona pero no puede ser utilizada aún para fines clínicos en adultos.

Por otra parte, se observó que es factible utilizar modelos de predicción calibrados para adultos, en la predicción de la concentración de glucosa, in vivo y de forma no invasiva en neonatos, observándose de los estudios realizados, una alta correlación de las predicciones para diversos neonatos frente al estándar de referencia clínico en el rango de los 30 a los 100 mg/dL. De las predicciones realizadas con la técnica no invasiva, se obtuvo un coeficiente de correlación de predicción más alto que el obtenido para dos glucómetros comerciales, así como un error de medición más bajo para la técnica no invasiva que el obtenido para los glucómetros. El inconveniente evidente en estos resultados, son en primer lugar; el bajo número de neonatos usados para el estudio, lo cual limita la estadística para visualizar una posible aplicación clínica a corto plazo. Otro inconveniente, son el control de los factores que influyen en la predicción para cada neonato, aunque con los resultados obtenidos, la tendencia muestra que la mejor zona de medición es en la yema del dedo. No obstante, estos resultados son muy alentadores, debido a que en la actualidad la mayor cantidad de estudios relativos a este tema están orientados para el monitoreo de glucosa en personas diabéticas adultas, por lo cual nuestra investigación es innovadora y con una posible pronta aplicación clínica.

En conclusión, podemos decir, que el objetivo planteado en el título de la tesis fue superado con resultados que van más allá de lo previsto en un principio, así como en aplicación. Todo esto logrado gracias al trabajo multidisciplinario que esta investigación planteaba desde un principio, enriqueciendo en ideas y aplicaciones esta tesis.

A continuación se enumeran algunas de las contribuciones de esta investigación:

1. Trabajo multidisciplinario realizado entre el área de investigación y caracterización en materiales con la comunidad médica en San Luis Potosí.
2. Aplicación de las técnicas espectroscópicas y de quimiometría en el área clínica.

3. Uso de un modelo de predicción calibrado con los espectros de un adulto, para la predicción de la concentración de glucosa en neonatos.
4. Identificación de factores que influyen tanto en la medición como en el sitio de predicción en neonatos.
5. Es posible aplicar eficientemente las técnicas de espectroscopia óptica de absorción y de calibración multivariante, para la predicción de analitos o componentes en mezclas simples.

Finalmente, existen perspectivas para continuar con esta investigación, como:

1. Continuar con las mediciones espectroscópicas en neonatos para aumentar el numero de muestras y evaluar estadísticamente su aplicación clínica.
2. Evaluar los factores que influyen para la predicción en las diferentes zonas del cuerpo del neonato.
3. Evaluación de la mejor zona de medición en neonatos.
4. Continuar con el estudio para la calibración de modelos de predicción en adultos.
5. Implementar estas técnicas para la detección de otros componentes de la sangre, como colesterol, triglicéridos y urea, tanto en adultos como en infantes.
6. Se plantea seguir en esta área de investigación.

# Bibliografía

- [1] Alam M. Kathleen, *Noninvasive Diagnoses by Near-Infrared Spectroscopy*, Sandia Report, SAND2000-2584, (2000).
- [2] Christopher V. Eddy and Mark A. Arnold, *Near-Infrared spectroscopy for measuring urea in hemodialysis fluid*, *Clinical Chemistry*, **47** 1279-1286 (2001).
- [3] Hopkins George W. and Mauze Ganapati R, *In-vivo NIR diffuse-reflectance tissue spectroscopy of human subjects*, Technical report HP laboratories Palo Alto, January (1999).
- [4] Khalil Omar S, *Spectroscopic and clinical aspects of noninvasive glucose measurements*, *Clinical Chemistry*. **45** 165-177 (1999).
- [5] Ling X.-F. et al, *Investigation of normal and malignant tissue sample from the human stomach using fourier transform Raman spectroscopy*, *Applied Spectroscopy*. **56** 570-573 (2002).
- [6] Malin Stephen F. et al. *Noninvasive Prediction of glucose by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy*, *Clinical Chemistry* **45** 1651-1658. (1999).
- [7] Menni F, Lonlay P, Senvib C., et al. *Neurologic outcomes of 90 neonates and infants with persistent hyperinsulinemic.*, *Pediatrics* **107** 476 (2001).
- [8] Rhiel Martin et al, *Nondestructive near-infrared spectroscopic Measurement of multiple analytes in undiluted samples of serum-based cell culture media*, *Biotechnology and Bioengineering*, **77** 73-82 (2002).

