



**Universidad
de Valparaíso**
CHILE

FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA CIVIL BIOMÉDICA

DISEÑO Y DESARROLLO DE UN SENSOR DE LACTATO DE USO CLÍNICO PARA MEDICIÓN NO INVASIVA Y EN TIEMPO REAL

KRISNA ANTONELLA MARTÍNEZ PLAZA

Trabajo para optar al Título de
Ingeniera Civil Biomédica

Profesor Guía:
ALEJANDRO WEINSTEIN O
Profesor Co-Guía:
CHRISTIAN GUZMÁN C

Julio - 2023

VALPARAÍSO ::: CHILE



Universidad de Valparaíso
Facultad de Ingeniería
Escuela de Ingeniería Civil Biomédica

Información para registro oficial en Biblioteca:

- Proyecto de Ingeniería Biomédica: Área Proyecto en Institución Externa
- Prof. Coordinador del Área: Alejandro Weinstein
- Prof. Guía: Alejandro Weinstein
- Prof. Co-Guía: Christian Guzmán
- Prof. Corrector: Luis Arredondo
- Prof. Presidente Comisión: Luis Arredondo
- Palabras clave: Sensor de lactato, No invasivo, Uso clínico

Autorización del prof. Guía:

- Fecha versión final para depósito en Biblioteca UV: 04/ 10/ 2023
- Nombre Prof. Guía: ALEJANDRO WEINSTEIN OPPENHAIMER

- V°B° Prof. Guía:

A. Weinstein D.

Dedicatoria

A mis padres, Claudio y Yasna, en reconocimiento a todo el sacrificio que han realizado para darme las oportunidades que me han permitido llegar a este punto.

A mi hermano, familia y a todas las personas que me han entregado sus palabras de aliento, cariño y buenos deseos antes y durante este proceso.

Gracias a cada uno de ustedes por creer en mí.

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a Sky-Walkers, en especial a Ximena Riveros por brindarme la oportunidad de llevar a cabo mi proyecto final de título en sus instalaciones. La experiencia ha sido enriquecedora y ha tenido un impacto significativo en mi desarrollo académico y profesional.

Asimismo, agradecer a Christian Dani Guzmán por compartir sus conocimientos conmigo, por su disponibilidad y paciencia. Sus perspectivas y sugerencias contribuyeron en gran medida a dar forma a este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	7
2. MARCO TEÓRICO	9
2.1 LACTATO	9
2.2 HIPERLACTATEMIA Y ACIDOSIS LÁCTICA	9
2.3 MÉTODOS ACTUALES DE MEDICIÓN DE LACTATO	10
2.3.1 Sensores electroquímicos	10
2.3.2 Sensores ópticos	10
2.4 LEY DE BEER-LAMBERT	10
2.5 ESPECTRO INFRARROJO CERCANO	11
2.6 MOLARIDAD Y DILUCIÓN	11
2.7 SENSIBILIDAD Y ERROR EXPERIMENTAL	12
2.8 MÉTODOS DE REGRESIÓN: SUPPORT VECTOR REGRESSION	12
3. METODOLOGÍA E IMPLEMENTACIÓN	13
3.1 ESTADO DEL ARTE	13
3.2 DISEÑO DEL DISPOSITIVO	15
3.2.1 Requerimientos del instrumento	15
3.2.2 Descripción técnica del diseño	15
3.2.2.1 Óptica	16
3.2.2.2 Electrónica	18
3.2.2.3 Software	19
3.2.2.4 Encapsulado	20
3.2.3 Pruebas iniciales de funcionamiento	21
3.3 ALGORITMO DE PROCESAMIENTO PARA ESTIMACIÓN DE LACTEMIA	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1 FASE PRELIMINAR DE EXPERIMENTOS	23
4.1.1 Experimento con solución inyectable	23
4.1.2 Experimento con sangre de cerdo	25
4.2 EXPERIMENTOS DE CALIBRACIÓN CON FILTRO DE DENSIDAD NEUTRAL	27
4.3 EXPERIMENTO DE VALIDACIÓN CON AGUA DESMINERALIZADA	29
5. CONCLUSIÓN	31
6. REFERENCIAS	32
7. ANEXOS	34
7.1 ANEXO 1: METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA DE LITERATURA	34
7.2 ANEXO 2: MODOS DE FUNCIONAMIENTO DE LEDs NIR	36
7.3 ANEXO 3: ESQUEMÁTICOS ELECTRÓNICOS DE LA TARJETA CONTROLLER	37
7.4 ANEXO 4: ESQUEMÁTICO ELECTRÓNICO DE LA TARJETA DETECTOR	40

7.5 ANEXO 5: PLANOS DE PIEZAS DEL ENCAPSULADO	41
7.6 ANEXO 6: MEDICIÓN DE ALINEACIÓN DE LEDs Y FOTODIODOS NIR	44
7.7 ANEXO 7: RESUMEN DE VALORES DE MEDICIONES INICIALES	45
7.8 ANEXO 8: MEDICIONES PARA AJUSTE DE RESISTENCIAS EN LEDs	46
7.9 ANEXO 9: ALGORITMO DE ESTIMACIÓN DE LACTEMIA	47
7.10 ANEXO 10: CIRCUITO DE MEDICIÓN PARA EXPERIMENTOS PRELIMINARES	49
7.11 ANEXO 11: CÁLCULOS Y PROCEDIMIENTO PARA EXPERIMENTO CON SOLUCIÓN INYECTABLE	55
7.12 ANEXO 12: CÁLCULOS Y PROCEDIMIENTO PARA EXPERIMENTO CON SANGRE DE CERDO	58
7.13 ANEXO 13: RELACIÓN ENTRE VOLUMEN Y CAMINO ÓPTICO	61
7.14 ANEXO 14: CÁLCULOS Y PROCEDIMIENTO PARA SOLUCIONES DE EXPERIMENTO CON AGUA DESMINERALIZADA	62

1. INTRODUCCIÓN

El lactato es un importante marcador bioquímico que se produce durante la glucólisis anaeróbica [1]. Durante este proceso, la glucosa se convierte en piruvato, el cual, al estar en ausencia de oxígeno, no se metaboliza en la mitocondria ni ingresa al Ciclo de Krebs [1]. En su lugar, es catalizado por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), lo que resulta en la generación de lactato como producto de degradación [1].

Una vez generado, el lactato es transportado a través del torrente sanguíneo hacia distintos tejidos, donde puede ser captado para ser utilizado como combustible en la producción de ATP o para ser desechado por el organismo [2]. El hígado es uno de los principales órganos encargados de metabolizar esta sustancia, especialmente en situaciones de hipoxia tisular, donde la disponibilidad de oxígeno es limitada [2].

En la hipoxia, la acumulación de lactato en los tejidos puede provocar acidosis láctica, consecuencia directa del aumento de los niveles de lactato en sangre o hiperlactatemia [2]. El hígado tiene la capacidad de captar y metabolizar este exceso que puede ser perjudicial para el organismo mediante la oxidación o la gluconeogénesis [3]. Durante la oxidación, el lactato se convierte en piruvato y puede continuar el ciclo normal de producción de energía [3]. En cambio, en la gluconeogénesis, los hepatocitos convierten al lactato nuevamente en glucosa [3].

Es así que el metabolismo del lactato se vuelve relevante en el contexto de trasplante de hígado. Durante esta intervención, se reemplaza un hígado disfuncional o enfermo por uno sano de un donante. En este sentido, la medición de los niveles de lactato en el pre y post operatorio puede proporcionar valiosa información: en el pretrasplante, como un indicador temprano de viabilidad del órgano; y postrasplante, en la evaluación del aclaramiento del lactato en el hígado. Esto último permite evaluar la respuesta inicial del injerto y la predicción de la mortalidad [4]. Por lo tanto, monitorear los niveles de lactato antes y después del trasplante hepático es una herramienta relevante para evaluar si existe daño tisular, posibilitando la detección de complicaciones postoperatorias en el receptor, como sepsis, necrosis tisular o problemas de perfusión.

Actualmente, el *gold standard* en medición de lactato es a través de un analizador de gases en sangre, sin embargo, este método presenta algunas limitaciones importantes en relación al volumen de muestra necesaria para su funcionamiento, a la invasividad en el procedimiento y la complejidad en su operación [5]. Además, esta técnica no permite obtener información continua y en tiempo real de las fluctuaciones en los niveles de lactato, con un tiempo de espera considerable para la obtención de resultados [5]. Este tiempo puede ser significativo si la viabilidad del injerto está comprometida.

Además del método ya mencionado, existe uno que ha sido estudiado por varios autores para la medición de lactato: la espectrofotometría [6]–[8]. Esta técnica se basa en la medición de la absorbancia de la luz de una sustancia para determinar su concentración en una muestra. Para llevar a cabo esta medición, se utiliza la técnica de espectrofotometría en el infrarrojo cercano (NIRS). Diversos investigadores han hecho estudios al respecto para determinar las bandas de absorción del lactato en el espectro infrarrojo cercano (NIR), no obstante, este método, al igual que los tradicionalmente utilizados, requiere de extraer una muestra de sangre para ser analizada, por lo que actualmente no existe un método que sea completamente no invasivo para monitorear los niveles de lactemia .

Para abordar esta necesidad, el proyecto propone el diseño y desarrollo de un sensor de lactato para uso clínico en base al uso de tres longitudes de onda que operan en el espectro NIR, seleccionadas de acuerdo al estudio del Estado del Arte. Este sensor analizará la muestra de lactato que circula por un medio óptico apropiado para una medición por transmisión. Cabe resaltar que este sensor se desarrolla como parte de una máquina de perfusión en desarrollo, siendo ambos proyectos mandatados por la empresa Sky-Walkers. Aunque este es el enfoque principal del instrumento de medición de lactato que se pretende desarrollar en el presente proyecto, su importancia y motivación va más allá de esta aplicación específica, ya que surge de la necesidad de monitorear la asfisia perinatal (APN) al momento del parto.

La APN es una deficiencia de oxígeno por disminución del flujo sanguíneo y/o intercambio de oxígeno antes, durante o después del nacimiento [9]. Esta condición puede traer consigo secuelas sistémicas o neurológicas que pueden desencadenar una encefalopatía hipóxico-isquémica (EHI) neonatal [9]. Durante el período prenatal, la EHI neonatal se produce cuando se compromete el intercambio de gases en la placenta, lo que provoca una falta parcial o total de oxígeno en los órganos del feto. Como resultado, se genera una disminución en el nivel de oxígeno en la sangre, conocida como hipoxemia. Si la hipoxemia es lo suficientemente grave, los órganos vitales y los tejidos experimentan una deficiencia de oxígeno, lo que desencadena la activación de la glucólisis anaeróbica para generar energía.

De acuerdo con un estudio publicado el año 2017 [10], la incidencia de EHI neonatal en países desarrollados es de aproximadamente 1 a 2 casos por 1.000 nacidos vivos (NV). En Chile, se estima que la incidencia era de aproximadamente 4 a 5 casos por 1.000 NV [10]. De este total, 2 por 1.000 NV corresponden a una EHI que puede ser moderada o severa, de los cuales el 40 a 50% fallece o queda con secuelas [10]. Por lo tanto, la monitorización continua y la intervención temprana durante el trabajo de parto es crucial para el feto que presenta hipoxia, ya que las causas de la APN se originan un 70% durante el trabajo de parto, seguido de un 20% antes del inicio del parto y un 10% durante el período neonatal [11].

El objetivo general de este proyecto está orientado a medir la concentración de lactato utilizando tecnologías no invasivas en tiempo real para su uso clínico. A continuación, se define cada objetivo específico (O.E.):

- **O.E. 1:** Estudiar las tecnologías ópticas que se han aplicado para la medición de lactato.
- **O.E. 2:** Identificar las bandas del espectro electromagnético que interactúan con el lactato.
- **O.E. 3:** Diseñar experimentos de laboratorio que permitan evaluar la tecnología de medición.
- **O.E. 4:** Evaluar la sensibilidad de medición de la tecnología desarrollada.
- **O.E. 5:** Desarrollar un prototipo de instrumento utilizando las tecnologías evaluadas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 LACTATO

El lactato es una molécula orgánica producida por gran parte de los tejidos en el cuerpo durante la glucólisis anaeróbica [1, 12]. Esta molécula es metabolizada principalmente por el hígado, representando el 70% del aclaramiento del lactato en todo el cuerpo [2]. El porcentaje restante es metabolizado por los riñones u otros tejidos [2].

En condiciones aeróbicas, es decir, en presencia de oxígeno, la glucólisis produce piruvato, el cual se metaboliza en la mitocondria e ingresa al Ciclo de Krebs desencadenando diversas reacciones que culminan en la producción de ATP y de coenzimas NADH y FADH necesarias para la respiración celular [1, 12]. En caso de presentar condiciones anaeróbicas, donde hay baja o nula disponibilidad de oxígeno, el piruvato se convierte en ácido láctico por acción de la enzima LDH. El ácido láctico se disocia en lactato y ión hidrógeno (H^+) al estar disuelto en la sangre [13]. Una vez en el torrente sanguíneo, el lactato se transporta a los órganos encargados de la metabolización. Una acumulación de lactato en el organismo resulta peligrosa, desencadenando una hiperlactatemia y posterior acidosis láctica si es que no se elimina rápidamente de los tejidos y de la circulación sanguínea [14].

Los valores de lactato en sangre no han sido consensuados clínicamente. Algunos autores consideran un nivel de lactato normal cuando existe una concentración inferior a 2 [mmol/L] [15, 16].

El monitoreo de este metabolito se vuelve necesario no sólo en el cuidado de pacientes críticos propensos a desarrollar sepsis, shock cardiogénico, paro cardíaco, enfermedad pulmonar grave y con insuficiencia hepática [6], si no que, además, de acuerdo con un reciente estudio, existe la posibilidad de ampliar el monitoreo a una enfermedad como el cáncer [14]. En este se menciona que el lactato es capaz de promover un microambiente ideal para el crecimiento tumoral, considerándose un elevado nivel de este biomarcador como un pronóstico negativo para varios tipos de cáncer.

2.2 HIPERLACTATEMIA Y ACIDOSIS LÁCTICA

La hiperlactatemia y la acidosis láctica son dos condiciones médicas que están estrechamente relacionadas, lo que a menudo genera una confusión. La hiperlactatemia se origina por el aumento de la concentración de lactato en sangre [2]. Típicamente es medida para valores superiores a 2 [mmol/L] [15]. En cambio, la acidosis láctica es una condición que, además de presentar concentración de lactato en sangre superior a los 5 [mmol/L], afecta el equilibrio del pH en el cuerpo (acidosis metabólica), lo que puede ser mortal para quién lo padece y requiere tratamiento inmediato [15]. Esta condición se deriva de la hiperlactatemia, debido a la acumulación de iones H^+ en la sangre, superando la cantidad de bicarbonato y amortiguadores, los cuales tienen la tarea de mantener normales los niveles de pH [15].

2.3 MÉTODOS ACTUALES DE MEDICIÓN DE LACTATO

2.3.1 Sensores electroquímicos

Estos sensores basan su medición en la corriente eléctrica generada o la diferencia de potencial dada entre un electrodo de trabajo y uno de referencia [5]. La magnitud de estas variables están relacionadas con la actividad o concentración del analito en la muestra. Los sensores que utilizan este tipo de estrategia son los sensores amperométricos y los sensores potenciométricos, que pueden ser utilizados en combinación con la reacción de una enzima específica (en lactato corresponde a la enzima LDH) [5].

En la práctica clínica es posible encontrar el analizador de gases en sangre como *gold standard* en medición de lactato en muestras sanguíneas [5]. Este instrumento requiere del análisis de una cantidad significativa de volumen de sangre (100 a 200 μl) tomada mediante una jeringa fina, lo cual lo convierte en un procedimiento invasivo [5]. Otro inconveniente es que es costoso y complejo de operar, además de que permite realizar mediciones intermitentes, sin entregar información continua y en tiempo real de las fluctuaciones de los niveles de lactato, con un tiempo de espera en los resultados que es considerable [5].

Es posible encontrar en la práctica clínica el uso de dispositivos portátiles que requieren de un pequeño volumen de muestra, ofreciendo una rápida respuesta [5]. Sin embargo, su uso se limita únicamente a la práctica de atención primaria, ya que ofrece mediciones precisas en un solo punto (desde la yema del dedo o el lóbulo de la oreja) [5].

También se están realizando investigaciones para desarrollar dispositivos que determinen la concentración de lactato a partir de fluidos como la saliva y lágrimas, no obstante, a pesar de que la extracción de la muestra es mucho más sencilla y menos invasiva, la medición sigue siendo discontinua y sujeta a variaciones por diversos factores (ambientales y personales) [17].

2.3.2 Sensores ópticos

Los sensores ópticos se basan en los principios ópticos para la detección y cuantificación del lactato en una muestra [5]. Existen algunos enfoques o técnicas basadas en este método:

- **Fluorescencia:** Estos sensores se basan en la excitación del sustrato a medir al ser excitado por una fuente de luz apropiada [5]. Los analitos con capacidad fluorescente responden fuertemente a una longitud de onda específica. En el caso del lactato, se mide la fluorescencia de la coenzima NADH, que absorbe a una longitud de onda entre 340 a 360 nm [5].
- **Espectroscopía:** Es un método que estudia la interacción de la materia con una luz incidente a una longitud de onda determinada, detectando así la luz que atraviesa la muestra. Esta técnica se relaciona con la ley de Beer-Lambert para conocer la concentración del analito [5]. Con esta técnica es posible medir en longitudes de onda en el rango UV/Visible (300-800 nm), NIR (800-2.600 nm) y en infrarrojo medio o MIR ($4.000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$) [6].

2.4 LEY DE BEER-LAMBERT

La ley de Beer-Lambert es un principio fundamental que describe los efectos de la interacción de una luz incidente con la materia [18]. Esta ley establece que existe una relación entre la pérdida de intensidad de la luz que atraviesa un medio homogéneo, la intensidad con la que se transmite esta misma y la longitud,

también llamado camino óptico (OPL, *Optical Path Length*), que debe atravesar la luz [18]. Lo anterior se expresa de la siguiente manera:

$$I(d) = I_0 e^{-\alpha d} \quad (1)$$

donde I_0 es la intensidad inicial de la luz, $I(d)$ es la intensidad resultante luego de atravesar una distancia d en el medio y α es el coeficiente de absorción o la absorbancia molar del medio.

Esta ley además postula la existencia de una relación lineal entre la absorbancia (A) y la concentración (c) del analito a determinar [19], que está dado por:

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = d \sum_{i=1}^N \alpha_i c_i \quad (2)$$

donde N es el número de especies absorbentes en la matriz.

Aunque es ampliamente utilizado en distintos campos de la investigación, existen limitantes en esta ley que pueden esperarse cuando la fuente de luz no es monocromática, existe una alta concentración del analito y cuando el medio no es homogéneo, lo que conlleva a presentar un alta dispersión de la luz [19].

2.5 ESPECTRO INFRARROJO CERCANO

El espectro infrarrojo cercano (*Near-Infrared*, NIR) es el espectro de radiación infrarroja (IR) que comprende las longitudes de onda 0,8 a 2,5 μm [20]. Este espectro se encuentra entre las regiones de la luz visible y MIR, y se caracteriza por ser absorbido principalmente por el agua [21].

Es posible explicar la absorción, dispersión, refracción y reflexión en el espectro infrarrojo como el resultado de los cambios energéticos causados por la transición de las moléculas a diferentes estados energéticos vibracionales y rotacionales [22]. Es decir, cuando la energía de radiación IR coincide con la necesaria para excitar uno o más de los modos vibratorios, se genera la absorción de la energía incidente.

2.6 MOLARIDAD Y DILUCIÓN

Molaridad es la cantidad de soluto presente en un disolvente o en una cantidad determinada de disolución, donde se realiza la suposición de que el soluto puede ser un sólido o líquido y el disolvente un líquido. Esta concentración puede ser expresada como M , que corresponde al número de moles de un soluto por litro de disolución (equivalente a la unidad $[\text{mol/L}]$) definida como [23]:

$$\text{Molaridad } (M) = \frac{\text{Moles de soluto}}{\text{Litro de disolución}} \left[\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right] \quad (3)$$

La dilución es el proceso de preparar una solución menos concentrada a partir de una con mayor concentración [23]. Se expresa en la ecuación (4), la cual permite determinar el volumen necesario para preparar la solución de trabajo a partir de una concentración inicial.

$$C_{\text{inicial}} V_{\text{inicial}} = C_{\text{final}} V_{\text{final}} \quad (4)$$

donde C_{inicial} es la concentración inicial de la disolución madre, V_{inicial} es el volumen inicial a determinar y que se toma de la concentración C_{inicial} para preparar cada solución, C_{final} es la concentración de la disolución final y V_{final} es el volumen que se desea preparar de la disolución final.

2.7 SENSIBILIDAD Y ERROR EXPERIMENTAL

La sensibilidad y el error experimental son dos conceptos clave para comprender la calidad y fiabilidad de los resultados que se obtienen en un experimento.

