



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
ESCUELA DE INGENIERIA

**MEDICIÓN NO-INVASIVA DE GLUCOSA
USANDO ESPECTROSCOPIA RAMAN Y SU
POTENCIAL APLICACIÓN A PACIENTES
DIABÉTICOS.**

NICOLÁS EDUARDO LARACH LEÓN

Tesis para optar al grado de
Magíster en Ciencias de la Ingeniería

Profesor Supervisor:
ANDRÉS GUESALAGA M.

Santiago de Chile, Junio, 2010

© 2010, Nicolás Larach L.



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
ESCUELA DE INGENIERIA

**MEDICIÓN NO-INVASIVA DE GLUCOSA
USANDO ESPECTROSCOPIA RAMAN Y
SU POTENCIAL APLICACIÓN A
PACIENTES DIABÉTICOS.**

NICOLÁS EDUARDO LARACH LEÓN

Tesis presentada a la Comisión integrada por los profesores:

ANDRÉS GUESALAGA

MARCELO GUARINI

FEDERICO LEIGHTON

HECTOR JORQUERA

Para completar las exigencias del grado de
Magíster en Ciencias de Ingeniería

Santiago de Chile, Junio, 2010

(A mis padres, hermanos y amigos,
que siempre me apoyaron en el
desarrollo de esta investigación)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la gente del laboratorio de Nutrición Molecular, por la ayuda entregada para la preparación de las muestras, en especial a Pablo Strobel y al profesor Federico Leighton. Al grupo de microsistemas y nanotecnología de la Universidad de British Columbia, en especial al profesor Lukas Chrostowski y a la alumna de doctorado Sahba Talebifard, por las valiosas discusiones sostenidas que sin duda enriquecieron el contenido de esta tesis. Agradezco también a mi familia, amigos y compañeros que me dieron fuerzas y ánimo en los momentos más difíciles de este trabajo. Finalmente agradezco a mi profesor supervisor Andrés Guesalaga por su orientación, apoyo y confianza, la cual fue fundamental para el desarrollo de esta investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes generales	1
1.2 Espectroscopia Raman	3
1.2.1 Espectrómetro Raman.....	6
1.2.2 Ventajas y desventajas de la Espectroscopia Raman.....	8
1.3 Investigaciones previas	11
1.3.1 Métodos mínimamente invasivos	11
1.3.2 Métodos no invasivos	12
1.4 Objetivos de la tesis	18
2. EQUIPAMIENTO	19
2.1 Definiciones	19
2.1.1 f/#	19
2.1.2 <i>Stray light</i> o luz parásita	19
2.1.3 Configuraciones ópticas.....	19
2.1.4 Filtros de rechazo del láser	21
2.1.5 Especificaciones de los detectores CCD.....	22
2.2 Espectrómetro Raman utilizado	23

2.3	Diferencias entre un espectrómetro portátil y uno de laboratorio.....	26
3.	ANÁLISIS DE DATOS	29
3.1	Mínimos cuadrados parciales (PLS)	29
3.2	Filtrado en frecuencia.....	30
3.2.1	Antecedentes generales.....	30
3.2.2	Explicación del método	32
3.3	Preprocesamiento	34
3.3.1	<i>Multiplicative Scatter Correction</i> (MSC) y <i>Standard Normal Variate</i> (SNV)	35
3.3.2	Savitsky-Golay	35
3.3.3	<i>Mean centering</i> o centrado de medias	35
3.4	Calibración	36
3.5	Validación	37
3.6	<i>Clarke Error Grid Analysis</i> (EGA) o gráfico de error de Clarke	37
4.	EXPERIMENTOS.....	39
4.1	Experimentos preliminares.....	39
4.1.1	Obtención del espectro Raman de la glucosa	39
4.1.2	Comportamiento de la razón señal a ruido de los espectros Raman	40
4.2	Métodos.....	42
4.2.1	Procedimientos experimentales	45
4.3	Análisis.....	47
4.3.1	Calibración “A”	48
4.3.2	Calibración “B”	49
4.3.2.1	Análisis de los datos obtenidos con el método del promedio	49
4.3.2.2	Análisis de los datos obtenidos con el método del filtrado en frecuencia	54
4.4	Resultados	55
4.4.1	Calibración “A”	55
4.4.2	Calibración “B”	58
4.4.2.1	Resultados con el método del promedio	58

4.4.2.2 Resultados con el método del filtrado en frecuencia	64
5. CONCLUSIONES	67
6. BIBLIOGRAFÍA	69

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1.1: Concentraciones de glucosa y volúmenes de los fluidos en la matriz tejidos-fluidos. Tabla tomada de (Koo, 2001).	15
Tabla 2.1: Especificaciones del espectrómetro MiniRam de B&W Tek.....	25
Tabla 4.1: Detalles del experimento	41
Tabla 4.2: Para cada concentración de glucosa en la sangre se usaron 3 distintas concentraciones en el líquido intersticial. En la tabla se observa el caso de una concentración de 50 mg/100 ml en la sangre	45
Tabla 4.3: Error máximo cometido al preparar cada una de las muestras.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1: Niveles de energía asociados con el fenómeno de fluorescencia.....	4
Figura 1.2: Diferentes posibilidades de dispersión. ν_0 indica la frecuencia de la luz incidente. $h\nu_1$ es la diferencia de energía entre el estado base y el primer estado vibracional.....	6
Figura 1.3: Esquema simplificado de un espectrómetro Raman dispersivo.....	7
Figura 1.4: Espectro Raman de la glucosa.	7
Figura 1.5: Sensibilidad espectral del detector CCD Sony ILX511 a una temperatura ambiente de 25°C. Este detector es usado por varios espectrómetros en la actualidad.	9
Figura 1.6: Sección cruzada de la piel humana. Los porcentajes indican las fracciones de radiación absorbida. Figura tomada de (Henderson & Schulmeister, 2004).	10
Figura 2.1: Espectrógrafo Czerny-Turner cruzado.....	20
Figura 2.2: Espectrógrafo de grilla holográfica cóncava.....	21
Figura 2.3: Espectrógrafo Holográfico axial transmisivo.	21
Figura 2.4: Espectro Raman de benceno líquido obtenido con un espectrómetro con y sin filtro holográfico de rechazo de luz del láser entre la muestra y la rendija de entrada. Las escalas de intensidad difieren largamente entre los dos espectros. Figura tomada de (McCreery, 2000).	22
Figura 2.5: Curvas de eficiencia cuántica para distintos tipos de CCD. Figura obtenida de (McCreery, 2000) a la que se le ha agregado el rango de dispersión Raman para un láser de 785 nm.....	24
Figura 2.6: Fotografía del espectrómetro MiniRam de B&W Tek.	24
Figura 2.7: Sostenedor de cubeta utilizado.....	25
Figura 2.8: Esquema del instrumento utilizado por el MIT. Imagen obtenida desde (Shih, 2007).	27
Figura 3.1: Fotopletismograma de una mujer de 22 años. Figura tomada de (Hlimonenko, Meigas, & Vahisalu, 2003).....	30
Figura 3.2: Formas del pulso de dos pacientes distintos obtenidas de un dedo de la mano. Figura tomada de (Allen & Murray, 2003).....	30

Figura 3.3:	Representación de la absorbancia relativa para varias secciones del dedo de la mano. La componente continua es significativamente mayor que la alterna. Figura tomada de (Asada, Shaltis, Reisner, Rhee, & Hutchinson, 2003)	31
Figura 3.4:	Espectro de potencia de la forma de onda normalizado con respecto a la fundamental para tres edades. Figura tomada de (Sherebrin & Sherebrin, 1990).....	32
Figura 3.5:	Simulación de una columna de la matriz X donde se ha tomado en cuenta sólo la primera y segunda armónica de la pulsación cardíaca. La componente continua de la señal corresponde a la señal Raman de la glucosa proveniente de fuentes estáticas como el líquido intersticial mientras que la señal alterna corresponde a la glucosa proveniente de la sangre. La proporción entre las señales alterna y continua se ha estimado en base a la tabla 1.1. La señal simulada no incluye ningún tipo de ruido o señal proveniente de otras fuentes distintas de la glucosa.....	33
Figura 3.6:	Espectro de la señal de la figura 3.5.	34
Figura 3.7:	<i>Clarke Error Grid Analysis</i> (EGA) o gráfico de error de Clarke.	38
Figura 4.1:	Espectro Raman de una solución acuosa de glucosa con una concentración de 18 gr/100 ml. El espectro del agua ha sido sustraído. El tiempo de integración fue de 100 s.	39
Figura 4.2:	Comportamiento de la razón señal a ruido al variar el número de “cuadros” manteniendo el tiempo total de integración.	42
Figura 4.3:	Esquema de la señal cuadrada observada a una longitud de onda correspondiente a una banda Raman de la glucosa. Los datos se han normalizado de manera que la intensidad máxima es 1.	44
Figura 4.4:	Media \pm la desviación estándar de los datos obtenidos mediante el método de filtrado en frecuencia.....	47
Figura 4.5:	Media \pm la desviación estándar de los datos obtenidos mediante el método del promedio.	48
Figura 4.6:	Espectros menos la señal de oscuridad. Los píxeles calientes son removidos y, por tanto, se aprecia el espectro con mucha mayor claridad. Sólo se grafican algunos espectros para una mejor visualización de los datos.....	49

Figura 4.7:	Espectros menos la señal de oscuridad y el offset. El offset de cada espectro se calculó como el promedio desde los 1600 a los 3220 cm^{-1} . Sólo se grafican algunos espectros para una mejor visualización de los datos.....	50
Figura 4.8:	Scores de las muestras sobre la primera componente principal.....	51
Figura 4.9:	Loadings de las variables sobre la primera componente principal.	51
Figura 4.10:	Muestras 54 (6600 mg/100 ml) y 55 (8400 mg/100 ml). La muestra 54 supera a la 55 lo que sugiere que hay otras interferencias además del offset.	52
Figura 4.11:	Espectros menos la señal de oscuridad preprocesados con MSC. Sólo se muestran algunos de los espectros para poder visualizar los datos con mayor claridad.....	53
Figura 4.12:	Scores de las muestras sobre la primera componente principal después de aplicar todos los métodos de preprocesamiento.	53
Figura 4.13:	Datos preprocesados con Savitsky-Golay de orden cero y ancho 5 y SNV. Sólo se muestran algunos espectros para una mejor visualización.	54
Figura 4.14:	Calibración PLS obtenida a partir de los datos obtenidos con el método de filtrado en frecuencia.....	55
Figura 4.15:	Calibración PLS obtenida a partir de los datos obtenidos con el método del promedio.	56
Figura 4.16:	Espectro generado en Matlab consistente en gaussianas más ruido de distribución normal.	57
Figura 4.17:	Calibración PLS obtenida a partir de los datos obtenidos con el método del promedio.	58
Figura 4.18:	Vector de regresión del modelo PLS. Se observan claramente los peaks de la glucosa en el vector de regresión lo que indica que la calibración se basa efectivamente en la glucosa.	59
Figura 4.19:	Datos de validación sobre el gráfico de error de Clarke.....	60
Figura 4.20:	Calibración PLS obtenida a partir de los datos obtenidos con el método del promedio sin el efecto de la variación de la concentración de la componente continua.	60
Figura 4.21:	Datos de validación sobre el gráfico de error de Clarke.....	61

Figura 4.22: Calibración PLS obtenida a partir de los espectros de bajas concentraciones con el método del promedio sin el efecto de la variación de la concentración de la componente continua.....	62
Figura 4.23: Vector de regresión del modelo PLS. Si bien el nivel de ruido es bastante alto, se observa la alta importancia de las variables entre los 400 y 600 cm^{-1} , donde se ubican ciertos peaks de la glucosa, lo que permite afirmar que la calibración se basa, al menos en parte, en la glucosa.	63
Figura 4.24: Datos de validación sobre el gráfico de error de Clarke.	63
Figura 4.25: Calibración PLS obtenida a partir de los datos obtenidos con el método del filtrado en frecuencia.	64
Figura 4.26: Vector de regresión del modelo PLS. Se observan claramente los peaks de la glucosa ubicados entre los 400 y 600 cm^{-1} lo que indica que la calibración se basa efectivamente en la glucosa.....	65
Figura 4.27: Calibración PLS obtenida a partir de los espectros de bajas concentraciones obtenidos con el método del filtrado en frecuencia.	65

RESUMEN

En este trabajo se evalúa la factibilidad de usar espectroscopía Raman para la medición no invasiva de glucosa con miras a su aplicación a pacientes diabéticos. Cuando se toman espectros no invasivos de variadas zonas del cuerpo humano, la mayor parte de la señal de la glucosa proviene del líquido intersticial y no de la sangre. Esto constituye un problema, pues las concentraciones de glucosa en el líquido intersticial suelen tener un desfase temporal con respecto a las concentraciones en la sangre. Por ello, se propone un nuevo método de procesamiento de los espectros que aprovechando las pulsaciones cardíacas logre obtener el espectro de la sangre, rechazando interferencias que provienen de otros fluidos o tejidos.

Para evaluar el rendimiento del nuevo procesamiento de datos, se tomaron espectros de soluciones acuosas de glucosa con el espectrómetro portátil MiniRam BTR-111 de la empresa B&W Tek. A partir de estos espectros se simuló un pulso cuadrado al que se le aplicó la nueva técnica. Finalmente se calibraron modelos PLS con y sin la aplicación del nuevo método para comparar sus resultados. Los resultados usando la nueva técnica no mostraron mejoras. Esto se debe a que los datos procesados presentan una razón señal a ruido baja que no permite aprovechar la ventaja de obtener el espectro exclusivamente de la sangre, por lo que se requiere modificar sustancialmente el equipamiento usado para mejorar su desempeño.

Sin embargo, la técnica es promisoría. Mejorando la razón señal a ruido del espectrómetro y la sonda se podrían alcanzar niveles de error clínicamente aceptables de manera no invasiva utilizando espectroscopía Raman.

Palabras Claves: espectroscopía, espectrómetro, Raman, glucosa, sangre, diabetes, Fourier, filtrado, frecuencia, pulso, cardíaco.

ABSTRACT

In this work, the feasibility of non-invasive glucose measurements using Raman spectroscopy and its potential application to diabetic patients is evaluated. When spectra are acquired from parts of the human body, most of the glucose signal comes from the interstitial fluid, not from the blood. This is a problem because the interstitial fluid glucose concentration lags or leads the blood glucose concentration. Therefore, a new processing method that takes advantage of the heart beating to obtain the concentration of glucose in blood only is proposed. This method also has the capability of rejecting other interferences like tissue and other fluids.

To assess the performance of the new processing method, spectra from aqueous glucose solutions were acquired using the MiniRam BTR-111 Raman spectrometer from B&W Tek. Using those spectra, a square modulated wave was built and the new technique was applied to it.

Finally, PLS models were calibrated with and without applying the new method in order to compare their results. The RMSEP of the model that included the new technique turned out to be worse than the one without it. This is due to the data processed with the new method presents a lower signal-to-noise ratio which impedes to take advantage of the fact of obtaining the glucose concentration only from blood.

Finally, promising results were obtained without the application of the processing technique. Improving the signal-to-noise ratio of the equipment would make possible to obtain glucose concentrations non-invasively with clinically acceptable error levels using Raman spectroscopy.

Keywords: spectroscopy, spectrometer, Raman, glucose, blood, diabetes, Fourier, filtering, frequency, pulse, heart, beat.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes generales

La diabetes mellitus es una enfermedad en la cual el cuerpo falla en producir o responder a la insulina, que es la hormona encargada de regular los niveles de glucosa en la sangre. Debido a esto, a menos que la diabetes sea controlada, se producen niveles muy altos (hiperglucemia) o muy bajos de glucosa en la sangre (hipoglucemia). El rango típico de concentraciones de glucosa en la sangre van desde los 70 mg/100 ml a los 130 mg/100 ml antes de una comida y hasta 180 mg/100 ml después de una comida (American Diabetes Association). Niveles extremadamente altos de glucosa en la sangre pueden causar cetoacidosis, coma e incluso la muerte. Niveles extremadamente bajos de glucosa pueden causar shock, coma e incluso la muerte. La hiperglucemia con el paso del tiempo puede dañar varios sistemas del organismo, especialmente los nervios y los vasos sanguíneos. Del total de los diabéticos, un 10% tiene diabetes tipo I, la cual se caracteriza por la falta de producción de insulina. Sin la administración diaria de insulina, la diabetes tipo I conduce rápidamente a la muerte (American Diabetes Association, 2002). El 90% restante, padece diabetes tipo II y si bien son capaces de producir insulina, las células de sus cuerpos no responden a la hormona.

A nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud estima que en el año 2000 había 171.000.000 diabéticos y proyectó 366.000.000 para el 2030 (Wild, Roglic, Green, Sicree, & King, 2004), mientras que para Chile estimó 495.000 para el año 2000 y proyectó 1.047.000 para el 2030 (*Prevalence of diabetes in the WHO region of the americas.*). Por otro lado, un estudio (Cuevas et al., 2008) señala que la prevalencia de la diabetes en Chile ha sufrido un acelerado incremento en los últimos años, probablemente debido al cambio en el estilo de vida, mayor sedentarismo y obesidad asociada al rápido desarrollo socioeconómico sufrido por el país, que llevará a una enorme carga en el sistema de salud en un futuro cercano. En lo que respecta al impacto económico de la diabetes en Chile, los gastos médicos para los diabéticos son 2 a 3 veces mayores que

para la gente que no padece diabetes, mientras que el costo total para el país asciende a US\$2417.9 millones de los cuales US\$2122 millones corresponden a costos indirectos como los años perdidos de productividad en las personas que mueren anticipadamente o que tienen algún nivel de invalidez debido a la diabetes (Barcelo, Aedo, Rajpathak, & Robles, 2003).

La diabetes lleva a variadas dificultades. Produce complicaciones microvasculares como retinopatía (la mayor causa de ceguera), nefropatía (la mayoría de los nuevos casos de diálisis) y neuropatía (amputaciones, disfunción eréctil). Dentro de las complicaciones macrovasculares se cuentan ataques cardíacos, accidentes vascular cerebrales y enfermedades vascular periféricas, que son entre 2 a 5 veces más frecuentes en personas con diabetes (Decter et al., 2007). En general, el riesgo de muerte de los diabéticos es al menos el doble que el de los no diabéticos. (Organización Mundial de la Salud, 2008)

Ha sido claramente demostrado que el control intensivo de los niveles de glucosa disminuye las complicaciones microvasculares causadas por la diabetes tanto en personas con diabetes tipo I como tipo II. Un estudio realizado sobre la diabetes tipo I encontró que la terapia intensiva reduce el riesgo de desarrollar retinopatía en un 76%, de microalbuminuria en un 39%, de albuminuria en un 54% y de neuropatía en un 60% (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993), mientras que un estudio realizado sobre la diabetes tipo II concluyó que el riesgo de tener complicaciones microvasculares en general se reduce en un 25% cuando se lleva a cabo un control intensivo de la glucosa (UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, 1998).

Para mantener los niveles de glucosa en el rango normal se requiere un monitoreo frecuente de la glucosa en la sangre y un tratamiento que consiste en una dieta, medicaciones o inyecciones de insulina. El monitoreo frecuente de los niveles de glucosa es importante para ajustar el tratamiento y reducir el riesgo de hipoglucemia que puede resultar en la muerte (Decter et al., 2007)

El método más usado por los diabéticos para medir sus niveles de glucosa en la sangre consiste en pinchar un dedo para obtener una gota de sangre la cual se deposita sobre una cinta reactiva. Dicha cinta se inserta en un monitor de glicemia y este entrega el resultado en 5 a 30 segundos. Este método es inconveniente, complicado, doloroso, conlleva un riesgo de infección y lógicamente no entrega información mientras el paciente está durmiendo. Por lo tanto, los pacientes no utilizan el método con la frecuencia que deberían y permiten así que las complicaciones aumenten. Un método no invasivo sería de gran utilidad debido a la ausencia de dolor, facilidad de uso, el potencial incremento en la frecuencia de uso y, por tanto, un mejor control de los niveles de glucosa, y el potencial para un sistema en lazo cerrado incluyendo un monitor y una bomba de insulina. Se disminuiría así drásticamente el riesgo de complicaciones y de hipoglucemia. Éste último aspecto es relevante, pues se ha comprobado que ciertas personas con diabetes pierden los síntomas indicadores de hipoglucemia y en consecuencia no pueden detectarla (Dexter et al., 2007). Finalmente, un método no invasivo permitiría un control continuo de la respuesta glicémica a distintos tipos de alimentos, ayudando a optimizar la dieta y los hábitos alimenticios.

1.2 Espectroscopia Raman

Existen diversas formas de interacción entre la luz y la materia. Algunas interacciones relevantes son: absorción, el fenómeno de fluorescencia, la dispersión Rayleigh y la dispersión Raman. El fenómeno de absorción es el utilizado por la espectroscopía por absorción y ocurre cuando la energía de la radiación incidente coincide con la diferencia de energía entre dos estados vibracionales de la molécula. En este caso el fotón es absorbido y la molécula es promovida a un estado vibracional de mayor energía. La pérdida de energía de la luz mientras atraviesa la muestra es entonces detectada.

El fenómeno de fluorescencia ocurre cuando una molécula pasa del estado electrónico base a uno de los estados vibracionales de un estado electrónico excitado.

Colisiones con otras moléculas producen que la molécula excitada pierda energía vibracional hasta que alcanza el nivel vibracional más bajo del estado electrónico excitado. La molécula cae entonces a uno de los estados vibracionales del estado electrónico base emitiendo un fotón de menor energía en el proceso. El proceso se aprecia en la figura 1.1.

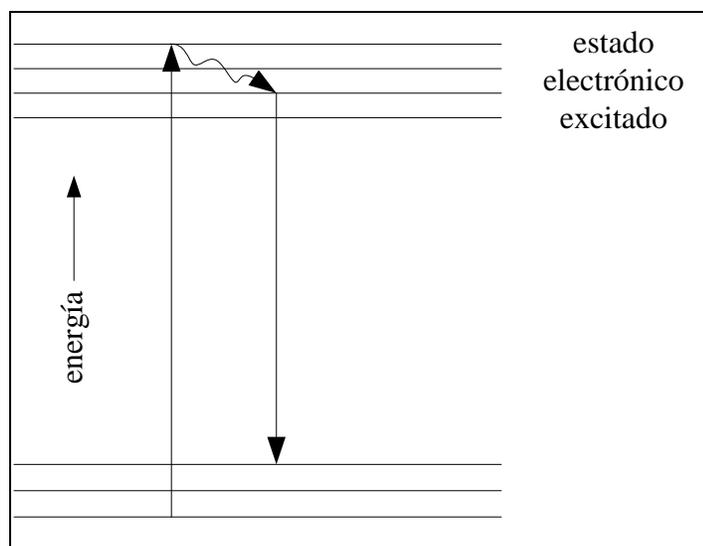


Figura 1.1: Niveles de energía asociados con el fenómeno de fluorescencia.

El fenómeno de fluorescencia es mucho más intenso que la dispersión Raman y por lo tanto debe ser evitado. Para ello, se utilizan láseres de mayor longitud de onda pues dado que sus fotones tienen menos energía, es menos probable excitar estados electrónicos en las moléculas de la muestra.

La dispersión, por otro lado, es un proceso físico en el que la luz es forzada a desviarse de su trayectoria en línea recta. Este proceso sucede cuando la luz interactúa con la molécula y distorsiona (polariza) la nube de electrones que rodea al núcleo para formar un llamado “estado virtual”. Este estado no es estable y el fotón es rápidamente re-irradiado. Si sólo una distorsión de la nube de electrones está involucrada en el proceso de dispersión, los fotones serán dispersados prácticamente con la misma

frecuencia, debido a que los electrones son comparativamente livianos. Éste es el proceso dominante y se llama dispersión Rayleigh y su eficiencia aumenta con la cuarta potencia de la frecuencia de la luz incidente. Esta es la razón del color del cielo ya que la luz azul es dispersada por la atmósfera de manera más eficiente que la luz roja. Sin embargo, si se induce movimiento del núcleo durante el proceso de dispersión, energía será transferida desde el fotón incidente a la molécula o desde la molécula al fotón dispersado. Este proceso es llamado dispersión Raman y es un proceso débil que ocurre en sólo uno de los $10^6 - 10^8$ fotones dispersados.

