



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA ELÉCTRICA – INSTRUMENTACIÓN

Análisis de la saturación fraccional en la oximetría de pulso

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:
Flor del Carmen Cortés Ortegón

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Celia Angelina Sánchez Pérez
ICAT, UNAM

Ciudad Universitaria, CDMX, Marzo 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. García Valenzuela Augusto
Secretario: Dr. Ramírez Chavarría Roberto
1^{er}. Vocal: Dra. Sánchez Pérez Celia Angelina
2^{do}. Vocal: Dr. Qureshi Naser
3^{er}. Vocal: Dra. Pérez Pacheco Argelia

Lugar o lugares donde se realizó la tesis:
Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT– UNAM)

TUTOR DE TESIS:

Dra. Celia Angelina Sánchez Pérez

FIRMA

AGRADECIMIENTOS

Dedico estas líneas para agradecer el apoyo de personas que son muy importantes en mi vida, empezando por mis padres Eugenia Ortegón y Jorge Cortés, que son mi motivación y más grande apoyo, quienes siempre creen en mí, me aconsejan, me animan cada día con sus mejores vibras y se alegran por mis metas alcanzadas, gracias por comprender mis ausencias por falta de tiempo y ser pacientes en mis momentos de estrés. Gracias por las memorias que hemos creado y los días llenos de risas interminables, las bases de la persona que soy ahora se los debo a ustedes, infinitas gracias.

A mis hermanos, Axel Cortés y Jorge Cortés, gracias por la paciencia en mis momentos de tensión, por comprender e interesarse en lo que hago, por su apoyo cuando los necesito y por intentar ayudarme con ideas que, aunque no lo crean fueron muy oportunas, gracias por los momentos y risas que compartimos todos los días, la vida no sería tan divertida sin ustedes, no podría tener mejores hermanos.

A mi compañero de vida Jesús Rodríguez, gracias por ser la luz que ilumina mis días, por tu apoyo, por comprenderme, por estar presente cuando te necesito y por animarme en esos días en que siento que no puedo más, por creer en mí e impulsarme a ser mejor cada día, gracias por las risas, por los buenos momentos, por alegrarte y celebrar conmigo las metas alcanzadas, gracias por seguir dándome el placer de tu compañía en este largo camino que es la vida y por todo lo que haces por mí.

A mis amigos David Martínez, Marco García, Nadia Álvarez, Miguel Torres, Aida Meléndez y Belem Guarneros (que aun en la distancia siempre está presente en los momentos más importantes), gracias a todos por escucharme hablar de lo mismo con paciencia en mis días de estrés y animarme con sus mejores vibras, por creer en mí y celebrar conmigo, gracias por compartir tan bellos momentos, por apoyarme y estar cuando los necesito, son las mejores personas que pude conocer, gracias por brindarme su amistad y permitirme llamarles amigos.

También quiero dedicar este espacio para agradecer a los investigadores e instituciones que me brindaron su apoyo e hicieron posible la conclusión de este proyecto de investigación.

Quisiera empezar por nombrar a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), mi segunda casa, por brindarme los conocimientos necesarios para desarrollarme profesional y personalmente, por las personas inigualables que me permitió conocer y los fuertes lazos de amistad que se formaron.

A mi asesora la Dra. Celia Sánchez Pérez, gracias por dirigir este trabajo de tesis, por el apoyo mostrados desde el primer momento guiándome, resolviendo las dudas y preguntas que fueron surgiendo a lo largo de la investigación con dedicación y paciencia, gracias por sus invaluable aportaciones y por hacer el ambiente de trabajo en el laboratorio tan ameno.

A mis sinodales el Dr. García Valenzuela Augusto, Dr. Ramírez Chavarría Roberto, Dra. Pérez Pacheco Argelia y al Dr. Qureshi Naser, por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y sus valiosos comentarios, gracias por formar parte del comité de evaluación.

A mis compañeros de laboratorio, M. Luisa Romero Ornelas, M.I. José Valladares Pérez y al M.I. Ricardo Cebada Fuentes gracias a todos, porque cada uno de ustedes me apoyo de diferentes maneras durante este proceso, con ideas y comentarios, así como con palabras de apoyo, gracias por los buenos momentos y risas en este tiempo que compartimos juntos en el laboratorio.

Finalmente, un agradecimiento especial al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado durante los 24 meses de mis estudios de maestría (CVU: 1086326).

Este trabajo recibió financiamiento del proyecto PAPIIT IV100320, "Desarrollo de Insumos e Instrumentación en atención a la emergencia sanitaria por el COVID19".

Gracias a todos

RESUMEN

La oximetría de pulso ha sido un método empleado desde hace muchos años, siendo la técnica óptica no invasiva estándar, encargada de la medición indirecta de la saturación parcial de oxígeno en la sangre (SpO_2), que es un parámetro que mide la capacidad de la hemoglobina para transportar oxígeno a través del cuerpo. En la oximetría convencional, la estimación de SpO_2 se hacen a partir de mediciones ópticas de absorción, basando su cálculo en la presencia de dos absorbentes en la sangre: la oxihemoglobina (HbO_2) y la desoxihemoglobina (RHb), medidos en la región del espectro VIS-NIR utilizando dos longitudes de onda específicas.

Sin embargo, se ha documentado que no solo existen estos dos tipos de hemoglobina, sino que también hay otras formas de hemoglobina conocidas como dishemoglobinas no transportadoras de oxígeno, estas son la carboxihemoglobina (COHb) y metahemoglobina (MetHb), son hemoglobinas que se encuentran en la sangre a bajas concentraciones pero resultan importantes en el caso de personas con sobreexposición a monóxido de carbono (CO), que se encuentran bajo tratamientos médicos específicos o hacen un uso indebido de ciertos fármacos o anestésicos presentan niveles elevados en concentración de estas formas de hemoglobina. En el área de la oximetría, resulta de interés desarrollar sistemas de análisis in vitro que permitan analizar el rol de estas dishemoglobinas en la cuantificación de SpO_2 en personas que se encuentran expuestas a las condiciones antes mencionadas, ya que hasta este momento son personas que se suelen monitorear con técnicas convencionales de oximetría y aunque existen métodos más precisos para monitorear estos casos, resultan ser caros, escasos y a los que no se tiene acceso fuera de hospitales y laboratorios especializados.

Considerando estas problemáticas, el propósito de este proyecto es proporcionar un mejor entendimiento de la influencia de las dishemoglobinas en los cálculos de la saturación de oxígeno arterial (SaO_2) considerando la presencia de tres derivados de hemoglobina: HbO_2 , RHb, y MetHb, a diferentes concentraciones. En principio se buscó hacer una primera aportación, en el entendimiento del porqué en la oximetría convencional se utiliza un modelo de análisis para medios homogéneos en un medio inhomogéneo como lo es el tejido biológico, para ello, se propone la simulación de un modelo de piel simplificado, conformado por dos capas de piel (dermis y epidermis) y una capa de sangre completa (pensada como una suspensión de eritrocitos en plasma, el interior de los eritrocitos contiene una hemoglobina total conformada por tres componentes de hemoglobina distintos; HbO_2 , RHb y MetHb, en diferentes concentraciones).

Por otro lado, se realizó un trabajo experimental en el laboratorio obteniéndose tres derivados de hemoglobina; HbO_2 , RHb y MetHb, mediante la utilización de hemoglobina en su forma liofilizada; las muestras se prepararon haciendo una suspensión de hemoglobina en agua inyectable y utilizando reacciones químicas (el proceso específico de obtención de estas hemoglobinas se aborda a detalle en el capítulo 4, que hace referencia a la metodología experimental). Una vez obtenidos los tres derivados de hemoglobina, se midieron los espectros de absorción de las muestras observando que son muestras estables en el tiempo y que, aunque los espectros de absorción son comparables con los espectros reportados en la literatura en el rango de 450 nm a 650 nm, se encuentra una marcada diferencia en la zona espectral de 650-1000 nm. Dadas estas circunstancias, el estudio de las hemoglobinas se restringió de 450 nm a 650 nm. Algo importante que hay que destacar es que proponer la utilización de hemoglobina liofilizada nos permite hacer mediciones in vitro en laboratorio evitando el uso de muestras de sangre de personas, englobándonos en un entorno

de ensayos éticos.

Finalmente, utilizando los espectros de absorción de dichas hemoglobinas experimentales se simuló un espectro de absorción de hemoglobina total compuesta por las fracciones de hemoglobina HbO₂, RHb y MetHb a diferentes concentraciones, con el fin de proponer un primer cálculo para la estimación de SaO₂ que se obtiene en función de la concentración de cada una de las hemoglobinas que compone el espectro total. Con este objetivo en mente se propone la aplicación de un método matemático de análisis espectral multivariable basado en el método de mínimos cuadrados clásicos (MLC) y la utilización de una ecuación sencilla que permita realizar la estimación de la SaO₂ en función de la concentración. Los resultados de este método fueron aproximados tanto para el cálculo de las concentraciones en una muestra experimental de hemoglobina total, así como para los cálculos de SaO₂. Se comprobó que el método aplicado es funcional, aunque sigue teniendo limitaciones al ser un método matemático menos robusto que otros, por lo que habrá que irlo mejorando en el futuro.

Como un experimento extra se intentó obtener en el laboratorio un espectro de absorción total de una mezcla con distintas concentraciones de HbO₂, RHb y MetHb, para este propósito se diseñó una cubeta de polidimetilsiloxano (mejor conocido como PDMS o dimeticona, es un polímero orgánico transparente), cuyo interior constaba de 3 compartimientos cilíndricos, donde se colocaron las muestras de hemoglobina. Con este diseño se lograron obtener los espectros de absorción de los tres tipos de hemoglobinas que fueron comparados con los espectros de absorción obtenidos con la cubeta de plástico del espectrofotómetro, observándose que los espectros obtenidos con la cubeta de PMDS eran diferentes a lo esperado, concluyendo que este resultado se debió a que el diseño de los canales de la cubeta de PMDS está provocando un efecto de esparcimiento muy grande, de tal forma que se va perdiendo tanta luz que al final el espectro de absorción ya no muestra la forma esperada. Se propone en principio como mejorar la cubeta, haciendo un rediseño de sus canales a una forma cuadrada con lo que se eliminaría este efecto de esparcimiento.

Los alcances de este proyecto llegan hasta este punto, sin embargo, en el futuro se planea mejorar los cálculos de la estimación de SaO₂ con un método más robusto en el que se pueda aplicar una formulación más completa para la SaO₂ que considere las inhomogeneidades del medio biológico estudiado, llegando a una aplicación de un sistema sencillo de laboratorio, considerando no sólo las tres hemoglobinas presentadas en este trabajo, sino también incorporando a la dishemoglobina COHb.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	V
CAPÍTULO 1. Planteamiento del problema	- 3 -
1.1 Antecedentes.....	- 3 -
1.2 Objetivos.....	- 9 -
1.2.1 Objetivo Principal.....	- 9 -
1.2.2 Objetivos Secundarios	- 9 -
CAPÍTULO 2. Oximetría de pulso	- 10 -
2.1 Oximetría de pulso desde el punto de vista fisiológico (transporte de oxígeno)	- 10 -
2.2 Propiedades ópticas de las hemoglobinas transportadoras de oxígeno y las dishemoglobinas.....	- 14 -
2.3 Oximetría de dos componentes: Saturación de oxígeno funcional	- 15 -
2.4 Oximetría de varios componentes: Saturación de oxígeno fraccional.....	- 17 -
CAPÍTULO 3. Modelado óptico de la piel	- 19 -
3.1 Interacción luz-tejido biológico	- 19 -
3.2 Coeficiente de absorción (μ_a).....	- 20 -
3.3 Coeficiente de esparcimiento (μ_s)	- 20 -
3.4 Ley de Beer-Lambert para un modelo de piel multicapa	- 22 -
3.5 Modelo de piel multicapa. Transmisión de luz en piel.....	- 24 -
3.5.1 Método de análisis de la luz transmitida	- 26 -
3.5.2 Análisis y discusión de resultados de la luz transmitida en el modelo de piel multicapa.....	- 27 -
CAPÍTULO 4. Metodología Experimental	- 36 -
4.1 Preparación de muestras y medición espectral	- 36 -
4.2 Montaje experimental utilizado para la caracterización espectral	- 37 -
4.3 Análisis espectral multicomponente: Estimación cuantitativa de los derivados de hemoglobina	- 38 -
4.4 Obtención experimental en laboratorio de una muestra que contiene HbO ₂ , RHb y MetHb	- 40 -

CAPÍTULO 5. Discusión y Análisis de Resultados Experimentales	- 43 -
5.1 <i>Análisis de las muestras preparadas de MetHb, HbO₂ y RHb</i>	- 43 -
5.2 <i>Cantidad mínima necesaria de bicarbonato (BS) y ditionito de sodio (DS) para la obtención de HbO₂ y RHb</i>	- 46 -
5.3 <i>Estabilidad de las muestras de MetHb, HbO₂ y RHb</i>	- 49 -
5.4 <i>Cálculo de la SpO₂ fraccional en función de las concentraciones de HbO₂, RHb y MetHb.</i>	- 51 -
5.5 <i>Resultados de la eficiencia de medición fraccional en laboratorio para obtener una muestra que contiene HbO₂, RHb y MetHb</i>	- 55 -
CAPITULO 6. Conclusiones	- 59 -
Apéndice I	61
Apéndice II	63
Apéndice III	65
Referencias	67

CAPÍTULO 1.

Planteamiento del problema

1.1 Antecedentes

El oxígeno es indispensable para que las células y órganos del cuerpo humano funcionen adecuadamente; sin embargo, en ocasiones se presentan situaciones que llegan a impedir que el oxígeno llegue de manera adecuada a las células y órganos, repercutiendo manera importante en la salud de las personas.

El ejemplo más próximo de este tipo de situaciones es el de la pandemia por el virus SARS-CoV-2 (COVID-19) (declarada a nivel mundial en el año 2020), donde se observó que esta enfermedad causaba estragos en el proceso de oxigenación de la sangre, deviniendo así en estados de hipoxia en las personas contagiadas con este virus. Debido a esta situación, el monitorear y medir los niveles de oxígeno en la sangre de las personas contagiadas se convirtió en una tarea obligatoria para tratar de controlar la enfermedad y disminuir los decesos.

La manera de medir los niveles de oxígeno en la sangre es a través de la oximetría de pulso, que es una técnica óptica no invasiva. La oximetría de pulso realiza una medición indirecta de la saturación parcial de oxígeno en la sangre (SpO_2); este parámetro mide la capacidad que tiene la hemoglobina de transportar oxígeno a través del cuerpo. La organización mundial de la salud (OMS) reporta que en individuos sanos una $SpO_2 > 96\%$ es considerada normal, mientras que un registro inferior al 92% pueden ser indicativo de una mala oxigenación, llevando a problemas de salud que pueden provocar una insuficiencia respiratoria que puede poner en peligro la vida. [1]

La oximetría de pulso se ha estudiado desde hace ya varios años; sin embargo, se le dio mayor atención durante la pandemia debido a que los problemas que esta técnica presenta comenzaron a hacerse más evidentes, principalmente por variaciones en las mediciones y a las deficiencias en la medición de personas con condiciones de salud alteradas.

Uno de los problemas más comunes para estimar la SpO_2 a partir de mediciones ópticas se debe a que la técnica convencional en sus cálculos considera únicamente la presencia de dos absorbentes de luz en la sangre: la oxihemoglobina (HbO_2) y desoxihemoglobina (RHb); sin embargo, existen otros componentes en personas sanas que también son absorbentes de luz en la misma región espectral (VIS-NIR) como las dishemoglobinas no transportadoras de oxígeno; carboxihemoglobina (COHb) y metahemoglobina (MetHb), que son otros tipos de hemoglobina que existen a bajas concentraciones, pero que en situaciones particulares (que se explicarán a detalle más adelante) aumentan su concentración influyendo de manera importante en la correcta oxigenación de la sangre, provocando un deterioro del estado de salud en las personas haciéndolas más vulnerables a desarrollar síntomas graves de enfermedades agudas respiratorias como la COVID-19.

La monitorización de las dishemoglobinas COHb y MetHb, así como su relación con la SpO_2 es un factor de suma importancia, por lo que se requiere la implementación de cálculos más completos en los que se

consideren estos tipos de hemoglobina con el fin de realizar mediciones de la saturación de oxígeno más confiables.

Actualmente se han desarrollado sistemas para la cuantificación de los componentes sanguíneos; sin embargo, las mediciones convencionales de mayor confianza y precisión requieren de técnicas invasivas, pues necesitan de una muestra de sangre del paciente para su análisis, resultando en métodos dolorosos e incómodos que no permiten la monitorización en tiempo real, y para aplicarlas se requiere infraestructura de laboratorio especializada y de personal capacitado, razón por la cual este tipo de estudios son costosos y por consiguiente, en muchos casos inaccesibles para los pacientes. Es por esta razón que los estudios para entender la influencia de las dishemoglobinas en los cálculos de la SPO_2 y la creación de sistemas para la cuantificación de éstos componentes sanguíneos continúan en desarrollo, donde se diseñan y consideran sistemas que emplean técnicas mínimamente invasivas y no invasivas, optando en mayor medida por éstas últimas; ya que sólo se necesita una bioseñal (imagen o espectro) para estimar la oxigenación sanguínea del paciente sin causarle molestia alguna, olvidándonos así de los inconvenientes y deficiencias de las técnicas invasivas. Las técnicas no invasivas más utilizadas son: la espectroscopia en el rango visible y el infrarrojo cercano (NIR), y la fotopleetismografía (PPG).

A continuación, son presentados algunos trabajos que intentan resolver los problemas que la técnica de oximetría de pulso presenta.

- **Diagnóstico no invasivo de la intoxicación por monóxido de carbono mediante el modelo de Beer-Lambert modificado [2]**

En este artículo de conferencia realizan algunos cálculos para demostrar la viabilidad del uso del modelo de Beer-Lambert modificado (EMLB) para detectar diferencias en las saturaciones medias porcentuales de oxihemoglobina (S_mO_2) y carboxihemoglobina (S_mCO) en la sangre entre poblaciones fumadoras y no fumadoras. Para este propósito desarrollan una rutina de ajuste iterativo y se ayudan de la función *fminsearch* del software de MATLAB para optimizar el ajuste del modelo de EMLB. Dicho algoritmo utiliza los coeficientes de extinción de las especies de hemoglobina que absorben la luz en el rango de longitudes de onda de 520 a 600 nm como información de fondo.

Las mediciones se realizan por medio de espectroscopia de reflectancia, con un equipo experimental muy sencillo que consiste en lo siguiente; un diodo emisor de luz (LED) blanco de 9 W para irradiar el tejido cutáneo del dedo pulgar; esta fuente de luz está en incidencia normal y se encuentra a 70 mm del pulgar, la luz reflejada se recoge en una fibra óptica que se encuentra a 30 mm de la piel y a un ángulo de 35° , la detección de la intensidad de la luz reflejada se realiza a través de un espectrómetro comercial (USB4000-VISNIR, Ocean Optics Inc.). Las señales detectadas se transfieren y almacenan en un ordenador a través de un puerto USB, para su posterior procesamiento (*Figura 1*).

Este estudio se llevó a cabo con nueve voluntarios asiáticos, cinco de los cuales (con edades comprendidas entre los 24 y los 62 años) son fumadores, mientras que los otros cuatro (dos de ellos de 21 años, uno de 22 y uno de 25) son no fumadores, sin ninguna enfermedad subyacente conocida y no estaban expuestos

laboralmente al monóxido de carbono (CO). A los individuos fumadores también se les pidió que proporcionaran información sobre su consumo diario de cigarrillos y la duración de su experiencia como fumadores.

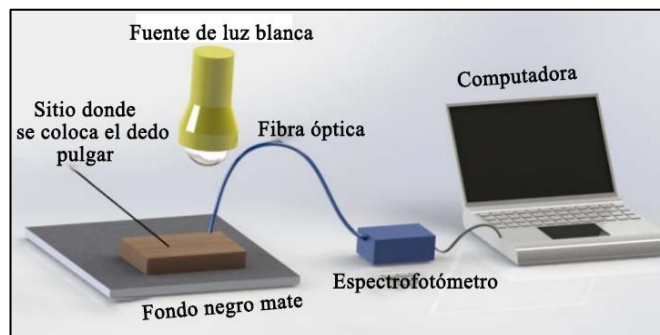


Figura 1. Sistema experimental. [2]

Comparando sus resultados con publicaciones reportadas en la literatura, este estudio concluye que el modelo de EMLB y la estrategia de ajuste son capaces de detectar diferencias en los porcentajes de saturación en sangre de voluntarios fumadores y no fumadores, por lo que ambas pueden utilizarse para detectar clínicamente la intoxicación por CO.

Aunque este artículo deja ver las ventajas de utilizar esta nueva formulación del modelo de EMLB donde se toman en cuenta las inhomogeneidades del medio, los autores no dejan muy claro de donde se obtiene el valor parámetro "G" que es el parámetro clave de esta nueva formulación del modelo de EMLB, pues es quien lleva consigo las inhomogeneidades del medio y las bibliografías a las que se hace referencia parecen tener el mismo problema pues no explican claramente cuál es su valor o cómo se obtiene.

- **Un oxímetro de pulso de tres longitudes de onda para la determinación de la carboxihemoglobina [3]**

Es necesario mencionar que este proyecto no pudo concluirse debido a la falta de financiamiento y se quedó solamente en el desarrollo del procedimiento de calibración.

En este artículo se presenta la metodología y el diseño de un oxímetro de pulso que mide la presencia de HbO₂, RHb, y una dishemoglobina: COHb. Se propone la utilización de LEDs no filtrados a 660 nm, 810 nm y 940 nm para identificar cada componente, los autores mencionan que la selección de longitudes de onda se realizó debido a la disponibilidad comercial y a la amplia separación espectral entre ellos. Hacen uso de la ley de Beer-Lambert para definir tres ecuaciones de absorción a las 3 longitudes de onda mencionadas, con ellas realizan una relación entre las absorbancias para determinar una calibración para su oxímetro de pulso.

Durante las pruebas teóricas realizadas se presentó una amplificación en el nivel de ruido de la señal transmitida en la región infrarroja en 810 nm y 940 nm cuando se realizaba el registro de la absorbancia. Los autores no encontraron una solución concreta para solventar este problema, pero proponen una posible solución utilizando longitudes de onda menores a 600 nm; sin embargo, en esta región los tres componentes empiezan a mostrar coeficientes de absorción muy similares y por lo tanto resultaría difícil separarlos; también

observaron que los niveles inusualmente altos de sulfahemoglobina y metahemoglobina provocarían datos erróneos en las lecturas de su dispositivo.

- **Espectrómetro VIS-NIR de múltiples longitudes de onda para la medición pulsátil de los derivados de la hemoglobina en la sangre total** [4]

Se hizo un análisis del uso del sistema multispectral que se encuentra en el rango VIS-NIR, para medir los derivados de hemoglobina en la sangre total en circulación. El sistema experimental propuesto está basado en un espectrómetro de matriz de diodos de tamaño compacto, diseñado para adquirir los componentes pulsátiles y no pulsátiles del fotopleletismograma de un lecho vascular periférico que se simula mediante la fabricación de un dedo sintético de caucho de silicona flexible (*Figura 2*).

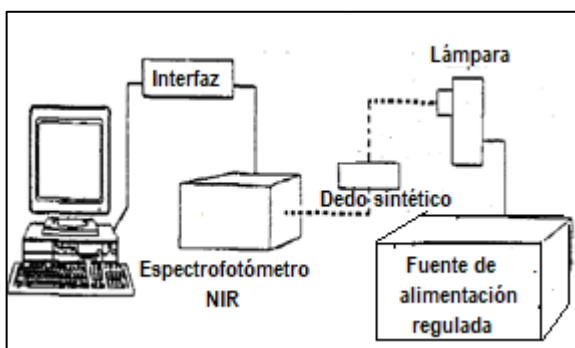


Figura 2. Sistema experimental. [4]

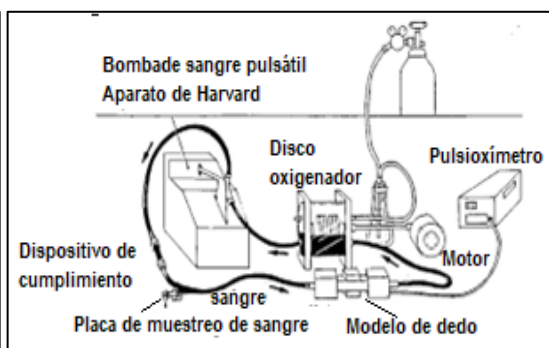


Figura 3. Simulador de flujo sanguíneo pulsátil. [62]

Se utiliza un circuito acoplado al dedo sintético para simular el flujo sanguíneo pulsátil (*Figura 3*) y la velocidad del flujo, la presión sanguínea y la temperatura pueden variar de forma controlada para simular diversas condiciones fisiológicas. Se utiliza un puerto de muestreo junto al dedo sintético para el muestreo intermitente de sangre. Se extraen del sistema aproximadamente 0,5 ml de sangre y se transfieren inmediatamente a un CO-oxímetro adyacente para su análisis.

En este artículo no se resuelve el problema de la cuantificación de las dishemoglobinas pero se concluye que el uso de la espectrometría VIS-NIR de múltiples longitudes de onda hace posible la determinación simultánea de varios analitos, pero que, debido a la interferencia espectral de dichos componentes se impide la cuantificación directa basándose en la Ley de Beer-Lambert por lo que sugieren la aplicación de análisis quimiométricos¹ como los Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) y la Regresión de Componentes Principales (PCR), para su estudio.

¹ **Análisis quimiométricos:** Aplicación de métodos matemáticos o estadísticos sobre datos químicos.

- **Sistema de calibración para la espectrofotometría de pulso utilizando una celda de flujo de pulsación de doble capa** [5]

En este trabajo se implementa un sistema de calibración in vitro como sustituto de la calibración in vivo² con el fin de evaluar o calibrar los dispositivos y oxímetros de pulso para la práctica clínica.

Los autores proponen la fabricación de un sistema circulatorio arterial y venoso y la utilización de una célula de flujo de pulsación de doble capa; con estos elementos, se simulan con alta precisión un entorno “in vivo” del sistema circulatorio. Para la experimentación se utiliza un volumen total de aproximadamente 400 ml. Las dimensiones del sistema son de aproximadamente 600 mm × 400 mm. Finalmente la saturación de oxígeno de este sistema se controla mediante un pulmón artificial.

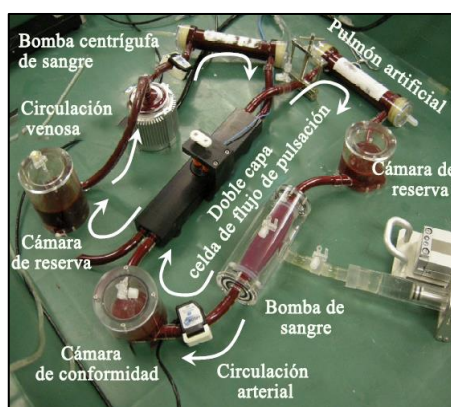


Figura 4. Simulación del sistema circulatorio [5].

La desventaja de este dispositivo es que nuevamente se utiliza un gran volumen de sangre humana y aunque es un sistema mucho más práctico que el encontrado en el artículo anterior, su fabricación es costosa.

- **Sistema multiespectral para el cálculo de SpO₂** [6]

Se desarrolló un instrumento que incorpora un LED de múltiples longitudes de onda para medir la SpO₂, la tHb (hemoglobina total), la COHb y la MetHb de forma no invasiva. Haciendo una medición por transmisión óptica aplicando para su análisis una fórmula construida por los autores, basada en un análisis de regresión múltiple donde incorporan los componentes DC de la densidad óptica para calcular la concentración de los derivados de hemoglobina en la sangre.