La sensibilidad de un instrumento es la capacidad del mismo para discriminar entre pequeñas diferencias de concentración de analito o de la variable que se está midiendo [22]. La sensibilidad se expresa como el mínimo cambio entre la variable medida que produce una variación en el valor medido por el instrumento [22]. Por otro lado, el error experimental se refiere a la diferencia que existe entre el valor medido y el valor real [24]. Se pueden encontrar dos fuentes principales de incerteza: error sistemático, en el cual existe un sesgo consistente o repetible; y error aleatorio, que corresponde a las variaciones observadas entre mediciones sucesivas realizadas bajo las mismas condiciones experimentales [24].

2.8 MÉTODOS DE REGRESIÓN: SUPPORT VECTOR REGRESSION

Una regresión permite encontrar una función matemática que reproduce un conjunto de datos, modelando el comportamiento entre las variables dependientes e independientes [25]. La forma más sencilla de regresión es la *regresión lineal*, en que un algoritmo encuentra la recta (descrita por su pendiente e intercepto) que posee distancia mínima (en un sentido óptimo) al conjunto de datos [26].

Otros algoritmos permiten encontrar polinomios u otras funciones que permiten modelar el conjunto de datos. Entre los métodos de regresión no lineal se encuentra *Support Vector Regression (SVR)*, el cual es un método de regresión que forma parte de *Support Vector Machine*, un algoritmo de *Machine Learning* [27]. Al igual que otros algoritmos de regresión no lineal, SVR encuentra una función no lineal óptima (o hiperplano) en un espacio n-dimensional que se ajusta a los datos, minimizando una figura de mérito (denominado margen ϵ en SVR) [28].

Para obtener una buena estimación de los datos con SVR, se deben configurar correctamente los hiperparámetros que utiliza. Este método de regresión se encuentra como función en la librería *Scikit-Learn* de *Python* [27], donde los hiperparámetros más relevantes son:

- **Kernel:** Determina la capacidad de modelado de los datos. Los más comúnmente utilizados son el kernel lineal, polinomial y *radial basis function (RBF)*.
- **Parámetro ϵ (ϵ):** Controla el valor de error alrededor de la función objetivo.
- **Parámetro C:** Es un parámetro de regularización. Indica el nivel de tolerancia que se tienen con los puntos que se encuentran fuera del margen de ϵ . Mientras mayor es el valor de C, aumenta la tolerancia.

3. METODOLOGÍA E IMPLEMENTACIÓN

La metodología empleada en el desarrollo del instrumento de medición de lactato se estructuró en las

siguientes etapas:

1. Estudio del Estado del Arte, para identificar la tecnología de medición a utilizar en el instrumento.
2. Diseño conceptual del instrumento, mediante los resultados obtenidos del desarrollo de experimentos preliminares.
3. Diseño detallado del instrumento y desarrollo del prototipo funcional.
4. Experimentos con el prototipo funcional

3.1 ESTADO DEL ARTE

La medición continua y en tiempo real del lactato se ha visto limitada por la invasividad de los métodos de medición tradicionales, por lo que el propósito de este estudio fue proporcionar una visión actualizada de los avances en la medición de lactato que utilice un método no invasivo en el espectro NIR, orientado a uso específicamente clínico, además de identificar las bandas de absorción para su implementación en este proyecto. La metodología de búsqueda de la literatura asociada se detalla en el Anexo 1.

Diversos estudios *in vitro* han explorado en el análisis del espectro NIR como una forma no invasiva para medición de lactato utilizando espectrofotómetros comerciales. En una investigación realizada por Lafrance *et al.* [7], se analizaron muestras de lactato en plasma mediante el uso de NIRS. En este estudio, las muestras fueron analizadas para un rango del espectro entre 890 y 2.500 nm. Los resultados revelaron que los *peaks* de absorción del agua fueron sobre 1.900 nm (en 1.920 y 2.630 nm), esto debido a que el plasma humano es una solución acuosa, por lo que la región espectral para determinar la concentración de lactato la definieron entre los rangos 2.050 a 2.400 nm, específicamente centrada en los *peaks* 2.166, 2.254 y 2.292 nm (Figura 3.1(b)). Estos *peaks* están dados por cambios de absorción debido a la vibración de los enlaces C-H presentes en el lactato.

En la tesis desarrollada por el mismo autor [8], se señala además que es posible determinar el lactato en un rango de longitudes de onda que van desde 1.500 a 1.750 nm, con *peaks* de absorción en 1.675, 1.690 y 1.730 nm, como se muestra en la Figura 3.1(a). Estas absorciones se asocian a las transiciones vibracionales de primer armónico en los enlaces C-H del lactato [8].

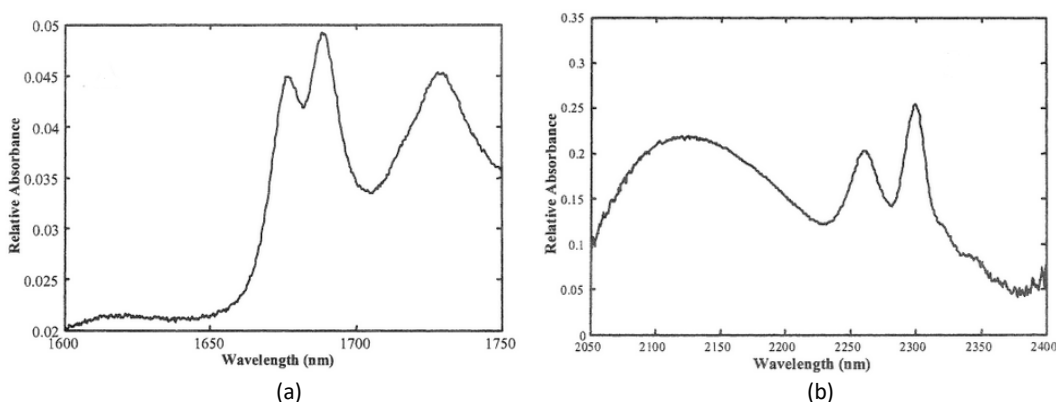


Figura 3.1: Bandas de absorción del lactato en el espectro NIR entre (a) 1.600 a 1.750 nm, y (b) 2.050 a 2.400 nm [8].

Basándose en la investigación de Lafrance *et al.* [7] y más recientemente, Budidha *et al.* [6] identificaron y determinaron cuantitativamente la concentración de lactato utilizando NIRS. Analizaron 37 muestras en solución salina tamponada con fosfato (PBS) de lactato sódico (NaLac) en un rango de 0 a 20 mM para el

espectro NIR con la finalidad de identificar las bandas de absorción. Se observaron dos *peaks* en el espectro a 1.450 nm y 1.920 nm que corresponden a la vibración fundamental de los enlaces O-H del agua [6]. Luego de restar la absorción del agua, reportaron *peaks* de absorción del lactato en distintas regiones que se encontraban entre 1.200 a 1.240 nm, 1.650 a 1.800 nm y 2.200 a 2.350 nm [6]. Si bien mencionaron lo útil que puede ser el uso de NIRS para la medición del lactato, debido a que esta radiación es absorbida justamente por los enlaces C-H, N-H y O-H (constituyentes del lactato), los *peaks* son apenas perceptibles, esto porque consisten en sobretonos y combinaciones de absorciones en el espectro y también debido a la dispersión de la luz. Es por esta razón que fue necesario restar la absorción del agua, tomada como referencia a partir de una NaLac igual a 0 M, de los otros espectros medidos [6]. Los resultados de esta investigación concuerdan con los trabajos previos liderados y realizados por Lafrance [7, 8].

En el trabajo realizado por Chatterjee *et al.* [29] se utilizaron simulaciones de Monte Carlo para investigar la forma en que interactúa la luz IR con el tejido vascular para la medición de lactato, basada en la investigación *in vitro* anterior [6]. Si bien el objetivo de este proyecto no es desarrollar en primera instancia un dispositivo que mida los niveles de lactato a través de los tejidos, en este estudio se justificó el uso de la longitud de onda máxima de absorción del agua (1.920 nm), con la finalidad de evaluar el rendimiento del sensor [29]. La selección de las otras longitudes de onda en estudio fueron en base a longitudes de onda donde se encontraban los *peaks* prominentes de lactato (1.684, 1.730, 1.752, 2.129, 2.259 y 2.299 nm), necesarias para detectar la absorbancia por este metabolito, y longitudes de onda sin *peak* de absorbancia para lactato o agua (a 1.310, 1.550 y 1.650 nm) [29]. Se encontró una mayor sensibilidad de variación al lactato en la longitud de onda 1.684 nm [29].

En base a los estudios anteriormente mencionados, se puede concluir que la medición no invasiva de los niveles de lactato *in vitro* en el espectro NIR es factible. Se identificaron las longitudes de onda en las cuales se observa la absorción de lactato, en los rangos 1.200 a 1.240 nm, 1.675 a 1.730 nm y 2.050 a 2.400 nm.

El estudio del Estado del Arte confirmó que todos los autores utilizaron algún tipo de espectrofotómetro NIR comercial para las mediciones publicadas (Figura 3.2). Estos son instrumentos que no permitirían la medición en tiempo real del lactato. No se encontró literatura relativa a la medición de lactato por medios ópticos en tiempo real, por lo que, como parte del desarrollo conceptual del sensor, se debió idear una método de medición que permitiera mediciones instantáneas o casi-instantáneas. Por ello, se identificaron longitudes de onda de interacción con el lactato y a la vez, se buscaron componentes opto-electrónicos que permitieran implementar esta medición, descritos más adelante en esta sección. Fue necesario hacer coincidir la longitud de onda requerida de acuerdo con la literatura, con la disponibilidad de componentes en estas longitudes de onda.



Figura 3.2: Ejemplo de espectrofotómetro comercial UV/VIS/NIR [30].

3.2 DISEÑO DEL DISPOSITIVO

3.2.1 Requerimientos del instrumento

Todo instrumento científico debe cumplir con un conjunto de *Instrument Requirements* que se derivan del caso científico que justifica su desarrollo. El estudio del Estado del Arte, así como los experimentos preliminares con los componentes opto-electrónicos críticos (presentados en el próximo capítulo) permiten enunciar los requerimientos del instrumento en la Tabla 3.1, los cuales deben ser satisfechos por el diseño que se describe a continuación.

N°	Requerimiento	Característica	Observaciones
1	Medición en tiempo real	No aplica	<ul style="list-style-type: none"> - Descarte de métodos ópticos con barrido (espectrofotómetro). - Las fuentes monocromáticas son candidatas factibles para llevar a cabo el requerimiento.
2	La intensidad de la fuente NIR debe superar los efectos de la ley de Beer-Lambert en la sangre	No aplica	<ul style="list-style-type: none"> - Descarta el uso de luz blanca y filtros angostos. - Es factible el uso de LEDs NIR.
3	Uso de detector NIR comercial y disponible	Costo más bajo posible	<ul style="list-style-type: none"> - Es factible el uso de fotodiodos NIR.
4	OPL	Menor a 5 mm	<ul style="list-style-type: none"> - Valor experimental debido a la intensidad máxima de LEDs NIR. - Obtenido como requerimiento en experimentos preliminares.
5	Modo de funcionamiento pulsado de los LEDs	Según especificaciones en hojas de datos	<ul style="list-style-type: none"> - Valor experimental debido a limitaciones de uso de LEDs NIR.
6	Uso y montaje	Sangre o muestra con lactato debe circular por un medio	<ul style="list-style-type: none"> - Contar con un tubo o similar para la medición. - Material de baja absorbancia. - Fácil instalación del tubo o similar.

Tabla 3.1: Requerimientos del instrumento de medición de lactato.

3.2.2 Descripción técnica del diseño

Como se muestra en la Figura 3.3, el instrumento basó su funcionamiento en el uso de tres LEDs en el espectro NIR: 1,6 μm , 1,9 μm y 2,2 μm . La luz irradiada por estos atraviesa un tubo rectangular que contiene una muestra de lactato. Parte de la luz emitida por cada LED es detectada en los fotodiodos, donde se produce una corriente eléctrica de acuerdo al efecto fotoeléctrico. Un circuito electrónico junto a los fotodiodos genera un voltaje proporcional a esta corriente, el cual es función de la concentración de lactato existente.

Los LEDs y fotodiodos NIR se controlan mediante sus tarjetas electrónicas, llamadas *Controller* y *Detector*. Ambas son alimentadas con una fuente de poder de 12V. La tarjeta electrónica *Detector* envía las mediciones digitalizadas correspondientes a las tres longitudes de onda hacia la tarjeta *Controller*. En el computador, a través de un programa (*software*), se visualizan estos datos en tiempo real, siendo posible registrarlos para su posterior análisis mediante un algoritmo de regresión que permita estimar los niveles de lactemia.

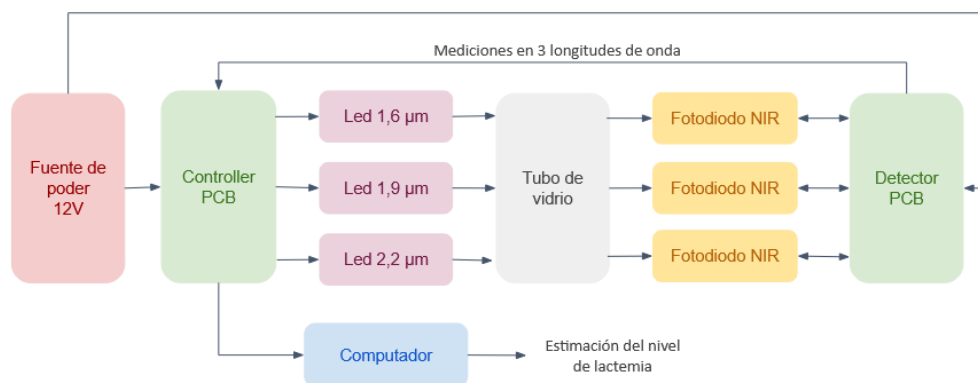


Figura 3.3: Diagrama de bloques del funcionamiento del sensor de lactato.

A continuación se abordan con mayor detalle los aspectos mencionados:

3.2.2.1 Óptica

Como concepto fundamental para el desarrollo del sensor de lactato, se consideró la tecnología de detección en el espectro NIR. El desarrollo del sensor se basó en el uso de detectores y LEDs NIR disponibles en el mercado. Se seleccionó un proveedor que ofrece LEDs con *peaks* de emisión en 1,6 μm , 1,9 μm y 2,2 μm (requerimiento N°2). Estas longitudes de onda fueron escogidas porque representan los rangos de absorción del lactato en el espectro NIR, lo que permite la identificación de las concentraciones de este metabolito. La elección anterior se basó en los estudios descritos previamente en el Estado del Arte.

Los LEDs y fotodiodos NIR deben estar alineados uno frente al otro, siguiendo la técnica básica de medición en la cual la luz irradiada por el LED, en una longitud de onda en específico, interactúa con el analito a medir. Este analito se encuentra entre ambos componentes, por lo tanto, lo que no es absorbido por éste, es detectado por el fotodiodo, el cual transforma la luz en una señal eléctrica.

La distancia entre ambos componentes se vio influenciada por el tamaño del tubo de vidrio a utilizar. Se seleccionó un tubo rectangular de vidrio borosilicatado, el cual permitía que la transmisión óptica, para un espesor menor a 1 mm, fuese mayor al 90% para las tres longitudes de onda seleccionadas (requerimiento N°6), de acuerdo con fabricantes y entidades expertas en el tema [31, 32]. Por lo tanto, los LEDs y fotodetectores NIR quedaron enfrentados a un OPL de 3,4 mm, que corresponde a la medida externa del tubo (requerimiento N° 4).

Los LEDs escogidos (modelos Lms16LED, Lms19LED y Lms22LED de LEDMicrosensor NT¹), funcionan bajo parámetros específicos que se detallan en las hojas de datos de estos componentes, en los cuales se especifican los dos modos de funcionamiento: *Quasi Continuous Wave* (qCW) y modo pulso [33]–[35]. Estos modos definen la amplitud máxima del pulso en corriente, la duración de éste y el tiempo máximo entre cada pulso para su correcto funcionamiento. En el modo pulso, el LED se enciende y funciona a alta potencia durante un corto período de tiempo y luego se apaga por un período de tiempo mayor, para permitirle disipar el calor generado en el encendido. En el caso del modo qCW, el LED permanece encendido por períodos de tiempo más largos, funcionando a una menor potencia, en comparación con el

¹ <https://lmsnt.com/>

modo pulso. En el Anexo 2 es posible obtener información más detallada de ambos modos de funcionamiento para los tres modelos de LEDs NIR.

Estos LEDs tienen un reflector parabólico que dirige y enfoca la luz en una dirección, evitando así la dispersión de la misma [33]–[35]. La diferencia entre los patrones de radiación que generan los LEDs sin reflector y con él se pueden observar en la Figura 3.4.

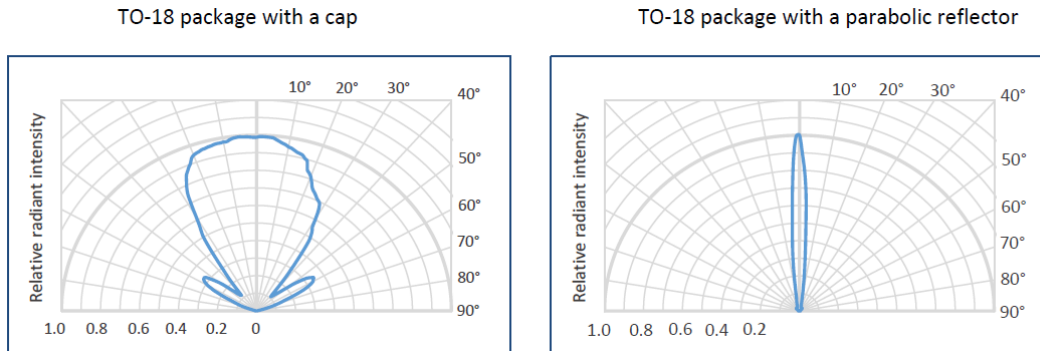


Figura 3.4: Patrón de radiación de los LEDs NIR (modelos Lms16, Lms19 y Lms22) sin reflector parabólico (a la izquierda) y con reflector parabólico (a la derecha) [33]–[35].

Por otro lado, en cuanto al fotodiodo seleccionado InGaAs G12183-003K de Hamamatsu², tienen una fotosensibilidad mayor a las longitudes de onda que son de interés para esta aplicación, de acuerdo a su hoja de datos [36], como se puede observar en la Figura 3.5 (requerimiento N°3).

Para el funcionamiento de este fotodiodo, se utilizó un amplificador de transimpedancia, el cual convierte la corriente generada por la llegada de fotones al detector en un voltaje.

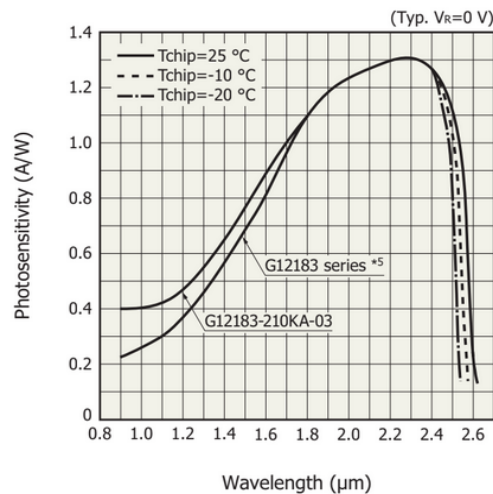


Figura 3.5: Respuesta espectral de los fotodetectores modelo 003K de la serie G12183 [36].

² <https://www.hamamatsu.com/eu/en.html>

3.2.2.2 Electrónica

El instrumento consiste en dos tarjetas electrónicas llamadas *Controller* y *Detector* (Figura 3.6), ver Anexo 3 y 4, respectivamente, con esquemáticos electrónicos para mayor detalle. La tarjeta electrónica principal corresponde a la tarjeta *Controller*, la cual se encarga del control de los LEDs NIR. La tarjeta *Detector* incluye los fotodiodos, la etapa de amplificación y conversores análogos-digitales (ADC). La medición digital es comunicada al microcontrolador en la tarjeta *Controller*.

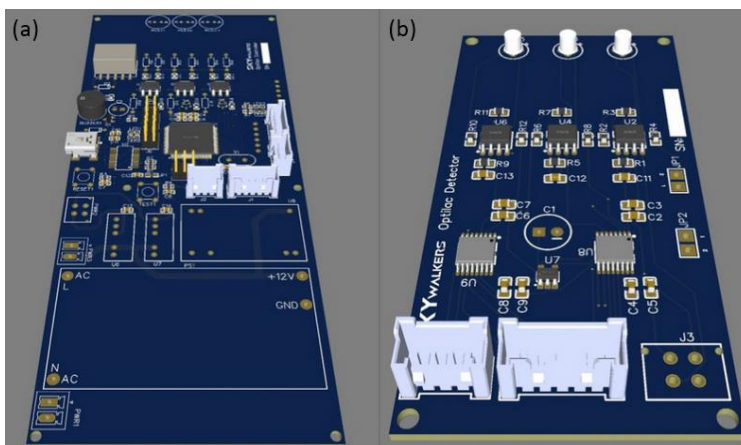


Figura 3.6: Tarjetas electrónicas *Controller* (a) y *Detector* (b).