La figura 1.2 muestra los niveles de energía involucrados en la dispersión Raman y dispersión Rayleigh. La dispersión Raman puede ser del tipo Stokes o anti-Stokes. El fotón es dispersado con una energía igual a la del fotón incidente menos la diferencia de energía entre los estados final e inicial de la molécula. Si el fotón es absorbido produciendo que la molécula que se encontraba en su estado vibracional base al inicio del proceso termine en un estado vibracional de mayor energía, la dispersión es Stokes. En este caso, el fotón es re-irradiado lógicamente con una menor energía. Si por el contrario, la molécula se encuentra en un estado vibracional de mayor energía al comienzo del proceso y termina en el estado vibracional base, el fotón es dispersado con una mayor energía con respecto a la del incidente. Este proceso es llamado anti-Stokes. A temperatura ambiente la mayoría de las moléculas se encuentran en el estado vibracional base y, por tanto, la dispersión Stokes es mucho más intensa que la anti-Stokes.

Si se hace incidir luz monocromática proveniente de un láser sobre un compuesto, la luz dispersada de manera Stokes que se recibirá tendrá una frecuencia equivalente a $h\nu_0 - h\nu_1$ donde ν_0 es la frecuencia de la luz incidente y $h\nu_1$ es la energía del primer estado vibracional de la molécula en observación. Debido a que la diferencia de energía entre estados vibracionales es una característica particular de cada molécula, las frecuencias recibidas dependerán de la molécula en observación. Esto hace posible utilizar la dispersión Raman para identificar compuestos. Además, mientras mayor sea la concentración de una molécula dentro de la muestra, mayor será el número de fotones

dispersados a la frecuencia correspondiente a dicha molécula y, por tanto, la dispersión Raman puede ser usada también para cuantificar concentraciones.

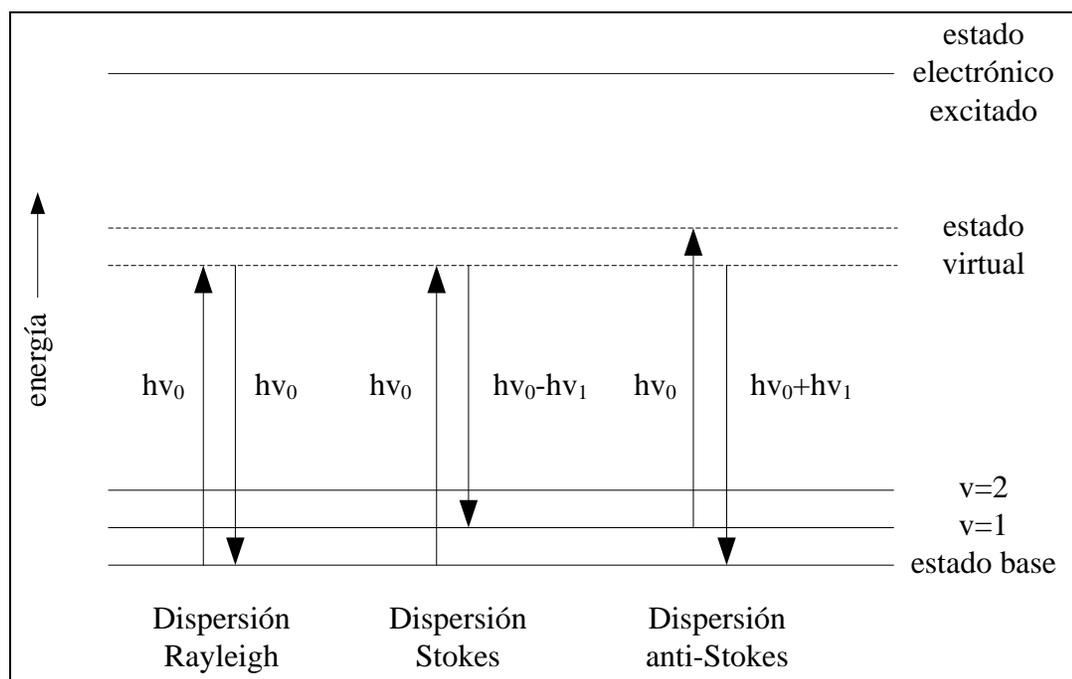


Figura 1.2: Diferentes posibilidades de dispersión. ν_0 indica la frecuencia de la luz incidente. $h\nu_1$ es la diferencia de energía entre el estado base y el primer estado vibracional.

1.2.1 Espectrómetro Raman

Un esquema con los componentes más importantes de un espectrómetro Raman se observa en la figura 1.3. El espectrómetro funciona de la siguiente manera. Primero, la luz monocromática proveniente del láser incide sobre la muestra. Luego, la luz dispersada se hace pasar por un filtro que rechaza la luz a la frecuencia del láser. La luz que logra pasar este filtro es mayormente resultado de dispersión Raman y se hace incidir sobre una grilla de difracción que separa espacialmente las componentes de frecuencia de la luz que finalmente impactan un detector CCD con el cual se obtiene el espectro. Un ejemplo de un espectro Raman se observa en la figura 1.4. El eje vertical corresponde a la intensidad Raman y el eje horizontal corrimiento Raman. El

corrimiento Raman es la diferencia de frecuencia entre la luz incidente proveniente del láser y la luz recibida y generalmente se expresa como la diferencia de número de onda (ω) cm^{-1} .

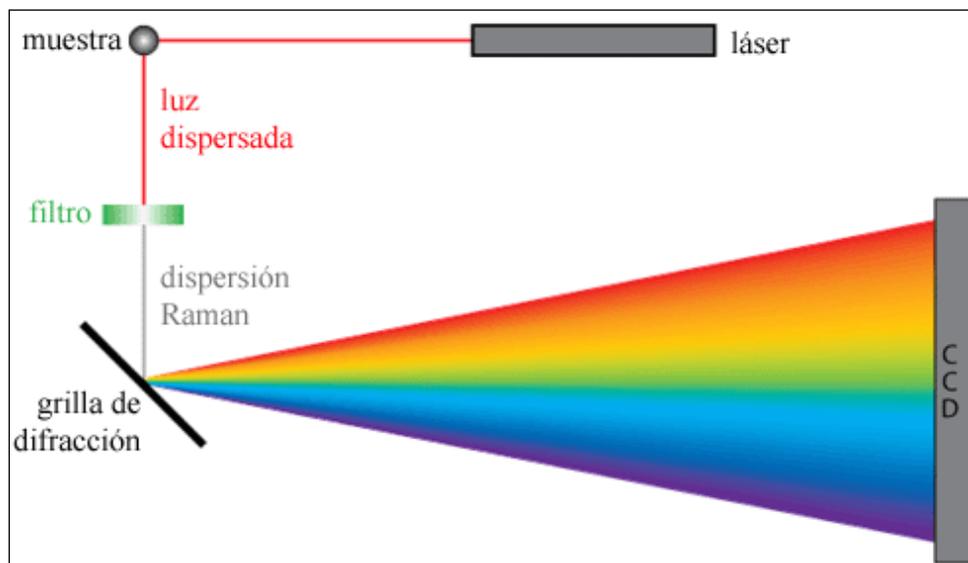


Figura 1.3: Esquema simplificado de un espectrómetro Raman dispersivo.

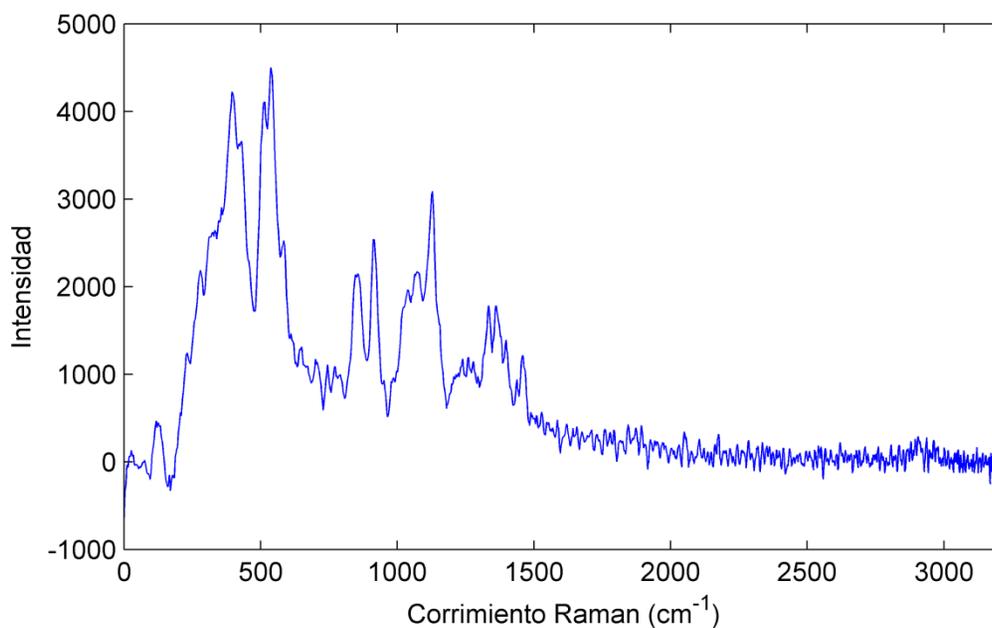


Figura 1.4: Espectro Raman de glucosa.

La relación entre el número de onda, la frecuencia y la longitud de onda de la luz viene dada por la ecuación:

$$\omega = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda} \quad (1.1)$$

Por lo tanto, la ecuación que relaciona el corrimiento Raman en número de onda con el corrimiento Raman en longitud de onda es:

$$\Delta(cm^{-1}) = \frac{1}{\lambda_{l\acute{a}ser}} - \frac{1}{\lambda_{Raman}} \quad (1.2)$$

1.2.2 Ventajas y desventajas de la Espectroscopia Raman

Dentro de las ventajas de la espectroscopía Raman se cuentan:

- Poca o nula preparación de la muestra.
- Posibilidad de medición no invasiva.
- Posibilidad de muestreo de soluciones acuosas y a través de contenedores de vidrio y plástico.
- Muestreo remoto a través de sondas de fibra óptica.
- Bandas Raman angostas y bien definidas.

Las bandas Raman al ser angostas y bien definidas, proveen información espectral más detallada que las bandas que se observan en la espectroscopia por absorción NIR que son más anchas y fruto de sobretonos. Esto es particularmente importante para sistemas biológicos complejos como la sangre (Hanlon et al., 2000).

Dentro de las desventajas más importantes de la espectroscopía Raman se cuentan la debilidad del fenómeno Raman y la fluorescencia. El problema de la debilidad de la señal se puede solucionar mejorando la capacidad de captación de luz, reduciendo las fuentes de ruido del espectrómetro y aumentando la intensidad del láser. En el caso del uso de espectroscopía Raman de manera no invasiva e *in vivo*, la intensidad del láser se encuentra limitada debido al posible daño de los tejidos. El Instituto Nacional Americano de Estándares (ANSI) establece que para una excitación a 830 nm por más de 10 segundos el nivel de irradianza recomendado para “comodidad” debe ser inferior a 0.36 W/cm^2 lo cual es bastante bajo. Sin embargo, Oh (Oh, 2004) usó un láser de 830 nm con una intensidad de aproximadamente 200 W/cm^2 por hasta 600 segundos sobre muestras de aorta. Cuando la histología de la muestra fue examinada no se encontró daño térmico. En la publicación de Motz (Motz, 2003) se resumen resultados de varios estudios *in vivo* sobre distintos órganos tales como el cervix, paladar de ratón, arterias de oveja, piel y retina con intensidades de hasta 20000 W/cm^2 en los cuales no se reportaron consecuencias adversas.

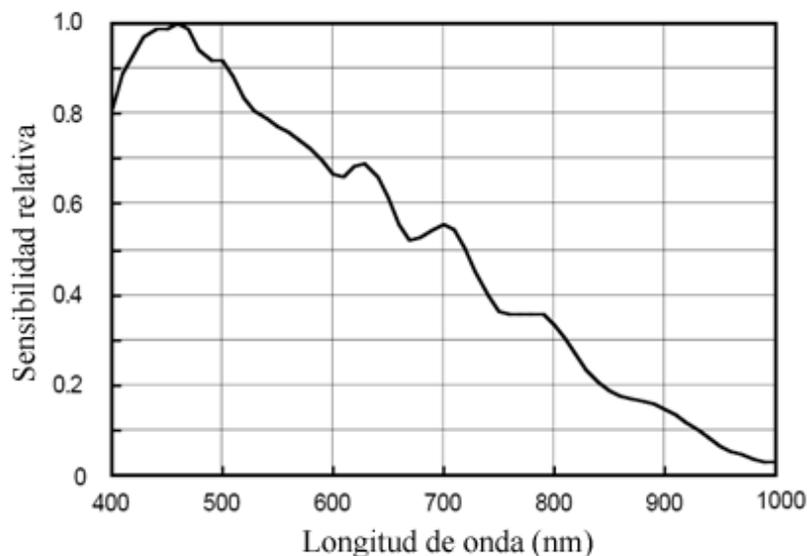


Figura 1.5: Sensibilidad espectral del detector CCD Sony ILX511 a una temperatura ambiente de 25°C . Este detector es usado por varios espectrómetros en la actualidad.

El problema de la fluorescencia, por otro lado, se puede disminuir usando longitudes de onda de excitación más largas. Sin embargo, debido a que el fenómeno Raman depende de la cuarta potencia de la frecuencia de la luz incidente, a medida que la longitud de onda de la excitación se incrementa, si bien la fluorescencia disminuye, también lo hace la intensidad Raman. Además, la eficiencia de los detectores CCD disminuye a niveles muy bajos al pasar más allá del infrarrojo cercano, como se puede observar en la figura 1.5.

Es por esto, que se ha establecido que para aplicaciones como la sangre, donde la fluorescencia es intensa, las longitudes de onda de excitación que representan el mejor compromiso entre estos factores se sitúan entre los 785 nm y 830 nm.

Además, en esta región la luz del láser puede penetrar de manera más profunda en los tejidos debido a la menor absorción tal como se observa en la figura 1.6.

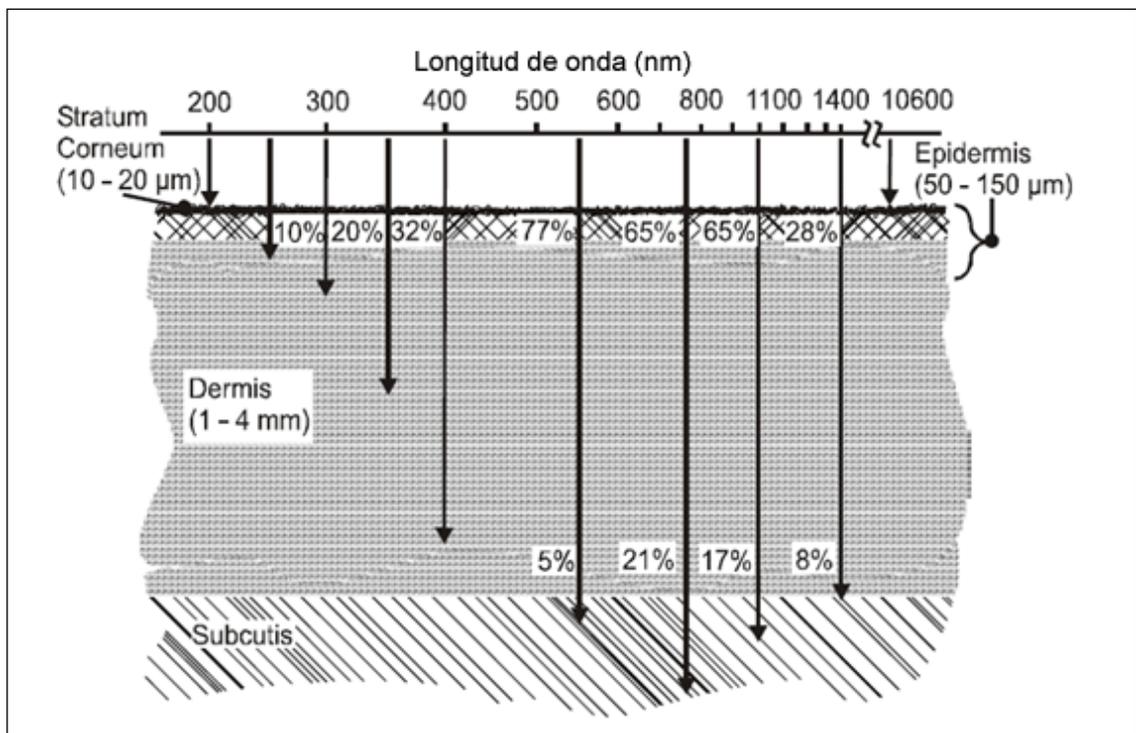


Figura 1.6: Sección cruzada de la piel humana. Los porcentajes indican las fracciones de radiación absorbida. Figura tomada de (Henderson & Schulmeister, 2004).

1.3 Investigaciones previas

Debido a la gran cantidad de beneficios que significaría contar con un método no invasivo para determinar la glicemia, se han propuesto varias técnicas que se procederá a revisar a continuación de manera general. Ninguno de los métodos propuestos ha alcanzado la precisión necesaria para reemplazar al método de pinchar el dedo (Ferrante do Amaral & Wolf, 2008). Se invita al lector a revisar las referencias entregadas sobre cada técnica para obtener más detalles.

1.3.1 Métodos mínimamente invasivos

Dentro de los métodos mínimamente invasivos, la iontoforesis inversa merece especial atención debido a que es la técnica utilizada por el GlucoWatch uno de los pocos dispositivos que estuvo disponible comercialmente y el único aprobado por la FDA (*Food and Drugs Administration of the United States*), si bien sólo como método auxiliar, no reemplazando al medidor de glicemia tradicional. Es un dispositivo tipo reloj de pulsera desarrollado por Cygnus Inc., Redwood, California. La iontoforesis inversa consiste en un proceso en el cual una débil corriente eléctrica es utilizada para transportar moléculas a través de la piel. El GlucoWatch utiliza esta técnica para transportar moléculas de glucosa presentes en el líquido intersticial hacia un material reactivo desechable donde ocurre una reacción similar a la de los medidores de glicemia tradicionales. Debido al lento tránsito de las moléculas a través de la piel y al retraso existente entre los niveles de glucosa en el líquido intersticial y en la sangre, el dispositivo entrega mediciones con alrededor de 15-20 minutos de retraso con respecto al método tradicional (Kulcu, Tamada, Reach, Potts, & Lesho, 2003). Funciona automáticamente, entregando resultados cada 10 minutos en la última versión, el GlucoWatch G2 Biographer, pudiendo configurarse alarmas de niveles bajos y altos de glucosa y de cambios rápidos en los niveles de glucosa. Además indica la tendencia del nivel de glucosa, es decir, si está aumentando o disminuyendo. Para utilizarlo se debe esperar 2-3 horas a que se equilibre y luego calibrarlo con un medidor de glicemia

tradicional. El material reactivo dura 13 horas después de las cuales se debe reemplazar, esperar el equilibrio y calibrar nuevamente. Además del retraso de las mediciones, la necesidad de calibración pinchándose el dedo diariamente y el tiempo de equilibrio, el dispositivo tiene otras desventajas como la irritación de la piel (Chase et al., 2005) y la incapacidad de realizar una medición cuando existe sudoración o una gran variación de temperatura (Pitzer et al., 2001). Un estudio comprobó que las personas no usaban el dispositivo con la frecuencia necesaria para producir un beneficio significativo y se sentían insatisfechas con el producto debido mayormente al problema de irritación de la piel (Chase et al., 2005). Debido a todas estas desventajas la compañía ya no fabrica el dispositivo y, por tanto, ya no se encuentra disponible en el mercado. Sin embargo, el número de papers acerca del dispositivo es bastante larga. En (Tura, Maran, & Pacini, 2007) se puede encontrar una recopilación de estudios y resultados.

1.3.2 Métodos no invasivos

Dentro de las tecnologías investigadas para el monitoreo no invasivo de los niveles de glucosa se encuentran: espectroscopia de absorción del infrarrojo cercano (NIR) y medio (Mid-IR), FTIR, tomografía de coherencia óptica (OCT), reflectancia localizada modulada por temperatura, espectroscopia Raman, polarimetría, espectroscopia fotoacústica, tecnología basada en la fluorescencia, espectroscopia de emisión térmica, espectroscopia ocular, espectroscopia de bioimpedancia, electromagnetismo y conformación del calor metabólico. La descripción, las ventajas y limitaciones de estas técnicas se pueden encontrar en (Poddar, Andrews, Shukla, & Sen, 2008), (Tura et al., 2007) y en (Ferrante do Amaral & Wolf, 2008). A pesar del gran esfuerzo de la comunidad científica, todavía no se encuentra disponible un dispositivo que tenga la precisión y robustez necesaria como para salir al mercado. Reiteramos que hasta la fecha, el único dispositivo que cuenta con la aprobación de la FDA es el GlucoWatch y debido a las dificultades mencionadas en la sección anterior ya no se

encuentra disponible. Una solución no invasiva para la medición de la glucosa está por tanto pendiente.

Gran cantidad de estudios se han realizado intentando utilizar espectroscopia Raman para medir los niveles de glucosa de manera no invasiva (Berger, Itzkan, & Feld, 1997; Berger, Koo, Itzkan, Horowitz, & Feld, 1999; Chaiken et al., 2001; Chaiken, Piacente, Ellis, Voss, & Eslick, 2006; Enejder et al., 2005; Kanger, de Mul, & Otto, 1999; Lambert, Morookian, Sirk, & Borchert, 2002; Malchoff, Shoukri, Landau, & Buchert, 2002; Ren & Arnold, 2007; Vilaboy, Greene, Ergin, Thomas, & Tchouassi, 2003). En (Enejder et al., 2005) un equipo de investigadores reporta los resultados de un experimento realizado utilizando espectroscopia Raman para medir los niveles de glucosa de manera no invasiva. Iluminando el antebrazo, ellos lograron un error absoluto medio (MAE) para cada persona de $7.8\% \pm 1.8\%$ con un R^2 de 0.83 ± 0.10 . Para lograr dichos resultados, utilizaron un espectrómetro de laboratorio especialmente diseñado para la aplicación. Cabe destacar que el error entregado fue calculado usando validación cruzada, el estudio estuvo compuesto sólo por 17 pacientes y las mediciones fueron realizadas todas en un mismo día. Por tanto, los resultados obtenidos no explican el comportamiento del sistema en el largo plazo.

Cuando se obtiene un espectro Raman iluminando ya sea, un dedo de la mano, el antebrazo u otros lugares, éste contiene interferencias o ruido provenientes del instrumento y de la muestra. Por ejemplo, las señales provenientes de todos los compuestos distintos de la glucosa que se encuentran en la muestra constituyen interferencias. Es por esto que algunos grupos han propuesto algunas técnicas de modulación que permiten rechazar las interferencias para mejorar la razón señal a ruido de la señal de interés.

En (Chaiken, Piacente, Ellis, Voss, & Eslick, 2006), un grupo propone la utilización de un tipo de modulación que ellos llaman *tissue modulation* o modulación del tejido. El método básicamente consiste primero en obtener una serie de espectros Raman de la punta del dedo mientras el paciente presiona su dedo contra una placa

metálica y luego obtener otra serie de espectros pero esta vez sin ejercer presión sobre el dedo. Este grupo sostiene que cuando se presiona el dedo contra la placa, la sangre es expulsada del lugar y por tanto el espectro obtenido es considerado prácticamente carente de sangre mientras que el espectro obtenido en la etapa no presionada está compuesto por sangre y otros tejidos. Finalmente, al restar los espectros correspondientes a la etapa presionada de los de la etapa no presionada el grupo sostiene que se obtiene un espectro que corresponde predominantemente al de la sangre. En un experimento (Chaiken et al., 2005), se obtuvieron 18 mediciones utilizando esta técnica emparejadas con mediciones obtenidas con el método de pinchar el dedo. De esta manera se realizó la calibración de un modelo que luego fue aplicado a 7 muestras obtenidas del mismo sujeto y 24 muestras obtenidas de 24 personas diferentes en un período de 14 semanas. Después de rechazar 11 muestras que fueron consideradas *outliers*, ellos obtuvieron un coeficiente de correlación R^2 de 0.8 y una desviación estándar de 22 mg/100 ml. Esta técnica es susceptible a grandes niveles de error humano debido a que distintas personas pueden ejercer distintos niveles de presión conducentes a distintos niveles de modulación. Además, debido a las distintas características de los dedos de distintos individuos, para obtener el mismo nivel de modulación es posible que se requieran distintos niveles de presión. Si bien el método logra rechazar las señales provenientes de los tejidos estáticos, de posibles suciedades y del instrumento, no es claro que el espectro obtenido sea sólo el de la sangre, como los autores de la publicación sostienen, debido a que el líquido intersticial también es un fluido móvil y, por lo tanto, es probable que el espectro obtenido con éste método provenga también de éste fluido. Esto como veremos a continuación puede constituir un problema.