- [9] Siesjo B. K., *Hypoglycemia, brain metabolism, and brain damage*. *Diabetes Metab. Rev.* **4** (2) 113 (1988).
- [10] Volpe J. J., *Hypoglycemia and brain Injury in: Neurology of the newborn*, 4rd Ed. WB Saunders, Philadelphia, 497-520, (2001).
- [11] Yoon Gilwon, Amerov Airat K, Jeon Kye Jin and Kim Yoen-Joo, *Determination of glucose concentration in a scattering medium based on selected wavelengths by use of an overtone absorption band*, *Applied Optics.* **41** (2002) 1469-1475.
- [12] Brereton R.G, *Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry*, *Analyst*, **125** 2125-2154 (2000).
- [13] Broad N. W., Jee R. D., Moffat A. C., Eaves M. J., Mann W. C. and Dziki W, *Non-invasive determination of ethanol, propylene glycol and water in a multi-component pharmaceutical oral liquid by direct measurement through amber plastic bottles using fourier transform near-infrared spectroscopy*, *Analyst*, **125** 2054-2058 (2000).
- [14] Demir C., and Brereton R.G., *Multivariate calibration on designed mixtures of four pharmaceuticals*, *Analyst*, **123** 181 (1998).
- [15] Egan W. J. and Morgan S. L., *Outlier detection in multivariate analytical chemical data*, *Anal. Chem.* **70** 2372 (1998).
- [16] Frank I. E. and Todeschini R., *The Data Analysis Handbook*, Elsevier, Amsterdam (1994).
- [17] Fuller M.P., Ritter G.L. and Draper C.S., *Appl. Spectrosc.*, **42** 2 (1988).

- [18] Kelly J. J., Barlow C. H., Jinguji T. M. and Callis J. B., *Prediction of gasoline octane numbers by near infrared spectroscopy in the spectral range 680-1235 nm*, Anal. Chem., **61** 313 (1989).
- [19] Kim H. Esbensen, *An introduction to multivariate data analysis and experimental design*, Aalborg University, Esbjerg, 5<sup>th</sup> ed. CAMO (2002).
- [20] Lemberge P. and Van Espen J., *Quantitative energy-dispersive X-ray fluorescence analysis of liquids using partial least-squares regression*, X-Ray Spectrom., **28**, 77-85 (1999).
- [21] Martens H. and Naes T., *Multivariate Calibration*, John Wiley and Sons (1991).
- [22] Naes T. and Isaksson T., *Selection of samples for calibration in near infrared spectroscopy. I. General principles illustrated by example.*, Appl. Spectrosc. **43** 328-335 (1989).
- [23] Naes T., *Detection of multivariate outliers in linear mixed models. Communications in statistics (Theory and Methods)*, **15**, 33-47 (1989).
- [24] Naes T. *Leverage and influence measures related to principal component regression. Chemometrics and intelligence laboratory systems*, **5** 155-168 (1987).
- [25] Naes T., and Martens H. *Multivariate calibration II. Chemometric methods. Trends in analytical chemistry*, **3** 266-271 (1984).
- [26] Naes T., *The design of calibration in NIR reflectance analysis by clustering*, J. Chemom. **1** 121 (1987).

- [27] Parisi A. F., Nogueiras L. and Prieto H., *Anal. Chem. Acta.* **238**, 95 (1990).
- [28] Pelletier M. J., *Quantitative analysis using Raman spectrometry*, *Applied spectroscopy* **57** 20A-42A (.2003).
- [29] Seasholtz M.B, Archibald D.D., Lorber A. and Kowalski B.R., *Appl. Spectrosc.*, **43** 6 (1989).
- [30] Beer A, *Ann. Physik Chem*, **86** (5), 78–88 (1852).
- [31] Berger A. J., Wang Yang, and Field M. S, *Rapid, noninvasive concentration measurements of aqueous biological analytes by near-infrared Raman spectroscopy*, **35** 209-212 (1996).
- [32] Bohren C. F, and Huffman, *Absorption and scattering of light by small particles*. First edn. New York: John Wiley and Sons. D. R. 1983.
- [33] Cooper C. E., Cope M, Springett R, Amess P. N, Penrice J, Tyszczyk L, Punwani S., Ordidge R, Wyatt J. S, and Delpy D. T. *Use of mitochondrial inhibitors to demonstrate that cytochrome oxidase near-infrared spectroscopy can measure mitochondrial dysfunction noninvasively in the brain*. *J Cereb Blood Flow Metab*, **19** (1), 27–38 (1999).
- [34] Cope M., *The development of a near infrared spectroscopy system and its application for non invasive monitoring of cerebral blood and tissue oxygenation in the newborn infant*. PhD tesis, University College London, London, 1991.
- [35] Judd D. and Wyszecki, *Color in business, Scienccn and industry*, John Wiley and Sons, New York, (1975).

