



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA ELÉCTRICA

SECCIÓN DE BIOELECTRÓNICA

**“Instrumentos desarrollados en la búsqueda de un  
sistema para la medición no invasiva de la  
concentración de glucosa en sangre”**

T E S I S

Que presenta

EMMANUEL DANIEL ORTEGA ROBLES

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE  
INGENIERÍA ELÉCTRICA

Director de la Tesis:

Dr. David Elías Viñas



## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, que me brindó el sostén económico durante la realización de este proyecto.

Al Dr. David Elías Viñas por su amistad, sus consejos, su guía y haberme dado la oportunidad de formar parte de su laboratorio, que es ahora como una segunda familia.

A mi esposa Itzel por su amor, comprensión y paciencia sin los cuales no hubiera podido lograr este objetivo.

A mi familia, que siempre han estado a mi lado y me han brindado su apoyo y cariño incondicionales.

A la Dra. María del Carmen Robles Ramírez por ser la mejor madre y por su ayuda con las determinaciones bioquímicas.

Al Dr. Alfredo Cruz Orea por compartir sus conocimientos en el área de fotoacústica y apoyarme en la realización del artículo.

A mis compañeros de laboratorio y en general a mis amigos de la sección por su amistad y consejos.

A los doctores de la Sección de Bioelectrónica y todo el personal académico, por compartir sus conocimientos y haber formado parte de mi formación profesional.

A todo el personal técnico y administrativo de la sección que con su labor nos facilitan el desarrollo de nuestro trabajo.



## Contenido

Índice de Figuras .....	4
Índice de Tablas .....	6
Resumen .....	7
Abstract.....	9
1. Introducción .....	11
1.1. Diabetes mellitus .....	11
1.1.1. Epidemiología .....	11
1.1.2. Clasificación .....	13
1.1.3. Tratamiento .....	14
2. Planteamiento del problema .....	16
3. Antecedentes y estado del arte.....	18
3.1. Métodos invasivos .....	19
3.2. Métodos mínimamente invasivos.....	21
3.3. Métodos no invasivos .....	22
3.3.1. Espectroscopía de absorción .....	22
3.3.2. Espectroscopía Raman .....	25
3.3.3. Espectroscopía de emisión térmica .....	26
3.3.4. Espectroscopía fotoacústica .....	27
3.3.5. Espectroscopía de fluorescencia .....	28
3.3.6. Tomografía de coherencia óptica .....	29
3.3.7. Polarimetría .....	29
3.3.8. Ultrasonoforesis .....	30
3.3.9. Iontoforesis inversa .....	31
3.3.10. Espectroscopía de impedancia eléctrica.....	32
3.3.11. Espectroscopía de impedancia de radiofrecuencias.....	33
3.3.12. Correlación con el calor metabólico .....	34
3.3.13. Medición en otros fluidos .....	34
3.4. Dispositivos comerciales .....	35
4. Objetivo.....	38
5. Técnicas aplicadas para la medición de glucosa de forma no invasiva .....	39
5.1. Espectroscopía de fluorescencia .....	40
5.1.1. Fuente de luz ultravioleta .....	41
5.1.2. Luxómetro ultravioleta.....	42



5.1.3.	Espectrómetro óptico UV-VIS.....	42
5.1.4.	Pruebas realizadas (espectroscopía de fluorescencia).....	54
5.2.	Espectroscopía del infrarrojo cercano (NIR).....	55
5.2.1.	Espectrómetro óptico NIR.....	56
5.2.2.	Pruebas realizadas (espectroscopía NIR).....	57
5.3.	Espectroscopía de impedancia de radiofrecuencias (RF).....	58
5.3.1.	Sistema para pruebas de espectroscopía de impedancia de RF.....	60
5.3.2.	Pruebas realizadas (espectroscopía de impedancia de RF).....	64
5.4.	Espectroscopía de impedancia eléctrica.....	66
5.4.1.	Espectrómetro de impedancia eléctrica.....	68
5.4.2.	Pruebas realizadas (espectroscopía de impedancia eléctrica).....	80
5.5.	Calor metabólico.....	82
5.5.1.	Oximetría de pulso.....	83
5.5.2.	Oxímetro de pulso.....	88
5.5.3.	Pruebas realizadas con el oxímetro de pulso.....	90
5.6.	Espectroscopía fotoacústica.....	91
5.6.1.	Espectroscopía fotoacústica pulsada.....	91
5.6.2.	Láser pulsado.....	93
5.6.3.	Fuente de alimentación.....	99
5.6.4.	Luxómetro infrarrojo.....	99
5.6.5.	Transductor ultrasónico.....	100
5.6.6.	Pruebas realizadas con espectroscopía fotoacústica pulsada.....	102
5.6.7.	El efecto fotoacústico con luz modulada.....	103
5.6.8.	Amplificador lock-in.....	105
5.6.9.	Pruebas realizadas con espectroscopía fotoacústica con luz modulada.....	117
6.	Utilización del equipo desarrollado para la medición de pigmentos en tomates.....	120
6.1.	Medición de clorofila A, clorofila B, carotenoides y humedad en tomates.....	120
7.	Discusión y trabajo a futuro.....	134
8.	Conclusiones.....	137
9.	Referencias.....	138
Apéndice A:	Diagrama eléctrico del espectrómetro óptico.....	148
Apéndice B:	Diagrama eléctrico del espectrómetro de impedancia.....	149
Apéndice C:	Diagrama eléctrico del oxímetro de pulso.....	150
Apéndice D:	Diagrama eléctrico del amplificador lock-in.....	151



## Índice de Figuras

Fig. 1: Panorama de las posibles técnicas y áreas de investigación para la medición <i>in vivo</i> de la glucemia. ....	18
Fig. 2: Uso de un glucómetro común. ....	20
Fig. 3: Monitoreo continuo de glucosa. ....	20
Fig. 4: Microporos creados sobre la piel por ablación láser. ....	21
Fig. 5: Microagujas para extraer fluido intersticial en la determinación de glucosa. ....	22
Fig. 6: Interacción entre la luz y la piel. ....	23
Fig. 7: Penetración de la radiación infrarroja en la piel. ....	24
Fig. 8: El efecto fotoacústico. ....	27
Fig. 9: Mecanismo de la iontoforesis inversa. ....	31
Fig. 10: Variables involucradas en la determinación de glucosa por calor metabólico. .	34
Fig. 11: Penetración de la radiación ultravioleta en la piel. ....	41
Fig. 12: Circuito de instrumentación del sensor ultravioleta ML8511. ....	42
Fig. 13: Diagrama de la óptica de un espectrómetro de difracción: a) con lentes y b) con espejos. ....	45
Fig. 14: Versión simplificada del espectrómetro de difracción con lentes. ....	46
Fig. 15: Montaje del espectrómetro. ....	47
Fig. 16: Atenuación en fibras ópticas de PMMA. ....	47
Fig. 17: Detector ILX511. ....	48
Fig. 18: Curva de sensibilidad del sensor ILX511 en los espectros UV (izquierda) y VIS-NIR (derecha). ....	48
Fig. 19: Interfaz de usuario del espectrómetro óptico. ....	49
Fig. 20: Esquema del espectrómetro usado para su ajuste. ....	50
Fig. 21: Resultado del programa que grafica los órdenes de difracción. ....	51
Fig. 22: Arriba: espectro de emisión típico de una lámpara HPS, tomado como referencia. Abajo: espectro adquirido de una lámpara HPS para calibrar el espectrómetro. ....	52
Fig. 23: Izquierda: espectro de emisión típico de una lámpara CFL. Derecha: espectro de emisión del mismo tipo de lámpara, registrado con el espectrómetro ya calibrado. .	53
Fig. 24: Espectro de emisión medido de una lámpara de vapor de mercurio de alta presión. ....	53
Fig. 25: Posicionamiento del LED-UV y la fibra óptica sobre la piel. ....	54
Fig. 26: Diseño óptico con el programa Zemax OpticStudio 2009. ....	58
Fig. 27: Modelo de antena en espiral circular y su respuesta en frecuencia. ....	61
Fig. 28: Modelo de antena en espiral rectangular y su respuesta en frecuencia. ....	62
Fig. 29: Programa realizado para controlar y adquirir los datos del analizador de espectro. ....	64
Fig. 30: Respuesta en frecuencia a lo largo del tiempo de registro de una de las sesiones del experimento. ....	65
Fig. 31: Respuesta de la antena a 507 MHz durante el tiempo de registro. La flecha indica el momento de la ingesta de la bebida glucosada. ....	66
Fig. 32: Intervalos de frecuencia de las dispersiones dieléctricas en los materiales biológicos. ....	67



Fig. 33: Configuración de los electrodos usados en la espectroscopía de impedancia: a) con dos electrodos; b) con tres electrodos; y c) con 4 electrodos.....	70
Fig. 34. Distintas configuraciones ensayadas para la fuente de corriente.....	71
Fig. 35. Circuito usado para la fuente de corriente.....	72
Fig. 36. Circuito generador de la señal de barrido en frecuencia.....	73
Fig. 37. Circuito de medición de la caída de tensión en la impedancia desconocida y amplificación.....	74
Fig. 38. Rectificador de precisión de onda completa usado en la medición de la magnitud de la señal.....	75
Fig. 39. Circuito para la medición de la fase de la señal.....	76
Fig. 40. Filtro pasa-bajas ajustable.....	76
Fig. 41. Circuito de conversión de voltajes para la alimentación del sistema.....	77
Fig. 42. Interfaz gráfica del espectrómetro de impedancia eléctrica.....	78
Fig. 43. Modelo teórico del circuito RCL usado.....	79
Fig. 44. Pruebas realizadas al dispositivo con circuitos RCL de impedancia conocida. De arriba hacia abajo y de izquierda a derecha: resistencia pura, circuito R  C, circuito R  L y circuito R  C  L.....	79
Fig. 45: Colocación de los electrodos en el antebrazo.....	80
Fig. 46: Magnitud de la impedancia eléctrica del tejido durante el tiempo de registro de una de las sesiones del experimento.....	81
Fig. 47: Magnitud de la impedancia eléctrica del tejido a 10 kHz. La flecha indica el momento de la ingesta de la bebida glucosada.....	82
Fig. 48. Espectro de absorción de la hemoglobina.....	83
Fig. 49. Disposición de los LEDs y el fotodiodo para la medición.....	85
Fig. 50. Transmisión de la luz a través del tejido.....	86
Fig. 51. Relación empírica entre la saturación de oxígeno (SPO <sub>2</sub> ) y la razón normalizada ( $I_R/I_{IR}$ ).....	87
Fig. 52. Diagrama a bloques de los circuitos de acondicionamiento internos del AFE4400.....	89
Fig. 53. Ventana de la interfaz de usuario del oxímetro de pulso.....	90
Fig. 54: Espectro de absorción del agua.....	95
Fig. 55: Pulso de voltaje medido en la resistencia de 0.05Ω.....	98
Fig. 56: Circuito controlador del láser pulsado SPL-PL90_3.....	98
Fig. 57: Circuito de la fuente de alimentación variable (0 – 150 V).....	99
Fig. 58: Circuito de instrumentación del fotodiodo Osram SFH213-FA.....	100
Fig. 59: Magnitud de la impedancia en los transductores PZT conectados en paralelo.....	101
Fig. 60: Circuito preamplificador del transductor ultrasónico PZT.....	101
Fig. 61: Respuesta del transductor ultrasónico al ser excitado con un monitor Doppler fetal de 2 MHz.....	102
Fig. 62. Diagrama de una celda fotoacústica.....	104
Fig. 63. Diagrama a boques del amplificador lock-in.....	106
Fig. 64. Ventana de la interfaz gráfica del amplificador lock-in.....	112
Fig. 65. Arreglo experimental para determinar la constante de tiempo del micrófono.....	113
Fig. 66. Izquierda: Señal de la celda fotoacústica medida con el lock-in. Derecha: Mejor ajuste a la ec. (29).....	114
Fig. 67. Arreglo experimental para determinar la difusividad del vidrio.....	114



Fig. 68. Señal de la celda fotoacústica en la medición de la difusividad térmica del vidrio. ....	116
Fig. 69: Respuesta en frecuencia del amplificador lock-in. ....	117
Fig. 70: Cámaras fotoacústicas construidas para mediciones sobre la piel. ....	118
Fig. 71: Espectros de absorción de la clorofila A, clorofila B y carotenoides totales [130]. Las líneas rojas marcan los picos de emisión de los LEDs seleccionados para la medición. ....	122
Fig. 72: Cámara fotoacústica para la medición sobre tomates. ....	123
Fig. 73: Respuesta fotoacústica del carbón al ser irradiado por cada uno de los seis LEDs. ....	124
Fig. 74: Electrodo usado para la medición de la impedancia eléctrica en tomates. .	124
Fig. 75: Tomates utilizados en el experimento. ....	125
Fig. 76: Montaje experimental de los tomates. ....	125
Fig. 77: Mejor ajuste del logaritmo de la señal fotoacústica medida en un tomate contra el logaritmo de la frecuencia angular. ....	127
Fig. 78: Mejor ajuste del logaritmo de la señal fotoacústica medida sobre carbón vegetal contra el logaritmo de la frecuencia angular. ....	129
Fig. 79: Mejor ajuste del logaritmo del cociente $ Q_s/Q_c $ contra el logaritmo de la frecuencia angular. ....	130
Fig. 80: Concentraciones de los pigmentos medidas con el método tradicional y el método propuesto. ....	132
Fig. 81: Contenido de agua medido con el método tradicional y el método propuesto. ....	133

## Índice de Tablas

Tabla 1: Dispositivos desarrollados para la medición no invasiva de la glucemia. ....	35
Tabla 2: Métodos elegidos para la determinación no invasiva de la glucemia y dispositivos necesarios para su implementación. ....	39
Tabla 3: Características del diodo emisor UVLED340-TF. ....	41
Tabla 4: Espectrómetros comerciales de gama baja en el rango visible. ....	43
Tabla 5. Comparación entre oxímetros de pulso comerciales. ....	87
Tabla 6: Láseres y transductores ultrasónicos usados en distintas investigaciones. ....	93
Tabla 7: Características del diodo láser pulsado Osram SPL-PL90_3. ....	95
Tabla 8: Características del fotodiodo Osram SFH213-FA. ....	99
Tabla 9. Características de algunos amplificadores lock-in comerciales. ....	108
Tabla 10. Características de algunos amplificadores lock-in desarrollados por investigadores. ....	108
Tabla 11: Propiedades térmicas del epicarpio del tomate. ....	126
Tabla 12: Propiedades térmicas del carbón vegetal. ....	128
Tabla 13: Concentración de pigmentos en el tomate (método espectrofotométrico convencional). ....	131
Tabla 14: Concentración de pigmentos en el tomate (método fotoacústico propuesto). ....	132



## Resumen

La *diabetes mellitus* es una enfermedad producida por una alteración del metabolismo que se caracteriza por un incremento anormal de la cantidad de glucosa en la sangre. Este aumento desencadena una serie de complicaciones micro y macrovasculares que provocan daños en varios órganos como los riñones, los ojos, corazón y nervios periféricos, aumentando la mortalidad asociada con la enfermedad y reduciendo la calidad de vida de las personas que la padecen.

El tratamiento actual de este padecimiento requiere la medición constante de los niveles de glucosa en sangre. La mayoría de los métodos convencionales para tal fin, involucran la extracción de gotas de sangre para su análisis químico, lo que hace a estos procedimientos invasivos, provocando dolor y daños en la piel, que se acrecientan cuando se realizan repetidamente.

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo inicial encontrar una alternativa no invasiva para el monitoreo de la concentración de glucosa en sangre con la finalidad de facilitar el cuidado de la salud de los pacientes diabéticos sin causarles mayores molestias.

Existen diversos métodos en la literatura ideados para extraer información de la concentración de glucosa sérica de forma no invasiva. A la par, se han desarrollado diversos dispositivos que utilizan estas técnicas para intentar obtener la glicemia sin la necesidad de penetrar ningún tejido. Sin embargo, a la fecha ninguno ha dado resultados suficientemente precisos como para poder reemplazar al glucómetro convencional. La mayoría de estos dispositivos utilizan un único paradigma de medición, por lo que se tuvo la hipótesis de que al aplicar dos o más de estas técnicas simultáneamente, se podría disminuir el error en la determinación.

Con esto en mente, se seleccionaron algunos de los métodos de medición que se consideraron técnicamente factibles de reproducir y se diseñaron diversos dispositivos





con la capacidad de medir los parámetros físicos en el tejido necesarios para este fin. Una vez construidos y probados estos instrumentos, se aplicaron en distintos sitios de la piel, de acuerdo a la técnica, para intentar extraer información que pudiera ser correlacionada con la concentración de glucosa en la sangre.

Sin embargo, después de realizar distintas pruebas con los instrumentos desarrollados, se concluyó que no iba a ser posible obtener información útil para la determinación de la glicemia con ninguno de los métodos seleccionados, y dado que las demás técnicas requerían de equipo aun más sofisticado, se optó por utilizar los dispositivos que ya se tenían para un propósito similar.

Este nuevo objetivo fue el de medir la concentración de pigmentos relacionados con la maduración en tomates rojos (clorofilas A, B y carotenoides), así como su contenido de humedad de una forma no destructiva y más rápida que la utilizada comúnmente, consiguiendo buenos resultados en las primeras pruebas.



## Abstract

*Diabetes mellitus* is a disease caused by an alteration of the metabolism that characterizes by an abnormal increase in the amount of glucose in the blood. This increase triggers a series of micro and macrovascular complications that may cause damage to organs such as the kidneys, eyes, heart and peripheral nerves, increasing the mortality associated with the illness and reducing the quality of life of people who suffer from it.

Current treatment of this condition requires the constant measurement of blood glucose levels. Most conventional methods for this purpose involve the extraction of blood droplets for its chemical analysis, which makes these procedures invasive, causing pain and damage to the skin when they are performed frequently.

The early intention of this research was to find a non-invasive alternative for the blood glucose concentration monitoring in order to facilitate health care of diabetic patients without causing them greater discomfort.

There are several methods in the literature designed to extract information on serum glucose concentration in a non-invasive manner. At the same time, several devices have been developed which use these techniques to try to obtain the glycemia without needing to penetrate any tissue. However, to date none has given precise enough results to be able to replace the conventional glucometer. Most of these devices use a single measurement paradigm, so it was hypothesized that by applying two or more of these techniques simultaneously, the error in the determination could be reduced.

With this in mind, we selected some of the measurement methods that were considered technically feasible to reproduce and designed various devices with the ability to measure the physical parameters of the tissue needed for this purpose. Once these instruments were constructed and tested, they were applied in different skin sites,



according to the technique, to try to extract information that could be correlated with the concentration of glucose in the blood.

However, after performing different experiments with the developed instruments, it was concluded that it would not be feasible to obtain useful information for the determination of glycemia with any of the selected methods, and given that the other techniques required even more sophisticated equipment, we chose to use the devices that we already had for a similar purpose.

This new aim was to measure the concentration of pigments related to ripening in tomatoes (chlorophylls A, B and carotenoids), as well as their moisture content in a non-destructive and faster way than commonly used, achieving good results in the first tests.



## 1. Introducción

### 1.1. Diabetes mellitus

La *diabetes mellitus* (DM) agrupa una serie de trastornos metabólicos que se caracterizan por originar un aumento en la concentración de glucosa en la sangre o hiperglucemia. Su origen se atribuye tanto a factores genéticos como ambientales. Dependiendo del tipo de DM, la hiperglucemia puede deberse a la deficiencia en la secreción de insulina (secretada por las células  $\beta$  de los Islotes de Langerhans del páncreas), el decremento del consumo de glucosa o el aumento de la producción de ésta. Estas situaciones repercuten también en el metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos, proteínas y electrolitos, lo que provoca diversas complicaciones que dañan frecuentemente a ojos, riñones, nervios y vasos sanguíneos. Las complicaciones agudas (hipoglucemia, cetoacidosis, coma hiperosmolar no cetósico) son consecuencia de un control inadecuado de la enfermedad mientras que las complicaciones crónicas (cardiovasculares, nefropatías, retinopatías, neuropatías y daños microvasculares) son consecuencia del progreso de la enfermedad y suponen una pesada carga tanto para el individuo que padece la enfermedad, como para sus cuidadores y el sistema de salud.

Los síntomas principales de la diabetes mellitus son: emisión excesiva de orina (poliuria), aumento anormal de la necesidad de comer (polifagia), incremento de la sed (polidipsia), y pérdida de peso sin razón aparente. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce tres formas de DM: tipo 1, tipo 2 y diabetes gestacional (ocurre durante el embarazo), cada una con diferentes causas y con distinta incidencia [1].

#### 1.1.1. Epidemiología

Estimaciones de la Organización Mundial de la Salud indican que la diabetes afecta actualmente a más de 347 millones de personas en el mundo y se espera que alcance los 438 millones en 2030.



En Estados Unidos, la DM es la primera causa de nefropatía en etapa terminal, de amputaciones no traumáticas de extremidades inferiores y de ceguera en adultos. También predispone a enfermedades cardiovasculares. Dado que está aumentando su incidencia en todo el mundo, la DM será una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad en el futuro próximo.

De conformidad con la información de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2016, 6.46 millones de mexicanos (9.4%) han sido diagnosticados con diabetes: 2.69 millones son hombres y 3.77 millones son mujeres.

La diabetes mellitus es un factor de riesgo cardiovascular; se estima que entre 7 y 8 de cada 10 personas con diabetes padecen problemas macrovasculares, como cardiopatía isquémica (pérdida de equilibrio entre el aporte de oxígeno al miocardio y la demanda de este tejido), insuficiencia cardiaca (el corazón ya no puede bombear suficiente sangre al resto del cuerpo), la enfermedad vascular cerebral (interrupción del suministro de la sangre que llega al cerebro) y la insuficiencia arterial periférica (bloqueo u obstrucción de las arterias).

La prevalencia de los tipos 1 y 2 de diabetes aumenta a nivel mundial, pero la del tipo 2 lo hace con rapidez mucho mayor, por el incremento en la frecuencia de obesidad y la disminución de los niveles de actividad física; el 90 por ciento de las personas que padecen diabetes presentan el tipo 2 de la enfermedad.

El Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) indica que la diabetes representa un gasto anual de 778 millones 427 mil 475 dólares, de los cuales 343 millones 226 mil 541 corresponden a costos directos y 435 millones 200 mil 934 a costos indirectos. Por cada 100 pesos que se invierten respecto a la diabetes en México, 51 provienen del paciente.

En el Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), durante 2004, la diabetes fue la quinta causa de estancia hospitalaria



equivalente a un costo de 219 millones de pesos; además invirtió 40 millones de pesos en medicamentos y estudios, 200 millones por hemodiálisis (método para eliminar de la sangre residuos como potasio y urea, así como agua en exceso cuando los riñones son incapaces de realizar su funcionamiento normal), y otorgó casi 205 mil días de incapacidad.

En 2004 el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) destinó aproximadamente 15 mil pesos para la atención de cada uno de sus derechohabientes con diabetes.

De cada 100 personas con diabetes 14 presentan nefropatía (daño en riñón), 10 desarrollan neuropatía (daño en sistema nervioso), 10 sufren de pie diabético (una de cada 3 termina en amputación) y 5 padecen ceguera. El paciente con diabetes tiene tres veces más riesgo de cardiopatía o enfermedad cerebrovascular además de presentar trastorno depresivo y cambios de personalidad [2,3,4].

### 1.1.2. Clasificación

Actualmente existen dos clasificaciones principales. La primera, correspondiente a la OMS [5], en la que sólo se reconocen tres tipos de diabetes (tipo 1, tipo 2 y gestacional) y la segunda, propuesta por la Asociación Americana de Diabetes (ADA) en 1997. Según el Comité de expertos de la ADA, los diferentes tipos de DM se clasifican en 4 grupos [6]:

Diabetes mellitus tipo 1 (DM-1): Este tipo de diabetes corresponde a la antiguamente llamada *diabetes insulino-dependiente* o *diabetes de comienzo juvenil*. Se presenta principalmente en jóvenes y en adultos también pero con menos frecuencia. No se observa producción de insulina debido a la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  de los Islotes de Langerhans del páncreas regulado por células T. El diagnóstico de este tipo de diabetes se detecta alrededor de los 25 años de edad, y afecta a cerca de 4.9 millones de personas en todo el mundo.



Diabetes mellitus tipo 2 (DM-2): Es un complejo mecanismo fisiológico en donde el cuerpo sí produce insulina pero, o bien no produce suficiente, o no puede aprovechar la que produce y la glucosa no está bien distribuida en el organismo (resistencia a la insulina). Esto quiere decir que los receptores de insulina de las células que se encargan de facilitar la entrada de la glucosa a la propia célula están dañados. Se observa en adultos, y se relaciona con la obesidad por lo que anteriormente era llamada *diabetes del adulto*.

Diabetes mellitus gestacional o gravídica (GDM): Durante el embarazo se puede desarrollar y descubrir por primera vez intolerancia a la glucosa. La resistencia a la insulina relacionada con las alteraciones metabólicas del final del embarazo aumenta las necesidades de insulina y puede provocar hiperglucemia o intolerancia a la glucosa. La diabetes mellitus gravídica se presenta en alrededor de 4% de los embarazos en Estados Unidos; la mayoría de las mujeres recuperan una tolerancia a la glucosa normal después del parto, pero tienen un riesgo sustancial (30 a 60%) de padecer diabetes en etapas posteriores de la vida.

Otros tipos específicos: Como los causados por defectos genéticos en la función de las células beta, defectos genéticos en la acción de insulina, enfermedad del páncreas exocrino (fibrosis quística) o inducida por sustancias químicas o medicamentos (por tratamiento de VIH/SIDA o después de trasplante de órgano). Éstos se presentan en menos del 6% de todos los casos diagnosticados.

### **1.1.3. Tratamiento**

Los objetivos del tratamiento de la DM de tipo 1 o 2 son: 1) eliminar los síntomas relacionados con la hiperglucemia, 2) reducir o eliminar las complicaciones de microangiopatía o macroangiopatía a largo plazo y 3) permitir al paciente un modo de vida tan normal como sea posible. Para lograr estos objetivos, el médico debe identificar una meta de control glucémico en cada paciente, dar a éste los recursos de educación y fármacos para lograr este nivel, y vigilar y tratar las complicaciones relacionadas con



la DM. Los síntomas de la diabetes suelen resolverse cuando la glucosa plasmática es menor a 200 mg/dl, y por tanto la mayor parte del tratamiento de la enfermedad se centra en lograr el segundo y tercer objetivos.

En la diabetes tipo 1 y en la diabetes gestacional se aplica un tratamiento sustitutivo de insulina o análogos de la insulina. En la diabetes tipo 2 puede aplicarse un tratamiento sustitutivo de insulina, o bien, un tratamiento con antidiabéticos orales. En ambos casos, mantener una dieta sana es una de las mejores maneras en que se puede tratar la diabetes. Se debe cuidar la cantidad de carbohidratos que son ingeridos durante el día, adaptándola a las necesidades del organismo y evitando los alimentos con índice glucémico alto.





## 2. Planteamiento del problema

Mantener las concentraciones de glucosa en sangre lo más cercanas posible de la normalidad se asocia a un riesgo menor de padecer complicaciones micro y macrovasculares secundarias causadas por la diabetes mellitus. Esto se ha demostrado tanto para la diabetes tipo 1 como para la tipo 2 en diferentes estudios prospectivos, como el Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) y el United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS). Recientemente, la American Diabetes Association (ADA) ha publicado sus recomendaciones para el tratamiento de la diabetes en función de los resultados de estos trabajos, y considera que las concentraciones de hemoglobina glucosilada (HbA1c) deben estar por debajo del 7%, precisando intervención terapéutica una HbA1c superior al 8%. Estos objetivos de control generalmente sólo se alcanzan con regímenes de tratamiento insulínico intensivo. Las dosis múltiples de insulina han demostrado ser la terapia insulínica más eficaz en el control glucémico del paciente con DM1, no tan claramente en el del paciente con DM2, ya que permiten adaptar el tratamiento insulínico a la vida diaria del paciente. Sin embargo, el tratamiento intensivo no tiene sentido sin la auto-monitorización diaria de glucemia capilar. La ADA recomienda realizar de 3 a 4 determinaciones diarias de glucemia capilar a los sujetos con DM1 y una determinación diaria a los que padecen DM2 en tratamiento con insulina o hipoglucemiantes orales [7].

A pesar de la auto-monitorización diaria frecuente y de las modificaciones en el tratamiento según la misma, no siempre es fácil conseguir un control óptimo de la diabetes, sobre todo evitando la aparición de hipoglucemias frecuentes. Evidentemente, la auto-monitorización de glucemia capilar no puede ser un reflejo exacto del perfil completo de glucemia de un paciente las 24 horas del día. En la práctica clínica diaria es frecuente que nos encontremos con determinaciones de HbA1c en clara discrepancia con los valores de glucemia capilar que nos muestra el paciente. Los períodos situados entre una y otra determinación capilar de glucemia pueden ocultarnos situaciones de hiperglucemia marcada o, en algunos casos, de hipoglucemia asintomática. De forma adicional, el período nocturno es un período que podríamos



denominar *oscuro*. Por razones obvias, no se puede recomendar a todo paciente diabético la realización sistemática de determinaciones de glucemia durante la noche, a pesar de la importancia que tiene el buen control nocturno de la diabetes en el control global de la enfermedad. Asimismo, la medición de glucemia en sangre capilar siempre está sujeta a errores derivados de una técnica incorrecta o bien a la manipulación de los resultados obtenidos por parte del paciente.

Por otro lado, el tipo de determinaciones con las que cuentan los pacientes con diabetes actualmente para el control de su glicemia implican ya sea la extracción de sangre mediante una punción o la implantación de un sensor subcutáneo, lo cual es doloroso y conlleva el riesgo de una posible infección.

Aunque han existido en el mercado algunos dispositivos para la determinación no invasiva de los niveles de glucosa, estos no han probado ser lo suficientemente eficaces para el correcto control de la glicemia en los pacientes diabéticos, y por lo tanto no han prosperado.

Es por eso que el presente trabajo de investigación tuvo como finalidad inicial encontrar una alternativa no invasiva para el monitoreo constante de la concentración de glucosa en sangre, que presentara una buena exactitud y una rápida respuesta, con el objetivo de facilitar el cuidado de la salud de los pacientes diabéticos.



### 3. Antecedentes y estado del arte

Las pruebas más antiguas para la determinación de la glucosa se basaban en el poder reductor de su grupo aldehído, capaz de reducir a cobre metálico los iones cúpricos en solución. Las más extendidas de todas estas pruebas fueron la reacción de Benedict y el método de Folin-Wu, que ya no se utilizan en la práctica actual. Al ser pruebas basadas en el poder reductor de la glucosa, cualquier otro monosacárido, o cualquier otro aldehído presente en la muestra, interferían necesariamente con el desarrollo de la misma. Por otra parte, su sensibilidad era relativamente baja.

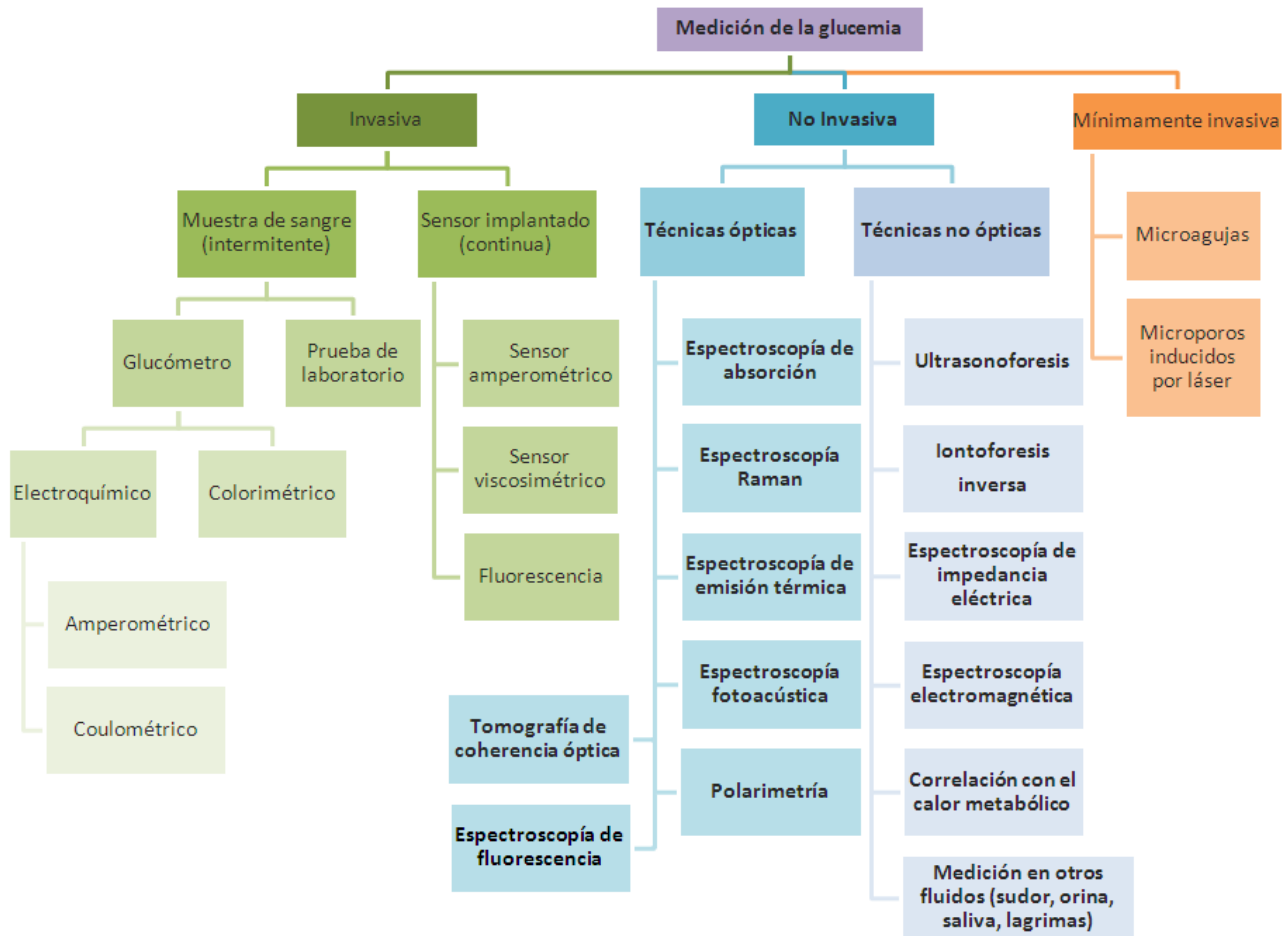


Fig. 1: Panorama de las posibles técnicas y áreas de investigación para la medición *in vivo* de la glucemia.



En la actualidad existe un vasto campo de técnicas ideadas para determinar la concentración de la glucosa en sangre, mismas que se resumen en el cuadro de la Fig. 1. En general se pueden distinguir tres categorías: los métodos invasivos (que son los más comunes y a la fecha, los únicos que se usan con aprobación médica), los mínimamente invasivos y los no invasivos [8].

### **3.1. Métodos invasivos**

En la práctica clínica común, la medición de la concentración de glucosa en sangre se realiza habitualmente en los laboratorios mediante un método denominado enzimático-colorimétrico que es una reacción catalizada por la enzima glucosa oxidasa, que a partir de glucosa y oxígeno molecular produce ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno se elimina mediante la acción de una segunda enzima, la peroxidasa, que en presencia de fenol y 4-aminofenazona da lugar a un compuesto coloreado. La intensidad del color se mide fotométricamente y es directamente proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra.

Otro método enzimático en la determinación de glucosa se basa en la reacción de la enzima hexoquinasa. Esta enzima, a partir de glucosa y ATP produce glucosa-6-fosfato y ADP. La glucosa-6-fosfato es atacada entonces por una segunda enzima, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que reduce la coenzima NADP a su forma NADPH al tiempo que oxida la glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconato. La reducción de NADPH causa un incremento en la absorbancia de la solución a una longitud de onda de 340 nm. Este incremento, debidamente calibrado, es proporcional a la cantidad de glucosa inicialmente presente en la muestra [9].

Por otro lado, para el autocontrol de los niveles de glucosa en el hogar del enfermo diabético existen también instrumentos que miden de forma casi instantánea la concentración de glucosa en sangre, llamados glucómetros Fig. 2. Estos aparatos utilizan biosensores con enzimas inmovilizadas, como la glucosa oxidasa, que reaccionan con la glucosa de una pequeña muestra de sangre, generando una señal



eléctrica que es leída a través de electrodos y convertida a una medida de la concentración de glucosa mediante una función de correlación.

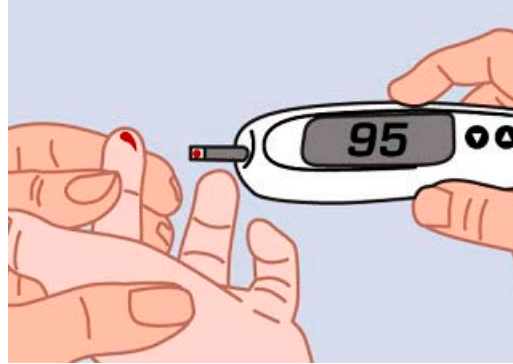


Fig. 2: Uso de un glucómetro común.

Otro método comercialmente usado es un sistema portátil de pequeño tamaño (Fig. 3) que el paciente lleva implantado un mínimo de 72 horas y que se compone básicamente de un sensor que se inserta en el tejido subcutáneo del abdomen y mide el nivel de glucosa presente en los fluidos intersticiales a intervalos de 5 minutos, registrando los datos que posteriormente pueden ser visualizados y analizados en un ordenador [7].

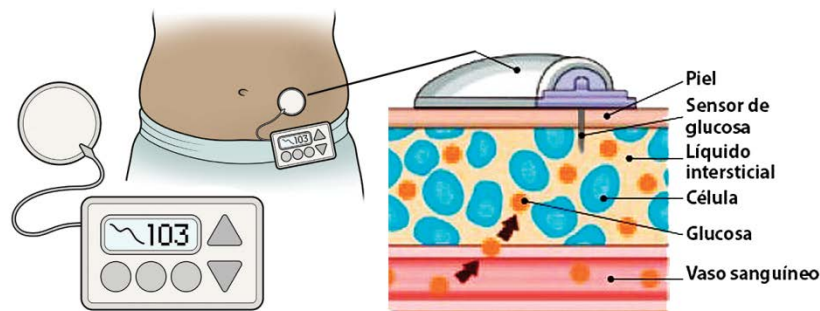


Fig. 3: Monitoreo continuo de glucosa.

Los métodos arriba descritos son invasivos ya que requieren de una muestra de sangre o la inserción de un sensor subcutáneo. Esto puede ser doloroso y difícil para la gente con diabetes, quienes pueden necesitar tomar una muestra de sangre hasta cuatro veces por día o más.



### 3.2. Métodos mínimamente invasivos

Estos métodos miden la concentración de glucosa en el fluido intersticial de la piel o el tejido subcutáneo, extrayéndolo del cuerpo por distintos medios.

Uno de los métodos en investigación es el uso de microporos, que son pequeños orificios sobre la piel provocados mediante ablación por radiación láser (Fig. 4). Mientras los poros están abiertos, un dispositivo aplica una presión de vacío continuo que permite drenar una pequeña cantidad del fluido corporal transdérmico. Sobre esta muestra, un electrodo basado en enzimas realiza la medición de la concentración de glucosa.

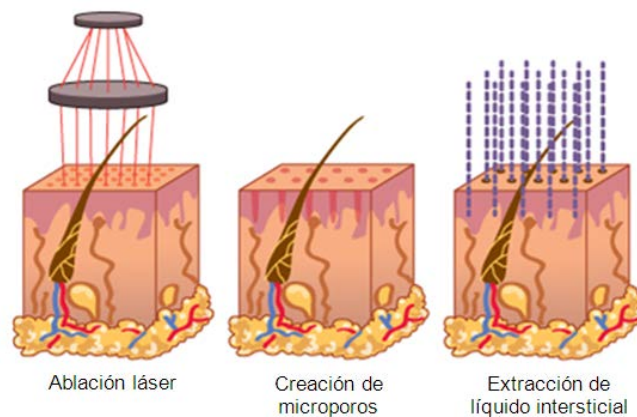


Fig. 4: Microporos creados sobre la piel por ablación láser.

El otro método emplea microagujas huecas con diámetros externos que rondan los 125  $\mu\text{m}$  para extraer una muy pequeña cantidad de fluido intersticial, que es filtrado para depurarlo de algunas proteínas (Fig. 5). La muestra filtrada pasa a través de un sensor electroquímico basado en enzimas, el cual produce una corriente proporcional a la concentración de la glucosa en la muestra [10,11].

Sin embargo, estos métodos adolecen de ciertas limitantes en términos de molestia para el paciente, alta susceptibilidad a la contaminación biológica y además requieren de una calibración continua, que a su vez implica el uso de métodos invasivos [12].

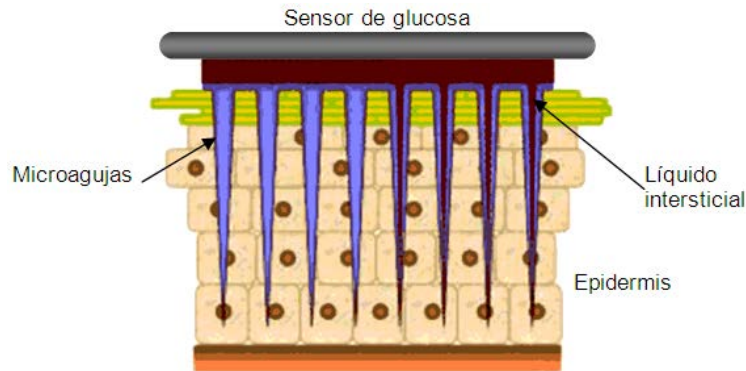


Fig. 5: Microagujas para extraer fluido intersticial en la determinación de glucosa.

### 3.3. Métodos no invasivos

A pesar de la intensiva investigación en el campo de la monitorización no invasiva de la glucosa en sangre, y el desarrollo de distintas técnicas desde hace ya más de 30 años, cuyas bases fisicoquímicas han sido bien descritas, hasta el momento no hay información publicada que apoye contundentemente su eficacia [8,13,14].

Los métodos más prometedores se basan en dos tipos de tecnología: las técnicas ópticas y las no ópticas. A continuación se brinda una breve descripción de cada una de estas tecnologías.

#### 3.3.1. Espectroscopía de absorción

La luz puede ser absorbida, transmitida, reflejada o dispersada cuando interactúa con los tejidos biológicos, dependiendo de las propiedades estructurales y químicas de estos (Fig. 6). En función de la longitud de onda de la luz incidida, algunas sustancias pueden absorber en mayor o menor proporción dicha radiación [14]. Es por eso que muchos de los intentos para lograr un método no invasivo para la determinación de la glucemia están orientados a determinar la firma óptica de la glucosa.



Debido a las propiedades ópticas de la piel, la mayoría de las investigaciones se han enfocado en los intervalos de longitud de onda de la luz visible (VIS), del infrarrojo cercano (NIR) y el infrarrojo medio (MIR). Tales espectros han sido escogidos ya que la absorción del agua en dichos intervalos es débil, la señal medida tiene alta energía y existe una buena disposición de transductores de luz comerciales [12].

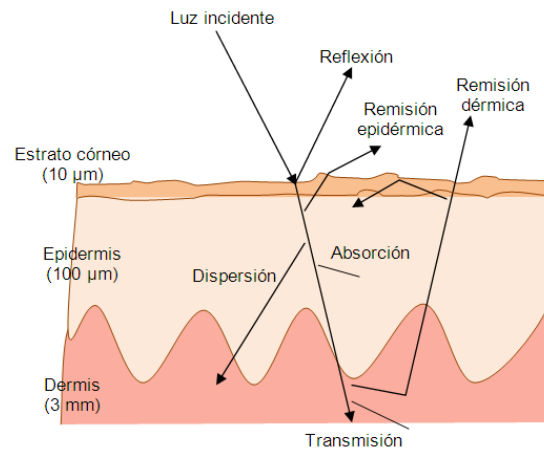


Fig. 6: Interacción entre la luz y la piel.

### **Espectroscopía del infrarrojo cercano (NIR)**

La espectroscopía NIR usa la radiación electromagnética en el intervalo de longitud de onda de 750 – 2500 nm que tiene un rango de penetración en la piel que va de 1 – 100 mm. Si bien la absorbancia del agua es baja en esta banda, lo es aun más la de la glucosa, a tal grado que la señal producida por la glucosa es apenas 1 parte en 100,000 comparada con la del agua. Los cambios en la concentración de glucosa afectan principalmente los coeficientes de absorción y de dispersión de la luz en el tejido. Por si fuera poco, los espectros de absorción de otros metabolitos como la hemoglobina, las proteínas y las grasas se traslapan con el de la molécula de glucosa por lo que mayor problema de este método es la necesidad de una constante recalibración del dispositivo. Menos del 0.1% de la luz NIR absorbida por el tejido puede ser atribuida a la glucosa [13].





Esta técnica ha sido empleada para determinar glucosa en distintas partes del cuerpo como el dedo, el lóbulo de la oreja, en la piel del antebrazo, el labio, la mucosa oral, la lengua, el septo nasal la mejilla y el brazo.

La espectroscopía NIR tiene serias limitaciones ya que la señal producida puede ser afectada por el cambio de parámetros fisicoquímicos como la temperatura corporal, la presión sanguínea, la hidratación de la piel y las concentraciones de triglicéridos y albúmina. Además, es sensible a variaciones del ambiente como temperatura, humedad, presión atmosférica, y concentración de dióxido de carbono. Las mediciones también pueden verse afectadas por el grosor y tonalidad de la piel, algunas enfermedades y el uso de medicamentos que absorban la luz en este intervalo [12].

### Espectroscopía del infrarrojo medio (MIR)

Este método emplea la radiación electromagnética en el intervalo de 2.5 – 10  $\mu\text{m}$ . A estas longitudes de onda, la luz presenta una menor dispersión en el tejido y una mayor absorción debida a la glucosa. Las bandas espectrales producidas por la glucosa en esta banda son más notorias que en el infrarrojo cercano, sin embargo, sufre prácticamente los mismos problemas que la espectroscopía NIR además de que a esta longitud de onda, la luz penetra tan solo unos pocos micrómetros dentro de la piel Fig. 7.