El 60% del peso del cuerpo humano es líquido. Un 40% del peso total es líquido intracelular y un 20% es líquido extracelular. Dentro de los líquidos extracelulares, un 4.3% del peso total del cuerpo humano es plasma y un 15.7% es líquido intersticial (Guyton & Hall, 1997). No todos estos fluidos tienen la misma concentración de glucosa. El líquido intracelular tiene una concentración de aproximadamente un 10% de la del líquido extracelular (Guyton & Hall, 1997). La tabla

1.1, tomada de (Koo, 2001), resume las concentraciones de glucosa y las fracciones de volumen ocupado por los distintos fluidos.

Tabla 1.1: Concentraciones de glucosa y volúmenes de los fluidos en la matriz tejidos-fluidos. Tabla tomada de (Koo, 2001).

	volumen (%)	concentración de glucosa típica (mg/100 ml)	cantidad de glucosa típica por cada 100 ml de matriz (mg)
Fluido intracelular	37%	9	3,33
Fluido intersticial	16%	73,8	11,808
Plasma	6%	90	5,4
Componente no-líquida	41%	0	0
Matriz tejidos-fluidos	100%	20,538	20,538

La mayoría de los métodos no invasivos obtienen sus mediciones de concentración de glucosa del líquido intersticial y no del plasma. Por ejemplo, algunos métodos mínimamente invasivos, como la mencionada iontoforesis inversa, obtienen directamente una muestra de líquido intersticial y luego calculan la concentración de glucosa en él. Los métodos no invasivos en general, incluidos los métodos ópticos como la espectroscopia Raman, al muestrear un volumen de tejido reciben señales desde todos los fluidos que contienen glucosa, y por tanto, la concentración que observa el método es la de la matriz de fluidos y tejidos, y no sólo la de la sangre. Además debido a que la mayor cantidad de glucosa en el volumen muestreado se encuentra en el líquido intersticial (ver tabla 1.1), es lógico que la concentración calculada se asemeje más a la de dicho fluido que a la del plasma. Esto sumado a que, actualmente, la medicina usa la concentración de glucosa en la sangre para controlar a los diabéticos y que los métodos no invasivos son calibrados con este mismo parámetro, hace que sea necesario saber cuál es la relación entre las concentraciones de glucosa en la sangre y en el líquido intersticial.

Varios estudios se han enfocado en analizar la relación entre la concentración de glucosa en la sangre y en el líquido intersticial. Los resultados han sido

variados, probablemente debido a los distintos métodos y sensores usados para medir la concentración en el líquido intersticial. Un artículo reciente (Cengiz & Tamborlane, 2009) hace una revisión de las diferencias entre los niveles de glucosa en ambos fluidos y explica los desafíos que se deben enfrentar para medir la concentración en el líquido intersticial de manera precisa. De cualquier manera, un retardo en la concentración de glucosa en el líquido intersticial con respecto a la concentración en el plasma ha sido observado por muchos (Boyne, Silver, Kaplan, & Saudek, 2003; Kulcu et al., 2003; P. J. Stout et al., 2001; P. Stout, Racchini, Hilgers, & Noujaim, 2006), con estimaciones que van desde 0 hasta 45 min. Stout, por ejemplo, reporta un atraso promedio de alrededor de 25 min (P. J. Stout et al., 2001). Otro estudio observó una diferencia promedio de 38.3 min con una desviación estándar de 11.5 min lo que ocasionó un porcentaje promedio de error absoluto de un 22.2% entre ambas concentraciones (P. Stout et al., 2006). En la misma publicación, se observan diferencias de hasta 150 mg/100 ml entre la concentración en el plasma y en el líquido intersticial debido al retraso.

Un factor que afecta fuertemente el desempeño de las calibraciones de los modelos desarrollados para predecir los niveles de glucosa es la precisión de las mediciones de referencia. Actualmente, las mediciones de referencia son obtenidas con medidores de glicemia tradicionales que calculan la concentración de glucosa en la sangre mientras que la mayoría de los métodos no invasivos obtienen la concentración de glucosa en la matriz tejidos-fluidos que es fuertemente influenciada por el líquido intersticial. Debido al retraso existente entre la concentración de glucosa en la sangre y en el líquido intersticial, el calibrar los modelos usando la concentración de glucosa en la sangre puede introducir errores.

Por otro lado, si el objetivo es controlar los niveles de glucosa en la sangre, utilizar mediciones basadas en la concentración en el líquido intersticial podría no ser adecuado debido al retraso existente entre ambas mediciones. Además, si se desea crear un sistema de control en lazo cerrado que incluya una bomba de insulina, de la teoría de control automático es sabido que retrasos en la medición pueden llevar a la inestabilidad del sistema. En (Sorensen, Colton, Hillman, & Soeldner, 1982) se simula el control de

glucosa en la sangre a través de un sistema de lazo cerrado, y se muestra que a medida que el retraso varía de 1.5 a 30 minutos existe un progresivo empeoramiento en la regulación de la glucosa, una exacerbación de la hiperinsulinemia y un aumento en el requerimiento de insulina. Un retraso mayor a 10 minutos puede resultar en un tan mal control de los niveles de glucosa en la sangre durante cambios dinámicos que no puede ser recomendado (Roe & Smoller, 1998).

En (Yamakoshi & Yamakoshi, 2006), diseñaron una técnica de modulación que ellos llaman *Pulsatile Glucometry*, o Glucometría Pulsátil, que permitiría obtener un espectro prácticamente de sólo la sangre, solucionando el problema asociado con el líquido intersticial y rechazando además interferencias provenientes de otros tejidos como los huesos, músculos, fluidos corporales, transpiración, etc. Ésta consiste en adquirir espectros de transmitancia en el infrarrojo cercano de manera rápida, 100 espectros por segundo. De esta manera ellos son capaces de distinguir las pulsaciones cardíacas y en base a esto calculan la intensidad pico-pico de las pulsaciones para cada longitud de onda. Así, ellos logran obtener el espectro de la componente pulsátil de la punta del dedo, es decir, la sangre, rechazando todas las interferencias estáticas como huesos, piel y otros tejidos. Usando una prueba de tolerancia a la glucosa sobre 27 voluntarios, 603 muestras, emparejadas con sus respectivas mediciones de referencia, fueron obtenidas. Los espectros fueron obtenidos usando un espectrómetro de laboratorio de alta velocidad. Se calibró un modelo utilizando 2/3 del total de las muestras el cual se aplicó al resto de los datos para verificar su precisión. De esta manera, obtuvieron un error de alrededor de 22 mg/100 ml comparado con la referencia de concentración de glucosa en la sangre. En (Chen et al., 2008), otro equipo utiliza básicamente el mismo sistema, pero con distinto software. Ellos sostienen que su versión del software utiliza el pulso completo, no sólo su intensidad pico-pico como la investigación anterior, aprovechando mucho mejor la información disponible y, por tanto, haciendo posible una mayor precisión. Se obtuvieron 179 pares de datos de 18 sujetos. 63 muestras fueron rechazadas y con los 113 puntos restantes se obtuvo un error absoluto medio de 28 mg/100 ml y un coeficiente de correlación R^2 de 0.81. Cabe

destacar, que en este estudio, 15 de los 18 sujetos eran diabéticos a diferencia de los 27 voluntarios utilizados en el estudio previo los cuales eran todos sanos. Este dato es relevante porque los problemas de microcirculación provocados por la diabetes pueden afectar directamente esta técnica.

En suma, todavía no existe un método no invasivo que tenga la precisión necesaria para reemplazar al inconveniente método de pinchar el dedo. En el caso de la espectroscopia Raman, la mayoría de las investigaciones usa además espectrómetros de laboratorio que tienen un tamaño y complejidad que resultan inadecuados para un uso doméstico.

1.4 Objetivos de la tesis

El principal objetivo de esta tesis es evaluar la factibilidad de medir la concentración de glucosa en distintas soluciones de manera no invasiva usando un espectrómetro Raman portátil y una nueva técnica de procesamiento de datos con miras a su posible aplicación a pacientes diabéticos.

Los objetivos específicos son:

1. Obtener el espectro Raman de la glucosa.
2. Analizar el comportamiento de la razón señal a ruido mientras se varía la concentración, el tiempo de integración y el número de espectros promediados.
3. Desarrollar e implementar un método de procesamiento de los datos que aproveche la modulación existente en el fluido a medir, rechazando las señales provenientes de otras fuentes de interferencia.
4. Simular la modulación causada por los latidos cardíacos para evaluar el nuevo método de procesamiento de datos.
5. Evaluar la precisión de las mediciones de concentración de glucosa obtenidas.
6. Evaluar el uso de un equipo Raman portátil para los niveles de glucosa existentes en la sangre humana.

2. EQUIPAMIENTO

2.1 Definiciones

Antes de listar las características del espectrómetro utilizado se explicaran algunos términos que permitirán una mejor comprensión de las especificaciones.

2.1.1 f/#

Es la razón entre la distancia focal y el diámetro de apertura. Un f/# bajo provee un ángulo de recolección de luz mayor y por tanto una recolección de dispersión Raman más eficiente. Si todos los demás parámetros del espectrómetro se mantienen constantes la intensidad de la señal Raman aumenta con $(f/\#)^{-2}$ (McCreery, 2000).

2.1.2 *Stray light* o luz parásita

Si bien la grilla de difracción separa la luz en sus distintas longitudes de onda de manera que en un determinado lugar del detector sólo debiera llegar la longitud de onda correspondiente, una pequeña cantidad de luz con otras longitudes de onda llegará también al mismo lugar, esta es la luz parásita.

2.1.3 Configuraciones ópticas

Existen varias configuraciones ópticas. Sin embargo, entre las más utilizadas se encuentran:

- Czerny-Turner (CZ): Esta configuración es compacta, pero tiene una gran aberración de la imagen, lo que disminuye la resolución del espectrómetro. Además,

para mantener esta aberración en niveles manejables se usan $f/\#$ mayores a 3, lo que limita la capacidad de recolección de luz del espectrómetro. Un esquema de la configuración se aprecia en la figura 2.1.

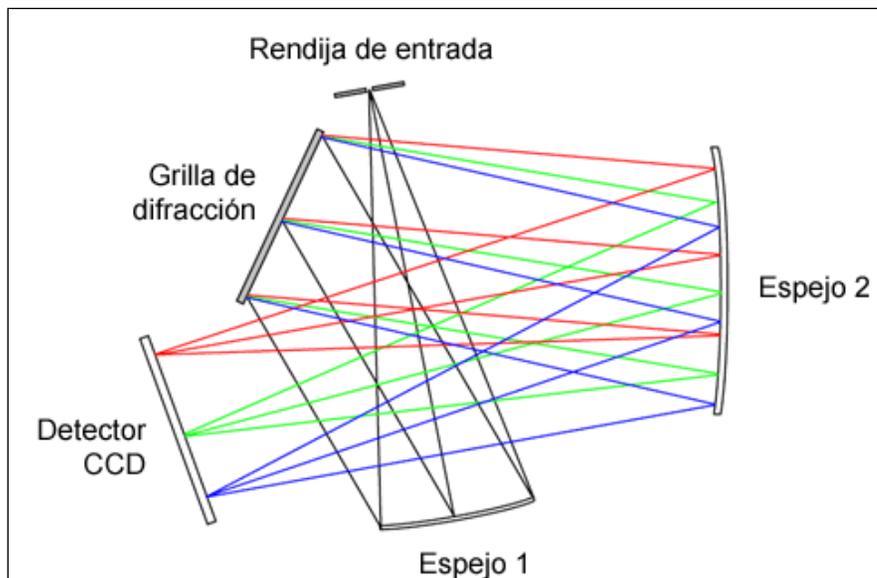


Figura 2.1: Espectrógrafo Czerny-Turner cruzado.

- Grilla holográfica cóncava (CHG): Al usar menos elementos, el rendimiento aumenta, manteniendo un tamaño compacto y con menos aberraciones de la imagen que la configuración CZ. Por otro lado, la grilla holográfica cóncava presenta una reducción de 10 veces en luz parásita, lo que ayuda a mejorar la razón señal a ruido del sistema. Un esquema se observa en la figura 2.2.
- Holográfico axial transmisivo: Presenta una alta calidad de imagen, bajas aberraciones y alta resolución. El diseño permite la utilización de $f/\#$ más bajos llevando a espectrómetros que detectan una mayor cantidad de dispersión Raman. Además, la grilla holográfica transmisiva tiene una mejor eficiencia que las reflectivas, permitiendo una alta transmisión en el espectrógrafo (es decir, una mayor porción de la luz que entra al espectrógrafo logra llegar al detector CCD). La configuración se aprecia en la figura 2.3.

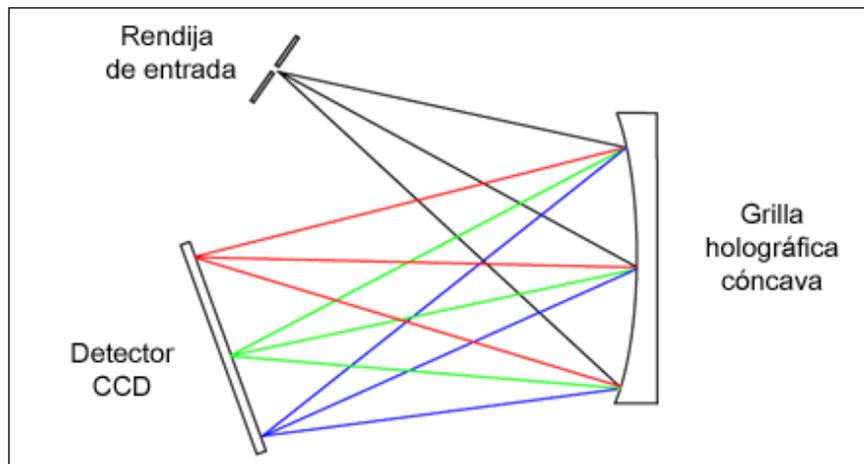


Figura 2.2: Espectrógrafo de grilla holográfica cóncava.

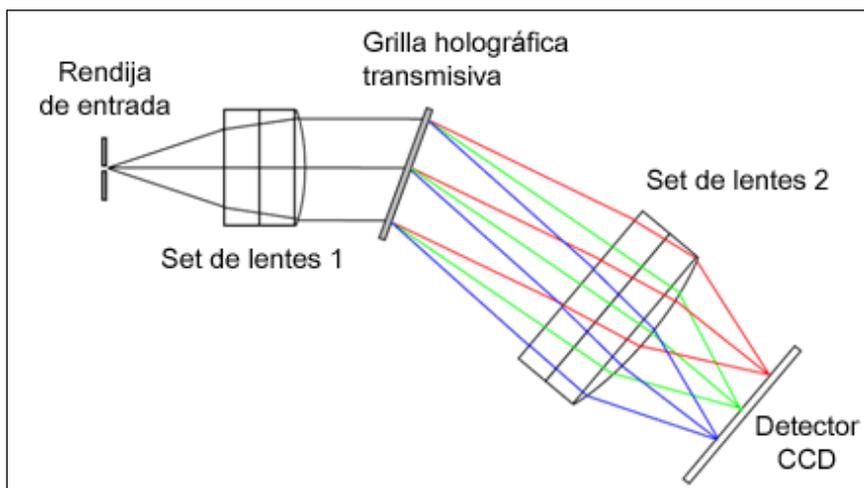


Figura 2.3: Espectrógrafo Holográfico axial transmisivo.

2.1.4 Filtros de rechazo del láser

Los espectrómetros dependen de un filtro que rechaza la luz recibida a la misma frecuencia que la del láser, la cual es muy intensa, para disminuirla. Debido a que la intensidad de la luz recibida a la misma frecuencia que la del láser es muy grande, ésta puede producir tanta luz parásita que puede llegar a enmascarar por completo la dispersión Raman como se observa en el ejemplo de la figura 2.4. Para evitar esto se usa un filtro que rechaza la luz a la longitud de onda del láser. Las características más

importantes de estos filtros son: densidad óptica (OD) que es el negativo del logaritmo del porcentaje de transmisión de la luz del láser; el porcentaje de transmisión a frecuencias distintas que la del láser y, finalmente, el ancho de banda de corte que determinará el mínimo corrimiento Raman que se podrá detectar. Los tipos de filtros más utilizados son dieléctricos y holográficos. Los filtros holográficos generalmente tienen una mayor densidad óptica, una mayor transmisión de luz a frecuencias distintas a la del láser y un mejor rendimiento para detectar corrimientos Raman pequeños que los filtros dieléctricos (McCreery, 2000).

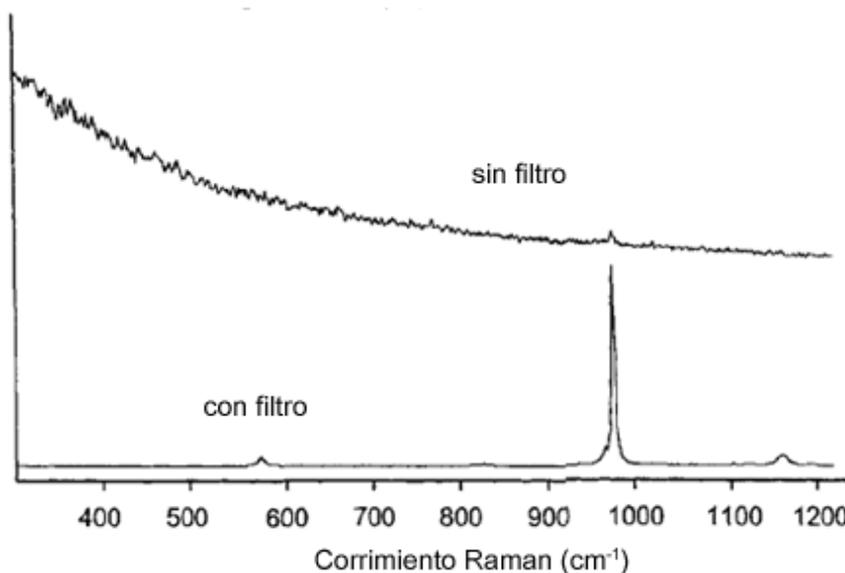


Figura 2.4: Espectro Raman de benceno líquido obtenido con un espectrómetro con y sin filtro holográfico de rechazo de luz del láser entre la muestra y la rendija de entrada. Las escalas de intensidad difieren largamente entre los dos espectros. Figura tomada de (McCreery, 2000).

2.1.5 Especificaciones de los detectores CCD

- Eficiencia cuántica, Q: Probabilidad que un fotón que impacta el detector genere un electrón (o fotoelectrón).

- Señal de oscuridad o corriente de oscuridad: La tasa promedio de generación de electrones cuando el detector no se encuentra expuesto a luz alguna. Se duplica aproximadamente cada 5°C (McCreery, 2000).
- Ruido de oscuridad: Desviación estándar de la señal obtenida con el láser apagado.
- Ruido de lectura: Desviación estándar de mediciones secuenciales de un número constante de electrones.
- Rayos cósmicos: Radiación que tienen suficiente energía como para generar varios electrones en el detector. El resultado son picos de ancho de uno o dos pixeles que aparecen en el espectro. La tasa habitual para dichos eventos es de $1/\text{min}^{-1} \text{cm}^{-2}$.
- CCDs iluminados frontalmente vs. iluminados por detrás: Los CCDs iluminados frontalmente tienen una eficiencia cuántica inferior al 50% debido a que los circuitos tapan aproximadamente la mitad de la superficie de silicio, y los circuitos en sí mismos no son fotoactivos. Los iluminados por detrás, si bien cuestan hasta el doble que los iluminados frontalmente, alcanzan eficiencias cuánticas de hasta un 95%. En la figura 2.5 se puede observar una comparación entre los distintos tipos de CCDs.
- CCDs de agotamiento profundo: El agotamiento profundo se refiere a un tratamiento aplicado al CCD para mejorar la respuesta a longitudes de onda mayores. Su desventaja es que tienen una mayor corriente de oscuridad y, por lo tanto, generalmente deben ser enfriados a temperaturas menores.

2.2 Espectrómetro Raman utilizado

El espectrómetro Raman utilizado fue el MiniRam fabricado por la compañía B&W Tek, el cual se puede apreciar en la figura 2.6 junto con la sonda de fibra óptica utilizada. En la figura 2.7 se puede observar el sostenedor de cubeta usado. La lista de especificaciones más relevantes se observa en la tabla 2.1.

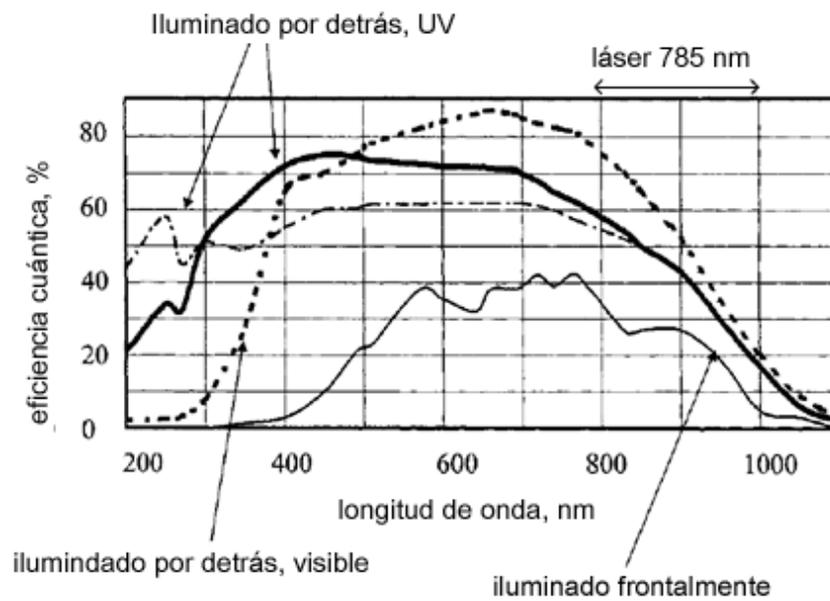


Figura 2.5: Curvas de eficiencia cuántica para distintos tipos de CCD. Figura obtenida de (McCreery, 2000) a la que se le ha agregado el rango de dispersión Raman para un láser de 785 nm.



Figura 2.6: Fotografía del espectrómetro MiniRam de B&W Tek.

Tabla 2.1: Especificaciones del espectrómetro MiniRam de B&W Tek.

Espectrógrafo	
Configuración óptica	Czerny-Turner cruzada
f/# del espectrógrafo	3.3
Rango espectral	175 cm ⁻¹ – 3150 cm ⁻¹
Resolución espectral	10 cm ⁻¹
Detector CCD	Sony ILX511
Tipo	Iluminado frontalmente
Eficiencia cuántica	<40% *
Temperatura de enfriamiento	14°C
Número de pixeles	2048x1
Capacidad del pozo	62500 electrones
Rango dinámico	300:1
Bloqueo del láser	
Densidad óptica	6
Filtro	Dieléctrico
Láser	
Longitud de onda	785 nm
Tamaño del punto luminoso en la muestra	85 μm
Potencia	300 mW
Irradianza en la muestra	1320 W/cm ²
Electrónica del detector	
Convertor A/D	16 bit
Tiempo de integración	9 ms – 65535 ms

*Esta información no estaba disponible, pero un 40% es típico para detectores iluminados frontalmente.



Figura 2.7: Sostenedor de cubeta utilizado

2.3 Diferencias entre un espectrómetro portátil y uno de laboratorio

Para ilustrar las diferencias entre el espectrómetro usado y uno de laboratorio, compararemos el MiniRam con el espectrómetro de laboratorio utilizado por el MIT para sus investigaciones de medición de glucosa en la sangre (Shih, 2007).