Para probar dicho sistema se realizaron experimentos in vitro con sangre humana ayudados de un sistema artificial llamado Waseda [5], que se muestra en la Figura 5.

² **Calibración in vivo:** Se utilizan personas para la calibración de la espectrofotometría de pulso. Sin embargo, utilizar personas o animales es algo que debe evitarse, pues es riesgoso.

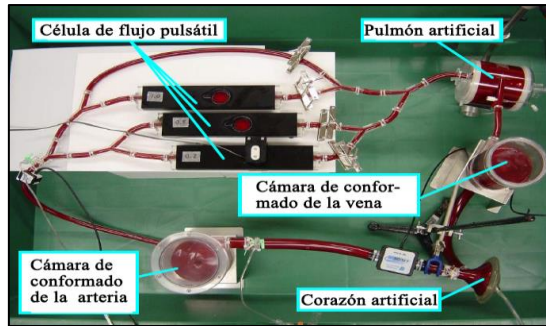


Figura 5. Simulación del sistema circulatorio de Waseda. [6]

Para la experimentación, las concentraciones de O_2Hb y $COHb$ en el sistema circulatorio fueron controladas por la concentración de oxígeno y CO en el aire que fluía a través del pulmón artificial del sistema Waseda. La concentración de $MetHb$ se controló mediante la infusión de una solución de nitrato de sodio en el sistema circulatorio, y la tHb se controló mediante la dilución de la sangre con solución salina tamponada con fosfato. Finalmente, la concentración calculada mediante la fórmula propuesta se comparó con la concentración medida por un oxímetro de CO (OSM3, Radiometer, Copenhague, Dinamarca), arrojando resultados con alta precisión.

Las desventajas de este sistema de experimentación son notables, desde que se necesita la utilización de gases para la creación de O_2Hb y $COHb$, además el sistema Waseda utilizado para sus experimentos in vitro aunque es práctico su fabricación resulta ser muy costosa. Además, de necesitar de sangre humana para la experimentación.

Cada una de las metodologías de los trabajos presentados con anterioridad, intentan resolver de manera diferente la problemática general de la medición de la SpO_2 en presencia de dishemoglobinas, pero siguen aplicando métodos que utilizan sangre humana, además de que los dispositivos planteados siguen presentando algunos problemas de portabilidad y son sistemas de experimentación complicados y costosos o en otros casos los métodos de análisis utilizados no son claros. De ahí la importancia de crear nuevas técnicas de análisis para el entendimiento de la influencia de las dishemoglobinas en la oxigenación y de este modo crear sistemas más completos que hagan mediciones confiables en personas con condiciones alteradas de salud.

Tomando inspiración de estas problemáticas, este proyecto de tesis busca hacer una primera aportación, aplicando un análisis que nos permita el entendimiento de la influencia de las dishemoglobinas en los cálculos de la saturación de oxígeno, considerando la presencia de tres derivados de hemoglobina: HbO_2 , RHb , y $MetHb$. Además, se pretenden realizar mediciones in vitro con la utilización de hemoglobina liofilizada comercial para laboratorio, creando los diferentes derivados de hemoglobina a partir de reacciones químicas, todo esto englobándose en un esquema de ensayos éticos sin el uso de muestras de sangre de personas, que nos lleve a un estudio en laboratorio de la oximetría de pulso por componentes.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Principal

Realizar mediciones de oximetría fraccional en un sistema in vitro, considerando tres tipos de hemoglobina; oxihemoglobina, desoxihemoglobina y metahemoglobina, tratando de entender su contribución en la medición de saturación de oxígeno con el fin de realizar cálculos de oximetría por componentes considerando un estado de salud normal y con alteraciones.

1.2.2 Objetivos Secundarios

- Simular la transmisión de luz, proponiendo un modelo de piel simplificado considerando dos capas de piel (dermis y epidermis) y una capa de sangre completa (considerada como una suspensión de eritrocitos en plasma, cuyo interior contiene únicamente hemoglobina, compuesta de tres tipos de hemoglobina; HbO₂, RHb y MetHb a diferentes concentraciones), utilizando para su análisis la ley de Beer-Lambert tradicional para medios homogéneos utilizada en los cálculos de oximetría convencional, comparando resultados con dos extensiones de la ley de Beer-Lambert en los que se considera además de la absorción, el esparcimiento de luz.
- Analizar la absorción de luz de tres distintas formas de hemoglobina: HbO₂, RHb y MetHb, caracterizando sus espectros de absorción en la región VIS - NIR.
- Seleccionar las longitudes de onda adecuadas para la cuantificación de las distintas hemoglobinas, mediante un método de análisis espectral multivariable.
- Obtener la saturación de oxígeno con el método fraccional a partir de un experimento sintético, utilizando hemoglobina liofilizada y reacciones químicas para inducir las formas de hemoglobina; HbO₂, RHb y MetHb. Se simulará el caso de niveles normales de hemoglobina y con alteraciones reportadas en la literatura.

CAPÍTULO 2

Oximetría de pulso

2.1 Oximetría de pulso desde el punto de vista fisiológico (transporte de oxígeno)

La sangre es un fluido que circula por nuestro cuerpo a través del corazón, pulmones, arterias, venas y capilares está compuesta principalmente por una solución acuosa conocida como plasma que ocupa entre el 55% y el 65% de la sangre total, el 45% restante contiene una serie de células especializadas, en su mayoría se encuentran las células conocidas como glóbulos rojos o eritrocitos. [7] [8]

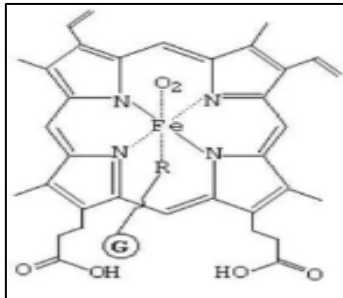


Figura 6. Estructura química de la HbO_2 . [64]

En el interior de los glóbulos rojos se encuentran las moléculas de hemoglobina (Hb) que poseen un color rojo característico. Molecularmente están compuestas de un grupo proteico llamado “globina” que se encuentra rodeada por cuatro compuestos llamados “hemo”, cada uno de los grupos hemo contiene un átomo de hierro que se une al oxígeno (Figura 6). [9]

De este modo, la hemoglobina se encarga del transporte de oxígeno a través del cuerpo, que está regulado fundamentalmente por dos sistemas; el sistema respiratorio y el sistema circulatorio.



Figura 7. Transformación de Hemoglobina a HbO_2 y RHb . [60].

Fisiológicamente cuando el oxígeno ingresa a los pulmones pasa al torrente sanguíneo y se adhiere a las moléculas de hemoglobina creando lo que se conoce como hemoglobina oxigenada u oxihemoglobina (HbO_2) tornándose de un color rojo brillante. De este modo, la HbO_2 se transporta a través de la sangre arterial desde

los alveolos³ pulmonares hacia los tejidos celulares, liberando por un lado oxígeno a los tejidos, dando lugar a la creación de hemoglobina desoxigenada o desoxihemoglobina (RHb) cambiando su color a un azul violáceo, además recoge el dióxido de carbono producto del metabolismo de los tejidos, retornando por la vía venosa a la circulación pulmonar, realizando un intercambio gaseoso expulsando el dióxido de carbono y uniéndose nuevamente al oxígeno (*Figura 7*). Este proceso de oxigenación y desoxigenación se da de manera natural como parte de los procesos de sístole-diástole dentro del ciclo cardíaco.

Es posible formar derivados de hemoglobinas dependiendo de su unión con otras moléculas, estas hemoglobinas son conocidas como dishemoglobinas que no son transportadoras de oxígeno, existen de manera normal en la sangre a bajas concentraciones, pero bajo ciertas condiciones aumentan su concentración impidiendo la correcta oxigenación de la sangre a través del cuerpo, se tienen principalmente:

- **Carboxihemoglobina (COHb)**

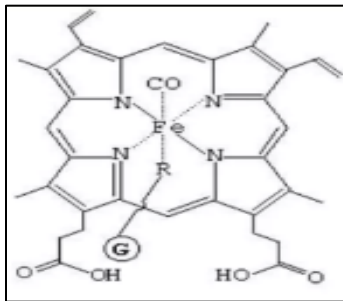


Figura 8. Estructura química de la COHb. [64]

En condiciones normales debido al proceso de oxigenación, la COHb se encuentra a una concentración del 0 al 2%, sin embargo, esta concentración puede aumentar cuando una persona se encuentra expuesta a grandes cantidades de monóxido de carbono (CO). Dependiendo de este aumento en concentración se desencadenan una serie de síntomas que van empeorando, causando complicaciones en el estado de salud de las personas (*Tabla 1*). [10] [11]

El CO es un gas incoloro, no irritante, inodoro e insípido que se produce por la combustión incompleta de hidrocarburos como carbón y gas (butano, propano); habitualmente podemos encontrar cantidades de CO de forma natural en la atmósfera, aunque las principales fuentes de emisión provienen del humo del cigarrillo y aparatos que funcionan con gas, gasolina o quema de madera. La acumulación en espacios cerrados o parcialmente cerrados es posible y puede causar intoxicación al ser inhalado, pero en grandes cantidades puede ser mortal [12].

Cuando se inhala CO éste entra al torrente sanguíneo uniéndose con mayor afinidad que el oxígeno a las moléculas de hemoglobina, es decir, desplaza al oxígeno para tomar su lugar, formando a la COHb (*Figura 8*) [11] [13] [14]. Cuando las personas sufren intoxicación por CO se crea una disminución de transporte de oxígeno a los tejidos, llegando incluso a generar hipoxia.

Es importante mencionar que no existe ninguna forma de depuración del CO del organismo, aparte de la expulsión fisiológica por la espiración, el único antídoto para la reducción de los niveles de COHb es la administración de oxígeno normobárico (NBO) es el tratamiento utilizado en la mayoría de los servicios de urgencias, se administra hasta que los pacientes ya no presentan síntomas y se normalización sus niveles, siendo dados de alta sin seguimiento posterior. [15] [16]

³ **Alveolos:** Lugar donde los pulmones y el torrente sanguíneo intercambian dióxido de carbono y oxígeno.

Tabla 1. Síntomas asociados al aumento en concentración de COHb y Methb en el torrente sanguíneo [10] [15]

COHb (%)	Síntomas
0-2	Niveles normales en no fumadores
5-6	Niveles normales en fumadores de tabaco
10-20	Dolor de cabeza y fatiga
20-30	Severo dolor de cabeza, náusea, vómito, mareo, visión borrosa, fatiga
30-40	Náusea, vómito, fatiga, aumento del corazón y el rango respiratorio, deterioro neurológico.
40-60	Coma, convulsiones, depresión cardiorrespiratoria
60-70	Coma convulsiones, depresión cardiorrespiratoria, bradicardia e hipotensión severa
>70	Falla respiratoria y muerte

- **Metahemoglobina (MetHb)**

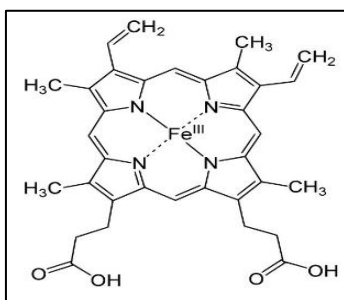


Figura 9. Estructura química de la Methb. [66]

La metahemoglobina es una forma oxidada de la hemoglobina que se produce cuando el ion ferroso del grupo hemo de los hematíes (eritrocitos) se oxida superando los mecanismos reductores de protección (como el sistema enzimático de reducción, compuesto por NADPH-MHb reductasa y el citocromo b5 reductasa), pasando de su estado ferroso (Fe²⁺) al estado férrico (Fe³⁺), produciendo una incapacidad de la hemoglobina para transportar oxígeno y dióxido de carbono (Figura 9). [17]

Esta oxidación ocurre de manera constante en el organismo, revirtiéndose normalmente gracias a la acción de los mecanismos reductores de protección, en condiciones sanas de salud para un adulto la metahemoglobina se encuentra a una concentración del 1%, sin embargo, ciertos factores que pueden propiciar un aumento en la concentración de metahemoglobina produciendo una condición que se conoce como metahemoglobinemia, en la cual la coloración de la sangre se torna rojo oscuro, chocolate o azulado y a diferencia de la desoxihemoglobina, este no cambia con la adición de oxígeno. [17] [18]

La metahemoglobinemia puede presentarse de dos formas [17]

1.- **Metahemoglobinemia congénita;** Producida por una deficiencia de citocromo-b5 reductasa (enzima en la sangre que controla la cantidad de hierro en los glóbulos rojos y ayuda a las células a transportar la cantidad

normal de oxígeno.) en los glóbulos rojos o en otros tejidos. Deficiencia que se presentan en condiciones médicas como; Anemia falciforme (crisis) o Insuficiencia cardíaca.

2.- **Metahemoglobinemia adquirida;** Es más frecuente y suele ocurrir por ingesta de medicamentos (como anestésicos locales, antimicrobianos o analgésicos) así como exposición a sustancias químicas (químicos industriales).

Estas condiciones pueden hacer que la concentración de metahemoglobina aumente a porcentajes potencialmente peligrosos desencadenando una serie de síntomas que van empeorando, llegando a causar problemas graves en el estado de salud de las personas e incluso la muerte, como se ilustra en la (Tabla 2).

En cuanto al tratamiento médico, el antídoto que debe aplicarse depende del nivel de intoxicación [17];

- **Personas con valores de Methb entre 10-20%:** si la causa es por ingesta de un agente o fármaco, para disminuir su absorción, se puede utilizar carbón activado, en dosis de 1 g/kg/dosis vía oral o por sonda nasogástrica y repitiendo la dosis cada seis horas, de acuerdo con la evolución, suministrando oxígeno al 100%.
- **Personas con valores de Methb < 20%:** se ha reportado que puede administrarse ácido ascórbico como tratamiento inicial, algunos autores indican que administrado a dosis altas de 50-100 mg/kg/día, cada 6 u 8 horas, actúa en forma rápida, eficaz y segura. Es considerado un fármaco seguro y con pocos efectos colaterales, siendo un agente reductor no enzimático.
- **Personas sintomáticas o con valores de Methb > 30%:** Se aplica específicamente azul de metileno y se emplea a 1-2 mg/kg/dosis en una dilución al 1% o 2% por vía endovenosa en infusión durante 3-5 minutos. Sus efectos deben observarse dentro de la primera hora de administración.

Tabla 2. Síntomas asociados al aumento en concentración de COHb y Methb en el torrente sanguíneo [17].

Methb (%)	Síntomas
<10	<i>Ausencia de síntomas</i>
10-20	<i>Cianosis, color achocolatado en la sangre</i>
20-30	<i>Ansiedad, mareos, cefalea, taquicardia</i>
30-50	<i>Fatiga, vértigo, confusión, taquipnea, taquicardia.</i>
50-70	<i>Coma, convulsiones, arritmias, acidosis</i>
>70	<i>Muerte</i>

2.2 Propiedades ópticas de las hemoglobinas transportadoras de oxígeno y las dishemoglobinas.

La hemoglobina es un cromóforo natural que, al ser irradiada con luz a longitudes de onda específicas presenta características de absorción óptica particulares. Específicamente la HbO₂ y la RHb, presentan absorciones ópticas distintas en el rango UV-VIS e NIR (Figura 10), por su parte, la HbO₂ muestra una mayor extinción en el rango NIR aprox. de 850-1000 nm, mientras que la RHb tiene una mayor extinción de luz en el rango visible aprox. de 600-700 nm, además se presenta un punto isobéptico de igual extinción a 805 nm a partir del cual se observa cómo se invierten estas condiciones de absorción óptica en las hemoglobinas. [19]

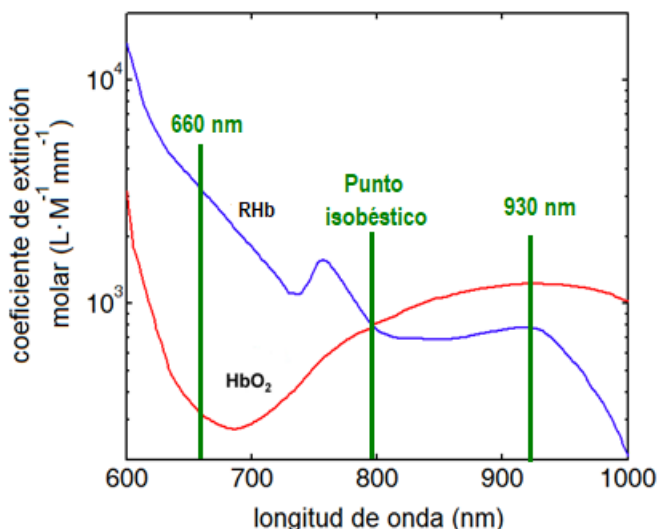


Figura 10. Coeficiente de extinción molar de HbO₂ y RHb. [63]

Estas características de absorción óptica tan distintas en las hemoglobinas HbO₂ y RHb son aprovechadas por los oxímetros de pulso convencionales para realizar una estimación cuantitativa de la saturación de oxígeno en sangre aplicando principios físicos de transmisión o reflexión óptica según sea el caso de interés.

Sin embargo, estas hemoglobinas no son las únicas con absorciones ópticas en esta región espectral, también se tiene a las dishemoglobinas COHb y MetHb. Como puede observarse en la (Figura 12), la COHb en $\lambda=660$ nm tiene un coeficiente de extinción similar a la HbO₂, por el contrario, la MetHb posee un coeficiente de extinción bastante similar a la RHb a $\lambda=660$ nm, mientras que a $\lambda=930$ nm su coeficiente de extinción es mucho mayor que el de las otras hemoglobinas.

En personas sanas las dishemoglobinas se encuentran en la sangre a bajas concentraciones (del 0 al 2% para la COHB y del 1% para la MetHb) y la estimación de SpO₂ se puede resolver sin problemas mediante la técnica de oximetría convencional (como se verá en la sección 2.4), sin embargo, estas dishemoglobinas aumentan sus concentraciones gradualmente (Tabla 1) cuando las personas se encuentran expuestas a situaciones particulares como las que se han expuesto en la sección 2.1.

De este modo a medida que las concentraciones aumentan la oximetría convencional ya no es suficiente y las mediciones de SpO₂ muestran deficiencias, dado que, como se observó en la *Figura 11* las dishemoglobinas poseen absorciones ópticas que se encuentran en el mismo rango de longitudes de onda que utilizan los oxímetros de pulso convencionales, razón por la que el incremento en la concentración de la MetHb y COHb comienza a enmascarar la extinción de luz de la HbO₂ y la RHb, haciendo que las mediciones de SpO₂ muestren valores erróneos. [20] [21]

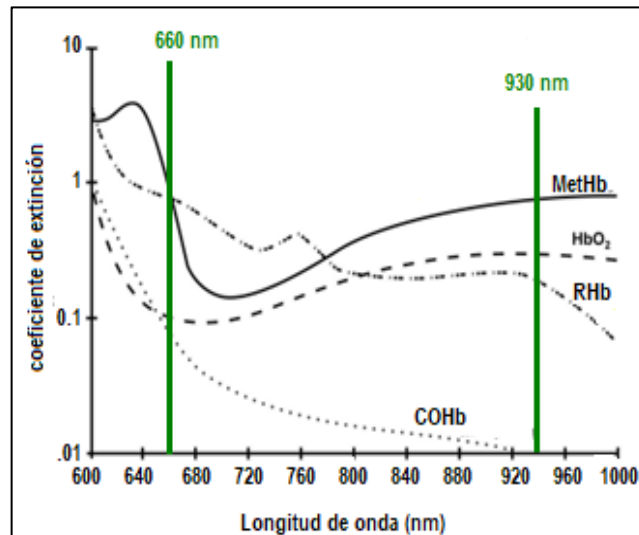


Figura 11. Coeficiente de extinción correspondientes a cada hemoglobina, en función de la longitud de onda. [20]

2.3 Oximetría de dos componentes: Saturación de oxígeno funcional

La saturación de oxígeno funcional (SpO_2) es un cálculo que representa el porcentaje de oxígeno que está siendo transportado a través de la circulación sanguínea por todo el cuerpo, toma en cuenta únicamente las *hemoglobinas funcionales*, es decir, aquellas que son capaces de transportar oxígeno, de este modo, la saturación de oxígeno es un concepto que se define en función de las concentraciones de HbO₂ y RHb, véase la ecuación (1).

$$SpO_2(\%) = \frac{C_{HbO_2}}{C_{Hb}} = \frac{C_{HbO_2}}{C_{HbO_2} + C_{RHb}} \times 100\%, \dots (1)$$

donde C_{Hb} es la concentración de la hemoglobina total, C_{HbO_2} y C_{RHb} son las concentraciones de HbO₂ y RHb respectivamente.

Para llevar a cabo las mediciones de SpO₂ en personas, la oximetría de pulso se basa en los principios de la fotopleletismografía, de la siguiente manera;

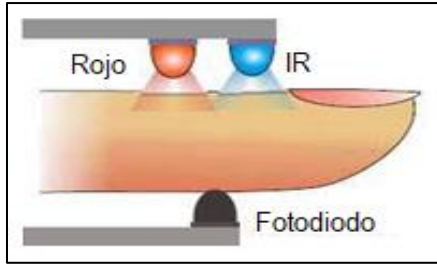


Figura 12. Medición de oximetría [4]

- Se realiza una selección de dos longitudes de onda situados antes y después del punto isobéptico, aproximadamente a 660 nm (VIS) y 930 nm (NIR), se hace incidir esta luz a través del dedo y la intensidad de luz transmitida será detectada por el fotodiodo (Figura 12).

- Se obtendrán dos señales debidas a los estados de sistole y diástole producto del ciclo de oxigenación en el cuerpo; una de componente pulsátil variable en el tiempo (AC) debida a los componentes absorbentes pulsátiles de la sangre arterial (HbO₂ y RHb) y una componente constante (DC) debida a los absorbentes no pulsátiles como la pigmentación de la piel, los huesos y los tejidos (Figura 13). [22]

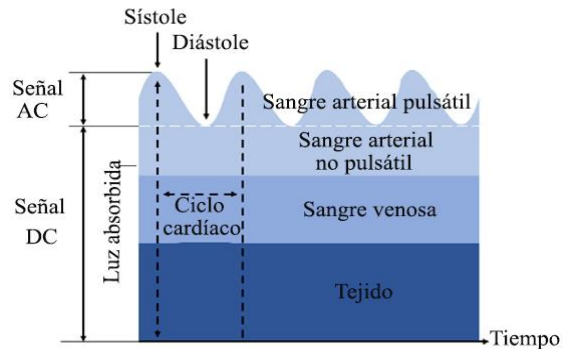


Figura 13. Señal pleetismográfica. [67]

- Posteriormente, se miden las intensidades transmitidas de dichas componentes y se establece una relación entre las mismas, que es conocida como la "Relación de Relaciones" (RR) y se muestra en la ecuación (2):

$$RR \approx \frac{\ln\left(\frac{I_{T\ VIS,S}}{I_{T\ VIS,d}}\right)}{\ln\left(\frac{I_{T\ IR,S}}{I_{T\ IR,d}}\right)}, \dots (2)$$

donde $I_{T\ VIS,S}$ e $I_{T\ VIS,d}$ son las intensidades transmitidas en los estados de sistole y diástole en la longitud de onda VIS y $I_{T\ IR,S}$ e $sI_{T\ IR,d}$ las intensidades transmitidas en el rango IR para ambos estados.

- Finalmente, para la estimación de la SpO₂ se hace uso de la ecuación (3):

$$SpO_2 = \frac{RR(\epsilon_{RHb, NIR}) - (\epsilon_{RHb VIS})}{RR[(\epsilon_{RHb,NIR}) - (\epsilon_{HbO_2,NIR})] + (\epsilon_{HbO_2, NIR}) - (\epsilon_{RHb, NIR})} \dots (3)$$

donde $\epsilon_{RHb,NIR}$ y $\epsilon_{RHb,VIS}$ son los coeficientes de extinción de la RHb en las longitudes de onda conocidas para el NIR y el VIS respectivamente, mientras que $\epsilon_{HbO_2,NIR}$ y $\epsilon_{HbO_2,VIS}$ son los coeficientes de extinción de la HbO₂ para las mismas longitudes de onda, respectivamente. [23]

En individuos sanos de acuerdo con la OMS, los valores normales de este parámetro son del 96% o mayores, mientras que un registro inferior al 92% puede ser indicativo del inicio de una mala oxigenación llevando a problemas de salud que pueden provocar una insuficiencia respiratoria que puede poner en peligro la vida. [1]

2.4 Oximetría de varios componentes: Saturación de oxígeno fraccional

Los estudios en torno a la oximetría llevan realizándose desde hace muchos años, pero la atención en la técnica utilizada para la estimación de SpO₂ fue mayor durante la pandemia por Covid-19 ya que uno de los signos que se convirtió en factor importante de monitorización del estado de salud en las personas fue la oxigenación de la sangre, no solo en hospitales sino también en los domicilios.

La medición de SpO₂ en personas fuera de condiciones sanas llevo a problemas con la técnica convencional para el cálculo de la saturación de oxígeno que empezaron a ser más evidentes, como; variaciones de las mediciones y deficiencias en la medición. Son diversas las causas por las que las estimaciones de SpO₂ arrojan valores erróneos, entre ellas, se tiene la aparición de un incremento en las dishemoglobinas COHb y MetHb, problema al que se presta especial atención en este trabajo.

Como se ha visto en la sección 2.4, el cálculo de la saturación de oxígeno de forma convencional se realiza asumiendo la presencia de solo dos absorbentes de luz en la sangre; HbO₂ y RHb. Sin embargo, en la región espectral VIS-NIR existen otros componentes absorbentes de luz que influyen en las mediciones de oxigenación, como son las dishemoglobinas COHb y MetHb, haciendo que la oximetría convencional ya no sea suficiente empezando a sobreestimar las mediciones.

A partir de esta problemática, surge la necesidad de implementar una técnica más completa para el estudio de la saturación de oxígeno, en la que se incluyan para sus cálculos no solo a las hemoglobinas funcionales sino también a las dishemoglobinas, con este propósito se hace una reformulación de la ecuación (1), en la que la hemoglobina total está conformada por cuatro componentes que son HbO₂, RHb, COHb y MetHb, llegando a una nueva expresión para el cálculo de la saturación de oxígeno, ilustrada en la ecuación (3);

$$SpO_2(\%) = \frac{C_{HbO_2}}{C_{Hb}} = \frac{C_{HbO_2}}{C_{HbO_2} + C_{RHb} + C_{COHb} + C_{MetHb}} \times 100\% , \dots (3)$$

donde C_{Hb} es la concentración de la hemoglobina total, C_{HbO_2} , C_{RHb} , C_{COHb} y C_{MetHb} son las concentraciones de HbO₂ RHb, COHb y MetHb respectivamente.

Es importante mencionar que las mediciones de la saturación de oxígeno en los pulsioxímetros se toman en función de la saturación parcial de oxígeno (SpO_2), esto significa que estas mediciones se realizan en función de una señal pulsátil y no pulsátil, obtenidas de los ciclos de sístole-diástole producto de la respiración. Sin embargo, existe otra manera de estimar la saturación de oxígeno realizando mediciones directas in vitro a partir de muestras de sangre arterial, cuando se usa este método se dice que se está obteniendo la saturación arterial de oxígeno (SaO_2).

La ecuación (3) es aplicable tanto para mediciones de SaO_2 como de SpO_2 , sin embargo, para éstas últimas sería necesario agregar una nueva componente (RR), parecida a la que se tiene en la ecuación (2) de la sección 2.4.

Dado que en este proyecto no se realizan mediciones en personas y por el contrario se hacen mediciones in vitro en el laboratorio apoyados de muestras sintéticas de sangre a partir de hemoglobina liofilizada, los cálculos de saturación de oxígeno serán presentados como resultados de estimaciones de SaO_2 , intentando llegar a una primera medición de oximetría por componentes.