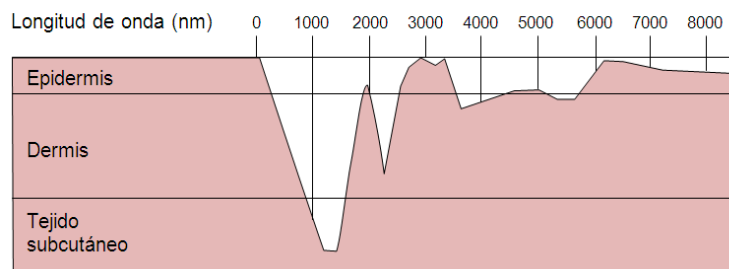


Fig. 7: Penetración de la radiación infrarroja en la piel.

Para mitigar este último inconveniente, se ha propuesto utilizar una técnica llamada reflexión total atenuada (RTA), en la que un haz de infrarrojos pasa por un cristal con un



alto índice de refracción en determinado ángulo. La reflectancia interna crea una onda evanescente que se extiende más allá de la superficie del cristal hasta la piel en contacto con el cristal, alcanzando incluso la dermis. En las regiones del espectro de infrarrojos en las que la muestra absorbe energía, la onda evanescente se atenúa. El haz atenuado vuelve al cristal, sale a continuación por el extremo opuesto del cristal y se dirige al detector en el espectrómetro de infrarrojos. El uso de aceite escualeno entre la interfaz del cristal y la piel parece mejorar aun más las mediciones [14].

Este método se ha utilizado para mediciones en la piel del dedo y en la mucosa oral.

### **3.3.2. Espectroscopía Raman**

La espectroscopía Raman se basa en los fenómenos de dispersión inelástica (dispersión Raman) de la luz monocromática, generalmente de un láser. La luz láser interactúa con las vibraciones moleculares, los fotones u otras fuentes de excitación de la muestra analizada, provocando que la energía de algunos de los fotones del láser se incremente o disminuya. Este cambio en la energía se ve reflejado en un desplazamiento en frecuencia de la luz, hacia arriba o hacia abajo del espectro, cuya magnitud es proporcional a la energía de vibración de las moléculas. De ahí que la espectroscopía Raman sea sensible a la composición química del objeto de estudio [15].

La complejidad de la instrumentación y las dificultades de calibración necesarias para la aplicación de este método, retrasaron su aceptación como una herramienta analítica. Sin embargo, el advenimiento de elementos ópticos holográficos, potentes láseres de estado sólido y los sensores CCD (dispositivos de carga acoplada), ha permitido el diseño de espectrómetros Raman más costeables y con mejores prestaciones.

La espectroscopía Raman ofrece varias ventajas en cuanto a la medición de la glucemia. Los momentos vibracionales fundamentales de la molécula de glucosa



pueden ser identificados con mayor certidumbre en comparación con la espectroscopía de absorción y además existe menor traslape con la señal presente de otros metabolitos y el agua [16].

Sin embargo, debido a que la señal producida por el efecto Raman es muy débil en comparación con la de luz incidida, requiere largos periodos de adquisición que a su vez conllevan a la disminución de la relación señal-ruido. Por otro lado, la inestabilidad en intensidad y longitud de onda de los láseres agrega otra limitante [12].

### **3.3.3. Espectroscopía de emisión térmica**

La espectroscopía de emisión térmica o espectroscopía del infrarrojo lejano (FIR), mide la absorción de la energía electromagnética contenida en las emisiones térmicas naturales o calor corporal. Este tipo de tecnología emplea un concepto similar al usado en los termómetros timpánicos para medir la temperatura corporal.

La longitud de onda de la energía térmica emitida por un cuerpo humano a unos 37 °C va de los 5 a los 12  $\mu\text{m}$ . Dentro de este intervalo, la glucosa absorbe fuertemente la energía en una banda alrededor de los 9.8 y 10.9  $\mu\text{m}$ . Cuando la radiación FIR sale del organismo, la glucosa en la sangre absorbe parte de esta energía. La cantidad de radiación absorbida puede ser determinada espectroscópicamente comparando la cantidad medida de energía térmica en la superficie de la piel contra la calculada por la función de distribución de Planck. Una medición simultánea de la energía térmica absorbida fuera de la banda de la glucosa sirve como referencia de la intensidad de la radiación, la cual es una variable necesaria para calcular la concentración de glucosa en la sangre. El porcentaje de energía térmica absorbida puede ser aritméticamente convertido a un valor de concentración de glucosa [13].

La espectroscopía FIR ha demostrado buena reproducibilidad en la detección de la concentración de glucosa pero las variaciones de la temperatura y los artefactos de movimiento interfieren notablemente con la medición. Igualmente, varios factores



patofisiológicos que inducen variaciones en la temperatura corporal interfieren con la detección de glucosa [12].

### 3.3.4. Espectroscopía fotoacústica

La espectroscopía fotoacústica (PAS, por sus siglas en inglés) es una tecnología de detección alternativa para la interacción de la radiación electromagnética con los tejidos. Para la detección de glucosa se ha usado generalmente la PAS pulsada. En este método, el tejido es excitado por una fuente de luz monocromática de alta intensidad, generalmente un láser pulsado cuya longitud de onda se encuentra en la banda del infrarrojo cercano. La energía del láser es absorbida por el tejido, idealmente por las moléculas de glucosa, con un subsecuente calentamiento microscópico localizado. El abrupto incremento en la temperatura causa una rápida expansión térmica que genera a su vez una onda de presión ultrasónica la cual es detectable en la superficie de la piel por un hidrófono o un transductor piezoeléctrico (Fig. 8). La amplitud de la señal ultrasónica es directamente proporcional a la densidad de la energía absorbida por la glucosa, y por ende con su concentración [16].

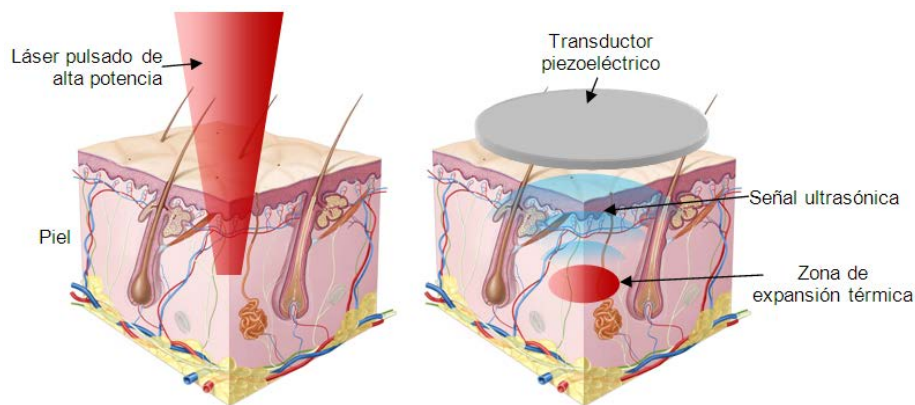


Fig. 8: El efecto fotoacústico.

En esta técnica el agua no interfiere con la medición debido a su pobre respuesta fotoacústica, y su sensibilidad es mayor comparada con la espectroscopía de absorción. Sin embargo, es sensible a cambios en la temperatura, presión y otras



variables ambientales, así como a interferencias de otras sustancias fisiológicas que absorben la luz en la longitud de onda utilizada [12].

### 3.3.5. Espectroscopía de fluorescencia

Esta técnica se basa en la generación de fluorescencia en el tejido a analizar al ser excitado por luz de cierta longitud de onda, generalmente en el ultravioleta. Dicha fluorescencia, puede ser intrínseca del tejido (auto-fluorescencia) o producida por otro compuesto en contacto con el mismo.

En el primer caso, existe una patente en la que se detalla que cuando una solución de glucosa es excitada por la luz de un láser ultravioleta a una longitud de onda de 308 nm, la fluorescencia puede ser detectada en un intervalo de 340 – 400 nm, con un máximo en 380 nm. También se detalla que su intensidad dependía de la concentración de glucosa en la solución [17]. Sin embargo, la glucosa no tiene bandas de absorción en el ultravioleta y en el estudio no se explica el origen de la fluorescencia detectada.

En otro estudio desarrollado por Evans *et al.* se describe un cultivo celular *in vitro* como modelo de piel para probar la medición de la concentración de glucosa indirectamente, midiendo la auto-fluorescencia de la molécula NAD(P)H, relacionada con el metabolismo de la glucosa, en el intervalo de longitud de onda de 400 – 500 nm al ser excitado por una fuente de luz a 340 nm [18].

Por otro lado, este método se ha utilizado para medir la concentración de glucosa en las lágrimas con la ayuda de un lente de contacto transparente fabricado de un polímero sensibilizado que al ser excitado con luz a 488 nm, fluoresce con una intensidad que se correlaciona con la concentración de glucosa en las mismas [14].

Esta técnica tiene una ventaja que radica en que la señal no es afectada por fluctuaciones en la intensidad de luz ambiental, sin embargo, la fluorescencia no solo depende de la concentración de glucosa sino también del grosor de la epidermis, la



pigmentación de la piel y otros parámetros. Además, el láser ultravioleta presenta una considerable dispersión en el tejido [19].

### **3.3.6. Tomografía de coherencia óptica**

La tomografía de coherencia óptica (OCT) es una nueva técnica de diagnóstico que provee de imágenes de profundidad de los tejidos, con una resolución de alrededor de 10  $\mu\text{m}$  con una penetración de hasta 1 mm. Sólo recientemente se ha propuesto utilizar esta tecnología para la determinación de la glucemia. Se basa en la medición del retraso de la luz que sufre el fenómeno de remisión, comparado con la luz que es reflejada al hacer incidir una fuente de luz poco coherente (como la de un diodo súper-luminiscente) sobre el tejido. La medición de dicho retraso se hace con la ayuda de un interferómetro [19]. Con este dato se puede calcular el coeficiente de dispersión del tejido, el cual ha probado tener correlación con la concentración de glucosa en el líquido intersticial. Un incremento en la concentración de glucosa causa un incremento en su índice de refracción, lo que a su vez provoca un decremento del coeficiente de dispersión [20].

La técnica OCT puede ser sensible a artefactos de movimiento y a variaciones de la temperatura de la piel (de varios grados); además de que requiere una compleja instrumentación para obtener mediciones precisas.

### **3.3.7. Polarimetría**

Se basa en el fenómeno que ocurre cuando un haz de luz polarizada atraviesa una solución que contiene solutos ópticamente activos (como las moléculas quirales); la luz rota su plano de polarización en un cierto ángulo que depende de la concentración de dichos solutos. La glucosa es una molécula quiral cuyas propiedades polarimétricas se conocen desde hace mucho tiempo. En polarimetría, se divide un rayo de luz polarizada en un haz de referencia y otro de detección el cual pasa a través del cuerpo en estudio. Después, estos haces son comparados para determinar el corrimiento de fase



producido al pasar por el cuerpo. El nivel de glucosa en sangre es calculado al aplicar un factor de conversión al corrimiento de fase [19].

Una ventaja de esta técnica es que se puede utilizar luz visible, cuyas fuentes son fáciles de conseguir, y que los componentes ópticos requeridos pueden ser fácilmente miniaturizados. Sin embargo tiene varias limitantes. Por un lado, la magnitud de la señal es muy pequeña. El ángulo de rotación de la luz para un tejido de apenas 1 cm de espesor es menor a  $0.00004^\circ$  por un incremento de 1 mg/dl en la concentración de glucosa [13]. Por otro lado, esta técnica es muy sensible a las propiedades dispersivas del tejido, por lo que la piel no es un objeto de estudio viable, debido a su alto coeficiente de dispersión. Además, la especificidad de este método es pobre, si bien puede ser mejorada parcialmente al utilizar múltiples longitudes de onda, debido a que existen otros compuestos en los fluidos corporales, como los ascorbatos y la albúmina, que también pueden rotar el plano de polarización de la luz. Otras fuentes de error en la medición son las variaciones de temperatura y pH del tejido.

El sitio en el cual ha sido probada esta técnica es en el ojo, específicamente en el humor acuoso (entre el cristalino y la córnea), cuya concentración de glucosa presenta un retraso en el tiempo con relación a la concentración de glucosa en la sangre.

### **3.3.8. Ultrasonoforesis**

Esta técnica, también conocida como sonoforesis, emplea un transductor piezoeléctrico para crear ondas de ultrasonido de unos 20 kHz, las cuales incrementan la permeabilidad de la piel al líquido intersticial, transportando consigo glucosa hacia la superficie de la epidermis, donde es medida con la ayuda de un sensor electroquímico convencional.

Esta técnica es considerada en ocasiones como mínimamente invasiva ya que crea microporos en la piel por los que fluye el líquido intersticial. Se han hecho experimentos *ex vivo* sobre la piel de cadáveres y también *in vivo*, en ratas [14,21].



### 3.3.9. Iontoforesis inversa

La iontoforesis es una técnica que ha sido utilizada por varios años para difundir medicamentos a través de la piel, aplicando una corriente eléctrica. Utilizando el mismo principio, pero en sentido opuesto, la iontoforesis inversa es capaz de extraer el líquido intersticial de la piel y con él, moléculas de glucosa.

Se basa en el establecimiento de una pequeña corriente eléctrica entre un ánodo y un cátodo posicionados sobre la piel. Cuando se aplica una diferencia de potencial entre estos dos electrodos, se causa la migración de iones como el sodio y el cloro desde el espacio intersticial hacia el ánodo o el cátodo, según su carga. Durante este desplazamiento, también son transportadas moléculas sin carga, como la de la glucosa, por efecto del flujo convectivo (electroósmosis). La glucosa es entonces recolectada sobre el cátodo, donde un sensor de glucosa tradicional mide su concentración (Fig. 9).

Existen diversos problemas con la extracción de fluidos de la piel como un método para el monitoreo de la glucosa, como es el caso de la iontoforesis inversa, la ultrasonoforesis o cualquier otra técnica que emplee este principio.

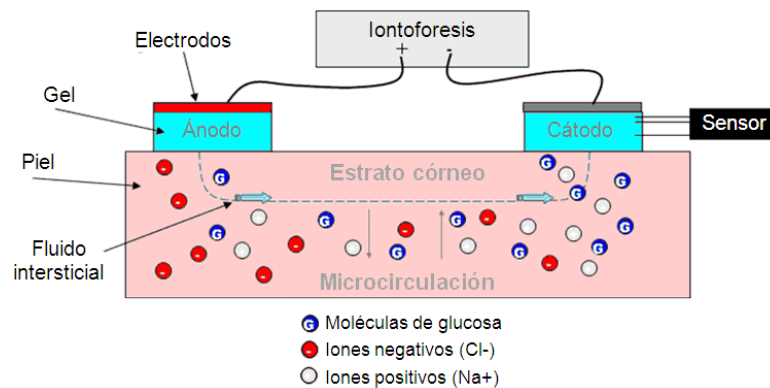


Fig. 9: Mecanismo de la iontoforesis inversa.

Primeramente, existe un tiempo de retraso de al menos 20 minutos desde el principio del ciclo de extracción del fluido hasta que el nivel de glucosa puede ser reportado. Si el nivel de glucosa en sangre decae de manera rápida, una severa





hipoglucemia podría no ser detectada y el paciente no tendría oportunidad de tomar una acción correctiva. El reconocimiento retardado de un aumento súbito en los niveles de glucosa en sangre es menos peligroso. El tiempo necesario para completar una medición hace a esta tecnología inapropiada para el laboratorio de un fisiólogo o un hospital donde se desea una rápida lectura de los niveles de glucosa. Por otro lado, la tecnología empleada para medir los niveles de glucosa en el fluido extraído de la piel debe ser muy exacta ya que la concentración de glucosa en este fluido es aproximadamente una milésima parte de la concentración que hay en la sangre. El dispositivo requiere una recalibración al menos cada semana y no puede ser utilizado por otra persona sin antes pasar por un periodo para equilibrar el sistema de 60 min seguido de una recalibración.

En cuanto a la comodidad del paciente, se ha reportado que podría haber unos cuantos minutos de leve malestar u hormigueo la primera vez que se aplica este instrumento en la piel y que con el uso prolongado tiende a causar irritación. Por último, la iontoforesis no puede ser usada si el paciente presenta una sudoración significativa [13,19].

### **3.3.10. Espectroscopía de impedancia eléctrica**

La espectroscopía de impedancia eléctrica mide la resistencia que presenta un cuerpo al flujo de electrones o iones a través de él, en función de la frecuencia de dicha corriente eléctrica. Esta técnica ya ha sido aplicada en, por ejemplo, cultivos celulares para obtener propiedades de la membrana celular y también ha probado ser un método no invasivo útil en la medición de la composición corporal [22].

Se ha observado que las variaciones en la concentración de glucosa en el plasma sanguíneo, inducen un decremento en la concentración de sodio dentro de los glóbulos rojos y un aumento de la concentración de potasio. Estas variaciones causan cambios en el potencial de membrana de los eritrocitos, el cual puede ser estimado al determinar la permitividad y conductividad de la membrana celular a través de su espectro



dieléctrico. Este espectro dieléctrico se ha medido *in vivo* en un intervalo de frecuencia de 100 Hz – 200 MHz [19], pudiendo correlacionarlo con cambios en la concentración de glucosa sérica.

Las limitantes de ese método radican en que los resultados se ven afectados por variaciones en el contenido de agua de los tejidos al igual que por enfermedades que afectan las propiedades de la membrana celular [12].

### **3.3.11. Espectroscopía de impedancia de radiofrecuencias**

Como se mencionó en el apartado anterior, las variaciones en la concentración de glucosa en la sangre inducen cambios en sus parámetros dieléctricos. Estos cambios también pueden ser detectados utilizando sensores electromagnéticos que tienen como principio la generación de corrientes de Foucault.

En un experimento realizado *in vitro*, se hizo circular sangre dentro de un tubo plástico que pasaba por el centro de dos solenoides dispuestos uno en frente del otro. A uno de los solenoides se le aplicó una corriente alterna que a su vez inducía otra corriente en el segundo solenoide; la intensidad de dicha corriente depende de las propiedades dieléctricas de su núcleo, que en este caso es el tubo por el que circula la sangre. Las frecuencias utilizadas para este estudio estaban en el intervalo de 2.4 – 2.9 MHz [19].

En otro estudio *in vivo*, se hace uso de la atenuación de las ondas de radio y microondas al pasar por el tejido vivo, en este caso un dedo. Con la ayuda de un analizador de redes vectorial, se emiten ondas electromagnéticas con un intervalo de frecuencias que va de los 10 MHz – 2 GHz, a través de una pequeña antena. Esta antena se pone en contacto con el dedo y se mide la variación en la amplitud de la señal recibida con una segunda antena [23].



Las desventajas de este método son la falta de especificidad, ya que los parámetros dieléctricos de la sangre dependen de otros componentes además de la glucosa, y su alta sensibilidad a las variaciones de temperatura.

### 3.3.12. Correlación con el calor metabólico

Este método involucra la medición de distintos parámetros fisiológicos relacionados con la generación de calor producida por el metabolismo (Fig. 10). Entre estos índices se encuentran la temperatura corporal, el flujo sanguíneo y la saturación de oxígeno (concentraciones de hemoglobina y oxihemoglobina). El calor metabólico parece correlacionarse con la concentración de glucosa en la sangre [24].

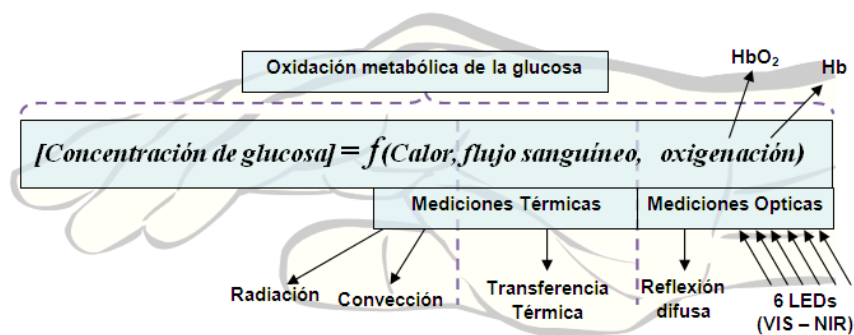


Fig. 10: Variables involucradas en la determinación de glucosa por calor metabólico.

Ya que esta técnica puede sufrir de grandes interferencias provocadas por las condiciones ambientales, es más usada como información auxiliar en el cálculo de la concentración de glucosa [14].

### 3.3.13. Medición en otros fluidos

Otra alternativa al monitoreo de glucemia, es la medición de la concentración de glucosa en fluidos corporales tales como la saliva, la orina, el sudor o las lágrimas. Aunque se ha probado la correlación de la concentración de glucosa en estas excreciones, existen diversas limitantes para su uso [14,25]. La mayor de estas restricciones es el tiempo de retraso que existe entre que ocurre un cambio en la



concentración de glucosa sérica y éste se ve reflejado en alguno de los fluidos mencionados, el cual, en el mejor de los casos es del orden de varios minutos. Otras desventajas radican en la interferencia producida por las demás sustancias que componen dichos fluidos, como la urea, en el caso de la orina, o los restos de comida, en el caso de la saliva.

### 3.4. Dispositivos comerciales

A la fecha ha habido ya varios intentos de aplicar las técnicas anteriormente descritas en dispositivos comerciales que puedan ser utilizados por los pacientes diabéticos. Algunos están vigentes, otros han sido retirados del mercado por diversas razones y otros están en pleno desarrollo. Sin embargo, gran parte de estos dispositivos tienen inconvenientes, ya sea porque no tienen una buena sensibilidad o precisión, o bien, porque necesitan un proceso complicado de calibración. Por otro lado, la mayoría de estos aparatos emplea un sólo principio de medición de la glucosa (a excepción del GlucoTrack™), por lo que están sujetos a las limitantes propias de la tecnología que utiliza cada uno. Quizá sea por estas razones, u otras, que el uso de este tipo de instrumentos no se ha diseminado y el mercado sigue dominado por los glucómetros tradicionales.

En la tabla se muestra una breve descripción de algunos de los dispositivos que han sido desarrollados hasta hoy, y su situación [19,12,14,26].

Tabla 1: Dispositivos desarrollados para la medición no invasiva de la glucemia.

<i>Dispositivo (Compañía)</i>	<i>Tecnología</i>	<i>Características</i>	<i>CE<sup>1</sup>/ FDA<sup>2</sup></i>	<i>Estado</i>
<b>Glucowatch® G2 Biographer</b> (Animas Technologies, antes Cygnus, Inc.)	Iontoforesis inversa.	<u>Sitio:</u> Piel de la muñeca. <u>Ventajas:</u> Toma en cuenta la temperatura de la piel y la transpiración. Alarma e indicadores de tendencia. Software de análisis y almacenamiento. <u>Desventajas:</u> Costoso. Calibración complicada que requiere un glucómetro estándar. Necesita un precalentamiento de 2 – 3 h. Electrodo desechable cada 12 h. Imprecisión debida a artefactos de movimiento, sudoración y cambios bruscos de temperatura. Mediciones con 20 min de retraso. Provoca irritación de la piel. Malo para la detección de hipoglucemia.	CE FDA	No disponible desde 2007.



<b>GlucoTrack™</b> (Integrity Applications Ltd.)	Ultrasónica <sup>3</sup> , electromagnética y por calor metabólico.	<u>Sitio:</u> Lóbulo de la oreja. <u>Ventajas:</u> Buena exactitud. Calibración sencilla y válida durante 1 mes. Alertas de hipo e hiperglucemia. Software de análisis y almacenamiento. Compacto y ligero. La medición no se ve afectada por las actividades diarias. <u>Desventajas:</u> Requiere una calibración individual contra niveles de glucosa basales y postprandiales con un glucómetro estándar. La calibración es tardada (2 h aprox.) Necesita mejoras en el procedimiento de calibración y el algoritmo de procesamiento de datos.	CE	En pruebas clínicas desde el 2011. No disponible hasta el momento.
<b>Pendra®</b> (Biovotion AG)	Espectroscopia de impedancia eléctrica.	<u>Sitio:</u> Piel de la muñeca. <u>Ventajas:</u> Alarmas de hipo e hiperglucemia. Software de análisis y almacenamiento. Toma en cuenta los cambios de temperatura. <u>Desventajas:</u> Las mediciones varían de un individuo a otro, por lo que requiere de calibrarse individualmente. La calibración es complicada. Electrodo desechable cada 24 h y estos tienen que ser colocados exactamente en el sitio de calibración. El paciente debe descansar por 1 h para equilibrar el aparato, antes de la lectura. Pobre correlación con los glucómetros estándar (aprox. 35%). No puede ser utilizado en algunas personas, por su tipo de piel.	CE	No disponible.
<b>OrSense NBM-200G</b> (OrSense Ltd.)	Espectroscopia NIR.	<u>Sitio:</u> Punta del dedo. <u>Ventajas:</u> Mide además hemoglobina y saturación de oxígeno. Portátil, fácil de usar y rápido. Alertas de hipo e hiperglucemia. Software de análisis y almacenamiento. Calibración sencilla y no tan frecuente. Mide la glucosa de forma continua. Buena precisión. <u>Desventajas:</u> No se reporta su desempeño para detectar hipoglucemias. El error promedio relativo absoluto es del 17.2%. Existe sólo un estudio que respalda su eficacia.	–	Sólo disponible una versión que mide Hb, SO <sub>2</sub> % y pulso, mas no glucosa.
<b>Symphony™</b> (Echo Therapeutics, Inc.)	Prelude® SkinPrep System <sup>4</sup> (abrasivo)	<u>Sitio:</u> Piel. <u>Ventajas:</u> Periodo breve de precalentamiento. Medición cada minuto. Alarmas para cambios bruscos en la concentración de glucosa. No irrita la piel. Buena precisión y correlación con los glucómetros estándar. <u>Desventajas:</u> Medición en líquido intersticial (tiempo de retraso).	–	No disponible.
<b>Diasensor®</b> (Biocontrol Technology, Inc.)	Espectroscopia NIR.	<u>Sitio:</u> Piel del antebrazo. <u>Ventajas:</u> Medición rápida. <u>Desventajas:</u> De gran tamaño y no puede detectar hipoglucemias.	CE	No disponible.
<b>Aprise®</b> (Glucon Medical Ltd.)	Espectroscopia fotoacústica.	<u>Sitio:</u> Piel del antebrazo. <u>Ventajas:</u> Compacto, ligero, mediciones cada 3 s. Buena especificidad y sensibilidad [27].	FDA (pendiente)	No disponible.
<b>Glucoband®</b> (Calisto Medical Inc.)	Espectroscopia de impedancia eléctrica.	<u>Sitio:</u> Piel de la muñeca. <u>Ventajas:</u> Alertas de hipo e hiperglucemia. No se necesita cambiar los electrodos. Autocalibración.	FDA	No disponible desde 2011.
<b>SugarTrak™</b> (LifeTrac Systems Inc.)	Espectroscopia NIR.	<u>Sitio:</u> Piel. <u>Ventajas:</u> Mediciones en menos de un minuto. Los componentes del aparato no tocan la piel del paciente.	–	No disponible.
<b>Dream Beam</b> (Futrex Medical Instrumentation, Inc.)	Espectroscopia NIR.	<u>Sitio:</u> Punta del dedo. <u>Ventajas:</u> Portátil y compacto. <u>Desventajas:</u> Requiere calibración individual.	–	No disponible.
<b>GluCall</b> (KMH Co. Ltd.)	Iontoforesis inversa.	<u>Sitio:</u> Piel. <u>Ventajas:</u> Alertas de hipo e hiperglucemia. Software de análisis y almacenamiento. <u>Desventajas:</u> Periodo de precalentamiento de 1 h.	FDA Korea	No disponible.
<b>GluControl GC300®</b> (ArithMed GmbH y Samsung Fine Chemicals)	Sensor electromagnético.	<u>Sitio:</u> Punta del dedo. <u>Ventajas:</u> Portátil. Capacidad de almacenamiento.	–	No disponible desde 2006



<b>TouchTrak</b> (Samsung Fine Chemicals Co. Ltd.)	Sensor electromagnético.	<u>Sitio:</u> Punta del dedo. <u>Ventajas:</u> Portátil. <u>Desventajas:</u> Costoso. No mide correctamente antes o después del ejercicio. No tiene una buena precisión.	–	No disponible.
<b>SugarTrac™</b> (LifeTrac Systems Inc.)	Espectroscopía NIR.	<u>Sitio:</u> Lóbulo de la oreja.	–	No disponible.
<b>Combo Glucometer CoG</b> (Cnoga Medical)	Espectroscopía NIR.	<u>Sitio:</u> Punta del dedo. <u>Ventajas:</u> Portátil, pequeño y rápido. <u>Desventajas:</u> Malo para detectar hipoglucemias. Necesita calibración por persona.	–	En desarrollo. No disponible.
<b>DMT Pocket</b> (DiaMonTech GmbH)	Espectroscopía MIR.	<u>Sitio:</u> Punta del dedo. <u>Ventajas:</u> Portátil y rápido. <u>Desventajas:</u> Mide glucosa en el líquido intersticial, por lo que tiene un tiempo de retraso. Necesita calibración.	–	En desarrollo. No disponible.
SpectRx Inc.	Microporos inducidos por láser	<u>Sitio:</u> Piel. <u>Ventajas:</u> Las mediciones se correlacionan bien con los glucómetros comerciales. Fácil calibración. <u>Desventajas:</u> Requiere un glucómetro estándar para su calibración. La medición tiene un tiempo de retraso de 2 a 4 min con respecto a la de la sangre.	–	No disponible.
Hitachi Ltd.	Metabolic heat conformation	<u>Sitio:</u> Punta del dedo. <u>Ventajas:</u> Compacto y portátil. Detecta otros parámetros fisiológicos.	FDA	No disponible.
BioPeak Co.	Espectroscopía de impedancia eléctrica.	<u>Sitio:</u> Piel de la muñeca.	–	No disponible.
Infratec Inc.	Espectroscopía de emisión térmica	<u>Sitio:</u> Membrana timpánica. <u>Ventajas:</u> Portátil. Realiza las determinaciones en 10 s.	–	No disponible.
LighTouch Medical Inc.	Espectroscopía Raman	<u>Sitio:</u> Punta del dedo. <u>Ventajas:</u> Portátil. Emplea un proceso de modulación patentado para hacer las mediciones.	–	No disponible.
MedOptix Inc.	Espectroscopía NIR	<u>Sitio:</u> Piel. <u>Ventajas:</u> Portátil. Emplea una tecnología patentada basada en la reflexión de la luz NIR desde la superficie de la piel.	–	No disponible.
GlucoLight, Co.	Tomografía de coherencia óptica	<u>Sitio:</u> Piel <u>Ventajas:</u> Medición continua. <u>Desventajas:</u> Necesita ser calibrado con un glucómetro normal.	–	No disponible.
C8 Medisensors	Espectroscopía Raman	<u>Sitio:</u> Piel. <u>Ventajas:</u> Compacto, portátil y resistente al agua. Mediciones en 3 min. Precisión comparable a la de los glucómetros comerciales. <u>Desventajas:</u> Se necesitan más estudios que validen sus resultados.	–	No disponible.
Instituto Tecnológico de Massachusetts	Espectroscopía Raman	<u>Sitio:</u> Piel del dedo o brazo. <u>Ventajas:</u> Utiliza un algoritmo para predecir los valores de glucemia a partir de la concentración en el fluido intersticial (calibración de concentración dinámica). <u>Desventajas:</u> Se necesitan más estudios que validen sus resultados. No se han hecho estudios clínicos. Se necesita miniaturizar el sistema.	–	No disponible.
Universidad de Missouri-St. Louis	Espectroscopía NIR	<u>Sitio:</u> Punta del dedo. <u>Ventajas:</u> Portátil. Detecta la glucosa en los capilares del dedo con buena precisión en 1 s. <u>Desventajas:</u> No se han hecho estudios clínicos.	–	No disponible.

1. CE: Aprobado para su venta en la Unión Europea.
2. FDA: Aprobado por la Agencia de Alimentos y Medicamentos para su venta en Estados Unidos.
3. La técnica ultrasónica utilizada por este glucómetro no fue descrita en los apartados anteriores ya que es relativamente nueva y sólo ha sido empleada en este dispositivo. Se basa en la medición de la variación en la velocidad del sonido, específicamente de las ondas ultrasónicas, debida al cambio de compresibilidad del tejido por cambios en la concentración de glucosa [28].
4. Prelude® SkinPrep System es una técnica patentada para volver permeable la piel y poder extraer el líquido intersticial. El método consiste en el desgaste de la piel con una punta abrasiva desechable. El instrumento mide la impedancia de la piel durante todo el proceso y cuando detecta que ésta es suficientemente permeable, detiene el dispositivo de ablación [29].



## 4. Objetivo

El objetivo inicial fue desarrollar un instrumento que midiera de forma no invasiva, y preferentemente de manera continua, la concentración de glucosa en sangre. Para ello se plantearon los siguientes puntos:

- Realizar una investigación y análisis de las técnicas no invasivas existentes para la determinación de la glucosa en sangre.
- Seleccionar dos o más de estas técnicas, con los siguientes criterios:
  - ❖ Que sean técnica y económicamente viables de reproducir en el laboratorio.
  - ❖ Que hayan reportado buenos resultados en la literatura.
- Construir los dispositivos de medición para cada una de las técnicas seleccionadas y hacer pruebas para validar su funcionamiento.
- Utilizar dos o más de estas tecnologías simultáneamente para aumentar la precisión, sensibilidad y especificidad de las lecturas de la concentración de glucosa:
  - ❖ Empleando técnicas de análisis de datos y/o procesamiento de señales para extraer información útil de los métodos de medición elegidos.

Sin embargo, como se verá más adelante, el objetivo original no pudo ser completado, por lo que se tuvo que replantear el curso de la investigación y aprovechar los dispositivos que ya se habían desarrollado con un nuevo propósito:

- Utilizar algunas de las técnicas e instrumentos desarrollados (amplificador lock-in y espectrómetro de impedancia) para medir, de una forma no destructiva, la concentración de clorofila A, clorofila B y carotenoides en tomates rojos (pigmentos que indican su estado de madurez), así como su contenido de humedad.



## 5. Técnicas aplicadas para la medición de glucosa de forma no invasiva

Después de evaluar las distintas tecnologías desarrolladas hasta el momento para la determinación de la glucosa en sangre de forma no invasiva, se seleccionaron algunas de las que reportaban mejores resultados en la literatura y que a la vez fueran técnica y económicamente viables de reproducir en el laboratorio. De esta forma, se vio la posibilidad de diseñar y construir el instrumental básico necesario para intentar reproducir las técnicas de la Tabla 2.

Tabla 2: Métodos elegidos para la determinación no invasiva de la glucemia y dispositivos necesarios para su implementación.

<i>Tecnología</i>	<i>Instrumentos necesarios</i>
Espectroscopía del infrarrojo cercano (NIR).	Espectrómetro óptico (1000 – 2500 nm) Fuente de luz infrarroja.
Espectroscopía fotoacústica.	Fuente de luz pulsada. Transductor de presión (i.e. piezoeléctrico o micrófono). Amplificador de señales en fase (boxcar o lock-in).
Espectroscopía de impedancia de radiofrecuencias.	Antenas emisora y receptora. Analizador de espectro (10 MHz – 2 GHz).
Espectroscopía de fluorescencia.	Espectrómetro óptico (340 – 450 nm) Fuente de luz ultravioleta (308 nm, 340 nm).
Espectroscopía de impedancia eléctrica.	Espectrómetro de impedancia (100 Hz – 200 MHz).
Calor metabólico.	Termómetro digital. Termopila para medir calor por radiación. Oxímetro de pulso. Medidor de flujo sanguíneo.





En las siguientes secciones se detallará el trabajo realizado sobre cada una de estas técnicas.

### **5.1. Espectroscopía de fluorescencia.**

Existen en realidad pocos trabajos que hayan intentado aplicar la espectroscopía de fluorescencia en la determinación de la glucemia directamente ya que la molécula de glucosa no tiene bandas de absorción electrónica en el espectro visible ni infrarrojo, y por lo tanto no presenta el fenómeno de fluorescencia por sí misma.

A pesar de ello, existe una patente de Snyder *et al.* [30] en la que los investigadores dicen poder excitar una solución de glucosa con un láser *excimer* de 308 nm consiguiendo detectar fluorescencia en la banda de 340 a 400 nm, con un máximo en 380 nm. Ellos reportan que la intensidad de la fluorescencia variaba con el cambio en la concentración de glucosa en el medio; sin embargo, no se da una explicación del origen de esta fluorescencia.

Por otro lado, los trabajos de Evans *et al.* [18,31,32], sugieren que la fluorescencia intrínseca de tejidos como la piel puede ser utilizada como un reporte del metabolismo de la glucosa, y por ende, de su concentración. Ellos sostienen la hipótesis de que el cofactor fluorescente NAD(P)H, que se produce a partir de la molécula no fluorescente NAD en muchas rutas metabólicas dependientes de la glucosa, tiene una fluorescencia con un máximo entre los 440 y 480 nm cuando se excita con una fuente de 340 nm, por lo que la medición de la fluorescencia de la piel a esta longitud de onda podría proveernos indirectamente de información sobre la concentración de glucosa.

Esta última aproximación es la que parece tener un mejor soporte científico, por lo que se decidió hacer algunos experimentos para comprobar si se podía detectar alguna señal de fluorescencia directamente sobre la piel.



### 5.1.1. Fuente de luz ultravioleta

Para probar esta técnica se adquirió un LED ultravioleta con pico de emisión en 340 nm, que fabrica la compañía Roithner Lasertechnik con el número de parte UVLED340-TF. Sus características se presentan en la Tabla 3.

Aun cuando las distintas capas de la piel, en especial el estrato córneo, dispersan de manera considerable la luz ultravioleta, a los 340 nm aún existe una considerable penetración de la radiación en el tejido, al menos hasta la dermis, en donde se encuentran los capilares sanguíneos (Fig. 11).

Tabla 3: Características del diodo emisor UVLED340-TF

<i>Parámetro</i>	<i>Valor</i>
Longitud de onda de emisión	339 nm $\pm$ 2 nm
Potencia de emisión	50 $\mu$ W
Voltaje en directa	5.1 V
Voltaje en inversa	0.9 V
Corriente de operación	20 mA
Ángulo de visión	90°

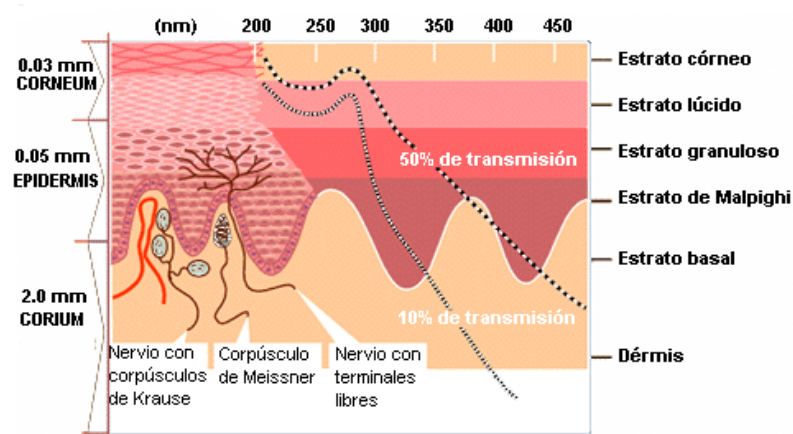


Fig. 11: Penetración de la radiación ultravioleta en la piel.



### 5.1.2. Luxómetro ultravioleta.

Para medir la radiación producida por la fuente de luz ultravioleta, construyó un luxómetro que detecta las radiaciones en un rango de 280 – 390nm. El detector de este dispositivo es el integrado ML511. Su circuito se puede apreciar en la Fig. 12.

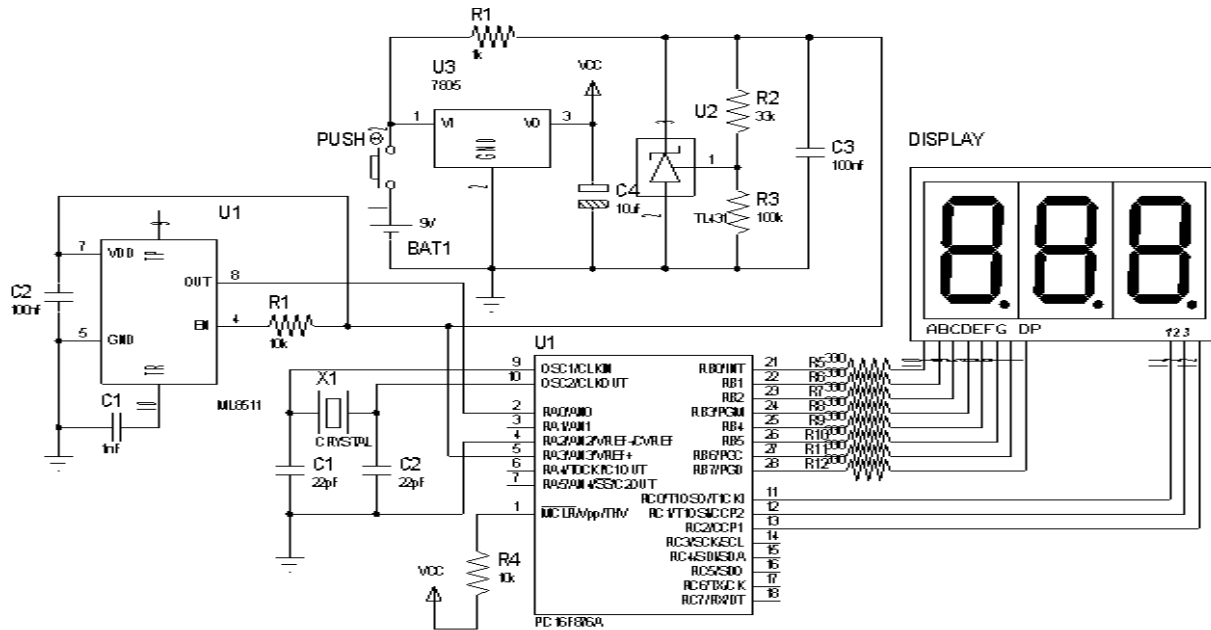


Fig. 12: Circuito de instrumentación del sensor ultravioleta ML511.

Con este circuito se pudo verificar de forma sencilla que el LED ultravioleta estuviera emitiendo, aunque no la longitud de onda a la cual lo estaba haciendo. Para esto último, así como para medir la fluorescencia que se pretendía encontrar en el tejido y algunos otros experimentos que se detallarán en secciones posteriores, se construyó un espectrómetro óptico, mismo que se describe a continuación.

### 5.1.3. Espectrómetro óptico UV-VIS.

Para poder medir el espectro de emisión de la molécula NAD(P)H cuando fluoresce se requiere de un aparato óptico especial llamado espectrómetro. Este dispositivo mide



la intensidad luminosa de las diferentes longitudes de onda que componen un haz de luz.

Existe una enorme variedad de espectrómetros en el mercado, destinados a diversas aplicaciones, y por tanto, con muy diversos rangos de longitud de onda y resoluciones. En la Tabla 4, se muestran algunos de ellos, limitándose a los modelos más compactos, económicos y destinados a medir en el espectro de la luz visible (aproximadamente de 380 hasta 780 nm).

Tabla 4: Espectrómetros comerciales de gama baja en el rango visible.

<i>Modelo</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Intervalo de longitud de onda (nm)</i>	<i>Resolución (nm)</i>	<i>Detector</i>	<i>Precio (USD*)</i>	<i>Ref.</i>
USB4000-UV-VIS	Ocean Optics	200 – 850	1.5 – 2.3	TCD1304 (CCD)	\$4,062.00	[33,34]
LumaSpec 800	Prior Scientific	350 – 800	1.5	**	\$1,699.00	[35]
AvaSpec-2048-USB2	Avantes	350 – 750	0.5	CCD	\$1,250.00	[36,37]
USB2000-UV-VIS	Ocean Optics	200 – 850	1.5	ILX511 (CCD)	\$1,000.00	[38,39]
C12666MA	Hamamatsu Photonics	340 – 780	15	CMOS	\$180.00	[40,41]
Spectruino	MySpectral	380 – 750	9	ILX554 (CCD)	\$100.00	[42,43]
TO-Mini-USB-TG-640	Thunder Optics	400 – 650	3	CMOS	\$70.00	[44]

\* Dólares estadounidenses a fecha de 2018.

\*\* No se proporciona la información.

Los espectrómetros son instrumentos costosos cuyo uso se limita al laboratorio de investigación o la industria. Sin embargo, en años recientes han sido desarrolladas alternativas mucho menos costosas y con un buen desempeño por parte de profesores de universidades para la enseñanza de la materia de óptica, y por aficionados a la astronomía, para el análisis de la luz de las estrellas [45,46,47,48]. Estos instrumentos utilizan componentes económicos para obtener resoluciones espectrales menores a 5



nm. Es por esta razón que se decidió intentar la construcción de un espectrómetro digital de bajo costo para el desarrollo de la presente investigación.

Existen distintos tipos de espectrómetros:

- De refracción: Utilizan un prisma como elemento dispersor.
- De difracción: Utilizan una rejilla de difracción como elemento dispersor.
- Por transformada de Fourier: Usan un interferómetro de Michelson. Al mover uno de los espejos, se genera un patrón de interferencia, el cual resulta ser la transformada de Fourier del espectro de la luz en estudio. Para obtener éste último, simplemente se calcula la transformada inversa.