Observando la figura 2.8 se aprecia que la luz es guiada hacia la muestra (brazo) sin utilizar fibra óptica. La fibra óptica produce fluorescencia al interactuar con la luz del láser por lo que esta configuración es menos ruidosa que la utilizada por el MiniRam, pero menos versátil. Por otro lado, la intensidad del láser es monitoreada por un fotodiodo con una precisión de aproximadamente 0.1%. El conocer la intensidad exacta del láser es muy importante en medición cuantitativa pues, al aumentar la intensidad, aumenta también la dispersión Raman, pudiendo confundirse con un aumento de concentración.

La luz es recolectada por un espejo parabólico con una apertura numérica de 0.9 (Koo, 2001) captando mucho más luz que la sonda utilizada por el MiniRam. La luz recolectada es filtrada por un filtro holográfico en vez de uno dieléctrico como en el caso del MiniRam bloqueando mejor la luz del láser y transmitiendo más dispersión Raman. Finalmente, la luz es enfocada en un paquete de fibras ópticas que en un extremo se encuentran organizadas de forma concéntrica y en el otro extremo de forma lineal para igualar la forma de la rendija de entrada del espectrógrafo.

Este paquete de fibras es utilizado debido a que la rendija rectangular que tienen los espectrógrafos no es una apertura ideal para transmitir la luz que emerge de un círculo debido a que bloquea gran parte de la luz (hasta un 58% en algunos casos). El MiniRam utiliza sólo una fibra para la recolección de la luz y por ello pierde gran parte de la dispersión Raman captada. En el caso de otros espectrómetros de laboratorio que si usan una sonda de fibra óptica, la mayoría usa una configuración donde varias fibras encargadas de recolectar luz se ubican alrededor de la fibra que dirige la luz de láser hacia la muestra. Al usar esta configuración la intensidad de la señal puede ser aumentada de gran manera. Por ejemplo, la configuración 36 alrededor de 1 produce una

intensidad de señal de hasta 18 veces la captada por una configuración de 1 alrededor de 1.

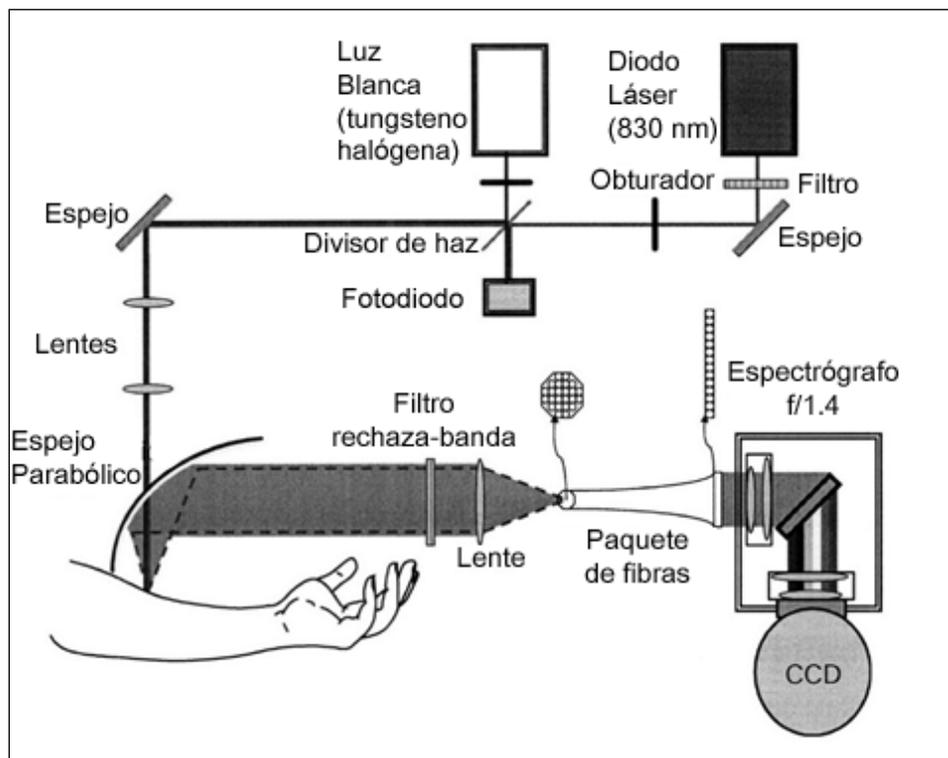


Figura 2.8: Esquema del instrumento utilizado por el MIT. Imagen obtenida desde (Shih, 2007).

El espectrógrafo utilizado por el MIT es un Holospec f/1.8 fabricado por Kaiser Optical Systems, Inc. modificado por el MIT para tener un $f/\#$ de 1.4. Este espectrógrafo tiene la configuración holográfica axial transmisiva ofreciendo todas las ventajas descritas en el capítulo 2.1.3.

El CCD utilizado por el MIT es un VersArray de 1300x1340b fabricado por Princeton Instruments y enfriado con nitrógeno líquido. Gracias a las bajas temperaturas logradas por el enfriamiento por nitrógeno líquido la corriente y ruido de oscuridad son reducidos drásticamente en comparación con el MiniRam. Además al usar un CCD bidimensional el espectrómetro alcanza un mejor rendimiento al utilizar toda la luz

entregada por la rendija vertical del espectrógrafo. La eficiencia cuántica del CCD utilizado por el MIT es de un 60% a 950 nm.

En suma, el rendimiento de un espectrómetro de laboratorio es muy superior a uno portátil. Por ejemplo, si sólo consideramos la diferencia en $f/\#$ (3.3 del MiniRam vs. 1.4 del Holospec), la diferencia en intensidad de señal es de 5.55 veces. La diferencia en SNR si se consideran todos los factores es muy grande, pudiendo llegar fácilmente a valores mayores que $\times 15$ y, por tanto, lo es también la diferencia de precisión que pueden alcanzar las mediciones cuantitativas realizadas por ambos instrumentos. Por otro lado, los espectrómetros portátiles son generalmente más baratos, simples, compactos y sencillos de usar que uno de laboratorio y, por ello, se asimilan mucho más a los equipos que podrían ser utilizados por los diabéticos para medir sus niveles de glucosa en la sangre de manera *in vivo*.

3. ANÁLISIS DE DATOS

3.1 Mínimos cuadrados parciales (PLS)

Cada espectro Raman consiste de miles de variables, cada una indicando la intensidad Raman a un cierto corrimiento en cm^{-1} . El objetivo de estas tesis es usar esas variables (X) como predictoras de la concentración (Y) y para ello es necesario usar un método de regresión multivariable.

El método PLS es un método de regresión multivariable que busca factores, o combinaciones de variables, que capturen la mayor cantidad de variabilidad posible de X y que además se correlacionen con Y. Estos factores se llaman componentes principales o variables latentes. La regresión se hace sobre los componentes principales y no sobre las variables originales.

Si se ocupa un gran número de componentes principales, el modelo generado por PLS logra explicar completamente la variabilidad de X. Sin embargo, el objetivo buscado es seleccionar un número de componentes principales que sólo expliquen la variabilidad en X debida a cambios en la concentración de glucosa y no debido al ruido. De esta manera, se logra que la regresión se base en la información y no en el ruido contenido en X para predecir Y.

El método PLS predice la concentración a través de una combinación lineal ponderada de las intensidades espectrales medidas:

$$Y = X_1b_1 + X_2b_2 + X_3b_3 + \dots + X_kb_k \quad (3.3)$$

El vector b es normalmente llamado vector de regresión. Como es de esperarse los lugares donde el vector b alcanza valores elevados indican sectores del espectro que contienen información acerca de la concentración del analito de interés.

Mayor información sobre el método PLS se puede encontrar en (Geladi & Kowalski, 1986; Haaland & Thomas, 1988).

3.2 Filtrado en frecuencia

3.2.1 Antecedentes generales

El volumen de sangre en una parte del cuerpo determinada varía debido al pulso cardíaco. La fotopletismografía consiste en medir el volumen sanguíneo de manera no invasiva e *in vivo* usando técnicas ópticas que se basan en medir los cambios en la absorción de luz inducidos por los cambios en los volúmenes de sangre. La forma de los pulsos puede ser observada en las siguientes figuras:

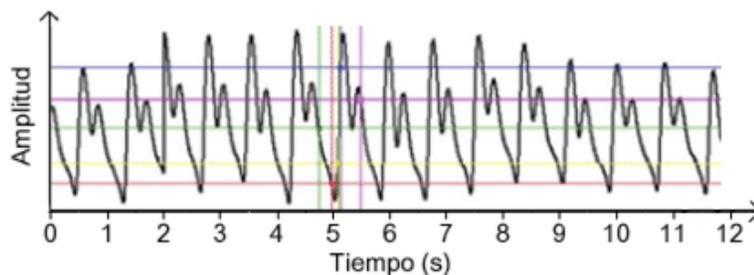


Figura 3.1: Fotopletismograma de una mujer de 22 años. Figura tomada de (Hlimonenko, Meigas, & Vahisalu, 2003).

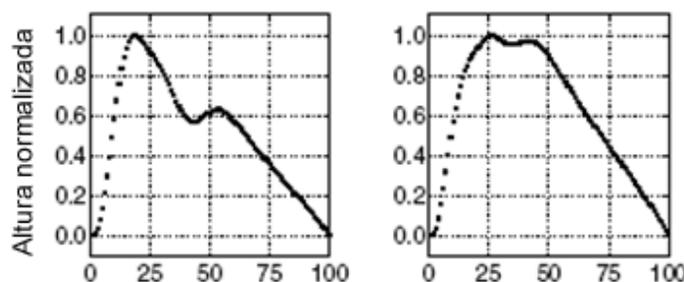


Figura 3.2: Formas del pulso de dos pacientes distintos obtenidas de un dedo de la mano. Figura tomada de (Allen & Murray, 2003).

En las figuras 3.1 y 3.2 sólo se muestra la parte alterna del pletismograma. En el esquema de la figura 3.3 se muestra también la parte continua que es producto de la absorción de luz por la sangre contenida en las venas y por el resto de los tejidos como huesos, piel, etc.

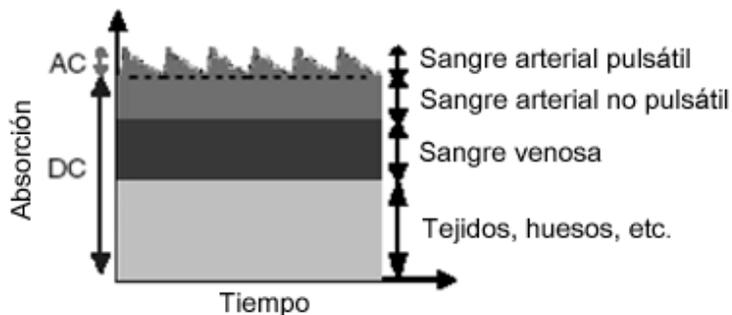


Figura 3.3: Representación de la absorbancia relativa para varias secciones del dedo de la mano. La componente continua es significativamente mayor que la alterna. Figura tomada de (Asada, Shaltis, Reisner, Rhee, & Hutchinson, 2003)

Al obtener series de espectros Raman de manera suficientemente rápida también se puede observar la señal pletismográfica (Chaiken, Piacente, Ellis, Voss, & Eslick, 2006a). Al tomar un espectro Raman de un dedo de la mano, se reciben señales Raman provenientes de fuentes estáticas tales como la piel, huesos, líquido intersticial, etc. y de una fuente pulsatoria, la sangre en las arterias. Por tanto, se tiene una situación similar a la observada en la figura 3.3.

Para lograr visualizar la señal pulsatoria es necesario cumplir con el criterio de Nyquist, es decir, la frecuencia de muestreo debe ser mayor al doble de la frecuencia que se desea detectar. En reposo, un adulto tiene una frecuencia cardíaca de entre 60 – 100 pulsaciones por minuto. En la figura 3.4 se observa que la mayor cantidad de energía de la señal pletismográfica se encuentra en la frecuencia fundamental y en la segunda armónica. Por tanto, si se desean detectar ambas armónicas se debe usar una frecuencia de muestreo de al menos 6.7 Hz, es decir, el tiempo de integración máximo de cada espectro Raman debe ser de 150 ms.

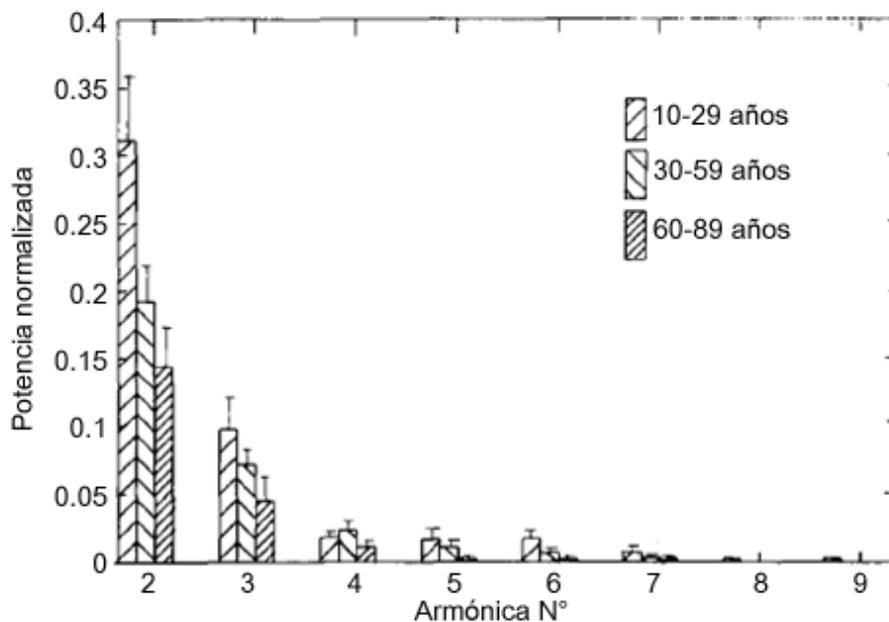


Figura 3.4: Espectro de potencia de la forma de onda normalizado con respecto a la fundamental para tres edades. Figura tomada de (Sherebrin & Sherebrin, 1990).

3.2.2 Explicación del método

El método de filtrado en frecuencia que propone esta tesis consiste en obtener una serie espectros Raman para luego aplicar la transformada de Fourier a cada longitud de onda del espectro y filtrar los datos dejando pasar sólo la información que se encuentra a la frecuencia cardíaca y en su segunda armónica, es decir, la información proveniente mayormente de la sangre. De esta manera, el método permitiría obtener el espectro Raman sólo de la sangre de manera no invasiva, rechazando las señales provenientes de otros tejidos y fluidos como el líquido intersticial. Esto solucionaría todos los problemas asociados con el líquido intersticial descritos en el capítulo 1.3.

Para entender el método con mayor claridad, supongamos que para analizar la concentración de glucosa en la sangre de un individuo, se toman N espectros con tiempo de integración t para lograr un tiempo de integración total Nt . Los espectros obtenidos son almacenados en una matriz X que tiene N filas y m columnas. Cada una de

las columnas de la matriz X corresponde a las distintas longitudes de onda del espectro Raman y, debido a las pulsaciones cardíacas, lucen de manera similar a la figura 3.5. La señal de la figura 3.5 contiene información de la glucosa contenida tanto en el líquido intersticial e intracelular (señal continua) como en la sangre (señal alterna). Si tomamos la transformada de Fourier de cada columna de la matriz X , deberíamos obtener un espectro similar al de la figura 3.6. No se ha incluido ruido en las señales de las figuras 3.5 y 3.6 debido a que no afecta esta explicación y permite al lector observar las señales con mayor claridad.

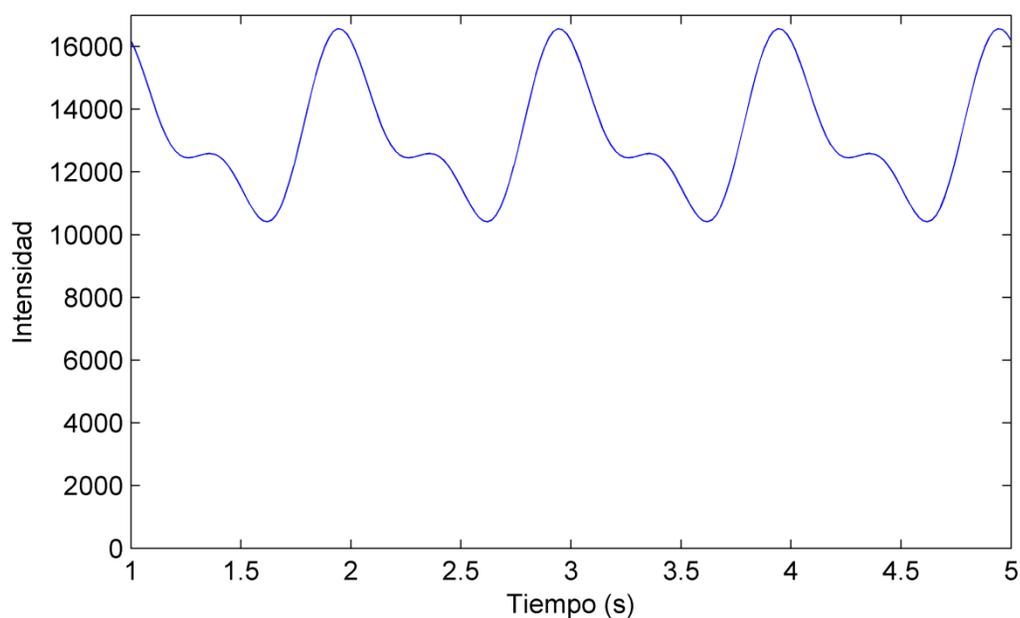


Figura 3.5: Simulación de una columna de la matriz X donde se ha tomado en cuenta sólo la primera y segunda armónica de la pulsación cardíaca. La componente continua de la señal corresponde a la señal Raman de la glucosa proveniente de fuentes estáticas como el líquido intersticial mientras que la señal alterna corresponde a la glucosa proveniente de la sangre. La proporción entre las señales alterna y continua se ha estimado en base a la tabla 1.1. La señal simulada no incluye ningún tipo de ruido o señal proveniente de otras fuentes distintas de la glucosa.

De la figura 3.6 podemos obtener la potencia total contenida en la primera y segunda armónica de la pulsación cardíaca. La raíz de la potencia es la amplitud promedio y, por tanto, a partir de X podemos fabricar un espectro Raman donde el eje Y

corresponde a la amplitud promedio de la señal alterna (pulsaciones cardíacas), es decir, un espectro Raman que proviene mayormente de la sangre y en base a él calibrar un modelo PLS para predecir las concentraciones de glucosa.

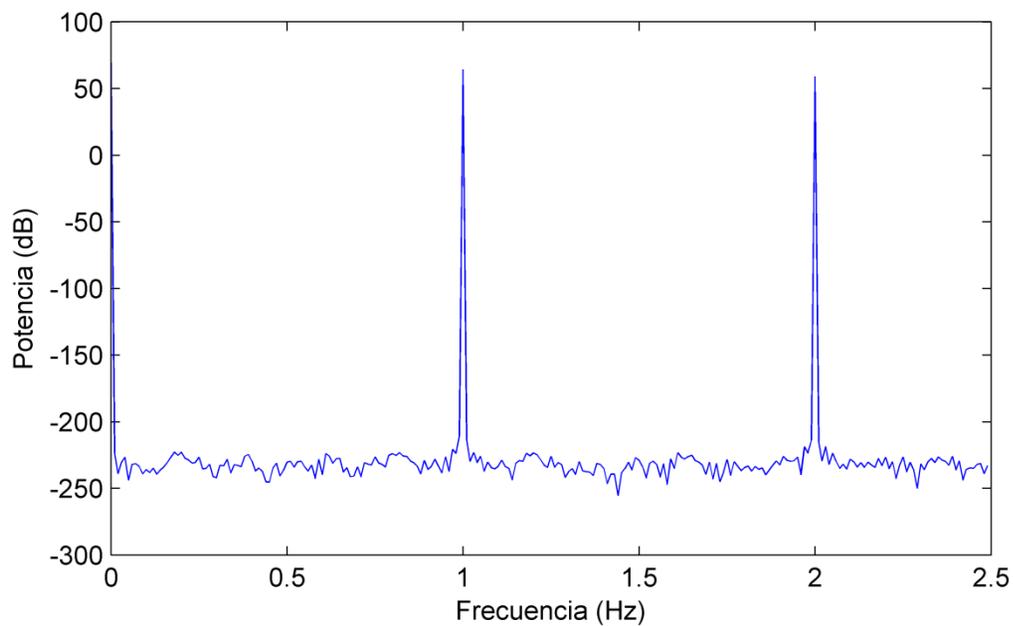


Figura 3.6: Espectro de la señal de la figura 3.5.

3.3 Preprocesamiento

Los espectros obtenidos con el espectrómetro Raman, contienen ruido y distintos tipos de interferencias o variaciones que disminuyen el rendimiento de los modelos PLS. Para eliminar o disminuir dichas interferencias los espectros son preprocesados con distintos métodos. A continuación se explicarán rápidamente los utilizados.

3.3.1 *Multiplicative Scatter Correction (MSC) y Standard Normal Variate (SNV)*

Al obtener espectros de muestras dispersivas, como un líquido turbio, el paso óptico se incrementa y da como resultado el efecto multiplicativo. Esto produce que espectros obtenidos de muestras con igual concentración sean distintos. La ecuación 3.4 modela dos interferencias comunes en los espectros, el efecto aditivo y el multiplicativo.

$$y_i = a + cx_i \quad (3.4)$$

En la ecuación 3.4, y_i representa el espectro modificado, a el desplazamiento producido por el efecto aditivo, c el factor de multiplicación y x_i el espectro original. Los métodos MSC y SNV corrigen tanto el efecto aditivo como el multiplicativo. Ambos métodos están matemáticamente relacionados, pero no son equivalentes. Con ciertos datos un método producirá mejores resultados que el otro. Una explicación simple de cómo funcionan ambos métodos se puede encontrar en (A. M. C. Davies & Fearn, 2007).

3.3.2 *Savitsky-Golay*

El método de suavizado Savitsky-Golay es muy útil para remover ruido espectral. El algoritmo ajusta un polinomio a cada segmento sucesivo de la curva, reemplazando así los valores originales con variaciones más regulares. Se puede elegir el largo de los segmentos, lo que también es llamado el ancho del filtro, y el orden del polinomio. El método es bastante complejo, por lo que si se desea conocer en detalle se recomienda revisar la referencia (Næs, 2002).

3.3.3 *Mean centering o centrado de medias*

Este método consiste en simplemente restarle a cada longitud de onda, su media. Este preprocesamiento es recomendable aplicarlo siempre, pues evita que la

primera componente principal del modelo PLS describa la media de cada variable en vez de variaciones de mayor interés. Debido a esto, generalmente mejora el resultado de los modelos PLS.

3.4 Calibración

Del total de los espectros adquiridos 2/3 fueron usados para calibrar el modelo dejando el tercio restante para su posterior validación. El proceso de calibración involucra la selección de los pre-procesamientos a usar y la selección del número de componentes principales a incluir en el modelo. Para afinar dichos parámetros se observa el rendimiento del modelo usando la llamada validación cruzada. Esta consiste en dividir sistemáticamente los datos usados para la calibración en subconjuntos de calibración y validación. Así el modelo se calibra con un set de datos y luego se aplica al set de validación para comprobar su rendimiento. El método de validación cruzada que se usó fue el llamado *leave one out* o “deja uno fuera”, que consiste en excluir un espectro del proceso de calibración para luego aplicar el modelo a dicho dato excluido. Este proceso se repite para todos los datos de calibración. Los indicadores de rendimiento que se usan para decidir acerca de los pre-procesamientos a usar así como el número de componentes principales a incluir, son el coeficiente de correlación (R^2) y la raíz cuadrada del error cuadrático medio de validación cruzada (RMSECV). El coeficiente de correlación indica la proporción de la varianza del parámetro dependiente que es explicada por la regresión. El RMSECV constituye una aproximación del error que cometerá el modelo PLS al predecir el parámetro de interés y su fórmula es la siguiente:

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (3.5)$$

Donde \hat{y}_i son las estimaciones de y_i estimadas por el modelo PLS.