- [36] Khalil Omar S, *Spectroscopic and clinical aspects of noninvasive glucose measurements*, *Clinical Chemistry*, **45**:2 165-167 (1999).
- [37] Kubelka V. P. and Munk F., *Z. Tech. Physik.* **12**, 593 (1931).
- [38] Marcus Y. *Water binding by organic molecules*. *Cell Biochem. Func*, **13** 157-163 (1995).
- [39] Marieb E. N. *Human Anatomy and Physiology*. Third edn. Redwood City, California: Benjamin/Cummings, 1995.
- [40] Nakamoto Kazuo, *Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds. Part A: Theory and applications in inorganic chemistry*, 5<sup>th</sup> ed. A Wiley Interscience publications (1997).
- [41] Norris K. H. *Multivariate analysis of raw materials, in chemistry and world foods supplies: the new frontiers*, chemraw II L. Shemlit ed. Pergamon Press, Oxford, 1983.
- [42] Pendersen D. K, and Engelsen S. B, *Monitoring Industrial Food Processed Using Spectroscopy and Chemometrics*, NIRS, The royal veterinary and Agricultural University, Denmark.
- [43] Thorniley M. S., Wickramasinghe Y. A. P. D., and Rolfe P, *Near infrared spectroscopy: a new technique for the non invasive monitoring of tissue and blood oxygenation in vivo*, *Biochem. Soc. Trans.* **16** 62-63 (1988).
- [44] White D. R., Widdowson E. M, Woodard H. Q., and Dickerson J. W. *The composition of body tissues (II). Fetus to young adult*. *Br. J. Radiol.*, **64** (758), 149-159 (1991).

- [45] Workman J., *An Introduction to Near Infrared Spectroscopy* ,  
www.Spectroscopy now.com, 04 march 2004.
- [46] Barker S.A., Bourne E. J, Stacey M. and Whiffen D. H, J. Chem. Soc.,  
171 (1954).
- [47] Bell A.. F, L. D. Barron and Hecht L, Carbohydr. Res., **257**, 11 (1994).
- [48] Cramer Christopher J., and Truhlar Donald G, *Quantum Chemical  
Conformational Analysis of Glucose in Aqueous Solution*, J. Am. Chem.  
Soc. **115** 5745-5753 (1993).
- [49] Edward J. T, Chem. Ind. 1102-1104 (1955).
- [50] Ha S. Gao J. Tidor B. Brady J. W. Karplus M. J., J. Am. Chem. Soc,  
**113** 1553-1557 (1991).
- [51] Foresman James B., Frisch Eleen, *Exploring Chemistry with Electronic  
Structure Methods*, Second Edition, Gaussian, Inc. Pittsburgh, 1996.
- [52] Lemieux R. U, *Exploration with sugars: How sweet it was*; American  
Chemical Society: Washington, D.C. 1990.
- [53] Madox, J. Nature. **364**, 669 (1993).
- [54] Molteni C. and Parrinello M, *Glucose in Aqueous Solution by First  
Principles Molecular Dynamics*, J. Am. Chem. Soc. **120** 2168-2171  
(1998).
- [55] PA. David C. Young, *Computational Chemistry: A practical guide for  
applying techniques to real-world problems*. John Wiley and Sons, Inc.  
(2001).