No obstante, el más sencillo de construir es el de difracción. Dentro de este tipo de espectrómetros, además existen distintas configuraciones (Czerny-Turner, Ebert-Fastie, etc.). Sin embargo, la mayoría tienen ciertos elementos básicos. La luz entrante, es decir, la que se desea analizar, debe ser limitada espacialmente. Esto se logra haciéndola pasar por una abertura estrecha, o rendija. Posteriormente esta luz pasa por un colimador, que bien puede ser una lente convergente o un espejo cóncavo, con el fin de convertirla en un haz estrecho y paralelo; esto asegura que toda la luz proveniente de la rendija llegará al elemento difractante con el mismo ángulo de incidencia, lo cual es necesario para que la imagen formada sea nítida. El haz colimado es separado en sus distintas longitudes de onda al pasar por una rejilla de difracción, de acuerdo a la ecuación (1), en donde  $\theta_i$  es el ángulo de incidencia y  $\theta_m$  el del rayo difractado, ambos con respecto a la normal del plano de difracción,  $\lambda$ , la longitud de onda del rayo difractado,  $d$ , la distancia entre las ranuras de la rejilla y  $m$  el orden de difracción. La rejilla de difracción puede ser reflectora o transmisora. Finalmente, la luz difractada pasa por otra lente convergente o un espejo cóncavo que la enfoca sobre el elemento detector (Fig. 13).

$$\theta_m = \arcsen\left(\frac{m\lambda}{d} - \text{sen } \theta_i\right) \quad (1)$$



Los parámetros más importantes de un espectrómetro son el intervalo de longitudes de onda que puede analizar, y su resolución. Esta última, es la capacidad del instrumento de separar la luz en regiones con un ancho de banda finito y distinguir estas regiones entre sí [49], es decir, que tan cerca pueden estar dos líneas del espectro y aun así poder identificarlas.

Para simplificar aún más el diseño, en [48] se propone eliminar el segundo lente ampliando la distancia entre la rendija y el primer lente, que en lugar de funcionar como colimador, enfocará la luz directamente sobre el detector, creando una imagen real pero difractada de la luz que entra por la rendija sobre el mismo (Fig. 14). Esta modificación trae el inconveniente de que la luz que incide sobre la rejilla de difracción no lo hace de forma paralela sino ligeramente convergente, lo que resulta en una diferencia angular no uniforme en la luz difractada, incluso para una misma longitud de onda, y por ende en una imagen ligeramente borrosa sobre el detector. Pese a esto, la resolución del instrumento no debería verse afectada de forma considerable ya que de acuerdo con [48], este efecto puede ser despreciado.

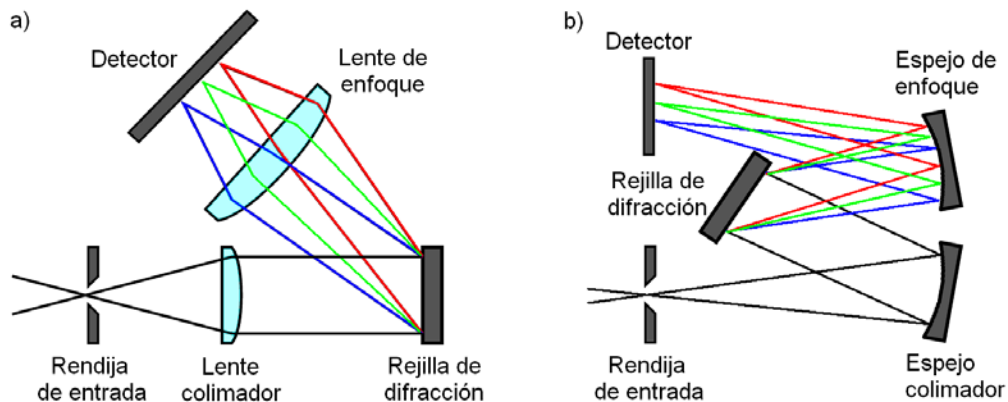


Fig. 13: Diagrama de la óptica de un espectrómetro de difracción: a) con lentes y b) con espejos.

En la construcción del espectroscopio se decidió utilizar este último diseño con el objeto de reducir el número de componentes necesarios y por lo tanto la complejidad del instrumento.

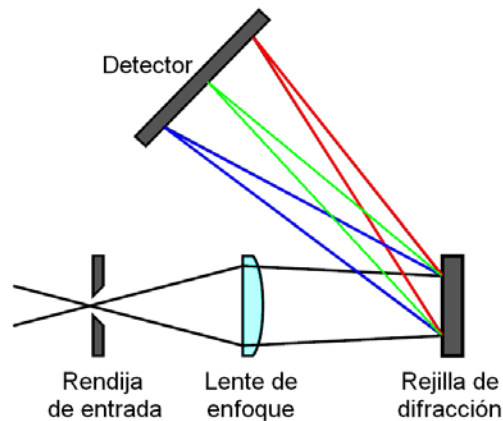


Fig. 14: Versión simplificada del espectrómetro de difracción con lentes.

La rendija de entrada se obtuvo colocando dos navajas de afeitar a una corta distancia la una de la otra (alrededor de 0.2 mm). Para el enfoque, se empleó un lente convergente en lugar de un espejo cóncavo, ya que son más fáciles de conseguir. Este lente se obtuvo del colimador de un láser de impresora. La distancia focal del mismo se midió con el método de Bessel resultando ser aproximadamente de 12 mm. El enfoque de la luz que entra por la rendija sobre el detector se puede hacer de acuerdo a la ecuación de las lentes delgadas:

$$\frac{1}{f} = \frac{1}{o} + \frac{1}{i} \quad (2)$$

Donde  $f$  es la distancia focal de la lente,  $o$  es la distancia del objeto a la lente e  $i$  es la distancia de la lente a la imagen.

A manera de rejilla de difracción se probaron fragmentos de discos compactos CD y DVD, como se propone en [45], los cuales tienen un buen desempeño, al menos para el rango del espectro visible. El CD tiene una densidad de 625 líneas por milímetro ( $d = 1.6 \mu\text{m}$ ) y el DVD de aproximadamente 1351 lín/mm ( $d = 740 \text{ nm}$ ).

El sistema óptico está montado sobre dos rieles de aluminio que forman un ángulo entre sí, en cuyo vértice se sitúa la rejilla de difracción sobre una montura que puede



rotar sobre su eje. De esta forma, se pueden variar los ángulos y distancias entre los componentes para ajustar el espectrómetro al rango de longitud de onda deseado (Fig. 15).

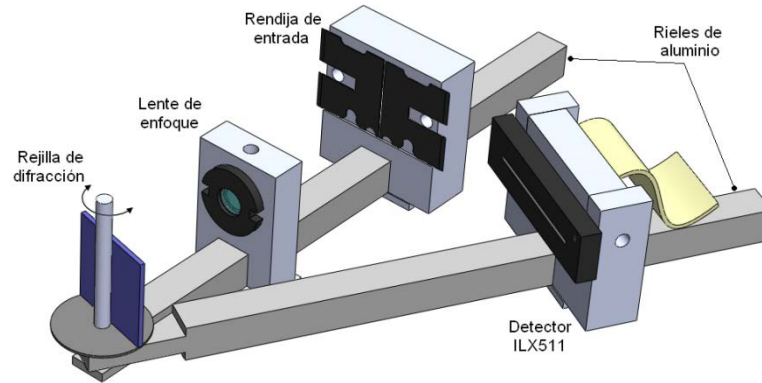


Fig. 15: Montaje del espectrómetro.

Para hacer llegar la luz desde la fuente de interés hasta la rendija de entrada del espectrómetro, se utilizó un tramo de fibra óptica del tipo Toslink (polimetilmetacrilato, multimodo,  $\phi 1$  mm). La gráfica de atenuación para este tipo de fibras se muestra en la Fig. 16 [50]. Todo el sistema se encuentra alojado en un gabinete plástico de paredes opacas, de manera que la luz externa y las reflexiones internas no interfieran con la medición.

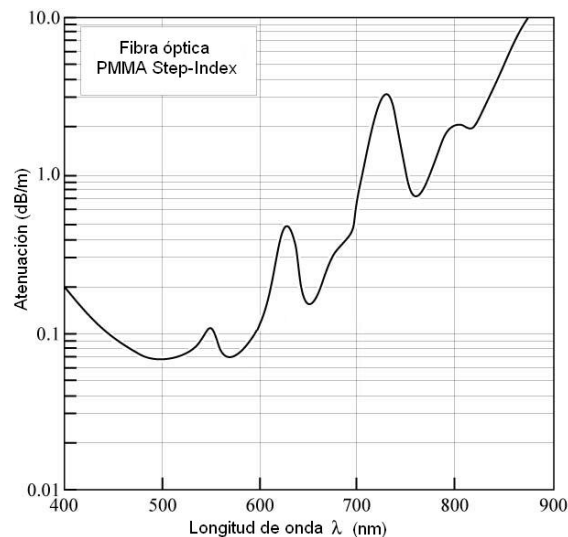


Fig. 16: Atenuación en fibras ópticas de PMMA.





Como detector se usó un sensor de imágenes de la marca Sony, modelo ILX511 (Fig. 17). Este detector es un dispositivo de carga acoplada (CCD por sus siglas en inglés) que cuenta con 2048 elementos sensores (píxeles) de 14  $\mu\text{m}$  de espesor dispuestos en una sola fila. La longitud de la porción sensible a la luz es de 28.67 mm. Este sensor se utiliza generalmente en la fabricación de escáneres de códigos de barras, aunque también es el elemento detector de varios espectrómetros modernos (Tabla 4). Debido a su amplio uso, su precio no es muy elevado. Tiene una buena sensibilidad en todo el espectro visible y parte del infrarrojo y ultravioleta Fig. 18 [51,52].

Se escogió un dispositivo CCD en lugar de uno CMOS como detector debido a que presenta una mayor sensibilidad y que ésta se puede variar fácilmente aumentando el tiempo de integración del sensor (tiempo de exposición a la luz).



Fig. 17: Detector ILX511.

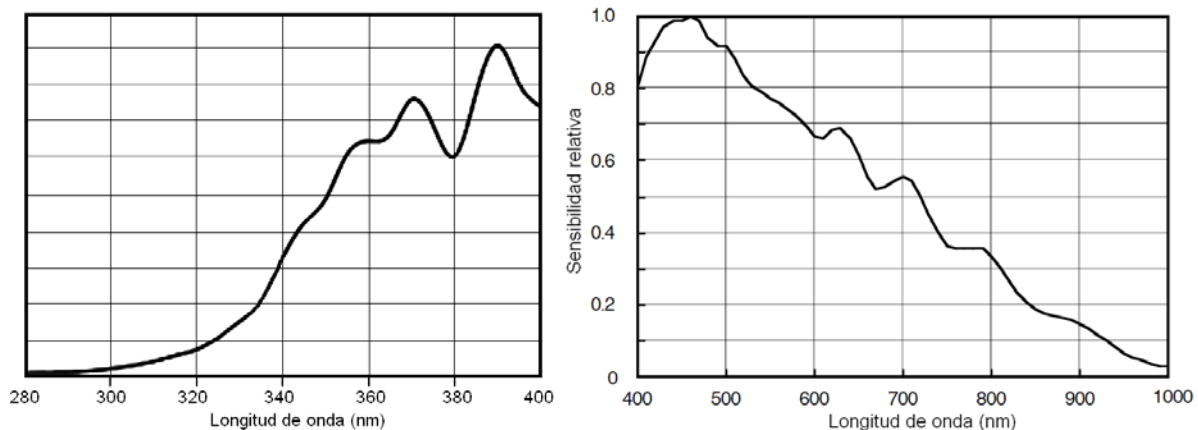


Fig. 18: Curva de sensibilidad del sensor ILX511 en los espectros UV (izquierda) y VIS-NIR (derecha).



Se diseñó y construyó un sistema para interpretar la señal de salida del sensor ILX511 y enviar esta información a la computadora, en donde un programa la recibe y grafica la intensidad luminosa registrada por cada pixel contra su posición en el sensor, que es proporcional a la longitud de onda de la luz que incidió sobre el mismo. El ILX511 manda de forma analógica y secuencial la respuesta de cada uno de sus pixeles. Esta señal es acondicionada con un amplificador operacional LM7332 y digitalizada con un convertidor analógico digital de 10 bits, AD9200. Los datos son almacenados directamente en una memoria RAM de 32 kilobytes para posteriormente ser enviados vía USB hacia el ordenador, con la ayuda de un microcontrolador PIC18F4550. El circuito completo se muestra en el Apéndice A. Ya que todos los componentes trabajan con una tensión de alimentación de 5 V, toda la electrónica utiliza como fuente de poder el mismo puerto USB.

El programa que recibe los datos y los grafica en la computadora fue escrito en Visual Basic 6 y cuenta con opciones para calibrar el espectro, aplicar un filtro de mediana a los datos, guardar las mediciones en un archivo, normalizar el espectro con respecto a la fuente de luz y variar la sensibilidad del espectrómetro (Fig. 19). Esto último se puede lograr al aumentar el tiempo de integración del sensor.

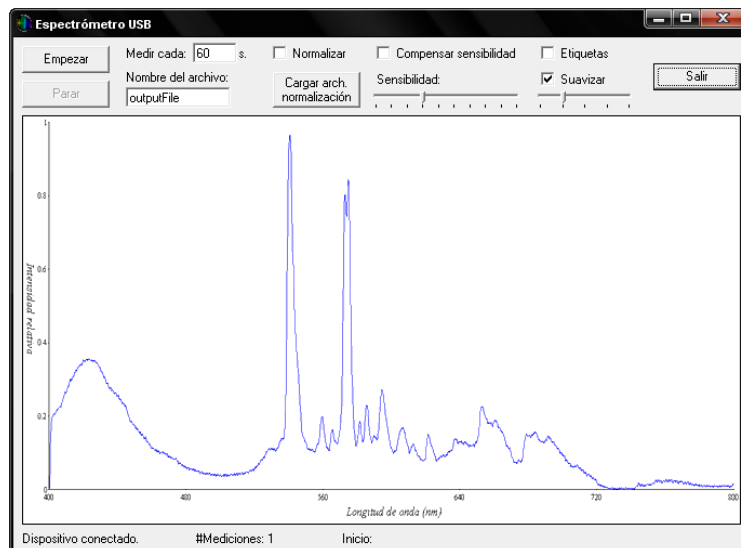


Fig. 19. Interfaz de usuario del espectrómetro óptico.



Como se mencionó anteriormente, el espectrómetro diseñado tiene la capacidad de ajustarse al intervalo de longitud de onda de interés. Para poder hacerlo, se debe variar el ángulo entre los rieles de aluminio donde está montado el sistema óptico, y cambiar las distancias entre la lente de enfoque y la gradilla de difracción, y entre ésta última y el detector. Esto se realiza deslizándolos sobre el riel, y ajustando con la ayuda de unos tornillos. La gradilla de difracción también tiene que ser girada cierto ángulo. Para facilitar este procedimiento, se colocó un pequeño disco graduado (transportador) sobre el vértice formado por los dos rieles.

Para saber a qué distancia se deben mover los componentes y a qué ángulo girar los rieles y la gradilla, se escribió un programa en MATLAB que toma como parámetros de entrada el límite inferior y superior del intervalo de longitud de onda, el espacio entre líneas de la rejilla de difracción usada, la distancia focal de la lente, el ángulo de incidencia de la luz sobre la rejilla y la longitud del elemento detector. Haciendo uso de las ecuaciones (1) y (2), y del esquema de la Fig. 20, calcula las distancias y ángulos requeridos para el ajuste. Se escogió por defecto el primer modo de difracción por ser el de mayor intensidad de luz, aunque esto puede ser cambiado también en el programa.

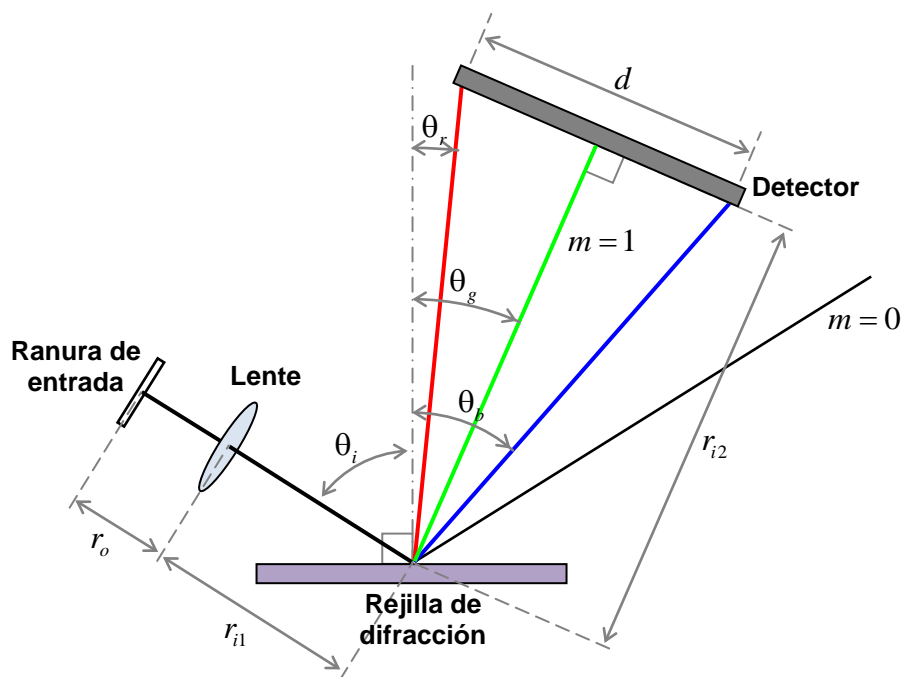


Fig. 20: Esquema del espectrómetro usado para su ajuste.



Del mismo modo se escribió otro programa en MATLAB, cuyos parámetros de entrada son el intervalo de longitud de onda, la rejilla de difracción usada y el ángulo de incidencia, que tiene la finalidad de graficar los primeros modos de difracción (-2, -1, 1 y 2) en el intervalo de longitud de onda seleccionado y verificar si éstos se sobreponen entre sí. Lo ideal es que no se sobrepongan, para evitar interferencias (Fig. 21).

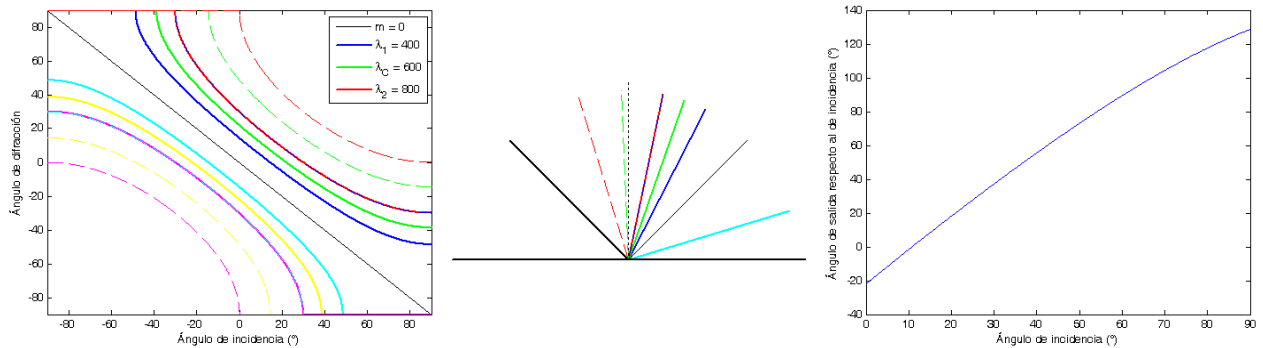


Fig. 21: Resultado del programa que grafica los órdenes de difracción.

La calibración del espectrómetro, es decir, el proceso de relacionar la posición de cada pixel con una determinada longitud de onda, se realizó tomando como referencia un espectro de luz conocido. La fuente que se eligió para este procedimiento es la de una lámpara de vapor de sodio de alta presión (HPS, por sus siglas en inglés) [53], de las que se utilizan comúnmente en el alumbrado público (Fig. 22), debido a que tiene picos de emisión bien definidos. De esta forma, conociendo la longitud de onda de ciertos puntos y su correspondiente número de pixel, se puede calcular la longitud de onda inicial y final del intervalo que está mostrando el espectrómetro. Estos valores se ingresan en la interfaz de usuario para que el programa calibre automáticamente el instrumento.

Este procedimiento se debe de efectuar cada que se alteran las distancias o ángulos entre los elementos del espectrómetro ya que, si bien el programa descrito anteriormente proporciona los parámetros adecuados para el ajuste del sistema óptico, siempre existen pequeños errores a la hora de realizar estos cambios físicamente, lo que conduce a un pequeño desajuste en la correlación entre los pixeles sobre el detector y su correspondiente longitud de onda.

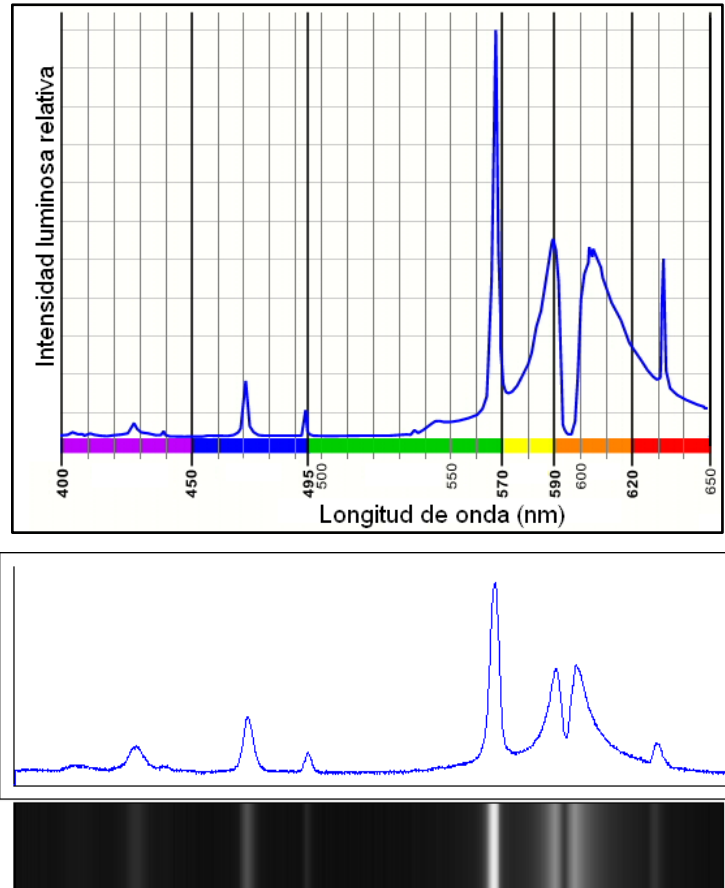


Fig. 22: Arriba: espectro de emisión típico de una lámpara HPS, tomado como referencia. Abajo: espectro adquirido de una lámpara HPS para calibrar el espectrómetro.

Una vez calibrado el aparato, el programa tiene también la opción de compensar la diferencia de sensibilidad del detector a lo largo del rango de longitud de onda seleccionado. Esto lo hace de acuerdo a las curvas de sensibilidad del ILX511 mostradas en la Fig. 18.

En la Fig. 23 se muestra el espectro de emisión de una lámpara fluorescente compacta (CFL). Del lado izquierdo se muestra el espectro tomado con un espectrómetro comercial Ocean Optics HR2000 [54] y a la derecha el obtenido con el espectrómetro construido. Nótese que el espectrómetro diseñado logra distinguir los picos en 584 nm y 587.6 nm cuya separación es de menos de 4 nm. La resolución del instrumento depende en mayor medida del ajuste de la rendija de entrada de la luz (la



distancia de separación entre las navajas) y del acho del intervalo de longitud de onda seleccionado.

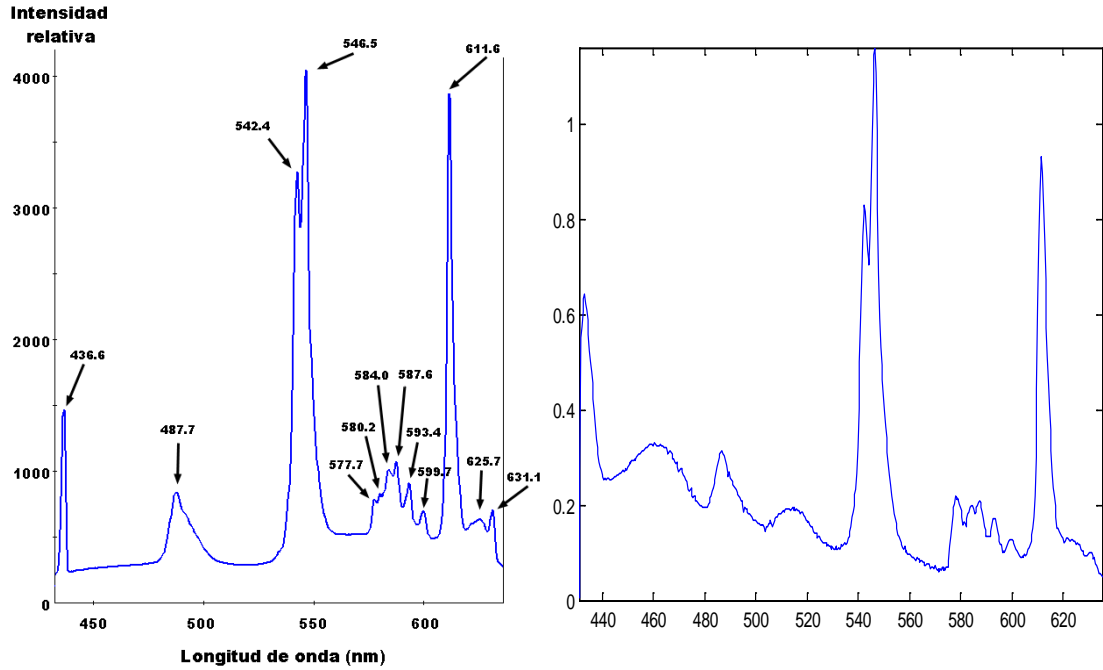


Fig. 23: Izquierda: espectro de emisión típico de una lámpara CFL. Derecha: espectro de emisión del mismo tipo de lámpara, registrado con el espectrómetro ya calibrado.

En la Fig. 24 se presenta el espectro de una lámpara de vapor de mercurio medido con el espectrómetro configurado con un ancho de banda de 400nm a 800nm.

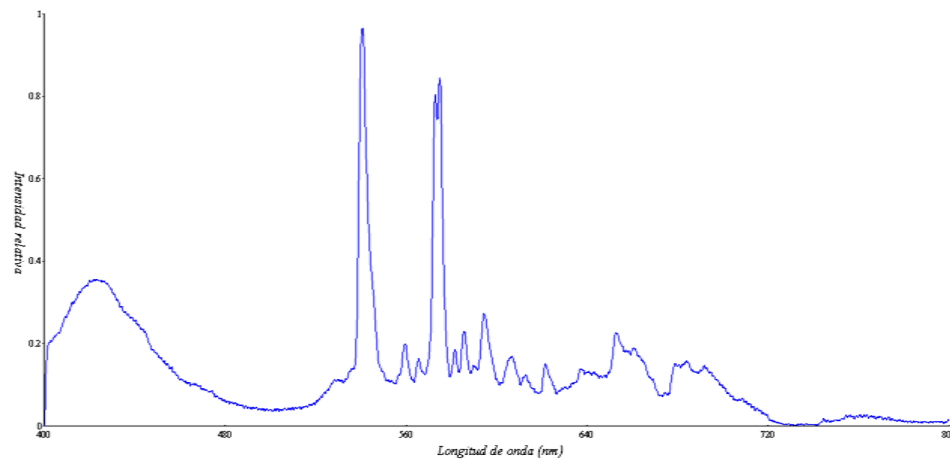


Fig. 24: Espectro de emisión medido de una lámpara de vapor de mercurio de alta presión.



#### 5.1.4. Pruebas realizadas (espectroscopía de fluorescencia).

Se colocaron el LED ultravioleta y la fibra óptica del espectrómetro sobre la piel a distintos grados de inclinación entre uno y otro, como se muestra en la Fig. 25. La zona de medición se cubrió para evitar interferencias de la luz ambiental. El LED fue alimentado con una fuente de corriente constante a 20 mA (su máxima potencia) y se realizaron mediciones con el espectrómetro esperando encontrar alguna señal en la región azul del espectro, tanto en la piel del antebrazo como en la del dorso de la mano. Sin embargo, aun con la máxima sensibilidad del espectrómetro (con un tiempo de integración de aproximadamente 30 ms por pixel), no se observó ningún rastro de fluorescencia. El tiempo de integración no se pudo aumentar más debido a que el detector CCD satura el voltaje del amplificador.

Esto puede deberse a distintas causas: la fuente de luz no tiene la potencia lumínica necesaria para producir fluorescencia de una intensidad detectable; o el espectrómetro no tiene la suficiente sensibilidad para medirla; o la piel puede estar atenuando demasiado la luz entrante de la fuente de excitación o la luz saliente producida por la fluorescencia; o una combinación de todas.

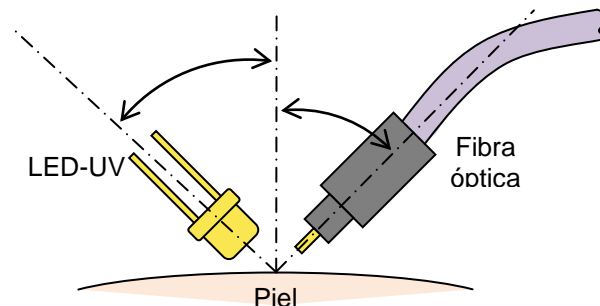


Fig. 25: Posicionamiento del LED-UV y la fibra óptica sobre la piel.

Pensando que la intensidad de la fluorescencia fuera el problema, se hizo un experimento similar pero reemplazando el espectrómetro por un fotodiodo y leyendo su respuesta con un circuito convertidor de corriente a voltaje acoplado a un amplificador lock-in (mismo que se describirá más adelante en la sección 5.6.8) y que, en pocas



palabras, ofrece una medición con una mayor sensibilidad y rechazo de ruido. No obstante, aun con esta técnica no fue posible detectar la auto-fluorescencia de la piel.

Lo descrito anteriormente se intentó también reemplazando la piel por un cultivo de levadura (1 g de levadura, 2 g de glucosa y una infusión de 20 g de papa en 100 ml de agua destilada [55]) para descartar que el grosor de la piel fuera el problema, sin obtener mejores resultados.

Dado que ni en esta ocasión se pudo obtener una señal detectable con los medios con los que se disponía, se concluyó que no iba a ser posible obtener información útil con esta técnica, por lo que la misma fue descartada.

## **5.2. Espectroscopía del infrarrojo cercano (NIR).**

La región del espectro correspondiente al infrarrojo cercano (NIR) comprende de los 700 nm a los 2500 nm. Este intervalo comprende características de absorción que se originan de transiciones electrónicas de baja energía así como de combinaciones y transiciones de sobretonos asociadas principalmente con los estados de vibración de los enlaces N–H, O–H y C–H. En el caso particular de la glucosa, aunque su banda de absorción fundamental se encuentra en el infrarrojo medio (alrededor de 9.6  $\mu\text{m}$ ), presenta otras bandas de absorción en el infrarrojo cercano que incluyen la banda de combinación entre 2 y 2.5  $\mu\text{m}$  y la banda del primer armónico entre 1.52 y 1.85  $\mu\text{m}$ . Algunos investigadores han usado longitudes de onda en la región entre 700 y 1300 nm que contiene sobretonos de mayor orden, con la desventaja de que a mayor orden del sobretono, menor será la absorción (< 0.1% comparado con la banda de absorción fundamental) [25]. Por otro lado, esta banda tiene la ventaja de una menor absorción causada por las moléculas de agua.

En un estudio *in vitro*, realizado con muestras de sangre [25], se determinó que las ventanas óptimas para la medición de la glucemia dentro del infrarrojo cercano son los intervalos que van de los 1380 – 1888 nm y de los 2044 – 2392 nm.





### 5.2.1. Espectrómetro óptico NIR.

Para poder realizar experimentos en las bandas de absorción de la glucosa dentro del infrarrojo cercano, se requiere de un espectrómetro que pueda funcionar en el intervalo de 1350 – 2400 nm. Por esta razón, se pensó en la posibilidad de modificar el espectrómetro que se diseñó previamente para funcionar en la región UV-VIS y adaptarlo para hacer lecturas en el intervalo NIR.

Con esto en mente, se adquirió una gradilla de difracción (Thorlabs GR13-0616) con 600 líneas por milímetro y una eficiencia optimizada para el rango de 1250 – 3000 nm. También se cambió la fibra óptica de PMMA (polimetilmetacrilato), que absorbe gran parte de la radiación NIR, por otra de sílice (Thorlabs FG200LEA) apropiada para esta banda del espectro. Como fuente de luz infrarroja, se vio la posibilidad de utilizar una lámpara halógena (General Electric FCR-100W) junto con un filtro paso alto con una frecuencia de corte en 1000 nm (LPF-RG1000-1203). Aunque el integrado ILX511 no está diseñado para trabajar en el intervalo del infrarrojo cercano, se pensó que quizás aumentando el tiempo de exposición (también llamado tiempo de integración) del sensor CCD, se podría adquirir una señal aceptable, ya que los detectores destinados a funcionar en este rango (detectores InGaAs) son muy costosos.

Se efectuaron algunas pruebas para verificar que el espectrómetro modificado pudiera medir en el intervalo NIR. Para esto se adquirieron LEDs infrarrojos con longitudes de onda pico en 1200 nm, 1612 nm, 1720 nm y 2150 nm (Roithner Lasertechnik, modelos LED1200, ML925B22F, ELD1720 y LED21 respectivamente), con potencias de emisión entre 1 y 5 mW. Las longitudes de onda de estos LEDs fueron elegidas por ser cercanas a los picos de absorción en las bandas de combinación, primer y segundo sobretonos de la glucosa [56,57]. Se intentaron medir los espectros de emisión de dichos LEDs con el espectrómetro, pero aun con el tiempo de integración más alto (30 ms por pixel), el detector ILX511 no fue capaz de percibirlos.



### 5.2.2. Pruebas realizadas (espectroscopía NIR).

Dado que no se pudo adaptar el espectrómetro UV-Vis para trabajar en el intervalo del infrarrojo cercano, se decidió aprovechar los LEDs infrarrojos para tratar de medir la absorbancia del tejido al menos en esas cuatro longitudes de onda. Esto se hizo de manera similar a lo efectuado en la espectroscopía de fluorescencia, es decir, se dispuso cada LED sobre la piel a distintos grados de inclinación, como se muestra en la Fig. 25, pero en lugar de la fibra óptica del espectrómetro, se adquirieron como detectores dos fotodiodos de InGaAs modelos PT511 y PD24, sensibles a longitudes de onda entre 850 nm y 1650 nm el primero, y entre 1400 nm y 2400 nm el segundo. Tanto los LEDs como los fotodiodos se instrumentaron con la ayuda del circuito construido para la oximetría de pulso que se detallará más adelante, en la sección 5.5.2, el cual incluye un amplificador de trans-impedancia con ganancia programable unido a un convertidor analógico digital, para la lectura de la señal del fotodiodo, y un controlador de corriente para el LED.

Primeramente, se verificó que los fotodiodos podían detectar la luz de los LEDs infrarrojos, colocándolos uno frente al otro y midiendo la respuesta de los detectores. Una vez hecho esto, se procedió a hacer pruebas sobre la piel. Como no se obtenían señales medibles, se pensó que tal vez la luz se estaba dispersando demasiado, dado que el ángulo de salida de los LEDs es amplio ( $> 30^\circ$ ). Para contrarrestar esto, se construyeron arreglos de lentes para enfocar la luz lo más posible sobre la piel. Para el diseño óptico se utilizó el programa Zemax OpticStudio 2009 (Fig. 26). Se repitieron los experimentos pero aun así no fue posible medir luz remitida por el tejido. También se intentaron experimentos de transmisión de la luz a través de las membranas interdigitales de la mano, obteniendo señales apenas distinguibles del ruido eléctrico. De la misma manera se intentó instrumentando tanto los LEDs como los detectores con la ayuda de un amplificador lock-in (del cual se hablará en la sección 5.6.8), sin obtener mejores resultados. Se concluyó que, o bien los LEDs adquiridos no tenían la potencia lumínica suficiente o la dispersión de la luz en la piel a esas longitudes de onda atenuaba demasiado la luz transmitida o remitida.

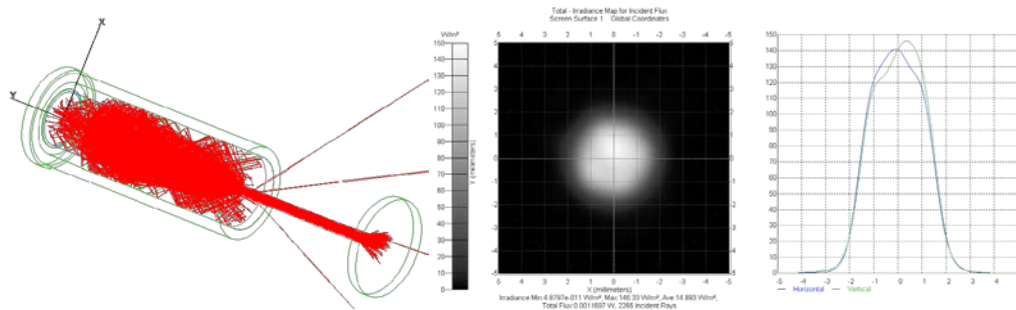


Fig. 26: Diseño óptico con el programa Zemax OpticStudio 2009

Considerando que los LEDs con las mismas longitudes de onda pero de mayor potencia incrementan su costo de manera considerable y que, igualmente, un detector de infrarrojos para el espectrómetro tiene un precio demasiado elevado, se optó por no hacer mayores intentos con esta técnica.

### 5.3. Espectroscopía de impedancia de radiofrecuencias (RF).

A lo largo de varios años, distintos grupos de investigación han estudiado la posibilidad de medir la concentración de glucosa en la sangre de manera indirecta, detectando los cambios que esta molécula induce en las propiedades dieléctricas del tejido. Esto mediante la medición de la atenuación de señales en el intervalo de radiofrecuencia e incluso microondas al pasar a través del tejido o sustancia en estudio.

Por un lado, se ha demostrado que se producen cambios medibles en el módulo de la impedancia [58] así como en la permitividad eléctrica (y por tanto, en los parámetros S) en soluciones de glucosa en agua a distintas concentraciones [59,60].

En otro estudio realizado por Topsakal *et al.* [61], se expuso una correlación entre la concentración de glucosa del plasma sanguíneo y algunos de sus parámetros dieléctricos (la permitividad relativa y la conductividad). También, como ya se había mencionado, en otro estudio se manifestó una correlación entre la glicemia y las propiedades dieléctricas de la sangre entera, en un experimento *in vitro*, mediante el



acoplamiento electromagnético entre dos bobinas a través de un tubo de vidrio por el que se hacía circular sangre de donadores [19].

Por otro lado, se pueden encontrar varios artículos donde se han hecho simulaciones con programas de análisis de elemento finito especializados en sistemas electromagnéticos, en los que se propone una antena emisora, con determinadas características geométricas, la cual se coloca en contacto con un objeto hecho de distintas capas de materiales, cada una con sus respectivas permitividades y conductividades eléctricas que simulan ser las diversas capas de la piel y la sangre. Dentro de todos los diseños de antena que se proponen, los que presentan un mayor cambio en la señal al simularlo con o sin el tejido en contacto con esta, son las antenas con forma de espiral [62,63].

Asimismo, en otros estudios han llegado más lejos y además de diseñar y simular la antena adecuada, han hecho algunos experimentos *in vivo* en personas voluntarias. Tal es el caso de Kumar *et al.* [64] quienes diseñaron y simularon una antena en forma de espiral (con ayuda del software Sonnet Lite Project Editor) que posteriormente fabricaron en una tarjeta de circuito impreso (PCB). Dicha antena fue colocada en el brazo de un voluntario mientras, con la ayuda de un circuito de propia elaboración, midieron los parámetros  $|S_{11}|$  y  $|S_{21}|$  (coeficiente de reflexión y ganancia en voltaje, respectivamente) en un intervalo de frecuencia de 500 MHz a 2 GHz. A la par, cada cinco minutos y durante hora y media, se midió la glucosa en sangre al voluntario con la ayuda de un glucómetro convencional. Según los autores, se obtuvo una buena correlación entre las mediciones hechas con el glucómetro y los valores obtenidos para el parámetro  $|S_{21}|$  ( $R^2 = 0.9639$ ).

En otro estudio realizado por Jean *et al.* [23], se utiliza de igual manera una antena impresa en forma de espiral puesto que, según los autores, por su simetría circular, esta forma la hace menos sensible a variaciones debidas a la orientación en la que se disponga. También en este caso miden el parámetro  $|S_{21}|$  pero en un rango de frecuencias de 10 MHz a 2GHz con la ayuda de un analizador de redes vectorial. En un



primer experimento, un voluntario con ayuno de ocho horas, se bebió rápidamente una solución azucarada, e inmediatamente se comenzaron a tomar los datos del analizador de redes durante un periodo de dos horas, mientras utilizaba el sensor sobre la parte anterior de la muñeca. De los datos obtenidos se seleccionaron las frecuencias en las que se presentaban los máximos o mínimos de ganancia y estos puntos se graficaron contra el tiempo, obteniendo un comportamiento similar al que se esperaría encontrar al medir los niveles de glicemia durante la prueba, es decir, un aumento de los valores medidos pasados unos minutos después de la ingesta, alcanzando un máximo aproximadamente a la hora de iniciado el experimento, para posteriormente disminuir de regreso a los niveles iniciales después de dos horas de registro.

En un segundo experimento, la antena en espiral fue modificada un poco para ajustarse al área del dedo pulgar, en donde se midió el parámetro  $|S_{21}|$  a cinco voluntarios, un total de 15 muestras por sujeto, de manera aleatoria, usando frecuencias de 100 MHz a 5 GHz. Subsecuente a cada registro, al participante se le media la glicemia con ayuda de un glucómetro comercial, obteniendo una buena correlación entre los valores adquiridos con el glucómetro y los calculados con el método espectrométrico.

### **5.3.1. Sistema para pruebas de espectroscopía de impedancia de RF.**

De forma análoga al trabajo realizado por Jean *et al.*, se buscó diseñar una antena en espiral con la cual poder hacer mediciones de impedancia de radiofrecuencias. Para esto, se utilizó el software ANSYS Electromagnetics Suite 15 en el que se simulon distintas configuraciones de antenas. Se eligió dicho programa ya que es fácil de utilizar y cuenta con una librería de materiales biológicos (piel, tejido adiposo, sangre, etc.) con los que se pudieron simular las distintas capas de tejido que conforman la piel.

La primer antena diseñada fue una en espiral circular de aproximadamente 3.5 vueltas, un diámetro exterior de 18 mm y un grosor de pista de alrededor de 0.9 mm, hecha de cobre con un espesor de 35  $\mu\text{m}$ , montada sobre una placa de material FR4 de



1.54 mm de espesor, comúnmente utilizado para la fabricación de circuitos impresos (Fig. 27, izquierda). El ancho de pista y el número de vueltas de la espiral se eligieron de forma que la antena tuviera una impedancia característica de aproximadamente  $50 \Omega$ , por razones que se verán más adelante.

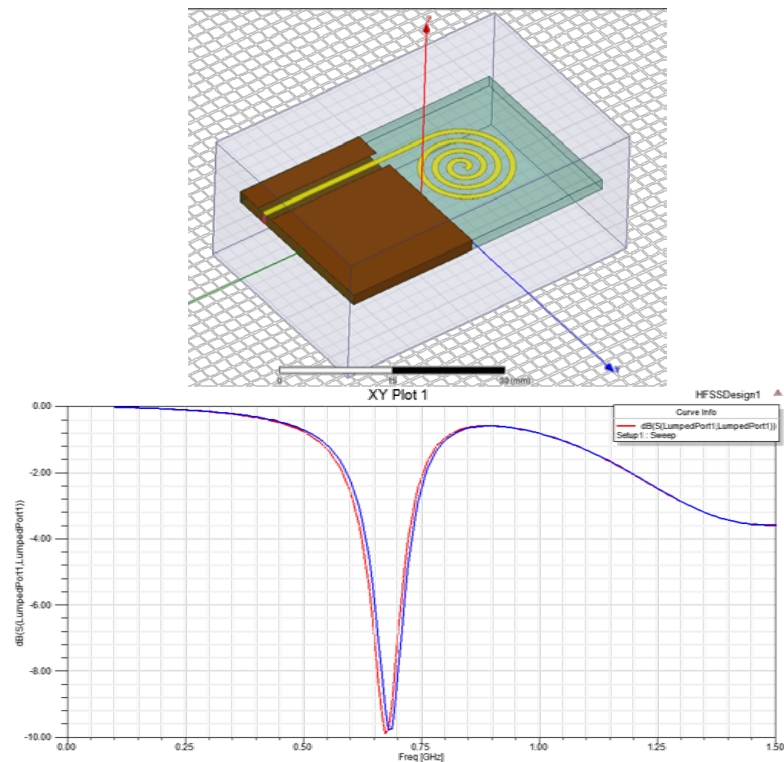


Fig. 27: Modelo de antena en espiral circular y su respuesta en frecuencia.

Para el modelo de piel, se colocaron varias capas de diferentes materiales, con distintos espesores apiladas una sobre otra como sigue: una capa de 0.015 mm de espesor con los parámetros dieléctricos correspondientes a la piel seca, a manera de epidermis; una capa de 0.3 mm de piel húmeda, como dermis; una capa de 0.2 mm de tejido adiposo; una capa de 0.5 mm de sangre; una capa de 0.2 mm de músculo; y finalmente una capa de 1 mm de hueso. Los espesores de las distintas capas se definieron de acuerdo a los modelos utilizados por Pimentel *et al.* y Kumar *et al.* [62,63].

La simulación de la respuesta de la antena se puede apreciar en la Fig. 27 (derecha), en un intervalo de frecuencia de 100 MHz a 1.5 GHz, en la que se mide el



parámetro  $|S_{11}|$ . En azul se ve el comportamiento de la antena al aire y en rojo cuando se sobrepone el modelo de piel. Como se puede observar, la antena tiene un pico de ganancia aproximadamente a los 680 MHz y existe un desplazamiento de esa frecuencia al superponer el modelo de piel. Sin embargo dicha traslación no es muy notable, por lo que se propuso otra geometría de antena en la cual el cambio fuera mayor.