3.5 Validación

Una vez calibrado el modelo PLS es necesario tener una idea de cuán bien el modelo predice el parámetro de interés. Para ello, el modelo se aplicó al set de datos apartados para este fin correspondientes a 1/3 del total de las muestras. Los indicadores de rendimiento calculados fueron nuevamente el R^2 y el RMSEP que es la raíz cuadrada del error cuadrático medio de predicción, es decir, básicamente lo mismo que el RMSECV, pero esta vez calculado para los datos independientes.

3.6 *Clarke Error Grid Analysis (EGA) o gráfico de error de Clarke*

El gráfico de error de Clarke (Clarke, Cox, Gonder-Frederick, Carter, & Pohl, 1987) es usado para evaluar el significado clínico de la diferencia entre el nivel de glucosa medido por una técnica bajo prueba y la concentración de glucosa en la sangre medida por un método de referencia, es decir, del error de medición. El gráfico está dividido en 5 zonas. La zona A, o aceptable, representa los valores que se desvían de la referencia por un $\pm 20\%$ o que están en el rango hipoglicémico (< 70 mg/100 ml), cuando la referencia está también en el rango hipoglicémico. Las mediciones que caen en la zona A llevan al tratamiento clínico correcto. La zona B, o de errores benignos, se ubica por sobre y bajo la zona A, incluyendo errores superiores al 20% pero que no provocan consecuencias de seriedad. En la zona C, las mediciones resultarían en sobre corregir niveles de glucosa aceptables, posiblemente llevando los niveles de glucosa a rangos hipoglicémicos o hiperglicémicos. La zona D representa una falla en la detección y tratamiento de niveles de glucosa anormales, es decir, la técnica bajo prueba muestra niveles de glucosa normales, mientras que la concentración de referencia es alta o baja. Finalmente, la zona E conduce al tratamiento opuesto, en el cual los valores determinados por la técnica bajo prueba son los opuestos a los valores de referencia.

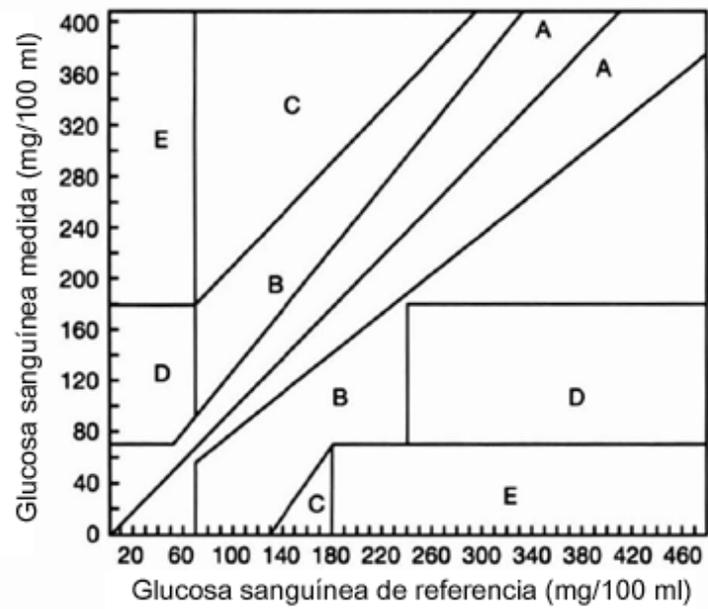


Figura 3.7: *Clarke Error Grid Analysis* (EGA) o gráfico de error de Clarke.

4. EXPERIMENTOS

4.1 Experimentos preliminares

4.1.1 Obtención del espectro Raman de la glucosa

Al comenzar la investigación lo primero que se intentó fue obtener el espectro de la glucosa con el MiniRam. El experimento se realizó tomando un espectro Raman de glucosa disuelta en agua destilada y uno de agua destilada sola para luego restar el segundo del primero para obtener el de la glucosa. La glucosa utilizada fue la D(+)-Glucosa fabricada por Merck y la concentración de la solución fue de 18 gr/100 ml.

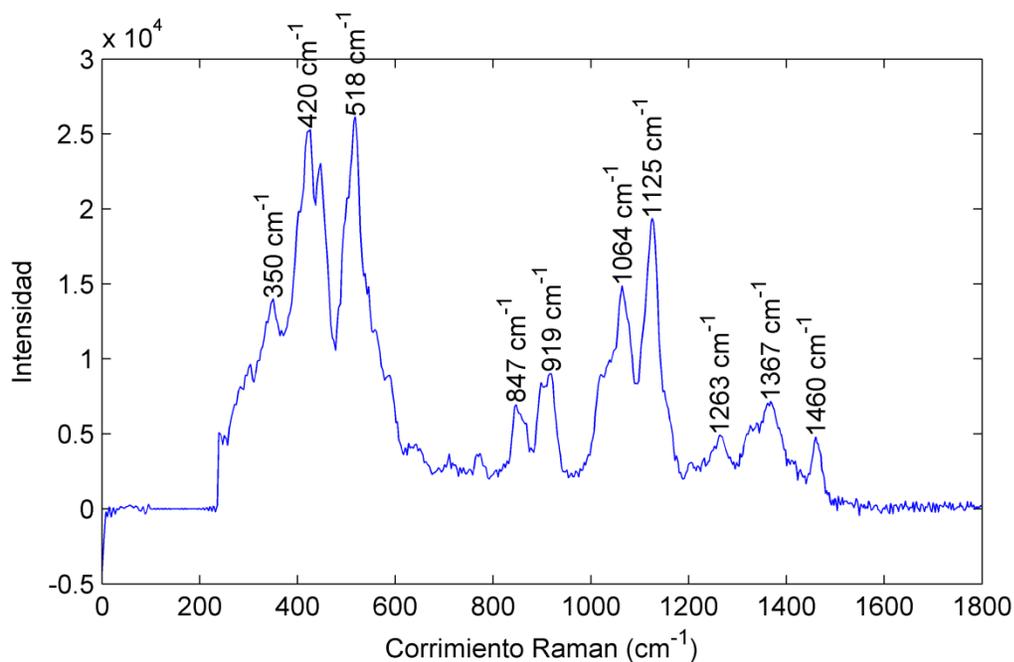


Figura 4.1: Espectro Raman de una solución acuosa de glucosa con una concentración de 18 gr/100 ml. El espectro del agua ha sido sustraído. El tiempo de integración fue de 100 s.

Para obtener el espectro, se usó la cubeta y el sostenedor de cubeta descritos en la sección 2.2. El tiempo de adquisición fue de 100 s.

Las bandas Raman observadas en la figura 4.1 son muy similares a las observadas por otros investigadores (McNichols & Cote, 2000; Ren & Arnold, 2007) lo que confirma que el espectro obtenido es realmente el de la glucosa.

4.1.2 Comportamiento de la razón señal a ruido de los espectros Raman

Debido a que en esta tesis se propone usar los espectros Raman para predecir las concentraciones de glucosa, es lógico pensar que la precisión de estas predicciones dependerá de la razón señal a ruido (SNR) de los espectros obtenidos. El SNR de un espectro Raman es la intensidad promedio del pico, \bar{S} , dividida por la desviación estándar de la intensidad del pico, σ_y .

$$SNR = \frac{\bar{S}}{\sigma_y} \quad (4.6)$$

En (McCreery, 2000) se propone que las fuentes de ruido en espectroscopía Raman son las indicadas por la ecuación 4.7:

$$\sigma_y = (\sigma_S^2 + \sigma_B^2 + \sigma_d^2 + \sigma_F^2 + \sigma_r^2)^{1/2} \quad (4.7)$$

Donde σ_S es la desviación estándar de la señal proveniente del analito de interés, en este caso la glucosa; σ_B es la desviación estándar de la señal de fondo; σ_d es la desviación estándar de la señal de oscuridad; σ_F es el ruido introducido por la variación en intensidad del láser (*flicker noise*) y finalmente, σ_r es el ruido de lectura del CCD. El *flicker noise* es despreciable en espectrómetros multicanal como el MiniRam y, por lo tanto, no será tomado en cuenta.

El ruido de lectura del CCD no depende ni del tiempo de integración ni de la intensidad de la señal. Por esto, al generar un espectro Raman sumando espectros de menor duración se obtiene un SNR inferior al que se lograría si se adquiriera un solo espectro con un tiempo de integración equivalente a la suma de los tiempos de los

espectros de menor duración. Esto es relevante debido a que el método de filtrado en frecuencia requiere tiempos de integración muy cortos para poder resolver las pulsaciones cardíacas y, por tanto, el tiempo de integración total se incrementa sumando series de espectros de corta duración.

Para verificar el comportamiento del SNR frente a la variación del número de espectros en que se divide el tiempo total de integración se obtuvieron 8 espectros de 50 seg totales de una solución acuosa de glucosa con una concentración de 18 gr/100 ml. La cantidad de espectros sumados para generar cada uno de los 8 espectros se puede apreciar en la tabla 4.1.

Tabla 4.1: Detalles del experimento

Número de espectros	Tiempo de integración (mseg)	Tiempo total (seg)
100	500	50
125	400	50
150	333	50
188	266	50
250	200	50
333	150	50
500	100	50
2500	20	50

Se tomaron espectros tanto de la solución de glucosa como del agua pura y luego se restó el espectro del agua pura al espectro de la glucosa. De esta manera se eliminó gran parte de la señal de fondo y de oscuridad. La razón señal a ruido, por tanto, viene dada de manera aproximada por:

$$\frac{S}{\sqrt{S + N\sigma_r^2}} \quad (4.8)$$

Donde se ha usado el hecho que $\sigma_s^2 = S$. En la figura 4.2 se pueden observar los resultados del experimento, además de una curva generada ajustando la ecuación 4.8 a los datos experimentales. Los resultados del ajuste fueron $S=999,47$ y $\sigma_r = 9.974$. De

esta manera, se puede apreciar que el ruido de lectura limita el tiempo mínimo de integración utilizable por cuadro debido a que cuando se usa un tiempo de integración por cuadro demasiado pequeño el tiempo total necesario para obtener una razón señal a ruido aceptable es demasiado largo.

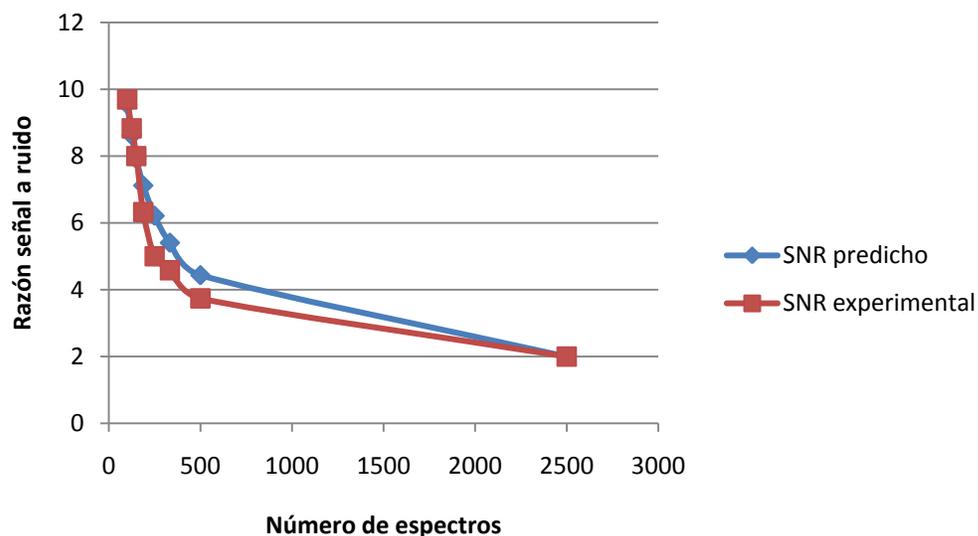


Figura 4.2: Comportamiento de la razón señal a ruido al variar el número de “cuadros” manteniendo el tiempo total de integración.

4.2 Métodos

Para evaluar el rendimiento del método de filtrado en frecuencia se llevó a cabo un experimento para simular la pulsación sanguínea. Específicamente, se simuló un pulso cuadrado donde la componente continua simuló la glucosa contenida en el líquido intersticial e intracelular mientras que la componente alterna simuló la glucosa contenida en la sangre. Para una concentración de glucosa cualquiera la señal continua equivalió a un 70% del total y la señal alterna al 30% restante lo que es similar a la situación típica observada en un ser humano según lo indica la tabla 1.1. Se obtuvieron espectros de varias concentraciones distintas para luego calibrar dos modelos PLS, uno con los espectros previamente procesados con el método de filtrado en frecuencia y otro con el

simple promedio de todos los “cuadros” para comparar el rendimiento del método con el procedimiento habitual.

Se simularon 14 concentraciones de glucosa en la sangre. Para cada concentración en la sangre se simularon 3 concentraciones distintas de la componente continua debido al atraso o adelanto de la cantidad de glucosa en el líquido intersticial con respecto a la concentración en la sangre, tal como fue explicado en el capítulo 1.1. Se simuló un retraso aleatorio de hasta 175 mg/100 ml, un adelanto aleatorio de hasta 75 mg/100 ml y finalmente el caso en que la concentración sólo tiene una pequeña diferencia con la observada en la sangre.

El pulso cuadrado se simuló asumiendo que en un instante de tiempo la concentración de glucosa observada en el volumen muestreado por la sonda Raman corresponde a la suma de la glucosa contenida en la sangre y en el líquido intersticial, y en otro instante, sólo corresponde a la contenida en el líquido intersticial. Para fabricar la señal cuadrada primero se tomaron 451 espectros de cada una de estas dos concentraciones por separado. Cada espectro tuvo un tiempo de integración de 333 ms. Finalmente, en el computador se intercalaron de 10 en 10 para formar la señal cuadrada, lo que corresponde a un ritmo cardíaco de 9 pulsos por minuto. Si bien esta frecuencia está bien por debajo de la frecuencia habitual en un ser humano, fue usada en el experimento porque debido al elevado ruido de lectura del espectrómetro, no es posible usar tiempos de adquisición mucho menores. Sin embargo, el experimento no pierde validez porque de funcionar la técnica, para implementarla con una frecuencia de muestreo más elevada, sólo se tendría que cambiar el espectrómetro por uno con mejor razón señal a ruido. En la figura 4.3 se presenta un esquema de cómo luce la señal cuadrada a una longitud de onda correspondiente a una banda Raman de la glucosa. Los datos se han normalizado de manera que la intensidad máxima es 1.

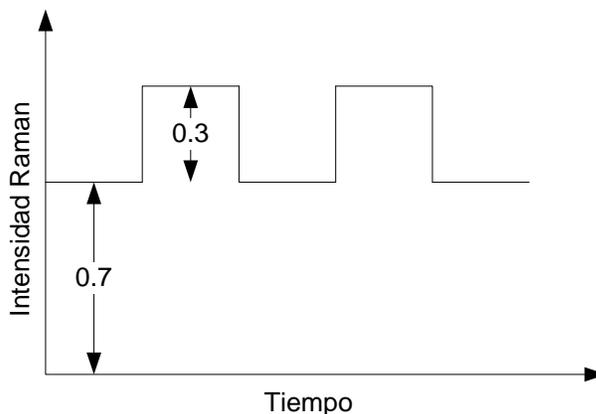


Figura 4.3: Esquema de la señal cuadrada observada a una longitud de onda correspondiente a una banda Raman de la glucosa. Los datos se han normalizado de manera que la intensidad máxima es 1.

A modo de ejemplo en la tabla 4.2 se presentan las muestras correspondientes a una concentración de glucosa en la sangre de 50 mg/100 ml. Se puede observar como la concentración simulada en el líquido intersticial atrasa o adelanta a la concentración sanguínea. Ahora si observamos la primera columna observamos que la concentración de las muestras es 31.5 y 46.5 mg/100 ml respectivamente. La concentración máxima corresponde al caso en que la sonda observa la glucosa contenida en el líquido intersticial y en la sangre y se calcula como el 70% de la concentración del líquido intersticial más el 30% de la concentración en la sangre debido a la relación volumétrica entre ambos fluidos, la cual puede ser observada en la tabla 1.1. La concentración mínima corresponde al caso en que la sonda sólo observa la glucosa contenida en el líquido intersticial y se calcula como el 70% de la concentración del líquido intersticial. Se tomaron 451 espectros de cada muestra de concentración mínima y 451 espectros de cada muestra de concentración máxima para luego intercalarlas de 10 en 10 en el computador para generar la señal cuadrada de un largo de 900 espectros equivalente a un tiempo total de integración de 5 minutos. De cada

columna se adquirieron 3 series de espectros para terminar con 9 señales cuadradas para cada concentración de glucosa en la sangre.

Tabla 4.2: Para cada concentración de glucosa en la sangre se usaron 3 distintas concentraciones en el líquido intersticial. En la tabla se observa el caso de una concentración de 50 mg/100 ml en la sangre.

Concentraciones simuladas	Sangre	50	50	50
	Líquido intersticial	53	75	30
Muestras	Concentración mínima	37,1	52,5	21
	Concentración máxima	52,1	67,5	36
	Modulación	15	15	15
	Atraso o Adelanto	-3	-25	20

Las concentraciones de glucosa en la sangre en mg/100 ml fueron: 50, 150, 250, 450, 750, 1150, 3000, 4800, 6600, 8400, 10200, 12000, 13800 y 15600. De esta manera, el número total de espectros ascendió a 126. Si bien una de las concentraciones de glucosa más alta medida en un ser humano ha sido de 5600 mg/100 ml (Soni, Rao, Bajaj, & Treser, 1990), la razón para usar mayores concentraciones es asegurar la obtención de resultados útiles acerca del método de filtrado en frecuencia aun cuando los niveles de ruido del espectrómetro sean altos.

4.2.1 Procedimientos experimentales

La glucosa usada fue D(+)-Glucosa marca Merck. Las soluciones se prepararon pesando la cantidad de glucosa adecuada y añadiendo agua destilada hasta completar 100 ml. La pesa utilizada para medir desde los 50 mg hasta los 1150 mg tenía un error de 1 mg y para el resto se usó una con un error de 20 mg. Los 100 ml se midieron en un matraz volumétrico de 100 ml \pm 0.100 ml. Los errores máximos cometidos al preparar cada una de las muestras debido a ambos errores combinados se pueden apreciar en la tabla 4.3.

Las muestras se vertieron en una cubeta de cuarzo que se ubicó dentro del sostenedor. Para tomar los espectros, la sonda se fijó al sostenedor para evitar cualquier movimiento. Finalmente, para controlar el espectrómetro se diseñó un programa para tomar las series de espectros y almacenarlos en un formato amigable para su posterior análisis en Matlab.

Tabla 4.3: Error máximo cometido al preparar cada una de las muestras.

Concentración de glucosa (mg/100 ml)	Error máximo (mg/100 ml)
50	1,5
150	2,5
250	3,5
450	5,6
750	8,6
1150	12,6
3000	50,5
4800	68,7
6600	86,9
8400	105,1
10200	123,2
12000	141,4
13800	159,6
15600	177,8

Para eliminar la posible correlación entre alguna variable temporal y la concentración de la glucosa, el orden en que se obtuvieron los espectros de las distintas concentraciones fue aleatorio. Finalmente, cabe mencionar que las muestras fueron tomadas en un período de dos semanas.

4.3 Análisis

Para cada muestra se obtuvieron 2 espectros. Uno que equivale al simple promedio de los 900 espectros correspondientes y otro obtenido con el método de filtrado en frecuencia.

En la figura 4.4 se presenta la media \pm la desviación estándar de los datos obtenidos con el método del filtrado en frecuencia y en la figura 4.5 los obtenidos con el método del promedio. Se puede observar que el método de filtrado en frecuencia al capturar sólo las señales alternas rechaza inmediatamente la información Raman del agua, del cuarzo y otras interferencias para detectar exclusivamente la glucosa que es lo único que se encuentra variando en este caso. Este hecho se puede corroborar notando la similitud entre la figura 4.4 y 4.1 donde aparece el espectro de la glucosa. En el caso del método del promedio, en la figura 4.5, se observa la información Raman del agua y la presencia de interferencias como los píxeles calientes y la señal de oscuridad.

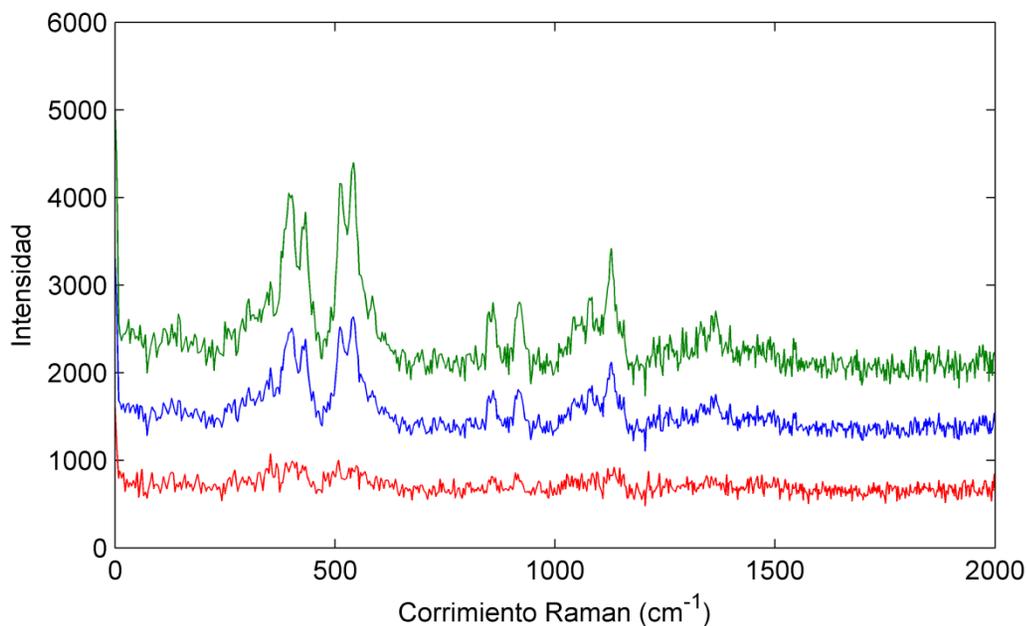


Figura 4.4: Media \pm la desviación estándar de los datos obtenidos mediante el método de filtrado en frecuencia.

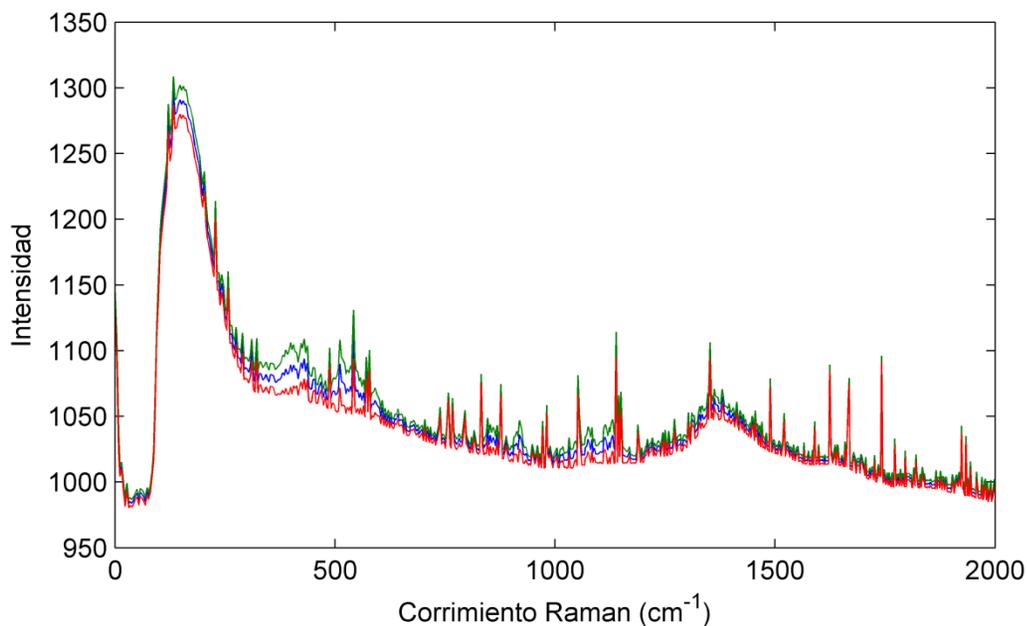


Figura 4.5: Media \pm la desviación estándar de los datos obtenidos mediante el método del promedio.