Se experimentó con los períodos de tiempo y la corriente aplicada en los LEDs hasta obtener suficiente luz en los fotodiodos, después de la absorción en el camino óptico. Se suministró una corriente de 0,25A a los LEDs NIR, operando en modo pulso. Cada LED se enciende por 100 μ s y permanece apagado por 1.900 μ s, es decir, el ciclo de cada LED tuvo un total de 2.000 μ s. Los LEDs se encienden alternadamente por lo tanto, el ciclo de cada LED es de 6.000 μ s (6 ms), ver Figura 3.7 (requerimiento N°5).

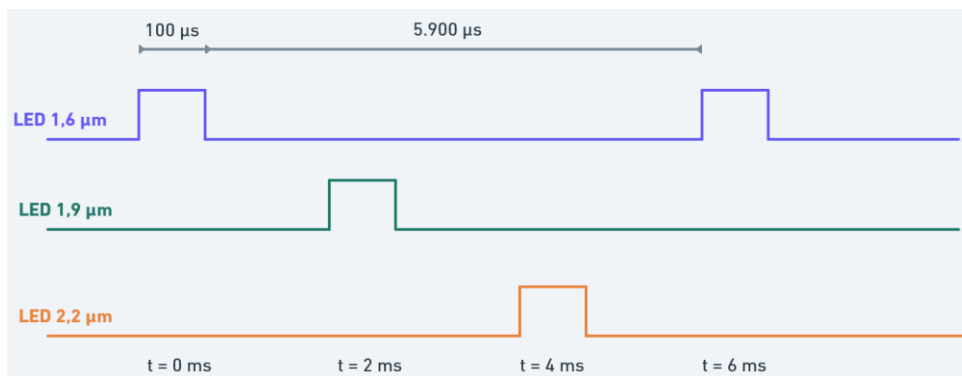


Figura 3.7: Diagrama de los ciclos de funcionamiento de cada LED NIR para 6 ms entre pulsos.

Posteriormente y debido a ajustes realizados en pruebas iniciales, el ciclo de funcionamiento de los LEDs fue modificado a un pulso de duración de 40 μ s, manteniendo el tiempo entre pulsos de un mismo LED en 6 ms. También se probó aumentando el período a 5 s. Estos resultados se detallan en el próximo capítulo.

La tarjeta *Detector* incluye conversores ADCs de 14 bits para que el circuito no esté limitado por resolución ante variaciones muy tenues al medir los cambios de concentración de lactato.

Tanto la tarjeta *Controller* como *Detector* son alimentadas por una fuente de poder de 12V de grado médico, ya que tiene la particularidad de cumplir con la norma IEC-60601-1 [37].

3.2.2.3 Software

El *software* utilizado para el registro de los datos y el control de los LEDs fue desarrollado por el ingeniero de software de Sky-Walkers. La interfaz del programa fue diseñada para mostrar los valores de ADC provenientes de cada uno de los 3 detectores, como se aprecia en la Figura 3.8. Estos datos se presentaban en tiempo real en la interfaz gráfica del programa durante el proceso de medición (requerimiento N°1).

El registro de las mediciones se inicia con el botón “Start Log”. Estos datos son almacenados en un archivo con extensión CSV (*Comma-Separated Values*). El registro contiene, principalmente:

- El tiempo en milisegundos una vez iniciado el registro de los datos.
- Los valores de ADC cuando los LEDs están encendidos (LED 16, LED 19 y LED 22 en la Figura 3.8).
- Los valores de ADC cuando los LEDs están apagados (DARK 16, DARK 19 y DARK 22 en la Figura 3.8). Estos valores “dark” se utilizan para ser restados a los valores de ADC con LEDs encendidos para calibración, para compensar la luz de fondo presente en la medición.

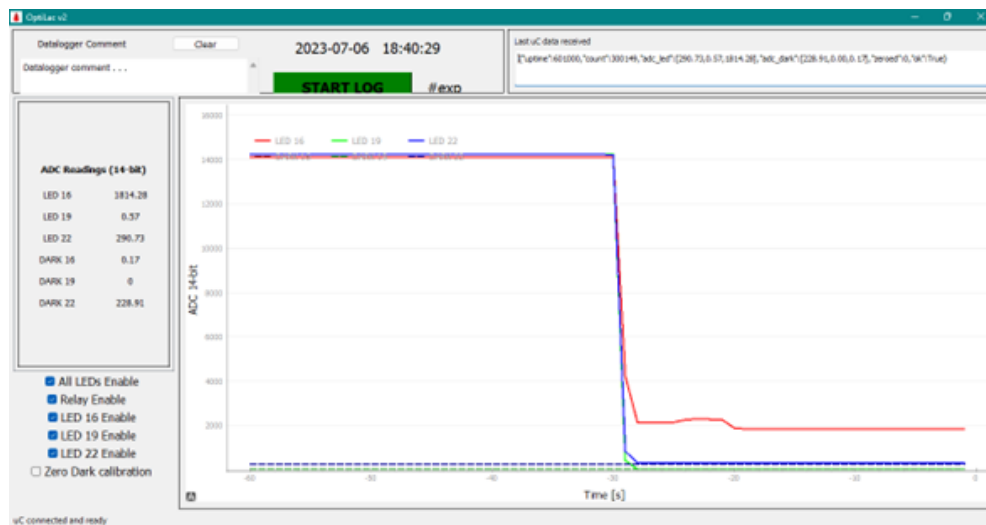


Figura 3.8: Interfaz del software de registro de datos y control de los LEDs.

3.2.2.4 Encapsulado

El *Encapsulado* o caja del instrumento se diseñó con 3 piezas: la *base*, la *tapa* y la pieza que sostiene la tarjeta *Detector* (Figura 3.9). Se utilizó el *software* Open Source *FreeCAD* para diseñar estas piezas, las cuales se imprimieron en una impresora 3D industrial de Sky-Walkers. Las dimensiones del encapsulado se detallan en los planos del Anexo 5.

Consideraciones en el diseño de las piezas

- 1) El diseño de la pieza *base* se realizó para permitir la sujeción de la tarjeta *Controller* con sus LEDs. Se consideró, en esta pieza y en la que va dispuesta la tarjeta *Detector*, la altura de los LEDs y fotodiodos, respectivamente, asegurando que ambos componentes quedasen enfrentados y cercanos a la superficie del tubo rectangular, minimizando el OPL (requerimiento N°4).

- 2) En la pieza *base* y en la *tapa* del instrumento se consideró una ranura en la cual va encajado el tubo rectangular, con la finalidad de evitar movimientos indeseados del tubo y de la muestra que puedan afectar la medición (requerimiento N°6) (Figura 3.9), así como el fácil reemplazo del tubo, el cual puede estar conectado a una línea de sangre, como parte de un circuito de perfusión o similar.

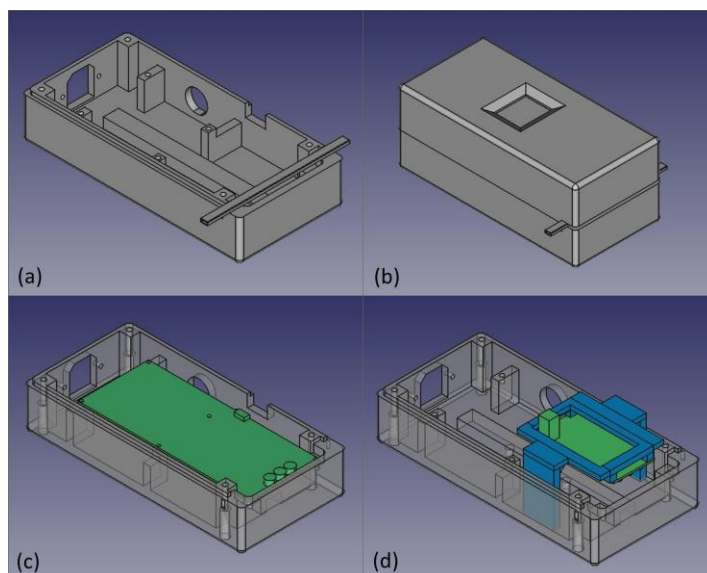


Figura 3.9: Base del sensor y tubo rectangular de vidrio (a), tapa y base del instrumento de medición con tubo rectangular dispuesto en la ranura (b), base del sensor con tarjeta Controller (c) y pieza que sujeta la tarjeta Detector en azul (d).

3.2.3 Pruebas iniciales de funcionamiento

El propósito de estas pruebas consistió en evaluar el funcionamiento del circuito y realizar ajustes previos a las mediciones de los experimentos de validación.

Duración de los pulsos en LEDs

Se realizó la medición de la duración de los pulsos de encendido de cada LED NIR (Figura 3.10(a)), con la finalidad de verificar que tuvieran una duración aproximada de 100 μ s. Los pulsos cumplen con una duración de 94 μ s, observados en la Figura 3.10(b).

Medición de señal para muestreo del ADC

Se efectuó la medición de la señal de *trigger* del microcontrolador al ADC para iniciar el muestreo. Esta corresponde al flanco de bajada de la señal en la Figura 3.10(c).

Alineación de LEDs y fotodiodos NIR

Se llevó a cabo esta medición con la finalidad de comprobar que cada LED NIR se encontrara correctamente alineado con su respectivo fotodiodo. El resultado esperado de esta actividad es obtener valores de ADC cercanos al rango máximo de resolución (para 14 bits), sin la presencia del tubo rectangular de vidrio entre ambos componentes. Los valores obtenidos para cada LED NIR se encuentran en el Anexo 6.

Mediciones iniciales de prueba

Se realizaron las primeras mediciones con los circuitos ya montados en el Encapsulado. Estas mediciones consistieron en evaluar el efecto de distintos elementos entre el sistema óptico del instrumento. Las mediciones promedio obtenidas se encuentran en el Anexo 7.

Ajuste de la corriente de los LEDs NIR

Se ajustó la corriente para los tres LEDs NIR a causa de los efectos de absorción presentados en las mediciones del Anexo 7. En el Anexo 8 se encuentra el procedimiento y los valores de corriente obtenidos en el ajuste, incluidas las mediciones con agua desmineralizada y elementos entre detectores y LEDs NIR por cada ajuste realizado, además de la modificación de la duración de los pulsos de cada LED debido a este ajuste de corriente.

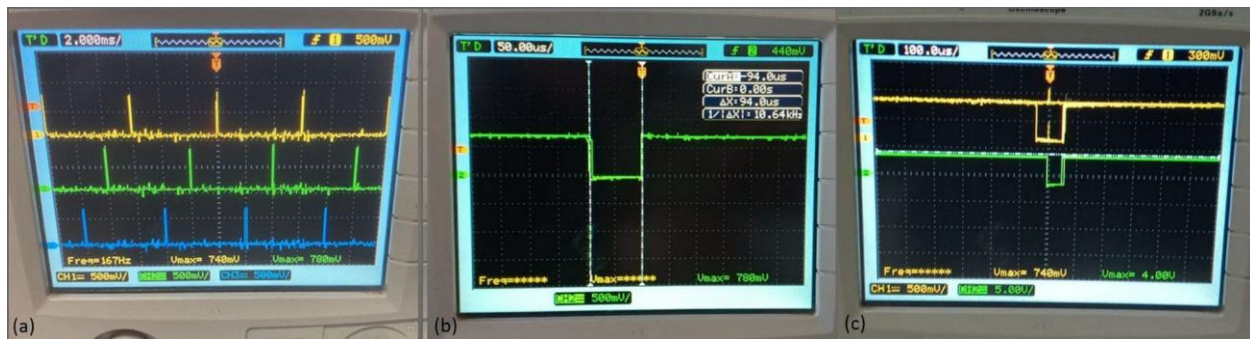


Figura 3.10: Pruebas iniciales. Se muestran los pulsos de los tres LEDs NIR al mismo tiempo (a) y la duración de un pulso de encendido correspondiente a uno de los LEDs medidos (94 μ s) (b), la señal de muestreo del ADC (traza amarilla) y señal del microcontrolador (traza verde) en (c).

3.3 ALGORITMO DE PROCESAMIENTO PARA ESTIMACIÓN DE LACTEMIA

Tanto en los experimentos preliminares como en los experimentos de validación, se utilizó como método de estimación de la lactemia un algoritmo que implementa SVR (Anexo 9). Este algoritmo, diagramado en la Figura 3.11, ajusta el modelo con un conjunto de mediciones tomadas desde los experimentos (datos de ajuste), utilizando otras mediciones para evaluar el modelo y estimar la cantidad de lactato a partir de los valores de ADC (datos de validación).

Para construir el modelo SVR, se seleccionaron los mejores parámetros de acuerdo a los datos de ajuste con los que se alimenta. El cálculo del coeficiente de determinación R-cuadrado (R^2) permite evaluar la calidad del modelo. El valor máximo de R^2 corresponde a 1, mientras más cercano se encuentre a este valor, más precisa es la estimación.

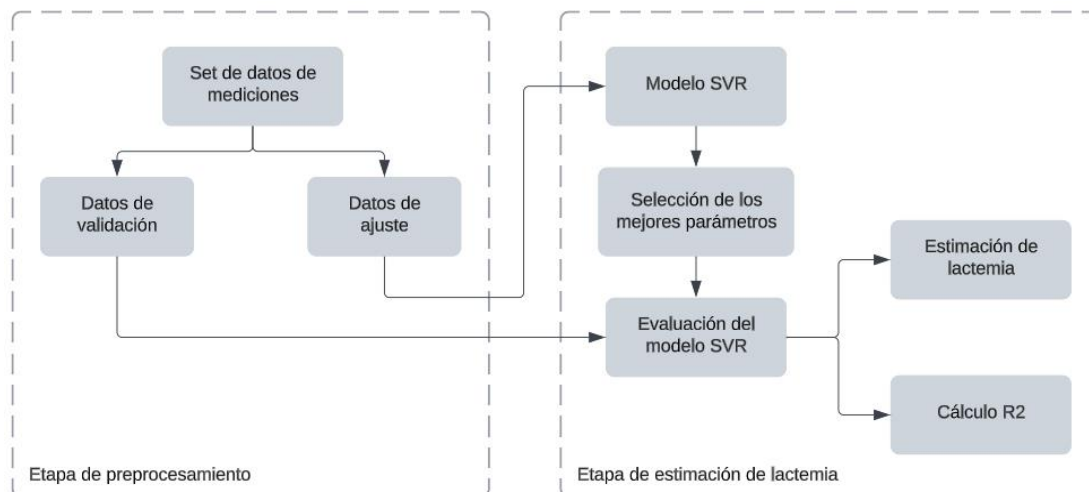


Figura 3.11: Diagrama de bloques del funcionamiento del algoritmo de estimación de lactemia.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron diversos experimentos durante el diseño y desarrollo del instrumento, los cuales se pueden agrupar en *Preliminares*, para definir el diseño conceptual del dispositivo; de *Calibración*, para determinar el comportamiento de la electrónica del instrumento y de *Validación*, para comprobar el principio de medición del sensor.

4.1 FASE PRELIMINAR DE EXPERIMENTOS

En la siguiente sección se presentan los resultados obtenidos con el circuito opto-electrónico del Anexo 10.

4.1.1 Experimento con solución inyectable

Se prepararon cinco soluciones con concentraciones de lactato entre 2 a 10 mM, a partir de una solución madre de 1 M fabricada con una solución inyectable para perfusión. Esta solución contiene 0,310 g de lactato de sodio por cada 100 ml, por lo que cada solución tiene una concentración de 3,7 mM como base. Por lo tanto, se tienen soluciones desde 3,7 a 13,7 mM.

Las soluciones se dispensan en 2 ml sobre un tubo de vidrio preparado para el experimento (Figura 4.1), cuyo cristal tiene un espesor de 1 mm (ver Anexo 11).



Figura 4.1: Tubo de vidrio en el cual se dispensan las soluciones preparadas para experimentos preliminares.

Cada solución fue vertida en el tubo de la Figura 4.1, iluminando con cada uno de los LEDs NIR a un único fotodiodo NIR, según el circuito del Anexo 10. Los valores digitales del ADC (de 10 bits en estos experimentos) se registraron como los resultados de este y otros experimentos, ya que aún no existe calibración para el instrumento. Los resultados obtenidos son los siguientes:

Variación de respuesta del detector versus longitud de onda y concentración

La Figura 4.2 muestra curvas de valor ADC promedio versus concentración de lactato, para cada una de las tres longitudes de onda.

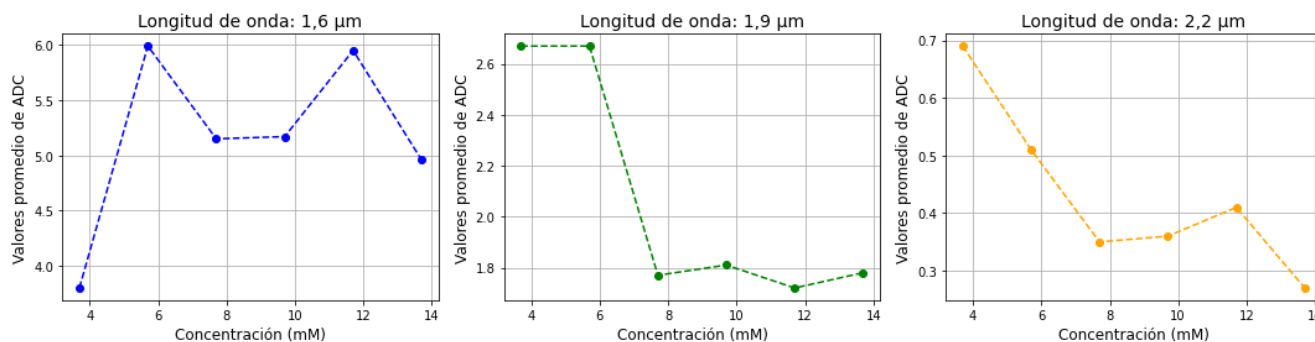


Figura 4.2: Mediciones de experimento con solución inyectable.

Absorción debido al tubo de vidrio

La Figura 4.3 compara mediciones con y sin tubo de vidrio en el haz de cada LED.

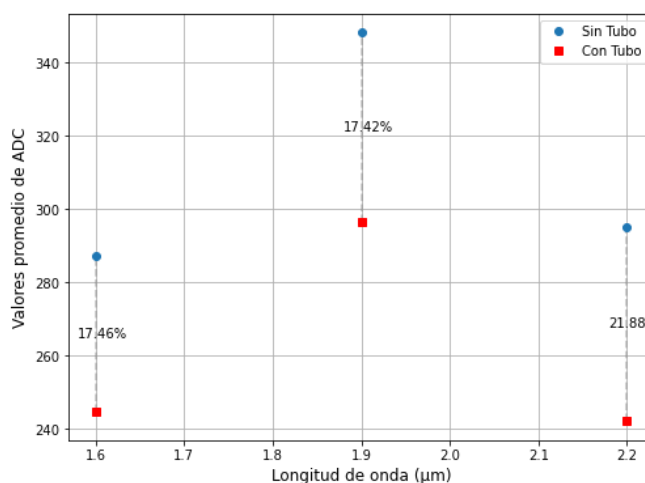


Figura 4.3: Valores promedio de ADC para cada longitud de onda con y sin tubo de vidrio.

Análisis de Resultados Preliminares

- 1) La Figura 4.2 muestra que en las bandas de interés el cambio de concentración de lactato produce diferencias de absorción, por lo que este fenómeno puede ser utilizado para estimar la concentración de lactato a partir de mediciones en múltiples bandas.
- 2) El tubo de vidrio produce una atenuación sobre el 17% para las bandas NIR de 1,6 μm y 1,9 μm. En el caso del LED 2,2 μm, se produce una atenuación del 21,88% del haz de luz que alcanza el fotodiodo (Figura 4.3).

- 3) También se observó que la distancia entre LED y fotodetector es crítica, tal como se esperaba que lo fuese. En el sistema opto-electrónico utilizado para este experimento, la distancia entre estos dos componentes electrónicos fue de 15 mm.

De estos resultados, surgen los requerimientos de mínima distancia entre fuente de luz y detector, además de un medio para contener la solución y/o sangre de mínimo espesor.

Estimación de los niveles de lactemia

Adicionalmente, y para confirmar que es posible estimar la lactemia a partir de las mediciones a diversas concentraciones, se ajustó un modelo preliminar con los valores de ADC obtenidos, liberando dos de ellos para la validación. En la Tabla 4.1 se encuentran los errores de estimación para estos dos valores ajustando el modelo a los datos obtenidos para las longitudes de onda que se mencionan.

Longitud de onda	R2	Error de estimación para 5,7 mM	Error de estimación para 11,7 mM	Observación
1,6, 1,9 y 2,2 μm	0,995	1,01%	2,37%	Es posible realizar la estimación. Alta capacidad predictiva.
1,6 y 2,2 μm	Negativo	-	-	No es posible realizar una estimación. Se tiene un alto nivel de error en la predicción.
1,9 y 2,2 μm	0,76	16,59%	15,76%	La estimación presenta un nivel de error a considerar.
1,6 y 1,9 μm	0,73	37,67%	4,47%	La estimación presenta un nivel de error a considerar.