CAPÍTULO 3

Modelado óptico de la piel.

3.1 Interacción luz-tejido biológico

La piel es un tejido biológico que podemos considerar como un sistema multicapa, compuesto por la epidermis, dermis e hipodermis (*Figura 14*), cada una de estas capas a su vez está conformada por otros componentes, que poseen diferente tamaño, forma, densidad e índice de refracción, características que contribuyen a que la piel presente un alto grado de inhomogeneidad. [24]

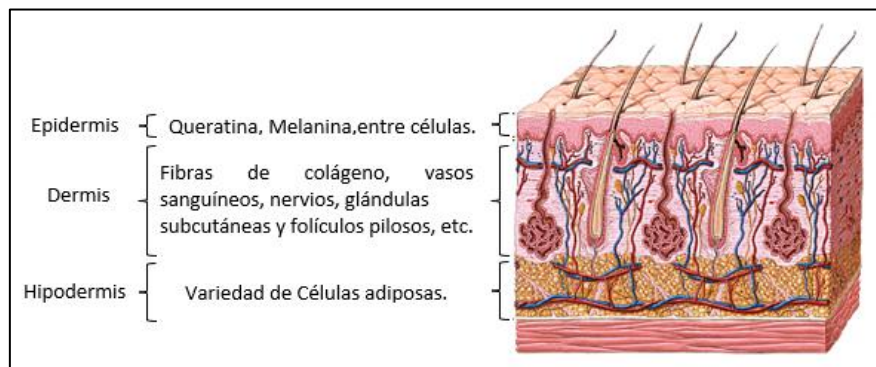


Figura 14. Capas de la piel [61]

Dada ésta inhomogeneidad, el estudio de la interacción de luz con piel resulta complejo porque se presentan principalmente cuatro fenómenos ópticos; reflexión, transmisión, absorción y esparcimiento. Estos procesos se dan cómo se detalla a continuación; cuando se hace incidir luz sobre el tejido, en principio una parte de esta luz incidente será reflejada producto de la diferencia de índices de refracción entre el aire y la piel, los fotones que logran atravesar la piel serán absorbidos o esparcidos por el medio múltiples veces. Finalmente, la luz que sufrió múltiples eventos de esparcimiento puede ser transmitida o reflejada en la interfase de salida. [25]

Es importante mencionar que los fenómenos físicos que ocurrirán dependerán de la intensidad y la longitud de onda incidente de la fuente utilizada, así como de los componentes de la piel con los que interactúe. Por ejemplo, en la medicina la región espectral en el UVIS-NIR, mejor conocida como “ventana terapéutica” es la más utilizada, en particular para las mediciones de oximetría de pulso ya que la hemoglobina de la sangre es un fuerte absorbente en este rango y el coeficiente de absorción (μ_a) de este medio es moderado.

Las propiedades ópticas que describen la propagación de luz en el tejido son el coeficiente de absorción (μ_a) y esparcimiento (μ_s). [26]

3.2 Coeficiente de absorción (μ_a)

Una forma de medir la cantidad de luz absorbida es mediante el coeficiente de absorción (μ_a) el cual se define como la probabilidad de que un fotón sea absorbido en un medio por unidad de longitud (camino recorrido por el fotón) [27] y depende de la concentración descrita como densidad de volumen de los cromóforos absorbentes del tejido biológico ρ_a (ya sea la hemoglobina, la melanina, el agua, etc.), se expresa mediante la siguiente ecuación;

$$\mu_a = \rho_a \sigma_a \text{ [cm}^{-1}\text{]}, \dots (4)$$

dónde σ_a es la sección transversal de absorción.

Dada la dificultad de entender la interacción de la luz con el tejido biológico, con frecuencia se recurre a su simplificación, considerando algunas de sus estructuras idealmente como partículas esféricas distribuidas homogéneamente. [28]

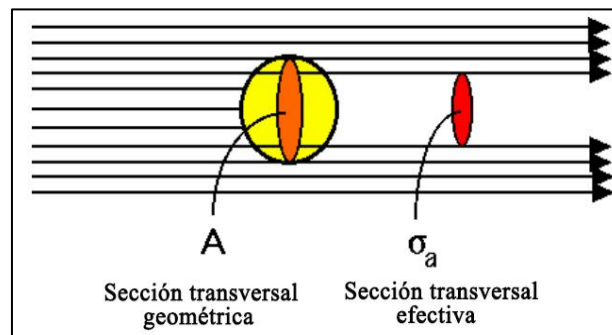


Figura 15. Sección transversal de absorción. [29]

Por ejemplo, si hablamos de luz absorbida, se considerará a los cromóforos como una esfera con un tamaño geométrico determinado A [cm^2], dicha esfera bloqueará la luz incidente y proyectará una sombra, lo que constituye una absorción (Figura 15) [29].

El tamaño de la sombra de absorción es lo que se denomina sección transversal efectiva o sección transversal de absorción σ_a y puede ser menor o mayor que el tamaño geométrico de la partícula esférica, relacionado por la constante de proporcionalidad denominada eficiencia de absorción Q_a . Así, la σ_a se expresa mediante la siguiente ecuación;

$$\sigma_a = Q_a A \text{ [cm}^2\text{]}, \dots (5)$$

3.3 Coeficiente de esparcimiento (μ_s)

El esparcimiento de la luz resulta de una interacción compleja entre la onda electromagnética incidente y la estructura molecular/atómica del medio. Cuando un rayo de luz incidente encuentra un obstáculo como una partícula de esparcimiento, existe una redirección de esta, a medida que la onda electromagnética interactúa

con la partícula discreta las órbitas de los electrones dentro de las moléculas constituyentes de la partícula son perturbadas periódicamente con la misma frecuencia (ν_0) que el campo eléctrico de la onda incidente. La perturbación de la nube de electrones da lugar a una separación periódica de la carga dentro de la molécula, que se denomina momento dipolar inducido, este se manifiesta como una fuente de radiación electromagnética, dando lugar al esparcimiento de la luz [30].

El esparcimiento de luz a través del tejido biológico se debe a la presencia de componentes con diferentes índices de refracción que provocan el cambio de dirección de la luz. Así, el coeficiente de esparcimiento (μ_s) se define como la probabilidad de que un fotón sea esparcido en el medio por unidad de longitud (camino recorrido por el fotón) [27], describe un medio que contiene muchas partículas de dispersión en una concentración descrita como una densidad de volumen ρ_s . El (μ_s) se expresa mediante la siguiente ecuación;

$$\mu_s = \rho_s \sigma_s [cm^{-1}], \dots (6)$$

dónde σ_s es la sección transversal de esparcimiento.

Al igual que en la sección 2.2, para obtener la sección transversal de esparcimiento, se idealiza una partícula esférica con un tamaño geométrico determinado A [cm^2]. La diferencia es que se tratará de una esfera esparcidora que redirige los fotones incidentes hacia nuevas direcciones e impide así la transmisión hacia delante, proyectando así una sombra, que constituye la dispersión (Figura 16). [31]

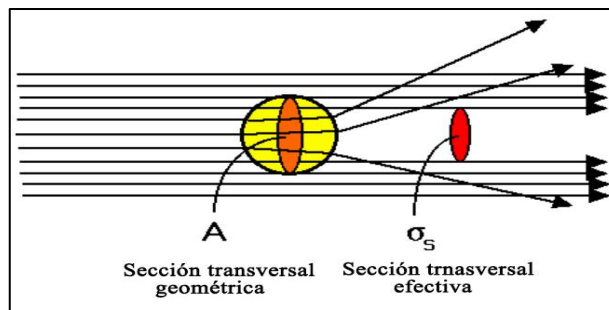


Figura 16. Sección transversal de esparcimiento. [31]

El tamaño de la sombra de dispersión se denomina sección transversal efectiva o sección transversal de esparcimiento σ_s y puede ser menor o mayor que el tamaño geométrico de la partícula de dispersión, relacionado por la constante de proporcionalidad denominada eficiencia de dispersión Q_s .

Así, la σ_s se expresa mediante la siguiente ecuación;

$$\sigma_s = Q_s A [cm^2], \dots (7)$$

dónde Q_s es la eficiencia de esparcimiento y A es el tamaño de la partícula.

Existen dos teorías que explican el esparcimiento de luz y se basan en la solución de las ecuaciones de Maxwell para un obstáculo esférico homogéneo con excitación de onda plana (Apéndice I); la primera de ellas

es la teoría de esparcimiento de Rayleigh (llamada así en honor a Lord Rayleigh), describe el esparcimiento de la radiación electromagnética por partículas esféricas no absorbentes dieléctricas que son mucho más pequeñas que la longitud de onda de excitación y la otra es la teoría de MIE (en honor a Gustav Mie, 1908), que es una teoría físico-matemática más completa para el esparcimiento de luz de partículas esféricas (absorbentes o no absorbentes), siendo una teoría válida para partículas esféricas dieléctricas de dispersión grandes y pequeñas. Sus formulaciones funcionan mejor en tamaños de partículas que son comparables a la longitud de onda de la luz, en lugar de mucho más pequeñas o mucho más grandes [30] [32].

La teoría de Mie puede utilizarse para describir la mayoría de los sistemas de dispersión de partículas esféricas, incluida la dispersión de Rayleigh. Sin embargo, en general se prefiere la teoría de dispersión de Rayleigh, en caso de ser aplicable, debido a la complejidad de las formulaciones de la dispersión de Mie.

3.4 Ley de Beer-Lambert para un modelo de piel multicapa

➤ Ley de Beer-Lambert clásica (BL_{μ_a})

La ley de Beer-Lambert clásica, de manera formal, establece una relación entre la absorción de luz de un medio homogéneo y las propiedades ópticas del mismo, donde la intensidad de luz incidente I_0 que viaja a través del medio experimentará una atenuación exponencial dependiente de la distancia [33]. Esta ley está definida mediante la siguiente ecuación:

$$I = I_0 e^{-\mu_a(\lambda)CL}, \dots (8)$$

donde I es la intensidad de la luz absorbida por el medio, I_0 es la intensidad de la luz incidente, μ_a es el coeficiente de absorción del medio (o el coeficiente de extinción según sea el caso), que depende de la longitud de onda λ en nm, C es la concentración molar de la sustancia absorbente en el medio que es constante y L es la longitud de camino recorrido por la luz en cm.

Esta formulación se basa en el principio de transmitancia que indica que la suma de las intensidades de la luz transmitida I_T y absorbida I es igual a la intensidad de la luz incidente I_0 , se define como;

$$T = \frac{I}{I_0} = e^{-\mu_a(\lambda)CL} \dots (9)$$

A partir de la ecuación (9) se puede definir la absorbancia óptica no dispersada total o también conocida como la densidad óptica del medio (A), ilustrada en la ecuación (10);

$$A = -\ln(T) = \mu_a(\lambda)CL \dots (10)$$

Cuando se está frente a un medio que posee más de un componente absorbente, la absorbancia total se expresa como la suma de las absorbancias individuales de los componentes que posea el medio, esto se muestra en la ecuación (11);

$$A = \mu_{a1}(\lambda)C_1L + \mu_{a2}(\lambda)C_2L + \mu_{a3}(\lambda)C_3L + \dots + \mu_{an}(\lambda)C_n \dots (11)$$

Como puede observarse en la ecuación (11), la ley de Beer- Lambert permite conocer las concentraciones de todos los componentes que posea el medio, siempre y cuando se conozcan sus absorciones y coeficientes de absorción (o el coeficiente de extinción según sea el caso) respectivos a longitudes de onda determinadas.

En la oximetría convencional y fraccional se utiliza la ley de Beer-Lambert para estudiar la transmisión de luz en un modelo de piel multicapa simplificado que se considera homogéneo, tomando en cuenta solamente los procesos de absorción de las hemoglobinas en la sangre. Sin embargo, es una modelación idealizada bastante alejada de la realidad pues es bien sabido que el tejido biológico es inhomogéneo compuesto por medios de formas irregulares con distintos índices de refracción y densidades, por ende, también se dan lugar otros fenómenos ópticos de importancia como; la reflexión, la dispersión y el esparcimiento, mostrando que la absorción de luz no varía únicamente en función de la concentración de hemoglobina o de la longitud de camino recorrido por la luz. [34]

Las limitaciones de la ley Beer-Lambert ponen sobre la mesa ciertas hipótesis por ejemplo, que es probable que sea un error la interpretación de la transmisión de luz con una ley de medios homogéneos en un medio que es claramente inhomogéneo (en el campo de la oximetría el medio biológico estudiado sería la sangre que es un líquido compuesto por proteínas y diferentes células), de ahí la importancia de proponer modelos más reales donde se muestre el paso de la luz a través de un medio biológico basándose en otros fenómenos además de la absorción.

En este trabajo de tesis se propone añadir la consideración del esparcimiento producido por la presencia de los glóbulos rojos en la sangre y para llevar a cabo el análisis de la transmisión de luz se proponen dos modelos que se pueden considerar extensiones de la ley de Beer-Lambert. Estos modelos se presentan a continuación;

➤ **Modelo extendido de Beer-Lambert para una suspensión de partículas absorbentes (BL_{σ_a})**

Este modelo es una formulación propuesta en el libro de Bören-Huffman [35], de una modificación de la ley de Beer-Lambert. Este modelo aplica para medios no homogéneos, considerando el coeficiente de absorción del medio que se expresa en términos de la densidad y la sección transversal de absorción. Se define como;

$$I_{\sigma_a} = I_0 e^{-\rho\sigma_a(\lambda)d}, \dots (12)$$

donde ρ es el número de partículas por volumen de la sustancia absorbente, $\sigma_a(\lambda)$ es la sección transversal de absorción y d es la longitud del camino recorrido por el haz de luz a través del medio.

➤ **Modelo extendido de Beer-Lambert para una suspensión de partículas absorbentes que producen esparcimiento ($BL_{\sigma_a\sigma_s}$)**

Este modelo es un precursor de la denominada ley de Lambert-Beer modificada, es una aproximación realizada por Twersky [36]. Este modelo considera un medio inhomogéneo formado por una suspensión de

partículas que producen esparcimiento, se define como;

$$I_{\sigma_a \sigma_s} \approx I_0 e^{-\gamma d} [e^{\beta d} + q(\alpha)(1 - e^{-\beta d})], \dots \quad (13) \quad \text{Con } 0 < q(\alpha) < 1$$

donde $\gamma = \Gamma\omega$ y $\beta = B\omega(1 - \omega)$, y a su vez $\Gamma \approx \frac{\sigma_a}{v}$, $B \approx \frac{\sigma_s}{v}$ y $\omega \approx \rho v$, en donde σ_a y σ_s son las secciones transversales de absorción y esparcimiento respectivamente, v es el volumen de una partícula y ρ es la densidad de partículas por volumen de la sustancia absorbente, el factor $q(\alpha)$ es el área de la sección transversal de absorción con la que es iluminado el colector, esto es $q(\alpha) = \frac{\sigma(\alpha)}{\sigma}$, en donde $\sigma \approx \sigma_s$ y d es la longitud del camino recorrido por el haz de luz a través del medio.

La Ley de Beer-Lambert clásica y los tres modelos matemáticos expuestos anteriormente fueron aplicados a una primera propuesta de un modelo de piel multicapa simplificado para realizar un análisis de la luz transmitida, el procedimiento y análisis se explican a detalle en la sección 3.5.

3.5 Modelo de piel multicapa. Transmisión de luz en piel

El modelo de piel simplificado fue tomado del trabajo publicado por nuestro grupo de trabajo [37] en la que se aplica un análisis de la luz transmitida en función de los tres modelos de la ley de Beer-Lambert antes mencionados, dicho análisis está orientado a la oximetría convencional, en la que sólo se considera la presencia de HbO₂ y RHb. En este trabajo de tesis se utiliza la misma metodología de análisis y se extiende el estudio para la aplicación a la oximetría fraccional, en la que además de considerar HbO₂ y RHb, se añadirá la dishemoglobina MetHb.

El modelo de piel propuesto se ilustra en la *Figura 17*, está conformado por dos capas de piel (dermis y epidermis que se consideran como capas homogéneas), así como de un vaso sanguíneo en cuyo interior se tiene una capa de sangre completa, simulada como una suspensión de eritrocitos en plasma. Los eritrocitos se suponen esféricos y solo con hemoglobina en su interior, la concentración total de hemoglobina (C_{Hb}) estará formada por tres hemoglobinas; HbO₂, RHb y MetHb, en diferentes concentraciones según el caso a estudiar,

Los valores de referencia para realizar esta simulación como son; índices de refracción (n) de todos los medios, así como sus respectivos anchos de capa (d), peso molecular y densidades (ρ), fueron obtenidos de la literatura y se muestran en la *Tabla 3*.

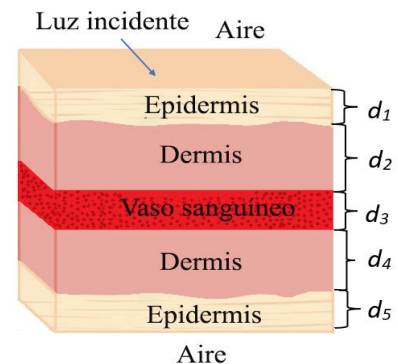


Figura 17. Modelo de piel multicapa propuesto. [37]

Tabla 3. Características de los elementos utilizados en el modelo

Capa	Referencias de consulta	Índices de refracción (n)	Anchos de capa (μm)	Peso molecular (M)	Densidad (ρ) (g/dl)
Epidermis	[38] [33]	1.43	50	---	---
Dermis	[38] [39]	1.43	600	---	---
Plasma	[40] [41] [42]	1.35	----	59450	1025
Eritrocitos	[43] [44] [42]	1.40	5	64500	340
Vaso sanguíneo (arteriola)	[45]	---	18	---	---

La concentración total de hemoglobina (C_{Hb}) propuesta en el modelo de piel, irá acorde con el cálculo de la saturación arterial de oxígeno fraccional;

$$SaO_2 = \frac{C_{HbO_2}}{C_{Hb}} = \frac{C_{HbO_2}}{C_{HbO_2} + C_{RHb} + C_{MetHb}}, \dots (14)$$

donde, C_{HbO_2} , C_{RHb} y C_{MetHb} son las concentraciones correspondientes a HbO₂, RHb y MetHb, respectivamente.

Considerando lo anterior se calculó el coeficiente de absorción μ_{atot} correspondiente a C_{Hb} de la siguiente manera:

$$\mu_{atot} = \mu_{HbO_2} C_{HbO_2} + \mu_a C_{RHb} + \mu_a C_{MetHb}, \dots (15),$$

donde, μ_{HbO_2} , μ_{RHb} y μ_{MetHb} , son los coeficientes de absorción de la HbO₂, RHb y MetHb respectivamente.

Ahora bien, los modelos extendidos de Beer-Lambert consideran en sus cálculos la sección transversal de absorción y esparcimiento de las partículas, por ende, las secciones transversales en nuestro modelo se obtuvieron en función de los eritrocitos. Así, para calcular las secciones transversales fue necesario encontrar el índice de refracción complejo (n'') tanto de las partículas (eritrocitos) como del medio (plasma), utilizando la ecuación 16;

$$n'' = n + in', \dots (16)$$

donde n y n' corresponden a la parte real e imaginaria del índice de refracción.

La parte real del índice de refracción para los eritrocitos y el plasma se obtuvo de la literatura (Tabla 3) y la imaginaria para cada componente se calculó mediante la ecuación (17) y (18), obtenida de la referencia [43];

$$n_e' = \log(10) \frac{\lambda}{4\pi M_h} \varepsilon_{ah}(\lambda) HC, \dots (17) \quad \text{y} \quad n_p' = \log(10) \frac{\lambda}{4\pi M_p} \varepsilon_{ap}(\lambda) HC, \dots (18)$$

donde, HC corresponde al hematocrito, M_h y M_p son los valores del peso molecular de la hemoglobina y el plasma respectivamente (Tabla 3), ε_{ah} es el coeficiente de absorción calculado a partir de los espectros de absorción obtenidos para las hemoglobinas experimentales HbO₂, RHb y MetHb (Apéndice I), la metodología

de obtención y la caracterización de estas hemoglobinas se abordan a detalle en el capítulo 4, y finalmente ε_{ap} es el coeficiente de absorción del plasma, obtenido de la literatura.

Una vez calculado el índice de refracción complejo se aplicó la teoría de MIE para obtener el valor de las secciones transversales de absorción y esparcimiento (*Apéndice II*).

3.5.1 Método de análisis de la luz transmitida

En la simulación, por un lado, se analizaron las variaciones de la trayectoria de la luz a una incidencia diferente a la normal, considerando los índices de refracción de las diferentes capas, para ello se utilizó la ley de Snell, ilustrada en la ecuación (19)

$$n_1 \text{sen} \theta_1 = n_2 \text{sen} \theta_2 \dots (19)$$

donde n_1 y n_2 , son los índices de refracción del medio, θ_1 y θ_2 son los ángulos de incidencia y transmisión respectivamente.

Además, se calculó la transmitancia en cada una de las interfaces para una polarización transversal magnética (TE), con el fin de determinar las diferencias en absorción de las mezclas de hemoglobina, esto se hizo con ayuda del coeficiente de transmisión de Fresnel (t_1), ilustrado en la ecuación (20):

$$t_1 = \frac{2n_1 \cos \theta_1}{n_1 \cos \theta_1 + n_2 \cos \theta_2}, \dots (20)$$

Finalmente, a partir de t_1 se calcula la transmitancia del medio T_1 , como se ilustra en la ecuación (21);

$$T_1 = \frac{n_2 \cos \theta_2}{n_1 \cos \theta_1} |t_1|^2, \dots (21)$$

Combinando las ecuaciones (19), (20) y (21), se llegan a las formulaciones que permiten describir el comportamiento de la luz transmitida en el modelo multicapa propuesto, para cada uno de los modelos de la ley de Beer-Lambert aplicados (ecuaciones 8, 12 y 13), dichas ecuaciones se muestran a continuación en la *Tabla 4*;

Tabla 4. Formulaciones que permiten describir el comportamiento de la luz transmitida de acuerdo con el modelo de la ley de Beer-Lambert aplicado.

Modelo de Beer-Lambert clásico (BL_{μ_a})	Modelo de Beer-Lambert para una suspensión de partículas absorbentes (BL_{σ_a})	Modelo de Beer-Lambert para una suspensión de partículas absorbentes con esparcimiento ($BL_{\mu_a \sigma_s}$)
$I_1 = I_0 T_1$	$I_1 = I_0 T_1$	$I_1 = I_0 T_1$
$I_2 = I_1 T_2$	$I_2 = I_1 T_2$	$I_2 = I_1 T_2$
$I_3 = I_2 T_3 e^{-\mu_a H b_T(\lambda) C d}$	$I_3 = I_2 T_3 e^{-\rho \sigma_a(\lambda) d}$	$I_3 = I_2 T_3 e^{-\gamma d} [e^{\beta d} q(\alpha)(1 - e^{-\beta d})]$
$I_4 = I_3 T_4$	$I_4 = I_3 T_4$	$I_4 = I_3 T_4$
$I_5 = I_4 T_5$	$I_5 = I_4 T_5$	$I_5 = I_4 T_5$
$I_6 = I_5 T_6 = I_T$	$I_6 = I_5 T_6 = I_T$	$I_6 = I_5 T_6 = I_T$

En la *Tabla 4*, I_{1-6} corresponden a la intensidad transmitida por cada capa siendo I_6 la luz transmitida total.

Con el fin ilustrar de manera más esquemática de donde salen las ecuaciones anteriores se presenta la *Figura 18*.

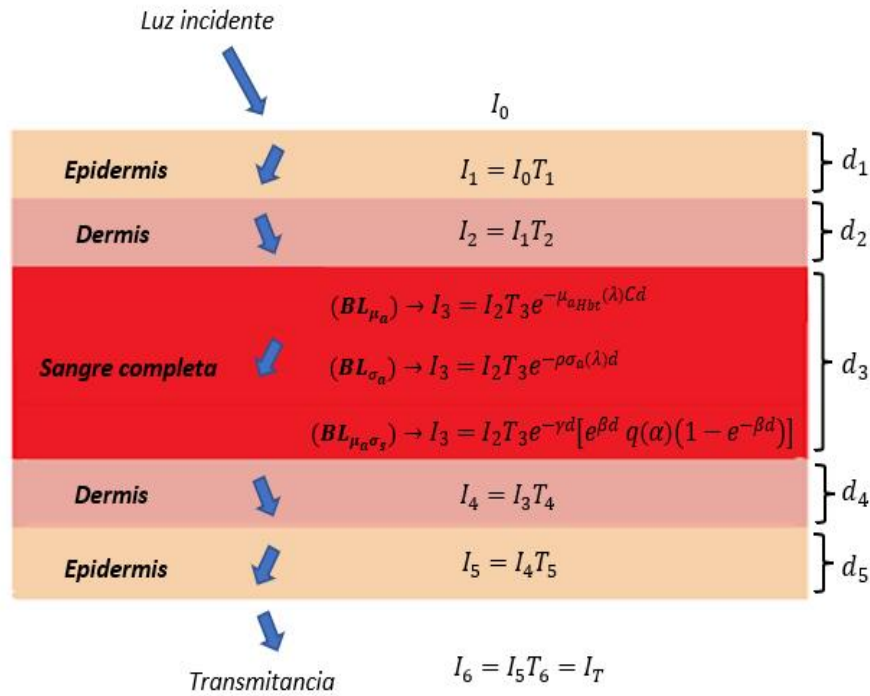


Figura 18. Diagrama ilustrativo de la transmisión de luz en el modelo de piel multicapa.

3.5.2 *Análisis y discusión de resultados de la luz transmitida en el modelo de piel multicapa*

Con el fin de entender la razón de utilizar en oximetría convencional un modelo de análisis para medios homogéneos en un medio inhomogéneo como el tejido biológico, se realizó una comparación entre la transmisión de luz del modelo de ley de Beer-Lambert clásica (BL_{μ_a}) y los modelos extendidos de la ley de Beer-Lambert para una suspensión de partículas (BL_{σ_a}) y para una suspensión de partículas que producen dispersión ($BL_{\sigma_a\sigma_s}$).

Es importante mencionar que los resultados de las simulaciones consideran dos factores; en principio la absorción de la capa de sangre completa (vista como una suspensión de eritrocitos en plasma) y posteriormente la contribución de la absorción de la piel (dermis y epidermis). En estas dos condiciones se presenta una variación en concentración de las hemoglobinas HbO₂, RHb y MetHb, en el interior de los eritrocitos, considerando 4 casos (*Tabla 5*).

Tabla 5. Concentraciones de hemoglobina consideradas en los 4 casos analizados.