A partir de estos datos se produjeron dos calibraciones PLS con distintos objetivos. La primera calibración, o calibración “A”, se hizo con el fin de comparar los niveles de error obtenidos a partir de los datos procesados con el método de filtrado en frecuencia vs. el simple promedio. Por ello, no se usaron técnicas de preprocesamiento que pudieran interferir con la comparación. La segunda calibración, o calibración “B”, buscó obtener los menores niveles de error posibles en ambos casos y para ellos se utilizaron métodos de preprocesamiento más avanzados.

4.3.1 Calibración “A”

Para la calibración “A” los datos fueron preprocesados solamente usando centrado de medias. El modelo fue calibrado usando todas las longitudes de onda.

4.3.2 Calibración “B”

4.3.2.1 Análisis de los datos obtenidos con el método del promedio

A continuación se explicará el preprocesamiento que dio los mejores resultados en términos de error.

Lo primero que se hizo fue restar la señal de oscuridad a los datos de manera de evitar que variables como la temperatura del CCD afecten a los datos. Los espectros menos la señal de oscuridad se aprecian en la figura 4.6.

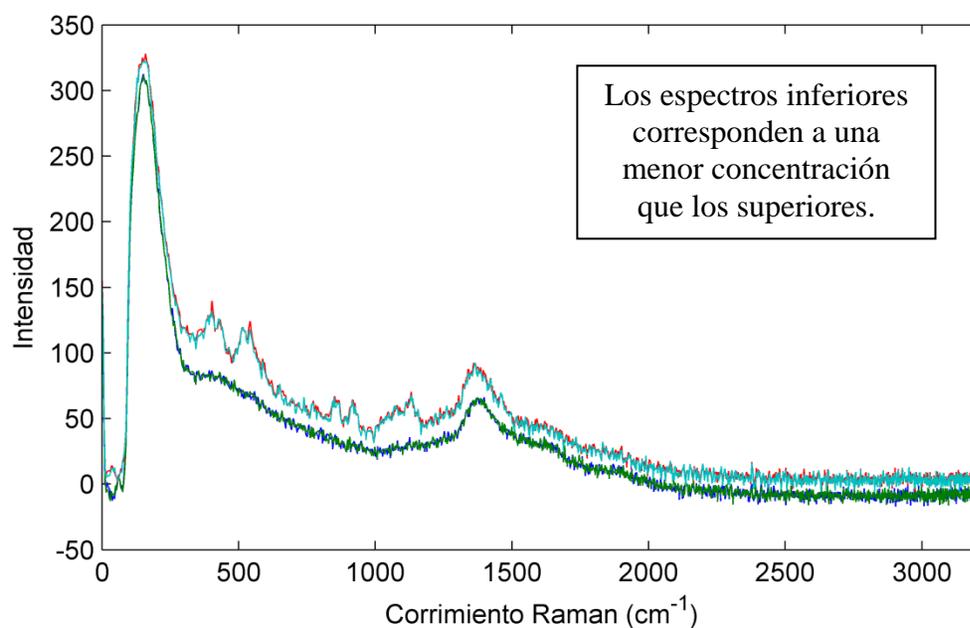


Figura 4.6: Espectros menos la señal de oscuridad. Los píxeles calientes son removidos y, por tanto, se aprecia el espectro con mucha mayor claridad. Sólo se grafican algunos espectros para una mejor visualización de los datos

En la figura 4.6 se observa que existe diferencia entre los espectros en los sectores donde sabemos que hay información Raman de la glucosa, es decir, entre los 200 y 1500 cm^{-1} , pero también existe diferencia donde sabemos que no hay información de la glucosa, es decir, desde los 1600 cm^{-1} en adelante. Esto significa que los espectros tienen sumado un offset que varía de muestra en muestra. Para eliminar el offset se le

resto a cada espectro el promedio entre los 1600 y 3220 cm^{-1} y los datos quedaron como en la figura 4.7.

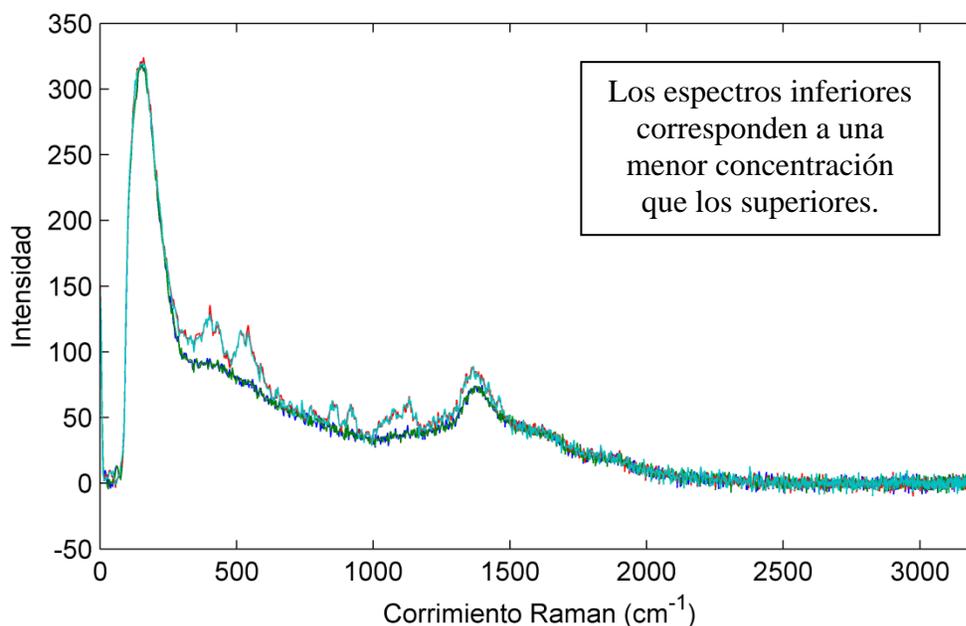


Figura 4.7: Espectros menos la señal de oscuridad y el offset. El offset de cada espectro se calculó como el promedio desde los 1600 a los 3220 cm^{-1} . Sólo se grafican algunos espectros para una mejor visualización de los datos.

Observando la figura 4.8 observamos que las muestras varían de una extraña manera a lo largo de la primera componente principal, pues aumenta y disminuye a medida que la concentración aumenta monótonamente (las muestras están ordenadas).

En la figura 4.9 observamos cual es la variabilidad que captura la primera componente. Se observa claramente el espectro de la glucosa, lo que hace aun más extraño el fenómeno observado en la figura 4.8. Es decir, no es posible que los scores sobre una componente principal que se asemeja mucho al espectro de la glucosa bajen mientras la concentración aumenta.

En la figura 4.10 observamos las muestras correspondientes al área encerrada en rojo en la figura 4.8, específicamente las muestras 54 y 55. La muestra 55 corresponde a una concentración de 8400 mg/100 ml mientras que la 54 corresponde a

6600 mg/100 ml, pero ésta última supera a la de mayor concentración. Esto indica que existe otra interferencia en los datos que todavía no hemos removido.

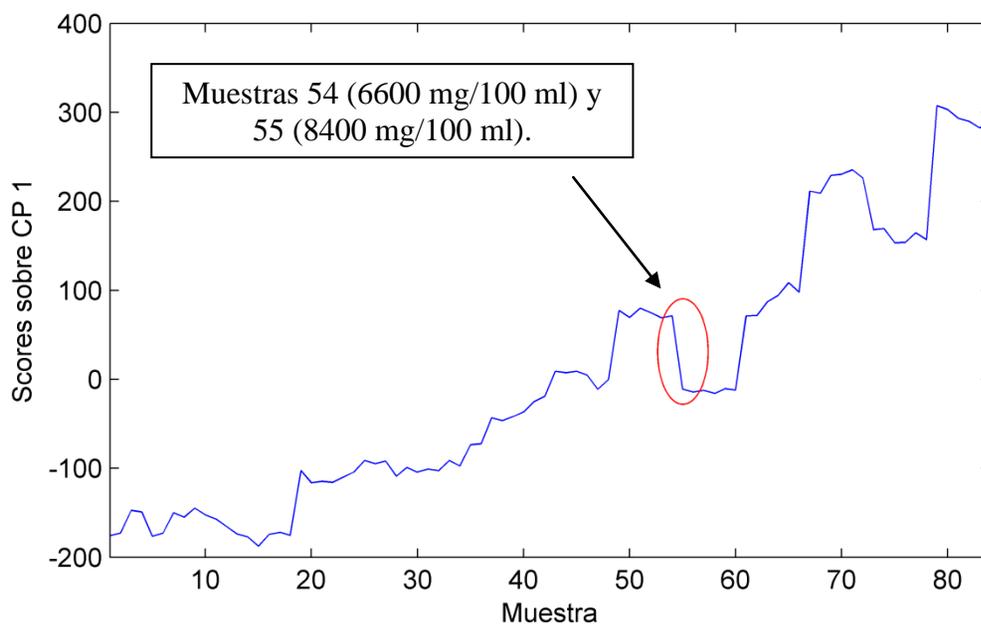


Figura 4.8: *Scores* de las muestras sobre la primera componente principal.

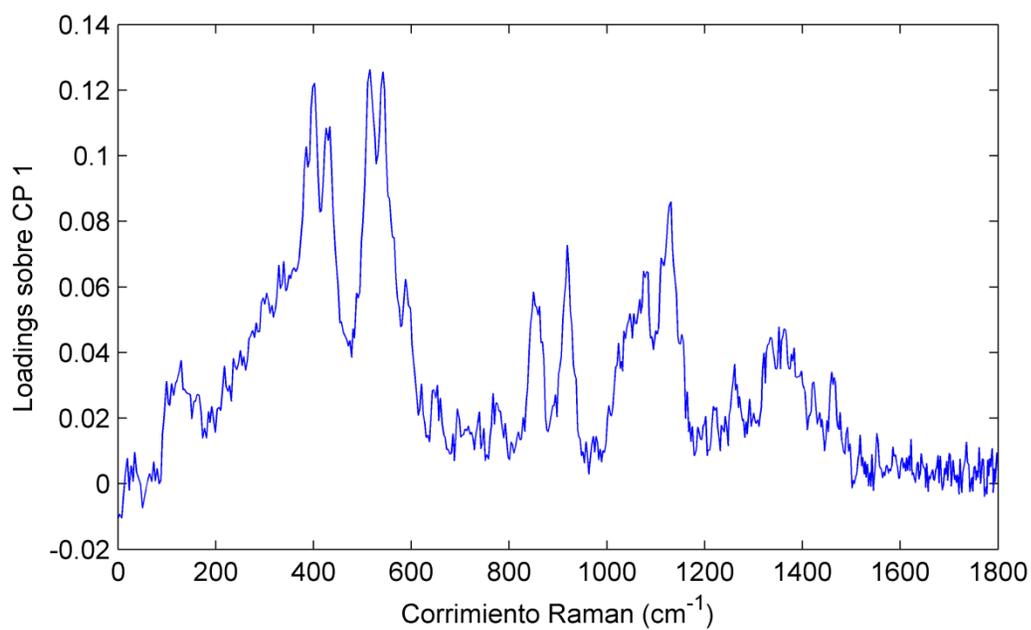


Figura 4.9: *Loadings* de las variables sobre la primera componente principal.

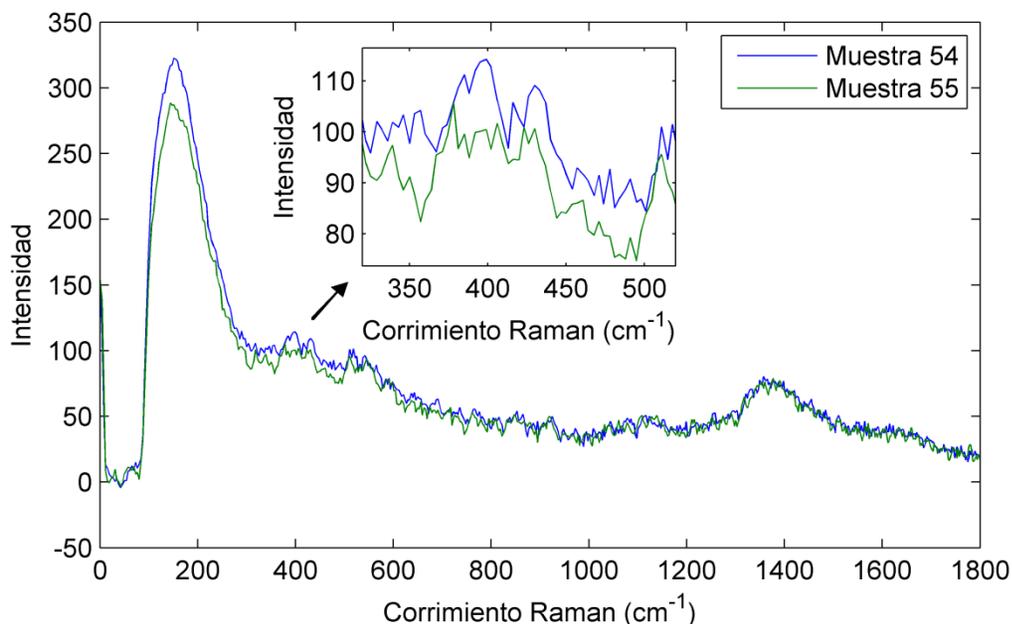


Figura 4.10: Muestras 54 (6600 mg/100 ml) y 55 (8400 mg/100 ml). La muestra 54 supera a la 55 lo que sugiere que hay otras interferencias además del offset.

En (A. Davies & Fearn, 2007), se explica que el paso óptico en un medio dispersivo como una solución turbia, que es el caso de las soluciones de glucosa, se incrementa y esto da origen al efecto multiplicativo.

La técnica MSC remueve tanto el efecto multiplicativo como el aditivo por lo que se aplicó directamente a los datos después de restar la señal de oscuridad dando como resultado los datos de la figura 4.11.

Finalmente, los datos fueron suavizados con Savitsky-Golay con una ventana de ancho 7 y orden 0 para después aplicar centrado de medias. En la figura 4.12 se aprecia como el preprocesamiento final, es decir, MSC + SavGol de ancho 7 + centrado de medias, soluciona en gran parte el problema observado en la figura 4.8.

La validación del modelo PLS se llevó a cabo aplicándolo a un set independiente de datos, equivalentes a 1/3 del total de los espectros.

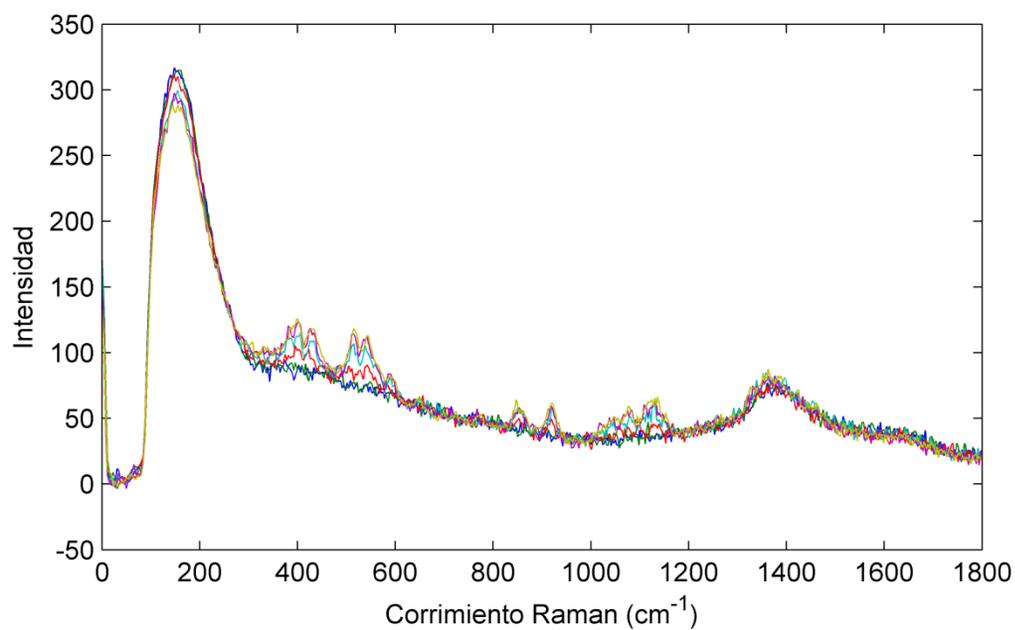


Figura 4.11: Espectros menos la señal de oscuridad preprocesados con MSC. Sólo se muestran algunos de los espectros para poder visualizar los datos con mayor claridad.

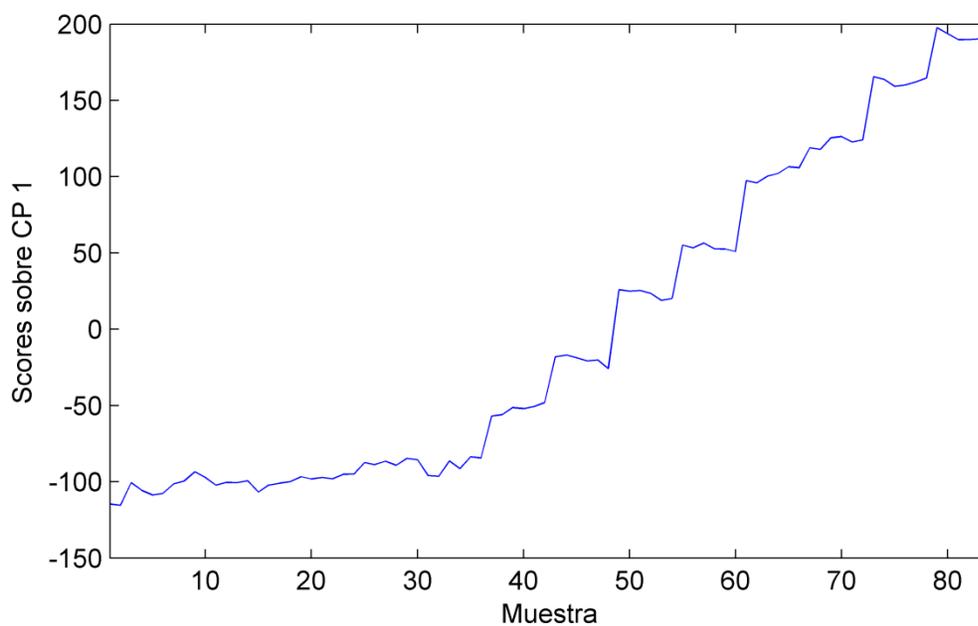


Figura 4.12: *Scores* de las muestras sobre la primera componente principal después de aplicar todos los métodos de preprocesamiento.

4.3.2.2 Análisis de los datos obtenidos con el método del filtrado en frecuencia

Los mejores resultados se obtuvieron preprocesando los datos con un suavizado mediante Savitzky-Golay de orden cero con una ventana de ancho 5 para reducir los altos niveles de ruido, para después aplicar SNV para anular los efectos aditivo y multiplicativo y finalmente aplicar centrado de medias. Los datos preprocesados se aprecian en la figura 4.13. Si bien los datos conservan una gran cantidad de ruido, un suavizado más agresivo elimina o distorsiona las bandas Raman por lo que el error del modelo aumenta.

La validación del modelo PLS se llevó a cabo usando un set independiente de espectros, correspondientes a 1/3 del total.

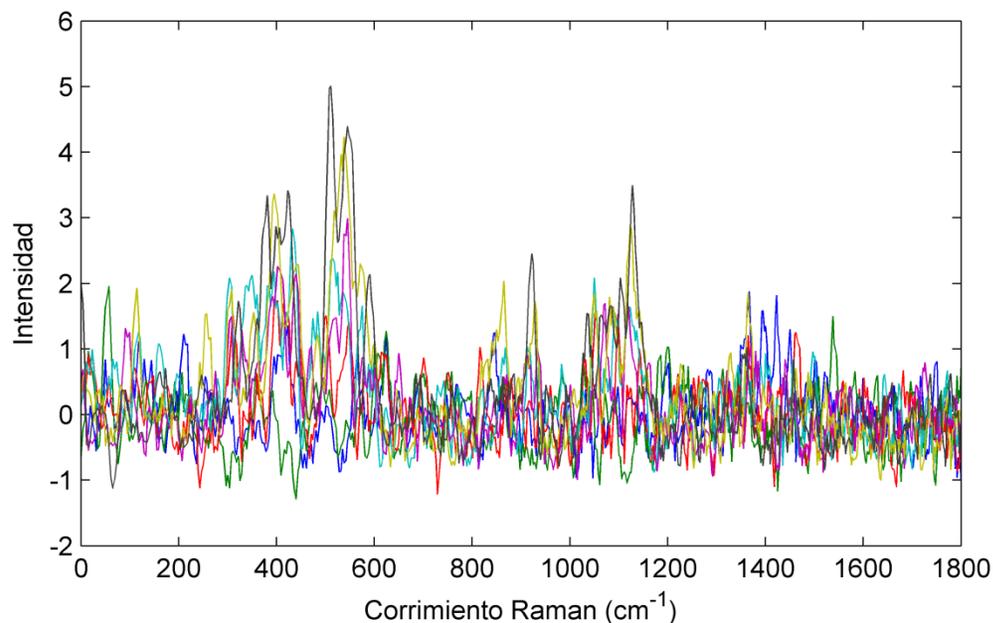


Figura 4.13: Datos preprocesados con Savitsky-Golay de orden cero y ancho 5 y SNV. Sólo se muestran algunos espectros para una mejor visualización. Se observa como los datos presentan una gran cantidad de ruido.

4.4 Resultados

En los gráficos que se presentarán en este capítulo, los triángulos rojos corresponden a los datos de validación y los círculos negros a los datos de calibración.

4.4.1 Calibración “A”

En las figuras 4.14 y 4.15 se pueden observar los resultados de las calibraciones PLS hechas sobre los datos obtenidos con el método del filtrado en frecuencia y con el método del promedio respectivamente. Es evidente que el nivel de error RMSEP es mucho mayor en el caso del método del filtrado en frecuencia que en el método del promedio. De hecho, es aproximadamente 10 veces más grande.

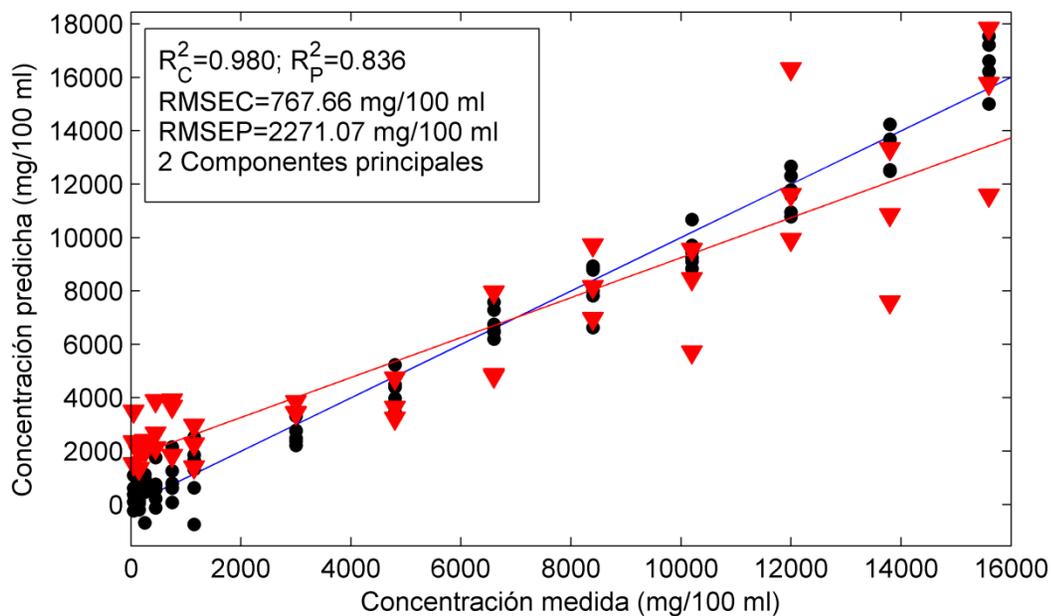


Figura 4.14: Calibración PLS obtenida a partir de los datos obtenidos con el método de filtrado en frecuencia.