La nueva antena se diseñó como una espiral rectangular, con 15 mm de ancho y 28 mm de largo, 4 vueltas aproximadamente y un espesor de la pista de alrededor de 1 mm. Esta vez, en lugar de utilizar el material FR4, se usó un sustrato flexible (PVC) de forma que la antena se pudiera doblar en semicírculo para adaptarse mejor a la curvatura de un dedo (Fig. 28, izquierda). El espesor del cobre fue de aproximadamente 35  $\mu\text{m}$ . La antena se colocó dentro de un orificio de 13 mm de diámetro realizado dentro de un cubo de acrílico transparente (polimetilmetacrilato), de forma que cupiera la punta del dedo índice. De igual manera, la geometría de la espiral se ajustó de forma que la antena tuviera una impedancia cercana a los 50  $\Omega$ .

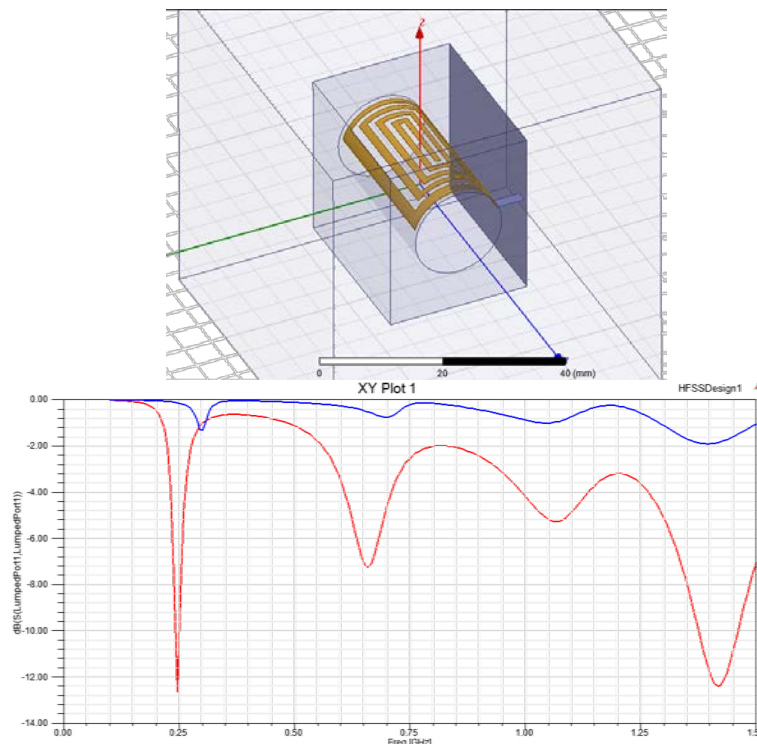


Fig. 28: Modelo de antena en espiral rectangular y su respuesta en frecuencia.



En esta ocasión, para hacer el modelo de un dedo dentro de la cavidad de la antena, se utilizaron los mismos materiales que en la simulación anterior, sólo que esta vez en lugar de apilar capas planas, se utilizaron cilindros concéntricos, respetando los espesores. Esto es: un cilindro hueco exterior de 0.015 mm de espesor con el material de piel seca; otro cilindro de 0.3 mm de espesor, de piel húmeda; uno de 0.2 mm de tejido adiposo; uno de 0.5 mm de sangre; otro de 0.2 mm de músculo; y finalmente un último cilindro interior de 5 mm de radio que simula el hueso.

La simulación se corrió igualmente de 100 MHz a 1.5 GHz (Fig. 28, derecha). En azul se muestra el comportamiento de la antena con aire dentro de la cavidad, y en rojo la respuesta de la misma con el modelo de dedo en su interior. En esta ocasión, la antena presenta cuatro picos de ganancia en 300 MHz, 700 MHz, 1.05 GHz y 1.4 GHz, los cuales se desplazan aproximadamente a 250 MHz, 660 MHz, 1.07 GHz y 1.42 GHz con el modelo de dedo presente. Además también hay un incremento importante en la magnitud de la ganancia a dichas frecuencias.

Para verificar los resultados obtenidos en las simulaciones, ambas antenas fueron fabricadas con la misma geometría y materiales utilizados en la simulación. Para realizar el análisis en frecuencia de las mismas, se ocupó un analizador de espectro Rigol DSA850, cuya impedancia de salida es de 50  $\Omega$ , razón por la cual las antenas se diseñaron con esta misma impedancia, para maximizar la transferencia de potencia. Aunque los picos de ganancia variaron en frecuencia con respecto a la simulación, debido a pequeños errores a la hora de manufacturarlas y a algunas diferencias en las propiedades dieléctricas de los materiales, se pudo constatar que en el caso de la antena en espiral circular, la variación de su respuesta al aire comparada con su comportamiento cuando se ponía en contacto con la piel del antebrazo, no era muy diferente. En cambio, en el caso de la espiral rectangular, esta variación era sustancial, como sucedía en la simulación.





### 5.3.2. Pruebas realizadas (espectroscopía de impedancia de RF).

Con el objeto de replicar el primer experimento descrito por Jean *et al.* [23], se hizo un programa en LabView para controlar el analizador de espectro de forma que se pudiera hacer una medición del parámetro  $|S_{21}|$  de la antena en el intervalo de 10 MHz a 1.5 GHz cada 30 segundos (Fig. 29).

Para el experimento se utilizó la antena en espiral rectangular, que es la que tenía una variación más marcada de su respuesta. Un voluntario, con ayuno de 8 horas, introdujo su dedo dentro de la cavidad de la antena y se comenzaron a registrar los datos del analizador de espectro. Pasados 15 minutos aproximadamente, tiempo tomado para tener una respuesta basal del sensor, el sujeto ingirió 500 mL de una solución glucosada al 10%, a partir de lo cual se tomaron 3 horas más de registro con el individuo en reposo y con la indicación de evitar mover, en manera de lo posible, el dedo de su sitio. Este experimento se repitió con la misma persona en tres días distintos, aproximadamente a la misma hora (por la mañana).

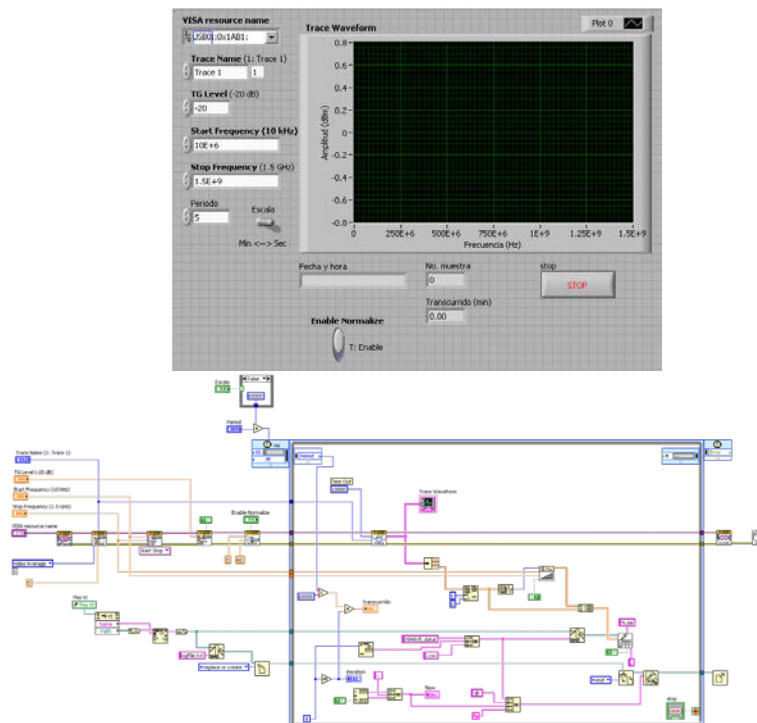


Fig. 29: Programa realizado para controlar y adquirir los datos del analizador de espectro.



Los resultados obtenidos de una de estas sesiones se aprecian en la Fig. 30. Las líneas azules son los primeros registros tomados mientras que las rojas son los últimos. Como se observa, existen varios picos de ganancia de la antena en los cuales su magnitud tiene una buena variación a lo largo del tiempo.

Dentro de estos picos, se seleccionaron las frecuencias a las cuales, al graficar la magnitud en función del tiempo, se obtuviera una respuesta parecida a la que se esperaría encontrar en una prueba de tolerancia a la glucosa, como se conoce comúnmente a este tipo de experimento, es decir, en los cuales se viera una tendencia creciente durante la primera hora de registro, correspondiente con un aumento en la concentración de glucosa en la sangre, y luego, pasada una hora a partir de que se ingirió la bebida glucosada, una respuesta decreciente, debida la absorción de la glucosa por las células con la consiguiente disminución de su concentración en la sangre, hasta alcanzar nuevamente los valores basales, pasadas dos horas desde la ingesta; esto, para sujetos con un metabolismo sin alteraciones.

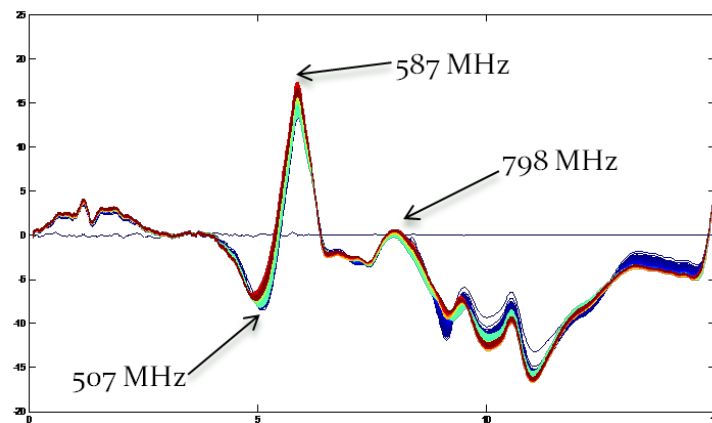


Fig. 30: Respuesta en frecuencia a lo largo del tiempo de registro de una de las sesiones del experimento.

Dicho comportamiento se observó para las frecuencias marcadas en la Fig. 30 (a 507, 587 y 798 MHz) para uno de los días de medición, mas no para los demás días, en los que, a pesar de que la respuesta de la antena en general conservaba la misma forma, el comportamiento en dichas frecuencias en función del tiempo ya no era creciente-decreciente sino sólo creciente o incluso un comportamiento inverso,



decreciente-creciente, como se observa en la Fig. 31, en la que pasadas las tres horas de registro, los valores de ganancia obtenidos no llegan a bajar a los valores iniciales.

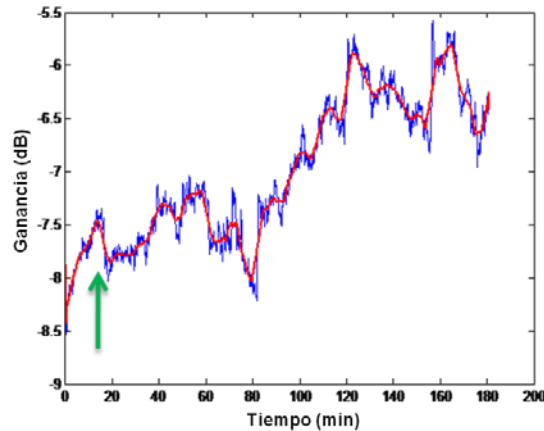


Fig. 31: Respuesta de la antena a 507 MHz durante el tiempo de registro. La flecha indica el momento de la ingesta de la bebida glucosada.

Por otro lado, se notó que las dos antenas diseñadas presentaban una considerable variación de su espectro debida a cambios en su colocación o al movimiento (del antebrazo en el caso de la antena circular y a pequeños movimientos del dedo, en el caso de la rectangular), por lo que seguramente las variaciones que se midieron en los registros se deban en mayor medida a artefactos de movimiento que a los cambios de concentración de la glucosa. Para que ésta técnica pudiera ser útil, primero se debe de idear una forma de compensar estas desviaciones.

#### 5.4. Espectroscopía de impedancia eléctrica.

La espectroscopía de impedancia eléctrica (EIS, por sus siglas en inglés) es una técnica ampliamente usada para evaluar las propiedades eléctricas de los materiales en función de la frecuencia de una señal eléctrica de excitación. Este método es de gran interés debido a que resulta una forma de análisis no destructiva, esto es, la muestra bajo estudio no sufre daño alguno (siempre y cuando la corriente utilizada sea lo suficientemente baja). Es por esta razón que en el caso particular de las ciencias



biológicas, las mediciones de impedancia eléctrica sobre tejidos y sistemas vivos, han sido utilizadas desde hace ya varios años en una gran variedad de aplicaciones [65].

Las propiedades dieléctricas de los materiales biológicos cambian de forma característica dependiendo de la frecuencia de excitación, mostrando una alta permitividad eléctrica a bajas frecuencias, la cual disminuye en escalones más o menos bien definidos al aumentar la frecuencia, los cuales son llamados dispersiones. Cada dispersión responde a distintos mecanismos, dependiendo de la longitud de onda de la señal electromagnética. Las tres dispersiones más notables son la  $\alpha$ , a bajas frecuencias, la  $\beta$ , en el ancho de banda de la radiofrecuencia, y la  $\gamma$ , en el orden de las microondas (Fig. 32) [66].

En el contexto de la medición de glucosa en sangre, varios esfuerzos se han hecho, empezando por Hayashi *et al.* [67] quienes descubrieron que los cambios en la concentración de glucosa sérica afectan las propiedades dieléctricas de la membrana de los eritrocitos.

Desde entonces, varios grupos de investigación han intentado medir la glicemia con esta técnica, utilizando distintas regiones del espectro. Tal es el caso del grupo de investigación de Caduff *et al.* quienes utilizan frecuencias en el intervalo de 1 a 200 MHz [68,69]. Ellos utilizan la impedancia de la piel como un elemento dentro de un circuito resonador. Encontraron que la frecuencia de resonancia de dicho circuito se correlacionaba con el nivel de glucosa en la sangre.

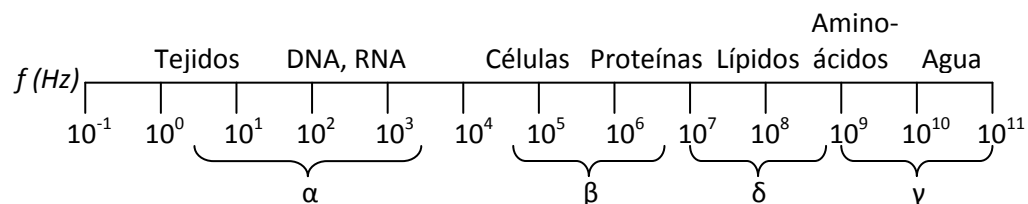


Fig. 32: Intervalos de frecuencia de las dispersiones dieléctricas en los materiales biológicos.



Park *et al.* [70], trabajando con bajas frecuencias, de 10 kHz a 10 MHz, encontraron una correlación inversa entre la parte real e imaginaria de la constante dieléctrica de la piel y la concentración de glucosa en la sangre.

#### 5.4.1. Espectrómetro de impedancia eléctrica

Existen distintas variantes para efectuar el barrido en frecuencia en la espectroscopía de impedancia. En algunas de ellas se estimula directamente con una señal eléctrica, generalmente sinusoidal, a la cual se hace variar su frecuencia. En otras se aplica un pulso cuadrado para excitar y posteriormente se utiliza la transformada de Fourier para obtener su respuesta en frecuencia.

Dentro de las técnicas que efectúan directamente el barrido en frecuencia, existen además variantes en cuanto al número de electrodos que se utilizan (dos, tres o cuatro electrodos), y la forma de estimular, ya sea con tensión constante o con corriente constante.

En el método de dos electrodos se hace circular una corriente constante ( $I_0$ ) a través de dos electrodos ( $Z_{e1}$  y  $Z_{e2}$ ), Fig. 33a. El detector es conectado a través de los mismos electrodos de forma que el voltaje medido ( $V_0$ ) es una función de la impedancia entre los electrodos, como se aprecia en la ecuación (3). Si se conoce el valor de impedancia de los electrodos, se puede saber el valor de la de interés ( $Z_x$ ).

$$\frac{V_0}{I_0} = Z_{e1} + Z_{e2} + Z_x \quad (3)$$

En el método de tres electrodos se aplica una corriente ( $I_0$ ) a través de dos electrodos ( $Z_{e1}$  y  $Z_{e2}$ ), uno de los cuales se toma como referencia. El voltaje ( $V_0$ ) se detecta entre un tercer electrodo ( $Z_{e3}$ ) y el electrodo de referencia ( $Z_{e2}$ ), Fig. 33b. La diferencia de tensión medida corresponde a la caída de tensión provocada por la



corriente que se aplica a la impedancia de interés ( $Z_x$ ) y el segundo electrodo. Al igual que en el caso anterior, si se conoce el valor de impedancia del electrodo de referencia, se puede calcular el de la impedancia desconocida.

$$\frac{V_0}{I_0} = Z_{e2} + Z_x \quad (4)$$

Sin embargo, no siempre es posible conocer la impedancia de los electrodos, ya sea porque ésta varíe con el tiempo o el área de contacto, como sucede con los electrodos de superficie, o bien, cuando el electrodo está en contacto con otra impedancia desconocida y que no es de interés. Esto último sucede, por ejemplo, cuando se desea conocer la impedancia del tejido subcutáneo. En ese caso, la impedancia de la piel tiene un valor desconocido y que debe de ser eliminada si se desea conocer la del tejido de interés. Para estos casos existe la configuración de cuatro electrodos.

Este método consiste en aplicar una corriente ( $I_0$ ) a través de dos electrodos ( $Z_{e1}$  y  $Z_{e4}$ ) y medir la tensión en otros dos electrodos distintos ( $Z_{e2}$  y  $Z_{e3}$ ), Fig. 33c. Con este método se consigue eliminar la influencia de la impedancia de los electrodos, siempre y cuando estos tengan una impedancia pequeña en comparación con la impedancia de entrada del circuito utilizado para medir el voltaje  $V_0$  y no provoquen la saturación de la fuente de corriente. En el caso de realizar medidas superficiales, también se reduce el efecto de la impedancia de la piel ya que queda en serie con los electrodos.

De esta forma, la impedancia desconocida se calcula simplemente dividiendo la tensión medida entre la corriente aplicada.

$$\frac{V_0}{I_0} = Z_x \quad (5)$$

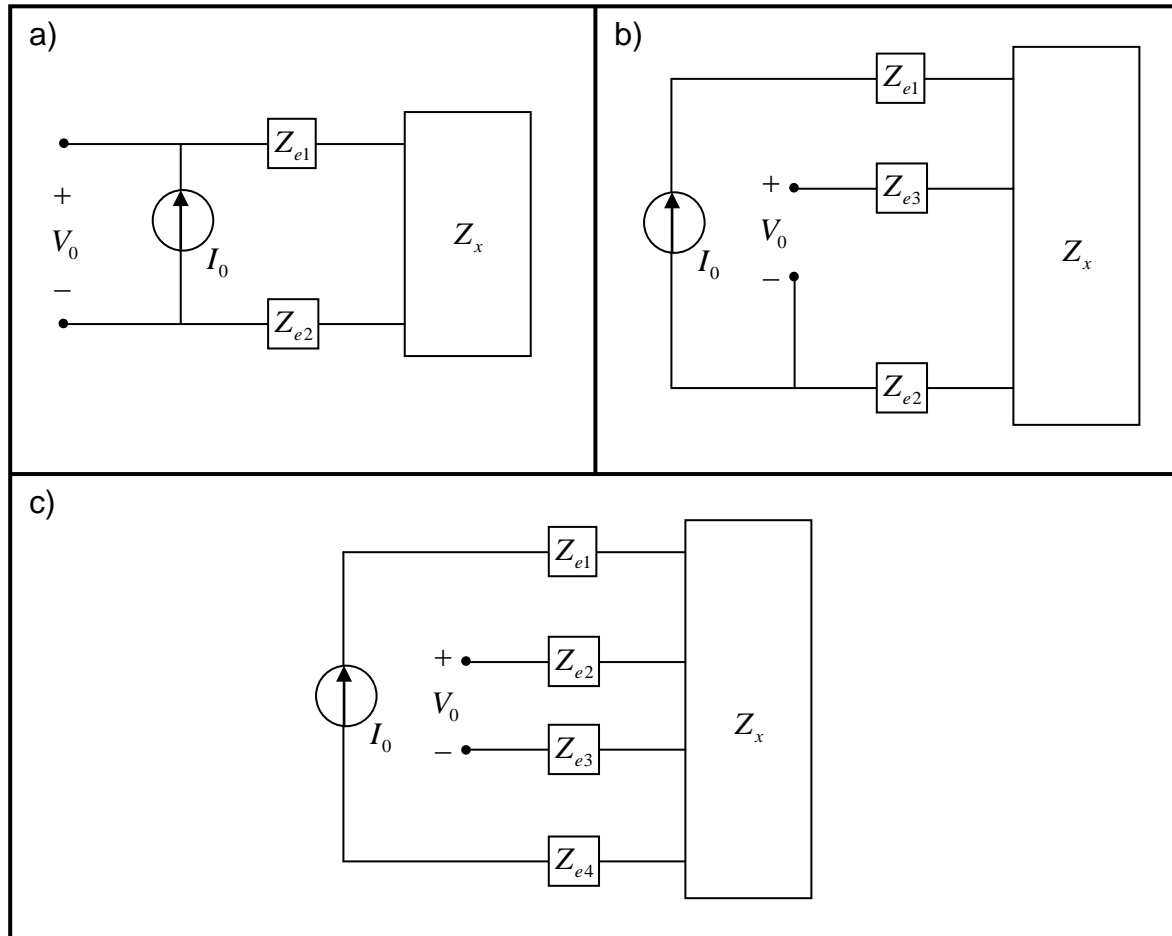


Fig. 33: Configuración de los electrodos usados en la espectroscopía de impedancia: a) con dos electrodos; b) con tres electrodos; y c) con 4 electrodos.

En cualquiera de estas tres configuraciones, la corriente necesaria para excitar el circuito se puede generar con una fuente de corriente constante o una de tensión constante. Si se utilizara ésta última, se tendría que agregar una resistencia adicional en serie con la fuente y medir la caída de tensión en la misma con el objeto de conocer en todo momento el valor de la corriente que se está suministrando.

De todas las configuraciones descritas arriba, se decidió utilizar la de cuatro electrodos con una fuente de corriente constante. Se escogieron los cuatro electrodos para aumentar la versatilidad del sistema y que pudiera hacer mediciones sin tener que tomar tanto en consideración el tipo de electrodo empleado. La razón de inclinarse por la fuente de corriente constante fue la de proteger el sistema a medir, pues al hacer uso



de una tensión constante no se tiene un control adecuado de la corriente máxima que puede circular por el objeto de estudio. Si ésta es excesiva, lo podría dañar. En el Apéndice B se presenta el diagrama eléctrico del sistema.

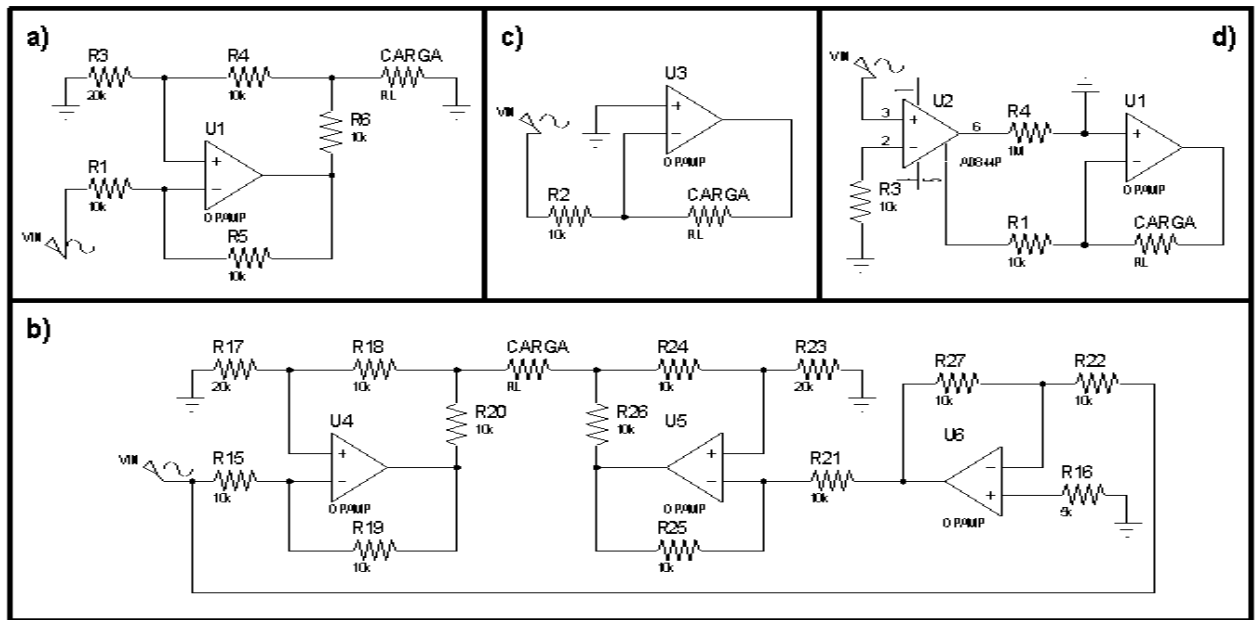


Fig. 34. Distintas configuraciones ensayadas para la fuente de corriente.

Para la elaboración de la fuente de corriente constante, se consideraron distintas topologías. En primer lugar se intentó con una fuente de corriente Howland modificada (Fig. 34a). Si bien esta configuración asegura un corriente bastante estable, se tuvieron problemas al intentar suministrar dicha corriente a frecuencias superiores a 1 MHz. La retroalimentación del amplificador operacional en este circuito hace que su ancho de banda se vea dramáticamente reducido. Esta misma situación se presentó con las demás configuraciones que se probaron: fuente de corriente Howland bipolar (Fig. 34b), convertidor de voltaje a corriente (Fig. 34c) y convertidor voltaje-corriente con seguidor de corriente (Fig. 34d).



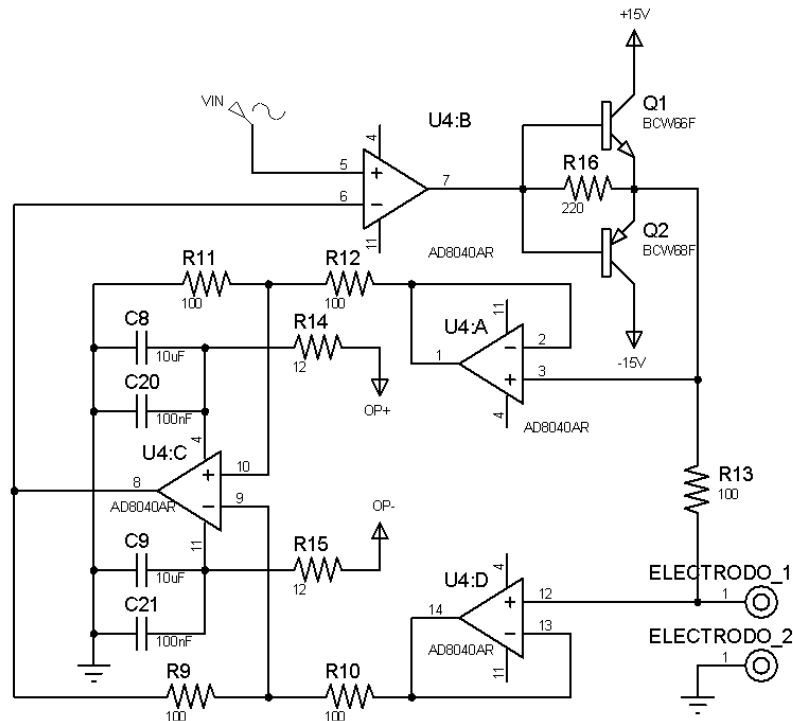


Fig. 35. Circuito usado para la fuente de corriente.

Posteriormente se intentó con una otra configuración en la que las retroalimentaciones de los amplificadores operacionales mantienen una ganancia unitaria, y de esta forma el ancho de banda no se ve tan comprometido (Fig. 35). Esta topología fue la que finalmente se utilizó en el circuito. El amplificador U4:B proporciona un voltaje en su salida tal que la diferencia de tensión entre sus entradas inversora y no inversora sea igual a cero. Dicho voltaje hace circular una corriente que fluye por R13 y la carga (impedancia desconocida) hacia tierra. Dicha corriente genera una caída de tensión en R13 que es medida por U4:A, U4:C y U4:D, y retroalimentada hacia U4:B, que hará que la caída de tensión en R13 sea igual al voltaje de la señal de control ( $V_{in}$ ). De esta forma, la corriente que suministra la fuente está dada por la ecuación (6). El amplificador que se empleó para esta etapa es un AD8040.

$$I_o = \frac{V_{in}}{R_{13}} \quad (6)$$



Los transistores Q1 y Q2 actúan como un seguidor de voltaje y proporcionan la corriente necesaria. Las resistencias y capacitores a la entrada de las alimentaciones del amplificador filtran el ruido de la fuente.

El circuito anterior suministrará una corriente proporcional a la señal de excitación. Dicha señal será una senoide que deberá poder variar su frecuencia en todo el intervalo deseado, es decir, de 1 Hz hasta 10 MHz. Para producirla, se empleó el integrado AD9833 el cual es un generador de formas de onda programable (Fig. 36). Se controla mediante comunicación serial (SPI de 3 líneas) y, alimentado con una señal de reloj de 100 MHz, puede generar ondas sinusoidales de hasta 12.5 MHz, con una resolución de 0.37 Hz. La salida de este integrado tiene una amplitud que va de los 38 mV hasta los 650 mV, es decir, que es una senoide de 306 mV de amplitud, montada sobre un voltaje de 344 mV. Para eliminar esta tensión de CD, se hace pasar por un filtro pasa altas ( $f_c = 0.7$  Hz) y un seguidor de voltaje. Finalmente, antes de ser enviada a la fuente de corriente, se atenúa con un potenciómetro que hace de divisor de tensión. De esta forma, al variar la relación de la resistencia variable, se puede controlar la magnitud de la corriente de excitación.

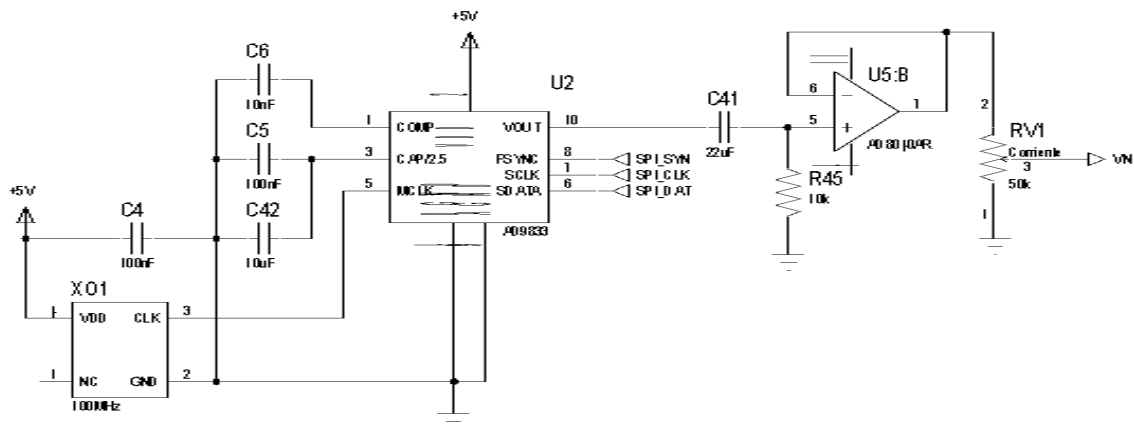


Fig. 36. Circuito generador de la señal de barrido en frecuencia.

La medición de la caída de tensión provocada por el flujo de corriente en la impedancia bajo estudio se realiza mediante tres amplificadores que tienen una configuración semejante a la del amplificador de instrumentación con ganancia unitaria



(U5:A, U5:B y U5:C), Fig. 37. El amplificador operacional usado para este fin es el AD8040, con un ancho de banda en ganancia unitaria de 125 MHz, y una resistencia de entrada de 6 M $\Omega$ . Posteriormente le siguen cuatro etapas de amplificación en serie, con una ganancia de diez cada una. Las tres primeras están destinadas a la medición de la amplitud de la señal, y la cuarta a medir la fase de la misma. La selección de la ganancia adecuada ( $\times 1$ ,  $\times 10$ ,  $\times 100$  o  $\times 1000$ ) se hace de manera automática mediante un multiplexor analógico HEF4052, que es manejado por el microcontrolador. Las etapas de amplificación se realizaron con el operacional LMH6626. Todos los integrados tienen un filtro pasa bajas en la alimentación, para reducir el ruido de la fuente.

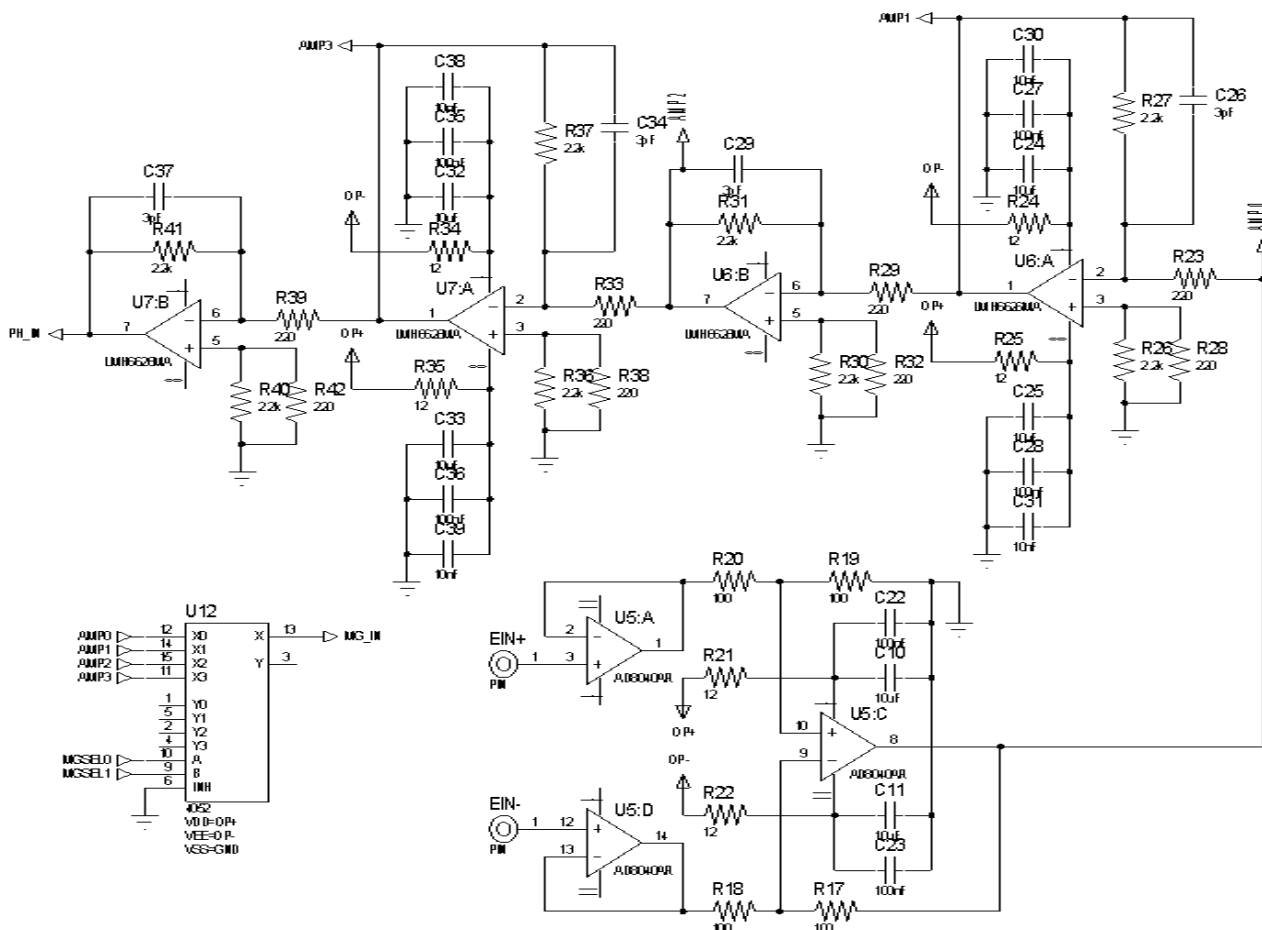


Fig. 37. Circuito de medición de la caída de tensión en la impedancia desconocida y amplificación.

Posterior a las etapas de amplificación, la señal que ha sido canalizada por el multiplexor llega a un rectificador de precisión de onda completa (Fig. 38) y luego a un



filtro pasa bajas (Fig. 40) para así obtener un nivel de voltaje proporcional a la amplitud de la señal medida, y por tanto, proporcional a la magnitud de la impedancia. Este valor es leído por uno de los canales del convertidor analógico-digital (ADC) del microcontrolador.

De la última etapa de amplificación ( $\times 10000$ ), se obtiene una señal casi cuadrada que es rectificadora para eliminar la parte negativa y convertida, con una compuerta lógica, en un pulso cuya fase se comparará con la de la señal de excitación. La señal proveniente del generador AD9833 también es amplificada y transformada en un pulso cuadrado por medio de otra compuerta lógica. Ambas señales se introducen al comparador de fase de un PLL (MC74HC4046) el cual da como resultado una señal cuadrada cuyo ancho de pulso es proporcional a la diferencia de fase (Fig. 39). Al igual que con la amplitud, esta señal es filtrada para poder obtener una tensión proporcional a la fase que pueda ser digitalizada por el ADC del microcontrolador.

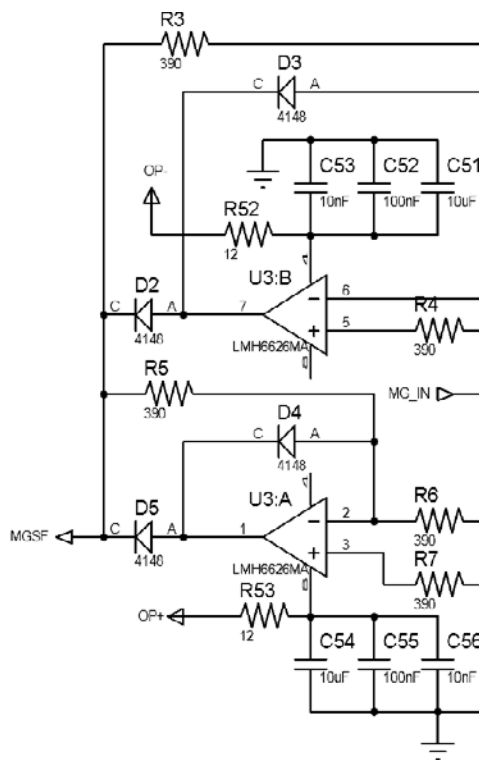


Fig. 38. Rectificador de precisión de onda completa usado en la medición de la magnitud de la señal.

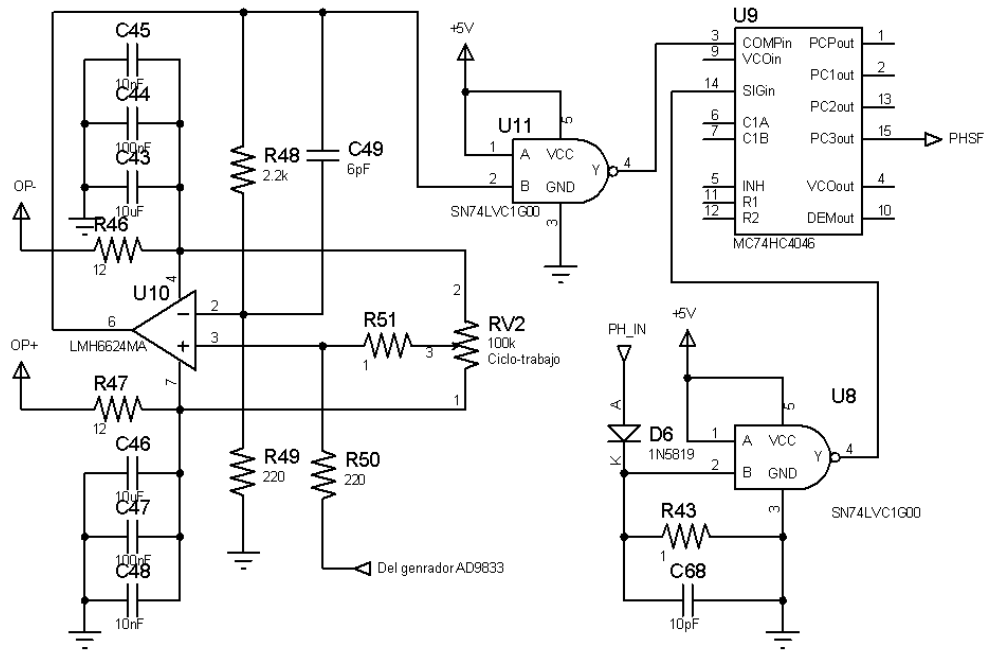


Fig. 39. Circuito para la medición de la fase de la señal.

El filtro pasa bajas, utilizado en la obtención de la amplitud y la fase, cuenta con dos canales y cuatro frecuencias de corte seleccionables de manera digital (0.45 Hz, 10 Hz, 100 Hz y 1 kHz). Esta selección la hace el microcontrolador de forma automática en función de la frecuencia de la señal a filtrar. Esto se logró con una resistencia de 1.5 k $\Omega$  conectada a un arreglo de condensadores por medio de un multiplexor analógico, Fig. 40.

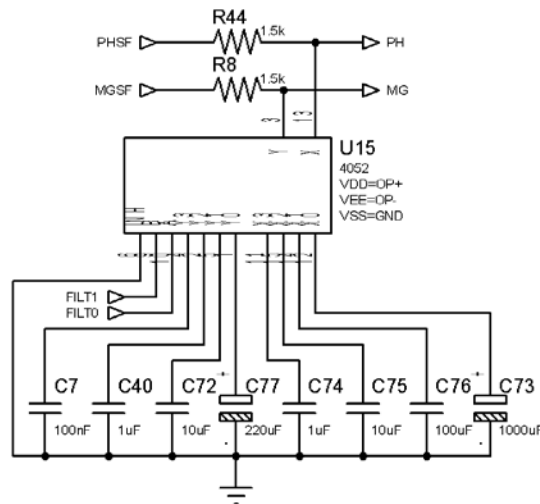


Fig. 40. Filtro pasa-bajas ajustable.



Se utilizó un microcontrolador PIC18F2550 para establecer la comunicación USB con la computadora personal así como para configurar y controlar el barrido en frecuencia del generador de onda, seleccionar la ganancia adecuada para la medición de amplitud, elegir la frecuencia de corte oportuna para el filtro pasa bajas y digitalizar las señales de magnitud y fase de la impedancia medida.

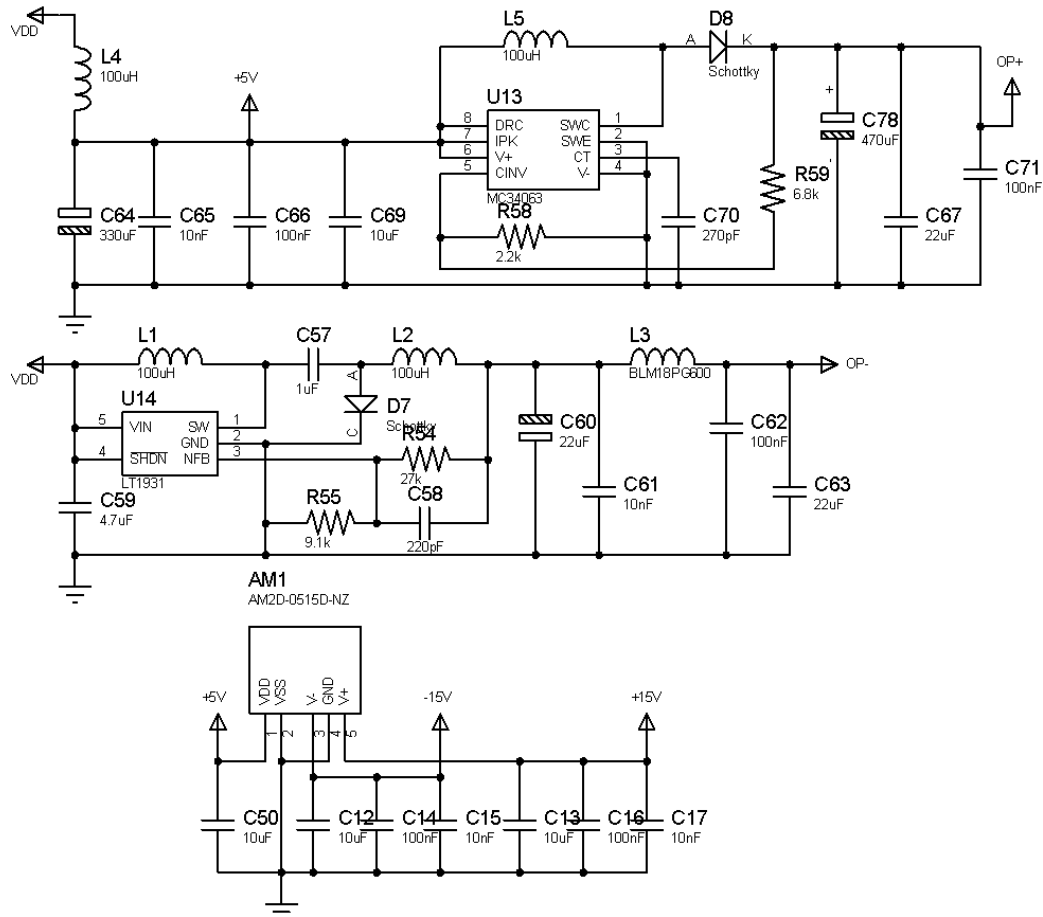


Fig. 41. Circuito de conversión de voltajes para la alimentación del sistema.