Casos	Condición	Concentraciones		
		HbO ₂ (%)	RHb (%)	MetHb (%)
1	Persona considerada sana	95	4	1
2	Ligero aumento de MetHb	90	4	6
3	Inicio de una intoxicación por MetHb	80	4	16
4	Intoxicación por MetHb	40	4	56

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para el modelo de BL_{μ_a} para la transmitancia total de luz I_T correspondientes a cada uno de los casos estudiados (Tabla 5), en una capa de sangre completa;

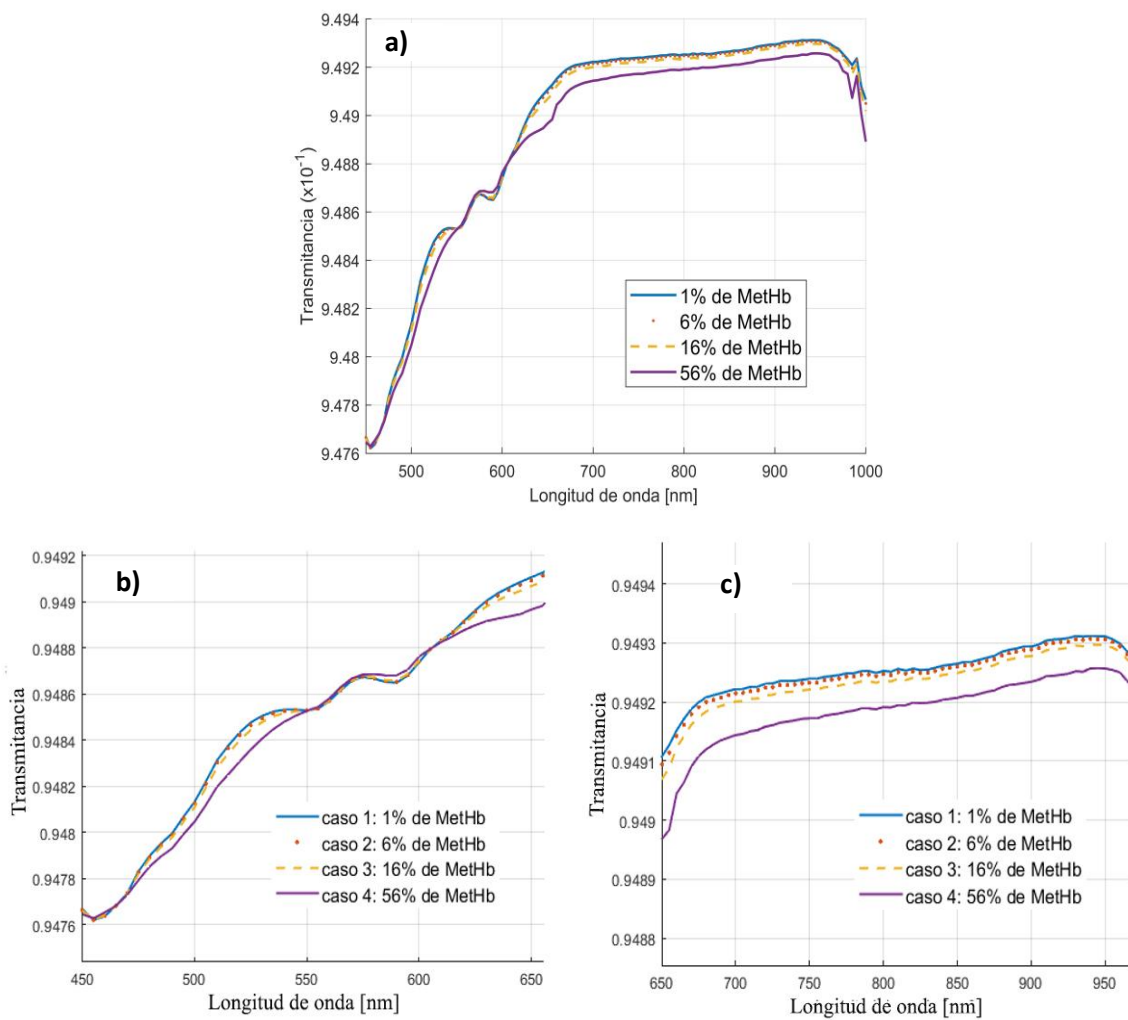


Figura 19. Transmitancia total como función de la longitud de onda (λ), en la capa de sangre completa del modelo de piel (Fig. 17), empleando el modelo de BL_{μ_a} . Se grafican los 4 casos expuestos en la Tabla 5;

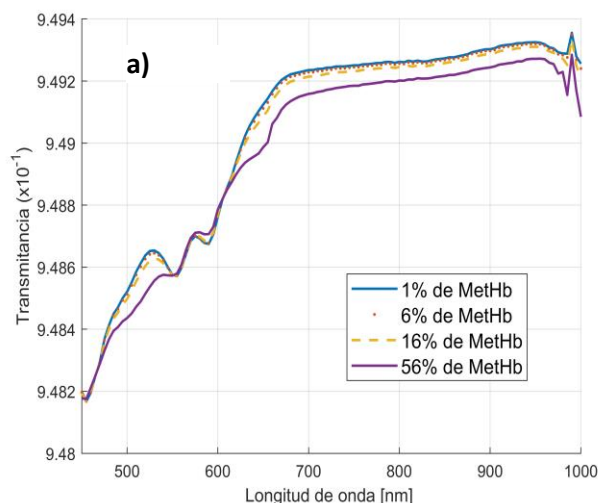
- a) Curvas de transmisión de luz de 450 a 1000 nm,
- b) Curvas de transmisión de luz de 450 a 650 nm,
- c) Curvas de transmisión de luz de 650 a 950 nm.

En la *Figura 19 inciso a)*, se observan las curvas de transmitancia total (I_T) en función de la longitud de onda considerando los cuatro casos propuestos en la *Tabla 5* para el modelo de $BL_{\mu\alpha}$, se destaca que el comportamiento de las curvas de I_T parece ser muy similar para las concentraciones que van del 1% hasta el 16% de MetHb, y además la transmitancia disminuye medida que se va incrementando la concentración de MetHb, en el rango de longitudes de onda que va de los 450 a 1000 nm.

Por su parte, en la región de 450 a 650 nm (*Figura 19 inciso b)* se puede observar para los primeros tres casos una mayor deformación de la curva y un incremento de la I_T , apareciendo dos máximos el primero en 540 nm y el segundo mejor definido en 575 nm, así como dos mínimos ubicados en 550 y 590 nm. Para el caso 4 en esta región espectral, lo que se observa es que cuando el incremento en concentración de MetHb llega a un 56% la forma de la curva cambia haciendo que el primer pico máximo que aparece en 540 nm muestre una fuerte atenuación implicando que en esta zona se está obteniendo una mayor absorbancia con respecto a lo que se observaba para los casos anteriores donde las concentraciones de MetHb van del 1% al 16%. Otro aspecto importante para destacar en el caso 4 es que se presenta un incremento de I_T en 460 nm y en el rango de 550 a 605 nm, lo que estaría indicado que se está dando una menor absorbancia a mayor concentración de MetHb. Estos resultados parecerían estar indicando que de 550 a 605 nm es donde se está presentando la mayor sensibilidad a cambios en concentración de MetHb. Dada la sensibilidad de las curvas de transmitancia esta región, podría ser adecuada para elegir longitudes de onda que permitan hacer mediciones que ayuden a identificar cambios producidos por afectaciones en la concentración de MetHb.

Particularmente, para los cuatro casos estudiados, en la región de 650 a 1000 nm (*Figura 19 inciso c)*, se presenta la mayor I_T así como un incremento progresivo de la misma conforme aumenta λ . En esta región para los cuatro casos estudiados, se tiene un comportamiento homogéneo, sin embargo, se sigue observando que la I_T va disminuyendo gradualmente conforme se incrementa la concentración de MetHb, presentándose la mayor pérdida de luz cuando se tiene un aumento de su concentración al 56%. Esto estaría indicando que conforme aumenta la concentración de MetHb se tiene una mayor absorbancia en esta región espectral.

Finalmente, se muestra la *Figura 20*, en la que se ilustran las curvas de transmitancia total de luz I_T correspondientes a cada uno de los casos estudiados (*Tabla 5*) para el modelo de $BL_{\sigma\alpha}$, en la capa de sangre completa;



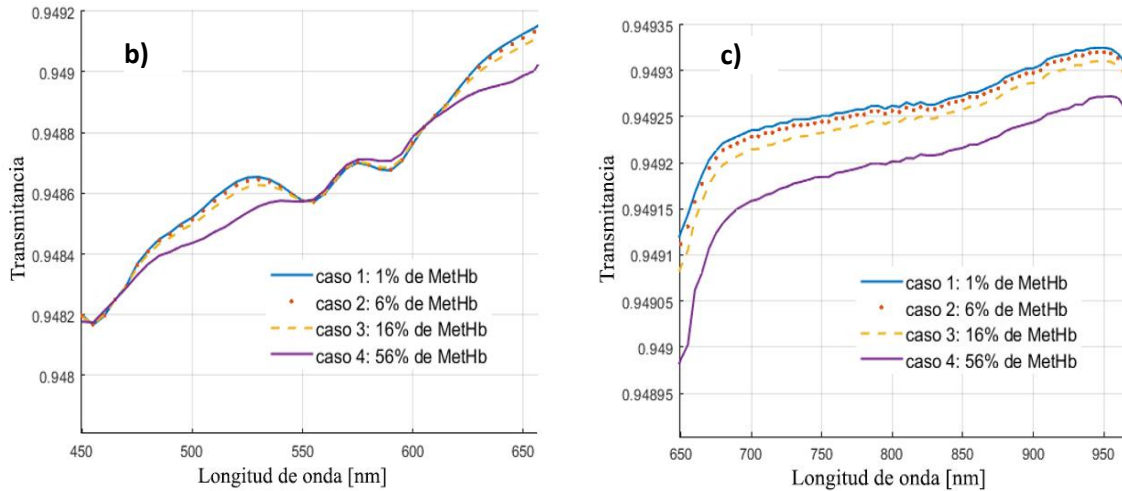


Figura 20. Transmitancia total como función de la longitud de onda (λ), en la capa de sangre completa del modelo de piel (Fig. 17), empleando el modelo de BL_{σ_a} . Se grafican los 4 casos expuestos en la Tabla 5;

- a) Curvas de transmisión de luz de 450 a 1000 nm,
 b) Curvas de transmisión de luz de 650 a 950 nm,
 c) Curvas de transmisión de luz de 450 a 650 nm.

En la Figura 20 inciso a) se observan las curvas de transmitancia total (I_T) en función de la longitud de onda considerando los cuatro casos propuestos en la Tabla 5 para el modelo de BL_{σ_a} , cabe destacar que para este modelo las curvas de transmitancia muestran características muy similares a lo que se observó en modelo de BL_{μ_a} , con la diferencia de que el modelo de BL_{σ_a} se tiene una I_T mayor.

Comparando los resultados de los modelos de BL_{μ_a} y BL_{σ_a} en general se concluye que ambos modelos pueden ser igualmente aplicados para estudios de oximetría convencional en la región espectral de 660 a 950 nm, ya que su comportamiento en esta región es bastante homogéneo, sin embargo, dada esta homogeneidad el estudio de alteraciones en concentración de MethHb para esta zona es más complicado, ya que el único cambio visible son las variaciones de la I_T , por lo que para el estudio de éstas alteraciones, sería más recomendable moverse a longitudes de onda entre 550 a 600 nm, que es la región espectral de mayor sensibilidad, donde se pueden llegar a observar modificaciones en la forma y transmitancia de la curva en función de los cambios en concentración de MethHb que se vayan dando. Estos puntos de sensibilidad encontrados permiten acotar longitudes de onda que podrían sondearse con el fin de elegir sólo aquellas que permitan monitorear los cambios con mayor claridad.

A continuación, se mostrarán los resultados obtenidos para del modelo $BL_{\sigma_a\sigma_s}$, pero antes hay que recordar que este modelo considera además de la contribución de la absorción, el fenómeno de esparcimiento de una suspensión de partículas (que en este caso particular son eritrocitos), además de que se agrega el factor $q(\alpha)$ que como se mencionó en la teoría corresponde al ángulo del cono de aceptación en el que la luz llega al colector, es decir, el parámetro $q(\alpha)$ nos dice que tanto esparcimiento de luz existira en función de que tan grande sea el ángulo del cono de aceptación a la hora de llegar la luz al colector después de pasar a

través del medio con partículas. De acuerdo a la formulación matemática, $q(\alpha)$ puede tener valores entre 0 y 1.

Considerando lo anterior, la *Figura 21* ilustra la transmitancia total de luz (I_T) en función de la longitud de onda correspondientes a cada uno de los casos estudiados (*Tabla 5*) para el modelo de $BL_{\sigma_a\sigma_s}$ a través de una capa de sangre completa, además se hace una variación del parámetro $q(\alpha)$ dentro de 0 y 1.

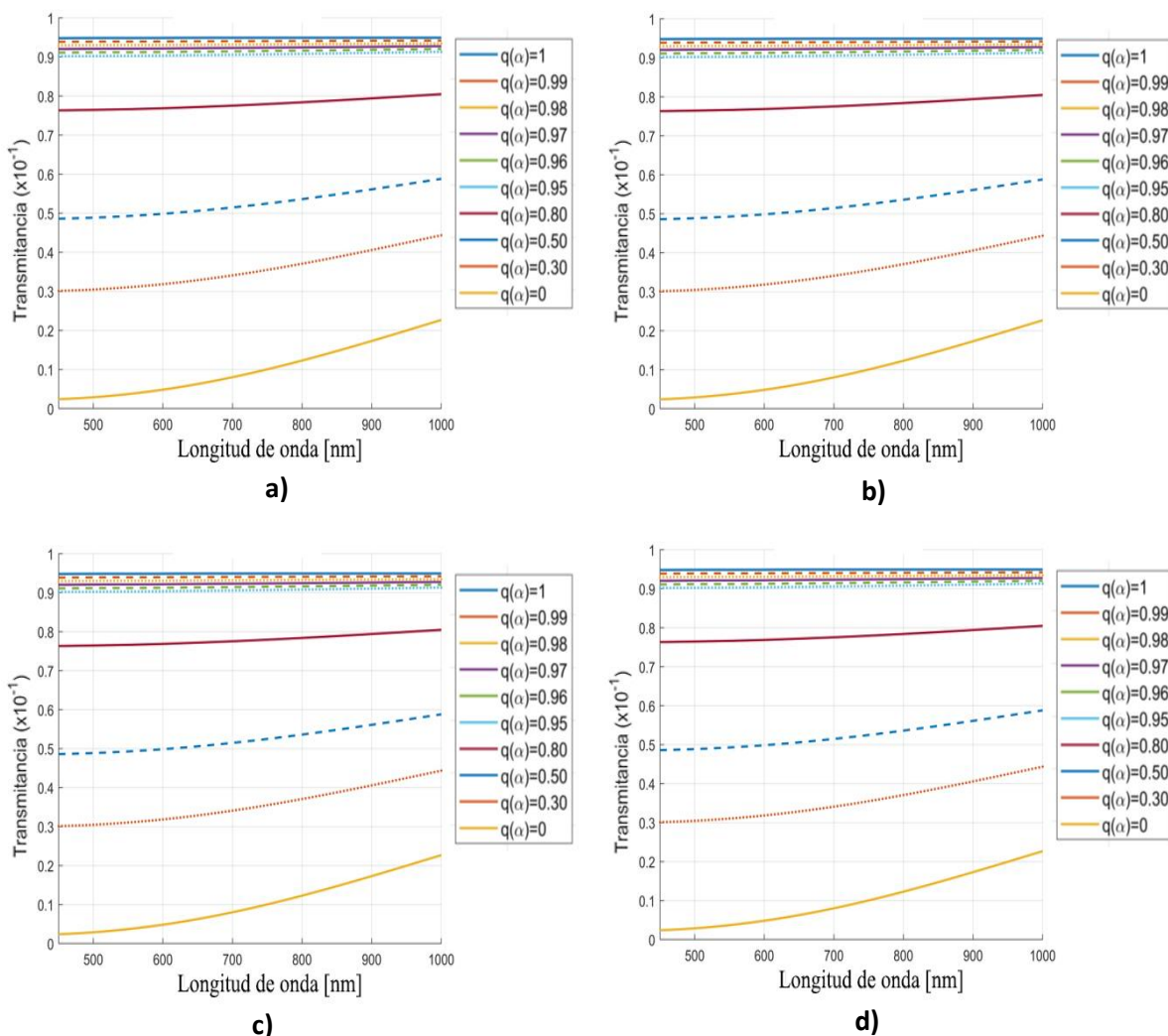


Figura 21. Transmitancia total como función de la longitud de onda (λ), en la capa de sangre completa del modelo de piel (Fig. 17), empleando el modelo de $BL_{\sigma_a\sigma_s}$ y haciendo una variación de $q(\alpha)$ de 0 a 1. Se grafican los 4 casos propuestos en la *Tabla 5*;

- a) Caso 1: las concentraciones de HBO_2 , RHb y $MetHb$ se encuentran en concentraciones normales.
- b) Caso 2: existe un aumento en la concentración de $MetHb$ llegando hasta el 6%.
- c) Caso 3: en el que existe un aumento en la concentración de $MetHb$, llegando hasta el 16%.
- d) Caso 4: intoxicación por un aumento alarmante en la concentración de $MetHb$, llegando hasta el 56%.

Los resultados de la *Figura 21* para los cuatro casos estudiados muestran en principio que el incremento en concentración de $MetHb$ parece no tener influencia en la I_T , ya que los cuatro casos están arrojando resultados

muy similares, esto no quiere decir que la MetHb no este influyendo en la propagación de la luz, simplemente el modelo de $BL_{\sigma_a\sigma_s}$, no está permitiendo ver este efecto.

Por otro lado, en cuanto a la variación de $q(\alpha)$ es importante mencionar que este estudio se realizó de 1 a 0 con variaciones de 0.01, observándose que I_T va disminuyendo gradualmente conforme nos alejamos de 1, en este sentido, la *Figura 21* ilustra saltos pequeños de 1 a 0.95 y posteriormente se muestran variaciones más grandes con el fin de hacer más evidentes los cambios que las curvas de I_T van experimentando. Considerando lo anteriormente mencionado, en la *Figura 21* para los cuatro casos estudiados se observa que en toda la región espectral de 450 a 1000 nm al variar a $q(\alpha)$ de 1 a 0.95 se tiene un comportamiento bastante homogéneo, lo que podría significar que la mayor parte de la luz recibida por el colector sigue una trayectoria hacia adelante por lo que el esparcimiento de luz podría ser tan pequeño que sería despreciable. Sin embargo, entre más nos acercamos a 0 la curva de I_T se va modificando llegando a tener un comportamiento aproximadamente exponencial.

De manera general, los resultados obtenidos muestran que conforme el valor de $q(\alpha)$ se va acercando a 0 el cono de aceptación se "hace más grande", llegando a un punto en que el cono adquiere un ángulo mayor al área del colector que recibe la luz, propiciando un mayor esparcimiento pues la luz no solo se propaga hacia adelante, sino también en otras direcciones, fuera del área del colector.

En cuanto a la aplicación del modelo de $BL_{\sigma_a\sigma_s}$, en mediciones de oximetría convencional es posible siempre y cuando los valores para $q(\alpha)$ estén entre 0.95 y 1, ya que es donde se tiene un esparcimiento de luz prácticamente despreciable, es decir, la luz se propaga de manera más homogénea. Sin embargo, hay que tener en cuenta que este modelo, no es lo suficientemente sensible como para detectar cambios en altas concentraciones de MetHb por lo que las estimaciones de SaO₂ podrían arrojar valores erróneos cuando se está frente a una intoxicación causada por el incremento en concentración de la MetHb.

Por otro lado, en la *Figura 22* se ilustran los resultados obtenidos para la transmitancia total de luz (I_T) en función de la longitud de onda para los modelos de BL_{μ_a} y BL_{σ_a} , ahora considerando la absorción de a través de dos capas de piel (dermis y epidermis) así como de una capa de sangre completa, considerando los cuatro casos estudiados en la *Tabla 5*.

En principio, en la *Figura 22* para los modelos de BL_{μ_a} (inciso a) y BL_{σ_a} (inciso b), se observa que cuando se considera la absorción de la piel, la forma de la curva de I_T se modifica por completo apareciendo dos máximos y un mínimo entre ellos que se localizan dentro de la región espectral de 600 a 900 nm (que es la ventana de estudio de la oximetría convencional). Específicamente estos máximos se posicionan en 695 nm y 810 nm y su mínimo se encuentra en 745 nm, además se observa que no hay transmitancia de 450 a 590 nm y de 900 a 1000 nm, esto estaría mostrando que la presencia de la piel está jugando un papel muy importante en la propagación de la luz haciendo que esta, tienda a atenuarse mucho más, es decir en estas regiones del espectro prácticamente la piel está absorbiendo toda la luz que incide sobre ella.

Adicionalmente se hace notar que el comportamiento de las curvas de transmitancia parece ser similar para todos los casos, en los dos modelos estudiados, pues las curvas se enciman unas con otras en el rango de longitudes de onda que va de los 450 a 1000 nm. Haciendo un acercamiento a dichas curvas, se puede apreciar

de mejor manera como el incremento en concentración de MetHb disminuye la I_T y se hace más drástico cuando se llega a una concentración del 56%.

Otro aspecto importante que se debe destacar es que la I_T , para todos los casos estudiados ha bajado cuatro ordenes de magnitud cuando se considera la contribución en absorción de la piel a diferencia de lo que se observaba en la *Figura 19 y 20*, donde la luz se propagaba únicamente por la capa de sangre completa.

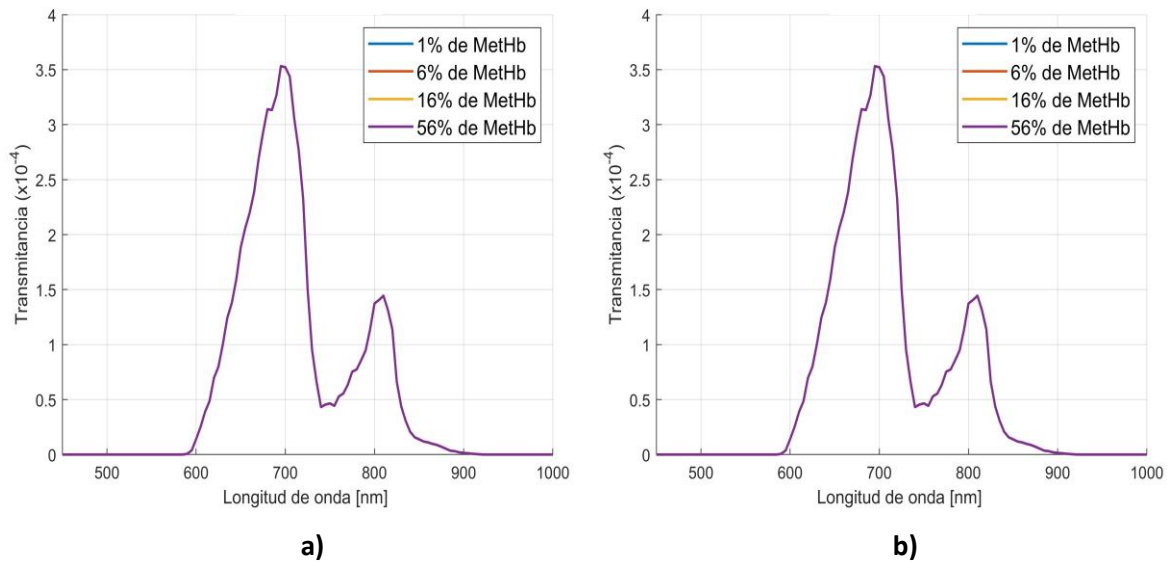


Figura 22. Transmitancia total como función de la longitud de onda (λ), en el modelo de piel completo (*Fig. 17*), empleando el modelo de BL_{μ_a} . Se grafican los 4 casos expuestos en la *Tabla 5*.

- a) Los 4 casos expuestos en la *Tabla 5*, para el modelo de BL_{μ_a} , de 450 a 1000 nm
- b) Los 4 casos expuestos en la *Tabla 5*, para el modelo de BL_{σ_a} de 450 a 1000 nm.

Gracias a los resultados obtenidos también se comprobó que modelos de BL_{μ_a} y BL_{σ_a} arrojan una respuesta en transmitancia muy parecida, pero hay que considerar que, si se realizan mediciones de pulsioximetría en personas con alteraciones en la concentración de MetHb, las estimaciones de la SaO₂ podrían no ser tan confiables, pues como se observó en los resultados de la *Figura 22*, aparte de la absorción de la piel, el incremento de MetHb también afecta la transmisión de luz.

Finalmente, se presentan los resultados obtenidos para el modelo $BL_{\sigma_a\sigma_s}$ considerando la absorción de la capa de piel (dermis y epidermis), así como la absorción de la capa de sangre completa;

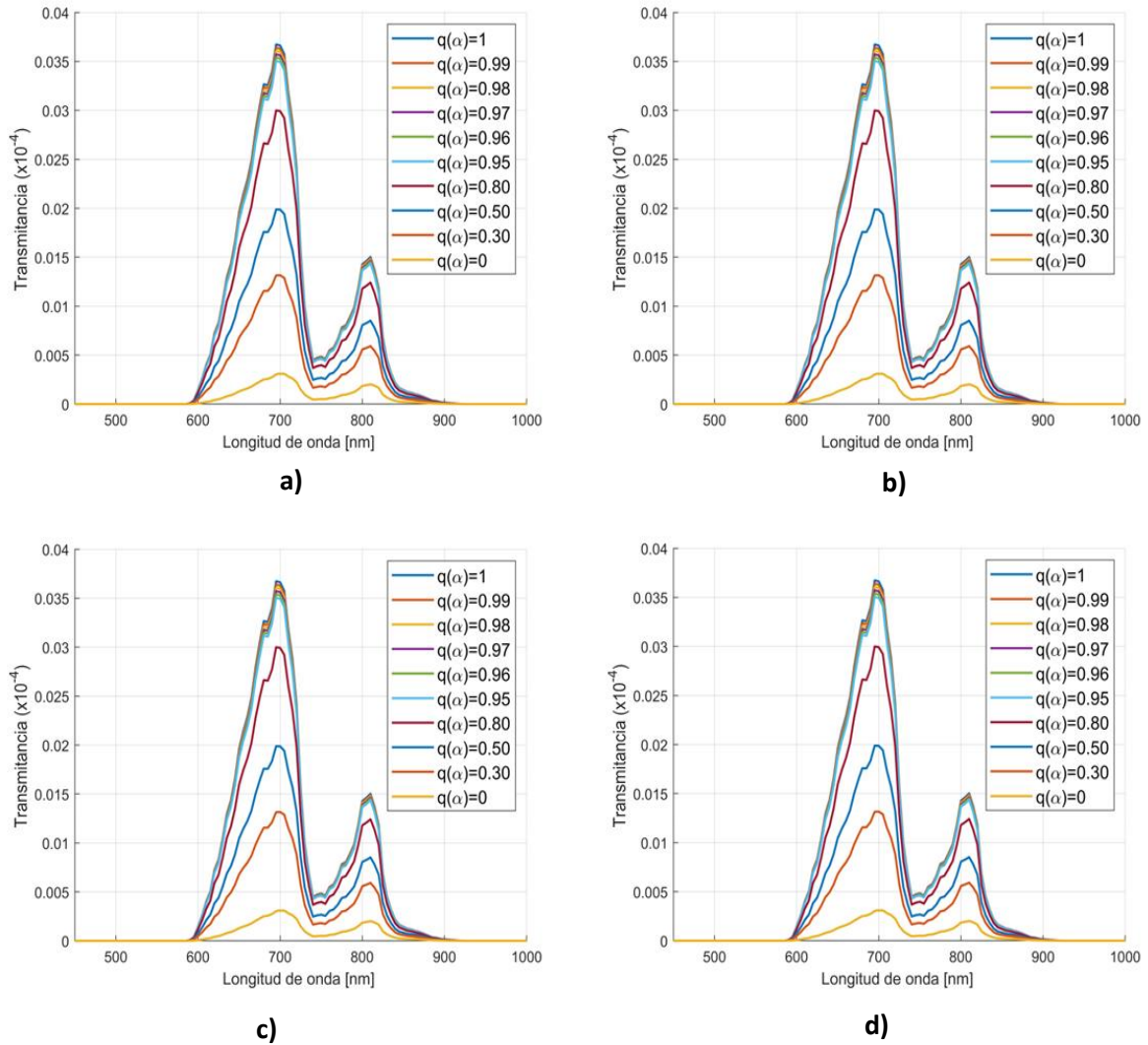


Figura 23. Transmitancia total como función de la longitud de onda (λ), en la capa de sangre completa del modelo de piel (Fig. 17), empleando el modelo de $BL_{\sigma_a\sigma_s}$ y haciendo una variación de $q(\alpha)$ de 0 a 1. Se grafican los 4 casos expuestos en la Tabla 5;

- a) Caso 1: las concentraciones de HbO_2 , RHb y $MetHb$ se encuentran en concentraciones normales.
- b) Caso 2: existe un aumento en la concentración de $MetHb$ llegando hasta el 6%.
- c) Caso 3: en el que existe un aumento en la concentración de $MetHb$, llegando hasta el 16%.
- d) Caso 4: intoxicación por un aumento alarmante en la concentración de $MetHb$, llegando hasta el 56%.