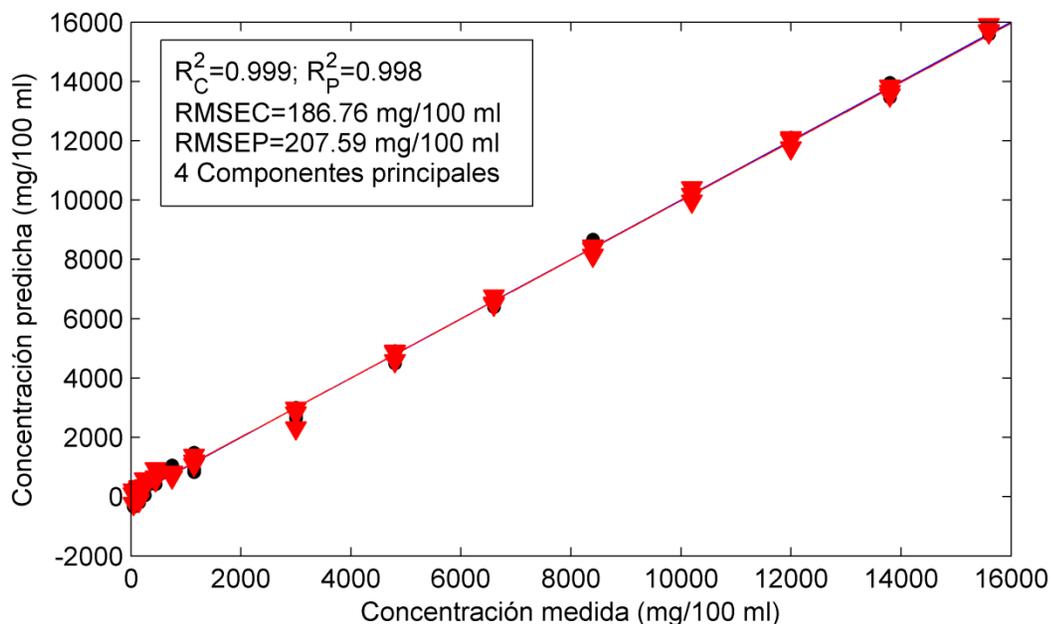


Figura 4.15: Calibración PLS obtenida a partir de los datos obtenidos con el método del promedio.

La diferencia de error se debe a dos razones principales. Primero, las intensidades que detectan uno y otro método son distintas. El método del promedio detecta la glucosa total mientras que el método del filtrado en frecuencia detecta sólo la glucosa contenida en la sangre, la cual en el caso del experimento corresponde a un 30% del total. Además, el promedio mide la señal continua mientras que el método de filtrado en frecuencia está midiendo una componente alterna. Si observamos la figura 4.3, el promedio tendría una intensidad de 0.85 mientras que la amplitud de la señal alterna es de 0.15. Adicionalmente, para medir la amplitud de la señal alterna sólo se está tomando en cuenta la componente fundamental la que equivale aproximadamente al 81% de la energía total del pulso cuadrado o al 90% de su amplitud. En segundo lugar, las señales producidas por ambos métodos son de distinta naturaleza. El método del promedio va a producir un espectro en que cada longitud de onda corresponderá a la media de esa longitud de onda. El método de filtrado en frecuencia en tanto, produce un espectro en que cada longitud de onda corresponde a la amplitud de la señal alterna más una

estimación de la cantidad ruido que hay a esa frecuencia. Eso quiere decir, entre otras cosas, que en ausencia de señal el promedio va a tener una esperanza de cero, mientras que el método de filtrado en frecuencia va a tener una esperanza que equivale a la cantidad de ruido que hay a esa frecuencia.

Para comprobar que la diferencia en los niveles de error no se debieron a alguna variable experimental que no se tomó en cuenta, se generaron espectros en Matlab y luego se sometieron al método de filtrado en frecuencia y al método del promedio. Los espectros generados correspondieron a gaussianas más ruido con distribución normal. En la figura 4.16 se observa uno de dichos espectros. Finalmente se calibraron modelos PLS y se comprobó que la diferencia de error RMSEP era, al igual que con los datos experimentales, de un factor de aproximadamente 10, lo que significa que no hay otros factores adicionales que estén influyendo de manera significativa en la diferencia de los niveles de error.

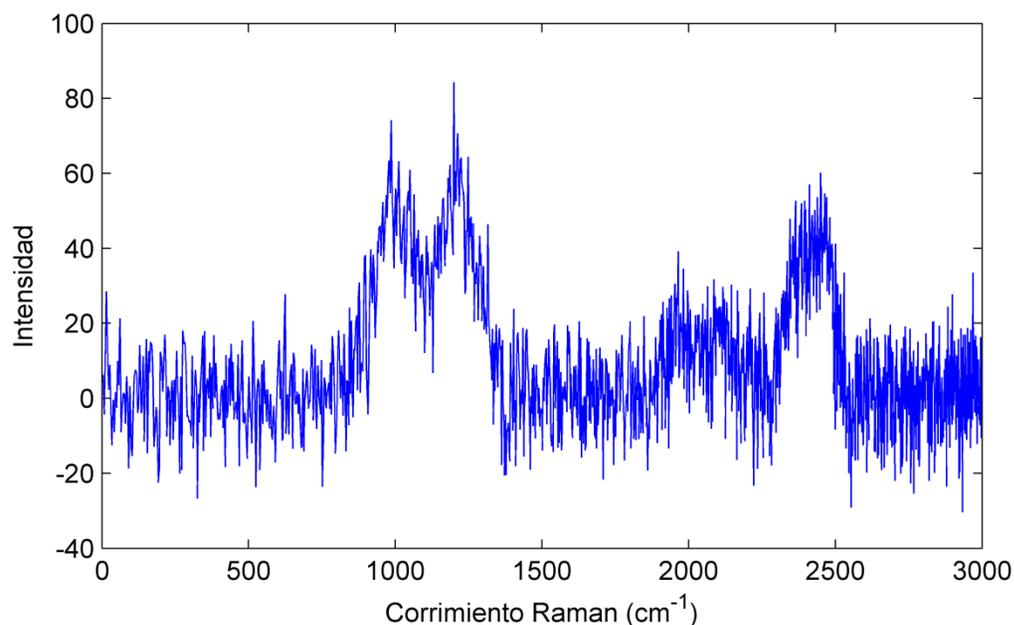


Figura 4.16: Espectro generado en Matlab consistente en gaussianas más ruido de distribución normal.

4.4.2 Calibración “B”

4.4.2.1 Resultados con el método del promedio

En la figura 4.17 se aprecian los resultados de la calibración PLS. El error RMSEP es de 127.17 mg/100 ml. Cabe recordar que este error se ha incrementado debido al error del método de referencia y debido a la variación de la componente continua. El promedio del error máximo posible en las mediciones de referencia es de 67.67 mg/100 ml (ver tabla 4.3). Es decir, el método podría tener un error de alrededor de 60 mg/100 ml, pero para afirmar ello se requiere de un nuevo experimento con métodos de referencia más precisos.

Por otro lado, la calibración efectivamente se basa en la glucosa como puede observarse en la figura 4.18.

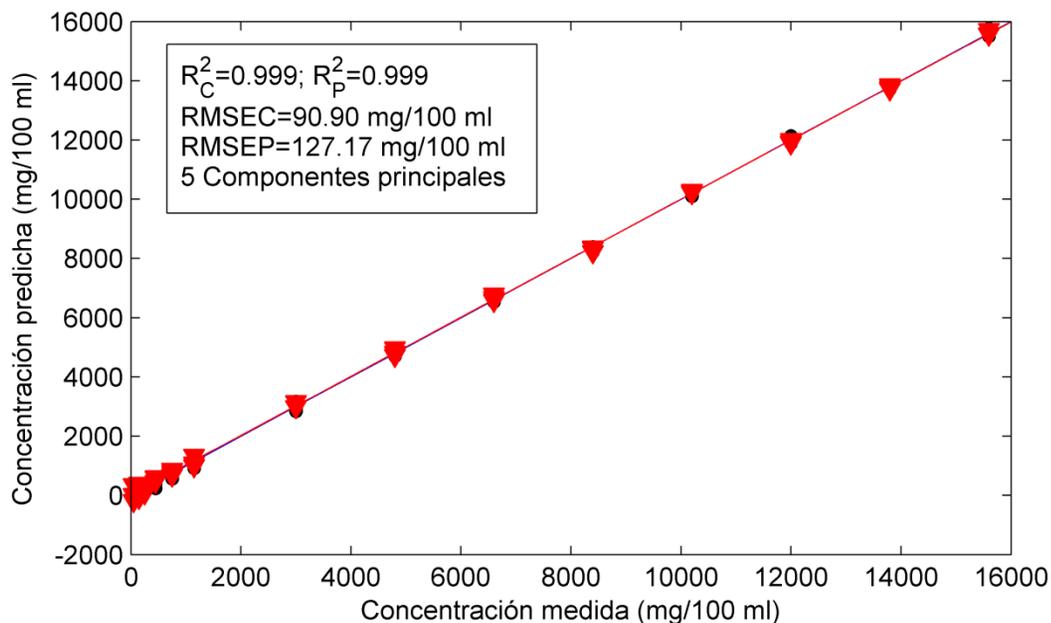


Figura 4.17: Calibración PLS obtenida a partir de los datos obtenidos con el método del promedio.

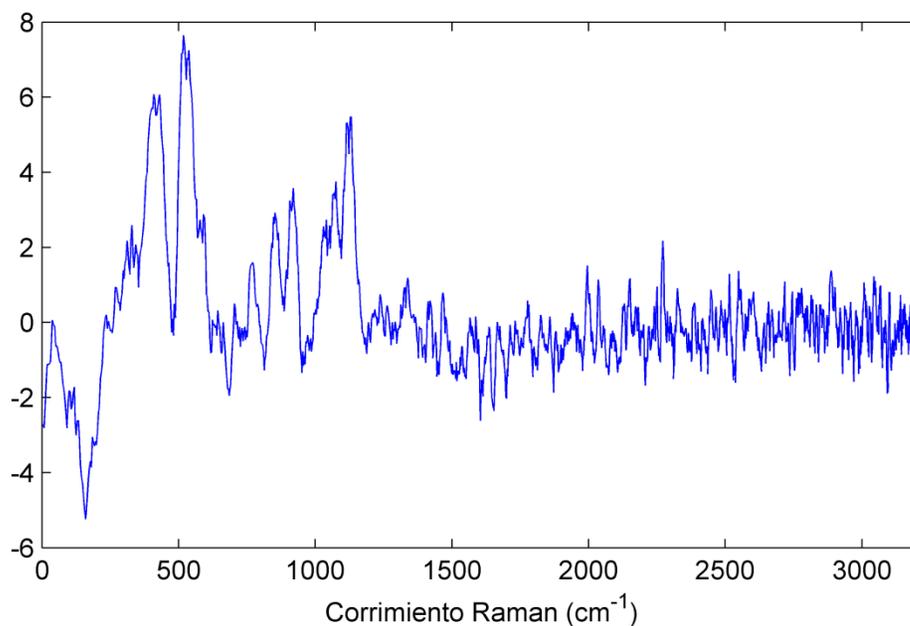


Figura 4.18: Vector de regresión del modelo PLS. Se observan claramente los peaks de la glucosa en el vector de regresión lo que indica que la calibración se basa efectivamente en la glucosa.

En la figura 4.19 se evalúa la utilidad clínica de los datos. De los 9 datos que tienen una concentración de referencia <400 mg/100 ml, sólo 5 caen dentro del gráfico. De esos 5, 3 caen en la zona A, 0 en la B, 0 en la C, 1 en la D y 1 en la E. Estos resultados son claramente inaceptables clínicamente hablando. Es importante mencionar que esto no se debe a la imprecisión del método de referencia, pues dicho error es despreciable en los rangos cubiertos por el gráfico.

Ahora, para medir la máxima precisión posible se anuló el efecto de la variación de la componente continua calibrando el modelo con la concentración real de cada muestra, es decir, con el promedio de la concentración mínima y máxima de la tabla 4.2. El RMSEP fue de 101.03 mg/100 ml como se observa en la figura 4.20. Tomando en cuenta el error de referencia, la calibración podría tener un error de alrededor de 30 mg/100 ml, pero nuevamente, para afirmar ello se requeriría de un nuevo experimento con mediciones de referencia más precisas.

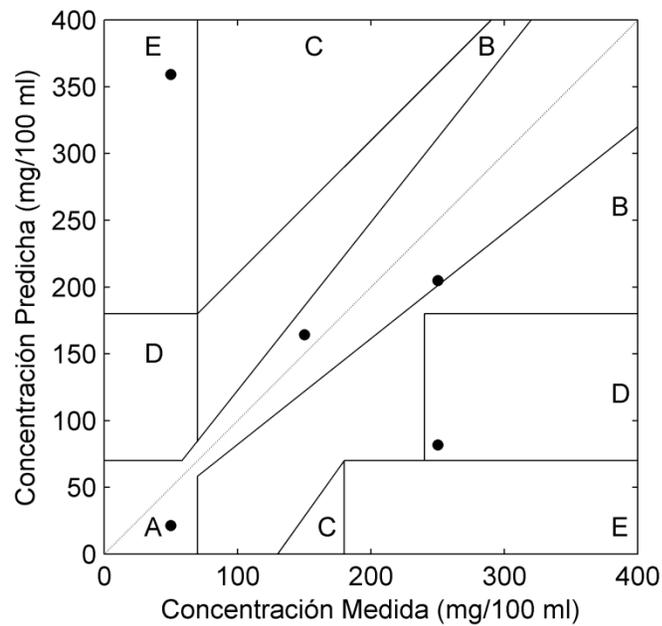


Figura 4.19: Datos de validación sobre el gráfico de error de Clarke.

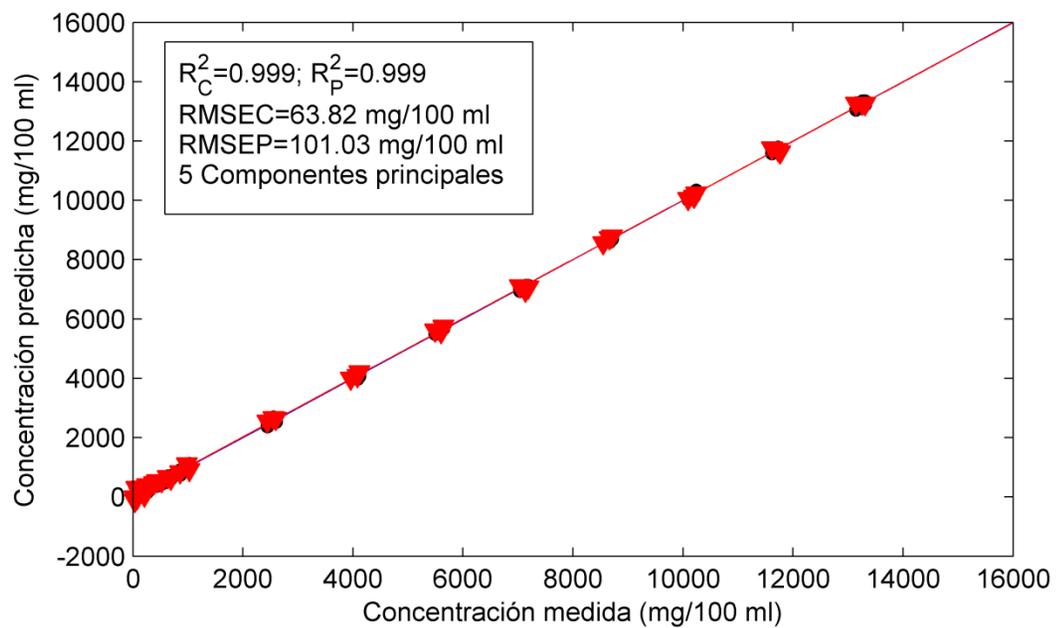


Figura 4.20: Calibración PLS obtenida a partir de los datos obtenidos con el método del promedio sin el efecto de la variación de la concentración de la componente continua.

En la figura 4.21 se graficaron los resultados de la validación sobre el gráfico de error de Clarke. De los 11 datos con concentración <400 mg/100 ml, sólo 6 caen dentro del gráfico. De esos 6, 1 cae dentro de la zona A, 2 en la zona B, 1 en la zona C, 0 en la D y 2 en la E lo que sigue siendo clínicamente inaceptable.

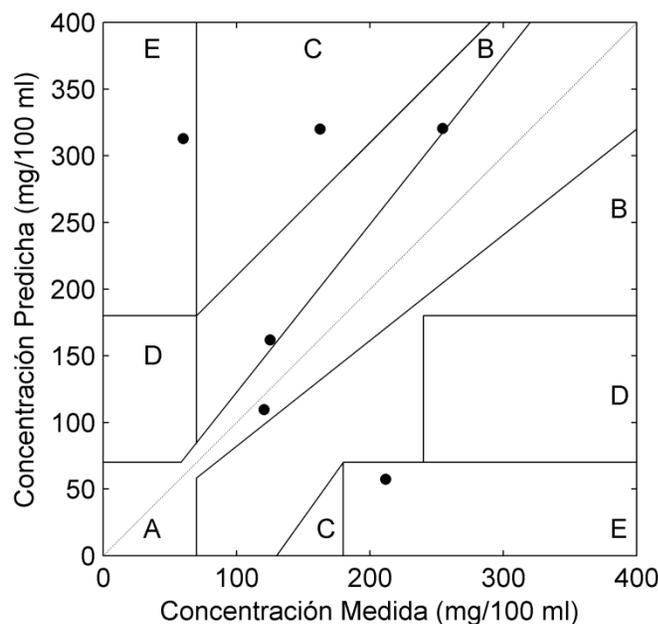


Figura 4.21: Datos de validación sobre el gráfico de error de Clarke.

Finalmente se calibró un modelo pero usando sólo 22 espectros, todos los disponibles con concentraciones bajo 400 mg/100 ml. El error RMSEP fue de 41.16 mg/100 ml, tal como se observa en la figura 4.22. El error de las mediciones de referencia es despreciable en este caso. En la figura 4.23 se puede observar el vector de regresión que sugiere que la calibración se basa, al menos en parte, en el espectro de la glucosa. Este se observa con una menor razón SNR que el de la figura 4.18 debido a las menores concentraciones que se están midiendo.

La utilidad clínica de los datos se observa en la figura 4.24. De los 11 espectros, 7 caen en la zona A y 4 en la B. Es decir, en este caso, los resultados son clínicamente benignos. Sin embargo, de acuerdo a la Organización Internacional para la Estandarización (ISO), el 95% de las mediciones determinadas por un monitor de

glucosa deben tener un error <15 mg/100 ml, cuando los niveles de glucosa son <75 mg/100 ml, o $<20\%$ cuando los niveles de glucosa son >75 mg/100 ml para poder ser utilizados por diabéticos (International Organization for Standardization, 2003). En este caso, esto no se está cumpliendo, pues los datos que cayeron en la zona B tienen un error mayor al 20%.

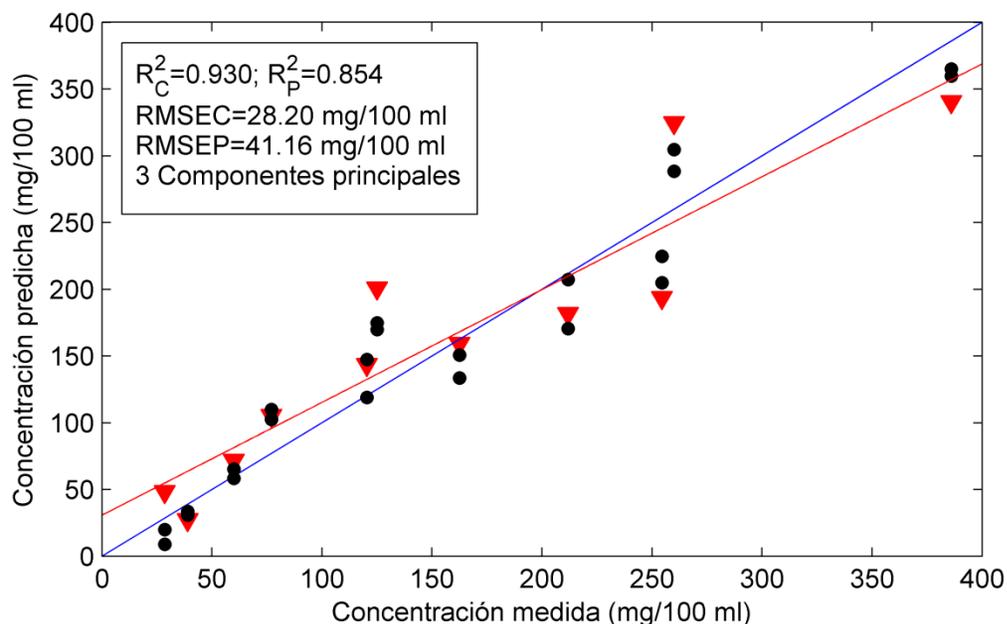


Figura 4.22: Calibración PLS obtenida a partir de los espectros de bajas concentraciones con el método del promedio sin el efecto de la variación de la concentración de la componente continua.

Debido a que el error de los modelos PLS escala aproximadamente de manera lineal con el SNR de los espectros (Berger & Feld, 1997), se podría obtener un RMSEP de aproximadamente 13.72 mg/100 ml y el 100% de los datos en las zonas A y B con un incremento de alrededor de 3 veces en el SNR. Para obtener dichos resultados, además de incrementar la razón SNR de los espectros, lógicamente se deben usar mediciones de referencia de alta precisión.

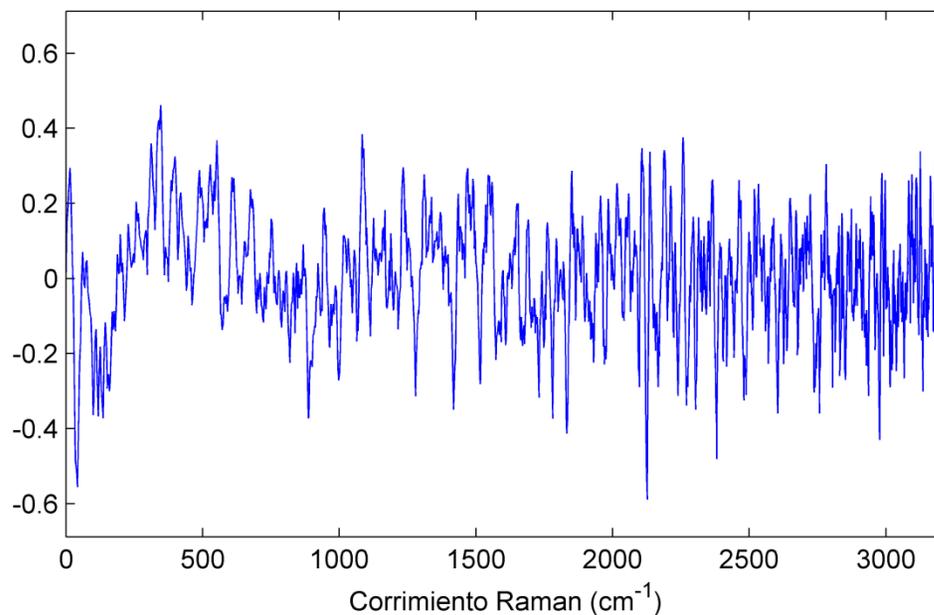


Figura 4.23: Vector de regresión del modelo PLS. Si bien el nivel de ruido es bastante alto, se observa la alta importancia de las variables entre los 400 y 600 cm^{-1} , donde se ubican ciertos peaks de la glucosa, lo que permite afirmar que la calibración se basa, al menos en parte, en la glucosa.