Si bien el circuito entero obtiene la energía del puerto USB, se tuvo que hacer una etapa de conversión de voltajes para alimentar los distintos circuitos integrados que así lo requerían, Fig. 41. En el caso de los amplificadores operacionales, estos requieren una alimentación de  $\pm 5$  V. Si bien el puerto USB suministra una tensión de 5 V, esta no se mantiene constante, por lo que fue necesario utilizar un convertidor MC34063 para darle estabilidad al voltaje. Para la fuente de -5 V se usó otro convertidor modelo



LT1931. Finalmente se utilizó un convertidor AM2D-0515D para polarizar los transistores de la fuente de corriente con  $\pm 15$  V. Todos estos circuitos cuentan con filtros de salida para minimizar el ruido de alta frecuencia producido por los convertidores DC-DC.

Se desarrolló una interfaz gráfica, programada en Visual Basic 6, Fig. 42. Con ésta el usuario puede hacer mediciones, las cuales se visualizan en dos gráficas, una para la magnitud y otra para la fase; guardar los datos recibidos en un archivo; y cambiar la frecuencia del estímulo o de la forma de onda, de ser necesario. Por defecto, se hace un barrido en frecuencia, de forma logarítmica, de 1 Hz hasta 10 MHz con nueve mediciones por década, lo que da un total de 64 puntos. Esto puede ser cambiado fácilmente en el programa, siendo la resolución mínima de 1 Hz. La información obtenida de cada medición se va guardando automáticamente en un archivo binario, en formato de punto flotante. Primero los valores de magnitud, seguido por los de fase.

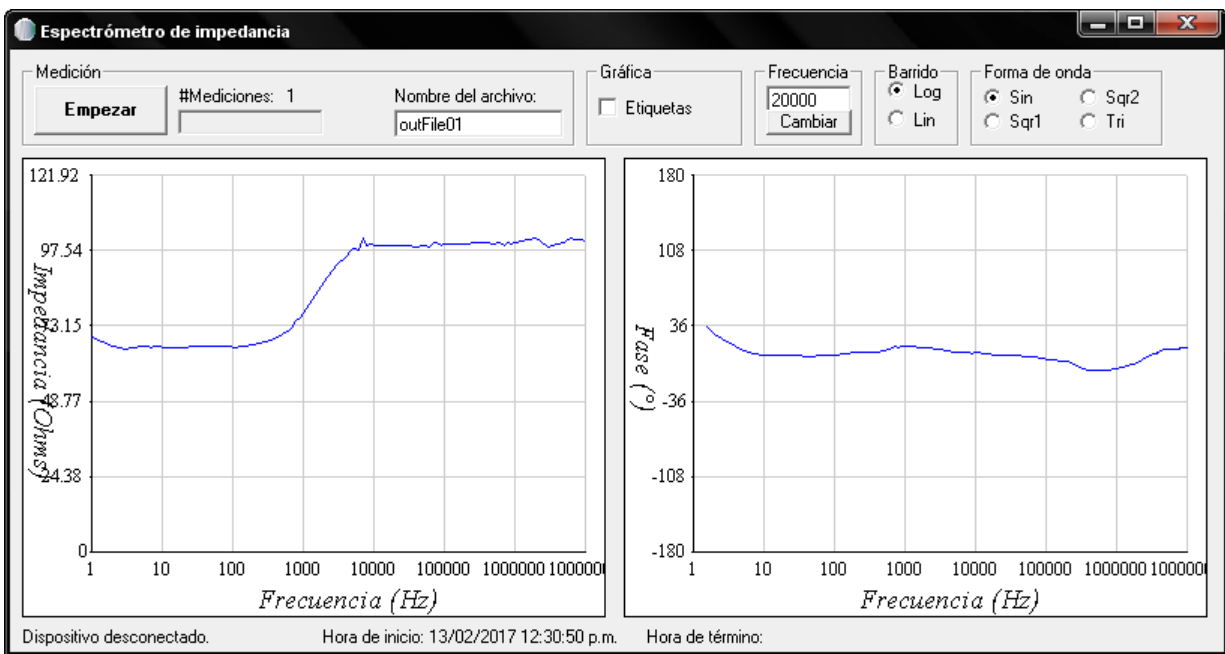


Fig. 42. Interfaz gráfica del espectrómetro de impedancia eléctrica.

Para comprobar el buen funcionamiento del instrumento desarrollado, se probó con circuitos cuya impedancia es conocida.

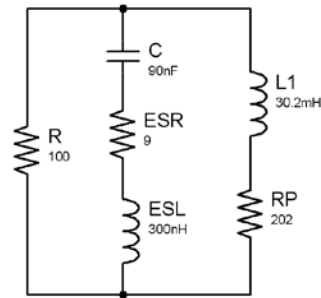


Fig. 43. Modelo teórico del circuito RCL usado.

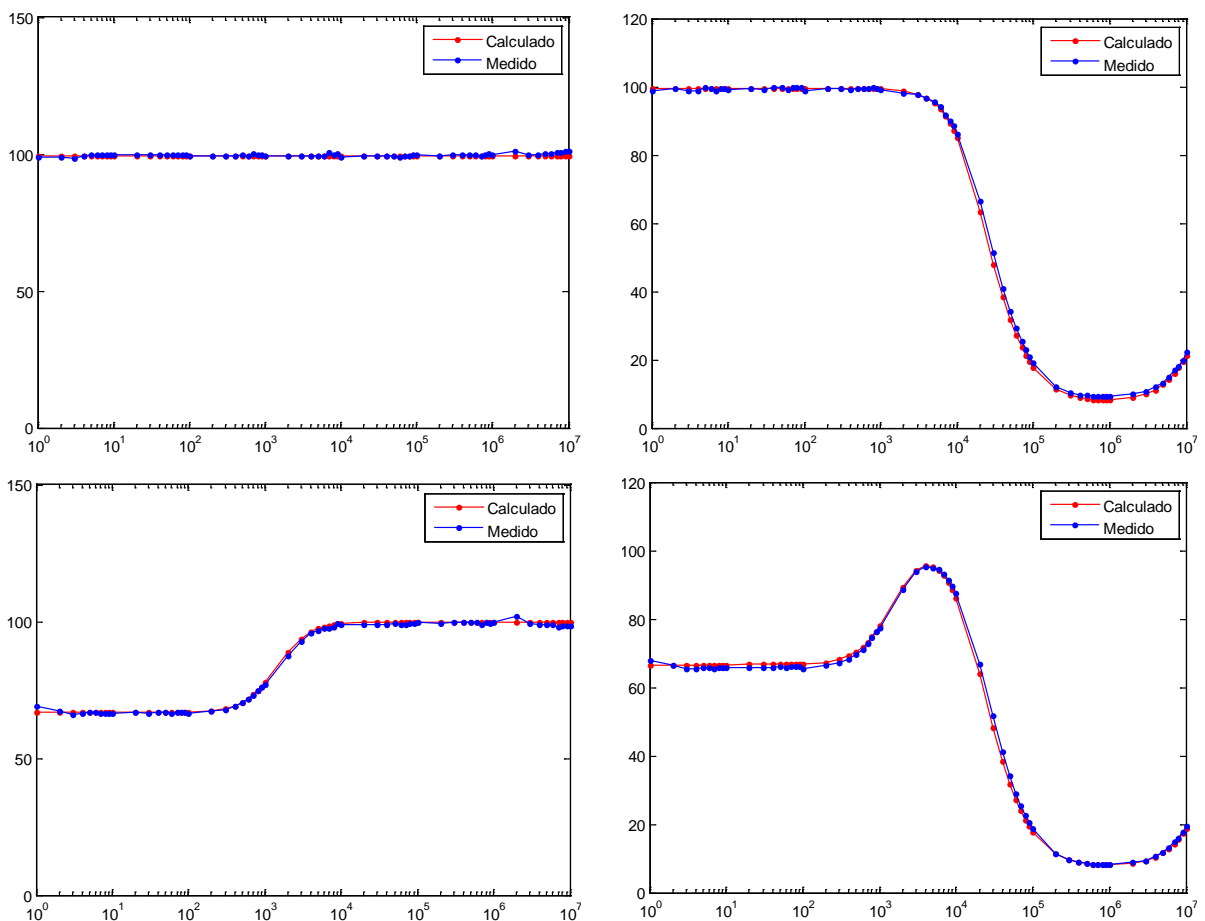


Fig. 44. Pruebas realizadas al dispositivo con circuitos RCL de impedancia conocida. De arriba hacia abajo y de izquierda a derecha: resistencia pura, circuito R||C, circuito R||L y circuito R||C||L.

En primer lugar, con una resistencia pura ( $R = 100 \Omega$ ), luego con una resistencia en paralelo con un condensador ( $R = 100 \Omega$ ,  $C = 90 \text{ nF}$ ). Debido a que la medición llega hasta los 10 MHz, se tuvo que considerar en el modelo teórico las resistencias e inductancias parásitas del condensador ( $ESR = 9 \Omega$ ,  $ESL = 300 \text{ nH}$ ). De igual forma, se





probó con una resistencia en paralelo con un inductor, en el cual también se consideró la resistencia parásita de este último ( $L = 30.2 \text{ mH}$ ,  $R_p = 202 \Omega$ ), y finalmente con los tres elementos en paralelo (Fig. 43, Fig. 44). La capacitancia parásita del inductor pudo ser despreciada.

#### 5.4.2. Pruebas realizadas (espectroscopía de impedancia eléctrica).

Una vez que se verificó el buen funcionamiento del espectrómetro de impedancia, se decidió utilizarlo junto con el sistema montado para la espectroscopia de impedancia de radiofrecuencias durante la prueba de tolerancia a la glucosa que se describió en la sección 5.3.2.

Para tal efecto, al voluntario se le colocaron los cuatro electrodos sobre la piel de la parte anterior del antebrazo, con una separación de 10 cm entre los electrodos, con los de medición de voltaje al centro y los electrodos de inyección de corriente en los extremos (Fig. 45).

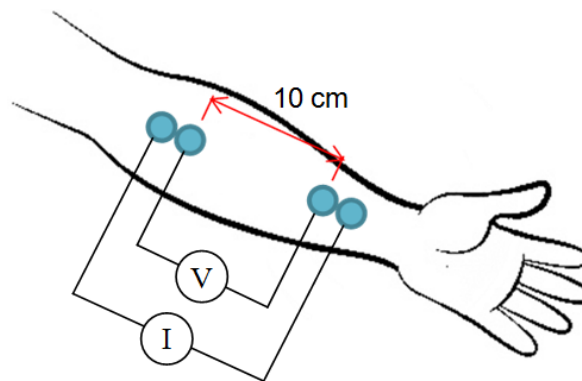


Fig. 45: Colocación de los electrodos en el antebrazo.

Se midió la impedancia del tejido en un intervalo de 10 kHz a 1 MHz, cada 5 segundos durante las tres horas que duró el experimento, además de los 15 minutos antes de la ingesta de la bebida glucosada destinados a registrar la respuesta basal. De igual forma, el experimento fue repetido en tres días diferentes.



El registro de una de estas sesiones se grafica en la Fig. 46. Las líneas azules corresponden a los primeros espectrogramas medidos y las rojas a los últimos.

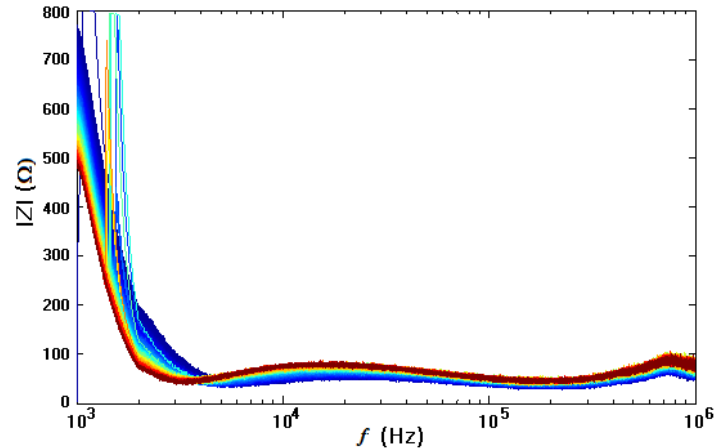


Fig. 46: Magnitud de la impedancia eléctrica del tejido durante el tiempo de registro de una de las sesiones del experimento.

Análogamente a lo que se hizo para el caso de la impedancia de radiofrecuencia, se buscó entre las distintas frecuencias el punto en el cual, al graficar la magnitud en función del tiempo, se obtuviera una respuesta creciente durante la primera hora de registro, y luego decreciente durante la siguiente hora, como se esperaría que se comportara la concentración de glucosa en la sangre durante la prueba. También se buscó el caso contrario, primero una respuesta decreciente y luego una creciente, en caso de que se tuviera una correlación inversa. No obstante, en ninguna de las tres sesiones se observó tal situación. En su lugar, se tuvieron respuestas crecientes durante todo el tiempo de registro, como la de la Fig. 47, o meramente decrecientes, o con comportamientos que parecían aleatorios.

La impedancia de la piel depende de otros factores de mayor peso que la concentración glucosa en la sangre, como son el contenido de agua y electrolitos (Na, K, Ca, etc.) así como de otros metabolitos que pudieran afectar la conductividad del medio o la permitividad de la membrana celular [19]. Esto es particularmente relevante en los pacientes diabéticos puesto que existe un efecto deshidratante que acompaña la



hiperglicemia [17]. Por consiguiente, para que esta técnica pueda tener éxito, se debe de considerar el efecto dichas variables.

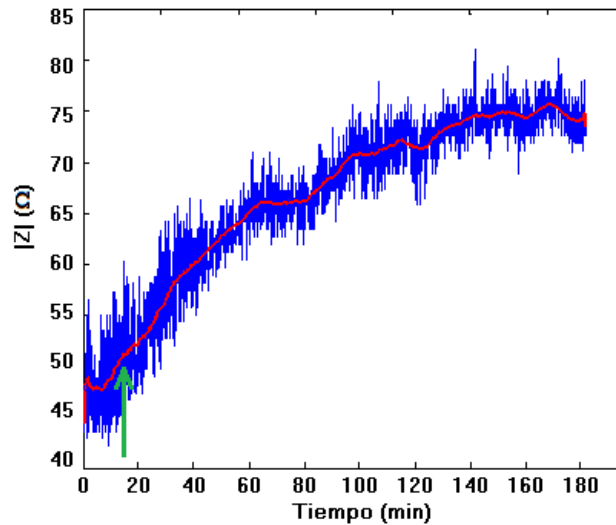


Fig. 47: Magnitud de la impedancia eléctrica del tejido a 10 kHz. La flecha indica el momento de la ingestión de la bebida glucosada.

### 5.5. Calor metabólico.

Esta técnica, propuesta por Cho *et al.*, considera que dado que la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular es extraída de la oxidación metabólica de la glucosa, su concentración en la sangre podría ser estimada conociendo cuánto calor se genera tras dicha oxidación y la cantidad de oxígeno que se utiliza en el proceso. De esta forma, la concentración de glucosa sanguínea podría verse como una función que depende del calor corporal generado, el flujo sanguíneo, la concentración de hemoglobina (Hb) y la de oxihemoglobina (HbO<sub>2</sub>). Con este fin, los investigadores utilizan una serie de sensores térmicos (termistores y termopilas) para calcular la temperatura de la piel por conducción y por radiación, su conductividad térmica, y la temperatura ambiente; además de sensores ópticos (fotodiodos y LEDs), con los cuales intentan estimar la concentración de hemoglobina y oxihemoglobina, y la reflectancia difusa y especular de la piel [24,71].



Aunque reportan haber obtenido buenas estimaciones de la glicemia en una prueba clínica, dada la complejidad del proceso metabólico del cuerpo y la fuerte interferencia que pueden provocar las condiciones ambientales, ésta técnica ha sido usada más como auxiliar en la determinación de la concentración de la glucosa [14].

Considerando que las técnicas de medición seleccionadas para la medición de la glicemia podrían verse afectadas por variables como la temperatura ambiental, la temperatura corporal, el flujo sanguíneo y la cantidad de hemoglobina en la sangre, se pensó que la medición de estas variables podría conducir a una mejor estimación de la concentración de glucosa. Por tanto, se consideró tomar en cuenta la temperatura del sitio de medición, la temperatura ambiental, la saturación de oxígeno (medida indirecta de la relación  $Hb/HbO_2$ ), la frecuencia cardíaca y la conductividad térmica de la piel (medidas indirectas del flujo sanguíneo [71]).

Para medir la saturación de oxígeno así como el ritmo cardíaco se planteó utilizar un oxímetro de pulso, del cual se hablará a continuación.

### 5.5.1. Oximetría de pulso

La oximetría de pulso es una técnica no invasiva que mide la saturación de oxígeno en la sangre de un paciente así como su frecuencia cardíaca. Al ser un método óptico, tiene la ventaja de ser intrínsecamente seguro ya que no existe un contacto eléctrico entre el paciente y el equipo.

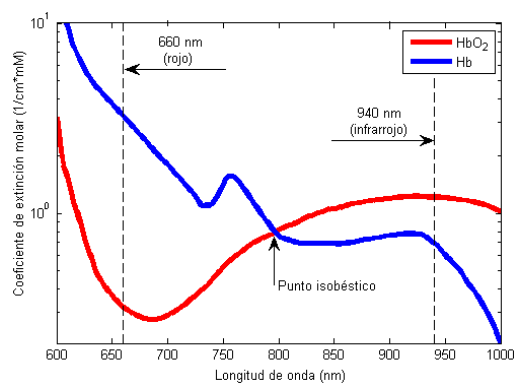


Fig. 48. Espectro de absorción de la hemoglobina.



En 1860 se descubrió que la sustancia que le da el color a la sangre, la hemoglobina, también era la encargada de llevar el oxígeno. Al mismo tiempo se halló que la absorción en el rango visible de una solución de hemoglobina cambiaba con el nivel de oxigenación. Esto es porque las dos formas más comunes de esta molécula, la hemoglobina oxidada ( $HbO_2$ ) y la hemoglobina reducida ( $Hb$ ), tienen distintos espectros de absorción en el intervalo de longitudes de onda de 500 a 1000 nm, como se muestra en la Fig. 48 [72].

El oxígeno químicamente combinado con la hemoglobina dentro de los eritrocitos (glóbulos rojos), representa la mayor parte del oxígeno total de la sangre (existe un poco de oxígeno disuelto en el plasma). De esta forma se definió la saturación de oxígeno en la sangre ( $SaO_2$ ) como la razón de la concentración de oxihemoglobina entre la concentración total de hemoglobina presente en la sangre (7).

$$SaO_2 = \frac{[HbO_2]}{[\text{Hemoglobina total}]} = \frac{[HbO_2]}{[HbO_2] + [Hb]} \quad (7)$$

La saturación de oxígeno generalmente se expresa como porcentaje ( $SPO_2$ ) y bajo condiciones fisiológicas normales, es de un 97% en la sangre arterial y de un 75% en la sangre venosa.

Gracias a que el intervalo de longitud de onda entre 600 nm y 1000 nm también es el rango en el que el tejido presenta la menor atenuación de la luz, es posible utilizar la diferencia en el espectro de absorción de la  $HbO_2$  y la  $Hb$  para la medición de la saturación de oxígeno *in vivo*. Esto se logra midiendo la luz transmitida a través de la punta de un dedo o el lóbulo de la oreja a dos distintas longitudes de onda, una en el rojo, generalmente a 660 nm, y otra en el infrarrojo cercano, a 940 nm.

Si se asume que la transmisión de la luz a estas longitudes de onda a través del tejido sólo es influenciada por las concentraciones de  $HbO_2$  y  $Hb$ , entonces, la



intensidad de la luz decaerá logarítmicamente con la longitud de la trayectoria que atraviese según la ley de Beer-Lambert. Esto es:

$$\text{Para } \lambda_1: I_{out1} = I_{in1} 10^{-(\alpha_{o1}C_0 + \alpha_{r1}C_r)l} \quad (8)$$

$$\text{Para } \lambda_2: I_{out2} = I_{in2} 10^{-(\alpha_{o2}C_0 + \alpha_{r2}C_r)l} \quad (9)$$

Donde  $I_{inx}$  es la intensidad de la luz incidente en el tejido a la longitud de onda  $\lambda_x$ ,  $I_{outx}$  es la intensidad de la luz transmitida a  $\lambda_x$ ,  $C_0$  es la concentración de la  $HbO_2$ ,  $C_r$  es la concentración de la Hb,  $\alpha_{ox}$  es el coeficiente de absorción de la  $HbO_2$  a  $\lambda_x$ , y  $\alpha_{rx}$  es el coeficiente de absorción de la Hb a  $\lambda_x$ . Si definimos:

$$R = \frac{\log_{10}(I_{out1}/I_{in1})}{\log_{10}(I_{out2}/I_{in2})} \quad (10)$$

Entonces:

$$SaO_2 = \frac{C_o}{C_o + C_r} = \frac{\alpha_{r2}R - \alpha_{r1}}{(\alpha_{r2} - \alpha_{o2})R - (\alpha_{r1} - \alpha_{o1})} \quad (11)$$

En la práctica, se utilizan diodos emisores de luz (LEDs) en las longitudes de onda de 660 nm y 940 nm como fuentes de luz y un fotodiodo para medir la luz transmitida, Fig. 49.

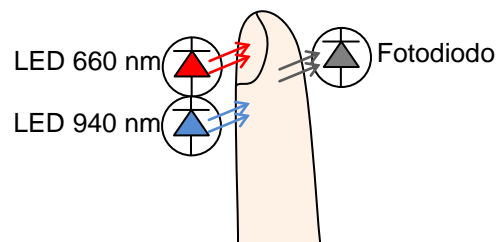


Fig. 49. Disposición de los LEDs y el fotodiodo para la medición.

Como se muestra en la Fig. 50, la magnitud de la señal de luz recibida depende de la cantidad de sangre bombeada por el corazón en cada sístole, la absorción óptica de



la sangre y la absorción por los demás tejidos. La parte pulsátil de la señal es considerada como la componente de corriente alterna (CA), y la parte que no es pulsátil, debida a la sangre venosa y el tejido, como la componente en corriente directa (CD). Un cambio en el brillo del LED o la sensibilidad del detector, puede cambiar la intensidad de la luz medida por el sensor. Esta dependencia de la luz transmitida puede ser compensada usando una técnica de normalización en donde la componente de CA se divide entre la de CD, ecuación (12) [73].

$$R' = \frac{I_R}{I_{IR}} = \frac{\left(\frac{CA_R}{CD_R}\right)}{\left(\frac{CA_{IR}}{CD_{IR}}\right)} \quad (12)$$

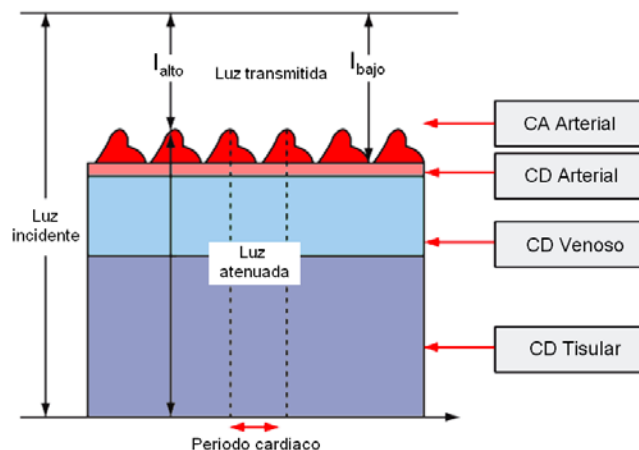


Fig. 50. Transmisión de la luz a través del tejido.

De esta forma, se elimina de la medición el efecto de la absorbancia invariante de la sangre venosa y el tejido. La razón normalizada  $R'$ , puede ser entonces correlacionada empíricamente con la saturación de oxígeno, como se muestra en la Fig. 51.

La mayoría de los pulsioxímetros comerciales están destinados a su uso clínico, de forma que sólo muestran los valores de saturación de oxígeno y frecuencia cardiaca en una pequeña pantalla sin contar con la opción de llevar un registro de dichos valores y mucho menos de transmitirlos a un ordenador.

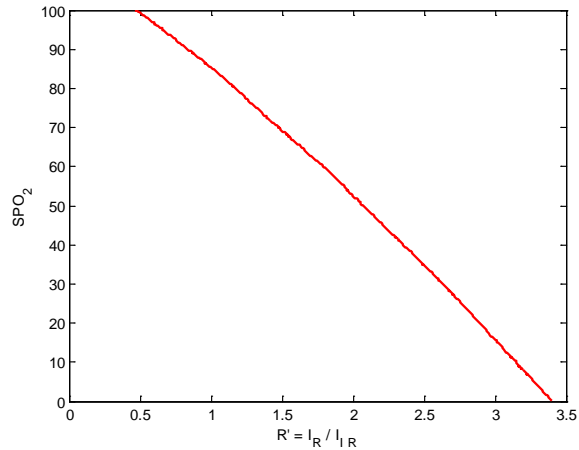


Fig. 51. Relación empírica entre la saturación de oxígeno ( $SPO_2$ ) y la razón normalizada ( $I_R/I_{IR}$ ).

Los que sí cuentan con dicha capacidad, son instrumentos costosos y difícilmente configurables, por ejemplo, si se deseara automatizar la adquisición de los datos, cambiar la curva de calibración del instrumento o añadir un algoritmo de procesamiento.

En la Tabla 5 se enlistan algunos de los oxímetros comerciales que tienen la capacidad, ya sea de almacenar las mediciones en una memoria, o bien, de transmitirlos en tiempo real a un ordenador.

Tabla 5. Comparación entre oxímetros de pulso comerciales.

<i>Modelo</i>	<i>Marca</i>	<i>Transmite en tiempo real</i>	<i>Guarda en memoria</i>	<i>Precio*</i>	<i>Ref.</i>
SPECTRO2	Smiths Medical		✓	\$500.00	[74]
CMS70A	Contec Medical	✓		\$305.00	[75]
300i-P	Choice Medical		✓	\$155.00	[74]
CMS50EW	Contec Medical	✓		\$100.00	[75]
iHealth	Apple	✓		\$ 70.00	[76]
CMS50D+	Contec Medical	✓	✓	\$ 40.00	[75]

\* Precio en dólares estadounidenses a fecha de 2018.

Todos estos dispositivos cuentan con un software especial que lee los datos del oxímetro y los muestra en pantalla o lo guarda en un archivo con un formato propio del





fabricante. Para poder recuperar los datos y trabajar con ellos, sería necesario hacer ingeniería inversa, como lo hacen en [77]. Es por esto que se decidió diseñar y construir uno propio, de forma que se pueda modificar o adaptar a conveniencia.

### 5.5.2. Oxímetro de pulso.

Existen distintos trabajos en los que se han desarrollado oxímetros de pulso utilizando microcontroladores y amplificadores operacionales para el control de los LEDs y lectura del fotodiodo receptor [78,79], sin embargo, se decidió utilizar una solución que requiriera una menor cantidad de componentes electrónicos, con la finalidad de reducir el tamaño del dispositivo, su complejidad y su precio. Es por esto que se resolvió emplear el chip AFE4400 de Texas Instruments.

El AFE4400 (Fig. 52) es un circuito integrado de aplicación específica para oxímetros de pulso y monitores de ritmo cardiaco, [80]. Cuenta internamente con los circuitos de acondicionamiento para controlar los dos LEDs, el de 660 nm y el de 940 nm, usados como fuente de luz en la medición. Se puede controlar de forma digital y de manera independiente, la corriente suministrada a cada uno de ellos, con una resolución de 8 bits y pudiendo suministrar hasta 50 mA. También integra un amplificador de trans-impedancia para el acondicionamiento de la señal del fotodiodo. Esta señal puede amplificarse con una ganancia programable de 0 dB, 3.5 dB, 6 dB, 9.5 dB y 12 dB. Cuenta con un convertidor analógico digital (ADC) de 13 bits y con circuitos de detección de fallas, como cortocircuito y circuito abierto, tanto para los LEDs como para el fotodiodo.

Para configurar y controlar este integrado, se ocupó un microcontrolador PIC18F2550. Éste se comunica de manera serial (SPI) con el AFE4400. El microcontrolador también es el encargado de transmitir los datos adquiridos hacia la computadora personal a través del puerto USB. Para realizar estas funciones, se escribió un programa en lenguaje C, con la ayuda del compilador mikroC. Este código contiene un algoritmo para modificar automáticamente la corriente en los LEDs y la



ganancia del amplificador en el AFE4400, de forma que se adapte a las condiciones ambientales de luz y movimiento del sensor, para hacer un uso eficiente del rango dinámico del ADC. También detecta si se ha producido alguna falla en el sistema y alerta al usuario de ésta con una señal luminosa. Asimismo, calcula la saturación de oxígeno y la frecuencia cardiaca a partir de la señal pletismográfica, mediante un algoritmo detector de picos.

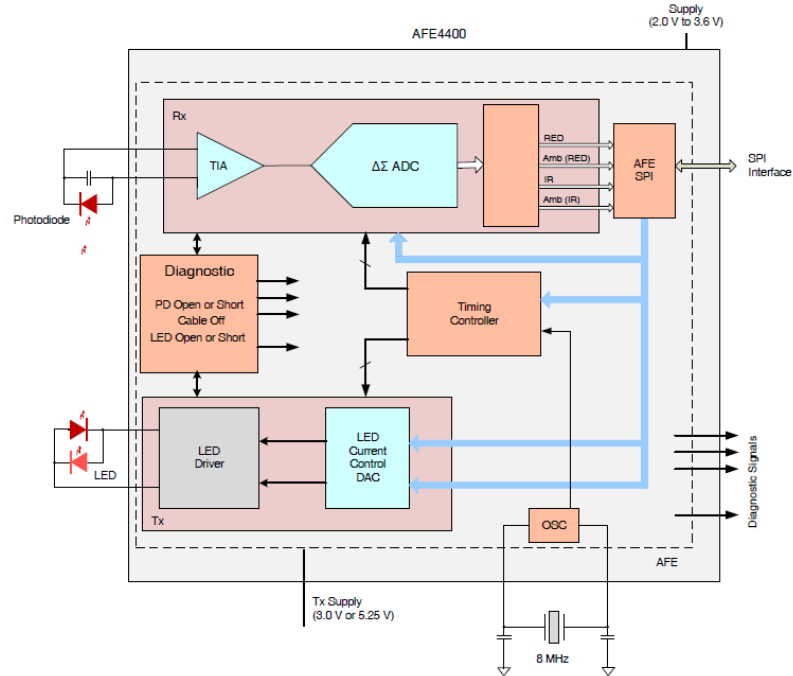


Fig. 52. Diagrama a bloques de los circuitos de acondicionamiento internos del AFE4400.

El circuito completo diseñado para del oxímetro de pulso se puede ver en el Apéndice C. Se utilizaron diodos de protección contra sobre voltaje tanto en la salida del controlador de los LEDs como en la entrada del amplificador de trans-impedancia. Debido a que el AFE4400 trabaja con una alimentación de 3.3 V, y el microcontrolador con 5 V, que es la tensión que proporciona el USB, se empleó un regulador LDO modelo MIC5235 para reducir el voltaje y divisores de tensión en las líneas de entrada de comunicación con el microcontrolador. Se dejó un conector con las líneas del ICSP para poder reprogramar el microcontrolador de ser necesario.



La interfaz de usuario se programó con ayuda del compilador Visual Basic 6 (Fig. 53). Cuenta con opciones para controlar algunos parámetros del AFE4400 como las corrientes de cada LED, la ganancia del amplificador y la corriente de compensación de offset. También muestra los valores calculados de SPO2 y frecuencia cardiaca además de graficar la señal pletismográfica en tiempo real. De igual forma cuenta con la opción de guardar los datos en un archivo.

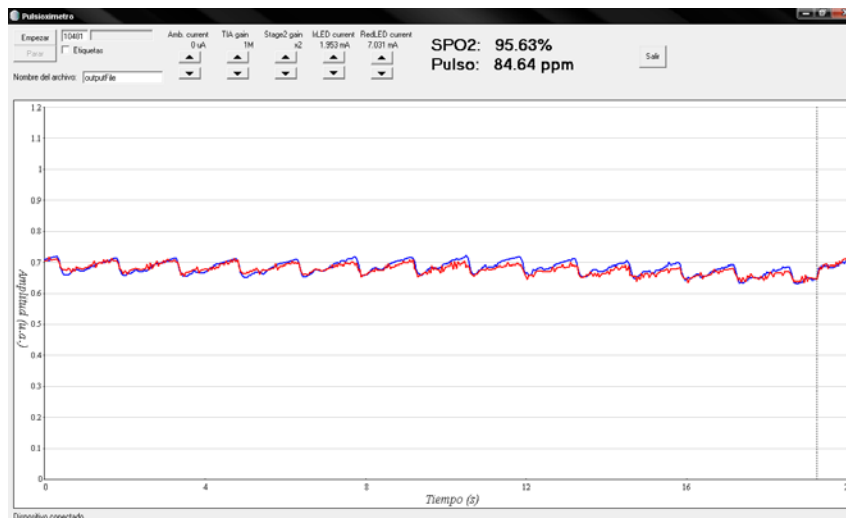


Fig. 53. Ventana de la interfaz de usuario del oxímetro de pulso.

### 5.5.3. Pruebas realizadas con el oxímetro de pulso.

Se realizaron algunas pruebas en sujetos sanos, encontrándose saturaciones de oxígeno dentro de los valores normales en todos los casos, con un error estándar del 3%. Esto se corroboró con un oxímetro de pulso comercial, modelo CMS50D de Contec Medical. Sin embargo, dado que este tipo de valores no varían mucho entre sujetos sanos, no se pudo comprobar que tan fiable es el instrumento para detectar valores bajos de saturación. Es difícil medir saturaciones de oxígeno menores ya que sólo se presentan en personas con alguna patología grave. La medición del ritmo cardiaco se realizó para sujetos en reposo y después de haber realizado alguna actividad física, observándose así un incremento en la frecuencia. Los valores obtenidos se compararon con los del pulsioxímetro comercial, encontrándose un error estándar en la medición del 4%.



## 5.6. Espectroscopía fotoacústica.

Como se mencionó en la sección 3.3.4, el principio de la espectroscopía fotoacústica (PAS, por sus siglas en inglés) tiene como fundamento la generación de ondas acústicas por un mecanismo termoelástico fotoinducido. Esto es, en pocas palabras, que al excitar un objeto con luz pulsada o modulada, éste generará ondas de sonido que pueden ser detectadas con un transductor, a causa de ciertos principios que se explicarán a detalle más adelante, y cuya intensidad está relacionada con propiedades ópticas y térmicas del mismo.

La ventaja de éste método en comparación con la espectroscopía de absorbancia, radica en que se evitan pérdidas provocadas por la dispersión de la luz en el tejido, ya que incluso esta luz participa en el efecto fotoacústico, así como interferencias producidas por el agua, dada la pobre respuesta fotoacústica de la misma.

### 5.6.1. Espectroscopía fotoacústica pulsada.

Cuando un material es irradiado por un pulso de luz láser de alta intensidad y corta duración, se produce un aumento en su temperatura causado por la radiación electromagnética absorbida por el objeto, misma que se transforma en calor. Si el tiempo de conducción de calor en el material es mucho mayor que el tiempo de transmisión del sonido en la región irradiada, ocurre una rápida expansión volumétrica por la dilatación del mismo material, lo que genera a su vez una onda acústica cuya frecuencia depende de la duración del pulso de luz.

Despreciando la viscosidad del material, la presión acústica puede describirse por la ecuación (13).

$$\left( \nabla^2 - \frac{1}{v^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \right) p = - \frac{\beta}{C_p} \frac{\partial H}{\partial t} \quad (13)$$



Donde  $p$  es la presión acústica,  $\beta$  es el coeficiente de expansión volumétrica,  $C_p$  es el calor específico,  $v$  es la velocidad del sonido en el medio,  $t$  es el tiempo y  $H$  es la función de energía transferida al material por unidad de volumen y tiempo [81].

Cuando toda la energía absorbida se convierte en energía térmica, el incremento de temperatura  $\Delta T$  se puede expresar como:

$$\Delta T = \frac{E_a}{C_p \rho V} \quad (14)$$

Donde  $E_a$  es la energía absorbida,  $\rho$  es la densidad del material y  $V$  es el volumen de la muestra que absorbió la energía lumínica.

Si el tiempo de duración del pulso láser es mucho menor que el tiempo de transmisión acústica, la magnitud de la presión acústica generada cumple con la ecuación (15).

$$|P| \propto \frac{E \alpha \beta \sqrt{v}}{C_p} \quad (15)$$

Donde  $E$  es la energía del láser y  $\alpha$  el coeficiente de absorción óptico [82].

Por lo tanto, al medir la amplitud de la onda ultrasónica, obtenemos información acerca de las propiedades ópticas, térmicas y acústicas del medio en la que fue generada.

La configuración usual para las pruebas de espectroscopía fotoacústica pulsada comprende un láser pulsado de alta potencia, cuya luz es proyectada sobre la muestra a analizar, y un transductor, generalmente piezoeléctrico, para medir la amplitud de la onda acústica generada.



Tabla 6: Láseres y transductores ultrasónicos usados en distintas investigaciones.

<i>Grupo de investigación</i>	<i>Tipo de láser</i>	<i>Longitud de onda (nm)</i>	<i>Tipo de transductor ultrasónico</i>	<i>Frecuencia de resonancia</i>
Christison <i>et al.</i> [83]	Nd-YAG	1064	PZT-5A	1 MHz
Quan <i>et al.</i> [84]	Láser pulsado TEA CO <sub>2</sub>	9676	PZT	–
Greig <i>et al.</i> [85]	Nd-YAG	1000 – 2000	PZT-5A	1.5 MHz
Duncan <i>et al.</i> [82]	Diodo láser	904	PZT-5A	1.5 MHz
Zhao <i>et al.</i> [86,87]	Diodo láser	905	PZT	450 kHz
Bednov <i>et al.</i> [88]	Nd-YAG	532, 1064	PVDF	20 kHz – 40 MHz
Kinnunen, <i>et al.</i> [89]	Nd-YAG	532, 1064	PVDF	3 MHz
Kottmann, <i>et al.</i> [8]	Láser de cascada cuántica	9259, 9671	Micrófono electret	100 Hz – 10 kHz
Zhu <i>et al.</i> [90]	Láser de He-Ne	632.8	PZT	1 MHz
Ren <i>et al.</i> [81]	Nd-YAG OPO	1300 – 2300	PZT	9.52 MHz

La longitud de onda de los láseres utilizados por distintos investigadores en la espectroscopía fotoacústica para la medición de la glucemia varía desde el espectro visible hasta el infrarrojo medio. Los transductores ultrasónicos utilizados en estos experimentos también han sido variados, desde el uso de cerámicas piezoeléctricas hasta polímeros, y con diversas frecuencias de resonancia (Tabla 6). La longitud de onda que se eligió para esta investigación está dentro de la banda del infrarrojo cercano, en específico a los 905 nm, y el transductor ultrasónico que se empleará es un cerámico PZT con frecuencia de resonancia de 3 MHz. Las razones de esta elección se exponen en los apartados siguientes.

### 5.6.2. Láser pulsado.

Las señales fotoacústicas en el rango del infrarrojo cercano son habitualmente generadas usando costosos y voluminosos láseres Nd-YAG (acrónimo del inglés neodymium-doped yttrium aluminium garnet) los cuales tienen un rango limitado de variación de su longitud de onda, ancho de pulso y frecuencia de repetición. Una alternativa empleada por varios investigadores, es el uso de diodos láser. Estos dispositivos son compactos, relativamente económicos y están disponibles en una amplia gama de longitudes de onda. La duración del pulso y las tasas de repetición también pueden ser variadas de manera casi arbitraria. Su principal desventaja es su baja potencia lumínica, comparada con los láseres Nd-YAG. Sin embargo, al tener una mayor frecuencia de repetición (del orden de los kHz), existe la posibilidad de promediar



un mayor número de señales en el mismo periodo de tiempo, lo cual incrementa la relación señal a ruido de la medición [91].

Por otro lado, los láseres Nd-YAG utilizados para la medición no invasiva de glucosa, trabajan en una longitud de onda de 1064 nm. Si se elige una longitud de onda menor, que esté más alejada del pico de absorción del agua en la región infrarroja (Fig. 54), se podría tener una mayor penetración en el tejido, lo cual representaría una ventaja.

Por éstas y otras razones que se verán a continuación, se eligió como fuente de excitación un diodo láser de la marca Osram, modelo SPL-PL90\_3 cuyas características se muestran en la Tabla 7.

La profundidad a la cual la luz se hace difusa y se atenúa dentro del tejido puede ser aproximada por la ecuación (16).

$$F(z) \propto F_0 e^{-z \mu_{eff}} \quad (16)$$

Donde  $F$  es la distribución axial del flujo del láser,  $F_0$  el flujo del láser antes de entrar en el tejido,  $\mu_{eff}$  el coeficiente de atenuación efectivo del medio y  $z$  la profundidad.

En la piel, los coeficientes de atenuación efectivos para 1064 nm y 905 nm son respectivamente  $0.3 \text{ mm}^{-1}$  y  $0.229 \text{ mm}^{-1}$ . De ahí que un láser de 1064 nm será atenuado con una mayor rapidez que uno de 905 nm [91].

Por otra parte, se pueden encontrar láseres pulsados comerciales de 905 nm con una buena potencia lumínica y relativamente económicos ya que son utilizados en telémetros láser para medir grandes distancias. De hecho, los láseres de semiconductor más potentes hoy en día tienen longitudes de onda dentro de los 850 – 910 nm [92].

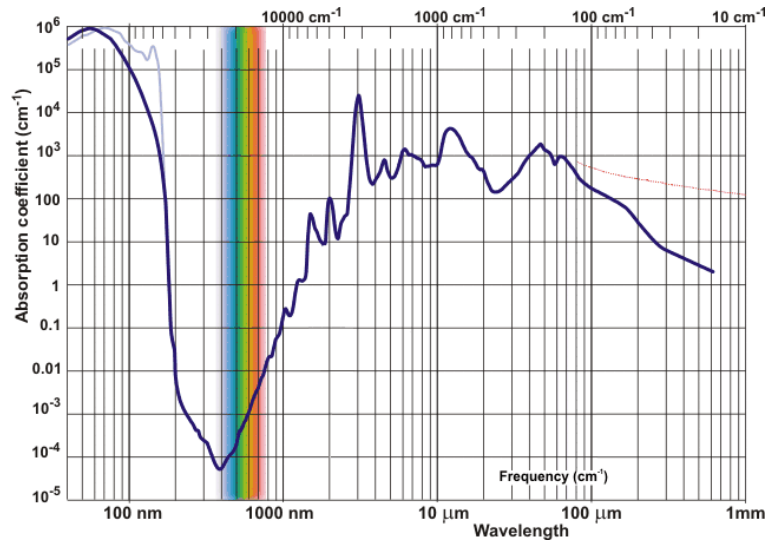


Fig. 54: Espectro de absorción del agua.

Tabla 7: Características del diodo láser pulsado Osram SPL-PL90\_3.

<i>Parámetro</i>	<i>Valor</i>
Longitud de onda de emisión	905 nm
Ancho de banda espectral	7 nm
Potencia óptica pico	75 W
Corriente de umbral	0.75 A
Corriente de operación (@75W)	30 A
Voltaje de operación (@75W)	9 V
Ancho de pulso máx.	100 ns
Ciclo de trabajo máx.	0.1%
Tiempos de subida y bajada	1 ns
Apertura	200 × 10 μm
Divergencia del haz	9° <sub>  </sub> , 25° <sub>⊥</sub>

Según un informe publicado por la Comisión Internacional para la Protección contra Radiaciones no Ionizantes (ICNIRP) [93], la máxima exposición permitida para asegurar la inocuidad del pulso láser proyectado sobre la piel humana, en la longitud de onda de 905 nm, para una duración del pulso dentro del intervalo de 1 – 100 ns, es de 51.4 mJ/cm<sup>2</sup>.





La densidad de potencia radiada por el láser, considerando un haz de frente plano, se puede calcular con la ecuación (17):

$$P_D = \frac{P}{A} \quad (17)$$

Donde  $P$  es la potencia incidente y  $A$  es el área de la superficie en que incide la onda. La cantidad de energía que se obtiene de un pulso láser está dada por:

$$E = P\tau \quad (18)$$

Donde,  $\tau$  es la duración del pulso.

Por lo tanto, el área mínima sobre la cual se puede irradiar el láser elegido de forma segura es de  $14.59 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$ .

Para poder utilizar la máxima potencia que puede proporcionar el SPL-PL90\_3, se le debe de suministrar un pulso de corriente de 30 A con una duración de 100 ns. Para tal efecto, se diseñó un circuito basado en las notas de aplicación de Osram para el manejo de este tipo de dispositivos [94,95].

El circuito consta básicamente de un capacitor que se carga a un determinado voltaje durante un tiempo relativamente largo con respecto a la duración del pulso. Posteriormente, con la ayuda de un transistor de efecto de campo, que funciona como interruptor electrónico, se descarga totalmente a través del diodo láser. Esto genera un pulso de corriente cuya magnitud, en el caso ideal, puede deducirse de la definición de capacitancia:

$$I_{\max} = \frac{CV_C}{\tau} \quad (19)$$

Donde  $C$  es la capacitancia del condensador,  $V_C$  es el voltaje en el mismo y  $\tau$  la duración del pulso. Si se desea una corriente máxima de 30 A y un pulso de 100 ns, la relación de voltaje y capacitancia debe de ser  $CV_C = 3 \times 10^{-6}$ . Para un capacitor de 50 nF,



por ejemplo, se necesitará un voltaje de alimentación de 60 V. En la práctica, la duración del pulso depende también de las características de conmutación tanto del transistor como del diodo láser. En cualquier caso, tanto la corriente como el ancho de pulso se podrán controlar variando los valores tanto del voltaje de alimentación como del capacitor.

Por otro lado, al manejarse cambios de corriente tan bruscos, es necesario reducir al mínimo las inductancias parásitas que podrían localizarse en las patas de los componentes o en las pistas del circuito impreso. Estas inductancias podrían generar voltajes de sobretiro bastante altos; si consideramos que por cada centímetro de alambre conductor (del calibre de las patas del diodo láser) se agregan aproximadamente 8 nH de inductancia en serie, y teniendo variaciones de corriente de 30 A en 10 ns (el tiempo de subida del transistor), se podrían generar voltajes transientes de  $L \frac{di}{dt} = 24 \text{ V}$ . Por ello, lo más recomendable es utilizar componentes de montaje superficial y colocarlos cerca uno del otro [94].