Tabla 4.1: Resultados de estimación del modelo SVR para experimento con solución inyectable.

Se obtuvo un menor error de estimación utilizando las tres longitudes de onda, esto indica que para obtener mejores resultados de predicción en la estimación de los niveles de lactemia, es imprescindible utilizarlas en conjunto, ya que contribuyen a lograr una mejor representación de las características espectrales en cada concentración de lactato.

4.1.2 Experimento con sangre de cerdo

Se prepararon cinco soluciones, de 2 a 10 mM, alternadas, con distintas concentraciones de lactato a partir de la solución madre de 1 M, con sangre de cerdo como solvente. Estas soluciones fueron dispensadas sobre el tubo de vidrio de la Figura 4.1.

Se tomaron mediciones para distintos volúmenes de sangre, desde 500 a 2.500 μl , dispensados en el tubo de vidrio para cada longitud de onda. Véase el Anexo 12 para mayor detalle sobre la preparación de soluciones y el procedimiento del experimento.

En este experimento se evaluaron los resultados obtenidos para distintos volúmenes, en las tres longitudes de onda, que iban desde 500 a 2.500 μl para distintas concentraciones de lactato. Esto permitió relacionar el volumen del líquido con el OPL, que es la distancia que debe recorrer la luz para llegar a los fotodetectores IR. El cálculo de esta relación se encuentra en el Anexo 13.

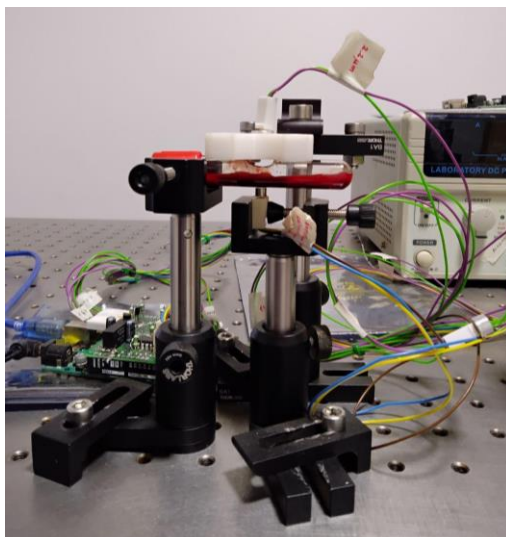


Figura 4.4: Sistema opto-electrónico con tubo de vidrio y muestra de sangre de cerdo en su interior.

Variaciones en las mediciones según OPL

Las mediciones obtenidas para cada OPL y concentración se visualizan en la Figura 4.5. Se descarta la solución de 2 mM por error en el procedimiento de pipeteo del lactato. Es importante tener en cuenta que una de las limitaciones en este experimento fue la ausencia de datos concretos sobre la cantidad de lactato presente en la sangre de cerdo utilizada.

Al analizar la Figura 4.5(e), es posible observar que existe un patrón similar al obtenido en el experimento con solución inyectable. Sin embargo, en las mediciones obtenidas para volúmenes menores, se evidencia que ocurrieron variaciones que pueden atribuirse al volumen de la muestra. Al tener un volumen insuficiente dispuesto en el tubo cilíndrico de vidrio, la luz tiene una limitada interacción con el lactato presente en él, lo que puede provocar mediciones imprecisas.

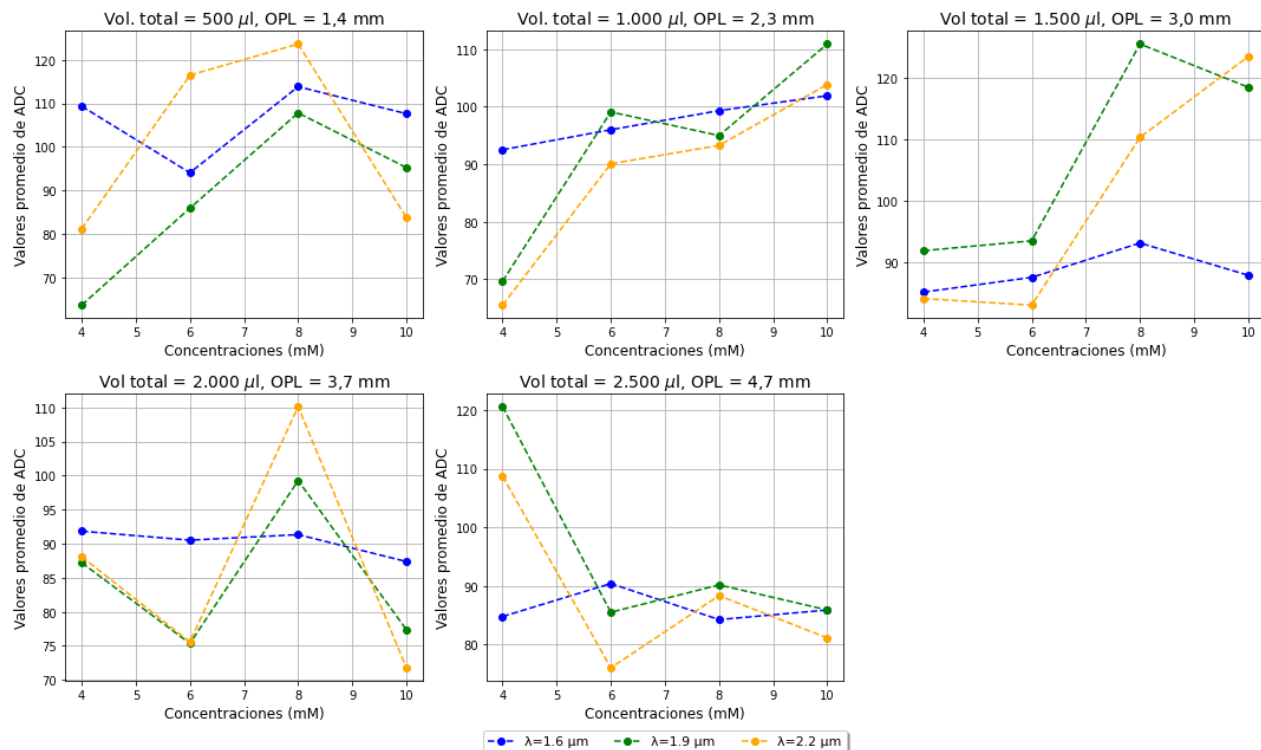


Figura 4.5: Mediciones de experimento con sangre de cerdo a distintos volúmenes y OPL.

Cabe mencionar que la estimación de la lactemia no fue posible de llevar a cabo debido a la cantidad limitada de datos disponibles en el experimento para un volumen de 2.500 μ l. No obstante, estos experimentos demostraron ser relevantes al entregar información sobre los requerimientos para desarrollar el instrumento de medición de lactato.

4.2 EXPERIMENTOS DE CALIBRACIÓN CON FILTRO DE DENSIDAD NEUTRAL

Una vez confirmada la operación electrónica básica del circuito prototipo del instrumento, el cual incluye operación simultánea de las 3 bandas NIR frente a 3 fotodiodos NIR iguales, se ejecutaron experimentos de calibración para evaluar la precisión y repetibilidad de la adquisición de datos. Para ello se utilizaron hojas de papel blanco como filtros de densidad neutral, que provocan una absorción espectral y temporalmente estable. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4.6.

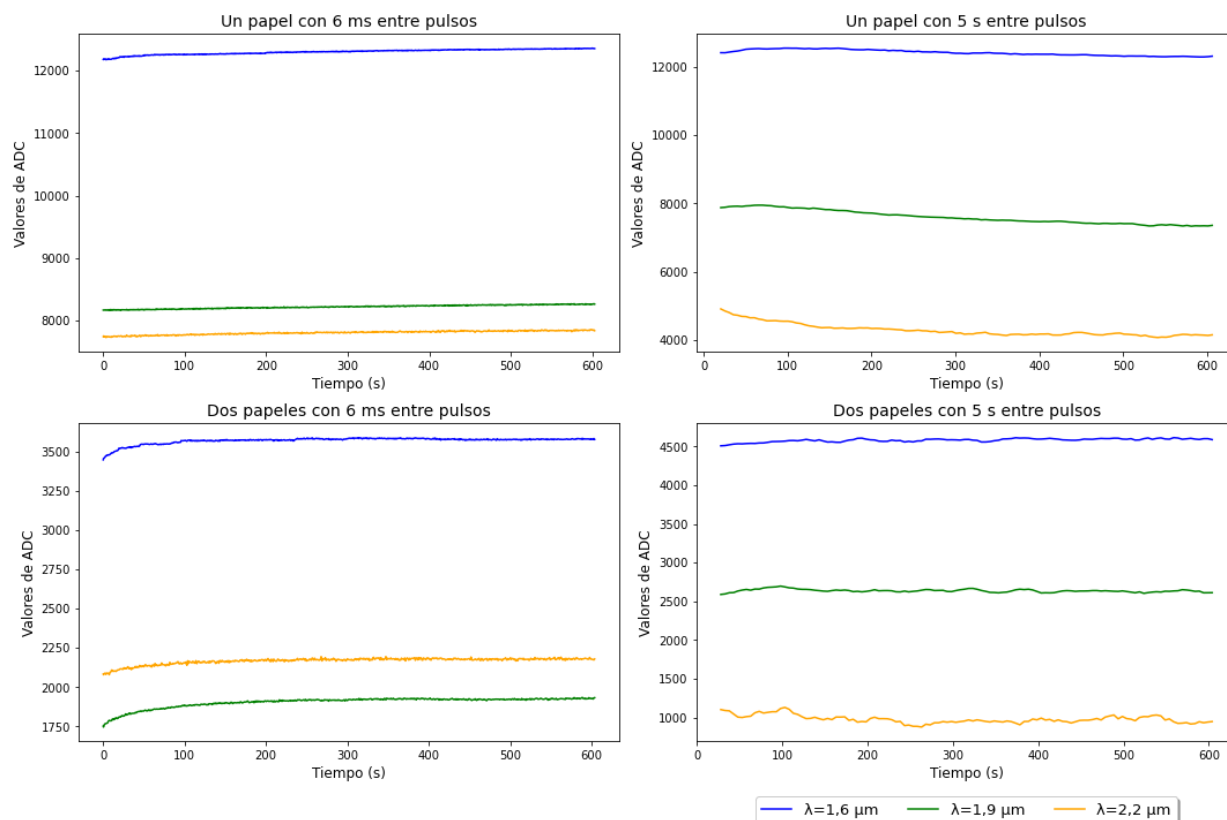


Figura 4.6: Mediciones de experimento de calibración.

Adquisición de datos: generación de efecto térmico y ruido en las mediciones

Se ejercitaron dos modalidades de adquisición de datos: 6 ms y 5 s. La medición de 6 ms permite obtener muchas muestras de la lectura del fotodiodo, las cuales se promedian en el microcontrolador, previo a ser registradas por el computador del experimento. Las mediciones cada 5 s en cambio no se promediaron porque implicaría obtener mediciones cada intervalos demasiado largos. Estas dos modalidades de lectura se implementaron ya que se observó un cambio en los valores de ADC frente a condiciones estables. Como muestran las curvas del lado izquierdo de la Figura 4.6, se produce un aumento lento, casi exponencial, que se distingue claramente con 2 papeles y 6 ms de lectura. Se ha identificado un efecto térmico indeseable provocado por el LED en el medio irradiado y posiblemente en el detector. Las mediciones espaciadas 5 s no muestran este efecto, sin embargo, incorporan un ruido de lectura significativamente mayor que las de 6 ms.

Este experimento dejó en evidencia la importancia del método de adquisición de datos, por tanto, en futuros estudios que consideren mejoras en el diseño del sistema de adquisición, será crucial estudiar a fondo estos efectos.

4.3 EXPERIMENTO DE VALIDACIÓN CON AGUA DESMINERALIZADA

Se prepararon diez soluciones con distintas concentraciones de lactato diluidas en agua desmineralizada. Estas soluciones iban de 1 a 10 mM, las cuales fueron extraídas de la misma solución madre de 1 M que se utilizó en experimentos previos. Estas muestras se dispensaron en un tubo de vidrio rectangular de borosilicato con capacidad de 1,3 ml (Figura 4.7). Véase el Anexo 14 para mayor detalle sobre la preparación de soluciones y el procedimiento del experimento.



Figura 4.7: Encapsulado del instrumento de medición con el tubo de vidrio rectangular.

Estructura y relación no lineal en las mediciones

La Figura 4.8 muestra curvas de valores ADC versus concentración de lactato, para cada una de las tres longitudes de onda. Es importante destacar que las mediciones obtenidas en este experimento difieren de las obtenidas en experimentos anteriores debido a la variación en el OPL, el cual está determinado, en este caso, por las dimensiones del tubo rectangular. Esta variación en el OPL afecta la magnitud o forma de la estructura en los datos, por lo que no es posible realizar una comparación directa con los resultados obtenidos en los experimentos anteriores.

A pesar de esta diferencia en las condiciones experimentales, es posible observar estructura en los datos, lo que sugiere que puede existir un tipo de relación no lineal entre los valores de ADC y las concentraciones de lactato. Esto es consistente con lo obtenido en los experimentos previos.

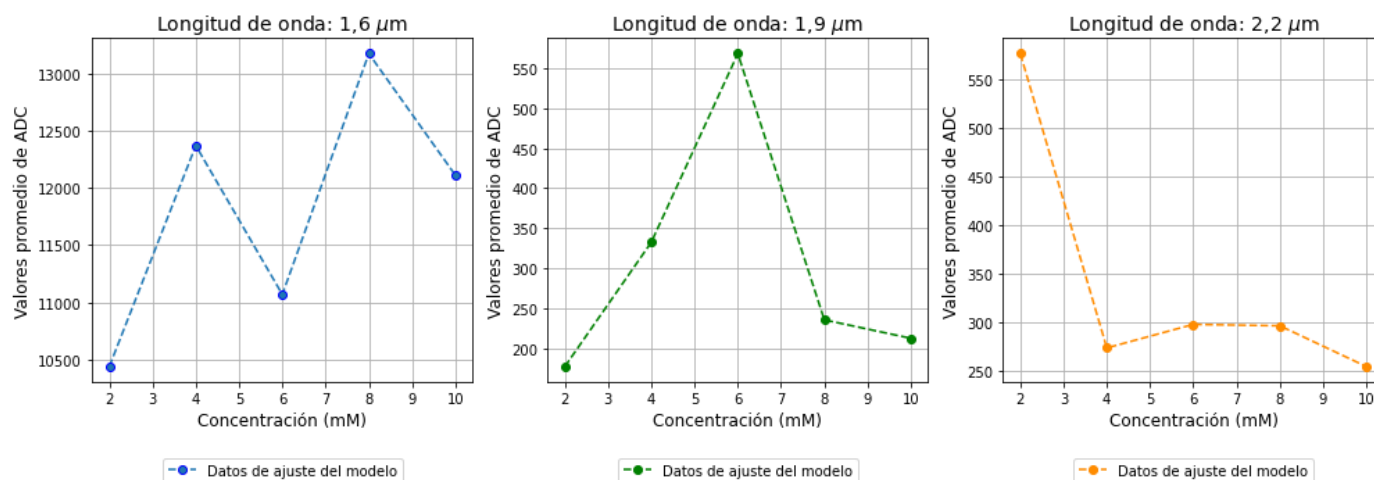


Figura 4.8: Mediciones de experimento con agua desmineralizada.

Estimación de los niveles de lactato

El modelo SVR fue ajustado utilizando las soluciones de 2 a 10 mM, intercaladas en pares en el rango. Los datos utilizados en la validación del mismo fueron las soluciones 3 y 7 mM.

En la Figura 4.9 se presenta el valor real versus el valor estimado por SVR de las dos concentraciones de lactato seleccionadas. La línea diagonal en rojo representa el escenario ideal donde los valores reales coinciden con los estimados. Los resultados de validación mostraron un R2 de 0,98 usando la información de las tres longitudes de onda para realizar la estimación. El margen de error de estimación para la solución de 3 mM es del 10,45% y para 7 mM, del 3,71%.

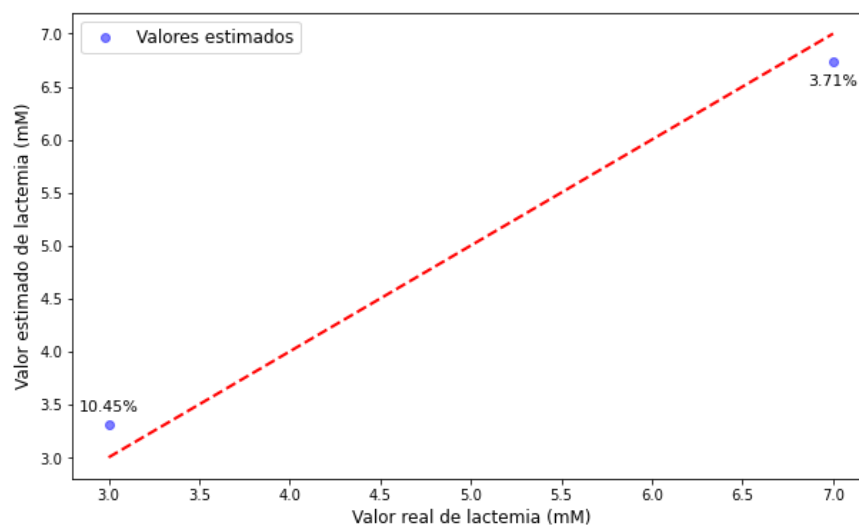


Figura 4.9: Estimación con SVR de las soluciones 3 mM y 7 mM con el error asociado.

Estos resultados, sumado a los obtenidos en el experimento preliminar con solución inyectable, dan las primeras señales de que la técnica funciona y que puede ser utilizada para obtener mediciones y estimar las concentraciones.

Durante la ejecución de estos experimentos, la influencia de los efectos térmicos sobre las concentraciones y los detectores impidió ajustar nuevos modelos u obtener más estimaciones de la lactemia, requeridas para calcular el error experimental del instrumento. Esta es una de las áreas más relevantes del trabajo futuro para finalizar el desarrollo de este instrumento.

5. CONCLUSIÓN

En el presente proyecto se diseñó y desarrolló un prototipo funcional de sensor de lactato de uso clínico para medición no invasiva y en tiempo real basado en tecnologías optoelectrónicas en bandas del espectro NIR. Experimentos preliminares basados en el Estado del Arte demostraron la existencia de diferencias en la absorción de lactato en 3 bandas NIR para distintas concentraciones de lactato. Además, estos experimentos proporcionaron valiosa información sobre los requisitos de distancia entre emisor NIR y receptor. Experimentos independientes de calibración mostraron efectos indeseados atribuibles a los LEDs, que apuntan al diseño de una nueva y mejorada estrategia de adquisición de datos para minimizar su efecto en las mediciones.

Si bien es posible que este efecto sea controlado modificando la estrategia de adquisición, es necesario considerar también la opción de incrementar el OPL para reducir su efecto. El tubo de borosilicato, utilizado en los experimentos de validación, se seleccionó sólo por criterios de minimización de OPL, sin embargo, los efectos térmicos medidos podrían evitarse con un OPL más largo, seleccionando otro tubo de dimensiones apropiadas.

Los experimentos de validación con agua desmineralizada permitieron confirmar la técnica de estimación seleccionada para el instrumento, similar a la utilizada en los experimentos preliminares. Esta técnica, SVR, mostró un bajo error en la predicción, lo que indica que el método puede ser de utilidad. En la siguiente etapa de desarrollo, es pertinente investigar otras técnicas, por ejemplo, redes neuronales, las cuales, mantienen su capacidad de estimación aún en condiciones de mayor ruido en las mediciones.

Los resultados experimentales presentados en este Informe, respecto a absorción versus longitud de onda y concentración deben compararse con la literatura estudiada en el Estado del Arte, con el fin de confirmar que las mediciones son consistentes con mediciones efectuadas con espectrofotómetros por otros grupos de investigación. Esta comparación es la base para la publicación de un artículo científico con estos resultados.

El trabajo realizado hasta el momento ha sentado las bases para el desarrollo de un instrumento de medición de lactato. Sin embargo, es importante reconocer que existen desafíos que se deben superar y aspectos que requieren una investigación más profunda. Estas líneas de trabajo futuro van enfocadas en mejorar y validar el sensor, con el cual se podrán facilitar diagnósticos más precisos y personalizados para su uso clínico, transformando la manera en que se miden actualmente los niveles de lactato.