- [56] Schmidt R. K. Kerplus M. Brady J. W. J. Am. Chem. Soc., **118** 541-546 (1996).
- [57] Suzuki Tappei and Sota Takayuki, J. Chem. Phys., **119**, 10133(2003).
- [58] Pedersen D.K and Engelsen S. B., New Food, **9** (2002).
- [59] Britton Chance, Hanli Liu, Toshiyuki Kitai, and Yutao Zhang, *Effects of solutes on optical properties of biological Materials: Models, Cells, and Tissues*, Analytical Biochemistry **227** 351-362, (1995).
- [60] Flock S.T., Jaques S. L, Wilson B. C, Star W. M, Van Gemert M. J. C, *Optical properties of intralipid: A Phantom medium for light propagation studies*, Lasers in Surgery and Medicine **12**: 510-519, 1992.
- [61] Troy Tamara L. and Thennadil Suresh N, *Optical properties of human skin in the NIR Wavelength range of 1000 - 2200 nm*, Technical Report, Intrumentation Metrics, Inc. 2085 Technology Circle Suite 302, Tempe, Arizona 85284.
- [62] Burmeister Jason J. and Arnold Mark A, *Evaluation for measurement sites for noninvasive blood glucose sensing with near-infrared transmission spectroscopy*, Clinical Chemistry, 1621-1627 (1999).
- [63] Gray H. Descriptive and surgical anatomy, T.P. Pick and R. Howden, ed. New York: Bounty Books, 1977.
- [64] Gabriely I., Wozniak R., Mevorach M., Kaplan J., Aharon Y., Shamoon H., *Transcutaneous glucose measurement using near-infrared spectroscopy during hypoglycemia.*, Diabetes Care, **22** 2026-2032 (1999).

- [65] Koschinsky T. and Heinemann L., *Sensors for glucose monitoring: technical and clinical aspects*, Diabetes Metab. Res. Rev. **17** 113-123, (2001).
- [66] Williams A. C., Edwards H. G. M. and Barry. B. W. *Raman spectra of human keratotic biopolymers: skin, callus, hair and nail*, Journal of Raman Spectroscopy, **25** 95-98 (1994).
- [67] Bier D.M, Leake R. D, Haymond M. W, et al. *Measurements of "true" glucose production rates with 6,6 dideuterioglucose*. Diabetes **26**, 1016 (1977).
- [68] Bougneres P.F, Kart I. E, Hillman L. S, et al. *Lipid transport in the human newborn. Palmitate and glycerol turnover and the contribution of glycerol to neonatal hepatic glucose output*. J. Clin. Invest. **70** 262-270 (1982).
- [69] Cornblath M, Schwartz R. *Disorders of carbohydrate metabolism in infancy*. Cambridge, MA: Blackwell Publications; 1991.
- [70] Dweck H. S, Cassady G. *Glucose intolerance in infants of very low birth weight. Incidence of hyperglycemia in infants of birth weights 1100 grams or less*. Pediatrics **53** 189-195 (1974).
- [71] Girouard J, Forest J. C, Masse J, Leroux M, Bradbourn N. C, Noblet T. C, Joynes J. O, Baum J. *Multicenter Evaluation of the glucometer Elite XL meter, an instrument specifically designed for use with neonates*, Diabetes Care. **23**, 1149-1153 (2000).

- [72] Hawdon J. M., Ward Platt M.P, Aynsley Green A. *Pattern of metabolic adaptation for preterm and term infants in the first week neonatal*. Arch. Dis. Child. **67** 357-365 (1992).
- [73] Keele D. K, Kay J. L, et al. *Plasma free fatty acids and blood sugar levels in newborn infants and their mother*. Pediatrics. **37** 597-604 (1966).
- [74] Kramer Michael S. And Feinstein Alvan R., Clinical Bioestatics LIV. *The biostatics of concordance*, Clin. Pharmacol. Ther., 111-123, January (1981).
- [75] Lawrence I and Lin Kuei, *A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility*, Biometrics **45** 225-268 (1989).
- [76] Louis C, Mitchell A. A, Epstein M. F, et al. Risk factors for neonatal hyperglycemia asociated with 10% dextrose infusion. Am. J. Dis. Child. **139**(8), 783-789 (1985).
- [77] Ogata E. S, *Carbohydrate metabolism in the fetus and neonate and altered neonatal glucose regulation*, Ped. Clin. North Am. **33** 25-45 (1986).
- [78] Pildes R. S, Neonatal hyperglycemia. J Pediatr. **109**(5), 905-907 (1986).
- [79] Santerre J, Karlberg P, *Respiratory quotient and metabolic rate in normal full-term and small for date newborn infants*. Acta Paediatrica. Scand. **59** 653-658 (1970).
- [80] Stanley C. A, Baker L. *The causes of neonatal hypoglycemia*. N. Engl. J. Med. **340** 1200 (1999).