Para conmutar tanta corriente en tan poco tiempo, se necesita un transistor que soporte una corriente pico de al menos 30 A, que tenga una resistencia de encendido muy baja, una capacitancia de entrada baja y una alta velocidad de conmutación. El transistor que se eligió es un MOSFET con matrícula FDS5351 [96]. Para obligar a este transistor a conmutar de forma veloz, se hace necesario que su compuerta sea cargada muy rápido, lo que implica una corriente de disparo considerable. Por ello se necesita un circuito controlador de disparo del MOSFET, que no es más que dos transistores de menor potencia, uno canal N y otro canal P, que realizan este trabajo. Existen circuitos integrados que ya realizan esta función. El controlador del MOSFET que se eligió es el MIC4452 [97].

Para poder medir la corriente que pasa por el diodo láser, se colocó una resistencia de  $0.05 \Omega$  en serie (del diodo láser a tierra) y la tensión en la misma se midió con un amplificador operacional.



El láser puede resistir un ciclo de trabajo de 0.1%, esto es, operarlo con pulsos de 100 ns a una frecuencia de 10 kHz. Para no trabajar al límite y además para no requerir una fuente de alimentación de tanta potencia, se decidió trabajar a una frecuencia de 1 kHz. Los pulsos se generan con un circuito multivibrador astable hecho con un temporizador 555.

En la Fig. 55 se puede ver uno de los pulsos de corriente generados por el controlador del láser. La imagen muestra el voltaje en la resistencia de  $0.05\Omega$ , por lo que se puede calcular que el pulso fue de 22 A y tuvo una duración de 100 ns.

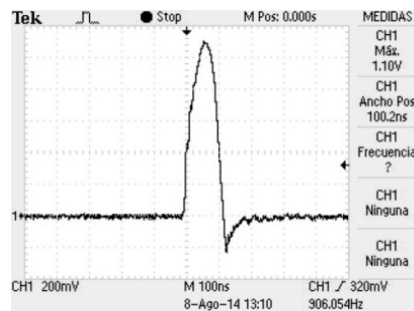


Fig. 55: Pulso de voltaje medido en la resistencia de  $0.05\Omega$ .

El circuito del controlador láser (sin la etapa de generación del tren de pulsos) se puede apreciar en la Fig. 56.

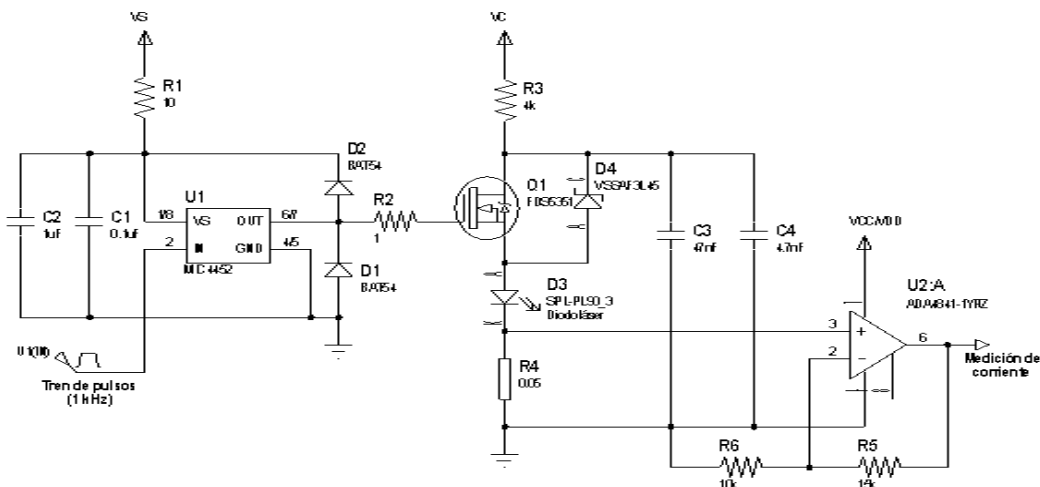


Fig. 56: Circuito controlador del láser pulsado SPL-PL90\_3.



### 5.6.3. Fuente de alimentación.

Para poder cargar el capacitor del controlador del láser, se diseñó y construyó una fuente de alimentación variable de 0 – 150 V y 10 W. Al controlar el voltaje de carga de dicho condensador, se tiene la capacidad de variar tanto el ancho de pulso como la intensidad de corriente que pasará por el diodo láser. El circuito está diseñado como una fuente lineal que rectifica el voltaje de la línea de alimentación y lo regula mediante dos transistores MOSFET (Fig. 57).

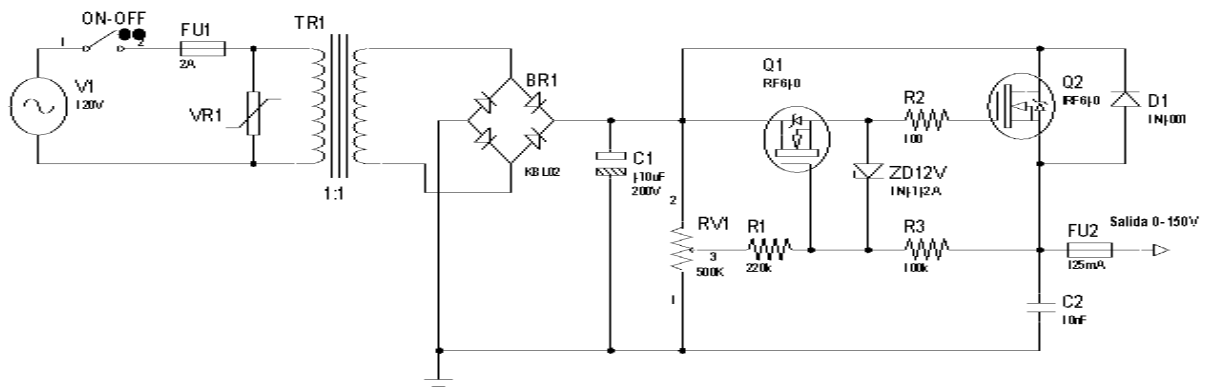


Fig. 57: Circuito de la fuente de alimentación variable (0 – 150 V).

### 5.6.4. Luxómetro infrarrojo.

Se construyó un luxómetro infrarrojo para poder medir de forma efectiva la potencia lumínica del láser pulsado y predecir la energía radiante que se está generando. Para tal efecto, se consiguió un fotodiodo de la marca Osram, modelo SFH213-FA cuyas características se pueden observar en la Tabla 8.

Tabla 8: Características del fotodiodo Osram SFH213-FA.

Parámetro	Valor
Longitud de onda de sensibilidad máx.	900 nm
Rango espectral de sensibilidad	750 – 1100 nm
Dimensiones del área sensitiva	1 mm × 1 mm
Corriente oscura	1 nA



Sensibilidad espectral	0.65 A/W
Tiempos de subida y bajada	5 ns
Voltaje en directa	1.3 V
Capacitancia	11 pF

Este fotodiodo se instrumentó mediante un convertidor de corriente-voltaje con ganancia variable, como se muestra en la Fig. 58.

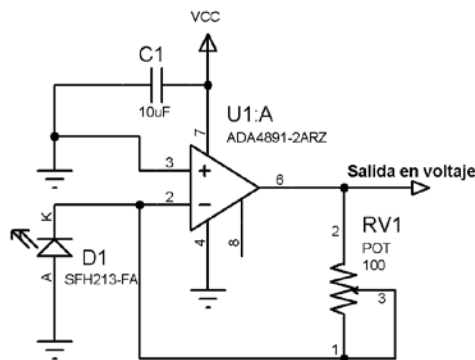


Fig. 58: Circuito de instrumentación del fotodiodo Osram SFH213-FA.

### 5.6.5. Transductor ultrasónico.

Se utilizó un transductor ultrasónico PZT obtenido de una sonda para monitor Doppler fetal de 3 MHz. En realidad, este tipo de sondas cuentan con dos cerámicas en forma de media luna; una la utilizan para transmitir y la otra para recibir. Sin embargo, en ésta aplicación no se necesita transmitir así que los dos transductores fueron conectados en paralelo y su salida fue amplificada con el circuito que se muestra en la Fig. 60. Este circuito es un amplificador no inversor, en cuya entrada se colocan las cerámicas PZT referenciadas a tierra y en paralelo con una resistencia de 10 kΩ para acoplar impedancia, como se explica en [98]. Para ello, se tuvo que medir la magnitud de la impedancia de los transductores en paralelo. Esto se hizo con la ayuda de un analizador de espectro (Rigol DSA815-TG) con el método que se describe en [99]. En la gráfica de la Fig. 59 se muestra el resultado de la medición.

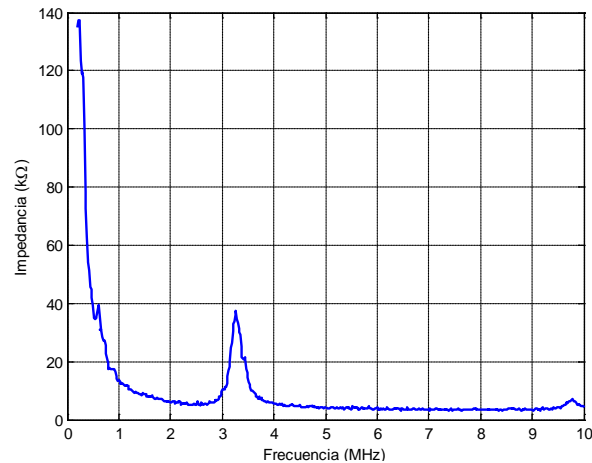


Fig. 59: Magnitud de la impedancia en los transductores PZT conectados en paralelo.

Para probar el funcionamiento del transductor y su circuito acondicionador, se excitó el dispositivo con ráfagas de ondas ultrasónicas producidas con la ayuda de un monitor Doppler fetal con una frecuencia de 2 MHz. La salida de voltaje del preamplificador se puede ver en la Fig. 61.

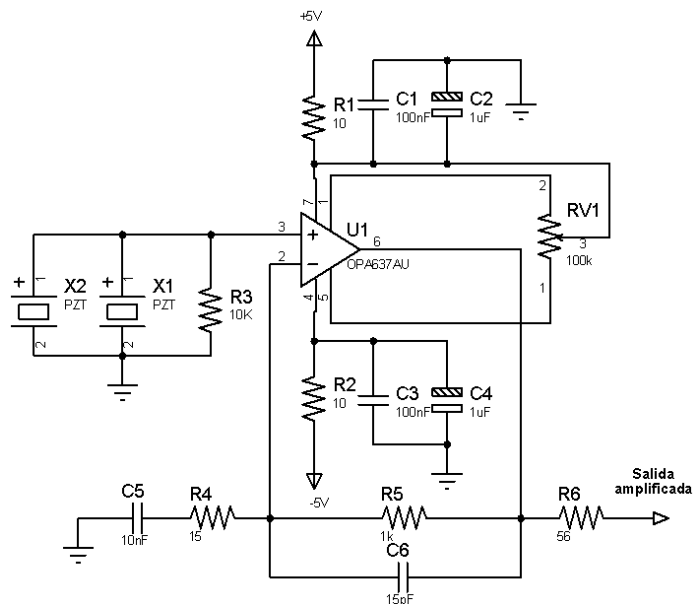


Fig. 60: Circuito preamplificador del transductor ultrasónico PZT.

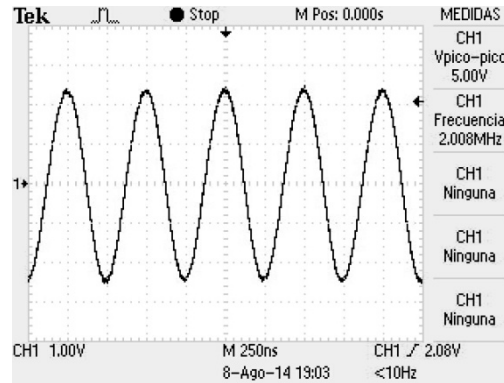


Fig. 61: Respuesta del transductor ultrasónico al ser excitado con un monitor Doppler fetal de 2 MHz.

### 5.6.6. Pruebas realizadas con espectroscopía fotoacústica pulsada.

Para verificar que se podía obtener una señal fotoacústica con esta técnica, se hizo un pequeño experimento en el cual se colocó el transductor ultrasónico sobre la piel del antebrazo, valiéndose de un poco de gel para ultrasonido con el objetivo de acoplar las impedancias acústicas. El diodo láser se colocó entre los dos piezoeléctricos y se utilizó el luxómetro infrarrojo para verificar que la luz del láser tuviera una buena intensidad. Con la ayuda de un osciloscopio se midió la salida del amplificador del transductor piezoeléctrico, esperando ver un pulso inicial correspondiente al disparo del láser y unos microsegundos después, otro correspondiente al efecto fotoacústico (de 2 a 10  $\mu$ s, dependiendo de la distancia del transductor al punto de medición, y de la velocidad del sonido en el medio [100,82,101]). Sin embargo, no fue posible ver ninguna señal fotoacústica; solamente ruido electromagnético provocado por la corriente circulando por el diodo láser. El circuito de control del láser se blindó eléctricamente y aunque el ruido bajó considerablemente, la señal fotoacústica siguió sin aparecer. Teóricamente, al alimentar el diodo láser con pulsos de corriente de 30 A, éste debería producir pulsos de luz de 75 W, por lo que la energía liberada por cada disparo sería de 7.5  $\mu$ J, la cual, a juzgar por la literatura, es una buena cantidad de energía para este fin. No obstante, el área sobre la cual fue aplicada, quizás fue demasiado grande dado que el láser no cuenta con un lente de enfoque y éste fue aplicado directamente sobre la piel. Teniendo en cuenta la divergencia del láser, que consta en la hoja de datos, justo al tocar la piel, éste radiaría un área de 0.286 mm<sup>2</sup>, por lo que la densidad de energía suministrada



sería de aproximadamente  $2.63 \text{ mJ/cm}^2$ , cuya magnitud está dentro de lo que generalmente se emplea [102,103,104]. Sin embargo, entre más profunda sea la absorción de la luz en el tejido, la densidad de energía cae drásticamente. Así, a 1 mm de profundidad en la piel, ésta sería de  $0.64 \text{ mJ/cm}^2$ , y a 2 mm, de apenas  $0.28 \text{ mJ/cm}^2$ , por lo que la señal fotoacústica se ve igualmente atenuada.

A la par de los intentos realizados con esta técnica, se decidió probar con otro método fotoacústico, en el que en lugar de utilizar luz pulsada de alta intensidad, se emplea luz modulada a una determinada frecuencia, con la idea de aprovechar los LEDs infrarrojos que se utilizaron en la espectroscopía NIR e intentar medir el coeficiente de absorción óptica de la piel en una mayor cantidad de longitudes de onda. Tal método se detalla en la siguiente sección.

#### **5.6.7. El efecto fotoacústico con luz modulada.**

Hace más de 100 años Alexander Graham Bell descubrió que si se hace incidir luz modulada periódicamente sobre una muestra colocada en una celda cerrada, se producía una señal acústica de la misma frecuencia. En la actualidad las técnicas basadas en ese fenómeno, que se nombró efecto fotoacústico, tienen muchas aplicaciones.

El efecto fotoacústico en sólidos fue descrito matemáticamente por Rosencwaig y Gersho [105], utilizando un modelo de una celda cerrada como el de la Fig. 62. Suponiendo que un haz de luz monocromático, cuya intensidad varía sinusoidalmente, es absorbido por el medio según la ley de Beer-Lambert y resolviendo las ecuaciones de difusión de calor, se puede calcular una ecuación que describe el cambio de temperatura periódico en la capa de aire que está justo en contacto con la muestra a analizar. Para conocer la amplitud de la señal acústica producida, es decir, la variación de presión periódica dentro de la celda, se asumió que esta capa de aire en contacto con la muestra se comporta como un gas ideal, dilatándose y comprimiéndose debido al cambio en su temperatura, y que el resto del gas dentro de la celda responde a la





acción de este pistón de forma adiabática. La variación de presión en el gas de la celda está dada por la ecuación (20).

$$\Delta P(t) = Q \exp \left[ j \left( \omega t - \frac{\pi}{4} \right) \right] \quad (20)$$

Donde  $\omega$  es la frecuencia a la cual se modula la luz y  $Q$ , la envolvente compleja de la variación sinusoidal de presión. Al hacer una medición con un amplificador lock-in, la variación de presión se desplaza de la frecuencia moduladora a corriente directa, quedándonos únicamente el valor de  $Q$ , que está dado por la ecuación (21).

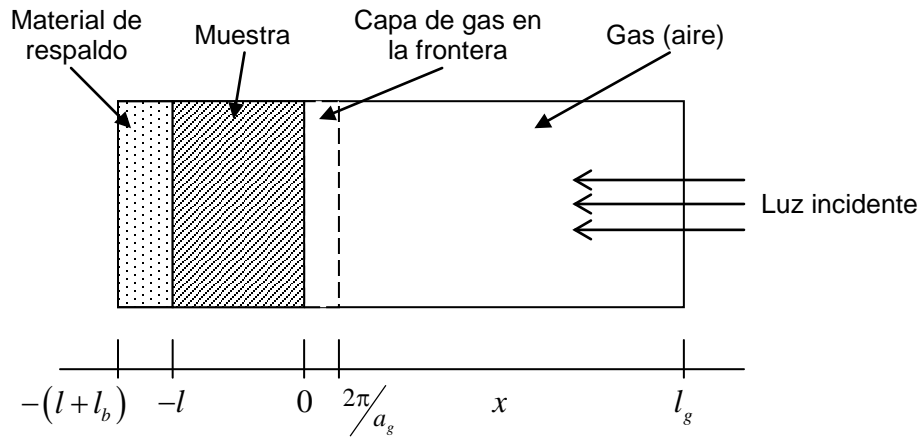


Fig. 62. Diagrama de una celda fotoacústica.

$$Q = Y \frac{\beta}{k_s a_g (\beta^2 - \sigma_s^2)} \left( \frac{(r-1)(b+1) \exp(\sigma_s l) - (r+1)(b-1) \exp(-\sigma_s l) + 2(b-r) \exp(-\beta l)}{(g+1)(b+1) \exp(\sigma_s l) - (g-1)(b-1) \exp(-\sigma_s l)} \right) \quad (21)$$

Con:

$$Y = \frac{\gamma I_0 P_0}{2\sqrt{2} l_g T_0} \quad (22)$$

$$b = \frac{k_b a_b}{k_s a_s} = \frac{\varepsilon_b}{\varepsilon_s} \quad (23)$$



$$g = \frac{k_g a_g}{k_s a_s} = \frac{\epsilon_g}{\epsilon_s} \quad (24)$$

$$r = \frac{(1-j)\beta}{2a_s} = \frac{(1-j)\mu_s}{2\mu_\beta} \quad (25)$$

$$\sigma_s = (1+j)a_s = (1+j)\left(\frac{\omega}{2\alpha_s}\right)^{1/2} \quad (26)$$

Donde  $l$  es el espesor de la muestra;  $\beta$ , el coeficiente de absorción óptica de la muestra y su inverso  $\mu_\beta$ , la longitud de absorción óptica;  $a_i$ , el coeficiente de difusión térmica y su inverso  $\mu_i$ , la longitud de difusión térmica;  $\alpha_i$ , la difusividad térmica;  $\epsilon_i$ , la efusividad térmica;  $k_i$ , la conductividad térmica; donde  $i$  toma los subíndices  $s$ ,  $g$  o  $b$  para la muestra, el gas o el material de respaldo, respectivamente.  $Y$  es una constante que depende de las condiciones iniciales en la celda fotoacústica.

La ecuación (21) se puede simplificar bastante si se toman en consideración ciertos casos en los que la muestra a analizar puede ser ópticamente opaca o transparente y térmicamente gruesa o delgada. Todos estos casos se estudian detalladamente en [105].

En la práctica, se utiliza algún tipo de transductor, como un micrófono, para la medición de la variación de presión dentro de la celda fotoacústica, producida al incidir luz modulada a cierta frecuencia sobre la muestra. Con la ayuda del modelo matemático descrito anteriormente, se pueden obtener diversas propiedades tanto ópticas como térmicas del material en estudio.

### 5.6.8. Amplificador lock-in.

Como se mencionó anteriormente, para realizar mediciones fotoacústicas con luz modulada periódicamente, se requiere de un aparato llamado amplificador lock-in ya



que generalmente este tipo de señales son de baja amplitud y están acompañadas por ruido de fondo de una potencia considerable.

El principio del lock-in es el de tratar a la señal de modo que pueda ser fácilmente diferenciada del ruido. Por definición, el ruido consiste en oscilaciones aleatorias irregulares con un amplio rango de frecuencias. Si la señal de interés se modula con una portadora de frecuencia y fase definidas, es posible separar esta señal de las componentes de ruido. Esto requiere una frecuencia de referencia para la señal portadora.

En el diagrama de la Fig. 63 se puede apreciar mejor el funcionamiento del amplificador lock-in. La señal portadora ( $f_{MOD}$ ) excita el sensor. Esto hace que la señal generada por el parámetro físico a medir se desplace en frecuencia a la de la portadora (modulación). Este desplazamiento permite colocar a la señal deseada en una banda de frecuencia con menor ruido. Un filtro pasa-banda remueve el ruido fuera de dicha banda de frecuencia. Un demodulador síncrono, o mezclador, desplaza sólo la señal en la frecuencia de referencia de regreso a corriente directa (CD). Finalmente un filtro pasa-bajas remueve parte del ruido restante en la señal.

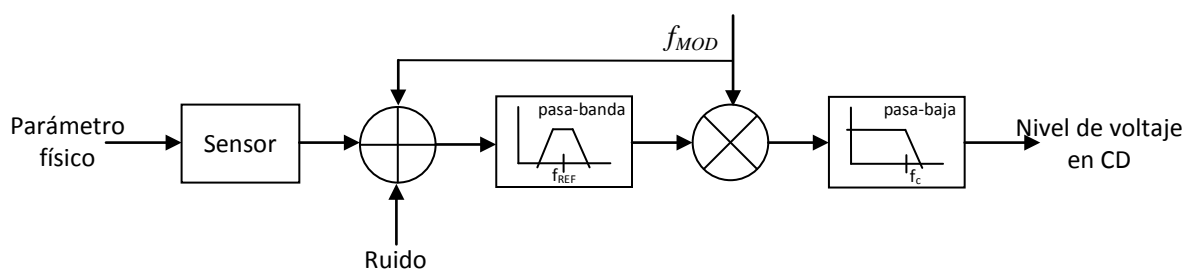


Fig. 63. Diagrama a boques del amplificador lock-in.

Si la fase de la señal, relativa a la fase de la portadora, permanece constante, la salida del amplificador lock-in es directamente proporcional a la amplitud de la señal de entrada. Pero si ésta no se mantiene constante, se hace necesario obtener dos componentes ortogonales de la señal para determinar su amplitud y fase relativa. Estas



son la componente en fase ( $I$ ) y la componente en cuadratura ( $Q$ ). Si la amplitud de la señal permanece relativamente constante durante el tiempo de la medición, la componente  $I$  resultará de demodular la señal de entrada directamente con la de referencia, y la componente  $Q$ , de demodularla con la señal de referencia desfasada  $90^\circ$ . Una vez obtenidas estas dos componentes, la amplitud ( $A$ ) y la fase ( $\theta_{rel}$ ) de la señal original se pueden calcular con las ecuaciones (27) y (28).

$$A = \sqrt{I^2 + Q^2} \quad (27)$$

$$\theta_{rel} = \cos^{-1}\left(\frac{Q}{A}\right) = \sin^{-1}\left(\frac{I}{A}\right) \quad (28)$$

Dado que el seno inverso y el coseno inverso sólo están definidos en dos cuadrantes, debe de tomarse en cuenta el signo de  $I$  y  $Q$  para mapear el resultado en el intervalo completo de  $-\pi$  a  $\pi$ . No se recomienda el uso de la función tangente inversa ya que las mediciones se volverían muy sensibles al ruido cuando la fase se acerque a  $\pm\pi/2$  [106,107,108].

Aunque en teoría la señal de referencia debería de ser una sinusoidal, en la práctica ésta se puede cambiar por una señal cuadrada o triangular sin afectar demasiado el resultado [109].

Dado que el amplificador lock-in es un instrumento ampliamente usado, existen diversas opciones comerciales con distintos anchos de banda y resoluciones, dependiendo de la aplicación a la cual están destinados. Generalmente este tipo de amplificadores comerciales son costosos, de grandes dimensiones y relativamente pesados por lo que no son aptos para aplicaciones portátiles o en las que no se pueda disponer de una cuantiosa suma de dinero.

En la Tabla 9 se muestran algunos amplificadores lock-in comerciales así como sus características principales y precios.



Tabla 9. Características de algunos amplificadores lock-in comerciales.

<i>Modelo</i>	<i>Marca</i>	<i>Ancho de banda</i>	<i>Resolución</i>	<i>Sensibilidad</i>	<i>Precio*</i>	<i>Ref.</i>
MFLI Lock-in Amplifier	Zurich Instruments	DC – 500 kHz	16 bits	1 nV – 3 V	\$5,730.00	[110]
7265	Perkin Elmer	1 mHz – 250 kHz	16 bits	1 nV – 1 V	\$5,300.00	[111]
SR810/SR830	Stanford Research Systems	1 mHz – 100 kHz	16 bits	2 nV – 1 V	\$4,150.00	[112]
USB LockIn 250	Anfatec Instruments AG	0.1 Hz – 250 kHz	14 bits	10 nV – 10 V	\$2,833.00	[113]

\* Todos los precios en dólares estadounidenses a fecha de 2017.

Por las razones expuestas arriba, algunos investigadores han optado por hacer amplificadores lock-in diseñados especialmente para cubrir sus necesidades. En la Tabla 10 se pueden apreciar algunos de estos desarrollos así como sus características.

Tabla 10. Características de algunos amplificadores lock-in desarrollados por investigadores.

<i>Grupo</i>	<i>Año</i>	<i>Ancho de banda</i>	<i>Resolución</i>	<i>Sensibilidad</i>	<i>Precio*</i>	<i>Ref.</i>
Sengupta <i>et al.</i>	2005	DC – 10 kHz	Analógico	ND**	\$100.00	[114]
Liu <i>et al.</i>	2012	500 Hz – 100 kHz,	24 bits	1 $\mu$ V – 2 V	ND	[115]
Liu <i>et al.</i>	2013	DC – 1 kHz	Analógico	ND	ND	[108]
Maya-Hernández <i>et al.</i>	2014	DC – 317 kHz	Analógico	800 $\mu$ V – 240 mV	ND	[109]
Gervasoni, <i>et al.</i>	2016	1 Hz – 6 MHz,	14 bits	ND	ND	[116]

\* Todos los precios en dólares estadounidenses a fecha de 2017.

\*\* ND: No determinado.

Con el fin de realizar experimentos con las técnicas fotoacústicas se diseñó y construyó un amplificador lock-in de fácil manejo, portátil y económico, que puede



efectuar mediciones en un intervalo de 1 Hz a 30 kHz, y medir voltajes del orden de los micro voltios. El esquema eléctrico de dicho amplificador se presenta en el Apéndice D.

La entrada del amplificador lock-in está constituida por un filtro pasa-altas y una primera etapa de ganancia realizada con un amplificador operacional de bajo ruido AD8674 en configuración no-inversora. El filtro utilizado es del tipo RC (resistor-capacitor) de primer orden ( $f_c = 0.159$  Hz) cuya función es la de eliminar cualquier voltaje de CD en el cual pudiera estar montada la señal medida. El capacitor de este filtro se encuentra en paralelo con un interruptor analógico (DG413) de forma que pueda ser suprimido en caso de que no se requiera. De igual forma, otro interruptor analógico une la entrada del lock-in con una resistencia acoplada a un voltaje positivo para poder conectar directamente un micrófono electret al instrumento y que éste quede polarizado. La selección del tipo de entrada (de CD, CA o para micrófono) la realiza el usuario de manera digital desde una interfaz en la computadora personal. La etapa de ganancia se controla igualmente de forma digital. Esto se hizo con ayuda de un multiplexor analógico HEF4051 que cambia la resistencia de retroalimentación del amplificador de forma que se puedan obtener ocho multiplicadores ( $\times 2$ ,  $\times 3$ ,  $\times 5$ ,  $\times 10$ ,  $\times 20$ ,  $\times 30$ ,  $\times 100$  y  $\times 200$ ). De aquí, la señal pasa por otro filtro pasa-altas ( $f_c = 0.159$  Hz) a una segunda etapa de amplificación cuya ganancia se puede cambiar de forma digital del mismo modo ( $\times 2$ ,  $\times 3$ ,  $\times 5$ ,  $\times 20$ ,  $\times 30$ ,  $\times 50$ ,  $\times 300$  y  $\times 500$ ). De esta forma se pueden obtener en total hasta 36 ganancias distintas.

Una vez amplificada, la señal pasa por un último filtro pasa-altas ( $f_c = 0.169$  Hz) hacia otro circuito que le suma un voltaje de 1.8 V, necesario para la siguiente etapa. Posteriormente, la señal pasa por un filtro pasa-bajas ( $f_c$ ) que funciona como anti-alias hacia un demodulador síncrono modelo ADA2200. Este integrado hace varias funciones. La principal es la de demodular la señal de entrada para recuperar el voltaje en corriente continua que se desea medir, esto es, que multiplica la señal de entrada por una señal cuadrada de referencia de la misma frecuencia. Esta señal de referencia puede ser desfasada internamente  $90^\circ$  para obtener la componente en cuadratura de la medición, o sin retraso, para obtener la componente en fase. Con estas dos



componentes, el programa computacional puede calcular tanto la amplitud como la fase de la señal medida.

La configuración y control del ADA2200 se hace con ayuda de un microcontrolador mediante comunicación serial (SPI). Debido a que ambos chips trabajan con niveles de voltaje distintos, se tuvo que recurrir a divisores de tensión para las señales unidireccionales y convertidores de nivel lógico, para las bidireccionales.

El ADA2200 también cuenta internamente con dos filtros cuyas frecuencias de corte están supeditadas a la frecuencia de la señal de reloj. Un filtro de diezmado que produce una muestra filtrada por cada ocho muestras en la entrada. Y otro filtro pasa-banda (del tipo IIR), cuya frecuencia central corresponde a la de la señal demoduladora, y asegura que sólo la componente de la señal de entrada en dicha frecuencia se mezcle con la de referencia, produciendo un voltaje fijo en CD.

A la salida de este integrado se colocó un filtro pasa-bajas ( $f_c = 48.2$  kHz) que servirá de anti-alias para el convertidor analógico-digital (ADC). El ADA2200 tiene un ancho de banda de hasta 30 kHz.

Para digitalizar la salida analógica del ADA2200, se utilizó un ADC modelo ADS7883, de 12 bits de resolución, el cual se comunica de manera serial (SPI) con el microcontrolador. La alimentación de este integrado se filtró con un circuito LC ( $f_c = 50.3$  kHz) para atenuar el ruido de la fuente.

El ADA2200 necesita de una señal de reloj (CLKIN) para poder generar la señal utilizada para la demodulación. Debido a que éste integrado tiene internamente un divisor de frecuencia, la señal de reloj debe de tener 64 veces la frecuencia deseada de la señal de referencia. Para producirla, se empleó el generador de formas de onda programable AD9833, que alimentado con una señal de reloj de 25 MHz, puede generar ondas cuadradas de hasta 12.5 MHz, con una resolución de 0.1 Hz. Para obtener la señal de 25 MHz se empleó un cristal de cuarzo como oscilador Pierce. La señal de referencia (REFSIG), la cual se usará como señal moduladora o de excitación para la



medición, se extrae de dicha señal de reloj después de dividirla en frecuencia las mismas 64 veces con ayuda de un contador binario 74LS393.

Se utilizó un microcontrolador PIC18F2550 para establecer la comunicación USB con la computadora personal así como para configurar y controlar la frecuencia del generador de onda, controlar los selectores de ganancia, cambiar el selector de tipo de entrada, configurar y controlar el ADA2200 y controlar el convertidor analógico-digital. Para realizar todas estas funciones, se escribió un programa para el controlador en lenguaje C, con la ayuda del compilador mikroC.

La alimentación del sistema es por el mismo puerto USB. Sin embargo, se necesitaron convertidores DC-DC para generar los voltajes de polarización de los amplificadores operacionales y que éstos se mantuvieran estables y bajos de ruido. Se utilizó el MIC2288 para generar la alimentación positiva (5 V) y el LM2611 para la alimentación negativa (-5 V). También se empleó el MIC5205 para obtener los 3.6 V necesarios para alimentar el demodulador.

Se programó una interfaz gráfica con ayuda del compilador Visual Basic 6 (Fig. 64) mediante la cual el usuario puede controlar las funciones del amplificador lock-in y hacer mediciones. Éstas se visualizan en dos gráficas, una para la magnitud y otra para la fase.



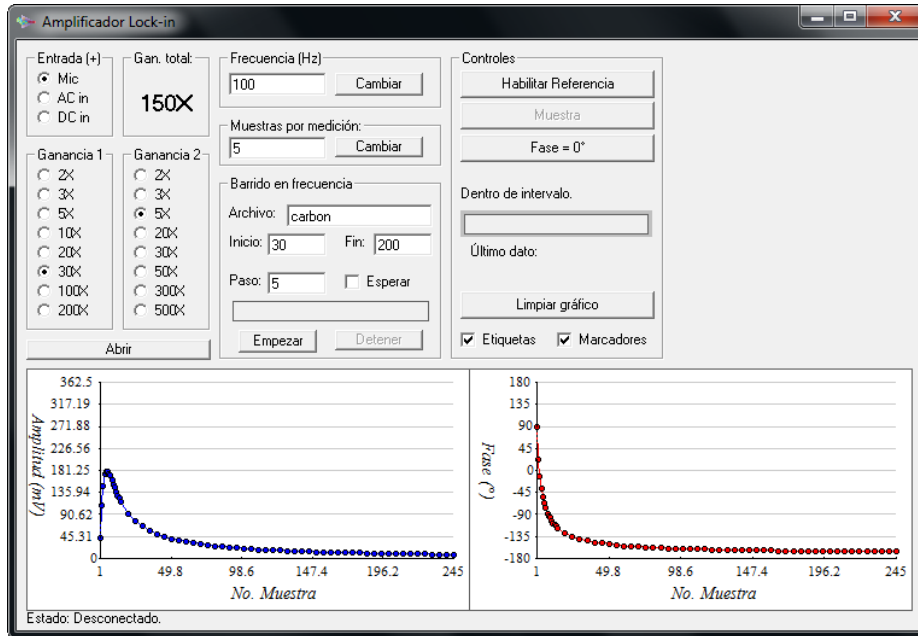


Fig. 64. Ventana de la interfaz gráfica del amplificador lock-in.

También cuenta con opciones para guardar los datos recibidos en un archivo o abrir uno ya existente; cambiar la frecuencia de la señal de referencia y habilitarla o deshabilitarla de ser necesario; tomar una sola medición o hacer un barrido en frecuencia; promediar varias muestras por medición; activar o desactivar el circuito de acondicionamiento para el micrófono electret; y seleccionar la ganancia en cualquiera de las dos etapas de amplificación. La resolución mínima para el barrido en frecuencia es de 0.1 Hz. La información obtenida se guarda en un archivo de texto en tres columnas, la primera contiene el valor de frecuencia, las segunda la amplitud de la señal y la tercera su fase, en grados.

Para verificar el buen funcionamiento del amplificador lock-in desarrollado, se aplicó en algunos experimentos utilizando la técnica fotoacústica.

El primero de ellos fue la determinación de la constante de tiempo de un micrófono electret usando el modelo para una celda fotoacústica abierta, descrito por Marquezini *et al.* en [117]. En este experimento se colocó una delgada laminilla de aluminio (con un espesor de aproximadamente 14  $\mu\text{m}$ ) sobre un micrófono electret, unidos herméticamente con grasa de vacío (grasa de silicón). Se utilizó la señal de referencia



del lock-in para modular la luz de un láser de 5 mW de potencia y una longitud de onda de 532 nm, el cual se enfocó sobre la laminilla de aluminio (Fig. 65). Se midió con la ayuda del amplificador lock-in la respuesta del micrófono electret, haciendo un barrido en frecuencia desde 5 Hz hasta 134 Hz. Considerando la laminilla como una muestra térmicamente delgada y ópticamente opaca dentro del intervalo de frecuencia de la medición, se tiene que la magnitud de la señal generada en la celda fotoacústica varía en función de la frecuencia de modulación como indica la ecuación (29).

$$V_{mic} = |V_{opc}| \cdot \omega^{3/2} = \frac{P_1 \omega}{\sqrt{P_2^2 \omega^2 + 1}} \quad (29)$$

Donde  $P_1$  es una constante que depende de las condiciones iniciales de la celda fotoacústica, y  $P_2 = RC$  es la constante de tiempo del micrófono. De esta forma, para conocer estos parámetros, basta con obtener la respuesta de la celda fotoacústica, multiplicarla por  $\omega^{3/2}$  y hacer un ajuste de los datos obtenidos a la ecuación (29).

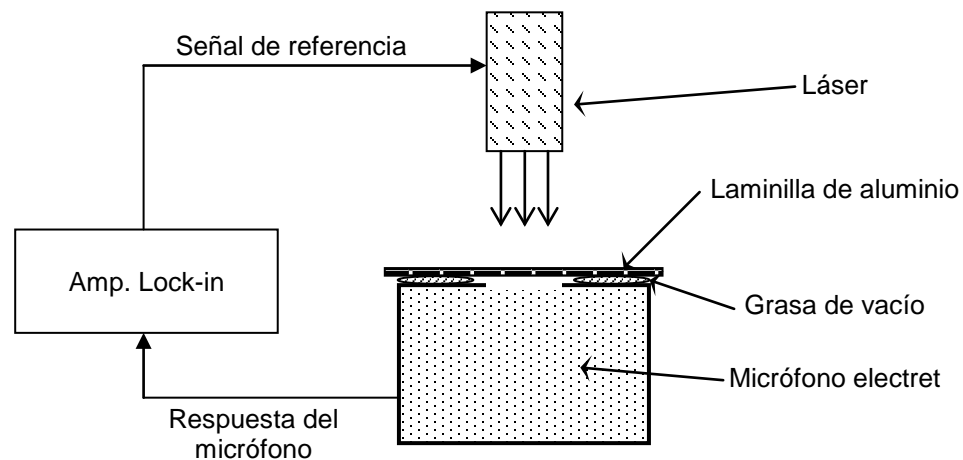


Fig. 65. Arreglo experimental para determinar la constante de tiempo del micrófono.

La respuesta de la celda fotoacústica medida con el lock-in se muestra en la Fig. 66 (izquierda), así como ésta misma multiplicada por  $\omega^{3/2}$  (derecha, en azul) y el mejor ajuste a la ecuación (29) (derecha, en rojo). La constante de tiempo del micrófono se encontró, como se esperaba, de  $3.05 \text{ ms} \pm 0.1 \text{ ms}$ .

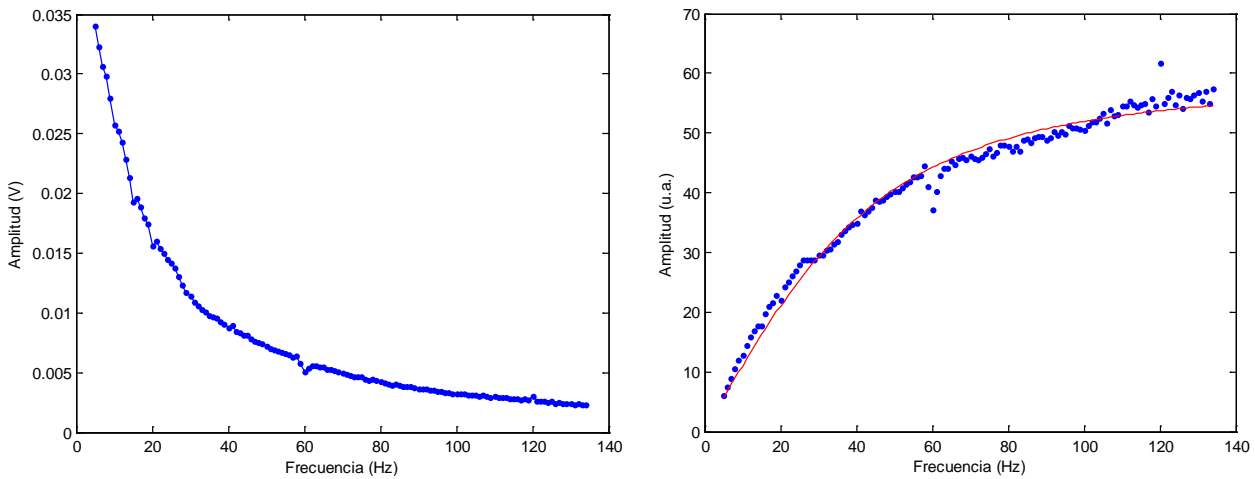


Fig. 66. Izquierda: Señal de la celda fotoacústica medida con el lock-in. Derecha: Mejor ajuste a la ec. (29).

Otro de los experimentos realizados fue la medición de la difusividad térmica de una laminilla de vidrio (cubreobjetos). El arreglo experimental es similar al usado anteriormente. Se colocó el cubreobjetos en contacto con el micrófono, usando grasa de vacío. Debido a que el vidrio es transparente a la longitud de onda usada, éste se tuvo que hacer ópticamente opaco. Esto se consiguió adhiriéndole una delgada laminilla de aluminio con pasta térmica (Fig. 67). De igual forma, se moduló el láser con la señal de referencia del lock-in y se incidió el haz sobre el aluminio.

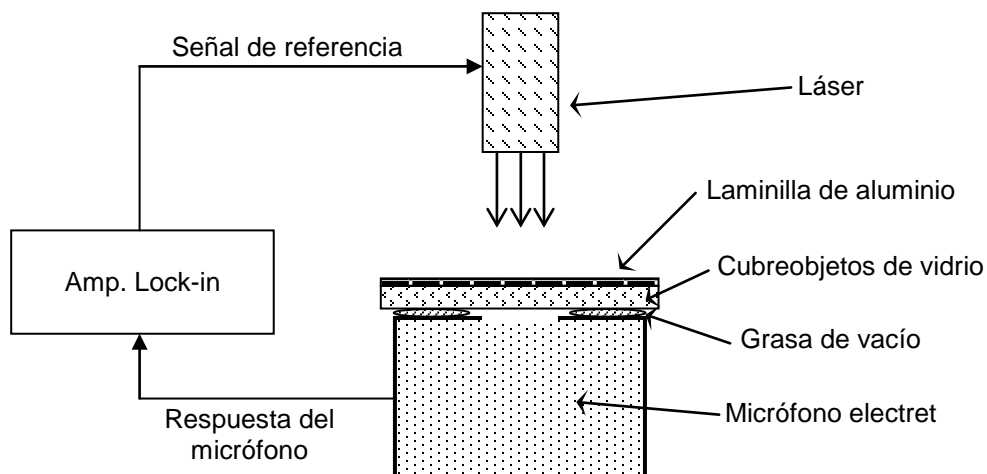


Fig. 67. Arreglo experimental para determinar la difusividad del vidrio.



Esta vez, la pieza de vidrio (de aproximadamente 140  $\mu\text{m}$  de espesor) puede considerarse como una muestra térmicamente gruesa y ópticamente opaca (gracias al recubrimiento con aluminio). De esta forma se espera que la señal medida de la celda fotoacústica sea de la forma:

$$|V_{opc}| = \frac{P_1 \exp(-P_2 \sqrt{f})}{\sqrt{1 + (2\pi f RC)^2}} \quad (30)$$

Donde  $P_1$  es, como en el caso anterior, una constante y  $P_2$  depende de la difusividad del material y su espesor. La difusividad en función de este parámetro es:

$$\alpha_s = \pi \left( \frac{l_s}{P_2} \right)^2 \quad (31)$$

Puesto que la constante de tiempo del micrófono ya se conoce, se puede ajustar la medición de la señal fotoacústica de la celda, medida con el lock-in, a la ecuación (30) y así conocer el parámetro  $P_2$ , con el cual se puede calcular la difusividad del material.

La medición se efectuó desde 15 Hz hasta 94 Hz (Fig. 68), y se ajustó a la ecuación (30). La difusividad térmica del cubreobjetos de vidrio se calculó de  $0.006 \text{ cm}^2/\text{s} \pm 0.0004 \text{ cm}^2/\text{s}$ , valor que es del orden que se esperaba ( $5.61 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ ) [118].

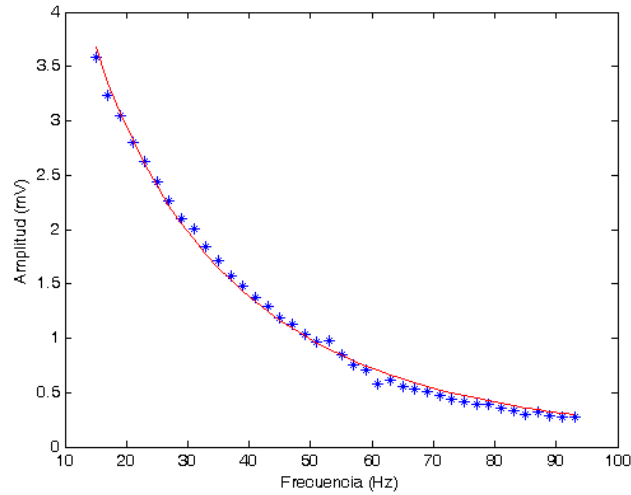


Fig. 68. Señal de la celda fotoacústica en la medición de la difusividad térmica del vidrio.

En la Fig. 69 se muestra la respuesta en frecuencia del amplificador lock-in, tanto en magnitud como en fase. La misma se midió conectando de la señal de referencia a tierra, una resistencia de 100 k $\Omega$  en serie con una de 100  $\Omega$  y efectuando la medición de voltaje sobre esta última. El barrido en frecuencia se hizo de 1 Hz hasta 30 kHz.

Una versión anterior de este amplificador lock-in se utilizó también en la medición de la efusividad térmica de ocho distintos líquidos, como se reporta en [119], obteniendo buenos resultados.