6. REFERENCIAS

- [1] A. C. Guyton y J. E. Hall, *Tratado de Fisiología Médica*, vol. 12. 2011.
- [2] S. Kushimoto *et al.*, “Lactate, a useful marker for disease mortality and severity but an unreliable marker of tissue hypoxia/hypoperfusion in critically ill patients”, *Acute Med. Surg.*, vol. 3, n° 4, pp. 293–297, 2016, doi: 10.1002/ams2.207.
- [3] M. Garcia-Alvarez, P. Marik, y R. Bellomo, “Sepsis-associated hyperlactatemia”, *Crit. Care*, vol. 18, n° 5, p. 503, sep. 2014, doi: 10.1186/s13054-014-0503-3.
- [4] “Rol del lactato en pacientes con falla hepática”, Accedido: 6 de julio de 2023. [En línea]. Disponible en: [https://revistas.javeriana.edu.co/files-articulos/UMED/62-3%20\(2021\)/231066999006/](https://revistas.javeriana.edu.co/files-articulos/UMED/62-3%20(2021)/231066999006/)
- [5] “Lactate biosensors: current status and outlook | SpringerLink”. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-013-7307-1> (accedido 21 de junio de 2023).
- [6] K. Budidha, M. Mamouei, N. Baishya, M. Qassem, P. Vadgama, y P. A. Kyriacou, “Identification and Quantitative Determination of Lactate Using Optical Spectroscopy—Towards a Noninvasive Tool for Early Recognition of Sepsis”, *Sensors*, vol. 20, n° 18, p. 5402, sep. 2020, doi: 10.3390/s20185402.
- [7] D. Lafrance, L. C. Lands, L. Hornby, y D. H. Burns, “Near-Infrared Spectroscopic Measurement of Lactate in Human Plasma”, *Appl. Spectrosc.*, vol. 54, n° 2, pp. 300–304, feb. 2000, doi: 10.1366/0003702001949267.
- [8] D. Lafrance, “Near Infrared Determination of Lactate in Biological Fluids and Tissues”, McGill University, Montreal, Quebec, Canadá, 2003.
- [9] M. Gillam-Krakauer y C. W. Gowen Jr, “Birth Asphyxia”, en *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. Accedido: 1 de julio de 2023. [En línea]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430782/>
- [10] J. M. Novoa P *et al.*, “¿Es posible disminuir la Incidencia de Encefalopatía Hipóxica Isquémica?”, *Rev. Chil. Obstet. Ginecol.*, vol. 82, n° 1, pp. 51–57, feb. 2017, doi: 10.4067/S0717-75262017000100007.
- [11] “sintesis.med.uchile.cl - Asfixia neonatal”. <https://sintesis.med.uchile.cl/index.php/profesionales/informacion-para-profesionales/medicina/condiciones-clinicas2/pediatria/750-2-01-1-114> (accedido 1 de julio de 2023).
- [12] L. W. Andersen, J. Mackenhauer, J. C. Roberts, K. M. Berg, M. N. Cocchi, y M. W. Donnino, “Etiology and therapeutic approach to elevated lactate”, *Mayo Clin. Proc.*, vol. 88, n° 10, pp. 1127–1140, oct. 2013, doi: 10.1016/j.mayocp.2013.06.012.
- [13] B. Phipers y J. T. Pierce, “Lactate physiology in health and disease”, *Contin. Educ. Anaesth. Crit. Care Pain*, vol. 6, n° 3, pp. 128–132, jun. 2006, doi: 10.1093/bjaceaccp/mkl018.
- [14] “Lactate metabolism in human health and disease | Signal Transduction and Targeted Therapy”. <https://www.nature.com/articles/s41392-022-01151-3> (accedido 17 de junio de 2023).
- [15] “Lactic Acidosis: Background, Etiology, Epidemiology”. <https://emedicine.medscape.com/article/167027-overview?0=0=reg=1&1=reg=1> (accedido 2 de julio de 2023).
- [16] O. Kruse, N. Grunnet, y C. Barfod, “Blood lactate as a predictor for in-hospital mortality in patients admitted acutely to hospital: a systematic review”, *Scand. J. Trauma Resusc. Emerg. Med.*, vol. 19, p. 74, dic. 2011, doi: 10.1186/1757-7241-19-74.
- [17] M. Falk, C. Psotta, S. Cirovic, y S. Shleev, “Non-Invasive Electrochemical Biosensors Operating in Human Physiological Fluids”, *Sensors*, vol. 20, n° 21, Art. n° 21, ene. 2020, doi: 10.3390/s20216352.
- [18] T. G. Mayerhöfer, S. Pahlow, y J. Popp, “The Bouguer-Beer-Lambert Law: Shining Light on the Obscure”, *ChemPhysChem*, vol. 21, n° 18, pp. 2029–2046, sep. 2020, doi: 10.1002/cphc.202000464.
- [19] M. Mamouei, K. Budidha, N. Baishya, M. Qassem, y P. A. Kyriacou, “An empirical investigation of deviations from the Beer–Lambert law”, *Sci. Rep.*.
- [20] “Near-Infrared Region Measurement and Related Considerations Part 1”. <https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/tips-ftir/nir1.html> (accedido 23 de julio de 2023).
- [21] D. Malacara, *Óptica básica*, 3ª ed. Fondo de Cultura Económica, 2015.
- [22] D. A. Skoog, F. J. Holler, y S. R. Crouch, *Principios de Análisis Instrumental*, 6ª ed. Cengage Learning Editores, 2008.

- [23] R. Chang, *Química*, 10ª ed. McGraw Hill, 2010.
- [24] “Experimental Error”, *Cornell University*. https://courses.cit.cornell.edu/virtual_lab/LabZero/Experimental_Error.shtml (accedido 14 de julio de 2023).
- [25] R. Muthukrishnan y S. Maryam Jamila, “Predictive Modeling Using Support Vector Regression”, *International Journal of Scientific & Technology Research*, vol. 9, n° 2, 2020.
- [26] “Linear Regression”. <http://www.stat.yale.edu/Courses/1997-98/101/linreg.htm> (accedido 22 de julio de 2023).
- [27] “1.4. Support Vector Machines”, *scikit-learn*. <https://scikit-learn/stable/modules/svm.html> (accedido 10 de julio de 2023).
- [28] O. A. Montesinos López, A. Montesinos López, y J. Crossa, “Support Vector Machines and Support Vector Regression”, en *Multivariate Statistical Machine Learning Methods for Genomic Prediction*, O. A. Montesinos López, A. Montesinos López, y J. Crossa, Eds., Cham: Springer International Publishing, 2022, pp. 337–378. doi: 10.1007/978-3-030-89010-0_9.
- [29] S. Chatterjee, K. Budidha, M. Qassem, y P. A. Kyriacou, “In-silico investigation towards the non-invasive optical detection of blood lactate”, *Sci. Rep.*, vol. 11, n° 1, Art. n° 1, jul. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-92803-x.
- [30] “High-Performance UV-Vis, Cary 5000 UV-Vis-NIR spectrophotometer | Agilent”. <https://www.agilent.com/en/product/molecular-spectroscopy/uv-vis-uv-vis-nir-spectroscopy/uv-vis-uv-vis-nir-systems/cary-5000-uv-vis-nir> (accedido 19 de julio de 2023).
- [31] “SCHOTT BOROFLOAT® technical details”. <https://www.schott.com/en-ae/products/borofloat-p1000314/technical-details> (accedido 19 de julio de 2023).
- [32] “Optical Transmission – American Scientific Glassblowers Society”. <https://asgs-glass.org/optical-transmission/> (accedido 19 de julio de 2023).
- [33] LED Microsensor NT, “Near-Infrared (NIR) Light-Emitting Diode (hoja de datos de Lms16 Series)”. [En línea]. Disponible en: <http://lmsnt.com/>
- [34] LED Microsensor NT, “Near-Infrared (NIR) Light-Emitting Diode (hoja de datos de Lms19 Series)”. [En línea]. Disponible en: <http://lmsnt.com/>
- [35] LED Microsensor NT, “Near-Infrared (NIR) Light-Emitting Diode (hoja de datos de Lms22 Series)”. [En línea]. Disponible en: <http://lmsnt.com/>
- [36] Hamamatsu Photonics, “InGaAs PIN photodiodes G12183 series”. 2021.
- [37] “MFM-30-12”, *Digi-Key Electronics*. <https://www.digikey.com/es/products/detail/mean-well-usa-inc/MFM-30-12/7707287> (accedido 15 de julio de 2023).

7. ANEXOS

7.1 ANEXO 1: METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA DE LITERATURA

Para la búsqueda de literatura asociada se utilizó la base de datos *PubMed*. Las palabras claves utilizadas fueron “lactato”, “medición no invasiva”, “infrarrojo cercano” o “NIR” y “uso clínico”. Los criterios de inclusión que se aplicaron fueron para seleccionar estudios publicados en los últimos 10 años (desde 2013 a 2023), en inglés o español y centrados únicamente en investigaciones relacionadas al ámbito clínico. Como criterio de exclusión de los estudios, se dejó fuera a cualquier estudio que no cumpla con lo anteriormente mencionado y que su aplicación se enfoque en el ámbito deportivo u otro que no se haya especificado. Sin embargo, se consideró un estudio fuera del rango de años especificado por resultar relevante para el desarrollo del proyecto. Los detalles asociados a la búsqueda de los estudios se presentan a continuación.

En *PubMed*:

- Expresión de búsqueda: (((*lactate*) AND (*non-invasive measurement*)) AND ((*NIR*)) OR (*near-infrared spectra*))) AND (*clinical use*)
- La búsqueda arrojó 349 estudios sin aplicación de los filtros establecidos en la sección *Estado del Arte*.
- 194 estudios arrojados después de la aplicación de los filtros establecidos en la sección de Estado del Arte (periodo de 10 años y en idioma inglés o español).
- Cantidad de estudios seleccionados luego de lectura de título: 3.
- Cantidad de estudios seleccionados luego de lectura de resumen: 3.
- Cantidad de estudios seleccionados por lectura completa: 1.

N°	Título	Autor, año	DOI o ISSN
1	<i>Identification and Quantitative Determination of Lactate Using Optical Spectroscopy-Towards a Noninvasive Tool for Early Recognition of Sepsis</i>	K. Budidha <i>et al.</i> , 2020	10.3390/s20185402

Tabla 1: Información del estudio seleccionado de la base de datos *PubMed*.

Bajo el método de referencias cruzadas, a partir del estudio N°1, se identificó y obtuvo un artículo relacionado al tema, que, si bien, no cumple con el periodo de años especificado en el criterio de elegibilidad, aporta relevante información para el desarrollo del proyecto. Este artículo corresponde a uno desarrollado por los investigadores D. Lafrance *et al.* (2000).

Se llevó a cabo además el método de búsqueda por autor, con la finalidad de investigar si los autores anteriores han publicado otros estudios relacionados y así proporcionar una perspectiva más completa y/o actualizada sobre el tema en cuestión.

A continuación se presenta una tabla que contiene los estudios obtenidos y seleccionados a partir de los dos métodos de búsqueda anteriormente mencionados.

N°	Título	Autor, año	DOI o ISSN	Método de búsqueda
1	<i>Near Infrared Determination of Lactate in Biological Fluids and Tissues</i>	D. Lafrance, 2003	10.1109/EMBC44109.2020.9176675	Por autor

2	<i>In-silico investigation towards the non-invasive optical detection of blood lactate</i>	S. Chatterjee et al., 2021	10.1038/s41598-021-92803-x	Por autor
3	<i>Near-infrared spectroscopic measurement of lactate in human plasma</i>	D. Lafrance et al., 2000	10.1366/0003702001949267	Referencias cruzadas

Tabla 2: Estudios seleccionados a partir de los métodos de búsqueda mediante referencias cruzadas y por autor.

7.2 ANEXO 2: MODOS DE FUNCIONAMIENTO DE LEDs NIR

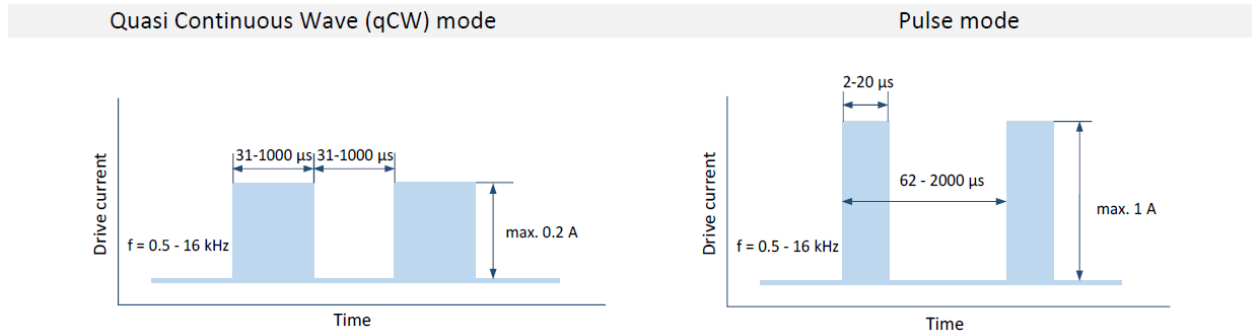


Figura 1: Modos de funcionamiento para LED de 1,6 μm (modelo Lms16LED).

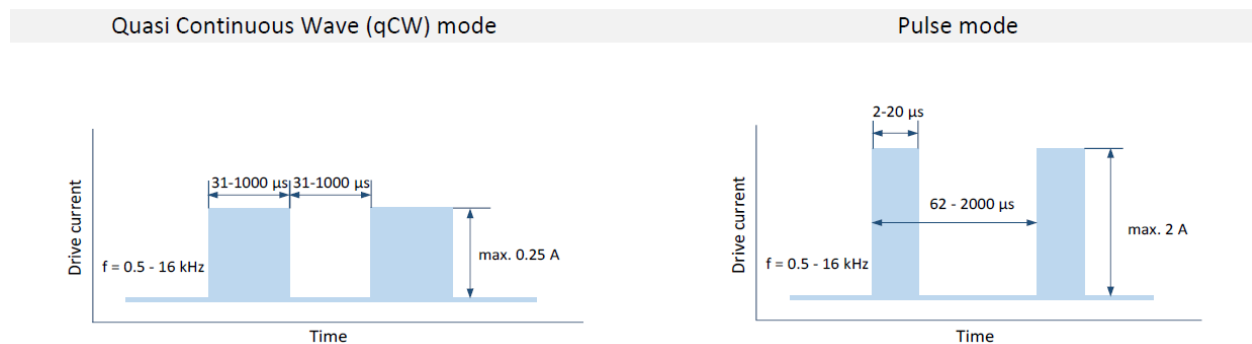


Figura 2: Modos de funcionamiento para LED de 1,9 μm (modelo Lms19LED).

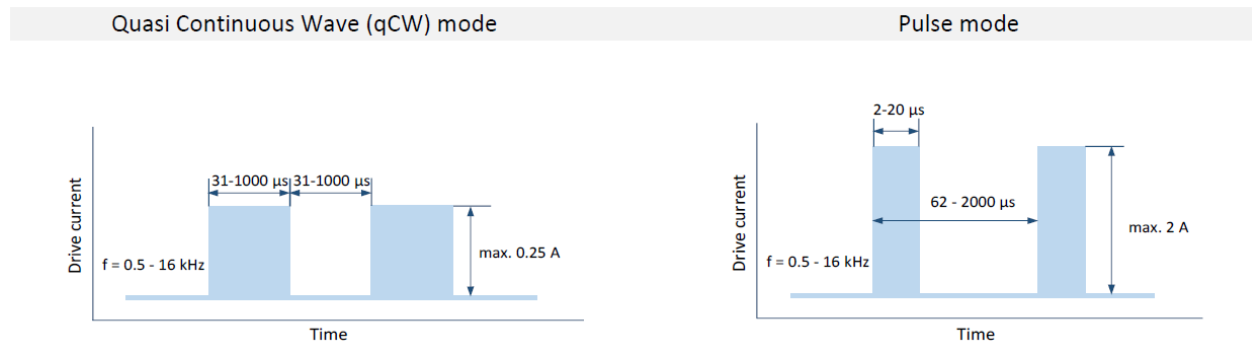


Figura 3: Modos de funcionamiento para LED de 2,2 μm (modelo Lms22LED).

7.3 ANEXO 3: ESQUEMÁTICOS ELECTRÓNICOS DE LA TARJETA CONTROLLER

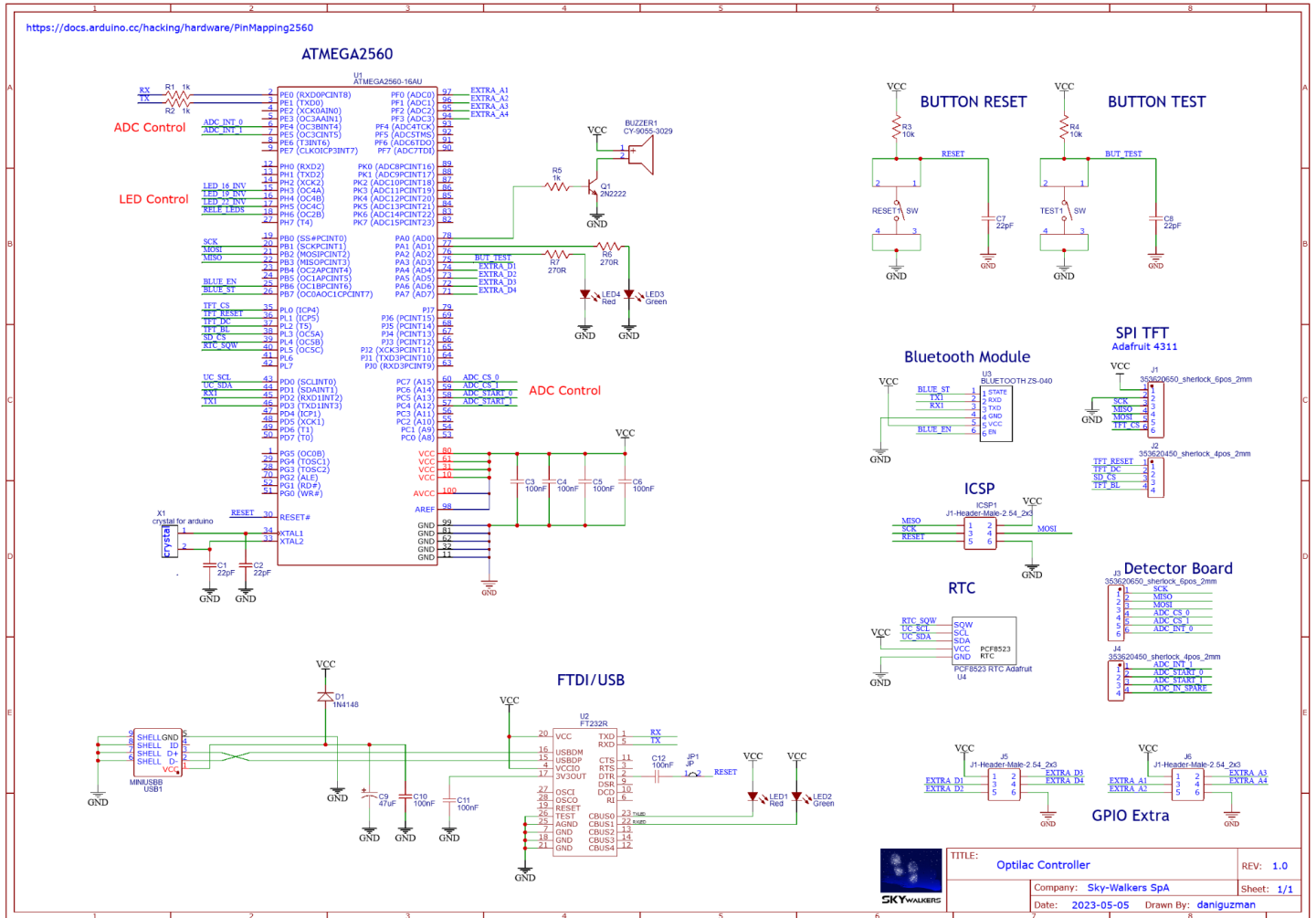


Figura 1: Esquemático electrónico del control en tarjeta Controller.