- 
- [81] Sunehag A, Ewald U, Gustafsson J. *Extremely preterm infants (<28 weeks) are capable of gluconeogenesis from glycerol on their first day of life. Pediatr. Res.* **40** 553-557 (1996).
- [82] Zar Jerrold H. *Bioestatical Analysis*, third edition, Prentice may (1996).

# ANEXO 1

## Datos Técnicos

### Descripción técnica de aparatos

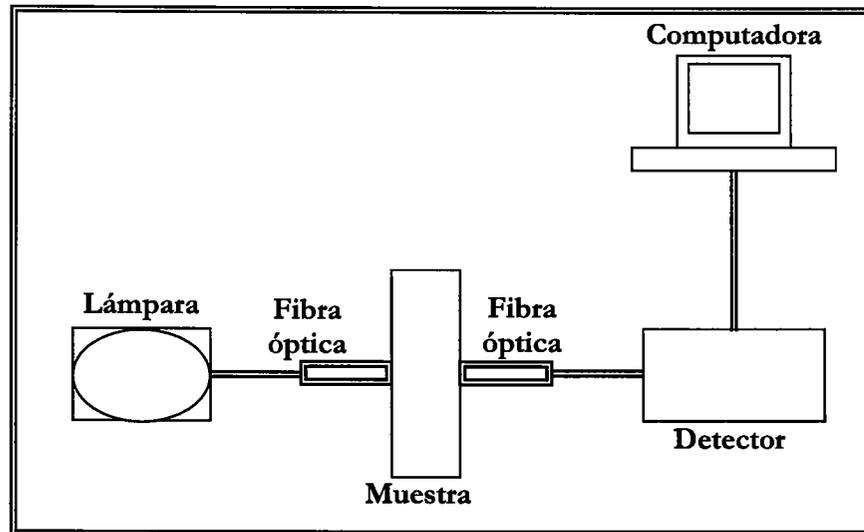
La colección de espectros de absorción en el cercano infrarrojo se realizaron utilizando el espectrofotómetro descrito a continuación:

Espectrofotómetro miniatura NIR 512 por fibra óptica de Ocean Optics, con un detector CCD de InGaAs de 512 píxeles de un tamaño de 25 x 500  $\mu\text{m}$ . Un rango de detección de 0.85 a 1.7 $\mu\text{m}$ , una razón señal a ruido de 4000:1, el cual opera a una temperatura de -5°C.

La fuente de excitación es una lámpara de Tungsteno-Halógeno con 1W/900-hr, un bulbo de 3100 K, el cual funciona con 12 VDC.

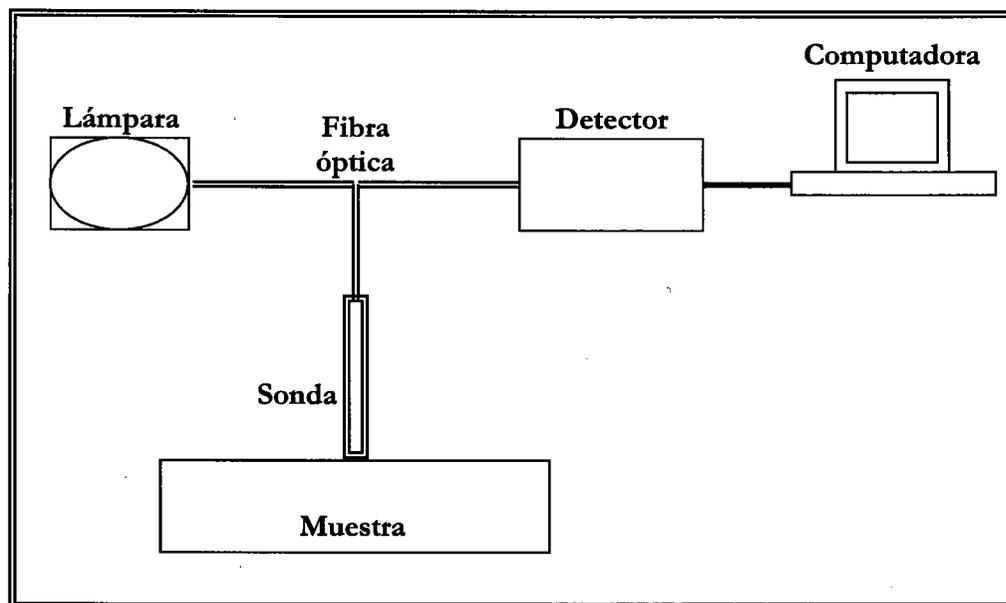
## Configuraciones experimentales.