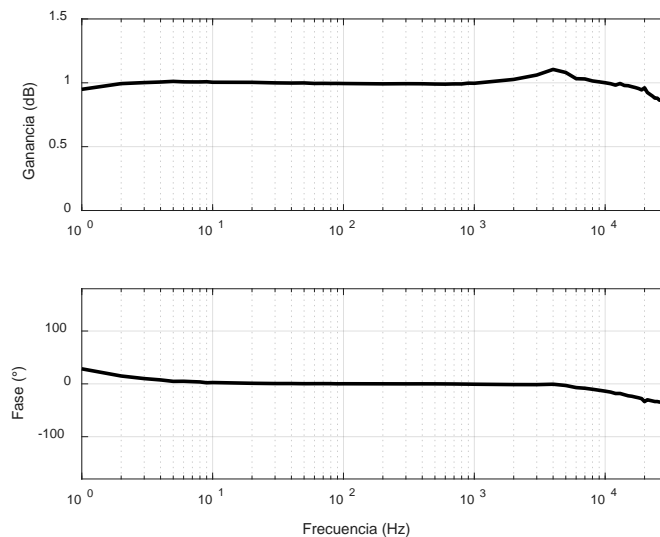




Fig. 69: Respuesta en frecuencia del amplificador lock-in.

### 5.6.9. Pruebas realizadas con espectroscopía fotoacústica con luz modulada.

Una vez teniendo el amplificador lock-in funcionando y la técnica fotoacústica montada, se decidió hacer pruebas para intentar medir el coeficiente de absorción de la piel en las distintas longitudes de onda de los LEDs infrarrojos con que se contaban (1200 nm, 1612 nm, 1720 nm y 2150 nm). Se pensó que era factible hacer esto dado que se puede considerar a la piel como una muestra térmicamente gruesa [120,121] y aunque, dependiendo de la longitud de onda de la luz incidida y del sitio de medición, ésta se puede comportar como ópticamente opaca o gruesa (ver Fig. 7), siempre es posible obtener información relacionada con el coeficiente de absorción óptica mientras la longitud de difusión térmica sea menor que la longitud de penetración óptica ( $\mu_s < \mu_\beta$ )[105], lo cual generalmente se cumple para el infrarrojo cercano.

Para poder hacer mediciones, se construyó una cámara fotoacústica que pudiera colocarse sobre la piel, como la mostrada en la Fig. 70 (izquierda). El extremo inferior, conectado acústicamente al micrófono electret a través de un pequeño canal, quedaba herméticamente cerrado por la parte superior con una ventana de cristal, y por la parte inferior, acoplado a la piel con grasa de vacío. Por el extremo contrario, se introducía el LED con el que se deseaba hacer la medición. El LED era controlado por la señal de referencia del amplificador lock-in a través de un circuito de corriente constante cuya magnitud se ajustaba a la máxima corriente permitida por el LED utilizado. El micrófono electret se conectó directamente al lock-in, a la entrada destinada para tal fin.

Con este montaje se intentaron hacer mediciones con los cuatro LEDs infrarrojos pero, debido a la baja potencia lumínica de los mismos y a la relativamente baja absorbancia de la piel a esas longitudes de onda, la señal fotoacústica resultó ser muy pobre. Si se aumentaba la ganancia del lock-in para amplificar la señal fotoacústica, también se amplificaba el ruido de fondo el cual, hasta cierto límite, podía ser filtrado



por el amplificador lock-in, pero al amplificar demasiado la señal, la entrada del lock-in se saturaba y era incapaz de distinguir la señal de interés. El ruido era principalmente provocado por el movimiento de la cámara sobre la piel y el ruido acústico de la habitación, y en menor medida, por el ruido eléctrico de la línea de alimentación.

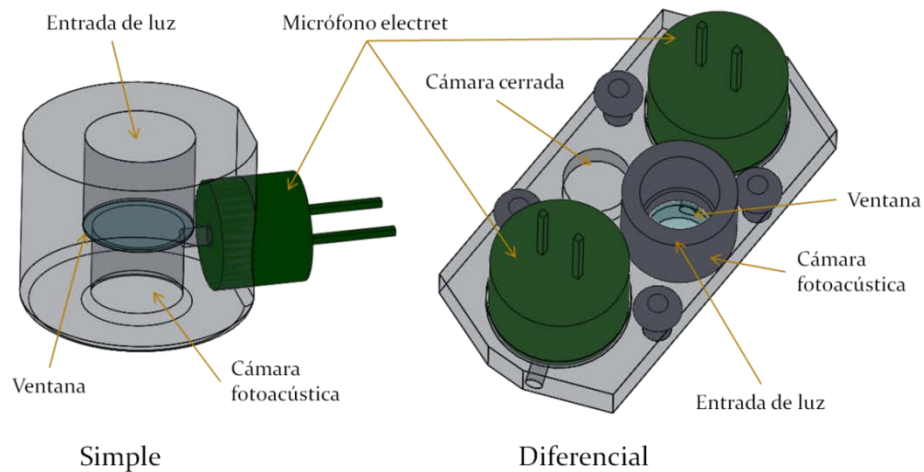


Fig. 70: Cámaras fotoacústicas construidas para mediciones sobre la piel.

Para intentar disminuir dicha interferencia, se construyó una cámara fotoacústica diferencial como la de la Fig. 70 (derecha), inspirada en el trabajo de Varela-Nájera *et al.* [122], en la que se tienen dos micrófonos electret, uno conectado a la verdadera cámara fotoacústica y otro conectado a una cavidad con las mismas dimensiones pero sin entrada de luz, de tal manera que lo único que tengan en común sean el ruido de la habitación y el del rozamiento con la piel. Posteriormente, la señal de los dos micrófonos es restada con la ayuda de un amplificador operacional, de forma que el ruido en común sea atenuado, y la señal resultante es introducida al amplificador lock-in. No obstante, la señal recuperada no mejoró lo suficiente como para poder hacer una medición aceptable sobre la piel.

Para superar estos inconvenientes, convendría utilizar una fuente de luz más potente, para aumentar la magnitud del efecto fotoacústico, o bien, utilizar un amplificador lock-in con un mayor rango dinámico, de manera que se pueda aumentar la ganancia de amplificación sin saturar la entrada del instrumento. Sin embargo, como



se mencionó con anterioridad, los LEDs que emiten en las longitudes de onda seleccionadas, pero con una mayor potencia lumínica, incrementan demasiado su costo. Por otro lado, modificar el amplificador lock-in para aumentar su rango dinámico habría requerido un total rediseño del mismo, consumiendo más recursos y tiempo. Por estas razones, no se continuó desarrollando esta técnica para la obtención de propiedades físicas de la piel.





## **6. Utilización del equipo desarrollado para la medición de pigmentos en tomates.**

Debido a los distintos contratiempos encontrados en la aplicación de los métodos elegidos para la extracción de propiedades físicas de la piel, con el fin de determinar la concentración de glucosa en sangre de manera no invasiva, se decidió no hacer más intentos con ese propósito y, en su lugar, reencaminar los esfuerzos hacia un nuevo objetivo, en el que se pudieran aplicar algunas de las técnicas e instrumentos con los que ya se contaban.

Para no alejarse demasiado del objetivo inicial, se propuso la determinación no invasiva de algún otro metabolito en alguna especie vegetal. De esta forma, se consideró viable medir la concentración de clorofila A, clorofila B y carotenoides así como la humedad en tomates rojos de forma no destructiva.

### **6.1. Medición de clorofila A, clorofila B, carotenoides y humedad en tomates.**

El tomate rojo o jitomate (*Solanum lycopersicum* L.), es una planta herbácea con hojas alternas y flores en forma de estrellas amarillas o blancas. El fruto es una baya de color rojo, cuyo tamaño varía desde 3 cm de diámetro hasta 16 cm. Su forma puede ser redondeada, achatada o en forma de pera y su superficie lisa o asurcada. Pertenece a la familia de las Solanáceas junto con el tabaco, el chile y la papa. Su nombre proviene del náhuatl, *xictlilotmatl* (tomate de ombligo). Es considerado el segundo vegetal más importante en el mundo después de la papa. Las principales variedades comerciales son: tomate bola, cherry, saladette, pera, beef, marmande, vemone, moneymaker, muchamiel, pometa tardío, san marzano, cocktail, ramillete y liso [123]. Es una de las hortalizas más importantes en México, siendo éste el principal proveedor a nivel mundial de esta baya, representando el 3.46% del PIB agrícola nacional [124].

Los pigmentos responsables de la coloración del tomate son principalmente las clorofilas y los carotenoides cuya composición va cambiando a lo largo de su proceso



de maduración. En éste proceso, las clorofilas se degradan y se sintetizan los carotenoides, los cuales le confieren al tomate la coloración anaranjada tenue que culmina en un rojo intenso. Estos pigmentos influyen en la percepción de frescura del tomate que, junto con la textura y el color, son los atributos de calidad más importantes [125].

La medición de estos pigmentos así como del contenido de agua del tomate son indicadores del grado de maduración del mismo y ayudan a evaluar su calidad tanto antes de su cosecha, como durante su almacenamiento y consumo [126,127].

Los métodos tradicionales para la medición de estos parámetros son de naturaleza destructiva, es decir, requieren partir el tomate para tomar una muestra cuya preparación y análisis consumen tiempo y esfuerzo. Por otro lado, también requieren de reactivos y costosos instrumentos. Por esta razón se han buscado otros métodos de medición más eficientes y no destructivos. Uno de ellos es la espectroscopía VIS-NIR que ha mostrado un gran potencial para este fin [127,128].

Sin embargo, para este estudio se optó por utilizar, en su lugar, la espectroscopía fotoacústica, ya que ofrece algunas ventajas sobre las técnicas espectrofotométricas habituales pues, a diferencia de estas, mide directamente la energía absorbida por la muestra, y no de manera indirecta, mediante transmitancia o reflectancia. De ahí que se puedan evitar posibles errores producidos por la dispersión de la luz en la muestra [129].

Para llevar a cabo el experimento, primero se eligieron las longitudes de onda a la cuales se deseaba medir la absorbancia. En la literatura, para medir la concentración de clorofilas y carotenoides con el método tradicional, se utilizan las longitudes de onda en las que estos pigmentos tienen un pico de absorbancia. Estas son de alrededor de 470 nm, para los carotenoides, de 645 nm para la clorofila B, y de 662 nm para la clorofila A, como se puede ver en la Fig. 71. Aunque la clorofila A tiene otro pico de



absorción, incluso mayor, en 420 nm, y la clorofila B en 455 nm, estos se traslapan con regiones de gran absorbancia para los carotenoides también.

Como fuente de luz se vio la posibilidad de utilizar LEDs comerciales, ya que en su hoja de datos se especifican rangos de emisión cercanos a los requeridos. Con la ayuda del espectrómetro óptico (del cual se habló en la sección 5.1.3), se midieron los picos de emisión reales de varios LEDs (violetas, azules y rojos), de entre los cuales se seleccionaron seis con picos de emisión en 400 nm, 450 nm, 460 nm, 470 nm, 640 nm y 660 nm (Fig. 71).

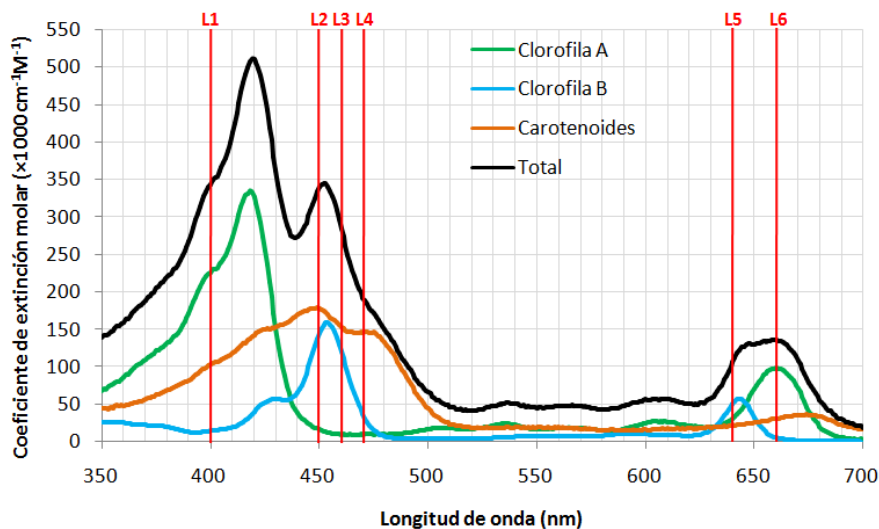


Fig. 71: Espectros de absorción de la clorofila A, clorofila B y carotenoides totales [130]. Las líneas rojas marcan los picos de emisión de los LEDs seleccionados para la medición.

Para poder hacer las mediciones se diseñó una nueva cámara fotoacústica (Fig. 72) que tiene en su parte inferior un anillo de goma, de manera que pueda acoplarse herméticamente a la piel de los tomates. Para que fuera más fácil el cambio de la longitud de onda, se le adaptó un revólver sobre el que se montaron los seis LEDs, de forma que al girarlo se pudiera cambiar la fuente de luz y que ésta siempre estuviera en la misma posición a lo largo de todas las mediciones. El micrófono electret se conectó directamente a la entrada *ad hoc* del amplificador lock-in y los LEDs fueron modulados con la señal de referencia del mismo, a través de una fuente de corriente de 20 mA.

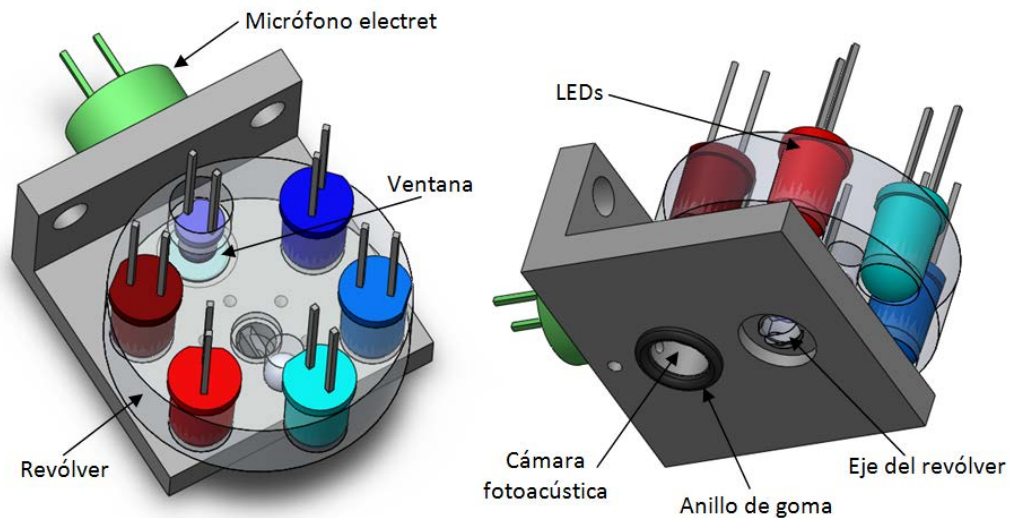


Fig. 72: Cámara fotoacústica para la medición sobre tomates.

La celda fotoacústica fue montada sobre una pequeña prensa con el objetivo de que al colocar el tomate, el anillo de goma hiciera presión sobre éste y la cámara sellara herméticamente (Fig. 76).

Antes de realizar el experimento sobre los tomates, primero se hizo una medición de la intensidad relativa de luz de los LEDs, registrando la respuesta fotoacústica de cada uno de ellos al irradiar una muestra de polvo de carbón vegetal compactada, de 0.5 mm de espesor. Se usó este material debido a que absorbe fuertemente la luz en un amplio rango de longitudes de onda, de tal forma que la señal fotoacústica que se produce es proporcional a la intensidad de la luz de la fuente [131]. En la Fig. 73 se muestra la respuesta fotoacústica del carbón al ser irradiado por los seis LEDs, con una frecuencia de modulación de 1 a 250 Hz. Debido a que el micrófono electret no tiene una buena respuesta a bajas frecuencias, las curvas no siguen el comportamiento exponencial que se esperaría. Más adelante se verá que este efecto puede ser compensado.

A la par de las mediciones fotoacústicas, también se midió la impedancia eléctrica de los tomates en un intervalo de frecuencia de 10 Hz a 2 MHz, con la intención de calcular su contenido de agua con esta información. Para esto, se utilizó el instrumento desarrollado en la sección 5.4.1. Se utilizaron electrodos de aguja con un recubrimiento



de oro con las medidas y separaciones que se muestran en la Fig. 74. La corriente se inyectó a través de los electrodos de los extremos, mientras que se midió el voltaje resultante en los centrales.

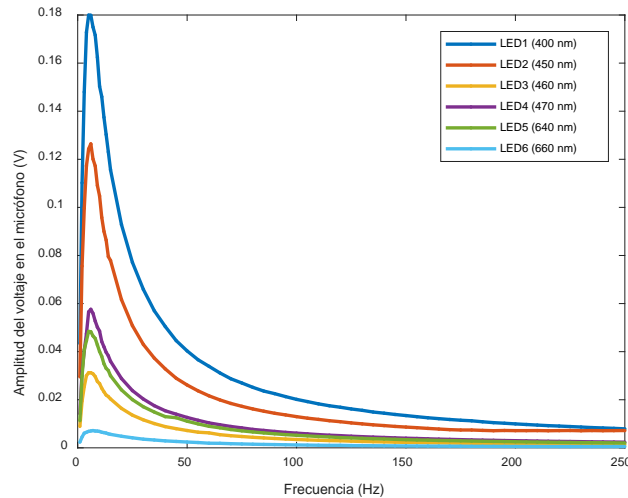


Fig. 73: Respuesta fotoacústica del carbón al ser irradiado por cada uno de los seis LEDs.

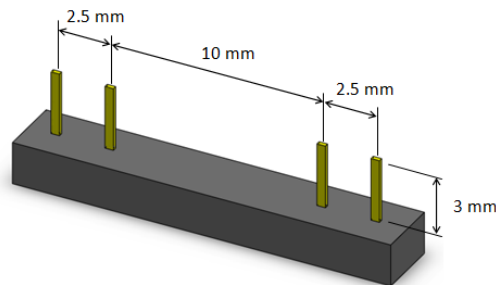


Fig. 74: Electrodo usado para la medición de la impedancia eléctrica en tomates.

El experimento fue realizado en siete tomates rojos de la variedad Saladette con distintos grados de maduración (Fig. 75).

A cada tomate se le midió la respuesta fotoacústica con cada uno de los seis LEDs en un intervalo de frecuencia de 1 a 250 Hz. Se tomó como sitio de medición la parte que se veía menos madura, es decir, sobre la región más verde del tomate. Esto se hizo colocando el espécimen dentro de la prensa y presionando la cámara fotoacústica contra éste lo suficiente para que la celda quedara sellada (Fig. 76). Al mismo tiempo



que se hacían estos registros, también se medía la impedancia eléctrica. Esta última fue tomada en cuatro zonas para cada tomate: en los costados del fruto, separando 90° cada sitio de medición y efectuando veinte registros (20 barridos en frecuencia) para cada uno, con el fin de promediarlos y de esta forma reducir el ruido.



Fig. 75: Tomates utilizados en el experimento.

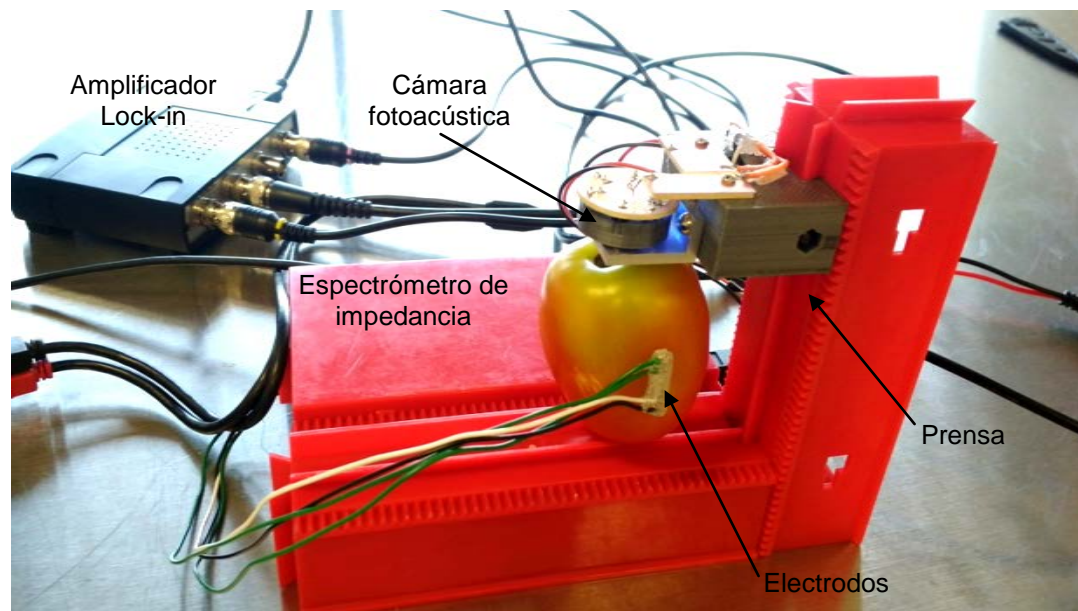


Fig. 76: Montaje experimental de los tomates.

Inmediatamente después de hacer las mediciones fotoacústicas y de impedancia sobre cada tomate, éstos fueron analizados usando el método convencional, con la ayuda de la Dra. María del Carmen Robles Ramírez de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, en su laboratorio del área de alimentos. Para esto, de la región sobre la que se había colocado la celda fotoacústica, se tomó una muestra de aproximadamente 1 g del tomate, destinada para la medición de los pigmentos; y de las



zonas donde se habían hecho las mediciones de impedancia, dos muestras de aproximadamente 7 g, para el análisis de humedad.

La medición de las clorofilas y carotenoides se hizo conforme al método espectrofotométrico que se detalla en Costache *et al.* [132], en el cual la muestra es macerada en un mortero y diluida con acetona en una proporción 1:50 para extraer los pigmentos. Posteriormente la mezcla es centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos y leída en el espectrofotómetro a 470 nm, 645 nm y 662 nm. Para obtener la concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) de clorofila A, clorofila B y carotenoides totales, se aplican las ecuaciones tricromáticas:

$$C_{\text{clorofila A}} = 11.75A_{662} - 2.35A_{645} \quad (32)$$

$$C_{\text{clorofila B}} = 18.61A_{645} - 3.96A_{662} \quad (33)$$

$$C_{\text{carotenoides}} = (1000A_{470} - 2.27C_{\text{clorofilaA}} - 81.4C_{\text{clorofilaB}}) / 227 \quad (34)$$

Para calcular el contenido de agua, las muestras de tomate se pesaron en fresco y posteriormente se pusieron a secar en un horno a  $90^\circ$  hasta peso constante. Una vez deshidratadas, se volvieron a pesar. El porcentaje de humedad se calculó mediante la ecuación (35).

$$H\% = 100 \frac{P_{\text{Fresco}} - P_{\text{Seco}}}{P_{\text{Fresco}}} \quad (35)$$

Tabla 11: Propiedades térmicas del epicarpio del tomate.

Espesor* ( $\mu\text{m}$ )	Difusividad térmica* ( $\text{m}^2\text{s}^{-1}$ )	Frecuencia de corte (Hz)	Efusividad térmica** ( $\text{Jm}^{-2}\text{K}^{-1}\text{s}^{0.5}$ )
68	$9.92 \times 10^{-8}$	6.83	1587
45	$7.23 \times 10^{-8}$	11.36	1859
41	$4.59 \times 10^{-8}$	8.69	2333

\* Datos de Velasco *et al.* [133]. \*\* Calculada con datos de Sweat [134] y Krokida *et al.* [135]



Para el análisis de las señales fotoacústicas, se consideró el epicarpio del tomate (la piel) como la muestra y el resto del fruto como el material de respaldo. De esta forma, se puede hablar de una muestra ópticamente transparente y térmicamente gruesa, para frecuencias mayores a 12 Hz, como se puede ver en la Tabla 11.

Así, conforme al trabajo de Rosencwaig & Ghercho [105], la señal fotoacústica varía en función de  $\omega^{-3/2}$ , de acuerdo a la ecuación (36), tal y como se pudo comprobar al graficar el logaritmo de la frecuencia contra el logaritmo de la señal fotoacústica medida (Fig. 77). Esta última, tuvo que ser primero compensada para eliminar el efecto del micrófono electret.

$$Q_s \cong -j \frac{\beta \mu_s}{2a_g} \frac{\mu_s}{k_s} Y$$

con: (36)

$$Y = \frac{\gamma I_0 P_0}{2\sqrt{2l_g T_0}}$$

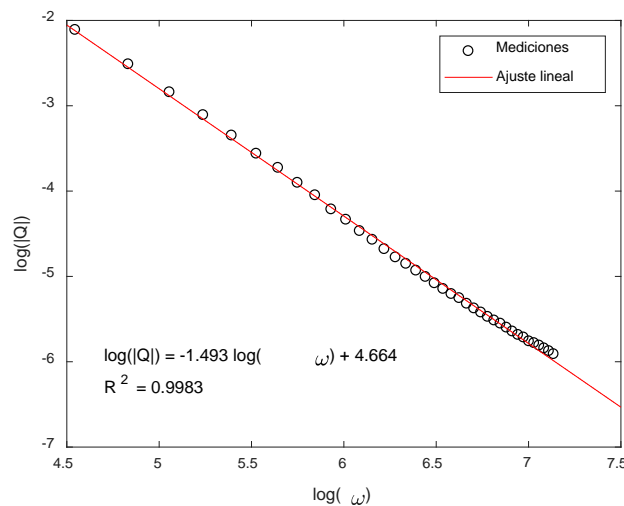


Fig. 77: Mejor ajuste del logaritmo de la señal fotoacústica medida en un tomate contra el logaritmo de la frecuencia angular.

La salida del amplificador lock-in corresponde a la magnitud del voltaje producido en el micrófono electret, el cual responde a la ecuación (37), de acuerdo a Marquezini *et al.* [117].





$$V_{mic} = Q \frac{j\omega RC}{1 + j\omega RC} \quad (37)$$

Por lo tanto, para obtener la señal fotoacústica, sin el artefacto del micrófono, se puede utilizar la ecuación (38), donde RC es la constante de tiempo del micrófono electret, misma que se calculó anteriormente en la sección 5.6.8 (Fig. 65).

$$|Q| = |V_{mic}| \frac{\sqrt{1 + (\omega RC)^2}}{\omega RC} \quad (38)$$

De igual forma, se hizo un ajuste lineal del logaritmo de las señales fotoacústicas registradas sobre el carbón al ser irradiado con los LEDs contra el logaritmo de la frecuencia (después de compensar el efecto del micrófono), obteniendo una dependencia de  $\omega^{-1}$  (Fig. 78), como se esperaba, puesto que el material se comporta como una muestra ópticamente opaca y térmicamente gruesa, para frecuencias mayores a 1 Hz, dadas sus propiedades térmicas (Tabla 12). Esto se ve reflejado en la ecuación (39).

$$Q_c \cong \frac{(1-j) \mu_c}{2a_g k_c} Y \quad (39)$$

Tabla 12: Propiedades térmicas del carbón vegetal.

Espesor ( $\mu\text{m}$ )	Difusividad térmica* ( $\text{mm}^2 \text{s}^{-1}$ )	Frecuencia de corte (Hz)	Efusividad térmica** ( $\text{Jm}^{-2} \text{K}^{-1} \text{s}^{0.5}$ )
500	0.09 – 0.129	0.11 – 0.16	712 – 853

\* Cremers [136], Deng *et al.* [137], Gosset *et al.* [138]. \*\* Calculada con datos de Xie [139].

Para normalizar la señal fotoacústica de las mediciones sobre los tomates en función de la intensidad de luz de los LEDs, y así eliminar la constante desconocida Y



de la ecuación (36), se calculó el cociente de la respuesta de los tomates entre la del carbón, a la respectiva longitud de onda del LED. Esto es:

$$\frac{Q_s}{Q_c} = \frac{-j \frac{\beta \mu_s}{2a_g} \frac{\mu_s}{k_s} Y}{(1-j) \frac{\mu_c}{2a_g} Y} = (1-j) \frac{\beta \mu_s}{2} \frac{\epsilon_c}{\epsilon_s} \quad (40)$$

$$\left| \frac{Q_s}{Q_c} \right| = \frac{\beta \mu_s}{\sqrt{2}} \frac{\epsilon_c}{\epsilon_s} = \beta \sqrt{\alpha_s} \frac{\epsilon_c}{\epsilon_s} \omega^{-0.5} \quad (41)$$

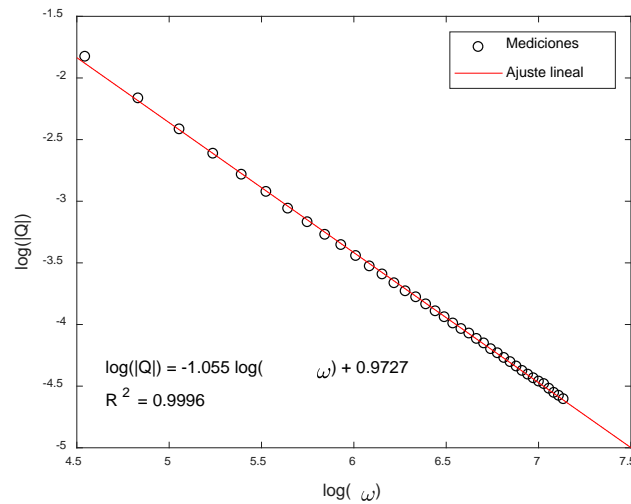


Fig. 78: Mejor ajuste del logaritmo de la señal fotoacústica medida sobre carbón vegetal contra el logaritmo de la frecuencia angular.

De esta forma, se obtiene una señal que varía en función de  $\omega^{-0.5}$ , y que además es proporcional al coeficiente de absorción óptica  $\beta$ , como se deseaba (Fig. 79). También depende de algunas propiedades térmicas del tomate (la raíz cuadrada de la difusividad y el inverso de la efusividad) las cuales se esperaba que tuvieran una variación mucho menor que la de  $\beta$ . La efusividad térmica del carbón queda como una constante.

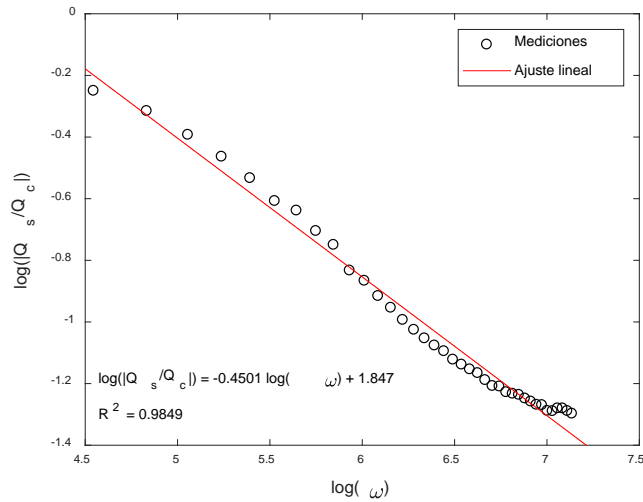


Fig. 79: Mejor ajuste del logaritmo del cociente  $|Q_s/Q_c|$  contra el logaritmo de la frecuencia angular.

Si definimos  $\bar{\beta} = \beta \sqrt{\alpha_s} (\varepsilon_c / \varepsilon_s)$ , entonces podemos hacer un ajuste lineal al cociente de las señales fotoacústicas de manera que:  $\ln(|Q_s/Q_c|) = a \ln(\omega) + b$ , con  $a = -0.5$  y  $\bar{\beta} = e^b$ .

Se siguió este procedimiento para calcular las distintas  $\bar{\beta}$  correspondientes a cada uno de los siete tomates en las seis longitudes de onda utilizadas.

Primeramente se buscó calcular la concentración de clorofila A, clorofila B y carotenoides con únicamente tres longitudes de onda. Dado que las utilizadas en la literatura (470 nm, 645 nm y 662 nm) son muy cercanas a las de los LEDs L4, L5 y L6 (470 nm, 640 nm y 660 nm), se pensó en ocupar tales fuentes de luz. Sin embargo, el LED L6 tenía una intensidad muy baja, por lo que el ruido en la señal fotoacústica era alto, así que se decidió cambiarlo por el LED L1, cuya intensidad de luz es mayor y que al igual que L6, su longitud de onda corresponde a un punto de buena absorción para la clorofila A, como se puede ver en la Fig. 71.

Dado que las ecuaciones (32) a (34) sólo son válidas para medir la concentración de los pigmentos cuando están disueltos en acetona y se leen a dichas longitudes de onda, se tuvieron que buscar unas nuevas ecuaciones que relacionaran las mediciones



de  $\bar{\beta}$  con la concentración de clorofilas y carotenoides. Para esto, se hizo un programa en MATLAB con el propósito de obtener una combinación lineal entre las lecturas de  $\bar{\beta}_{400\text{nm}}$ ,  $\bar{\beta}_{470\text{nm}}$  y  $\bar{\beta}_{640\text{nm}}$ , que maximizara la correlación entre las concentraciones calculadas con los valores obtenidos con el método tradicional. Esto se hizo con cuatro de los siete tomates, elegidos de manera aleatoria, con el fin de verificar el modelo con dichos tomates más los tres restantes. Tales ecuaciones resultaron ser:

$$C_{\text{clorofila A}} = -0.1101\bar{\beta}_{400\text{nm}} + 0.0050\bar{\beta}_{470\text{nm}} - 2.9635\bar{\beta}_{640\text{nm}} + 7.133 \quad (42)$$

$$C_{\text{clorofila B}} = -0.1631\bar{\beta}_{400\text{nm}} + 0.0189\bar{\beta}_{470\text{nm}} - 2.5693\bar{\beta}_{640\text{nm}} + 6.650 \quad (43)$$

$$C_{\text{carotenoides}} = -0.0498\bar{\beta}_{400\text{nm}} + 1.8789\bar{\beta}_{470\text{nm}} + 0.8715\bar{\beta}_{640\text{nm}} - 5.338 \quad (44)$$

En la Tabla 13 se pueden ver los resultados de la concentración de clorofilas y carotenoides obtenidos mediante el análisis espectrofotométrico convencional (en miligramos de pigmento por cada 100 gramos de tomate) y en la Tabla 14 se observan los resultados obtenidos mediante el método fotoacústico planteado.

Tabla 13: Concentración de pigmentos en el tomate (método espectrofotométrico convencional).

Tomate*	Clorofila A (mg / 100 g)	Clorofila B (mg / 100 g)	Clorofila total** (mg / 100 g)	Carotenoides (mg / 100 g)
1	1.246	0.777	2.023	0.966
2	1.086	1.246	2.332	0.964
3	0.162	0.060	0.222	1.222
4	0.062	0.140	0.202	1.941
5	0.277	0.117	0.394	4.229
6	0.053	0.026	0.078	7.156
7	0.120	0.021	0.142	8.102

\* Los tomates se ordenaron de menor a mayor grado de madurez.

\*\* La clorofila total es la suma de la clorofila A más la clorofila B.



Tabla 14: Concentración de pigmentos en el tomate (método fotoacústico propuesto).

Tomate	Clorofila A (mg / 100 g)	Clorofila B (mg / 100 g)	Clorofila total (mg / 100 g)	Carotenoides (mg / 100 g)
1	0.980	0.766	1.746	0.745
2	0.906	1.066	1.972	0.584
3	-0.222	-0.209	-0.431	2.522
4	0.221	0.078	0.300	2.125
5	0.236	0.118	0.353	6.253
6	0.425	0.286	0.711	4.904
7	0.456	0.284	0.740	7.441

La correlación entre la concentración de clorofila A, clorofila B y carotenoides medidos con el método espectrofotométrico y el método propuesto resultó ser de 0.81, 0.90 y 0.89 respectivamente ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, aunque la correlación es buena, el error en la estimación es muy alto (Fig. 80).

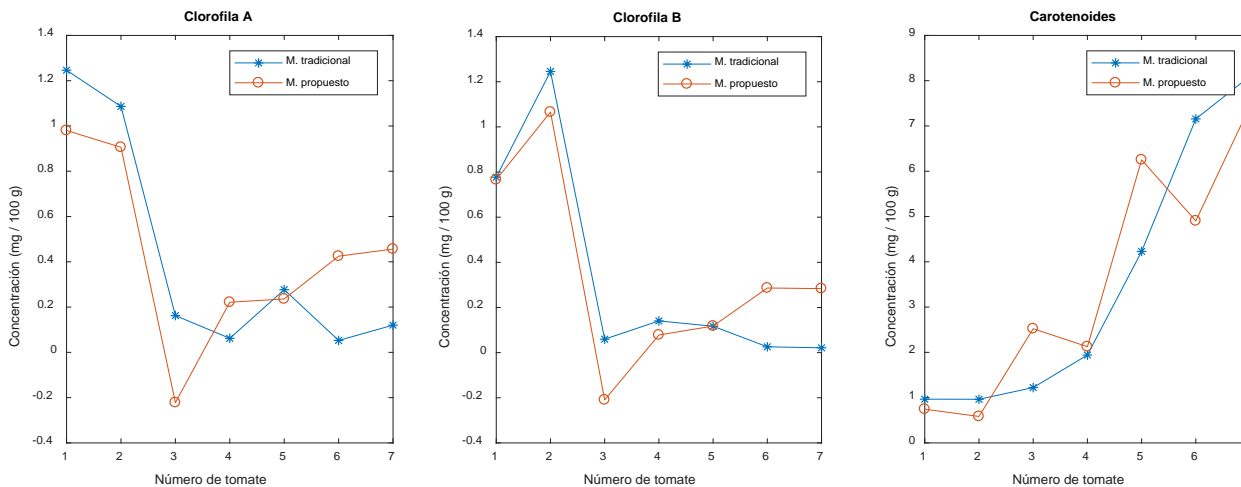


Fig. 80: Concentraciones de los pigmentos medidas con el método tradicional y el método propuesto.

Para el cálculo del contenido de agua en los tomates se hizo un promedio de los ochenta registros de impedancia que se tomaron de cada tomate (veinte mediciones en cuatro sitios distintos del tomate). De estas mediciones se seleccionaron empíricamente



tres frecuencias, 10 kHz, 50 kHz y 200 kHz (mismas que se encuentran dentro del intervalo que se sugiere en Kyle *et al.* para el análisis multi-frecuencia [140]) y se buscó una combinación lineal entre las lecturas de la magnitud de la impedancia a dichas frecuencias, que maximizara la correlación entre la humedad calculada mediante la impedancia, con los valores obtenidos con el método ortodoxo. De igual forma que con los pigmentos, estos cálculos se efectuaron con sólo cuatro de los siete tomates, para después verificar el modelo con todos los tomates a la vez. La ecuación que mostró una mejor correlación fue:

$$\% H = 4.307 \times 10^{-3} |Z_{10 \text{ kHz}}| - 26.747 \times 10^{-3} |Z_{50 \text{ kHz}}| + 8.640 \times 10^{-3} |Z_{200 \text{ kHz}}| + 103.5 \quad (45)$$

La correlación entre el contenido de agua (porcentaje de humedad) medido mediante el método tradicional y la técnica impedanciométrica propuesta resultó ser de 0.77 ( $p < 0.05$ ). No obstante, dada la poca variación de humedad que hay entre los tomates, aunque la correlación es buena, el error en la medición es alto (Fig. 81).

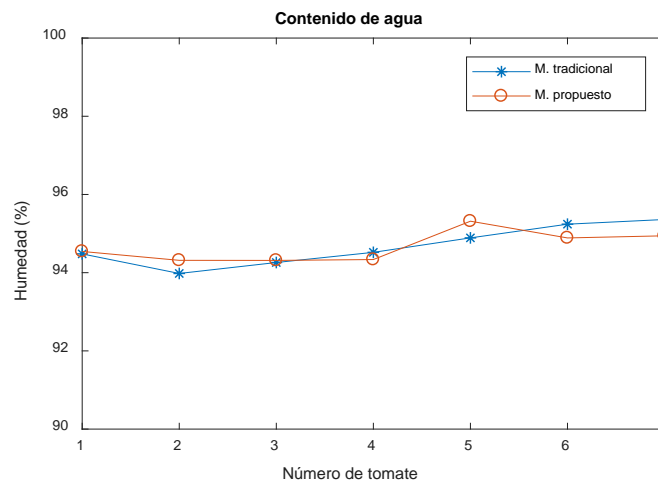


Fig. 81: Contenido de agua medido con el método tradicional y el método propuesto.



## 7. Discusión y trabajo a futuro

En esta sección se hablará sobre los obstáculos encontrados al tratar de obtener, con las distintas técnicas no invasivas seleccionadas, los parámetros físicos de la piel que han sido propuestos en la literatura para estimar la concentración de glucosa en sangre. También se discutirán los resultados obtenidos de la medición de clorofilas, carotenoides y humedad en tomates.

Con respecto a la espectroscopía de fluorescencia, no fue posible obtener una señal medible con la fuente de luz utilizada, posiblemente porque ésta no tenía la suficiente potencia para producir fluorescencia con una intensidad suficiente para el detector del espectrómetro. Por otro lado, la auto-fluorescencia de la piel con una longitud de onda de excitación de 340 nm, solo está reportada por el grupo de Evans *et al.* La dermis efectivamente tiene una zona de auto-fluorescencia, pero en un intervalo de excitación de 360 a 370 nm, misma que es utilizada en algunos estudios para la medición no invasiva de los productos finales de la glicación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés, lípidos o proteínas glicosiladas que pueden ser usadas como marcadores del daño ocasionado por enfermedades degenerativas como la diabetes, la arterosclerosis, enfermedades renales, etc.) [141]. Si bien la molécula NAD(P)H fluoresce cuando es excitada a 340 nm, no existen otros estudios en los que dicho efecto se detecte directamente sobre la piel. Por esta razón se sugiere utilizar en una futura investigación una fuente de luz con mayor potencia para comprobar si tal auto-fluorescencia puede ser medida. Por otro lado, existen otros fluoróforos en la piel, como el colágeno y la elastina, cuyo rango de excitación y de emisión es muy cercano al del NAD(P)H (absorben de 300 nm a 340 nm y emiten de 420 m a 460 nm) [142], por lo que de encontrarse fluorescencia se debe de tener cuidado de verificar que el origen de la misma sea efectivamente del NAD(P)H y no de alguna otra molécula.

En relación a los intentos realizados con la técnica de espectroscopía del infrarrojo cercano, como se mencionó en la sección 5.2.2, no fue posible medir la absorbancia del tejido a las longitudes de onda elegidas. La razón parece ser la misma que con la



espectroscopía de fluorescencia: la potencia de los LEDs utilizados es muy pobre, por lo que toda la luz se absorbe o se difunde en el tejido, evitando que ésta pueda ser transmitida o remitida al detector. Como trabajo a futuro se podrían conseguir LEDs con mayor potencia y en lugar de tratar de medir la absorbancia mediante la luz transmitida o remitida, se podría utilizar el efecto fotoacústico, modulando la luz de los LEDs a una frecuencia en la que la piel se comporte como térmicamente gruesa de manera que la señal fotoacústica posea información sobre el coeficiente de absorción. Esto último, para poder medir la luz que efectivamente está siendo absorbida por el tejido, descartando la que se pierde por difusión en el medio.

Esta medición podría ser complementada con la técnica fotoacústica con luz pulsada. Por lo que se refiere a la literatura, el láser de 905 nm con el que se hicieron las pruebas tenía una potencia suficiente como para haber podido producir una respuesta fototérmica detectable, sin embargo, ésta no se pudo leer. En retrospectiva, lo que parece haber fallado en esta ocasión no es la potencia de la luz sino la densidad de energía que se estaba administrando a la piel. El láser, al no estar colimado, irradiaba un área muy grande haciendo que la densidad de energía fuera baja, es decir, la energía se estaba repartiendo en un volumen de tejido demasiado grande como para que el aumento en la temperatura del mismo produjera una señal acústica detectable. Para sobrellevar esta situación, se debe de colimar el láser de forma que irradie un área lo suficientemente pequeña como para maximizar la magnitud de la señal fotoacústica, pero respetando los límites de exposición permitida a radiaciones no ionizantes que marcan las normas (ver la sección 5.6.2).

Tanto en el caso de la espectroscopia de radiofrecuencias, como en el de la espectroscopía de impedancia eléctrica, se aplicó el mismo experimento que consistió en una prueba de tolerancia a la glucosa, esperando encontrar algún valor en los resultados que a lo largo del tiempo tuviera una tendencia creciente durante la primer hora de registro y decreciente en la segunda hora, similar al comportamiento de la concentración de glucosa en sangre en este tipo de pruebas; esto, justificado en el experimento reportado por Jean *et al.* [23]. Sin embargo, no se encontró tal





comportamiento para ninguna de las frecuencias empleadas. No obstante, esto no significa que no exista información sobre la concentración de glucosa en sangre inmersa en la señal, sólo que su relación no es tan directa. Por tanto, para futuros estudios se sugiere repetir la prueba de tolerancia a la glucosa, midiendo la impedancia eléctrica y los parámetros S, propios de cada técnica, a la par de una medición de los valores reales de glicemia, con un glucómetro convencional, cada cierto intervalo de tiempo. De esta forma se podría hacer un estudio más profundo de las señales, por ejemplo, con análisis de componentes principales, para intentar vislumbrar una correlación. Otro de los inconvenientes que se tuvieron fue, en el caso de la impedancia de radiofrecuencias, los artefactos de movimiento que hacían que la antena cambiara ligeramente su posición u orientación, reflejándose en un notorio cambio en la señal medida por el analizador de espectro. Para contrarrestar esto durante el experimento realizado, la antena se fijó al dedo con cinta adhesiva y se evitó en medida de lo posible el movimiento de la extremidad, lo cual fue bastante incómodo. Para un futuro experimento se recomienda encontrar una forma de asegurar la antena de una mejor manera para evitar este tipo de interferencia y hacer más cómoda la prueba.

En el caso de la medición de clorofilas, carotenoides y humedad en los tomates, si bien se obtuvieron buenas correlaciones entre los valores obtenidos mediante el análisis tradicional y el método propuesto, los errores relativos de las mediciones fueron bastante altos. Esto puede deberse a que el tamaño de la muestra fue muy pequeño, de tan sólo siete tomates, y el modelo predictivo se realizó con únicamente cuatro de los mismos. Sin embargo, dado el buen curso que parece tener esta aplicación, el siguiente paso en la investigación sería hacerlo con una muestra mayor de tomates.