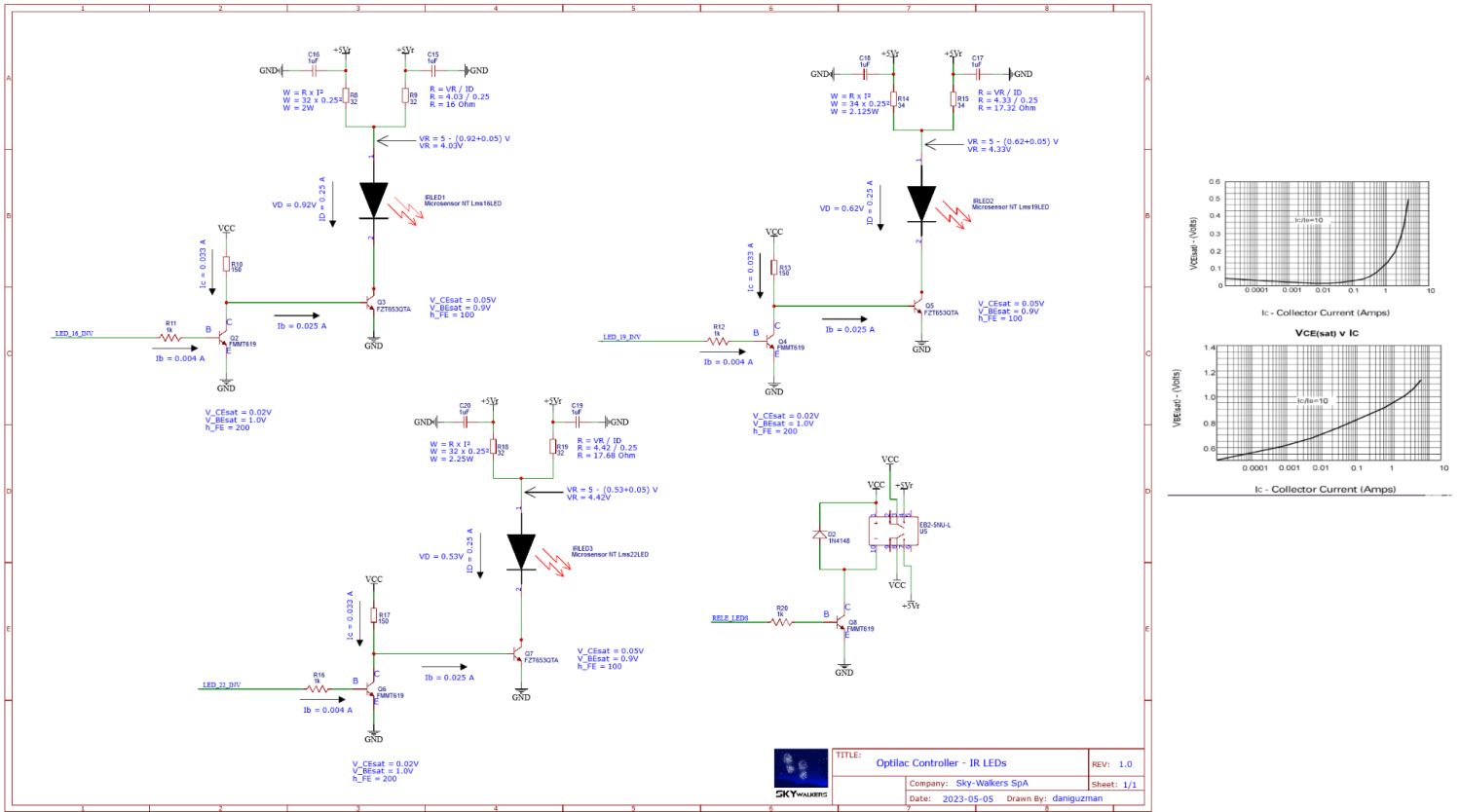
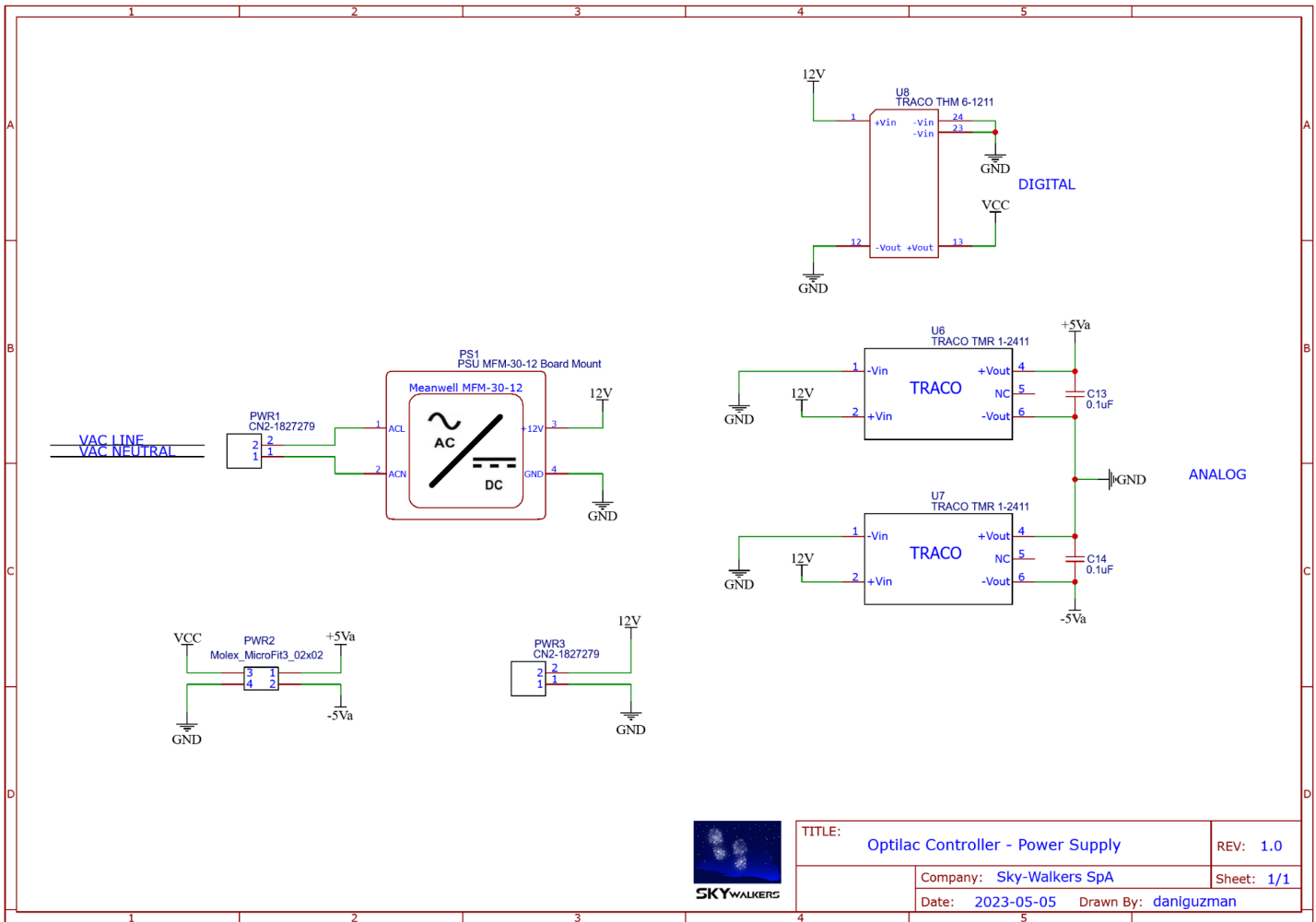


Figura 2: Esquemático electrónico de LEDs NIR en tarjeta Controller.



TITLE: Optilac Controller - Power Supply		REV: 1.0
Company: Sky-Walkers SpA		Sheet: 1/1
Date: 2023-05-05	Drawn By: daniguzman	

Figura 3: Esquemático electrónico de la alimentación en tarjeta Controller.

7.4 ANEXO 4: ESQUEMÁTICO ELECTRÓNICO DE LA TARJETA DETECTOR

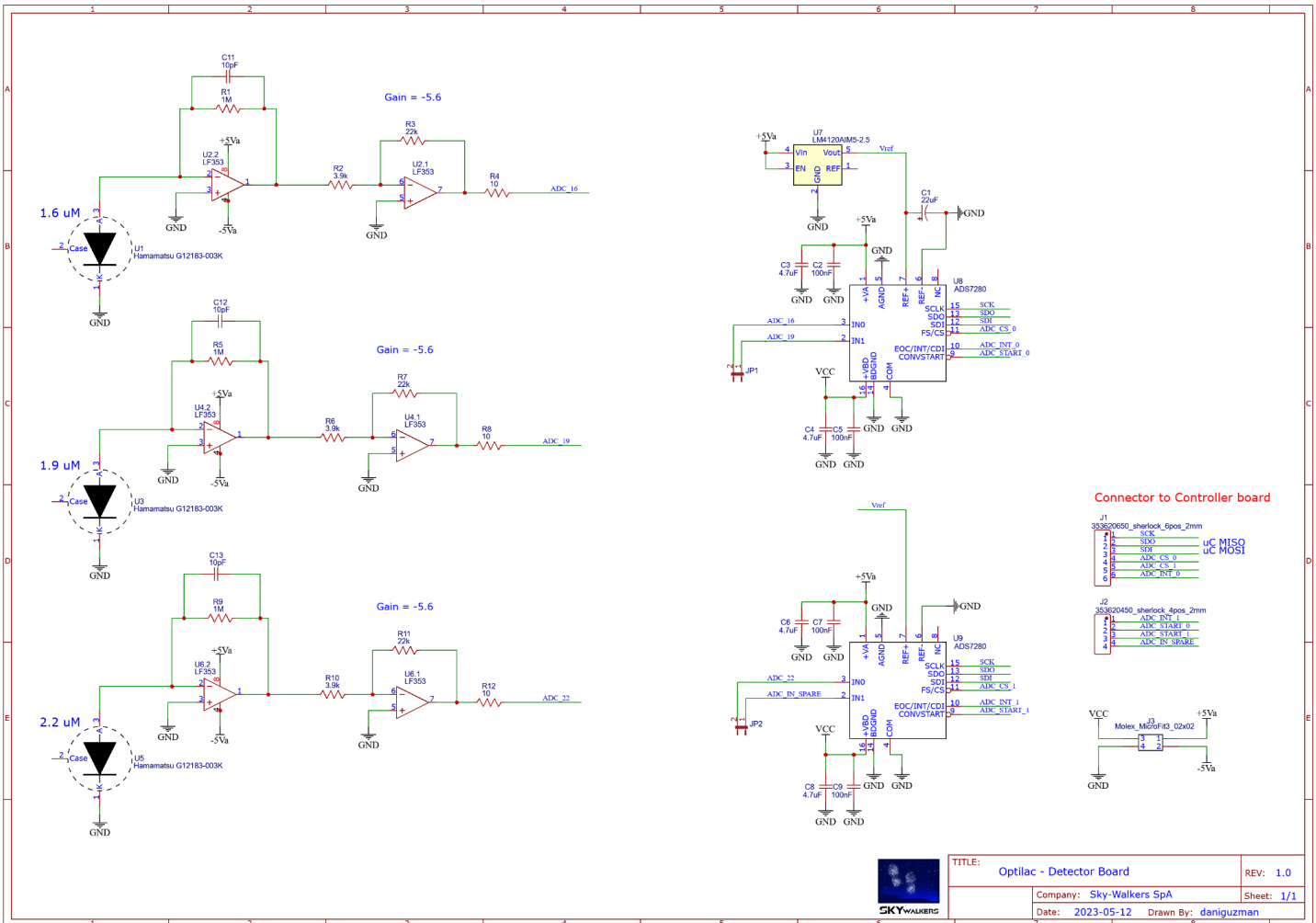


Figura 1: Esquemático electrónico de la tarjeta Detector.

TITLE:	Optilac - Detector Board	REV:	1.0
Company:	Sky-Walkers SpA	Sheet:	1/1
Date:	2023-05-12	Drawn By:	daniguzman

7.5 ANEXO 5: PLANOS DE PIEZAS DEL ENCAPSULADO

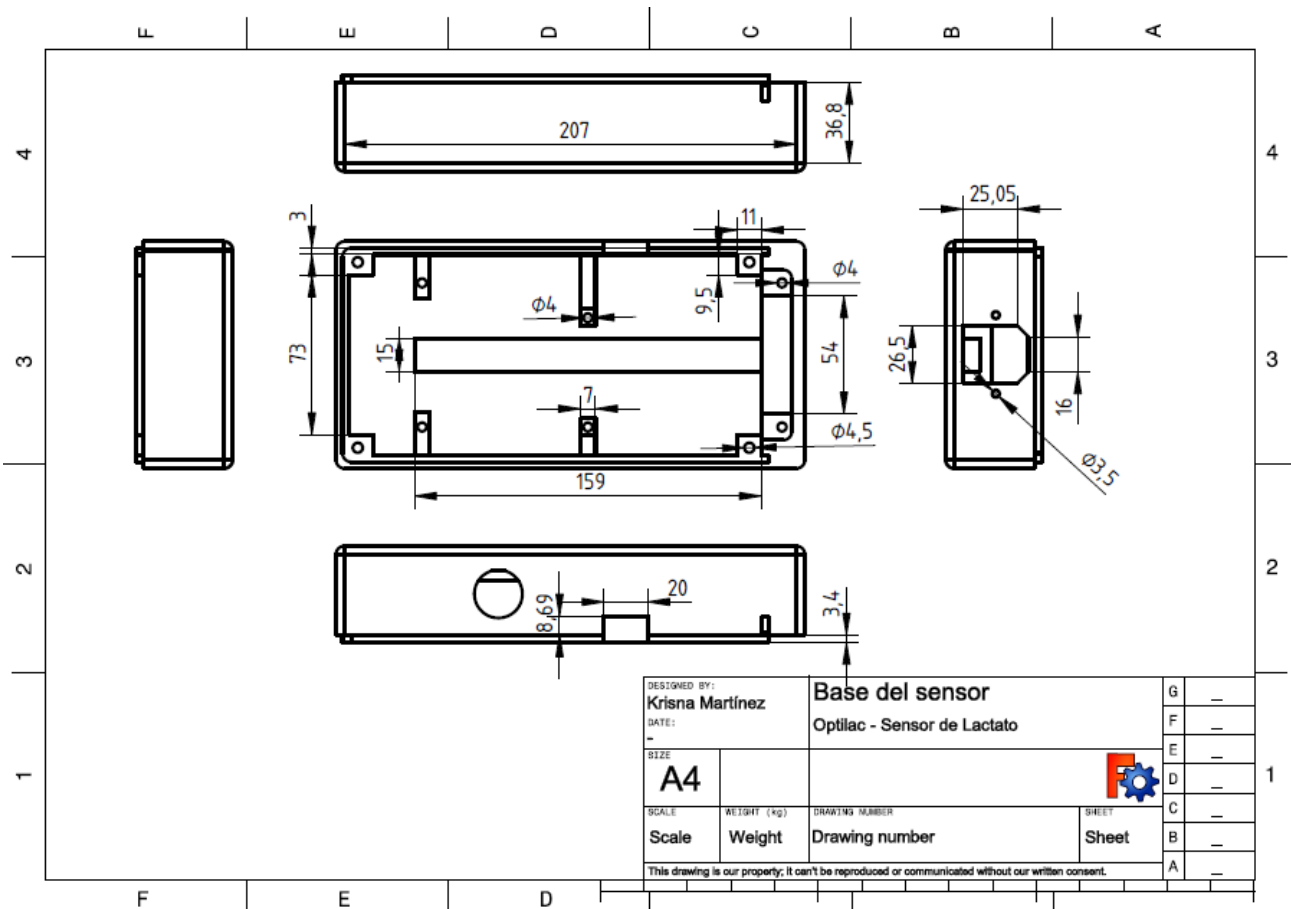


Figura 1: Base del sensor de lactato.

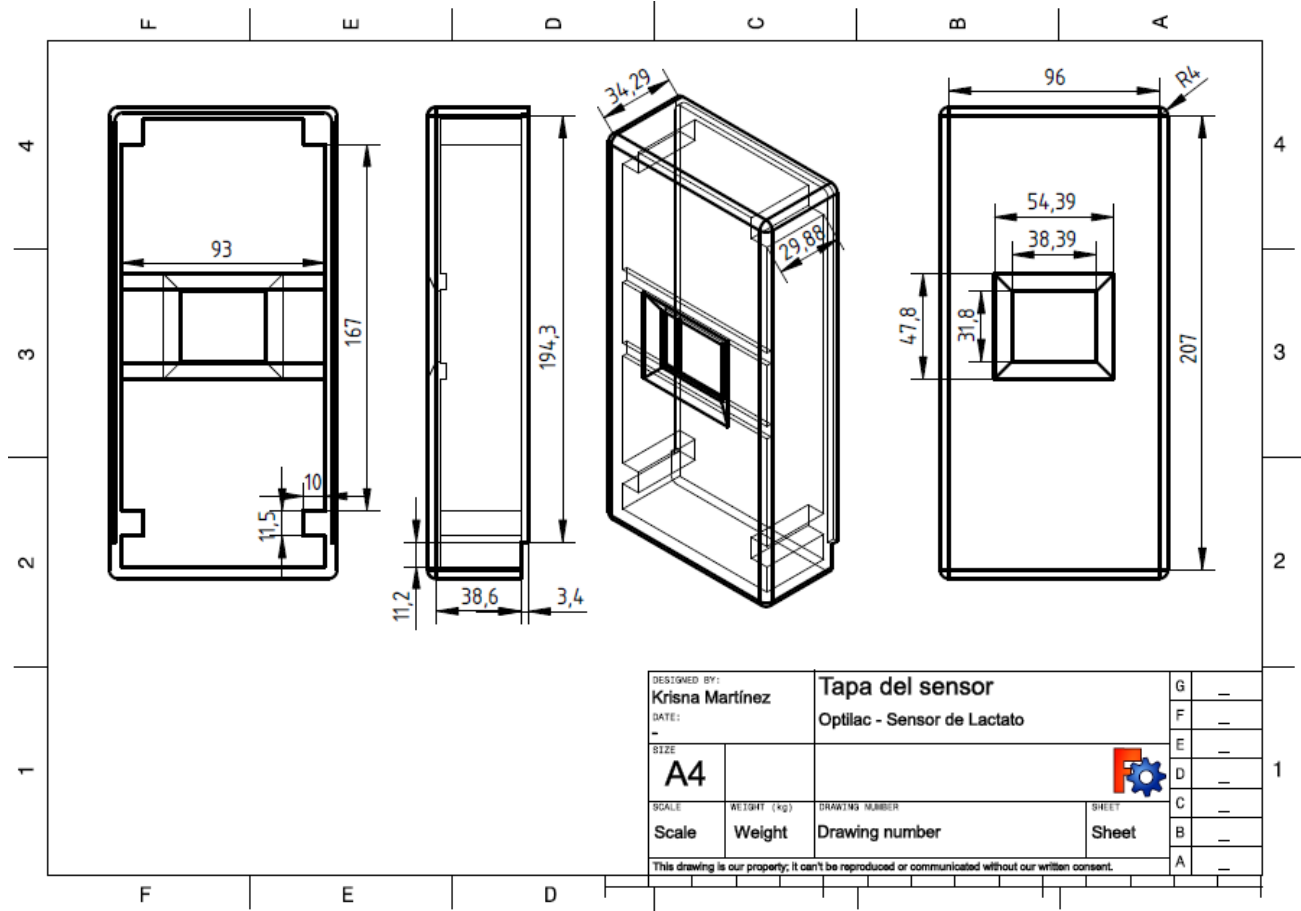


Figura 2: Tapa del sensor de lactato.

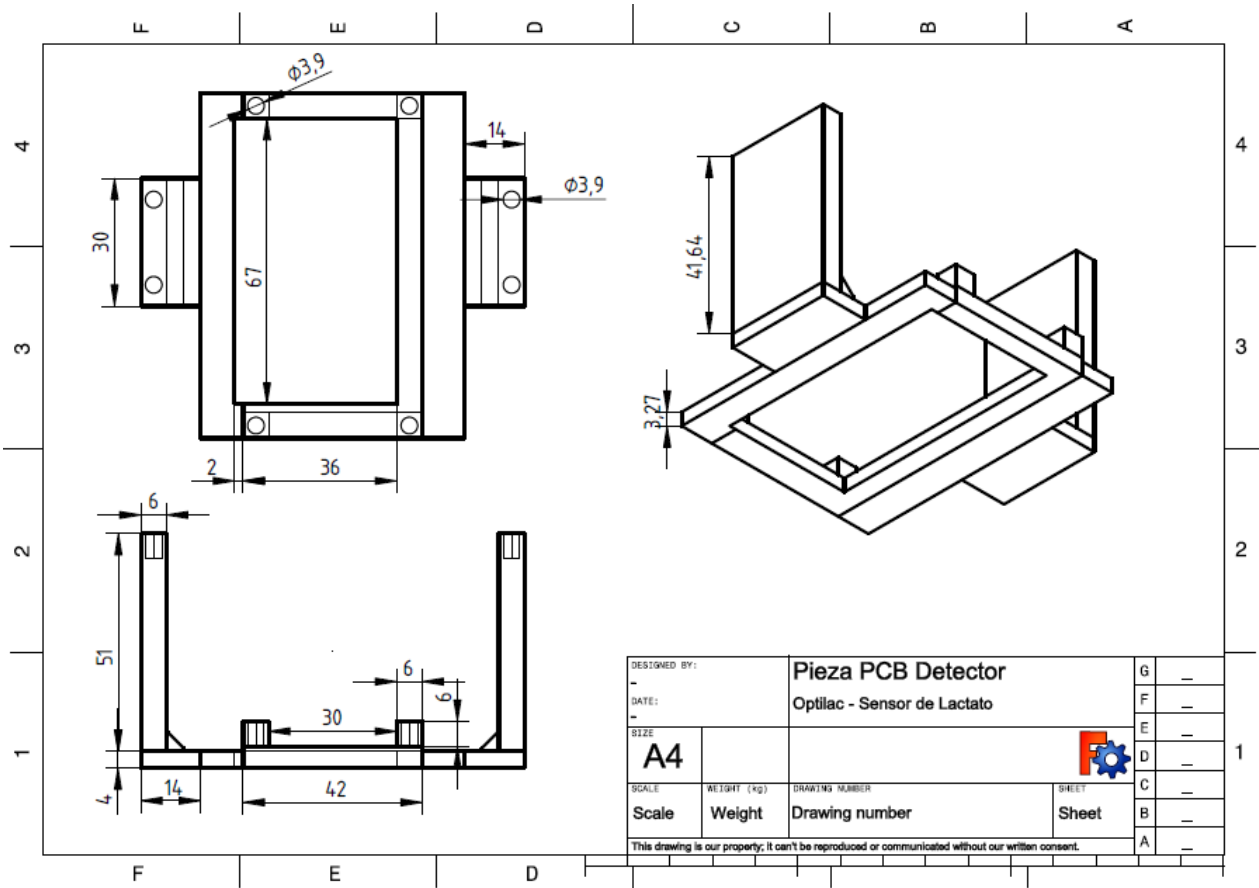


Figura 3: Pieza para tarjeta electrónica Detector.