La Figura 23 ilustra la transmitancia total de luz I_T en función de la longitud de onda a través de dos capas de piel (dermis y epidermis) así como de una capa de sangre completa, aplicando el modelo de $BL_{\sigma_a\sigma_s}$ y los cuatro casos propuestos en la Tabla 5, además se hace una variación del parámetro $q(\alpha)$ dentro de 0 y 1.

Para este modelo también se observa una modificación total en la forma del espectro de transmitancia cuando se considera la absorción de la piel, como sucedió en con los modelos de BL_{μ_a} y BL_{σ_a} . Inclusive la forma que toma la curva tiene características similares a lo que se observó para los modelos analizados en la Figura 22.

Sin embargo, una de las diferencias más marcadas es que el modelo de $BL_{\sigma_a\sigma_s}$ tienen una mejor respuesta en la I_T en el caso en el que se considera la absorción de la capa de piel (dermis y epidermis) a diferencia de lo que se observa para los modelos de BL_{μ_a} y BL_{σ_a} . En cuanto a los cambios en el incremento en concentración de MetHb, estos parecen no afectar la I_T o al menos no está siendo evidente como lo hace, misma situación que se presentó cuando se analizaban los resultados de las curvas obtenidas para los modelos de BL_{μ_a} y BL_{σ_a} .

Además, también se puede apreciar una disminución gradual de la I_T en función de la disminución del valor de $q(\alpha)$, nuevamente al igual que lo que se observaba en la *Figura 21* conforme el valor de $q(\alpha)$ se va acercando a 0 se propiciará un mayor esparcimiento pues la luz no solo se propaga hacia adelante, sino también en otras direcciones, fuera del área del colector que recibe la luz.

Finalmente, este análisis nos permite ver de manera general que la aplicación del modelo de $BL_{\sigma_a\sigma_s}$ con valores variables de $q(\alpha)$ 0.95 a 1, funciona para ser utilizado en oximetría convencional al igual que los modelos de BL_{μ_a} y BL_{σ_a} , pues su respuesta es muy similar en condiciones donde la contribución de las dishemoglobinas es despreciable. Sin embargo, hay que tener cuidado pues como se vió anteriormente una variación en la concentración de MetHb fuera de los límites considerados normales afecta la transmisión de la luz, haciendo que las estimaciones de SaO_2 sean más susceptibles a errores, razón por la cual para estos casos alterados de salud sería más recomendable realizar mediciones de oximetría fraccional.

CAPÍTULO 4

Metodología Experimental

En este capítulo se presenta detalladamente la metodología experimental llevada a cabo para la preparación de cada una de las variaciones de hemoglobina estudiadas en la teoría; HbO₂, RHb y MetHb.

Se muestra también el equipo experimental utilizado para su caracterización espectral a través de sus espectros de absorción, se prueba además que las muestras de Hb obtenidas son estables en función del tiempo por lo que pueden ser utilizadas por largos periodos de tiempo sin problema.

4.1 Preparación de muestras y medición espectral

Para la preparación de las muestras de hemoglobina se utilizó agua inyectable, hemoglobina liofilizada comercial para laboratorio de la marca Sigma-Aldrich, así como los siguientes reactivos; ditionito de sodio (Na₂S₂O₄) de la marca Sigma-Aldrich y bicarbonato de sodio (NaHCO₃).

La preparación de las muestras se realizó dentro de una campana, con el fin de mantener las condiciones de un ambiente estéril. Se hizo una resuspensión de 14.7 mg de hemoglobina liofilizada en agua inyectable para obtener 14 ml de solución de hemoglobina, realizando una doble agitación en principio en la Parrilla eléctrica y posteriormente en baño ultrasónico ambos procesos con una duración de 15 min cada uno, esto con el fin de tener una agitación de la hemoglobina más homogénea.

Una parte de la concentración madre obtenida de la resuspensión, fue diluida para formar tres concentraciones más. Posteriormente, en alícuotas individuales se colocaron 1 ml de cada concentración (Figura 24).

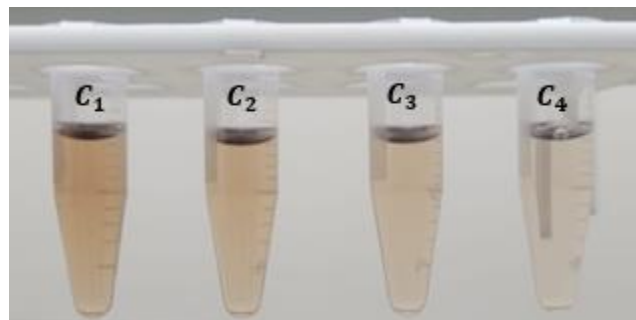


Figura 24. Muestras de hemoglobina liofilizada resuspendidas en agua inyectable. La imagen muestra la preparación de las diferentes concentraciones donde: %C₁ = 0.105, %C₂ = 0.07875, %C₃ = 0.0525 y %C₄ = 0.02625.

Posteriormente, se prepararon los tres tipos de hemoglobinas a estudiar: HbO₂, RHb y Methb, en principio, cabe destacar que la hemoglobina liofilizada disponible como reactivo, se oxida fácilmente en contacto con el aire por lo que con solo hacer la resuspensión de la hemoglobina liofilizada en agua inyectable se obtuvo Methb.

Aunque en la literatura no existe información detallada del porque la hemoglobina liofilizada se oxida en contacto con el aire, una de las posibles razones podría ser que la hemoglobina liofilizada ha cambiado su morfología básica durante el proceso de liofilización. La sangre es un medio acuoso compuesto por otras proteínas además de hemoglobina, sin embargo, la hemoglobina liofilizada es una hemoglobina que ha sido deshidratada hasta convertirla en polvo, al no estar en un medio acuoso pierde su morfología básica y la hace más propensa al oxígeno atmosférico que reacciona con ella indistintamente a su lugar de unión al oxígeno ya que no está inmersa en una solución buffer que mantenga sus interacciones moleculares estables. Una proteína requiere estar en un medio acuoso que le proporcione el pH adecuado para que se desarrolle correctamente en su función biológica. [46]

Por otro lado, la obtención de HbO₂ y RHb fue un poco más complicada, se realizó por medio de reacciones químicas, agregando bicarbonato de sodio (BS) para oxigenar y ditionito de sodio (DS) para desoxigenar la muestra de Methb creada. [47] [48] [49]

4.2 Montaje experimental utilizado para la caracterización espectral

El equipo experimental y montaje utilizado en este proyecto para la realización de las mediciones espectroscópicas se ilustra en la Figura 25;

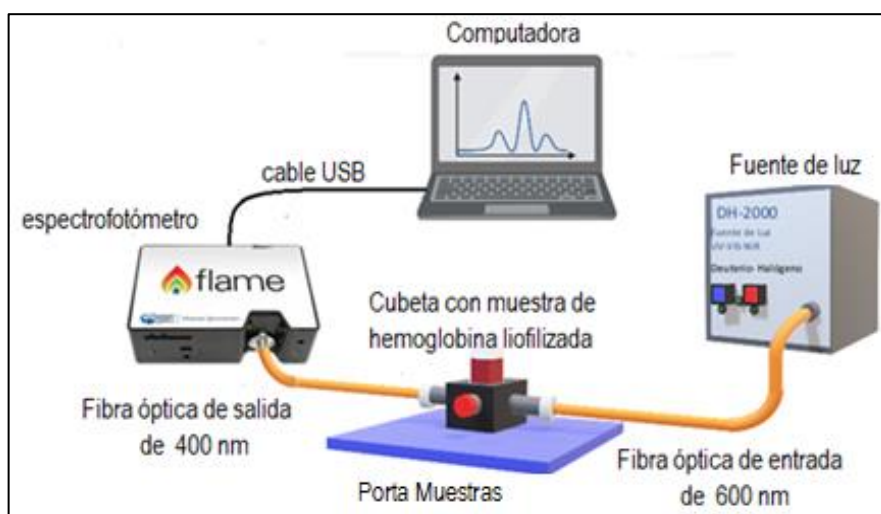


Figura 25. Montaje experimental utilizado para las mediciones espectroscópicas.

Para la experimentación, como fuente de luz de incidente se utilizó una lámpara de deuterio-halógeno de la

marca Ocean Optics DH-2000, cuya luz fue dirigida mediante una fibra óptica de 600 nm conectada a la entrada de un porta muestras, dentro del porta muestras se colocó una celda de plástico con medidas de 1 x 1 x 5 cm y en cuyo interior se vaciaron las muestras preparadas de hemoglobina liofilizada; a la salida de este porta muestras se acopló una fibra óptica de 400 nm que dirigía la luz a la entrada de un espectrofotómetro de la marca flame de Ocean Optics, cuyo rango espectral va del VIS-NIR.

Finalmente, el espectrofotómetro se conectó a una computadora que contenía el software OceanView del espectrofotómetro, con la ayuda de este software se logró la visualización de las señales espectrales de las muestras de hemoglobina. Los datos recabados de este programa se analizaron posteriormente en el software Origin 9 y Matlab.

4.3 Análisis espectral multicomponente: Estimación cuantitativa de los derivados de hemoglobina

Una vez que se comprobó que la aplicación de la ley de Beer- Lambert convencional también era válida para estudios de oximetría fraccional, el siguiente paso fue realizar un cálculo de la saturación fraccional de oxígeno, para ello fue necesario conocer las concentraciones de los diferentes tipos de hemoglobina que se encuentran en una concentración de hemoglobina total, para nuestro caso, consideramos HbO₂, RHb y Methb.

Realizando una exhaustiva revisión bibliográfica se encontró que en diversas áreas de la investigación se necesita estudiar y cuantificar los componentes de una mezcla determinada, para ello se emplean con frecuencia diversos métodos de análisis multicomponente que apoyados de métodos matemáticos estiman de manera cuantitativa estos componentes. [50]

De acuerdo con esta revisión bibliográfica y considerando que este estudio de oximetría fraccional está basado en una técnica espectroscópica se encontró que lo más adecuado era aplicar *un método de análisis de espectroscopia de absorción multicomponente* que basa su estudio en la relación entre la concentración del analito y la cantidad de luz absorbida por el mismo. Entre todos los métodos de análisis revisados, por su sencillez, se eligió aplicar *el análisis espectral multicomponente de mínimos cuadrados clásicos (MCL)*.

Este método de análisis se basa en aplicar la ley de Beer- Lambert por separado a todos los componentes de la mezcla a estudiar, haciendo una relación entre las concentraciones y absorbancias tomando a cada λ de los espectros de absorción de dichos componentes. [51]

Con este método es posible descomponer matemáticamente el espectro de absorción de una mezcla, en los espectros de absorción de sus componentes, ecuación (20);

$$A_T = \mu_{ax}(\lambda)_x C_x d + \mu_a(\lambda)_y C_y d + \mu_a(\lambda)_z C_z d , \dots (20)$$

donde A_T es la absorbancia total de la mezcla, $\mu_{ax}, \mu_{ay}, \mu_{az}$ son los coeficientes de absorción para cada uno de los componentes a longitudes de onda determinadas, C_x, C_y, C_z son las concentraciones de cada uno de los componentes y d es la distancia recorrida por la luz.

A partir de esta consideración, para encontrar cuáles son las concentraciones de cada componente en una mezcla determinada, el método de análisis de mínimos cuadrados clásicos establece una relación entre las concentraciones y espectros de absorción de cada uno de los componentes que se podrían encontrar en dicha mezcla. El método consta de los siguientes pasos;

➤ Etapa de calibración

1.- Se midieron los espectros de absorción de diferentes mezclas de las cuáles se conocían las concentraciones de cada uno de sus componentes.

$$\left. \begin{aligned} A_1 &= \mu_{a1}C_{11}d + \mu_{a2}C_{21}d + \mu_{a3}C_{31}d \\ A_2 &= \mu_{a1}C_{12}d + \mu_{a2}C_{22}d + \mu_{a3}C_{32}d \\ A_3 &= \mu_{a1}C_{13}d + \mu_{a2}C_{23}d + \mu_{a3}C_{33}d \\ A_4 &= \mu_{a1}C_{14}d + \mu_{a2}C_{24}d + \mu_{a3}C_{34}d \\ A_5 &= \mu_{a1}C_{15}d + \mu_{a2}C_{25}d + \mu_{a3}C_{35}d \\ A_6 &= \mu_{a1}C_{16}d + \mu_{a2}C_{26}d + \mu_{a3}C_{36}d \\ A_7 &= \mu_{a1}C_{17}d + \mu_{a2}C_{27}d + \mu_{a3}C_{37}d \\ A_8 &= \mu_{a1}C_{18}d + \mu_{a2}C_{28}d + \mu_{a3}C_{38}d \end{aligned} \right\}, \dots (21)$$

donde $A_1, A_2, A_3, A_4, A_5, A_6, A_7, A_8$ es la absorción de las mezclas, $\mu_{a1}, \mu_{a2}, \mu_{a3}$ son los coeficientes de absorción para HbO₂, RHb y MetHb respectivamente de 450 a 750 nm. C_{11} a C_{18} son las concentraciones de HbO₂, C_{21} a C_{22} son las concentraciones de RHb, C_{31} a C_{38} son las concentraciones de MetHb y d es la distancia recorrida por la luz, que en este caso es 1 cm.

2.- A partir de los datos en (21), se crea la Matriz A y X que contienen los espectros de absorción de las mezclas y las concentraciones para cada componente como se muestra a continuación;

$$A = \begin{pmatrix} A_1 \\ A_2 \\ A_3 \\ A_4 \\ A_5 \\ A_6 \\ A_7 \\ A_8 \end{pmatrix} \text{ y } X = \begin{pmatrix} C_{11} & C_{12} & C_{13} & C_{14} & C_{15} & C_{16} & C_{17} & C_{18} \\ C_{21} & C_{22} & C_{23} & C_{24} & C_{25} & C_{26} & C_{27} & C_{28} \\ C_{31} & C_{32} & C_{33} & C_{34} & C_{35} & C_{36} & C_{37} & C_{38} \end{pmatrix}, \dots (22)$$

3.- A partir de las matrices A y X en (22), se estima la matriz de sensibilidad S;

$$S = ((X)^T(x))^{-1}(X)^T(A), \dots (23)$$

con T como la matriz transpuesta y (-1) indicando la matriz inversa.

➤ **Etapa de predicción. Método de mínimos cuadrados**

El método de mínimos cuadrados clásicos presenta la siguiente relación;

$$r = SC + e, \dots (24)$$

donde r es el espectro de absorción de la muestra problema, es decir, la muestra de la que se quiere conocer la concentración de cada uno de los componentes que la integran (escrito como un vector columna), S es la matriz de sensibilidad de la ecuación (22) y C que corresponde al valor de la concentración que queremos conocer para cada componente de la muestra problema y e como los errores de los residuos espectrales de ajuste de una muestra.

Finalmente, despejando C de (23), tenemos la expresión que nos permite calcular la concentración para cada componente de una mezcla;

$$C = \frac{r}{S} \dots (25)$$

Una vez obtenidas las concentraciones se calculó la S_aO_2 , empleando la ecuación (11) vista en la sección 2.5.

4.4 Obtención experimental en laboratorio de una muestra que contiene HbO₂, RHb y MetHb

Una vez probado el método de cuantificación de las hemoglobinas haciendo mezclas de hemoglobina de manera controlada, se buscó la implementación de un sistema en el que se pudieran hacer mezclas de hemoglobina de manera experimental en el laboratorio. Dado que no es posible mezclar las hemoglobinas creadas HbO₂, RHb y MetHb en una misma cubeta porque los químicos utilizados reaccionan entre sí no permitiendo la existencia de una muestra de hemoglobina total (muestra de hemoglobina que está formada por las 3 variaciones de hemoglobina), se pensó en hacer una nueva cubeta para portar las tres variaciones de hemoglobina, pero por separado, el procedimiento se explica a continuación.

Se consideró importante que la nueva cubeta estuviese hecha de un material transparente, con el objetivo en mente de que al realizar la medición espectral este material no interfiriera con los espectros de absorción de las hemoglobinas, por ello se eligió el polímero polidimetilsiloxano (PDMS), que es un polímero líquido, orgánico, basado en silicio, ópticamente transparente y, en general, inerte, no tóxico y no flamable, también es conocido como dimeticona y es uno de los varios tipos de aceite de silicona (siloxano polimerizado). [52]

Una vez encontrado el material, se diseñó un sistema que tuviera tres canales separados y alineados uno alado del otro, de tal forma que fuera posible rellenarlos con las tres variaciones de hemoglobinas, sin mezclarlas, pero que estuvieran en la misma cubeta (*Figura 26*).

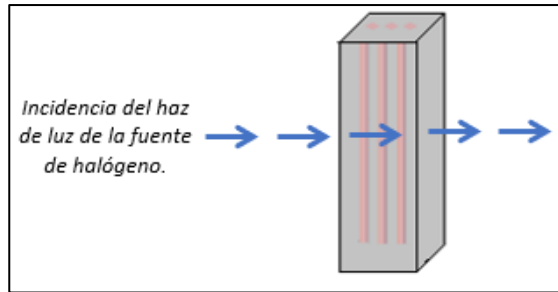


Figura 26. Esquema de la cubeta para medición de fracciones de hemoglobina.

Es importante mencionar que el tamaño de la cubeta se pensó con el fin de poder utilizarla en el montaje experimental mostrado en la *Figura 25*.

Ya que el PDMS es un material que se encuentra en forma líquida, es necesario endurecerlo, para ello se cura sometándolo a calor durante 4 horas o dejándolo en reposo durante 2 días. Se optó por la opción más rápida que era curarlo en calor, pasadas las 4 horas se obtuvo la cubeta que se observa en la (*Figura 27*).

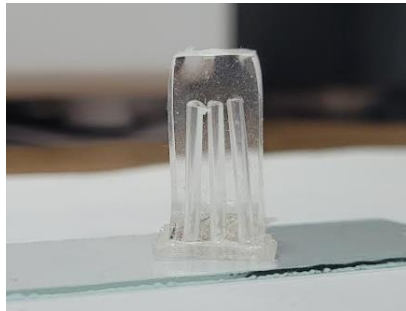


Figura 27. Cubeta hecha de PMDS con 3 canales independientes.

El diseño de la cubeta anterior se pensó con el fin de poder utilizarla en el montaje experimental mostrado en la *Figura 25*.

Finalmente, para probar la eficiencia del sistema creado se hicieron diversas pruebas que se explican a continuación;

En principio, se utilizó el montaje experimental de la *Figura 25* para medir los espectros de transmisión y transmitancia para posteriormente calcular el espectro de absorción de la cubeta de PDMS que contenía agua inyectable en el interior de sus canales. Para este propósito se hizo incidir el haz de luz a un costado de la cubeta con el fin de que la luz pasará a través de los tres canales (*Figura 28*).

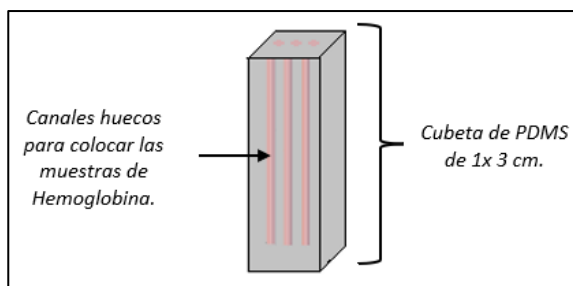


Figura 28. Se muestra como es la incidencia del haz de luz sobre la cubeta de PDMS.

Con el fin de comparar los espectros de absorción obtenidos, también se midió el espectro de absorción de la cubeta de plástico que fue utilizada para hacer la caracterización espectral de las muestras de hemoglobina, esta cubeta por supuesto también se rellenó con agua inyectable.

Finalmente, antes de hacer las mezclas de hemoglobinas, se probó la cubeta de PDMS llenando esta vez los tres canales de la cubeta solo con una de las variaciones de hemoglobina, empezando por llenar los canales de MetHb, se midió su espectro de transmisión y transmitancia y finalmente se calculó su espectro de absorción. Posteriormente se retiró la MetHb y se enjuagaron los canales con agua inyectable en varias ocasiones para evitar que quedaran residuos.

Esta operación se repitió en dos ocasiones más rellenando los canales con HbO₂ y RHb, se hace hincapié que entre cada cambio de hemoglobina se hizo un lavado de los canales con agua inyectable con el fin de eliminar cualquier residuo.

CAPÍTULO 5

Discusión y Análisis de Resultados Experimentales

5.1 Análisis de las muestras preparadas de MetHb, HbO₂ y RHb

Con ayuda del espectro de transmitancia medido con el espectrofotómetro, se calcularon los espectros de absorción de las tres variaciones de hemoglobina preparadas; MetHb, HbO₂ y RHb.

Como primera parte del análisis, se estudió como era la respuesta del espectro de absorción de cada una de las variaciones de hemoglobina considerando diferentes concentraciones en un rango de longitudes de onda que va de los 450-1000 nm, con el fin de identificar si los espectros de absorción de estas muestras experimentales concordaban con los espectros de absorción de la MetHb, HbO₂ y RHb reportadas en la literatura para sangre humana.

A continuación, en la *Figura 29* se presentan los espectros de absorción calculados a diferentes concentraciones de la muestra experimental de MetHb, así como un espectro de absorción tomado de la literatura de una muestra de sangre humana con MetHb.

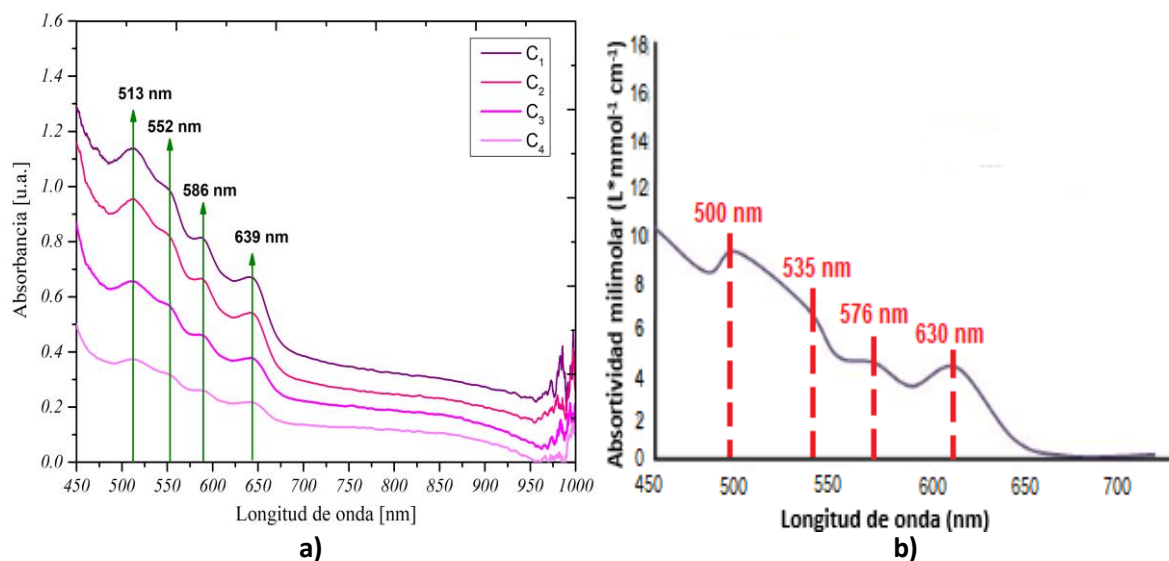


Figura 29. Se ilustra;

- Espectros de absorción de diferentes concentraciones de la muestra experimental de MetHb.
- Espectro de absorción obtenido de la literatura para una muestra de sangre humana con MetHb. [65]

La *Figura 29 inciso a)*, ilustra los espectros de absorción de la muestra experimental de MetHb, lo primero que se puede destacar es que la forma del espectro de absorción es la misma para cada concentración,

apareciendo cuatro máximos bien definidos ubicados en 513 nm, 552 nm, 686 nm y 639 nm, se distingue también que aproximadamente a partir de 650 a 1000 nm (que es la región de estudio de la oximetría convencional), no se presenta absorción de la muestra de hemoglobina. Adicionalmente, se observa que existe una relación lineal entre la absorción y la concentración, de tal forma que conforme aumenta la concentración de la muestra también lo hace su absorción y viceversa.

Por otro lado, en la *Figura 29 inciso b)*, se tiene el espectro de absorción reportado en la literatura para la sangre humana con MetHb, en un rango de longitudes de onda que va de 450-700 nm. Se observa en las características propias del espectro la presencia de cuatro máximos bien definidos, ubicados en; 500 nm, 535 nm, 576 nm y 630 nm.

En general, se hace notar que el espectro de absorción experimental y el espectro de absorción reportado en la literatura para la MetHb, son muy parecidos entre sí en forma, sin embargo, las muestras experimentales poseen ligeros desplazamientos en sus máximos de absorción cayendo en bandas espectrales muy cercanas a los máximos reportados en la literatura, por lo que el corrimiento presentado no es significativo y pueden ser debidos a la forma de obtención de las muestras.

Ahora bien, en la *Figura 30* se presentan los espectros de absorción calculados a diferentes concentraciones de la muestra experimental de HbO₂, así como un espectro de absorción tomado de la literatura de una muestra de sangre humana con HbO₂.

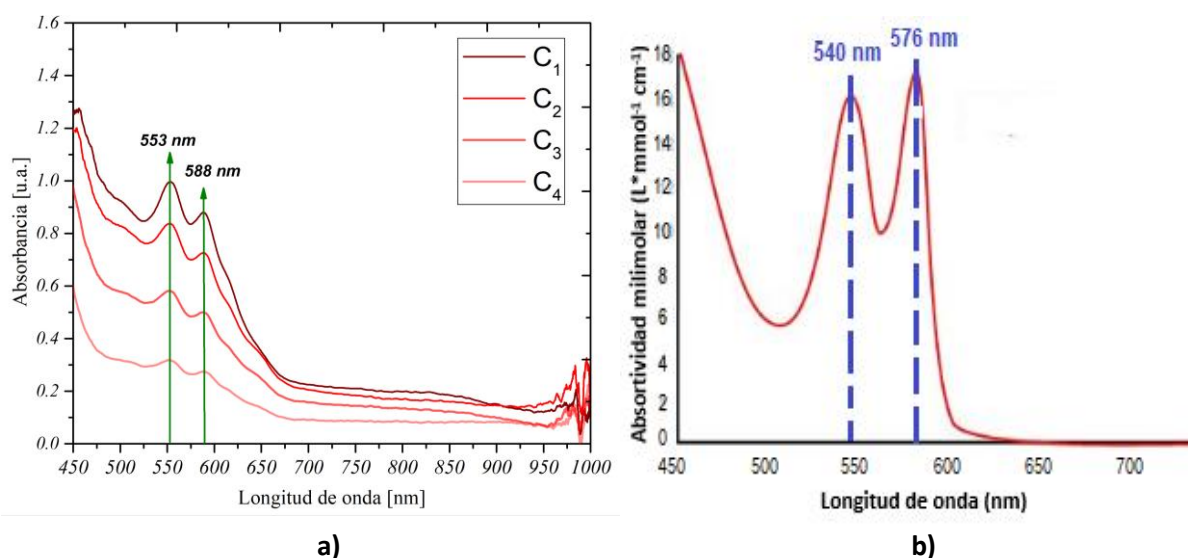


Figura 30. Se ilustra;

- a) Espectros de absorción de diferentes concentraciones de la muestra experimental de HbO₂.
- b) Espectro de absorción obtenido de la literatura para una muestra de sangre humana con HbO₂. [65]

Para las muestras experimentales de HbO₂ de la *Figura 30 inciso a)*, en el rango de longitudes de onda de 450 a 1000 nm, se observa una forma del espectro muy característica y completamente diferente a lo encontrado para las muestras experimentales de MetHb, en este caso el espectro de absorción posee

únicamente dos máximos bien definidos a las longitudes de onda de 553 nm y 588 nm, además nuevamente se observa una dependencia de la absorción en función de la concentración. Finalmente, al igual de las muestras anteriormente analizadas, a partir de aproximadamente 650 a 1000 nm, no se presenta absorción.