## 8. Conclusiones

En el presente trabajo se intentaron montar seis distintas técnicas para la medición no invasiva de parámetros físicos de la piel, con el objetivo inicial de medir la concentración de glucosa en sangre. Estas fueron: espectroscopía de fluorescencia, espectroscopía del infrarrojo cercano, espectroscopía de impedancia de radiofrecuencias, espectroscopía de impedancia eléctrica, medición del calor metabólico y espectroscopía fotoacústica (con luz pulsada y luz modulada). Con cada una de ellas se llevaron a cabo algunos experimentos con el propósito de verificar su viabilidad, para lo cual se diseñaron y construyeron algunos instrumentos: un espectrómetro óptico UV-VIS, un luxómetro ultravioleta, un espectrómetro de impedancia eléctrica, un oxímetro de pulso, un láser pulsado, un luxómetro infrarrojo y un amplificador lock-in, entre otros circuitos y sistemas que se requerían para poder trabajar con dichas técnicas.

Si bien, dadas las complicaciones que se presentaron, no se pudieron obtener propiedades del tejido que pudieran servir para estimar la concentración de glucosa en sangre, sí se hizo un avance significativo en cada uno de los métodos ensayados, y se identificaron los problemas que frenaron el avance de los mismos así como la posible forma de superarlos, de manera que en futuras investigaciones no se parta de cero. Asimismo, en el camino se desarrollaron diversos instrumentos que pueden tener otras aplicaciones además de las que se les dieron en este estudio.

Como muestra de esta afirmación, dos de estas técnicas, la espectroscopía de impedancia y la fotoacústica, se aplicaron simultáneamente para medir la concentración de clorofila A, clorofila B, carotenoides y porcentaje de humedad en tomates, obteniéndose buenas correlaciones entre los valores médicos con las técnicas de análisis tradicionales y el método propuesto.



## 9. Referencias

- [1] A. C. Powers, "Diabetes mellitus," in *Principios de Medicina Interna de Harrison*, D. L. Kasper, Ed. McGraw-Hill, 2006, vol. 2, ch. 338, pp. 2275-2304.
- [2] Secretaría de Salud. (2010) Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010. Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.. [En línea]. [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5168074&fecha=23/11/2010](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5168074&fecha=23/11/2010)
- [3] Vive con Diabetes. (2013) Vive con diabetes. Estadísticas.. [En línea]. <http://vivecondiabetes.com/basicos-de-diabetes/estadisticas>
- [4] M. Hernández-Ávila, J. P. Gutiérrez, and N. Reynoso-Noverón, "Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia," *Salud Pública de México*, vol. 55, no. sup. 2, pp. S129-S136, 2013.
- [5] Organización Mundial de la Salud. (2014) Diabetes.. [En línea]. [http://www.who.int/topics/diabetes\\_mellitus/es/](http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es/)
- [6] American Diabetes Association, "Standards of Medical Care in Diabetes 2014," *Diabetes Care*, vol. 32, no. sup. 1, pp. S14-S80, Enero 2014.
- [7] A. Chico, M. Subirá, and A. Novials, "Sistema de monitorización continua de glucosa: una nueva herramienta para mejorar el control metabólico de los pacientes diabéticos," *Endocrinología y Nutrición*, vol. 48, no. 9, pp. 266-271, 2001.
- [8] J. Kottmann, J. M. Rey, J. Luginbühl, E. Reichmann, and M. W. Sigrist, "Glucose sensing in human epidermis using mid-infrared photoacoustic detection," *Biomedical Optics Express*, vol. 3, no. 4, pp. 667-680, Abril 2012.
- [9] E. Battaner Arias, *Biomoléculas*. Salamanca, España: Ediciones Universidad de Salamanca, 1993, vol. 51.
- [10] D. D. Cunningham, "Transdermal Microfluidic Continuous Monitoring Systems," in *In Vivo Glucose Sensing*, J. D. Winefordner, Ed. USA: John Wiley & Sons, Inc., 2010, vol. 174, ch. 7, pp. 191-215.
- [11] A. A. Páez-Roa and R. Villamizar-Mejía, "Medición no Invasiva del Nivel de Glucosa en la Sangre Usando Espectroscopia con Infrarrojo Cercano. Estado del Arte," *UIS Ingenierías*, vol. 11, no. 1, pp. 21-33, Junio 2012.
- [12] S. K. Vashist, "Non-invasive glucose monitoring technology in diabetes management: A review," *Analytica Chimica Acta*, vol. 750, pp. 16-27, Octubre 2012.
- [13] D. C. Klonoff, "Noninvasive Blood Glucose Monitoring," *Diabetes Care*, vol. 20, no. 3, pp. 433-437, Marzo 1997.
- [14] C. E. Ferrante do Amaral and B. Wolf, "Current development in non-invasive glucose monitoring," *Medical Engineering & Physics*, vol. 30, p. 541-549, 2008.
- [15] N. A. Bazaev, Y. P. Masloboev, and S. V. Selishchev, "Optical Methods for Noninvasive Blood Glucose Monitoring," *Biomedical Engineering*, vol. 45, no. 6, pp. 229-233, Marzo 2012.
- [16] O. S. Khalil, "Spectroscopic and Clinical Aspects of Noninvasive Glucose



- Measurements," *Clinical Chemistry*, vol. 45, no. 2, pp. 165-177, 1999.
- [17] O. S. Khalil, "Non-invasive glucose measurement technologies: An update from 1999 to the dawn of the new millennium," *Diabetes Technology & Therapeutics*, vol. 6, no. 5, pp. 660-697, 2004.
- [18] N. D. Evans, L. Gnudi, O. J. Rolinski, D. J. S. Birch, and J. C. Pickup, "Non-Invasive Glucose Monitoring by NAD(P)H Autofluorescence Spectroscopy in Fibroblasts and Adipocytes: A Model for Skin Glucose Sensing," *Diabetes Technology & Therapeutics*, vol. 5, no. 5, pp. 807-816, 2003.
- [19] A. Tura, A. Maran, and G. Pacini, "Non-invasive glucose monitoring: Assessment of technologies and devices according to quantitative criteria," *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 77, no. 1, pp. 16-40, Julio 2007.
- [20] J. T. Bruulsema, et al., "Correlation between blood glucose concentration in diabetics and noninvasively measured tissue optical scattering coefficient," *Optics Letters*, vol. 22, no. 3, pp. 190-192, Febrero 1997.
- [21] J. Kost, S. Mitragotri, R. A. Gabbay, M. Pishko, and R. Langer, "Transdermal monitoring of glucose and other analytes using ultrasound," *Nature Medicine*, vol. 6, pp. 347-350, 2000.
- [22] M. Y. Jaffrin, "Body composition determination by bioimpedance: an update," *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, vol. 12, pp. 482-486, 2009.
- [23] B. R. Jean, E. C. Green, and M. J. McClung, "A Microwave Frequency Sensor for Non-Invasive Blood-Glucose Measurement," in *2008 IEEE Sensors Applications Symposium*, Atlanta, USA, 2008, pp. 12-14.
- [24] O. K. Cho, Y. O. Kim, H. Mitsumaki, and K. Kuwa, "Noninvasive Measurement of Glucose by Metabolic Heat Conformation Method," *Clinical Chemistry*, vol. 50, no. 10, pp. 1894-1898, 2004.
- [25] V. V. Tuchin, *Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues*. Florida, USA: Taylor & Francis Group, 2009.
- [26] T. Koschinsky and L. Heineman, "Sensors for glucose monitoring: technical and clinical aspects," *Diabetes Metabolism Research and Reviews*, vol. 17, pp. 113-123, Marzo 2001.
- [27] R. Weiss, Y. Yegorchikov, A. Shusterman, and I. Raz, "Noninvasive continuous glucose monitoring using photoacoustic technology-results from the first 62 subjects," *Diabetes Technology & Therapeutics*, vol. 9, no. 1, pp. 68-74, Febrero 2007.
- [28] I. Harman-Boehm, et al., "Noninvasive Glucose Monitoring: A Novel Approach," *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 3, no. 2, pp. 253-260, Marzo 2009.
- [29] H. Chuang, et al., "Skin permeation device for analyte sensing or transdermal drug delivery," *USA Concesión US8386027 B2*, Febrero 26, 2013.
- [30] W. J. Snyder and W. S. Grundfest, "Glucose monitoring apparatus and method using laserinduced," *USA Concesión US 6,232,609 B1*, Mayo 15, 2001.
- [31] N. D. Evans, L. Gnudi, O. J. Rolinski, D. J. S. Birch, and J. C. Pickup, "Glucose-



dependent changes in NAD(P)H-related fluorescence lifetime of adipocytes and fibroblasts in vitro: Potential for non-invasive glucose sensing in diabetes mellitus," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 80, no. 2, pp. 122-129, Agosto 2005.

- [32] J. C. Pickup, F. Hussain, N. D. Evans, O. J. Rolinski, and D. J. S. Birch, "Fluorescence-based glucose sensors," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20, no. 12, pp. 2555-2565, Junio 2005.
- [33] White Bear Photonics. (2017, Enero) USB 4000 Preconfigured Spectrometers. [En línea]. <https://www.whitebearphotonics.com/ocean-optics-uv-vis-spectrometers/usb-4000-preconfigured-spectrometers>
- [34] Ocean Optics, Inc. (2017, Enero) USB4000-UV-VIS. [En línea]. <https://oceanoptics.com/product/usb4000-uv-vis/>
- [35] Prior Scientific, Inc. (2017, Enero) LumaSpec 800 Optical Power Meter. [En línea]. <http://www.prior-us.com/Products/Microscope-Spectrometer/LumaSpec800.aspx>
- [36] Avantes. (2017, Enero) AvaSpec-ULS2048 StarLine Versatile Fiber-optic Spectrometer. [En línea]. <http://www.avantes.com/products/spectrometers/starline/item/208-avaspec-uls2048-starline-versatile-fiber-optic-spectrometer>
- [37] Avantes. (2017, Enero) Avantes US Demo Sales. [En línea]. <http://www.avantes.com/company/avantes-usa/item/1020-demo-equipment-sale>
- [38] Ocean Optics, Inc. (2017, Enero) USB2000-UV-VIS. [En línea]. <https://oceanoptics.com/product/usb2000uv-vis/>
- [39] LabX. (2017, Enero) Ocean Optics USB 2000+ UV-VIS Spectrometer. [En línea]. <http://www.labx.com/item/ocean-optics-usb-2000-uv-vis-spectrometer/3214545>
- [40] Hamamatsu Photonics. (2017, Enero) Micro-spectrometer C12666MA. [En línea]. <https://www.hamamatsu.com/us/en/C12666MA.html>
- [41] GroupGets LLC. (2017, Enero) C12666MA Micro-Spectrometer. [En línea]. <https://groupgets.com/manufacturers/hamamatsu-photonics/products/c12666ma-micro-spectrometer>
- [42] A. Mošat'. (2017, Enero) mySpectral Arduino Spectrophotometer: Spectruino. [En línea]. <http://myspectral.com/>
- [43] C. Kalkbrenner, A. Van, T. Smith, and D. Charles. (2013) Low-Cost Spectrophotometer. [En línea]. [https://engineering.tamu.edu/\\_files/\\_documents/\\_technical-reports/aggie-challenge\\_report\\_-\\_low\\_cost\\_spectrophotometer\\_1\\_.pdf](https://engineering.tamu.edu/_files/_documents/_technical-reports/aggie-challenge_report_-_low_cost_spectrophotometer_1_.pdf)
- [44] Thunder Optics. (2017, Enero) Mini USB SPectrometer. [En línea]. [http://www.thunderoptics.fr/index.php?p=1\\_22\\_Mini-USB-SPectrometer](http://www.thunderoptics.fr/index.php?p=1_22_Mini-USB-SPectrometer)
- [45] F. Wakabayashi and K. Hamada, "A DVD Spectroscope: A Simple, High-Resolution Classroom Spectroscope," *Journal of Chemical Education*, vol. 83, no. 1, pp. 56-58, Enero 2006.
- [46] R. K. Edwards, W. W. Brandt, and A. L. Companion, "A Simple and Inexpensive Student Spectroscope," *Journal of Chemical Education*, vol. 39, no. 3, pp. 147-148, Marzo 1962.
- [47] T.-S. Yeh and S.-S. Tseng, "A Low Cost LED Based Spectrometer," *Journal of the*



- Chinese Chemical Society, vol. 53, no. 5, pp. 1067-1072, 2006.
- [48] F. Dominec, "Design and construction of a digital CCD spectrometer," Universidad Técnica de Praga Proyecto de investigación, 2010.
- [49] N. Kreuziger Keppy and M. Allen, "Understanding Spectral Bandwidth and Resolution in the Regulated Laboratory," Thermo Fisher Scientific Inc., 2008.
- [50] Rensselaer Polytechnic Institute. (2017, Enero) Department of Electrical, Computer & Systems Engineering. [En línea].  
<https://www.ecse.rpi.edu/~schubert/Light-Emitting-Diodes-dot-org/chap22/chap22.htm>
- [51] Sony Corporation. (2017, Enero) ILX511 2048-pixel CCD Linear Image Sensor (B/W). [En línea]. <https://oceanoptics.com/wp-content/uploads/SONY-ILX511A.pdf>
- [52] G. C. Tyrrell. (2006, Septiembre) UV-Shifted Silicon Devices for Imaging and Detection. [En línea]. <https://www.photonics.com/Article.aspx?AID=26647>
- [53] L. M. Roberts. (2010, Abril) Spectrum of a typical High Pressure Sodium (HPS) lamp. [En línea].  
[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:High\\_Pressure\\_Sodium\\_Lamp\\_Spectrum.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:High_Pressure_Sodium_Lamp_Spectrum.jpg)
- [54] Wikimedia Commons. (2005, Octubre) Fluorescent lighting spectrum peaks labelled. [En línea].  
[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fluorescent\\_lighting\\_spectrum\\_peaks\\_labelled.gif](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fluorescent_lighting_spectrum_peaks_labelled.gif)
- [55] R. M. Atlas, Handbook of Microbiological Media, 4th ed., T. a. F. Group, Ed. Washington, D.C., EEUUAA: CRC Press, 2010.
- [56] A. Trabelsi, M. Boukadoum, and M. Siaj, "A Preliminary Investigation into the Design of an Implantable Optical Blood Glucose Sensor," American Journal of Biomedical Engineering, vol. 1, no. 2, pp. 62-67, 2011.
- [57] J. Yadav, A. Rani, V. Singh, and B. M. Murari, "Near-infrared LED based Non-invasive Blood Glucose Sensor," in International Conference on Signal Processing and Integrated Networks (SPIN), Noida, India, 2014, pp. 591-594.
- [58] I. A. Nazareth, S. R. Vernekar, R. S. Gad, and G. M. Naik, "Analysis of Blood Glucose using Impedance Technique," International Journal of Innovative Research in Electrical, Electronics, Instrumentation and Control Engineering, vol. 1, no. 9, pp. 413-417, Diciembre 2013.
- [59] S. Wiwatwithaya, P. Phasukkit, S. Tungjitkusolmun, and W. Wongtrairat, "Real-time monitoring Glucose by used Microwave Antenna apply to Biosensor," in The 4th 2011 Biomedical Engineering International Conference, Nueva York, 2011, pp. 135-137.
- [60] A. Tura, S. Sbrignadello, D. Cianciavichia, G. Pacini, and P. Ravazzani, "A Low Frequency Electromagnetic Sensor for Indirect Measurement of Glucose Concentration: In Vitro Experiments in Different Conductive Solutions," Sensors, vol. 10, pp. 5346-5358, 2010.
- [61] E. Topsakal, T. Karacolak, and E. C. Moreland, "Glucose-Dependent Dielectric Properties of Blood Plasma," in 2011 XXXth URSI General Assembly and



Scientific Symposium, Estambul, 2011, pp. 1-4.

- [62] S. Pimentel, et al., "Simulation of a non-invasive glucometer based on a microwave resonator sensor," *Journal of Physics: Conference Series*, vol. 477, pp. 1-7, Diciembre 2013.
- [63] S. Kumar and J. Singh, "Non Invasive Blood Glucose Measurement through Microwave Resonator," *International Journal of Science and Research*, vol. 2, no. 5, pp. 41-43, Mayo 2013.
- [64] S. Kumar and J. Singh, "Measuring Blood Glucose Levels with Microwave Sensor," *International Journal of Computer Applications*, vol. 72, no. 15, pp. 4-9, Junio 2013.
- [65] S. Othman and E. Sacristán, "Espectrómetro de impedancia compleja para aplicaciones biomédicas," *Memorias II Congreso Latinoamericano de Ingeniería Biomédica*, Mayo 2001.
- [66] Y. Feldman, I. Ermolina, and Y. Hayashi, "Time Domain Dielectric Spectroscopy of Biological Systems," *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, vol. 10, no. 5, pp. 728-753, Octubre 2003.
- [67] Y. Hayashi, L. Livshits, A. Caduff, and Y. Feldman, "Dielectric spectroscopy study of specific glucose influence on human erythrocyte membranes," *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 36, p. 369–374, 2003 .
- [68] A. Caduff, E. Hirt, Y. Feldman, Z. Ali, and L. Heinemann, "First human experiments with a novel non-invasive, non-optical continuous glucose monitoring system," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 19, pp. 209-217, 2003.
- [69] M. Zanon, et al., "Non-invasive continuous glucose monitoring: improved accuracy of point and trend estimates of the Multisensor system," *Medical and Biological Engineering Computing*, vol. 50, p. 1047–1057, 2012.
- [70] J. -H. Park, C. -S. Kim, B. -C. Choi, and K. -Y. Ham, "The correlation of the complex dielectric constant and blood glucose at low frequency," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 19, pp. 321-324, 2003.
- [71] J. B. Ko, O. K. Cho, Y. O. Kim, and K. Yasuda, "Body Metabolism Provides a Foundation for Noninvasive Blood Glucose Monitoring," *Diabetes Care*, vol. 27, no. 5, pp. 1211-1212, Mayo 2004.
- [72] N. Townsend. (2001) C3B Medical Electronics Downloads. [En línea]. [https://www.robots.ox.ac.uk/~neil/teaching/lectures/med\\_elec/notes6.pdf](https://www.robots.ox.ac.uk/~neil/teaching/lectures/med_elec/notes6.pdf)
- [73] Texas Instruments Inc. (2013) SpO Pulse Ox Wrist Oximeter Reference Design. [En línea]. <http://www.ti.com/lit/ug/tidu124/tidu124.pdf>
- [74] Healthy Ideas Inc. (2017) Hand Held Pulse Oximeters. [En línea]. <http://www.pulseoximetersupply.com/Hand-Held-Pulse-Oximeter-s/25.htm>
- [75] Contec Medical Systems Co. (2017) Pulse Oximeter. [En línea]. [http://www.contecmed.com/index.php?option=com\\_virtuemart&page=shop.browse&category\\_id=7&Itemid=592](http://www.contecmed.com/index.php?option=com_virtuemart&page=shop.browse&category_id=7&Itemid=592)
- [76] Apple Inc. (2017) iHealth Wireless Pulse Oximeter. [En línea]. <http://www.apple.com/shop/product/HC820LL/A/ihealth-wireless-pulse-oximeter>
- [77] The ramblings of atbrask. (2015, Marzo) Creating a python module for the Contec



- CMS50D+ pulse oximeter. [En línea]. <http://www.atbrask.dk/?p=244>
- [78] V. Chan and S. Underwood, "A Single-Chip Pulsoximeter Design Using the MSP430," Texas Instruments Inc., Reporte de aplicación, 2012.
  - [79] Z. Feng, "Pulse Oximeter Design Using Microchip's dsPIC Digital Signal Controllers (DSCs) and Analog Devices," Microchip Technology Inc. Nota de aplicación, 2013.
  - [80] Texas Instruments, "AFE4400 Integrated Analog Front-End for Heart Rate Monitors and Low-Cost Pulse Oximeters," Texas Instruments Inc. Hoja de especificaciones, 2014.
  - [81] Z. Ren, G. Liu, Y. Liu, and Z. Huang, "Exploration of Noninvasive Determination of Blood Glucose Concentration by using Photoacoustic Technique," in International Symposium on Photoelectronic Detection and Imaging 2013: Laser Sensing and Imaging and Applications., vol. 8905, Beijing, China, 2013, pp. 1-7.
  - [82] A. Duncan, et al., "A Portable Non-invasive Blood Glucose Monitor," in The 8th International Conference on Solid-State Sensors and Actuators and Eurosensors IX, Estocolmo, Suecia, 1995, pp. 455-458.
  - [83] G. B. Christison and H. A. MacKenzie, "Laser photoacoustic determination of physiological glucose concentrations in human whole blood," Medical & Biological Engineering & Computing, vol. 31, no. 3, pp. 284-290, Mayo 1993.
  - [84] K. M. Quan, G. B. Christison, H. A. MacKenzie, and P. Hodgson, "Glucose determination by a pulsed photoacoustic technique: an experimental study using a gelatin-based tissue phantom," Physics in Medicine and Biology, vol. 38, no. 12, pp. 1911-1922, Diciembre 1993.
  - [85] F. Greig, E. M. Johnston, T. D. Binnie, and H. A. Mackenzie, "A PC Based Photo-Acoustic Instrumentation System," in 1994 IEEE Ultrasonics Symposium, vol. 3, Cannes, France, 1994, pp. 1333-1336.
  - [86] Z. Zhao and R. Myllyla, "Photoacoustic determination of glucose concentration in whole blood by a near-infrared laser diode," SPIE Proceedings, vol. 4256, pp. 77-83, Junio 2001.
  - [87] Z. Zhao and R. A. Myllyla, "Photoacoustic blood glucose and skin measurement based on optical scattering effect," SPIE Proceedings, vol. 4707, pp. 153-157, Julio 2002.
  - [88] A. A. Bednov, E. V. Savateeva, and A. A. Oraevsky, "Glucose monitoring in whole blood by measuring laser-induced acoustic profiles," SPIE Proceedings, vol. 4960, pp. 21-29, 2003.
  - [89] M. Kinnunen and R. Myllylä, "Effect of glucose on photoacoustic signals at the wavelengths of 1064 and 532 nm in pig blood and Intralipid," Journal of Physics D: Applied Physics, vol. 38, pp. 2654-2661, Julio 2005.
  - [90] L. Zhu, J. Lin, B. Lin, and H. Li, "Noninvasive blood glucose measurement by ultrasound-modulated optical technique," Chinese Optics Letters, vol. 11, no. 2, pp. 1-5, Febrero 2013.
  - [91] T. J. Allen, B. T. Cox, and P. C. Beard, "Generating photoacoustic signals using high-peak power pulsed laser diodes," in SPIE Proceedings, vol. 5697,





Bellingham, WA, 2005, pp. 233-242.

- [92] A. Kilpelä, "Pulsed time-of-flight laser range finder techniques for fast, high precision measurement applications," Universidad de Oulu Tesis ISBN 951-42-7262-5, 2004.
- [93] International Commission on Non Ionizing Radiation Protection, "ICNIRP Guidelines on limits of exposure to laser radiation of wavelengths between 180 nm and 1000  $\mu\text{m}$ ," Health Physics, vol. 105, no. 3, pp. 271-295, 2013.
- [94] OSRAM Opto Semiconductors. (2004, Noviembre) Operating the Pulsed Laser Diode SPL PLxx. [En línea]. [http://www.osram-os.com/Graphics/XPic7/00054198\\_0.pdf/Standard Pulsed Laser Diode.pdf](http://www.osram-os.com/Graphics/XPic7/00054198_0.pdf/Standard Pulsed Laser Diode.pdf)
- [95] OSRAM Opto Semiconductors. (2004, Noviembre) Operating the Pulsed Laser Diode SPL LLxx. [En línea]. [http://www.osram-os.com/Graphics/XPic1/00018318\\_0.pdf/Operating the pulsed laser diode SPL LLxx.pdf](http://www.osram-os.com/Graphics/XPic1/00018318_0.pdf/Operating the pulsed laser diode SPL LLxx.pdf)
- [96] Fairchild Semiconductor. (2008, Abril) Hoja de datos del transistor FDS5351. [En línea]. <http://www.fairchildsemi.com/ds/FD/FDS5351.pdf>
- [97] Micrel. (2011, Octubre) Hoja de datos del controlador MOSFET MIC4451. [En línea]. [www.micrel.com/\\_PDF/mic4451.pdf](http://www.micrel.com/_PDF/mic4451.pdf)
- [98] L. Svilainis and V. Dumbrava, "Design of a low noise preamplifier for ultrasonic transducer," New Ultragarsas Journal, vol. 2, no. 55, pp. 28-32, 2005.
- [99] T. Saar, "Robust Piezo Impedance Magnitude Measurement Method," Elektronika ir Elektrotechnika, vol. 113, no. 7, pp. 107-110, 2011.
- [100] C. K. N. Patel and A. C. Tarn, "Pulsed photoacoustic spectroscopy of condensed matter," Reviews of Modern Physics, vol. 53, no. 3, pp. 517-550, Julio 1981.
- [101] H. A. MacKenzie, et al., "Advances in photoacoustic noninvasive glucose testing," Clinical Chemistry, vol. 45, no. 9, pp. 1587-1595, Septiembre 1999.
- [102] R. G. M. Kolkman, W. Steenbergen, and T. G. van Leeuwen, "In vivo photoacoustic imaging of blood vessels with a pulsed laser diode," Lasers in Medical Science, vol. 21, no. 3, pp. 134-139, Septiembre 2006.
- [103] P. C. Beard and T. N. Mills, "Characterization of post mortem arterial tissue using time-resolved photoacoustic spectroscopy at 436, 461 and 532 nm," Physics in Medicine & Biology, vol. 42, no. 1, pp. 177-198, 1997.
- [104] Z. Zhao, Pulsed photoacoustic techniques and glucose determination in human blood and tissue. Oulu, Finlandia: Oulu University Press, 2002.
- [105] A. Rosencwaig and A. Gersho, "Theory of the photoacoustic effect with solids," Journal of Applied Physics, vol. 47, no. 1, pp. 64-69, Enero 1976.
- [106] Analog Devices, Inc. (2017, Enero) ADA2200 Synchronous Demodulator and Configurable Analog Filter. [En línea]. <http://www.analog.com/media/en/technical-documentation/data-sheets/ADA2200.pdf>
- [107] Zurich Instruments. (2016, Noviembre) Principles of lock-in detection and the state of the art. [En línea]. [https://www.zhinst.com/sites/default/files/li\\_primer/zi\\_whitepaper\\_principles\\_of\\_lock-in\\_detection.pdf](https://www.zhinst.com/sites/default/files/li_primer/zi_whitepaper_principles_of_lock-in_detection.pdf)



- [108] Y. Liu, J. Song, L. Chen, and S. Pan, "Design of Lock-in Amplifier Used on the Photoacoustic Spectroscopy," *Journal of Convergence Information Technology*, vol. 8, no. 6, Marzo 2013.
- [109] P. M. Maya-Hernández, M. T. Sanz-Pascual, and A. Díaz-Sánchez, "Diseño integrado de un Amplificador Lock-in compacto de bajo consumo para aplicaciones portátiles," *Superficies y Vacío*, vol. 27, no. 2, pp. 66-73, Junio 2014.
- [110] Zurich Instruments AG. (2017, Enero) MFLI Lock-in Amplifier. [En línea]. <http://www.zhinst.com/products/mfli#>
- [111] Vin Karola Instruments. (2014) Comparison of various Lock-in Amplifiers. [En línea]. <http://www.vinkarola.com/pdf/Lock-InAmplifiersComparison.pdf>
- [112] Stanford Research Systems, Inc. (2017, Enero) SR810/SR830 Lock-In Amplifier. [En línea]. <http://www.thinksrs.com/products/SR810830.htm>
- [113] Anfatec Instruments AG. (2017, Enero) USB LockIn 250. [En línea]. [http://www.anfatec.de/anfatec/USB\\_LockIn.html](http://www.anfatec.de/anfatec/USB_LockIn.html)
- [114] S. K. Sengupta, J. M. Farnham, and J. E. Whitten, "A Simple Low-Cost Lock-In Amplifier for the Laboratory," *Topics in Chemical Instrumentation*, vol. 82, no. 9, pp. 1399-1401, Septiembre 2005.
- [115] Y. Liu and R. Zhang, "AD630 Lock-in Amplifier Circuit for Weak Signal," *Advanced Materials Research*, vol. 482, pp. 975-980, 2012.
- [116] G. Gervasoni, M. Carminati, and G. Ferrari, "FPGA-Based Lock-In Amplifier with Sub-ppm Resolution Working up to 6 MHz," in *IEEE International Conference on Electronics, Circuits and Systems, Monte Carlo, 2016*, pp. 117-120.
- [117] M. V. Marquezini, N. Cella, A. M. Mansanares, H. Vargas, and L. C. M. Miranda, "Open photoacoustic cell spectroscopy," *Measurement Science and Technology*, vol. 2, no. 4, pp. 396-401, 1991.
- [118] P. J. Hernández. (2014, Abril) Características térmicas de los materiales. [En línea]. <https://pedrojherandez.com/tag/caracteristicas-termicas/>
- [119] E. Ortega-Robles, A. Cruz-Orea, and D. Elías-Viñas, "Simple and portable low frequency lock-in amplifier designed for photoacoustic measurements and its application to thermal effusivity determination in liquids," *Review of Scientific Instruments*, vol. 89, no. 034904, pp. 1-5, Marzo 2018.
- [120] M. L. Baesso, J. Shen, and R. D. Snook, "Laser-induced Photoacoustic Signal Phase Study of Stratum Corneum and Epidermis," *Analyst*, vol. 119, no. 4, pp. 561-562, Abril 1994.
- [121] A. Yoshida, K. Kagata, and T. Yamada, "Measurement of Thermal Effusivity of Human Skin Using the Photoacoustic Method," *International Journal of Thermophysics*, vol. 31, no. 10, pp. 2019-2029, Octubre 2010.
- [122] J. B. Varela-Najera, T. Cordova-Fraga, M. Vargas-Luna, and G. Gutierrez-Juarez, "Thermal effusivity of human skin by photoacoustic technique," *Biomedical Optoacoustics. Proceedings of the SPIE.*, vol. 3916, pp. 179-185, 2000.
- [123] Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. (2012) Biodiversidad Mexicana. Jitomate.. [En línea]. <https://www.biodiversidad.gob.mx/usos/alimentacion/jitomate.html>



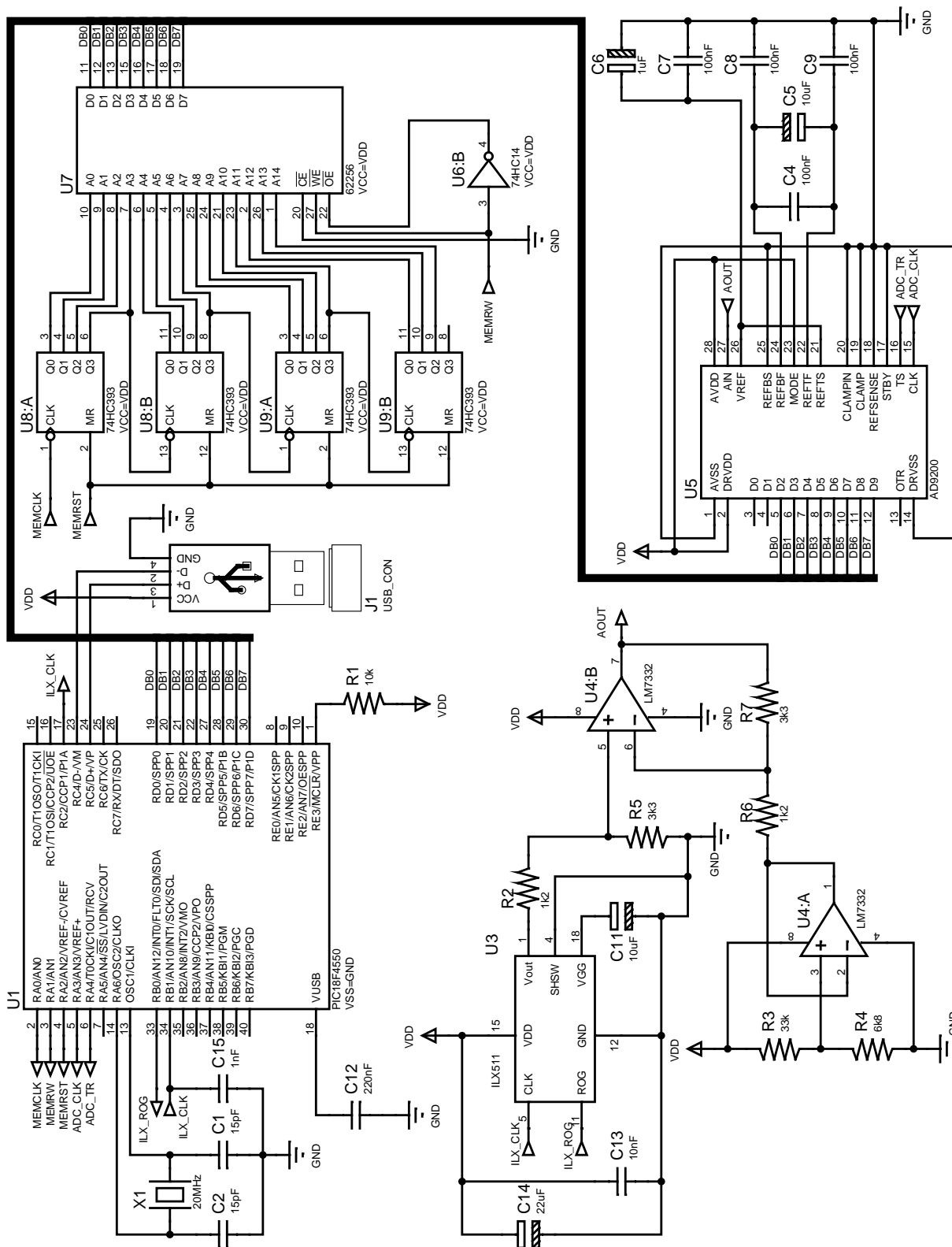
- [124] Subsecretaría de Agricultura, "Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. Jitomate Mexicano.," Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), 2017.
- [125] M. L. Luna-Guevara and A. Delgado-Alvarado, "Importancia, contribución y estabilidad de antioxidantes en frutos y productos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)," *Avances en Investigación Agropecuaria*, vol. 18, no. 1, pp. 51-66, Enero 2014.
- [126] Kozukue, Nobuyuki, and F. Mendel, "Tomatine, chlorophyll,  $\beta$ -carotene and lycopene content in tomatoes during growth and maturation," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 83, no. 3, pp. 195-200, Febrero 2003.
- [127] A. G. Saad, P. Jaiswal, and S. N. Jha, "Non-destructive quality evaluation of intact tomato using VIS-NIR spectroscopy," *International Journal of Advanced Research*, vol. 2, no. 12, pp. 632-639, Diciembre 2014.
- [128] Y. Shao, et al., "Visible/near infrared spectrometric technique for nondestructive assessment of tomato "Heatwave" (*Lycopersicum esculentum*) quality characteristics," *Journal of Food Engineering*, vol. 81, no. 4, pp. 672-678, Agosto 2007.
- [129] C. N. G. Scotter, "Non-destructive spectroscopic techniques for the measurement of food quality," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 8, no. 9, pp. 285-292, Septiembre 1997.
- [130] V. Nielsen. (2018, Enero) Which Wavelengths do Xanthophylls and Carotenes Absorb? Ursa Lighting Inc.. [En línea]. <http://ursalighting.com/wavelengths-xanthophylls-carotenes-absorb/>
- [131] C. H. Lochmüller, R. Röhl, and D. B. Marshall, "Use of Carbon Black as a Reference Material in Photoacoustic Spectroscopy," *Analytical Letters*, vol. 14, no. 1, pp. 41-46, Octubre 1981.
- [132] M. A. Costache, G. Campeanu, and G. Neata, "Studies concerning the extraction of chlorophyll and total carotenoids from vegetables," *Romanian Biotechnological Letters*, vol. 17, no. 5, pp. 7702-7708, 2012.
- [133] D. S. Velasco, et al., "Thermal diffusivity of periderm from tomatoes of different maturity stages as determined by the concept of the frequency-domain open photoacoustic cell," *Journal of Applied Physics*, vol. 109, no. 034703, pp. 1-9, Febrero 2011.
- [134] V. E. Sweat, "Experimental values of thermal conductivity of selected fruits and vegetables," *Journal of Food Science*, vol. 39, no. 6, pp. 1080-1083, Noviembre 1974.
- [135] M. K. Krokida, N. M. Panagiotou, Z. B. Maroulis, and G. D. Saravacos, "Thermal conductivity: Literature data compilation for foodstuffs," *International Journal of Food Properties*, vol. 4, no. 1, pp. 111-137, 2001.
- [136] C. J. Cremers, "Effective Thermal Diffusivity of Powdered Coal," *Thermal Conductivity*, vol. 18, pp. 699-707, 1985.
- [137] J. Deng, Q.-W. Li, Y. Xiao, C.-P. Wang, and C.-M. Shu, "Thermal diffusivity of coal and its predictive model in nitrogen and air atmospheres," *Applied Thermal Engineering*, vol. 130, pp. 1233-1245, Febrero 2018.



- [138] D. Gosset, O. Guillois, and R. Papoular, "Thermal diffusivity of compacted coal powders," *Carbon*, vol. 34, no. 3, pp. 369-373, 1996.
- [139] K.-C. Xie, "Physical Characteristics of Coal," in *Structure and Reactivity of Coal*. Heidelberg, Alemania: Springer, 2015, pp. 29-65.
- [140] U. G. Kyle, et al., "Bioelectrical impedance analysis-part I: review of principles and methods," *Clinical Nutrition*, vol. 23, no. 5, pp. 1226-1243, Octubre 2004.
- [141] B. T. Fokkens and A. J. Smit, "Skin fluorescence as a clinical tool for non-invasive assessment of advanced glycation and long-term complications of diabetes," *Glycoconjugate Journal*, vol. 33, no. 4, pp. 527-535, Agosto 2016.
- [142] K. Koenig and H. Schneckenburger, "Laser-Induced Autofluorescence for Medical Diagnosis," *Journal of Fluorescence*, Vol. 4, No. L 1994, vol. 4, no. 1, pp. 17-40, Marzo 1994.

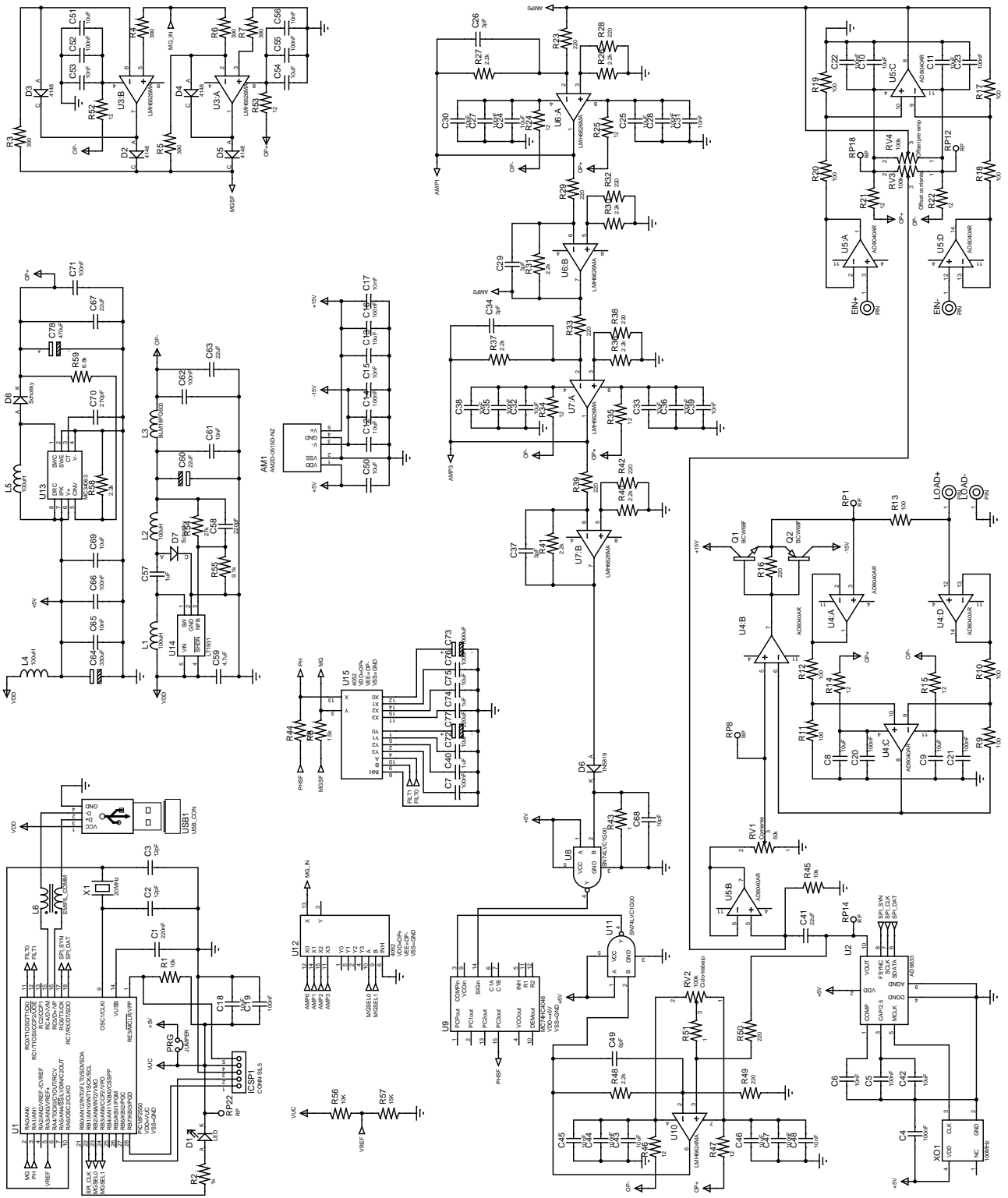


## Apéndice A: Diagrama eléctrico del espectrómetro óptico.



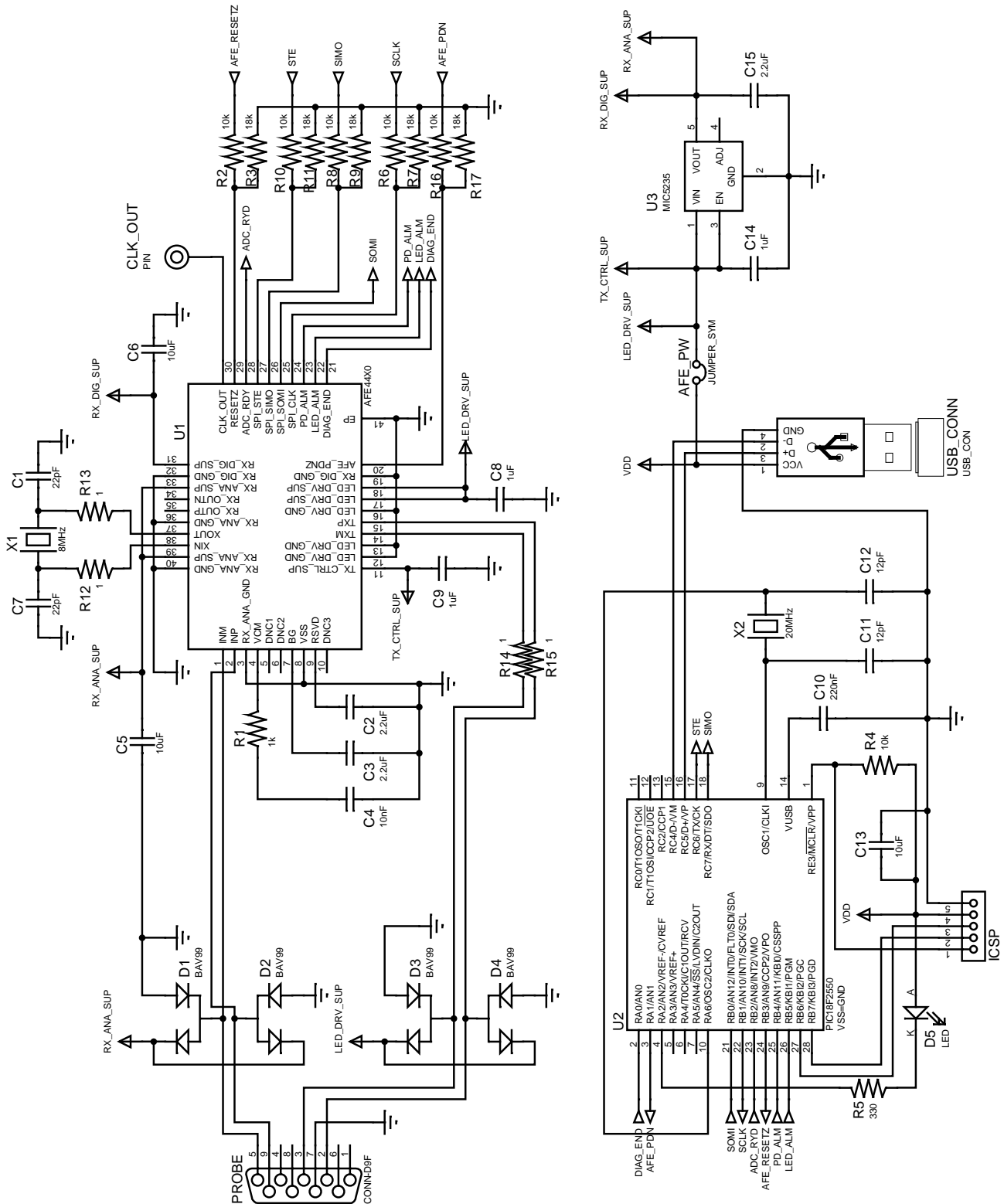


## Apéndice B: Diagrama eléctrico del espectrómetro de impedancia.





## Apéndice C: Diagrama eléctrico del oxímetro de pulso.





## Apéndice D: Diagrama eléctrico del amplificador lock-in.