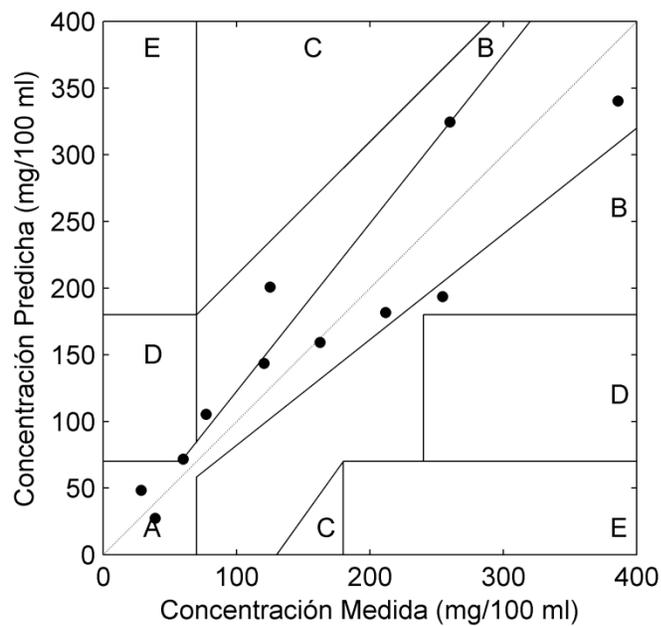


Figura 4.24: Datos de validación sobre el gráfico de error de Clarke.

4.4.2.2 Resultados con el método del filtrado en frecuencia

En la figura 4.25 se aprecian los resultados de la calibración PLS. El error RMSEP es de 1770.94 mg/100 ml. Nuevamente, el promedio del error máximo posible en las mediciones de referencia es de 67.67 mg/100 ml (ver tabla 4.3). Es decir, el método podría tener un error de alrededor de 1700 mg/100 ml, pero para afirmar ello se requiere de un nuevo experimento con métodos de referencia más precisos.

En la figura 4.26 se aprecia el vector de regresión del modelo. Si bien es bastante ruidoso, se observan con claridad las bandas Raman de la glucosa ubicadas entre los 400 y 600 cm^{-1} .

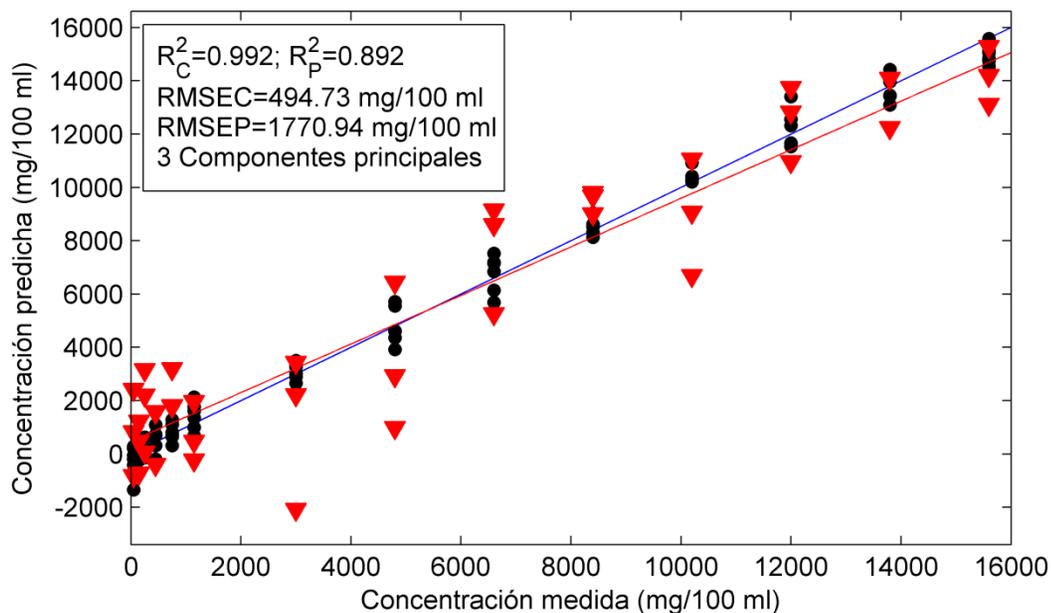


Figura 4.25: Calibración PLS obtenida a partir de los datos obtenidos con el método del filtrado en frecuencia.

En este caso no vale la pena usar el gráfico de error de Clarke ya que el nivel de error del modelo está por lejos sobre lo clínicamente aceptable. Además debido a la gran mejora en SNR que sería necesaria para poder utilizar este método es difícil hacer una predicción acerca del orden de incremento necesario.

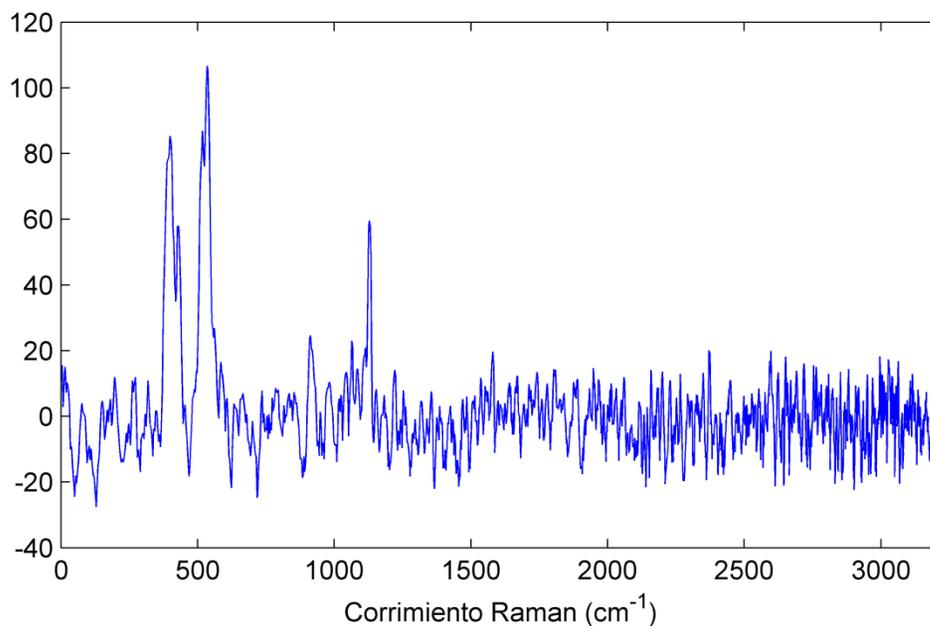


Figura 4.26: Vector de regresión del modelo PLS. Se observan claramente los peaks de la glucosa ubicados entre los 400 y 600 cm^{-1} lo que indica que la calibración se basa efectivamente en la glucosa.

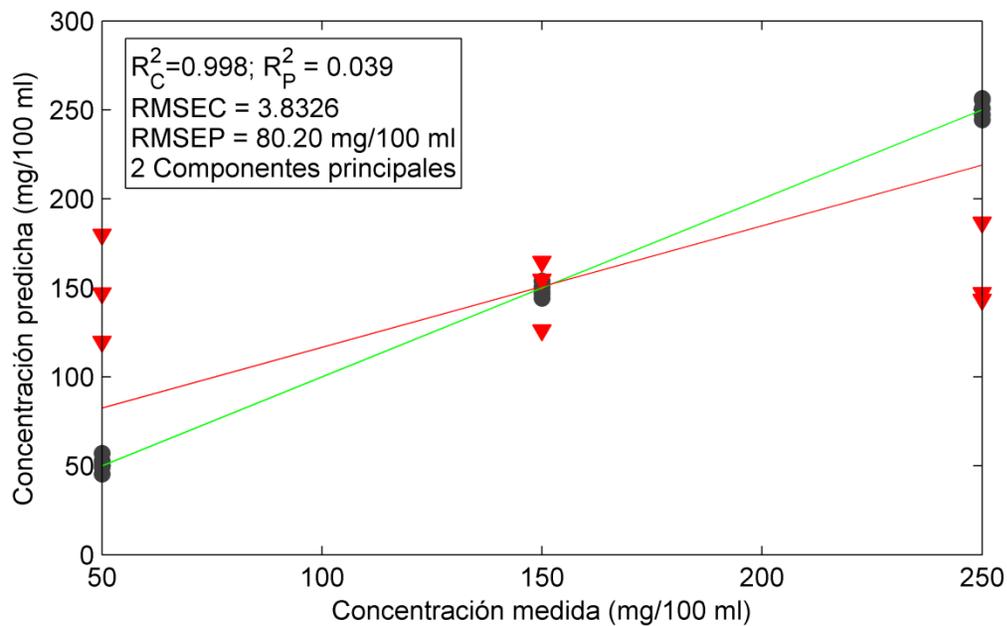


Figura 4.27: Calibración PLS obtenida a partir de los espectros de bajas concentraciones obtenidos con el método del filtrado en frecuencia.

Una calibración usando sólo las muestras con concentración <400 mg/100 ml se observa en la figura 4.27. En esta figura se comprueba que el modelo está sobreajustado y, además, no logra predecir las concentraciones de datos independientes ($R_p^2=0.039$). Esto se debe a que el SNR de los espectros producidos por el método de filtrado en frecuencia no es suficiente como para medir concentraciones tan pequeñas.

5. CONCLUSIONES

La concentración de glucosa de una solución acuosa puede ser medida efectivamente mediante la utilización de un espectrómetro portátil, como el MiniRam. La validación del modelo PLS calibrado en base a los datos procesados con el método del promedio, arrojó un R^2 de 0.999 con un RMSEP de 127.17 mg/100 ml cuando se usó el rango completo de concentraciones (50 a 15600 mg/100 ml) y un R^2 de 0.854 con un RMSEP de 41.16 mg/100 ml cuando se usaron sólo las muestras entre 0 y 400 mg/100 ml que es el rango de concentraciones encontrado habitualmente en la sangre. Un $R^2=0.999$ indica claramente que la técnica Raman es capaz de medir la concentración de glucosa de manera no invasiva. Además, picos correspondientes a las bandas Raman de la glucosa aparecen en los vectores de regresión de los modelos lo que sostiene que las predicciones efectivamente se basan en la glucosa. Sin embargo, de acuerdo a la Organización Internacional para la Estandarización (ISO), el 95% de las mediciones determinadas por un monitor de glucosa deben tener un error <15 mg/100 ml, cuando los niveles de glucosa son <75 mg/100 ml, o $<20\%$ cuando los niveles de glucosa son >75 mg/100 ml para poder ser utilizados por diabéticos (International Organization for Standardization, 2003). Esto y el uso del gráfico de error de Clarke demuestran que el nivel de error alcanzado por el método del promedio es todavía ligeramente superior al necesario para aplicaciones clínicas.

Los niveles de error de una calibración PLS escalan de manera aproximadamente lineal con el SNR de los espectros adquiridos (Berger & Feld, 1997). Considerando los niveles de error alcanzados por el método del promedio, se necesitaría una mejora de alrededor de 3 veces en el SNR de los espectros para alcanzar el rango de error clínicamente aceptado. Sin embargo, el SNR debe ser aumentado aún más si se pretende aplicar el método *in vivo*, pues debido a la piel, la fluorescencia de ciertos compuestos de la sangre y otras interferencias, el SNR de los espectros sería mucho menor que la de los adquiridos de una solución acuosa dentro de una cubeta como se hizo en esta tesis.

La calibración PLS basada en los datos procesados con el método de filtrado en frecuencia alcanzó un R^2 de 0.892 y un RMSEP de 1770.94 mg/100 ml, lo que es aproximadamente 14 veces peor que el método del promedio. Esto se debe, entre otras razones, a que el método detecta sólo la componente alterna, la que es menos intensa que la componente continua. Es decir, al detectar sólo la glucosa presente en la sangre se muestrea una menor cantidad de señal con un mismo nivel de ruido llevando a un error mayor. La mejora en el SNR para que el método del filtrado en frecuencia alcance niveles de error clínicamente aceptables midiendo la concentración de glucosa en una solución acuosa es difícil de estimar debido a su gran magnitud, pero se estima que debiera ser de alrededor de 40 veces. Sin embargo, para su aplicación *in vivo* este valor tendría que ser, lógicamente, aun mayor. Por esto, a no ser que se tenga un espectrómetro y una sonda con niveles SNR muy altos, la ventaja de detectar sólo la glucosa presente en la sangre a través del método de filtrado en frecuencia, se ve sobrepasada por el menor SNR de los espectros producidos.

Finalmente, este estudio demuestra que la espectroscopía Raman es una técnica promisoría para la medición *in vivo* e *in vitro* de concentraciones de glucosa si se logra mejorar el SNR de los espectros. Esta mejora puede ser lograda incrementando la potencia del láser, aumentando el área y ángulo sólido de colección (Tanaka et al., 1996), usando CCDs enfriados por nitrógeno líquido, etc. En (Koo, 2001), por ejemplo, logran incrementar en un factor 4 la SNR de un sistema que ya era de muy alto rendimiento, por lo que el margen de mejora para un equipamiento como el usado en esta tesis es inmenso. De hecho, una investigación del MIT (Enejder et al., 2005), midió los niveles de glucosa en seres humanos de manera *in vivo* utilizando un espectrómetro Raman de laboratorio con un alto SNR y utilizando el método del promedio logró obtener un error absoluto medio (MAE) para cada persona de $7.8\% \pm 1.8\%$ con un R^2 de 0.83 ± 0.10 , lo cual es clínicamente aceptable. Esto quiere decir que si la tecnología presente en estos sofisticados equipos de laboratorio logra ser incorporada en los equipos portátiles a un costo reducido, la medición *in vivo* portátil podría ser una realidad en un futuro cercano.

BIBLIOGRAFÍA

Allen, J., & Murray, A. (2003). Age-related changes in the characteristics of the photoplethysmographic pulse shape at various body sites. *Physiological Measurement*, 24(2), 297-307.

American Diabetes Association. *Checking your blood glucose*. Recuperado el 30 de diciembre de 2009, de <http://www.diabetes.org/living-with-diabetes/treatment-and-care/blood-glucose-control/checking-your-blood-glucose.html>

American Diabetes Association. (2002). Implications of the united kingdom prospective diabetes study. *Diabetes Care*, 25, S28-S32.

Asada, H., Shaltis, P., Reisner, A., Rhee, S., & Hutchinson, R. (2003). Mobile monitoring with wearable photoplethysmographic biosensors. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, 22(3), 28-40.

Barcelo, A., Aedo, C., Rajpathak, S., & Robles, S. (2003). The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean. *Bulletin of the World Health Organization*, 81(1), 19-27.

Berger, A., & Feld, M. (1997). Analytical method of estimating chemometric prediction error. *Applied Spectroscopy*, 51(5), 725-732.

Berger, A., Itzkan, I., & Feld, M. (1997). Feasibility of measuring blood glucose concentration by near-infrared raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 53(2), 287-292.

Berger, A., Koo, T., Itzkan, I., Horowitz, G., & Feld, M. (1999). Multicomponent blood analysis by near-infrared raman spectroscopy. *Applied Optics*, 38(13), 2916-2926.

Boyne, M., Silver, D., Kaplan, J., & Saudek, C. (2003). Timing of changes in interstitial and venous blood glucose measured with a continuous subcutaneous glucose sensor. *Diabetes*, 52(11), 2790-2794.

Cengiz, E., & Tamborlane, W. (2009). A tale of two compartments: Interstitial versus blood glucose monitoring. *Diabetes Technology Therapeutics*, 11, S11-S16.

Chaiken, J., Finney, W., Knudson, P., Weinstock, R., Khan, M., Bussjager, R., Hagrman, D., Hagrman, P., Zhao, Y., Peterson, C., & Peterson, K. (2005). Effect of hemoglobin concentration variation on the accuracy and precision of glucose analysis using tissue modulated, noninvasive, *in vivo* Raman spectroscopy of human blood: A small clinical study. *Journal of Biomedical Optics*, 10(3)

Chaiken, J., Peterson, K. P., Yang, X., Weinstock, R. S., Finney, W. F., Peterson, C. M., & Knudson, P. E. (2001). Noninvasive blood analysis by tissue modulated NIR Raman spectroscopy. *Proceedings of SPIE*, 4368, 134-145.

Chaiken, J., Piacente, L., Ellis, K., Voss, E., & Eslick, P. (2006). Noninvasive in vivo tissue and pulse modulated Raman spectroscopy of human capillary blood and plasma. *Proceedings of SPIE*, 6093, 609305.1-609305.11. doi:10.1117/12.659219

Chase, H. P., Beck, R., Tamborlane, W., Buckingham, B., Mauras, N., Tsalikian, E., Wysocki, T., Weinzimer, S., Kollman, C., Ruedy, K., & Xing, D. (2005). A randomized multicenter trial comparing the GlucoWatch biographer with standard glucose monitoring in children with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 28(5), 1101-1106.

Chen, C., Wang, K., Jan, M., Hsu, W., Li, S., Wang-Lin, Y., & Bau, J. (2008). Noninvasive blood glucose monitoring using the optical signal of pulsatile microcirculation: A pilot study in subjects with diabetes. *Journal of Diabetes and its Complications*, 22(6), 371-376.

Clarke, W., Cox, D., Gonder-Frederick, L., Carter, W., & Pohl, S. (1987). Evaluating clinical accuracy of systems for self-monitoring of blood glucose. *Diabetes Care*, 10(5), 622-628.

Cuevas, A., Molina, A., Rigotti, A., Miquel, J., Marshall, G., Reyes, S., & Nervi, F. (2008). Trends in obesity and diabetes prevalence in a Chilean urban population: 1993-2001. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 6(3), 219-222.

Davies, A., & Fearn, T. (2007). Back to basics: Removing multiplicative effects (1). *Spectroscopy Europe*, 19(4), 24-28.

Davies, A. M. C., & Fearn, T. (2007). Back to basics: The “final” calibration. *Spectroscopy Europe*, 19(6), 15-18.

Decter, M., Anis, A., Swallow, B., Estabrooks, C., Goldsand, G., Graham, J.,... Wallin, P. (2007). Consensus statement on self-monitoring in diabetes: Institute of Health Economics, Alberta, Canadá, Noviembre 14-16, 2006. *International Journal of Technology Assessment in Health Care*, 23(1), 146-151.

Enejder, A., Seccina, T., Oh, J., Hunter, M., Shih, W., Sasic, S., Horowitz, G., & Feld, M. (2005). Raman spectroscopy for noninvasive glucose measurements. *Journal of Biomedical Optics*, 10(3), 031114.1-031114.9.

Ferrante do Amaral, C. E., & Wolf, B. (2008). Current development in non-invasive glucose monitoring. *Medical Engineering & Physics*, 30(5), 541-549.

doi:10.1016/j.medengphy.2007.06.003

Geladi, P., & Kowalski, B. (1986). Partial least-squares regression: A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 185, 1-17.

Guyton, A., & Hall, J. (1997). *Human physiology and mechanisms of disease*.

Philadelphia, EE.UU.: Saunders.

Haaland, D., & Thomas, E. (1988). Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. *Analytical Chemistry*, 60(11), 1193-1202.

- Hanlon, E., Manoharan, R., Koo, T., Shafer, K., Motz, J., Fitzmaurice, M., Kramer, J., Itzkan, I., Dasari, R., & Feld, M. (2000). Prospects for *in vivo* Raman spectroscopy. *Physics in Medicine Biology*, 45(2), R1-R59.
- Henderson, A. R., & Schulmeister, K. (2004). *Laser safety*. New York, EE.UU.: Taylor & Francis.
- Hlimonenko, I., Meigas, K., & Vahisalu, R. (2003). Waveform analysis of peripheral pulse wave detected in the fingertip with photoplethysmograph. *Measurement Science Review*, 3(2), 49-52.
- International Organization for Standardization. (2003). *In vitro diagnostic test systems - requirements for blood-glucose monitoring systems for self-testing in managing diabetes mellitus*. (No. de publicación ISO 15197)
- Kanger, J., de Mul, F. F. M., & Otto, C. (1999). Non-invasive detection of glucose using raman spectroscopy. *Proceedings of SPIE*, 3570, 123-129.
- Koo, T. (2001). *Measurement of blood analytes in turbid biological tissue using near-infrared raman spectroscopy*. Tesis doctoral no publicada, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, EE.UU.
- Kulcu, E., Tamada, J. A., Reach, G., Potts, R. O., & Lesho, M. J. (2003). Physiological differences between interstitial glucose and blood glucose measured in human subjects. *Diabetes Care*, 26(8), 2405-2409.

- Lambert, J., Morookian, J., Sirk, S., & Borchert, M. (2002). Measurement of aqueous glucose in a model anterior chamber using raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 33(7), 524-529.
- Malchoff, C. D., Shoukri, K., Landau, J. I., & Buchert, J. M. (2002). A novel noninvasive blood glucose monitor. *Diabetes Care*, 25(12), 2268-2275.
- McCreery, R. (2000). *Raman spectroscopy for chemical analysis*. Hoboken, NJ, EE.UU.: John Wiley Sons, Inc.
- McNichols, R., & Cote, G. (2000). Optical glucose sensing in biological fluids: An overview. *Journal of Biomedical Optics*, 5(1), 5-16.
- Motz, J. (2003). *Development of in vivo raman spectroscopy of atherosclerosis*
- Næs, T. (2002). *A user-friendly guide to multivariate calibration and classification*. Chichester, Reino Unido: NIR Publications.
- Oh, J. (2004). *Transcutaneous measurement of glucose using raman spectroscopy*. Tesis de maestría no publicada, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, EE.UU.
- Organización Mundial de la Salud. (2008). *Diabetes*. Recuperado el 28 de octubre de 2009, 2009, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>
- Pitzer, K., Desai, S., Dunn, T., Edelman, S., Jayalakshmi, Y., Kennedy, J., Tamada, J., & Potts, R. (2001). Detection of hypoglycemia with the GlucoWatch biographer. *Diabetes Care*, 24(5), 881-885.

Poddar, R., Andrews, J. T., Shukla, P., & Sen, P. (2008). *Non-invasive glucose monitoring techniques: A review and current trends* Recuperado de arXiv:

http://arxiv.org/PS_cache/arxiv/pdf/0810/0810.5755v1.pdf

Organización Mundial de la Salud. (s.f.). *Prevalence of diabetes in the WHO region of the americas*. Recuperado el 20 de octubre de 2009, de

http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/index3.html

Ren, M., & Arnold, M. (2007). Comparison of multivariate calibration models for glucose, urea, and lactate from near-infrared and raman spectra. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(3), 879-888.

Roe, J. N., & Smoller, B. R. (1998). Bloodless glucose measurements. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 15(3), 199-241.

Sherebrin, M., & Sherebrin, R. (1990). Frequency-analysis of the peripheral pulse-wave detected in the finger with a photoplethysmograph. *IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering*, 37(3), 313-317.

Shih, W. (2007). *Quantitative biological raman spectroscopy for non-invasive blood analysis*. Tesis doctoral no publicada, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, EE.UU.

Soni, A., Rao, S. V., Bajaj, R., & Treser, G. (1990). Extreme hyperglycemia and hyperosmolarity. *Diabetes Care*, 13(2), 181-182.

Sorensen, J. T., Colton, C. K., Hillman, R. S., & Soeldner, J. S. (1982). Use of a physiologic pharmacokinetic model of glucose homeostasis for assessment of performance requirements for improved insulin therapies. *Diabetes Care*, 5(3), 148-157.

Stout, P. J., Peled, N., Erickson, B. J., Hilgers, M. E., Racchini, J. R., & Hoegh, T. B. (2001). Comparison of glucose levels in dermal interstitial fluid and finger capillary blood. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 3(1), 81-90.

Stout, P., Racchini, J., Hilgers, M., & Noujaim, S. (2006). Continuous glucose monitoring: Key challenges to replacing episodic SMBG. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 74, S97-S100.

Tanaka, K., Pacheco, M., Brennan, J., Itzkan, I., Berger, A., Dasari, R., & Feld, M. (1996). Compound parabolic concentrator probe for efficient light collection in spectroscopy of biological tissue. *Applied Optics*, 35(4), 758-763.

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. (1993). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*, 329(14), 977-986.

Tura, A., Maran, A., & Pacini, G. (2007). Non-invasive glucose monitoring: Assessment of technologies and devices according to quantitative criteria. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 77(1), 16-40.

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. (1998). Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*, 352(9131), 837-853.

Vilaboy, M., Greene, R., Ergin, A., Thomas, G., & Tchouassi, A. (2003). Optical measurement of glucose concentrations using raman spectroscopy. *Proceedings of the 2003 IEEE 29th Annual Bioengineering Conference*, 329-330

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., & King, H. (2004). Global prevalence of diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27(5), 1047-1053.

Yamakoshi, K., & Yamakoshi, Y. (2006). Pulse glucometry: A new approach for noninvasive blood glucose measurement using instantaneous differential near-infrared spectrophotometry. *Journal of Biomedical Optics*, 11(5), 1-11.