Por otro lado, en la *Figura 30 inciso b)*, se tiene el espectro de absorción reportado en la literatura para la sangre humana con HbO₂ en un rango de longitudes de onda que va de 450 a 700 nm. Se observa en las características propias del espectro la presencia de dos máximos bien definidos, ubicados en; 540 nm, 576 nm.

Como se puede observar, el espectro de absorción experimental y el espectro de absorción reportado en la literatura para la HbO₂, son muy parecidos entre sí en forma, sin embargo, las muestras experimentales poseen ligeros desplazamientos en sus máximos de absorción cayendo en bandas espectrales muy cercanas a los máximos reportados en la literatura, estas diferencias mínimas permiten pensar que se trata del mismo tipo de hemoglobina.

Finalmente, en la *Figura 31* se presentan los espectros de absorción correspondientes a la muestra experimental de RHb, así como un espectro de absorción tomado de la literatura de una muestra de sangre humana con RHb.

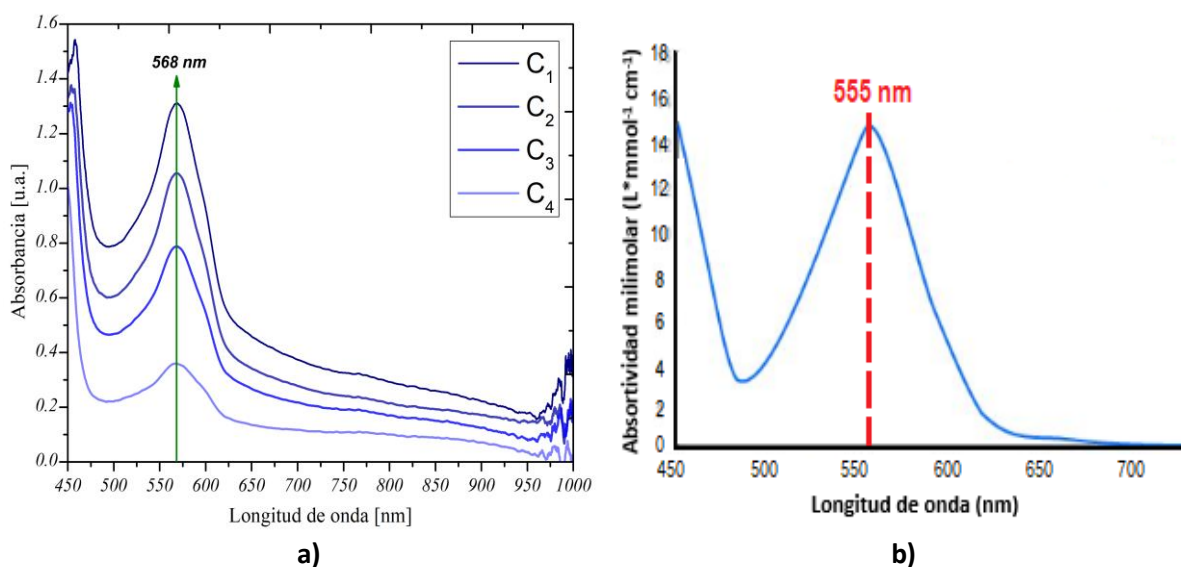


Figura 31. Se ilustra;

- Espectros de absorción de diferentes concentraciones de la muestra experimental de RHb
- Espectro de absorción obtenido de la literatura para una muestra de sangre humana con RHb. [65]

Para los espectros de absorción de las muestras experimental de RHb en la *Figura 31 inciso a)*, en el rango de longitudes de onda de 450 a 1000 nm, se observa una forma del espectro muy característica y también es completamente diferente a lo encontrado para las muestras experimentales de MetHb y HbO₂. En este caso el espectro de absorción posee un único máximo de absorción a 568 nm. Además, nuevamente se observa una dependencia de la absorción en función de la concentración y al igual que las muestras anteriormente analizadas, a partir de aproximadamente 650 a 1000 nm, no se presenta absorción.

En cuanto a la *Figura 31 inciso b)*, donde encontramos el espectro de absorción reportado en la literatura para la sangre humana con HbO₂ en un rango de longitudes de onda que va de 450 a 700 nm, se observa que su máximo de absorción se encuentra en 555 nm.

Como se puede observar, el espectro de absorción experimental y el espectro de absorción reportado en la literatura para la RHb, resultan ser muy parecidos entre sí en forma, sin embargo, las muestras experimentales poseen un ligero desplazamiento en su máximo de absorción cayendo en una banda espectral muy cercana a los máximos reportados en la literatura, sin ser un corrimiento significativo.

Los espectros de absorción obtenidos para las muestras experimentales de MetHb, HbO₂ y RHb, resultan ser muy parecidos en forma a lo que se reporta en la literatura, a pesar de que en todos los casos sus máximos de absorción presentan un ligero corrimiento, caen en las mismas bandas espectrales que lo que se reporta en la literatura por lo que este desplazamiento no es significativo.

Una de las posibles causas del corrimiento del espectro puede atribuirse en principio a las características de la hemoglobina humana liofilizada que se utilizó para la obtención de las distintas variaciones de hemoglobina, ya que aunque se trata hemoglobina humana, el medio en el que ha sido resuspendida no es el mismo que el que se encuentra dentro de los eritrocitos, así que ésta característica puede estar afectando el espectro y puede ser la causa de que a su vez tampoco se presente absorción de las muestras experimentales dentro del rango de 650 a 1000 nm, pues hay que recordar que en la literatura se observa que dentro de esta banda espectral la MetHb, HbO₂ y RHb presentan absorciones ópticas muy diferentes entre sí (*Figura 11*).

La ventana de estudio para las mediciones de oximetría como se ha visto con anterioridad es justamente en el rango de longitudes de onda que va de 650 a 1000 nm, sin embargo, como se dijo anteriormente las muestras de hemoglobina experimentales que se obtuvieron no presentan absorción en este rango, por lo que se investigó en la literatura si era posible hacer estudios de oximetría en la región espectral de 450 a 650 nm, encontrándose que es posible, en experimentos in vitro, pero resultaría ser un poco más complicado en pulsioximetría pues tendría que considerarse no solo la absorción de las hemoglobinas sino también de otros elementos como la piel.

Por lo que se ha discutido anteriormente, se puede concluir que las muestras preparadas de MetHb, HbO₂ y RHb a partir de hemoglobina humana liofilizada pueden ser perfectamente utilizadas para estudios in vitro de laboratorio y con ello se evita utilizar para la experimentación muestras de sangre de personas.

5.2 Cantidad mínima necesaria de bicarbonato (BS) y ditionito de sodio (DS) para la obtención de HbO₂ y RHb

Con el fin de saber la cantidad mínima de BS y DS necesarias para inducir el cambio de la muestra de MetHb a los otros dos tipos de hemoglobina buscados; HbO₂ y RHb, se realizó una calibración, que consistió en agregar diferentes gramajes de cada reactivo a las muestras de MetHb, posteriormente se realizaron

mediciones espectroscópicas de transmitancia para cada muestra, calculando con estos resultados sus espectros de absorción. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en las *Figura 32* y *33*.

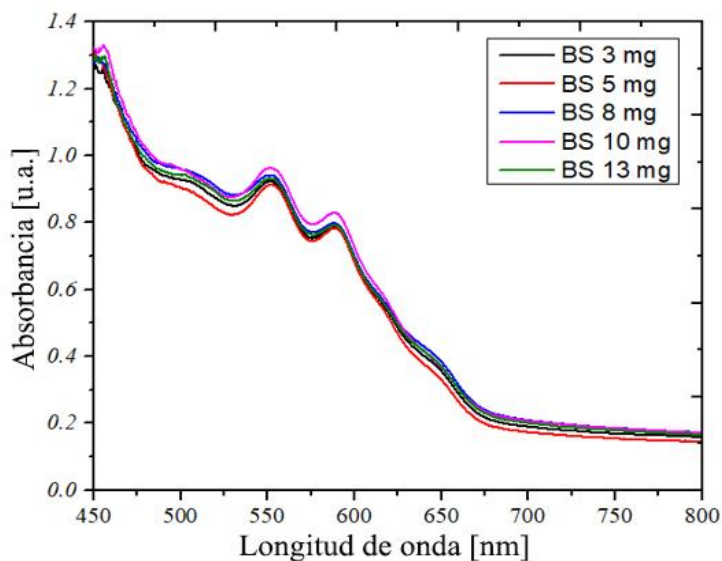


Figura 32. Se ilustran los espectros de absorción de la HbO₂, obtenidos a partir de diferentes cantidades de BS.

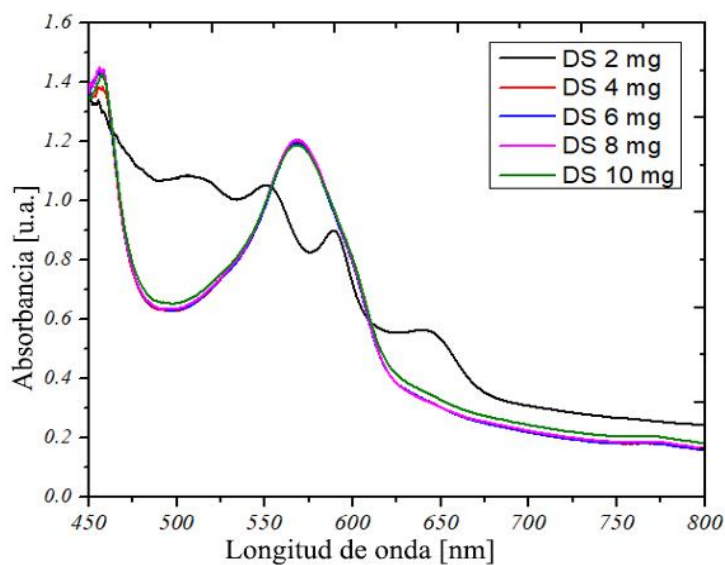


Figura 33. Se ilustran los espectros de absorción de la RHb, obtenidos a partir de diferentes cantidades de BS.

De los resultados obtenidos en las *Figura 32*, se concluye que cualquier cantidad de BS entre 3 a 13 mg logra oxigenar a la muestra.

En el caso del DS se observa en la *Figura 33* que cualquier cantidad mayor a 2 mg es suficiente para

desoxigenar a la muestra y una cantidad menor no induce la reacción química. Una observación importante es que si se agrega una cantidad elevada de DS (>10 mg) la muestra de hemoglobina comienza a formar aglomeraciones de hemoglobina aproximadamente 15 minutos después de haber preparado la muestra, estas aglomeraciones hacen que se pierda su estabilidad haciendo que sea imposible volver a utilizarse.

En la *Figura 34* se observar una muestra recién preparada de DS y las aglomeraciones de hemoglobina que se forman cuando se agregan altas cantidades de DS

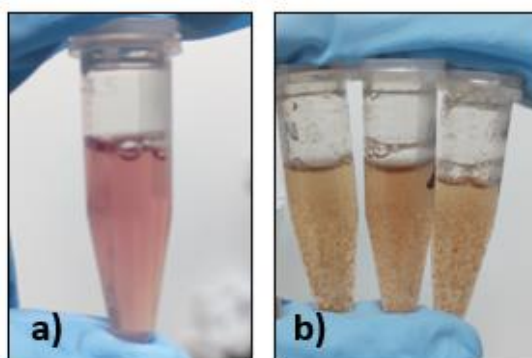


Figura 34. Se ilustran;
a) Muestra recién preparada de RHB,
b) Muestras de RHB aproximadamente 15 min después de ser preparadas con cantidades >10 mg de DS

Por lo tanto, con el fin de evitar residuos que eventualmente puedan interferir con las mediciones espectroscópicas se concluye que es suficiente utilizar la cantidad mínima de reactivo, es decir, 3mg de BS y 4 mg de DS. Una vez establecida la cantidad de reactivo a utilizar se prepararon nuevas muestras de MetHb y se indujeron las reacciones, integrando el BS y el DS a las muestras mediante agitación usando una pipeta Pasteur.

La reacción química del DS al desoxigenar la muestra de MetHb, resulta en un cambio momentáneo de coloración a un rosa, sin embargo, este cambio se hace menos evidente a la vista con el paso del tiempo, terminando en color marrón más claro que el de la muestra de MetHb. Por otro lado, la reacción química del BS al oxigenar la muestra de MetHb, también provoca un cambio de coloración, sin embargo, no es tan marcado como en el caso del ditionito de sodio, simplemente se convierte en un marrón más claro que el de la muestra de MetHb.

Los tres tipos de hemoglobina preparados se ilustran en la (*Figura 35*).

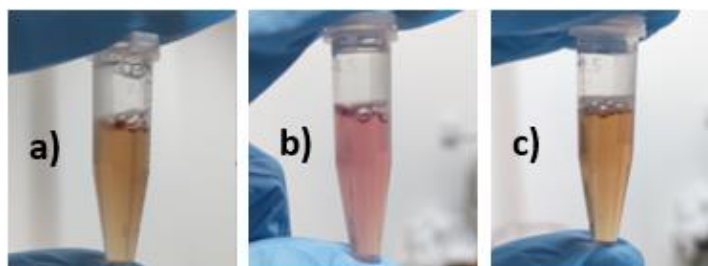


Figura 35. Muestras de; a) MetHb, b) RHB y c) HbO₂

Una vez obtenidas las muestras de los tres tipos de hemoglobina, se comprobó la estabilidad de las muestras en función del tiempo.

5.3 Estabilidad de las muestras de MetHb, HbO₂ y RHb

Con el fin de determinar qué tan estables eran las muestras experimentales de los tres tipos de hemoglobina en función del tiempo, se decidió hacer un monitoreo de estas durante una hora, guardando datos cada 5 min.

Los resultados obtenidos para la muestra de MetHb se presentan en la *Figura 36*.

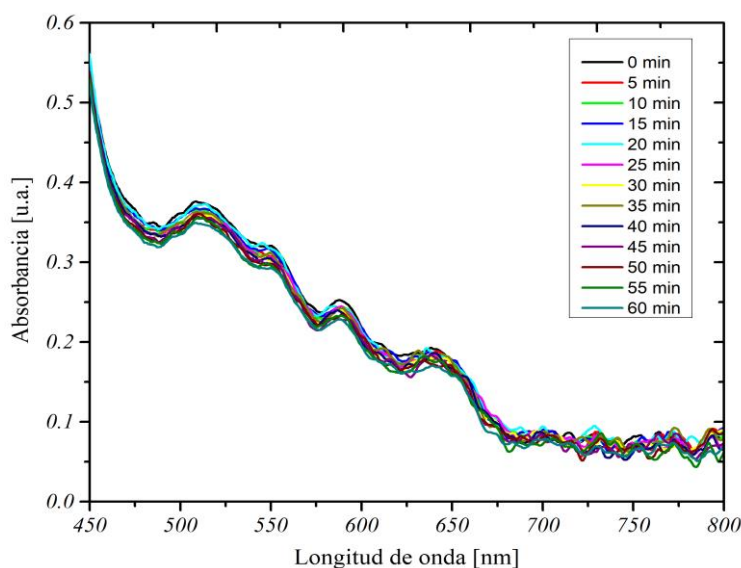


Figura 36. Monitoreo de 60 min de la muestra de MetHb.

En la *Figuras 36*, se puede observar que los espectros de absorbancia de las muestras de MetHb no cambian en función del tiempo, manteniendo su forma característica, se observa también pequeñas variaciones en cuanto a la absorción de las muestras, pero no se consideran significativas ya que parecería ser que se deben a errores sistemáticos del equipo experimental utilizado, como son, las variaciones de energía de la fuente de luz incidente utilizada.

Ahora bien, los resultados obtenidos para la muestra de HbO₂ se presentan en la *Figura 37*, donde se puede observar que los espectros de absorbancia de las muestras de HbO₂ no cambian en función del tiempo, manteniendo su forma característica, se observan nuevamente estas pequeñas variaciones de absorción de las muestras, pero no se consideran significativas ya que como se explicó con anterioridad parecería ser que se deben a errores sistemáticos del equipo experimental utilizado, como son, las variaciones de energía de la fuente de luz incidente utilizada.

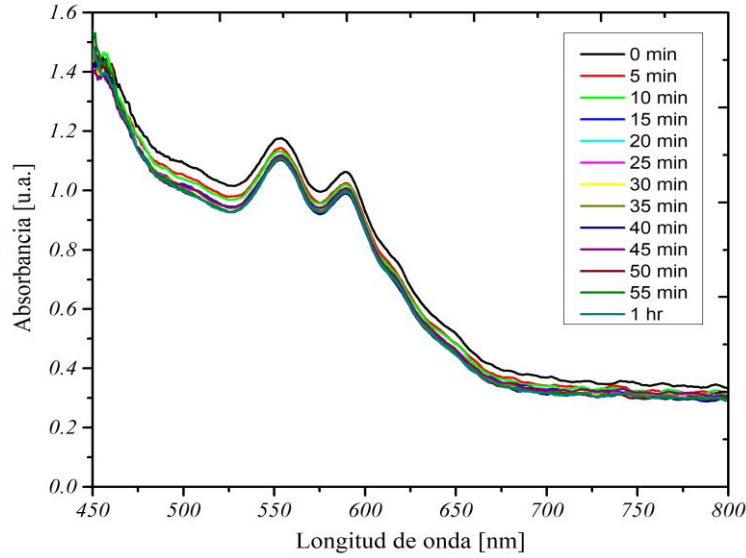


Figura 37. Monitoreo de 60 min de la muestra de HbO₂.

Finalmente, los resultados obtenidos para la muestra de RHb se presentan en la *Figura 38*, donde nuevamente se puede observar que los espectros de absorbancia de las muestras de RHb no cambian en función del tiempo, manteniendo su forma característica, también se presentan pequeños cambios de absorción en los espectros, sin embargo, no se consideran significativas ya que como se explicó con anterioridad parecería ser que se deben a errores sistemáticos del equipo experimental utilizado, como son, las variaciones de energía de la fuente de luz incidente utilizada.

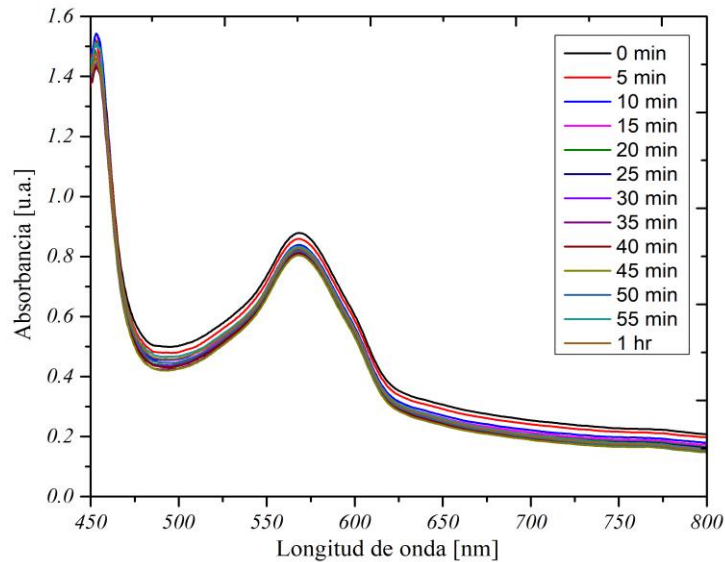


Figura 38. Monitoreo de 60 min de la muestra de RHb

Se puede concluir que las muestras de Methb, HbO₂ y RHb son muestras estables que mantienen sus

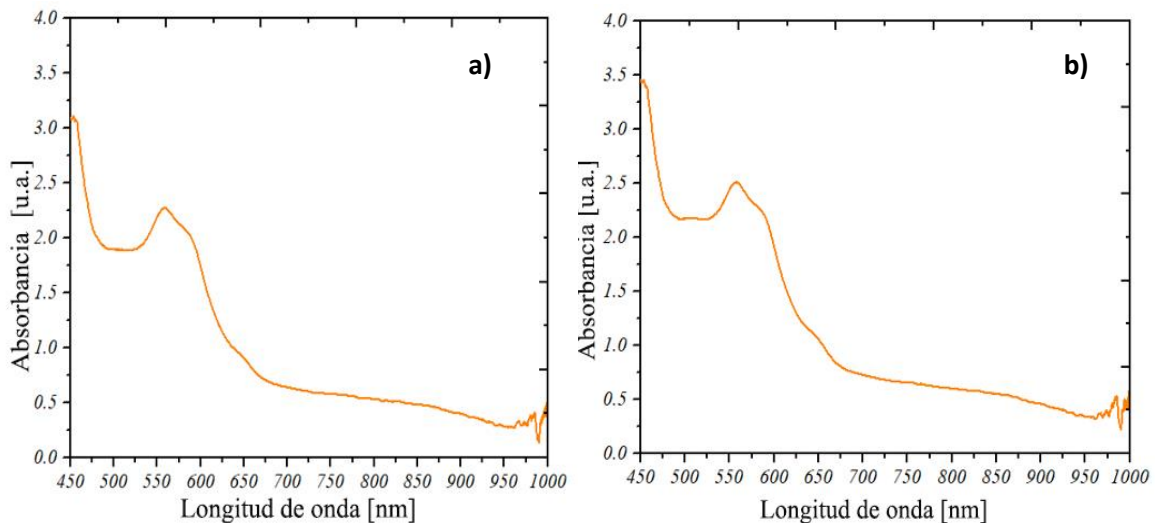
propiedades con el paso del tiempo, por lo que las mediciones y resultados que se obtengan a partir de estas muestras de hemoglobina serán confiables.

Algo importante que hay que mencionar es que se debe tener cuidado con la forma de manipular la muestra de RHb en caso de ser necesario estar cambiando constantemente la muestra de recipiente ya que se corre el riesgo de oxigenarla por completo, por lo que lo más recomendable es que durante las mediciones la muestra permanezca siempre en el mismo recipiente.

5.4 Cálculo de la SpO_2 fraccional en función de las concentraciones de HbO_2 , RHb y MetHb.

El cálculo para la estimación de las concentraciones de HbO_2 , RHb y MetHb y la estimación de la SaO_2 , se programó con ayuda del software de Matlab, aplicando el método de MLC considerando los espectros de absorción y concentraciones conocidas de los tres tipos de hemoglobina que se querían estudiar. Se consideró para el análisis el espectro de absorción de cada hemoglobina en un rango de longitudes de onda de 450 a 700 nm, ya que este es el rango donde se tiene absorción de las muestras experimentales preparadas, en cuando al cálculo realizado para las estimaciones de SaO_2 se utilizó la ecuación (3), presentada en la sección 2.5 del capítulo 2. El código programado se puede encontrar en el Apéndice III.

Como primer paso para comprobar los cálculos del programa, en el programa una combinación de diferentes valores que simulaban las diferentes concentraciones de HbO_2 , RHb y MetHb, con ello se crearon los espectros problema, que simularon cuatro casos distintos en los que se tiene un aumento gradual de MetHb. Los espectros problema obtenidos se muestran en la Figura 39.



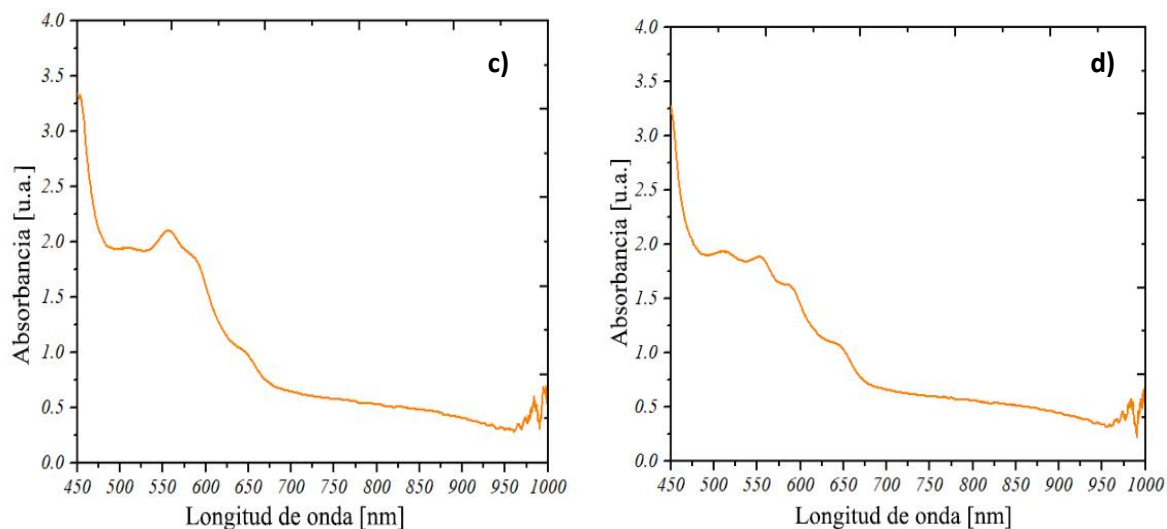


Figura 39. Se ilustra:

- a) Caso 1: Simulación de un espectro de absorción hemoglobina total, donde las concentraciones de HbO₂, RHb y MetHb se encuentran en valores normales (Tabla 6).
- b) Caso 2: Simulación de un espectro de absorción de hemoglobina total, donde existe un ligero aumento de MetHb que afecta a las HbO₂ y RHb (Tabla 7).
- c) Caso 3: Simulación de un espectro de absorción de hemoglobina total, donde existe un aumento de MetHb que comienza a comprometer a la HbO₂ y RHb (Tabla 8).
- d) Caso 4: Simulación de un espectro de absorción de hemoglobina total, donde se presenta un aumento de MetHb que lleva a una intoxicación (Tabla 9).

Los cálculos realizados para los espectros totales de la *Figura 39*, para encontrar las concentraciones de MetHb, HbO₂ y RHb, así como las estimaciones obtenidas para SaO₂ se muestran en las siguientes tablas;

Tabla 6. Resultados obtenidos para el cálculo de concentraciones y estimación de SaO₂, para el caso 1, donde las concentraciones de HbO₂, RHb y MetHb se encuentran en valores normales.

Condición: Sano	% HbO ₂	% RHb	% MetHb	% SaO ₂	% eSaO ₂
Esperada	0.105	0.079	0.026	50	0%
Experimental	0.105	0.052	0.026	57	7%

En la *Tabla 6* se observan los resultados obtenidos para el cálculo de concentraciones y estimaciones de SaO₂ para el caso 1 donde se simula un espectro de hemoglobina total en el que se tienen concentraciones de HbO₂, RHb y MetHb dentro de sus valores normales (*Figura 39*).