1. Configuración para mediciones espectroscópicas de absorción NIR por transmisión:



En esta configuración la luz viaja a través de una fibra óptica hacia el porta muestra, donde se encuentra la muestra en solución. La luz atraviesa la muestra y viaja a través de otra fibra óptica hacia el detector CCD, este convierte la señal de luz en una señal eléctrica la cual es procesada y mostrada por una computadora.

2. Configuración para mediciones de absorción NIR por la técnica de reflectancia difusa.



En este arreglo experimental, se utiliza una fibra óptica bifurcada, la cual tiene en la punta una sonda de acero inoxidable, donde hay una fibra óptica central y seis concéntricas a esta. Las seis fibras concéntricas son parte de la fibra que guía la luz de la fuente hacia la muestra como se observa en la figura. La fibra central se encarga de recolectar la luz que emerge de la muestra con la información de esta y esta conectada al detector CCD. La sonda puede colocarse en contacto con la muestra o no, a una configuración de  $45^\circ$  o  $90^\circ$  respecto a esta. En las mediciones in vivo, se utilizó una configuración de  $90^\circ$  en contacto con la muestra.

---

Del trabajo realizado en esta tesis, se han derivado los siguientes artículos de investigación.

**Artículos de investigación en revistas con arbitraje:**

- 1) “*Modelo de predicción basado en análisis multivariante para la determinación de concentración de azúcar en solución*”. C. Araujo-Andrade, I. Campos-Cantón, J. R. Martínez, G. Ortega-Zarzosa y F. Ruiz. Aceptado para publicación en la Revista Mexicana de Física, en la sección de enseñanza en (2005).
- 2) “*Infrared and Raman spectra, conformational stability, ab initio calculations of structure, and vibrational assignment of  $\alpha$  and  $\beta$  glucose*”. C. Araujo-Andrade, Facundo Ruiz, J.R. Martínez-Mendoza, H. Terrones. Journal of Molecular Structure (TEOCHEM). 714, 143-146 (2005). [Publicado]

**Artículos de investigación en extenso:**

- 3) Proceedings para la revista del VIII Simposium Mexicano de Física Medica realizado en Guanajuato, Gto. “*Non invasive in vivo blood glucose levels prediction using near infrared spectroscopy*”. C. Araujo-Andrade, Facundo Ruiz, J.R. Martínez-Mendoza, H. Terrones. AIP Conference Proceedings, September 30, 2004, Volume 724, Issue 1, pp. 234-239
- 4) Artículo presentado en el congreso de la Asociación Mexicana de Control Automático (AMCA 2004). C. Araujo-Andrade, Facundo Ruiz, J.R. Martínez-Mendoza, H. Terrones “*Predicción no invasiva de la concentración de glucosa in vivo utilizando espectroscopía de absorción en el cercano infrarrojo (NIR)*”.

---

**Artículos de investigación en proceso de revisión:**

- 5) *“Detección y predicción de concentraciones de glucosa en un medio turbio (intraalípidos) utilizando espectroscopía de absorción en el cercano infrarrojo”*. C. Araujo-Andrade, Facundo Ruiz, J.R. Martínez-Mendoza, H. Terrones, A. Gordillo- Moscoso. Enviado para su revisión a la Revista Mexicana de Física.
- 6) *“Non invasive in vivo blood glucose levels prediction using near infrared spectroscopy.”* C. Araujo-Andrade, Facundo Ruiz, J.R. Martínez-Mendoza, H. Terrones. Enviado para su revisión a la revista Applied Spectroscopy.
- 7) *“Analysis of the organoleptic properties of mezcal from San Luis Potosí using PLS and PCA”*.C. Araujo-Andrade, J.R. Martínez-Mendoza, Facundo Ruiz. Enviado para su revisión a la revista Journal of Agricultural and Food chemistry.
- 8) *“A rapid method for determination of the stored time of aged alcoholic beverages.”* C. Araujo-Andrade, J.R. Martínez-Mendoza, Facundo Ruiz. Enviado para su revisión a la revista Journal of Agricultural and Food chemistry.

**En proceso de escritura:**

- 9) *“Factibility for non invasive estimation of glucose concentration in newborns using NIR spectroscopy and PLS”*. C. Araujo-Andrade, Facundo Ruiz, J.R. Martínez-Mendoza, H. Terrones, J.F. Hernández-Sierra, F. Escalante-Padron.