La *Tabla 6* se distribuye de la siguiente manera; en el primer renglón encontramos las concentraciones propuestas de HbO₂, RHb y MetHb con las que se crearon los espectros de hemoglobina total, así como la estimación de SaO₂ que se esperaba obtener del programa. Por otro lado, en el segundo renglón se tienen los resultados para el espectro se tienen los resultados para el espectro experimental de hemoglobina total, donde

el cálculo de concentraciones es igual a los valores esperados, para la HbO₂ y la MetHb, sin embargo, existe una diferencia de 0.027%, entre la RHb esperada y la calculada. En cuanto a la estimación de SaO₂, se tiene una diferencia del 7%.

Como puede observarse, en general las diferencias obtenidas en los cálculos del programa para el caso 1, son considerables, sobre todo cuando se realizan para el espectro experimental de hemoglobina total.

Tabla 7. Resultados obtenidos para el cálculo de concentraciones y estimaciones de SaO₂, para el caso 2 donde existe un ligero aumento de MetHb que afecta a las HbO₂ y RHb.

Condición: Ligero aumento de MetHb	%HbO₂	%RHb	%MetHb	% SaO₂	% eSaO₂
<i>Esperada</i>	0.105	0.079	0.052	44	0%
<i>Experimental</i>	0.105	0.052	0.052	50	6%

En la *Tabla 7* se observan los resultados obtenidos para el cálculo de concentraciones y estimaciones de SaO₂ para el caso 2 donde se simula un ligero aumento de MetHb que empieza a afectar a las HbO₂ y RHb (*Figura 39*).

La *Tabla 7* se distribuye de la siguiente manera; en el primer renglón encontramos las concentraciones esperadas de HbO₂, RHb y MetHb con las que se crearon los espectros de hemoglobina total, así como la estimación de SaO₂ que se esperaba obtener del programa. Por su parte, el segundo renglón contiene los resultados para para el espectro de hemoglobina total experimental, donde el programa calculó concentraciones de hemoglobina, encontrando concentraciones exactas para la HbO₂ y MetHb, sin embargo, se encontró una diferencia del 0.027% entre el valor esperado para la RHb esperada y la calculada. En cuanto a la estimación de SaO₂, se tiene una diferencia del 6%.

Como puede observarse, en general las diferencias obtenidas en los cálculos del programa para el caso 2, son considerables, sobre todo cuando se realizan para el espectro experimental de hemoglobina total.

Tabla 8. Resultados para el cálculo de concentraciones y estimaciones de la SaO₂ para el caso 3 donde existe un aumento de MetHb que comienza a comprometer a la HbO₂ y RHb.

Condición: intoxicación media de MetHb	% HbO₂	% RHb	% MetHb	% SaO₂	% eSaO₂
<i>Esperada</i>	0.079	0.052	0.052	42	0%
<i>Experimental</i>	0.079	0.035	0.052	47	5%

En la *Tabla 8* se observan los resultados obtenidos para el cálculo de concentraciones y estimaciones de SaO₂ para el caso 3 donde se simula un aumento de MetHb que afecta a las HbO₂ y RHb (*Figura 54*).

La *Tabla 8* se distribuye de la siguiente manera; en el primer renglón encontramos las concentraciones de HbO₂, RHb y MetHb con las que se crearon los espectros de hemoglobina total, así como la estimación de SaO₂ que se esperaba obtener del programa. Por su parte, el segundo renglón contiene los resultados para el espectro experimental de hemoglobina total, donde el programa calculó las distintas concentraciones de

hemoglobina, encontrando concentraciones exactas en el caso de la HbO₂ y MetHb, sin embargo, se muestra una diferencia de 0.017%, para la RHb entre el valor calculado por el programa y el esperado. En cuanto a la estimación de SaO₂, se tiene una diferencia del 5%.

Como puede observarse, en general diferencias obtenidas en los cálculos para el caso 3, vuelven a ser considerables sobre todo para el espectro experimental de hemoglobina total.

En la *Tabla 9* se observan los resultados obtenidos para el cálculo de concentraciones y estimaciones de SaO₂ para el caso 4 donde se presenta un aumento de MetHb que lleva a una intoxicación (*Figura 39*).

Tabla 9. Resultados para el cálculo de concentraciones y estimaciones de la SaO₂, para el caso 4, donde se presenta un aumento de MetHb que lleva a una intoxicación.

<i>grave por MetHb</i>	% HbO ₂	% RHb	% MetHb	% SaO ₂	% eSaO ₂
<i>Esperada</i>	0.052	0.026	0.105	28	0%
<i>Experimental</i>	0.052	0.019	0.105	30	2%

La *Tabla 9* se distribuye de la siguiente manera; en el primer renglón encontramos las concentraciones de HbO₂, RHb y MetHb con las que se crearon los espectros de hemoglobina total, así como la estimación de SaO₂ que se esperaba obtener del programa. Por su parte, el segundo renglón contiene los resultados para el espectro de hemoglobina total experimental, donde se observa que el cálculo de las concentraciones es exacto para la HbO₂ y MetHb, pero tiene un fallo para la RHb, mostrando una diferencia entre la concentración esperada y calculada del 0.007 %. En cuanto a la estimación de SaO₂, se observa que se tiene una diferencia del 2%.

Como puede observarse, en general las diferencias entre los cálculos y valores esperados de las concentraciones y la estimación de SaO₂ del programa para el caso 4, son considerables, y nuevamente vemos que resultan ser mucho más representativas cuando se realizan para el espectro experimental de hemoglobina total.

Como puede observarse los cálculos del programa para encontrar las concentraciones de HbO₂, RHb y MetHb, así como las estimaciones de SpO₂ presentan errores relativos bastante altos, sobre todo cuando se introducen los espectros de absorción experimentales. Probablemente, esto se deba en parte al método de análisis espectral utilizado, debido a que el método de MLC tiene la desventaja de ser un método que generalmente se aplica a factores lineales por lo que tiene algunas fallas cuando se consideran factores no-lineales, como es el caso de los espectros de absorción de la hemoglobina, donde se tienen muchísimas variaciones en la forma de este.

A pesar de lo expuesto anteriormente, se piensa que este error tan alto en los cálculos realizados por el programa se puede minimizar aumentando los elementos de la matriz de sensibilidad, con el fin de tener un mayor rango de datos con los que se puedan hacer las operaciones. Además, se debe aumentar la precisión numérica, pues en los rangos numéricos establecidos para las concentraciones únicamente se consideran dos decimales. Inclusive se piensa en la posibilidad de más adelante cambiar el método de MLC por uno más robusto que nos permita realizar los cálculos de concentración y estimaciones de SaO₂ de manera más refinada.

5.5 Resultados de la eficiencia de medición fraccional en laboratorio para obtener una muestra que contiene HbO₂, RHb y MetHb

En esta sección se ilustran los resultados obtenidos en las pruebas realizadas con la cubeta diseñada en PDMS, como propuesta para obtener una medición del espectro de absorción de una muestra que contenga HbO₂, RHb y MetHb.

Se inicia el análisis con la *Figura 40*, donde se hace comparación de los espectros de absorción obtenidos por un lado con la cubeta de PDMS y por otro con la celda de plástico del espectrofotómetro. El interior de estas dos cubetas contiene agua inyectable.

En la *Figura 40 inciso a)*, se observa el espectro de absorción de la celda de PDMS cuyos canales contenían agua inyectable, se puede ver que la celda y el agua inyectable están presentando una mínima absorción de luz, que no es significativa. Por otro lado, para la *Figura 40 inciso b)*, se tiene el espectro de absorción de la celda de plástico del espectrofotómetro en cuyo interior se encuentra el agua inyectable, observamos que no se presenta absorción de luz.

Por lo tanto, se puede concluir que tanto el molde de PDMS como la cubeta de plástico no tendrán ninguna contribución en absorción cuando se realicen mediciones de las muestras hemoglobina y los espectros que se obtengan serán únicamente provenientes de la absorción de dichas muestras.

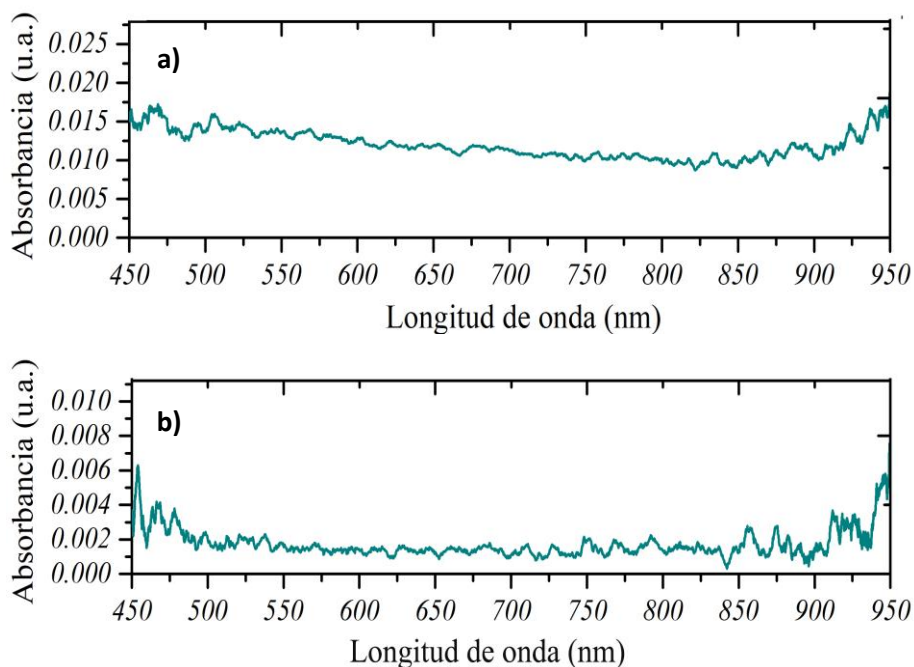


Figura 40. Espectro de absorción de:

- a) La celda de PDMS cuyos canales contienen agua inyectable.
- b) La celda de plástico del espectrofotómetro cuyos canales contienen agua inyectable

Una vez comprobado que las celdas no contribuyen en la absorción, se midieron los espectros de transmitancia de las muestras de HbO₂, RHb y MetHb, obtenidos para la celda de PDMS y la celda de plástico

del espectrofotómetro, posteriormente se calculó el espectro de absorción de cada una de las muestras de hemoglobina.

A continuación, en la *Figura 41*, se presentan los espectros de absorción obtenidos con la cubeta de PDMS y la cubeta de plástico, para la muestra de HbO₂. Lo primero que se puede observar es que los espectros de absorción de la HbO₂ medidos con las diferentes cubetas no se parecen en lo absoluto, en el espectro medido con la cubeta de plástico se observan dos máximos bien definidos en 553 nm y 588 nm, en la región espectral de 650 a 1000 nm no se presenta ninguna absorción de la muestra (estas son características propias de una muestra de HbO₂, muestra que se analizó la sección 5.1 del *capítulo 5*), por el contrario para el espectro de absorción tomado con la cubeta de PDMS se tiene una mínima absorción en la región espectral que va de 450 nm a 850 nm e inclusive se observa un máximo de absorción en 967 nm, inclusive este espectro tiene una menor absorción a comparación de lo que se observa para el espectro tomado con la cubeta de plástico.

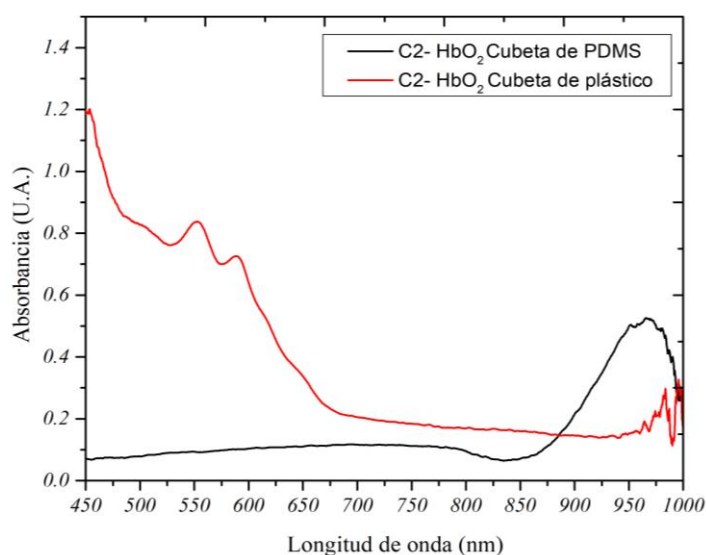


Figura 41. Espectro de absorción de la muestra de HbO₂, obtenido con la cubeta de PMDS y la cubeta de plástico del espectrofotómetro.

En conclusión, no se está obteniendo el espectro esperado para la muestra de HbO₂ con la medición realizada con la cubeta de PDMS, parecería que se pierde luz en el interior de la cubeta siendo la razón de que se esté obteniendo un espectro tan diferente al de HbO₂.

Ahora, en la *Figura 42*, se presentan los espectros de absorción obtenidos con la cubeta de PDMS y la cubeta de plástico, para la muestra de RHb.

Se observa nuevamente que los espectros de absorción de la RHb medidos con las diferentes cubetas no se parecen en lo absoluto, en el espectro medido con la cubeta de plástico se observa un máximos bien definido en 568 nm y en la región espectral de 650 a 1000 nm no se presenta ninguna absorción de la muestra (estas son características propias de una muestra de RHb, muestra que se analizó la sección 5.1 del *capítulo 5*), por el contrario para el espectro de absorción tomado con la cubeta de PDMS se tiene una absorción constante que va de 450 nm a 824 nm, después de 824 nm hay un decaimiento de luz, pero inclusive así, este espectro

tiene una absorción mayor en la región espectral de 650 a 1000 nm, a comparación de lo que se observa para el espectro tomado con la cubeta de plástico.

En conclusión, no se está obteniendo el espectro esperado para la muestra de RHb con la medición realizada en la cubeta de PDMS.

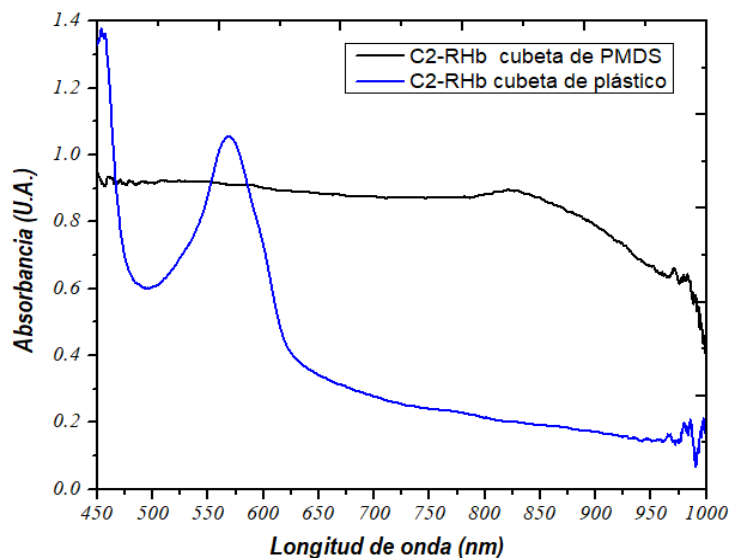


Figura 42. Espectro de absorción de la muestra de RHb, obtenido con la cubeta de PMDS y la cubeta de plástico del espectrofotómetro.

Finalmente, en la *Figura 43*, se presentan los espectros de absorción obtenidos con la cubeta de PDMS y la cubeta de plástico, para la muestra de MetHb;

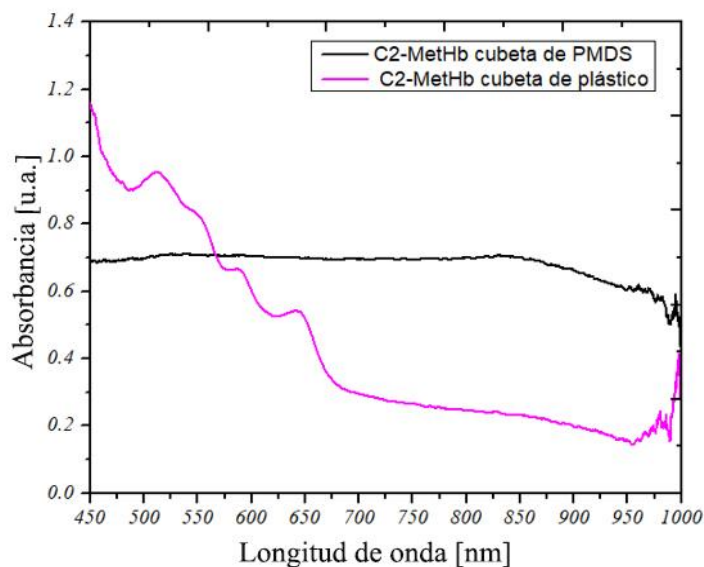


Figura 43. Espectro de absorción de la muestra de RHb, obtenido con la cubeta de PMDS y la cubeta de plástico del espectrofotómetro.

En la *Figura 43* se observa nuevamente que los espectros de absorción de la MetHb medidos con las diferentes cubetas no se parecen en lo absoluto, en el espectro medido con la cubeta de plástico se observan cuatro máximos bien definidos en 513 nm, 552 nm, 586 nm y 639 nm, además en la región espectral de 650 a 1000 nm no se presenta ninguna absorción de la muestra (estas son características propias de una muestra de MetHb, muestra que se analizó la sección 5.1 del *capítulo 5*), por el contrario para el espectro de absorción tomado con la cubeta de PDMS se tiene una absorción constante que va de 450 nm a 847 nm, después de 847 nm hay un decaimiento de luz, pero inclusive así, este espectro tiene una absorción mayor en la región espectral de 566 nm a 1000 nm, a comparación de lo que se observa para el espectro tomado con la cubeta de plástico.

En conclusión, no se está obteniendo tampoco el espectro esperado para la muestra de RHb con la medición realizada en la cubeta de PDMS.

Los resultados obtenidos en las *Figuras 41, 42 y 43* muestran que las mediciones realizadas con la cubeta de PDMS no están arrojando los espectros de absorción esperados para las muestras de HbO₂, RHb y MetHb, se observan algunas cosas, en principio los espectros de RHb y MetHb, se parecen mucho entre sí, pero con un decaimiento de la luz en diferentes longitudes de onda, es como si se tratara de la misma muestra.

Se piensa que el espectro de absorción obtenido puede ser una consecuencia directa del diseño de la cubeta de PDMS, en principio los canales que contienen las muestras se encuentran separados unos de otros, por lo que el paso de la luz tiene que atravesar varias capas hasta llegar el detector, así que es probable que se esté perdiendo luz en el camino, aunado a esto tenemos que considerar que los tres canales que contienen las muestras son totalmente lisos, pero están diseñados en forma de cilindros, por lo que se estaría propiciando un mayor esparcimiento de luz, de este modo cuando se termina el recorrido a través de la cubeta se ha perdido tanta luz que probablemente sea la causa de no estar observando los espectros de absorción esperados.

Otras de las dificultades de utilizar la cubeta de PDMS que los canales tienen diámetros pequeños y es difícil llenarlos con las muestras hemoglobina, a pesar de apoyarse con una punta de jeringa de microfluídica y si no se tiene el suficiente cuidado la hemoglobina sale del canal contaminando los otros canales.

Estos son resultados preliminares, pero queda claro que el diseño de la cubeta debe ser mejorado, para obtener los espectros de absorción esperados y posteriormente poder hacer mezclas con las diferentes concentraciones de hemoglobinas. Se propone como posible mejora de la cubeta de PDMS juntar un poco más los canales de la celda con el fin de hacer que las capas entre dichos canales sean más delgadas, por otro lado también se piensa en hacer que los canales de la cubeta ya no sean cilíndricos sino cuadrados, para evitar los efectos tan marcados del esparcimiento de la luz.

CAPITULO 6

Conclusiones

En este trabajo se propuso la realización de estudios de oximetría fraccional in vitro en laboratorio utilizando hemoglobina humana liofilizada, preparándose mediante esta hemoglobina y reacciones químicas de tres tipos de hemoglobinas; HbO₂, RHb y MetHb. Las mediciones espectroscópicas de absorción de estas muestras preparadas comparadas con los espectros de absorción reportados en la literatura para la sangre humana demostraron que la hemoglobina humana liofilizada es un buen sustituto de la sangre humana para estudios de laboratorio en el rango de longitudes de onda que va de 450 a 700 nm, debido a que de 660 a 950 nm esta hemoglobina tiene un comportamiento diferente a lo observado para las muestras de sangre de personas ya que se presentan absorciones ópticas homogéneas.

Con el fin de entender y proponer una primera solución para mediciones de oximetría fraccional, en este trabajo de tesis se restringió el análisis a la región espectral de 450 a 700 nm, logrando obtener resultados satisfactorios, de los que se hace un resumen a continuación.

En principio los análisis de transmitancia en el modelo de piel multicapa simplificado, mostraron resultados muy interesantes, cuando se aplica el estudio para los modelos de $BL_{\mu a}$ y $BL_{\sigma a}$ y no se considera la absorción de la piel, se observa que el modelo de $BL_{\sigma a}$ tiene una mayor transmitancia que el modelo de $BL_{\mu a}$ en toda la región espectral de 450 a 1000nm, específicamente se encontró que en la región de 650 a 950 nm se presentan la mayor intensidad de las curvas de transmitancia y además un comportamiento homogéneo, siendo el único cambio apreciable el cambio de transmitancia cuando se varía la concentración de MetHb, por su parte la región de 450 a 650 nm resulta ser mucho más enriquecedora en información, puesto que, aunque se tiene un comportamiento inhomogéneo de la curva existe una zona de alta sensibilidad que se encuentra en 550 a 600 nm que reacciona de manera diferente en transmitancia y cambia su comportamiento cuando se varía la concentración de MetHb, por lo que esta región espectral podría ser una buena acotación para realizar mediciones in vitro en los que se quiera monitorear a la MetHb.

Las cosas cambian cuando se agrega la contribución de la piel, ya que la forma de la curva cambia por completo, apareciendo dos máximos de transmitancia en la región espectral de 600 a 900 nm y teniendo transmitancia de nula de 450 a 600 y de 900 a 1000 nm, además de un decaimiento de la transmitancia de 4 órdenes de magnitud, lo que demuestra que la piel contribuye a la fuerte atenuación de la luz.

Por su parte, el modelo de $BL_{\sigma a, \sigma s}$ también proporciona información muy precisa, cuando no se considera la absorción de la piel y cuando se agrega su contribución los cambios de transmitancia en función de la concentración de MetHb no son apreciables, pero cuando se varía el valor de $q(\alpha)$ es cuando se notan los cambios en forma, sobre todo cuando el valor de $q(\alpha)$ esta más lejano de 1. Con estos resultados se encontró que un $q(\alpha)$ igual 1, hará que la luz se propague preferentemente hacia delante y, por tanto, el modelo $BL_{\sigma a, \sigma s}$ responderá prácticamente igual que el modelo $BL_{\mu a}$ y $BL_{\sigma a}$ pues la contribución del esparcimiento será despreciable y se tendrá un comportamiento más homogéneo. Por el contrario, cuando el valor de $q(\alpha)$ se va alejando de 1 existirá un mayor esparcimiento del medio haciendo que la transmitancia de luz en el

modelo de BL_{σ_a, σ_s} cambie completamente disminuyendo su espectro de transmitancia, pero no de manera tan drástica como lo que se observó en los modelos de BL_{μ_a} y BL_{σ_a} , pues en este caso únicamente disminuye un orden de magnitud.

Por otro lado, con el cálculo de la saturación fraccional de oxígeno en función de la estimación de la concentración de los diferentes tipos de hemoglobina estudiados mediante el análisis espectral multicomponente basado en los mínimos cuadrados clásicos, se logró realizar el cálculo de concentraciones de las diferentes hemoglobinas estudiadas en un espectro de hemoglobina total y con ello se lograron obtener los primeros cálculos para el valor estimado de la SaO_2 , sin embargo, el cálculo tiene un rango de error bastante alto, esto puede ser atribuido a diferentes factores, en principio se está utilizando un método de cálculo que generalmente se utiliza para medio homogéneos, por lo que no se están considerando por completo los factores no lineales del medio estudiado, como la forma del espectro de hemoglobina total, además de que probablemente haga falta también precisión numérica, sin embargo, como una propuesta para un primer cálculo de la SaO_2 va por buen camino, pero tendrá que irse mejorando con métodos más robustos que consideren los factores antes mencionados.

Este trabajo de tesis alcanzo sus objetivos, aportando al estudio de la oximetría fraccional la consideración de realizar estudios in vitro de laboratorio con hemoglobina humana liofilizada con el fin de no utilizar muestras de sangre de personas. El estudio de la oximetría fraccional se limitó a la consideración de la existencia únicamente de 3 derivados de hemoglobina; HbO_2 , RHb y $MetHb$, sin embargo, más adelante se piensa extender el análisis agregando la contribución de un cuarto componente, la carboxihemoglobina ($COHb$), que también tiene implicaciones importantes en las mediciones de SaO_2 , se propondrá también un método más robusto para los cálculos correspondientes mediciones de SaO_2 y adicionalmente se pretende la incorporación de un sistema de laboratorio orientado a estos estudios de oximetría fraccional in vitro.

Apéndice I

Espectros de absorción de las hemoglobinas liofilizadas HbO₂ RHb y MetHb

A continuación, se presentan los espectros de absorción y los espectros de los coeficientes de absorción de las hemoglobinas liofilizadas HbO₂, RHb y MetHb creadas en este proyecto.

Se anexa también la tabla 1 que contiene una lista de los coeficientes de extinción en función de la longitud de la longitud de onda para cada hemoglobina, en un rango de 450 a 700 nm.

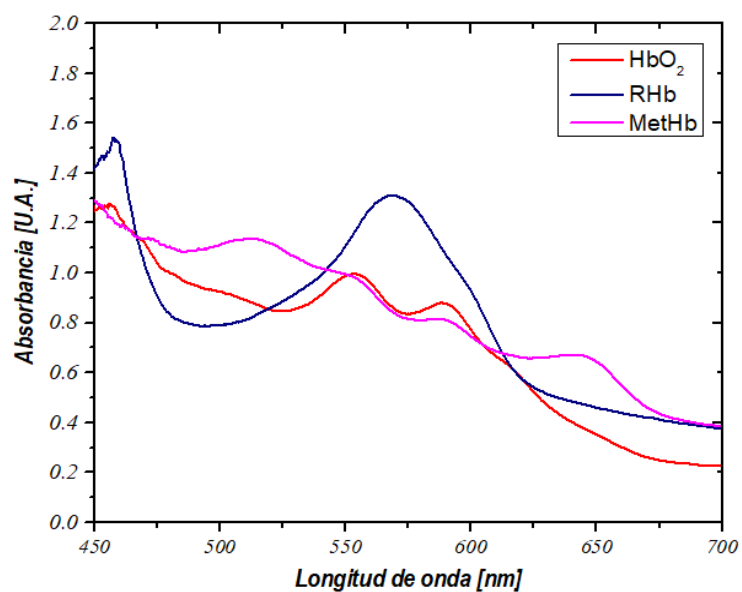


Figura 1. Espectros de absorción correspondientes a la HbO₂, RHb y MetHb.

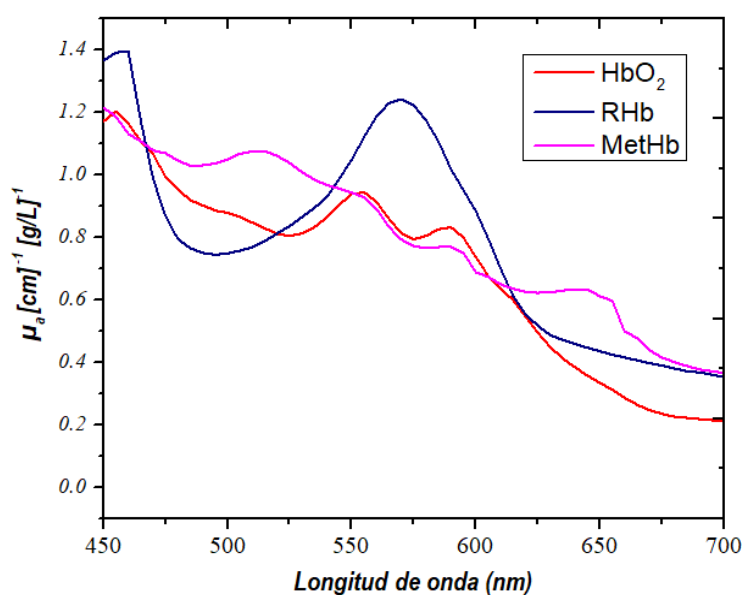


Figura 2. Coeficientes de absorción correspondientes a la HbO₂, RHb y MetHb.

Tabla 1. Coeficientes de absorción correspondientes a la HbO₂, RHb y

Longitud de onda (nm)	$\mu_a [\text{cm}]^{-1} \left[\frac{\text{g}}{\text{L}}\right]^{-1}$			Longitud de onda (nm)	$\mu_a [\text{cm}]^{-1} \left[\frac{\text{g}}{\text{L}}\right]^{-1}$		
	HbO ₂	RHb	MetHb		HbO ₂	RHb	MetHb
450	1.172	1.367	1.215	580	0.805	1.174	0.765
455	1.203	1.392	1.187	585	0.825	1.107	0.769
460	1.164	1.396	1.132	590	0.833	1.019	0.769
465	1.108	1.174	1.108	595	0.800	0.951	0.751
470	1.065	0.986	1.079	600	0.737	0.885	0.688
475	0.994	0.867	1.069	605	0.677	0.796	0.674
480	0.954	0.794	1.046	610	0.636	0.701	0.650
485	0.919	0.765	1.029	615	0.600	0.613	0.635
490	0.902	0.750	1.031	620	0.547	0.554	0.626
495	0.886	0.745	1.036	625	0.495	0.518	0.622
500	0.878	0.748	1.049	630	0.449	0.487	0.624
505	0.866	0.757	1.068	635	0.413	0.472	0.630
510	0.847	0.768	1.075	640	0.383	0.459	0.633
515	0.829	0.788	1.077	645	0.358	0.446	0.633
520	0.811	0.812	1.060	650	0.334	0.435	0.611
525	0.805	0.836	1.038	655	0.312	0.424	0.597
530	0.812	0.865	1.009	660	0.286	0.415	0.499
535	0.833	0.895	0.985	665	0.264	0.406	0.478
540	0.864	0.929	0.967	670	0.246	0.397	0.439
545	0.904	0.988	0.956	675	0.235	0.390	0.415
550	0.939	1.048	0.943	680	0.226	0.380	0.401
555	0.944	1.121	0.928	685	0.222	0.371	0.388
560	0.913	1.187	0.892	690	0.218	0.368	0.377
565	0.860	1.229	0.833	695	0.215	0.360	0.371
570	0.812	1.242	0.793	700	0.211	0.353	0.366
575	0.794	1.224	0.773	705	0.211	0.349	0.362

Apéndice II

Teorías de Esparcimiento de Luz

El esparcimiento de la luz resulta de una interacción compleja entre la onda electromagnética incidente y la estructura molecular/atómica del objeto de esparcimiento.

Cuando un rayo de luz incidente encuentra un obstáculo como una partícula de esparcimiento, existe una redirección de la luz, a medida que la onda electromagnética interactúa con la partícula discreta, las órbitas de los electrones dentro de las moléculas constituyentes de la partícula son perturbadas periódicamente con la misma frecuencia (ν_0) que el campo eléctrico de la onda incidente. La perturbación de la nube de electrones da lugar a una separación periódica de la carga dentro de la molécula, que se denomina momento dipolar inducido, este se manifiesta como una fuente de radiación electromagnética, dando lugar al esparcimiento de la luz [30].

Existen dos teorías que explican la dispersión de luz;

- **La teoría de esparcimiento de Rayleigh (llamada así en honor a Lord Rayleigh)**

Esta teoría se basa en el momento dipolar, describiendo el esparcimiento de la radiación electromagnética por partículas esféricas no absorbentes mucho más pequeñas que la longitud de onda de excitación. El esparcimiento generado ocurre en todas direcciones uniformemente y es considerado elástico debido a que la energía del fotón que incidente es igual a la energía del fotón esparcido.

La teoría se basa en la solución de las ecuaciones de Maxwell que lleva a una formulación para las secciones transversales de esparcimiento, absorción y extinción [30];

$$\sigma_{sca} = \frac{2\lambda^2}{3\pi} \alpha^6 \left| \frac{\bar{m}^2 - 1}{\bar{m}^2 + 2} \right|^2 \dots (8)$$

$$\sigma_{abs} = \frac{-\lambda^2}{\pi} \alpha^3 \text{Im} \left\{ \frac{\bar{m}^2 - 1}{\bar{m}^2 + 2} \right\} \dots (9)$$

$$\sigma_{ext} = \sigma_{sca} - \sigma_{abs} \dots (10)$$

Como se observa en las ecuaciones (8) y (9), la sección transversal de esparcimiento es proporcional a la 6ª potencia del tamaño de la partícula (α^6), mientras que la sección transversal de absorción es proporcional a la 3ª potencia (α^3). Para el régimen de Rayleigh, el parámetro de tamaño debe ser mucho menor que la unidad, por lo que la contribución del esparcimiento a la sección transversal de extinción total generalmente se desprecia para una partícula absorbente y por lo tanto se asume que $\sigma_{ext} = \sigma_{abs}$. Sin embargo, para una partícula dieléctrica $\sigma_{ext} = \sigma_{sca}$ ya que la contribución de la absorción es idéntica a cero ($\sigma_{abs} = 0$). [30] [32]

- **La teoría del esparcimiento de Mie (en honor a Gustav Mie, 1908).**

Es una teoría físico-matemática más completa para el esparcimiento de luz de partículas esféricas (absorbentes o no absorbentes), siendo una teoría válida para partículas esféricas de dispersión grandes y pequeñas, sin embargo, sus formulaciones funcionan mejor en tamaños de partículas que son comparables a la longitud de onda de la luz, en lugar de mucho más pequeñas o mucho más grandes [32].

Esta teoría se basa en la solución de la ecuación de Maxwell para un obstáculo esférico homogéneo con excitación de onda plana, a partir de la cual se puede obtener la ecuación de onda vectorial en coordenadas esféricas. Haciendo uso de la separación de variables, se puede expresar la solución de los campos eléctricos y magnéticos de la onda incidente en forma de funciones matemáticas.

Además el campo esparcido se representa como una serie infinita de campos de multipolos esféricos, que son ortogonales a la superficie de una esfera, de este modo las secciones de esparcimiento y de extinción se pueden determinar en función de una serie infinita que contiene asociados los polinomios de Legendre y las funciones esféricas de Bessel., llegando a las siguientes ecuaciones para las secciones transversales [30];

$$\sigma_{ext} = \frac{\lambda^2}{2\pi} \sum_{n=1}^{\infty} (2n + 1) Re\{a_n + b_n\} \dots (11)$$

$$\sigma_{sca} = \frac{\lambda^2}{2\pi} \sum_{n=1}^{\infty} (2n + 1) (|a_n|^2 + |b_n|^2) \dots (12)$$

$$\sigma_{abs} = \sigma_{ext} - \sigma_{sca} \dots (13)$$

Según la dispersión de MIE, se produce más dispersión hacia delante que en ninguna otra dirección y conforme aumenta el tamaño de la partícula, la dispersión hacia delante también aumenta.

La teoría de Mie puede utilizarse para describir la mayoría de los sistemas de dispersión de partículas esféricas, incluida la dispersión de Rayleigh. Sin embargo, en general se prefiere la teoría de dispersión de Rayleigh, en caso de ser aplicable, debido a la complejidad de las formulaciones de la dispersión de Mie.

Apéndice IIII

El código utilizado para los cálculos de concentraciones y estimaciones de SaO₂, se detalla a continuación;

```
clear all
close all
clc

% Datos importados
[var]= xlsread('Experimental.xlsx','coef','A2:H52');
Lambda= var(:,1);% longitudes de onda en un rango de 450-700 nm
Eoxy = var(:,2); % Coeficientes de absorción de la HbO2 en [(cm-1)(g/L)-1]
Edes = var(:,3); % Coeficientes de absorción de la RHb en [(cm-1)(g/L)-1]
Emet = var(:,4); % Coeficientes de absorción de la MetHb en[(cm-1)(g/L)-1]

%Espectro de absorción experimental de hemoglobina total
Caso1= var(:,5);
Caso2= var(:,6);
Caso3= var(:,7);
Caso4= var(:,8);
L=1; %camino recorrido por la luz en cm

% Se crean espectros de hemoglobina total, que están formadas por
% concentraciones de HbO2, RHb y MetHb conocidas
A1= L*(0.94*Eoxy + 0.05* Edes + 0.01*Emet);
A2= L*(0.90*Eoxy + 0.05* Edes + 0.04*Emet);
A3= L*(0.80*Eoxy + 0.05* Edes + 0.15*Emet);
A4= L*(0.55*Eoxy + 0.05* Edes + 0.33*Emet);
A5= L*(0.58*Eoxy + 0.05* Edes + 0.42*Emet);
A6= L*(0.50*Eoxy + 0.05* Edes + 0.45*Emet);
A7= L*(0.45*Eoxy + 0.05* Edes + 0.50*Emet);
A8= L*(0.76*Eoxy + 0.03* Edes + 0.20*Emet);

%Matriz de espectros de hemoglobina
total,
Y = [A1'; A2'; A3'; A4'; A5'; A6'; A7'; A8'];

%Matriz de concentraciones de HbO2
k1 = [0.94; 0.90; 0.80; 0.55; 0.58; 0.50; 0.45; 0.76];

%Matriz de concentraciones de RHb
k2 = [0.05; 0.05; 0.05; 0.05; 0.05; 0.05; 0.05; 0.05];

%Matriz de concentraciones de MetHb
k3 = [0.01; 0.04; 0.15; 0.33; 0.42; 0.45; 0.50; 0.20];

%Matriz de concentraciones de HbO2, RHb y MetHb
X = [k1 k2 k3];

%Matriz de sensibilidad
S = pinv(X'*X)*X'*Y;
```



```

%Pruebas del programa:
% PRUEBA 1: Se introduce un espectro experimental en el código.

a1= 1.05*Eoxy + 0.7875* Edes + 0.2625*Emet; %Espectro 1
a2= 1.05*Eoxy + 0.7875* Edes + 0.525*Emet; %Espectro 2
a3= 0.7875*Eoxy + 0.525* Edes + 0.525*Emet; %Espectro 3
a4= 0.525*Eoxy + 0.2625* Edes + 1.05*Emet; %Espectro 4
Mp=a1;

%Cálculo de las concentraciones de HbO2, RHb y MetHb para el espectro teórico
"a1"
Xp1 = (Mp'/S);

%Estimación de la SaO2 a partir de las concentraciones de HbO2, RHb y MetHb
encontradas para el espectro teórico "a1"
SaO2= (Xp1(:,1)./(Xp1(:,1)+Xp1(:,2)+Xp1(:,3)))*100;

%Los resultados obtenidos se muestran en pantalla
disp('Las concentraciones aproximadas de las variaciones de hemoglobina,
para el espectro mezcla son: ')
disp(' %HbO_2 %RHb %MetHb')
disp(Xp1)

disp('La saturación de oxígeno es:')
disp(SaO2)

```

Referencias

- [1] A. Gaviria Uribe, L. F. Correa Serna, C. E. Dávila Guerrero, G. Burgos Bernal, E. d. J. Osorio Saldarriaga, W. Marquiño, W. Marquiño, A. Suanca Sierra y L. Arciniegas Millan, «Uso e interpretación de la oximetría de pulso, Convenio 519 de 2015,» Bogotá D.C., agosto 2016.
- [2] A. Huong y X. Ngu, «Noninvasive diagnosis of carbon monoxide poisoning using Extended Modified Lambert Beer Model,» de *2014 2nd International Conference on Electronic Design (ICED)*, Penang, Malaysia, 2014.
- [3] R. P. Buinevicius y J. G. Webster, «A Three-Wavelength Pulse Oximeter for Carboxyhemoglobin Determination,» *Journal of Iranian Association of Electrical and Electronics Engineers*, vol. 5, nº 1-7, 2008.
- [4] Y. Mendelson, «A Multiwavelength VIS-NIR Spectrometer for Pulsatile Measurement of hemoglobin Derivatives in Whole Blood,» *18th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society.1.3.2: Cardiopulmonary Diagnostic Instrumentation and Data Analysis I1*, pp. 134-135, 1996.
- [5] M. Oura, N. Kobayashi, S. Yamamori, S. Takeda, K. Iwasaki y M. Umezu, «Calibration system for pulse spectrophotometry using a double-layer pulsation flow-cell,» *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc. 2009*, pp. 896-899, 2009.
- [6] H. Suzuki, N. Kobayashi, T. Nagaoka, K. Iwasaki, M. Umezu, S. Takeda y T. Togawa, «Noninvasive measurement of total hemoglobin and hemoglobin derivatives using multiwavelength pulse spectrophotometry -In vitro study with a mock circulatory system,» de *2006 International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, New York, NY, USA, 2006.
- [7] J. Moraleda, *Pregrado de Hematología*, 4º ed., Luzán, 2017, p. 740.
- [8] Ortega Scoane A. (Q.F.B.), *Atlas de Hematología, con interpretación de histogramas y escategamas*, 1º ed., Buenos Aires, Argentina: EC, 2002, p. 78.
- [9] «Hemoglobina,» *Enciclopedia Británica*, 13 noviembre 2022. [En línea]. Available: <https://www.britannica.com/science/hemoglobin>.
- [10] W. Brian, «Analysis of Carbon monoxide,» *Annals of Clinical Biochemistry*, vol. 4, nº 39, pp. 378-391, 2002.
- [11] G. Oliu, S. Nogué y O. Miró, «Intoxicación por monóxido de carbono: claves fisiopatológicas para un buen tratamiento,» *Comisión de Formación Continuada. Sistema Nacional de Salud.*, nº 22, pp. 451-459, 2010.

- [12] CDC, «Prevenga el envenenamiento por monóxido de carbono.» Departamento de Salud y Servicios Humanos, Gobierno USA. Atlanta, USA., 2016. [En línea]. Available: <https://www.cdc.gov/spanish/especialescdc/enve>.
- [13] A. Sibón, P. Martínez, M. Vizcaya y J. Romero, «Intoxicación por monóxido de carbono. Cuadernos de Medicina Forense.» vol. 13, nº 47, pp. 65- 69, 2007.
- [14] H. Buchelli, R. Fernández, G. Rubinos, C. Martínez, F. Rodríguez y P. Casan, «Niveles elevados de carboxihemoglobina: fuentes de exposición a monóxido de carbono. Archivos de Bronconeumología.» *Elsevier*, vol. 50, nº 11, pp. 465-468., 2014.
- [15] . P. Bolaños Morera y C. Chacón Araya, «Intoxicacion por monoxido de carbono,» vol. 34, nº 1, pp. 137-146, Marzo 2017.
- [16] M. T. Bartolomé Navarro, . V. Pilar Amores, N. Gallego Giménez y E. Cuesta Vizcaíno, «Intoxicación por Monóxido de Carbono: una patología poco valorada en Urgencias,» *Revista Clínica de Medicina de Familia*, vol. 3, nº 3, octubre 2010.
- [17] F. J. Castellano, L. A. Monges, M. F. Martínez y A. I. Aguirre Céliz, «Metahemoglobinemia grave de origen desconocido: respuesta al tratamiento con ácido ascórbico,» *Revista Ludovica Pediátrica*, vol. 23, nº 1, pp. 5-10, Marzo 2020.
- [18] J. L. Pazos, «Metahemoglobinemia.Libro electrónico de toxicología clínica.».
- [19] D. J. P. Ortega García, «Monitoreo respiratorio. Oximetría del pulso,» *Monitorización y Anestesia*, vol. Vol. 36, , nº Supl. 1, pp. S104-S105, Abril- Junio 2013.
- [20] S. Barker, J. Curry, D. Redford y S. Morgan, «Measurement of carboxyhemoglobin and methemoglobin by pulse oximetry: a human volunteer study,» *Anesthesiology*, vol. 105, nº 5, pp. 892-897, Noviembre 2006.
- [21] J. Eisenkraft, «The effect of carbon monoxide inhalation on pulse oximetry and transcutaneous PO₂,» *Anesthesiology*, vol. 66, nº 5, pp. 677-679., 1987.
- [22] . K. A., A. A., B. T., P. R. D., C. D., . P. S., . J. J. y M. S., «Reflectance Pulse Oximetry for Blood Oxygen Saturation Measurement from Diverse Locations-A Preliminary Analysis,» de *International Symposium on Medical Measurements and Applications (MeMeA),IEEE*, 2018.
- [23] J. P. Kock y L. Tarassenko, «In vitro investigation of the factors affecting pulse oximetry,» *Journal of biomedical engineering*, vol. 13, nº 1, pp. 61-66, 1991.
- [24] «Tejidos. Membranas. Piel. Derivados de la Piel,» *Infermera virtual*, [En línea]. Available: <https://www.infermeravirtual.com/files/media/file/95/Tejidos%2C%20membranas%2C%20piel%20y%20derivados.pdf?1358605323>.

- [25] A. E. Karsten, A. Singh, P. A. Karsten y M. W. H. Braun, «Diffuse reflectance spectroscopy as a tool to measure the absorption coefficient in skin: system calibration,» *Lasers Med. sci.*, vol. 28, nº 3, pp. 437-444, 2013.
- [26] . T. e. a. Pfefer, «REflectance-based determination of optical properties in highly attenuating tissue,» *J. Biomed. Opt.*, vol. 8, nº 2, p. 206, 2003.
- [27] I. J. Bigio y S. Fantini, *Quantitative biomedical optics; theory, methods, and applications*, 1er ed., Cambridge University Press, 2016, p. 698.
- [28] J. Campoya, R. Alcarriab y A. González-Marcos, «Estudio del comportamiento óptico de pieles utilizando técnicas de Monte Carlo,» *Revista Internacional de Métodos Numéricos para Cálculo y Diseño en Ingeniería*, vol. 31, nº 3, pp. 161-170, 2015.
- [29] S. L. Jacques y . S. A. Prah, «Definition and units of absorption coefficient μ_a [cm⁻¹],» Oregon Medical Laser Center, 1998. [En línea]. Available: <https://omlc.org/classroom/ece532/class3/muadefinition.html>.
- [30] D. W. Hahn, «Light Scattering Theory,» *Department of Mechanical and Aerospace Engineering, University of Florida.*, Julio Julio 2009.
- [31] S. L. Jacques y S. A. Prah, «Definition and units of scattering coefficient,» Oregon Medical Laser Center, 1998. [En línea]. Available: <https://omlc.org/classroom/ece532/class3/musdefinition.html>.
- [32] Y. A. Eremin, «Scattering Theory,» de *Encyclopedia of Modern Optics*, Moscow, Russia, 2005, pp. 326-330.
- [33] J. Webster, *Design of Pulse Oximeters*, J. Webster, Ed., CRC Press, 1997.
- [34] M. W. Wukitsch, M. T. Petterson, D. R. Tobler y J. A. Pologe, «Pulse oximetry: Analysis of theory, technology, and practice,» *Journal of Clinical Monitoring*, vol. 4, nº 4, p. 290–301, 1988.
- [35] C. Bohren y . D. Huffman, *Absorption and scattering of light by small particles*, New York: Jhon Wiley & sons, 1983.
- [36] V. Twersky, «Interface Effects in Multiple Scattering by Large, Low-Refracting, Absorbing Particles,» *Journal Of The Optical Society Of America*, vol. 60, nº 7, pp. 908-9014, 1970.
- [37] J. Valladares-Pérez, F. C. Cortés Ortégón, A. García Valenzuela y C. Sánchez Pérez, «Analysis of light transmission in skin tissue considering scattering condition in Beer-Lambert type models,» 2022.
- [38] H. Ding, J. Q Lu, W. A. Wooden, P. J. Kragel y . X. H. Hu, «Refractive indices of human skin tissues at eight wavelengths and estimated dispersion relations between 300 and 1600 nm.,» *Phys Med Biol.*, vol. 51, nº 6, pp. 1479-89, 2006.

- [39] A. Krishnaswamy y G. V. Baranoski, «A Study on Skin Optics. Natural Phenomena Simulation Group,» *School of Computer Science, University of Waterloo, Canada.*, 2004.
- [40] G. V. G. Baranoski, «Natural Phenomena Simulation Group,at.<http://www.npsg.uwaterloo.ca/data/blood.php>,» [En línea]. Available: <http://www.npsg.uwaterloo.ca/data/blood.php>.
- [41] O. Belgacem, A. Buchacher , K. Pock y D. Josic, «Molecular mass determination of plasma-derived glycoproteins by ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry with internal calibration,» *J. Mass Spectrom.*, vol. 37, nº 11, pp. 1118-1130, 2002.
- [42] «Theme 1.2 Characteristics and composition of blood,» [En línea]. Available: <https://ocw.unican.es/mod/page/view.php?id=544#:~:text=1.2%20Caracter%C3%ADsticas%20y%20composici%C3%B3n%20de,celulares%20y%20a%20los%20solutos%20macromoleculares>.
- [43] O. Vázquez-Estrada O y A. García-Valenzuela , «Reflectivity and transmissivity of a surface covered by a disordered monolayer of large and tenuous particles: theory versus experiment,» *Appl Opt*, vol. 56, nº 25, pp. 7158-7166, 2017.
- [44] «MANUAL MSD. Version para publico general,» [En línea]. Available: https://www.msdmanuals.com/es-ar/hogar/multimedia/table/v12857021_es.
- [45] T. Y. Tu y P. C. Chao, «Continuous blood pressure measurement based on a neural network scheme applied with a cuffless sensor,» *Microsyst Technol*, vol. 24, p. 4539–4549, 2018.
- [46] . D. R. Ferrier, Bioquímica, L. W. & Wilkins, Ed., WOLTERS KLUWER, 2017, p. 576 .
- [47] O. Zhernovaya, O. Sydoruk, V. Tuchin y A. Duoplik, «The refractive index of human hemoglobin in the visible range,» *Physics in Medicine and Biology*, vol. 56, pp. 4013-4021, 2011.
- [48] O. Sydoruk, O. Zhernovaya, V. Tuchin y A. Douplik, «Refractive index of solutions of human hemoglobin from the near-infrared to the ultraviolet range: Kramers-Kronig analysis,» *Journal of Biomedical Optics*, vol. 17, nº 11, 2012.
- [49] E. Mieczkowska, R. Koncki y L. Tymecki, «Hemoglobin determination with paired emitter detector diode,» *Anal Bioanal Chem*, vol. 399, nº 9, pp. 3293-3297, 2010.
- [50] A. H. Kamal, S. F. El-Malla y S. F. Hammad, «A Reviw on UV Spectrophotometric Methods for Simultaneous Multicomponent Analysis,» *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, vol. 3, nº 2, pp. 348-360, 2016.
- [51] J. Ferré, «Grupo de Quimiometría, Cualimetría y Nanosensores,» [En línea]. Available: <http://www.quimica.urv.es/quimio/general/calmul.pdf>.

- [52] T. e. Polímeros, «El Polidimetilsiloxano,» 9 octubre 2017. [En línea]. Available: <https://todoenpolimeros.com/2017/10/09/polidimetilsiloxanos/>.
- [53] A. P. S. Mohamed Tanveejul, A. Annamol , S. Preejith, D. Chistopher , Balamugesh, C. Sujith , J. Jayaraj y S. Mohanasankar , «A Study on the Subject and Location Specificity in Reflectance based SpO2 Estimation using R-value based Calibration Curve,» *2020 IEEE International Symposium on Medical Measurements and Applications (MeMeA)*, pp. 1-6, 2020.
- [54] V. Blazek, J. Kumar V., S. Leonhardt y M. Mukunda Rao, «Capítulo 3: Pulse Oximetry for the Measurement of Oxygen Saturation in Arterial Blood,» de *Studies in Skin Perfusion Dynamics Photoplethysmography and its Applications in Medical Diagnostics*, 2021st ed., Springer, 26 de marzo 2021, pp. 51-78.
- [55] A. M. Luks y E. R. Swenson, «Pulse Oximetry for Monitoring Patients with COVID-19 at Home. Potential Pitfalls and Practical Guidance,» *Ann Am Thorac Soc.*, vol. 17, nº 9, pp. 1040-1046, Sep 2020.
- [56] A. Kiruthiga , T. Annamol, T. Balamugesh , R. Dinesh Prabhu, D. Christopher , S. Preejith , J. Jayaraj y . S. Mohanasankar, «Reflectance Pulse Oximetry for Blood Oxygen Saturation Measurement from Diverse Locations-A Preliminary Analysis,» *2018 IEEE International Symposium on Medical Measuments and Applications (MeMeA)*, pp. 1-6, 2018.
- [57] G. L.-H. GP., «Oximetría de pulso: A la vanguardia en la monitorización no invasiva de la oxigenación,» *Revista médica del Hospital General de México, SS.*, vol. 66, nº 3, pp. 160-169, Jul-sep 2003.
- [58] M. Tanveejul, . P. S. Arsath , A. Annamol , S. Preejith, D. Chistopher , Balamugesh, Chandy, J. Jayaraj , Mohanasankar y Sivaprakasam, «A Study on the Subject and Location Specificity in Reflectance based SpO2 Estimation using R-value based Calibration Curve,» *2020 IEEE International Symposium on Medical Measurements and Applications (MeMeA)*, pp. 1-6, 2020.
- [59] GP. y G. López-Herranz, «Oximetría de pulso: A la vanguardia en la monitorización no invasiva de la oxigenación,» *Revista médica del Hospital General de México, SS.*, vol. 66, nº 3, pp. 160-169, Jul-sep 2003.
- [60] «La respiración celular en el músculo,» [En línea]. Available: http://uapas2.bunam.unam.mx/ciencias/respiracion_celular_musculo/ .
- [61] B. N. d. Medicina., «Capas de la Piel,» Mediline Plus, Enciclopedia Médica , 13 11 2021. [En línea]. Available: https://medlineplus.gov/spanish/ency/esp_imagepages/8912.htm.
- [62] Y. Mendelson and J. C. Kent, «An in vitro tissue model for evaluating the effect of carboxyhemoglobin concentration on pulse oximetry,» in *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 36, nº 6, pp. 625-627, junio 1989.

- [63] L. F. Corral Martínez, «Tomografía Óptica Difusa Por Transiluminación,» León Guanajuato, México, 2015.
- [64] J. Carretas, «Web de SlideShare. Carboxihemoglobina-Caso clínico,» [En línea]. Available: <http://es.slideshare.net/JacquelinCarretas/>. [Último acceso: 2023].
- [65] A. Yartsev , «Deranged Physiology (A free online resource for Intensive Care Medicine). Respiratory system. Absorption spectroscopy of haemoglobin species,» 1 Marzo 2020. [En línea]. Available: <https://derangedphysiology.com/main/cicm-primary-exam/required-reading/respiratory-system/Chapter%20121/absorption-spectroscopy-haemoglobin-species>.
- [66] J. Marin Gonzalez, «Web de SlideShare. Síntesis de la hemoglobina,» 11 junio 2013. [En línea]. Available: <https://es.slideshare.net/JesusMarinGonzalez/sintesis-de-la-hemoglobina>.
- [67] A. Bülbül y . S. Küçük , «Pulse Oximeter Manufacturing & Wireless Telemetry for Ventilation Oxygen Support.,» *International Journal of Applied Mathematics, Electronics and Computers*, 2016.