7.6 ANEXO 6: MEDICIÓN DE ALINEACIÓN DE LEDs Y FOTODIODOS NIR

Una vez montado los circuitos en su encapsulado impreso, se llevó a cabo una medición con la finalidad de comprobar que cada LED NIR se encontrara correctamente alineado con su respectivo detector. Para esto, se acomoda la pieza que sostiene la tarjeta *Detector*, hasta encontrar un valor máximo de ADC.

Se obtuvieron valores sobre 14.000 de ADC como máximo, esto puede ser explicado ya que puede corresponder al valor de saturación del fotodetector IR o al de un amplificador operacional intermedio.



Figura 1: Mediciones de alineación de LEDs y fotodiodos NIR.

7.7 ANEXO 7: RESUMEN DE VALORES DE MEDICIONES INICIALES

Mediciones	Valores de ADC promedio 1,6 μm	Valores de ADC promedio 1,9 μm	Valores de ADC promedio 2,2 μm
Tubo sin agua desmineralizada	14.119	14.229	14.230
Tubo con agua desmineralizada	14.143	577	647
Una hoja de papel	14.182	4.150	4.667
Dos hojas de papel	12.215	1.183	1.347

Tabla 1: Mediciones iniciales de prueba.

7.8 ANEXO 8: MEDICIONES PARA AJUSTE DE RESISTENCIAS EN LEDs

A partir de las mediciones iniciales del Anexo 7, fue posible evidenciar que el agua desmineralizada es absorbida principalmente por las longitudes de onda 1,9 y 2,2 μm , es por esto que se decidió ajustar los valores de resistencia de los LEDs. La finalidad de este ajuste fue permitir aumentar la cantidad de corriente que circulaba por los LEDs y, en consecuencia, aumentar la cantidad de fotones que alcanzan los fotodetectores IR. Esta modificación neutralizó el impacto de la absorción de la luz por el agua en las mediciones, aumentando el rango de valores de ADC para ambas longitudes de onda.

Los valores de resistencia (R) en un inicio correspondían a 15 Ω para el LED de 1,6 μm , 16 Ω para el LED de 1,9 μm y 18 Ω para el LED de 2,2 μm . Los valores ADC asociados a la corriente en cada medición fueron:

N°	LEDs	Duración del pulso (μs)	R (Ω)	Corriente (A)	Valores de ADC con una hoja de papel	Valores de ADC con doble hoja de papel
1	1,9 μm	100	16	0,27	4.150	1.183
	2,2 μm	100	18	0,26	4.667	1.347
2	1,9 μm	40	8	0,62	12.784	3.569
	2,2 μm	40	9	0,55	10.145	2.152

Tabla 1: Ajuste de corriente para LEDs de 1,9 y 2,2 μm .

Es importante mencionar que la duración del pulso de los LEDs también se debió modificar, reduciendo su tiempo de encendido a 40 μs . Disminuir este tiempo fue necesario para evitar posibles daños de sobrecalentamiento del componente.

A su vez, se ajustó el valor de resistencia para el LED de 1,6 μm , esto ya que el fotodetector se encontraba saturado en la medición con agua desmineralizada, por lo tanto se disminuyó la cantidad de corriente de funcionamiento del LED NIR. En la Tabla 2 se muestran los cambios de resistencia y las mediciones obtenidas. Con 45,5 Ω , se obtuvieron mediciones no saturadas para el tubo rectangular con agua desmineralizada.

N°	LEDs	Duración del pulso (μs)	R (Ω)	Corriente (A)	Valores de ADC con una hoja de papel	Valores de ADC con doble hoja de papel	Valores de ADC con triple hoja de papell
1	1,6 μm	40	15	0,29	14.034	13.341	5.661
2	1,6 μm	40	28	0,18	14.133	9.872	3.593
3	1,6 μm	40	45,5	0,11	14.207	5.911	2.524

Tabla 2: Ajuste de corriente para LED de 1,6 μm .

7.9 ANEXO 9: ALGORITMO DE ESTIMACIÓN DE LACTEMIA

Estimación de lactemia con SVR

```

from sklearn.svm import SVR
from sklearn.model_selection import GridSearchCV

x = data_16      # Mediciones de ajuste del modelo de las soluciones a 1,6 µm
y = data_19      # Mediciones de ajuste del modelo de las soluciones a 1,9 µm
z = data_22      # Mediciones de ajuste del modelo de las soluciones a 2,2 µm

xv = data_16_val  # Mediciones de validación del modelo de las soluciones a 1,6 µm
yv = data_19_val  # Mediciones de validación del modelo de las soluciones a 1,9 µm
zv = data_22_val  # Mediciones de validación del modelo de las soluciones a 2,2 µm

# Concentraciones usadas para ajuste del modelo:
y_svr = c

# Mediciones de ajuste:
X_svr = np.concatenate((x[:, np.newaxis], y[:, np.newaxis], z[:, np.newaxis]), axis=1)

# Concentraciones usadas para validación del modelo:
y_val = c_val

# Mediciones de validación:
X_val = np.concatenate((xv[:, np.newaxis], yv[:, np.newaxis], zv[:, np.newaxis]), axis=1)

# Búsqueda de hiperparámetros óptimos para el modelo:

params = {'kernel': ('rbf', 'poly'),
          'C': [0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 6, 7, 8, 10],
          'epsilon': [0.01, 0.1, 0.2, 0.5, 1],
          'degree': [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10]}

model_svr = SVR()# Definición del modelo con SVR

# Definición de grilla con parámetros aplicado al modelo:
grid = GridSearchCV(model_svr, param_grid=params, cv=2, scoring='r2', verbose=1,
return_train_score=True)

# Se ajustan los datos de entrenamiento con lo definido en la grilla para encontrar el mejor
parámetro:
#grid.fit(X_train, y_train)
grid.fit(X_svr, y_svr)

# Chequear los mejores parámetros para el modelo en base a los datos de ajuste:
print(grid.best_params_)

# Se define modelo con los mejores hiperparámetros:
# Este es un ejemplo de hiperparámetros que se pueden utilizar
svr_best = SVR(kernel='poly', gamma='scale', C=6, epsilon=0.05, degree=6)

# Se ajustan con los datos de entrenamiento o ajuste:
svr_best.fit(X_svr, y_svr)

# Predicción de los datos de validación:

```

```
y_pred = svr_best.predict(X_val)
print(y_pred)
```

```
r2 = r2_score(y_val, y_pred)
print(r2)
```

7.10 ANEXO 10: CIRCUITO DE MEDICIÓN PARA EXPERIMENTOS PRELIMINARES

El circuito utilizado consistía en el uso de tres LEDs NIR de las longitudes de onda $1,6\ \mu\text{m}$, $1,9\ \mu\text{m}$ y $2,2\ \mu\text{m}$ que se alineaban hacia los fotodetectores. Por cada medición, los LEDs se intercambiaban y se encajaban en una pieza impresa que estaba sujeta a componentes opto-mecánicos, quedando a 15 mm del fotodiodo. La descripción anterior se puede observar en la Figura 1.

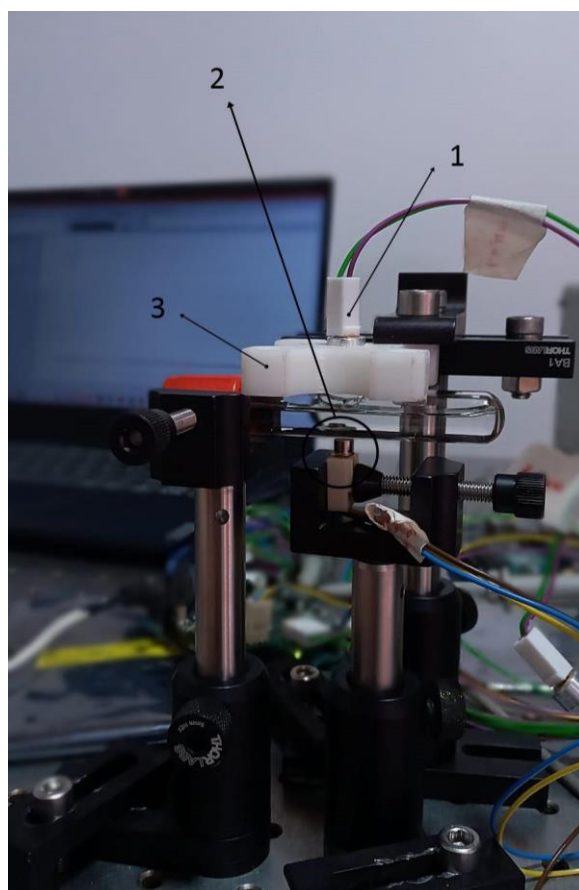


Figura 1: Sistema opto-electrónico con LED NIR (1), fotodetector IR (2) y pieza impresa en el que se encaja el LED (3), todo sujeto por componentes opto-mecánicos.

El circuito de los fotodetectores, se configuró con un ajuste de ganancia de $1\ \text{M}\Omega$ y se utilizaron dos amplificadores operacionales LF353M. Dado al funcionamiento del detector, que convierte las mediciones en voltajes negativos, es que el segundo amplificador operacional se encargaba de convertir estos valores en voltajes positivos. Estos datos de voltaje se enviaban al conversor análogo digital del Arduino UNO, que tenía una resolución de 10 bits.

A continuación se muestran los esquemáticos electrónicos:

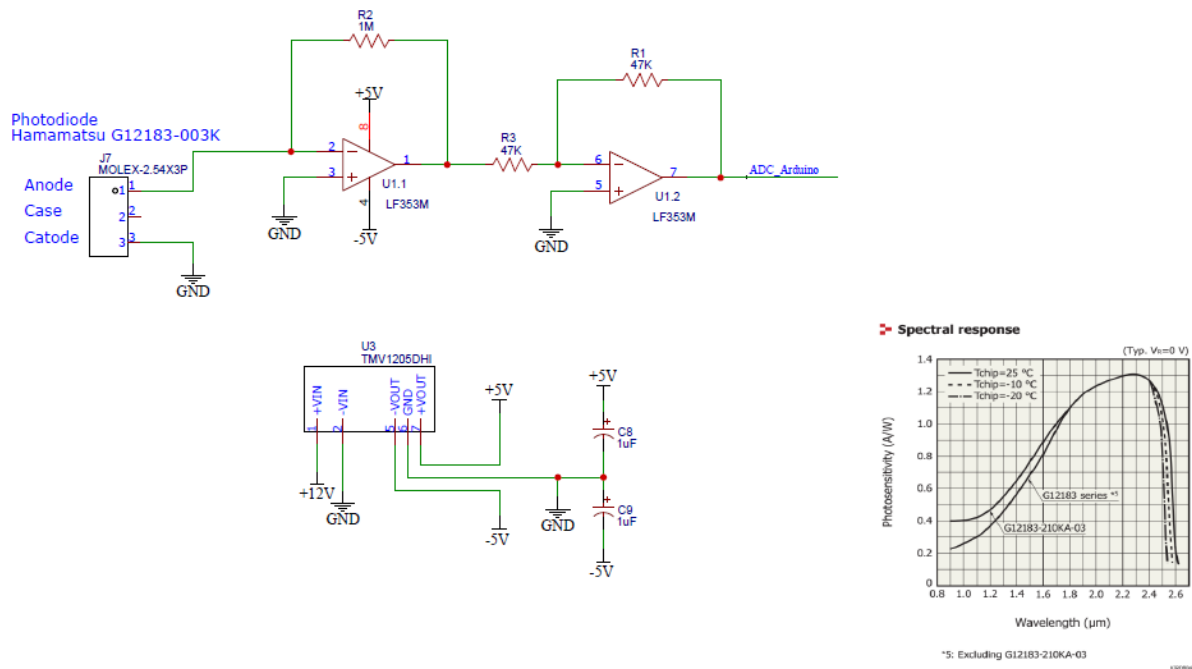


Figura 2: Esquemático electrónico del fotodiodo Hamamatsu G12183-003K.

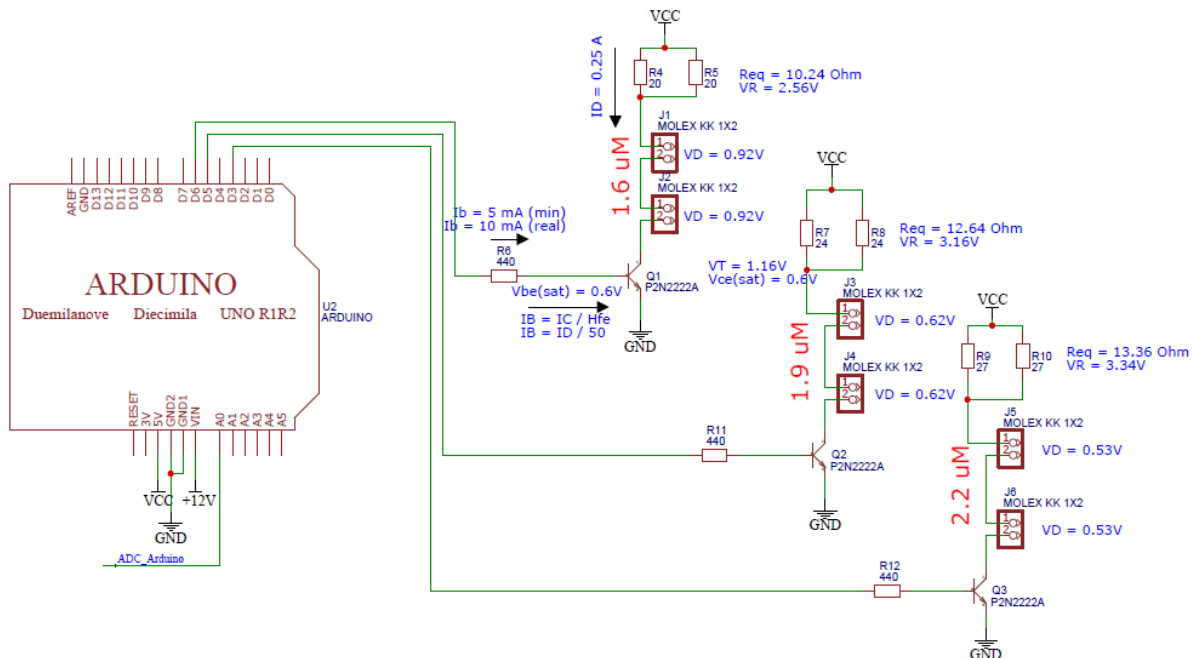


Figura 3: Esquemático electrónico del Arduino UNO y LEDs NIR.

Para el funcionamiento de los LEDs NIR se utilizó el modo pulsátil, donde individualmente cada uno estuvo encendido por $100 \mu\text{s}$ y apagado por $5.900 \mu\text{s}$, de acuerdo con la hoja de datos de los mismos. Para lograr esto, es que la corriente máxima de operación (I_D) se fijó en 250 mA para los tres LEDs. El tiempo en el cual se envía la señal al ADC para tomar una muestra fue definido de acuerdo a la duración del pulso y al tiempo que le toma al detector estabilizarse. En la Figura 4 es posible observar la señal de un pulso de encendido

del LED NIR de 50 μs (traza verde) y la señal del detector previo a pasar por el amplificador operacional (traza amarilla) que invierte su valor de voltaje. Con esto se estableció que es necesario enviar la señal para la toma de las muestras en un tiempo superior a los 20 μs luego de haber encendido el LED NIR.

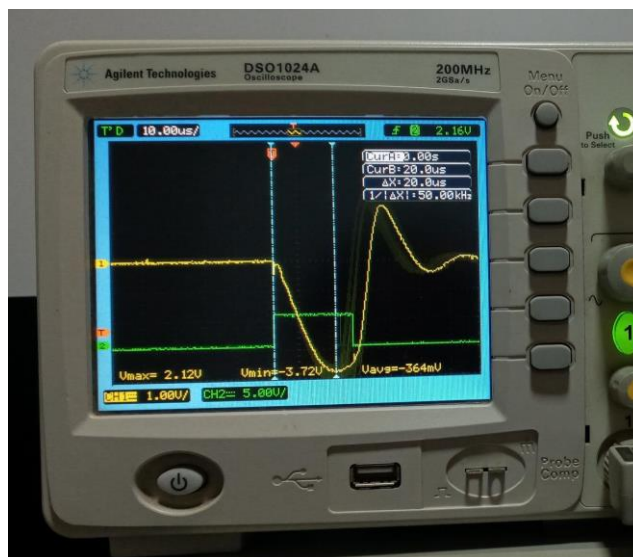


Figura 4: Señal de respuesta del fotodiodo NIR (señal amarilla) una vez que se enciende el LED (señal verde).

A partir de este valor de corriente, se obtuvieron los valores de voltaje directo (V_D) para cada LED. Lo anterior se realizó mediante la digitalización de los gráficos corriente-voltaje que se encuentran en la hoja de datos de estos componentes.

Una vez obtenido estos datos, se obtuvo el voltaje para los 250 mA en cada LED mediante una extrapolación. Los V_D resultantes fueron 912, 619 y 533 mV para los LEDs NIR de 1,6 μm , 1,9 μm y 2,2 μm , respectivamente. Los códigos, desarrollados con lenguaje Python, con la extrapolación de las curvas corriente-voltaje presentadas en las hojas de datos se presentan a continuación:

Ajuste polinomial y extrapolación de curva corriente-voltaje y búsqueda de V_D para LED 1,6 μm (LMS16)

```
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt

voltage = [-584.2105263, -394.7368421, 2.631578947, 186.8421053, 400, 536.8421053, 665.7894737,
728.9473684, 794.7368421, 823.6842105, 847.3684211, 863.1578947]

current = [0.649350649, 0.649350649, 0.649350649, 0.649350649, 1.298701299, 3.246753247,
20.12987013, 50,99.35064935, 129.8701299, 149.3506494, 172.7272727]

# Ajuste polinomial y extrapolación de curva:

plt.figure(figsize=(10,7))
for x1, y1 in zip(voltage, current):
    plt.plot(x1, y1, 'bo')

z = np.polyfit(voltage, current, 6) #coeficientes
f = np.poly1d(z)
val_x1 = []

for x1 in np.linspace(-800, 1500, 400):
    val_x1.append(x1)
```

```

    val_fx1.append(f(x1))
    plt.plot(x1, f(x1), 'c+')

plt.axis([-600, 1500, -200, 800])
plt.title("Lms16LED", size=15)
plt.xlabel("Voltaje (mV)", size=12,)
plt.ylabel("Corriente (mA)", size=12)
plt.axhline(y=250, color='r', linestyle='--')
plt.axvline(x=912, color='r', linestyle='--')
plt.show()

# Búsqueda de V_D para 250 mA:
aprox = []
for i in range(len(val_fx1)):
    aprox.append(round(val_fx1[i]))

for i in range(len(aprox)):
    if aprox[i] == 250:
        print(i, "- current, mA:", aprox[i])
        print(i, "- voltage, mV:", val_x1[i])

```

Ajuste polinomial y extrapolación de curva corriente-voltaje y búsqueda de V_D para LED 1,9 μm (LMS19)

```

import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt

voltage_19 = [-519.1919192, -406.0606061, -4.04040404, 86.86868687, 167.6868184, 262.6463641,
325.2726268, 400.1608121, 442.7961204, 477.4410774, 510.1964923, 514.3675562, 526.5993266,
538.9316046, 563.6363636, 580.1397055, 586.3912759, 594.6027439]

current_19 = [0, 0, 0, 0, 0.746268657, 1.492537313, 1.492537313, 11.94029851, 27.6119403, 50,
82.08955224, 91.79104478, 100, 115.6716418, 150, 175.3731343, 189.5522388, 199.2537313]

# Ajuste polinomial y extrapolación de curva:

plt.figure(figsize=(10,7))

for x1, y1 in zip(voltage_19, current_19):
    plt.plot(x1, y1, 'bo')

z = np.polyfit(voltage_19, current_19, 5) #coef
f = np.poly1d(z)

val_x2 = []
val_fx2 = []

for x1 in np.linspace(-800, 1500, 1000):
    val_x2.append(x1)
    val_fx2.append(f(x1))
    plt.plot(x1, f(x1), 'c+')

plt.axis([-600, 1500, -200, 800])
plt.title("Lms19LED", size=15)
plt.xlabel("Voltaje (mV)", size=12,)
plt.ylabel("Corriente (mA)", size=12)
plt.axhline(y=250, color='r', linestyle='--')
plt.axvline(x=619, color='r', linestyle='--')
plt.show()

# Búsqueda de V_D para 250 mA:

```

```

aprox = []
for i in range(len(val_fx2)):
    aprox.append(round(val_fx2[i]))

for i in range(len(aprox)):
    if aprox[i] == 253:
        print(i, "- current, mA:", aprox[i])
        print(i, "- voltage, mV:", val_x2[i])

```

Ajuste polinomial y extrapolación de curva corriente-voltaje y búsqueda de V_D para LED 2,2 μm (LMS22)

```

import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt

voltage_22 = [-522.4828859, -404.1125042, -2.071635515, 140.7891701, 242.822347, 310.12999,
371.1919596, 399.5897751, 425.8441658, 443.9043151, 463.9437992, 475.9531318, 477.8606774,
483.7986822, 495.8182704, 501.7665308, 509.7146373, 515.6423865]

current_22 = [1.226828705, 1.003768941, 0.999923083, 0.730713022, 1.292208292, 4.180447658,
16.12568264, 28.88623952, 49.18852396, 71.76755634, 98.86547189, 116.1795247, 125.974925,
139.5315745, 156.0918391, 168.8947004, 184.7088685, 199.0193062]

# Ajuste polinomial y extrapolación de curva:

plt.figure(figsize=(10,7))
for x1, y1 in zip(voltage_22, current_22):
    plt.plot(x1, y1, 'bo')

z = np.polyfit(voltage_22, current_22, 6) #coef
f = np.poly1d(z)

val_x3 = []
val_fx3 = []

for x1 in np.linspace(-800, 1500, 1000):
    val_x3.append(x1)
    val_fx3.append(f(x1))
    plt.plot(x1, f(x1), 'c+')

plt.axis([-600, 1500, -200, 800])
plt.title("Lms22LED", size=15)
plt.xlabel("Voltaje (mV)", size=12,)
plt.ylabel("Corriente (mA)", size=12)
plt.axhline(y=250, color='r', linestyle='--')
plt.axvline(x=533, color='r', linestyle='--')
plt.show()

# Búsqueda de  $V_D$  para 250 mA:
aprox = []
for i in range(len(val_fx3)):
    aprox.append(round(val_fx3[i]))

for i in range(len(aprox)):
    if aprox[i] == 250:
        print(i, "- current, mA:", aprox[i])
        print(i, "- voltage, mV:", val_x3[i])

```

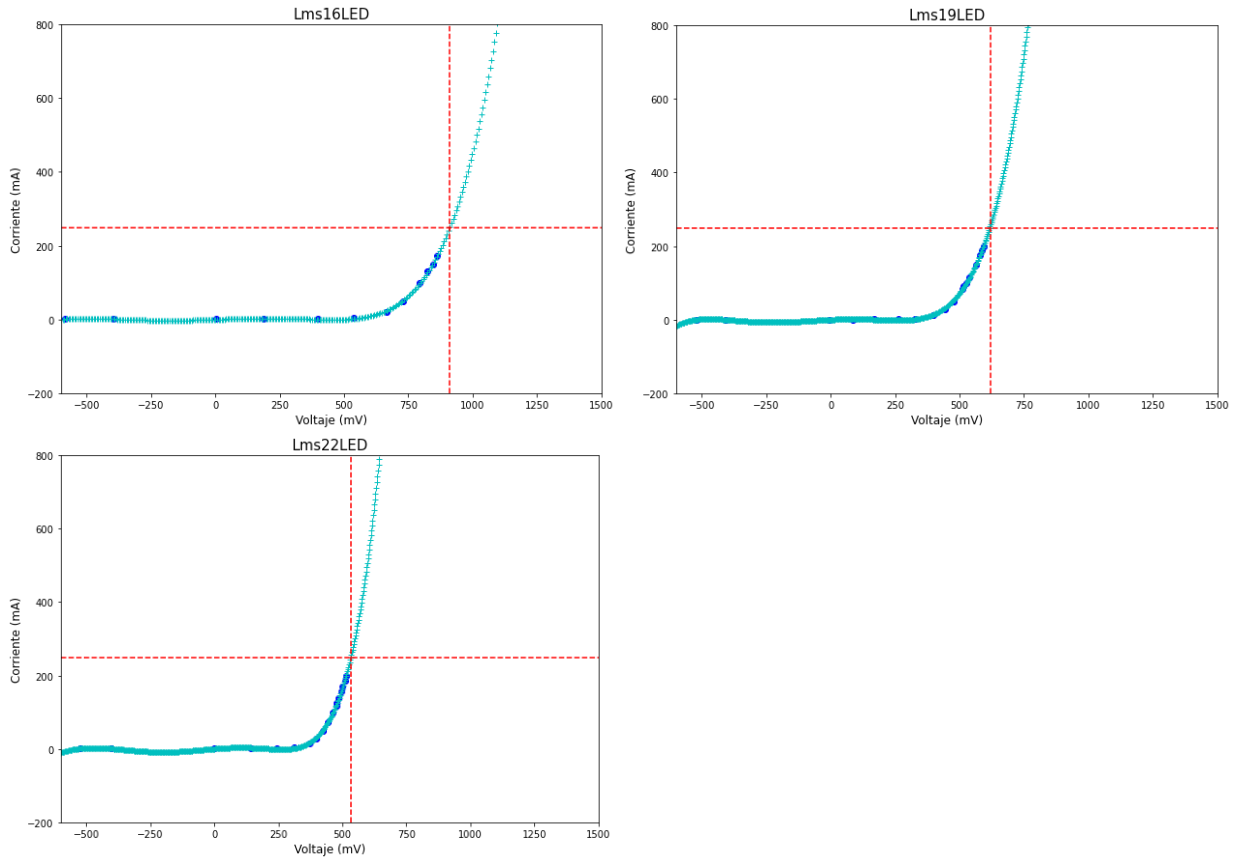


Figura 5: Gráficos de ajuste polinomial y extrapolación de curvas corriente-voltaje de hojas de datos de LEDs NIR. Lms16LED, Lms19LED y Lms22LED corresponden a los LEDs de longitud de onda 1,6, 1,9 y 2,2 μm , respectivamente. En cada gráfico, las líneas punteadas horizontales marcan la corriente a 250 mA y las líneas punteadas verticales marcan los voltajes directos encontrados para ese valor de corriente.

7.11 ANEXO 11: CÁLCULOS Y PROCEDIMIENTO PARA EXPERIMENTO CON SOLUCIÓN INYECTABLE

Soluciones

Para el cálculo de las diferentes soluciones que se prepararon en los experimentos, se utilizó la ecuación (4) de dilución descrita en el subapartado 2.6 de *Molaridad y Dilución*.

La concentración inicial, utilizada para extraer cada volumen empleado en la preparación de las diferentes soluciones en los experimentos, corresponde a una solución madre de 1 M. Dicha solución fue previamente preparada con 5,6 g de L-lactato de Sodio, con un peso molecular de 112,06 [g/mol], y que fue disuelto en 50 ml de agua.

Al despejar la ecuación (4), resulta la siguiente expresión:

$$V_{inicial} = \frac{C_{final} V_{final}}{C_{inicial}}$$

Esta expresión entrega la cantidad de volumen a extraer de la concentración inicial de 1 M para cada solución que fue preparada.

Se prepararon cinco soluciones con concentraciones de lactato que iban alternadas desde 2 a 10 mM, utilizando diferentes concentraciones de la solución madre de 1 M y diluyéndose en una solución inyectable para perfusión o *buffer*.

En primera instancia, se calculó y preparó el volumen de lactato a agregar a partir de la ecuación (5). Para el cálculo de cada solución se utilizaron los siguientes datos:

- $C_{inicial} = 1 \text{ M}$,
- $C_{final} = 2 \text{ mM}$, 4 mM, 6 mM, 8 mM y 10 mM,
- $V_{final} = 15 \text{ ml}$, correspondiente a la cantidad de solución total que se quiere preparar capacidad de llenado de un tubo Falcon,
- y $V_{inicial}$, el volumen a calcular y extraer de la solución madre de 1 M.

Una vez calculados los volúmenes necesarios de lactato para preparar cada solución de trabajo, se determinó la cantidad de *buffer* a agregar ($V_{solvente}$). Este volumen se calculó como la diferencia entre el volumen final y el volumen inicial.

A continuación se muestra una tabla resumen de las soluciones a preparar:

Soluciones	$V_{inicial} (\mu\text{L})$	$V_{solvente} (\text{ml})$
2 mM	30	14,97
4 mM	60	14,94
6 mM	90	14,91
8 mM	120	14,88
10 mM	150	14,85

Tabla 1: Volúmenes resultantes para preparación de soluciones en experimento con *buffer*.

Los cálculos de volumen de lactato para cada concentración y de los volúmenes de solvente a agregar se realizan a detalle a continuación:

Solución 2 mM

- Cálculo del volumen de lactato requerido para preparar la solución de trabajo:

$$V_{inicial} = \frac{2 \text{ mM} \times 15 \text{ ml}}{1 \text{ M}} = 30 \mu\text{l}$$

- Cálculo de la cantidad de solvente a agregar:

$$V_{solvente} = V_{final} - V_{inicial} = 15 \text{ ml} - 30 \mu\text{L} = 14,97 \text{ ml}$$

Solución 4 mM

- Cálculo del volumen de lactato requerido para preparar la solución de trabajo:

$$V_{lactato} = \frac{4 \mu\text{l} \times 15 \mu\text{l}}{1 \mu\text{l}} = 60 \mu\text{l}$$

- Cálculo de la cantidad de solvente a agregar:

$$V_{solvente} = V_{final} - V_{lactato} = 15 \mu\text{l} - 60 \mu\text{l} = 14,94 \mu\text{l}$$

Solución 6 mM

- Cálculo del volumen de lactato requerido para preparar la solución de trabajo:

$$V_{lactato} = \frac{6 \mu\text{l} \times 15 \mu\text{l}}{1 \mu\text{l}} = 90 \mu\text{l}$$

- Cálculo de la cantidad de solvente a agregar:

$$V_{solvente} = V_{final} - V_{inicial} = 15 \text{ ml} - 90 \mu\text{L} = 14,91 \text{ ml}$$

Solución 8 mM

- Cálculo del volumen de lactato requerido para preparar la solución de trabajo:

$$V_{inicial} = \frac{8 \text{ mM} \times 15 \text{ ml}}{1 \text{ M}} = 120 \mu\text{l}$$

- Cálculo de la cantidad de solvente a agregar:

$$V_{solvente} = V_{final} - V_{inicial} = 15 \text{ ml} - 120 \mu\text{L} = 14,88 \text{ ml}$$

Solución 10 mM

- Cálculo del volumen de lactato requerido para preparar la solución de trabajo:

$$V_{\text{solución}} = \frac{10 \text{ mM} \times 15 \text{ mM}}{1 \text{ M}} = 150 \text{ mM}$$

- Cálculo de la cantidad de solvente a agregar:

$$V_{\text{solvente}} = V_{\text{solución}} - V_{\text{solución}} = 15 \text{ mM} - 150 \text{ mM} = 14,85 \text{ mM}$$

Procedimiento

Se aspiraron con pipetas los distintos volúmenes calculados. Estos volúmenes fueron dispensados, mezclados en un tubo Falcon y etiquetados para identificar cada solución a medir.

Las soluciones resultantes a medir, sumando la cantidad de lactato base de la solución inyectable (3,7 mM) a las soluciones inicialmente planificadas, fueron 3,7, 5,7, 7,7, 9,7, 11,7 y 13,7 mM.

Se extraen 2 ml de cada solución y se dispensan en un tubo de vidrio cilíndrico de 75 mm de largo y un grosor de pared de 1 mm. Este tubo de vidrio se lavó entre cada solución para eliminar residuos o trazas de la anterior y así evitar afectar la precisión y la consistencia de los resultados.

Para las cinco soluciones preparadas se realizaron mediciones en las tres longitudes de onda: 1,6, 1,9 y 2,2 μm . Además, se consideró una medición adicional solo dispensando 2 ml de la solución inyectable, sin agregar lactato de la solución 1 M, siendo medida bajo las tres longitudes de onda.

Se registraron 10 s para cada solución y longitud de onda para su posterior análisis.

7.12 ANEXO 12: CÁLCULOS Y PROCEDIMIENTO PARA EXPERIMENTO CON SANGRE DE CERDO

Soluciones

Para el cálculo de las diferentes soluciones que se prepararon en los experimentos, se utilizó la ecuación (4) de dilución descrita en el subapartado 2.6 de *Molaridad y Dilución*.

La concentración inicial, utilizada para extraer cada volumen empleado en la preparación de las diferentes soluciones en los experimentos, corresponde a una solución madre de 1 M. Dicha solución fue previamente preparada con 5,6 g de L-lactato de Sodio, con un peso molecular de 112,06 [g/mol], y que fue disuelto en 50 ml de agua.

Al despejar la ecuación (4), resulta la siguiente expresión:

$$V_{inicial} = \frac{C_{final} V_{final}}{C_{inicial}}$$

Esta expresión entrega la cantidad de volumen a extraer de la concentración inicial de 1 M para cada solución que fue preparada.

Se prepararon cinco soluciones, de 2 a 10 mM, alternadas, con distintas concentraciones de lactato a partir de la solución madre de 1 M, con sangre de cerdo como solvente. Esta sangre estuvo almacenada en frío durante una semana en una bolsa contenedora heparinizada.

Una vez calculados los volúmenes para preparar cada solución de trabajo, se determinó la cantidad de sangre a agregar, que para este experimento corresponde al solvente. Este volumen se calculó como la resta entre el volumen final y el inicial.

Se calculó y preparó la cantidad de lactato para cada solución a partir de la ecuación (5). Para el cálculo de cada solución se consideraron los siguientes datos:

- $C_{inicial} = 1 \text{ M}$,
- $C_{final} = 2 \text{ mM}$, 4 mM, 6 mM, 8 mM y 10 mM,
- $V_{final} = 5 \text{ ml}$, correspondiente a la capacidad de llenado de un tubo Falcon,
- y $V_{inicial}$, el volumen a calcular y que se extrae de la solución madre de 1 M.

A continuación se muestra una tabla resumen de las soluciones a preparar:

Soluciones	$V_{inicial}$ (μL)	$V_{solvente}$ (ml)
2 mM	10	4,99
4 mM	20	4,98
6 mM	30	4,97
8 mM	40	4,96
10 mM	50	4,95

Tabla 1: Volúmenes resultantes para preparación de soluciones en experimento con sangre de cerdo.

El cálculo de cada concentración y de los volúmenes de lactato y solvente a agregar se encuentran a continuación:

Solución 2 mM

- Cálculo del volumen de lactato requerido para preparar la solución de trabajo:

$$V_{inicial} = \frac{2 \text{ mM} \times 5 \text{ ml}}{1 \text{ M}} = 10 \mu\text{L}$$

- Cálculo de la cantidad de solvente a agregar:

$$V_{solvente} = V_{final} - V_{inicial} = 5 \text{ ml} - 10 \mu\text{L} = 4,99 \text{ ml}$$

Solución 4 mM

- Cálculo del volumen de lactato requerido para preparar la solución de trabajo:

$$V_{inicial} = \frac{4 \text{ mM} \times 5 \text{ ml}}{1 \text{ M}} = 20 \mu\text{L}$$

- Cálculo de la cantidad de solvente a agregar:

$$V_{solvente} = V_{final} - V_{inicial} = 5 \text{ ml} - 20 \mu\text{L} = 4,98 \text{ ml}$$

Solución 6 mM

- Cálculo del volumen requerido para preparar la solución de trabajo:

$$V_{inicial} = \frac{6 \text{ mM} \times 5 \text{ ml}}{1 \text{ M}} = 30 \mu\text{L}$$

- Cálculo de la cantidad de solvente a agregar:

$$V_{solvente} = V_{final} - V_{inicial} = 5 \text{ ml} - 30 \mu\text{L} = 4,97 \text{ ml}$$

Solución 8 mM

- Cálculo del volumen de lactato requerido para preparar la solución de trabajo:

$$V_{inicial} = \frac{8 \text{ mM} \times 5 \text{ ml}}{1 \text{ M}} = 40 \mu\text{L}$$

- Cálculo de la cantidad de solvente a agregar:

$$V_{solvente} = V_{final} - V_{inicial} = 5 \text{ ml} - 40 \mu\text{L} = 4,96 \text{ ml}$$

Solución 10 mM

- Cálculo del volumen de lactato requerido para preparar la solución de trabajo:

$$V_{inicial} = \frac{10 \text{ mM} \times 5 \text{ ml}}{1 \text{ M}} = 50 \mu\text{L}$$

- Cálculo de la cantidad de solvente a agregar:

$$V_{solvente} = V_{final} - V_{inicial} = 5 \text{ ml} - 50 \mu\text{L} = 4,95 \text{ ml}$$

Procedimiento

El procedimiento que se siguió en este experimento fue similar al realizado para el experimento anterior. Realizados los cálculos de volúmenes de solvente y de solución madre a agregar, se aspiraron estas cantidades con pipetas mecánicas de capacidades adecuadas, y se dispusieron en tubos Falcon. Estos tubos fueron etiquetados para sus respectivas soluciones.

Con el uso de una pipeta mecánica de rango 100-1.000 μl , se aspiró 500 μl de una solución y se agregaron al tubo de vidrio como volumen base. Se obtuvo la medición para las tres longitudes de onda infrarrojas. Luego en cada paso se añadieron 500 μl más al volumen existente y se obtuvieron nuevas mediciones. Esta metodología de agregación en incrementos de 500 μl permitió obtener diferentes volúmenes acumulativos en el tubo de vidrio, lo cual resultó relevante para el desarrollo de la investigación.

Este paso se repitió sucesivamente hasta obtener finalmente mediciones para 2.500 μl . Se realizó esto para las cinco soluciones preparadas, desechando las puntas de pipetas para cada nueva solución dispensada en el tubo y realizando la limpieza del mismo para evitar la contaminación cruzada y posibles errores en la medición debido a trazas de la anterior solución.

Se realizaron mediciones de cada solución durante un período de 10 s para cada longitud de onda y volumen.

7.13 ANEXO 13: RELACIÓN ENTRE VOLUMEN Y CAMINO ÓPTICO

El OPL está relacionado con la altura que alcanza el líquido en el tubo cilíndrico horizontal. Esta altura se vincula con las distintas cantidades de volumen dispensadas en el tubo.

Para encontrar la relación entre el volumen en función de la altura se debe calcular el volumen total del tubo, el cual es la suma entre el volumen del cilindro y el volumen de la semiesfera de uno de los extremos:

$$V_T(h) = V_C(h) + V_S(h)$$

El volumen del cilindro (V_C) en función de la altura está dado por la expresión:

$$V_C(h) = \left(r^2 \arcsin\left(\frac{h-r}{r}\right) + (h-r)\sqrt{2rh-h^2} + \frac{\pi}{2}r^2 \right) L$$

donde h es la altura que puede alcanzar el líquido, r es el radio interno del tubo cilíndrico y L es el largo del cilindro del tubo.

Mientras que el volumen de la semiesfera (V_S) en función de la altura en un extremo del tubo cilíndrico está dada por:

$$V_S(h) = \pi r h^2 - \frac{\pi}{3} h^3$$

Considerando que el r es 5 mm y L es 70 mm, se tiene que la altura máxima que puede alcanzar el líquido dentro del tubo cilíndrico en posición horizontal es de 6.021 μ

Por lo tanto, de acuerdo a los volúmenes de sangre dispensados en las mediciones, el OPL resultante para cada uno se presenta en la siguiente tabla:

Volumen (μ l)	OPL (mm)
500	1,4
1.000	2,3
1.500	3,0
2.000	3,7
2.500	4,3

Tabla 1: Relación entre volumen dispensado y OPL.

7.14 ANEXO 14: CÁLCULOS Y PROCEDIMIENTO PARA SOLUCIONES DE EXPERIMENTO CON AGUA DESMINERALIZADA

Soluciones

Para el cálculo de las diferentes soluciones que se prepararon en los experimentos, se utilizó la ecuación (4) de dilución descrita en el subapartado 2.6 de *Molaridad y Dilución*.

La concentración inicial, utilizada para extraer cada volumen empleado en la preparación de las diferentes soluciones en los experimentos, corresponde a una solución madre de 1 M. Dicha solución fue previamente preparada con 5,6 g de L-lactato de Sodio, con un peso molecular de 112,06 [g/mol], y que fue disuelto en 50 ml de agua.

Al despejar la ecuación (4), resulta la siguiente expresión:

$$V_{inicial} = \frac{C_{final} V_{final}}{C_{inicial}}$$

Esta expresión entrega la cantidad de volumen a extraer de la concentración inicial de 1 M para cada solución que fue preparada.

Se prepararon diez soluciones con distintas concentraciones de lactato a partir de la expresión $V_{inicial}$. Estas soluciones iban de 1 a 10 mM y fueron extraídas de la misma solución madre de 1 M que se utilizó en experimentos previos.

Con la finalidad de obtener soluciones con concentración de lactato mucho más precisas, es que se preparó un volumen final de 30 ml.

Los datos a considerar para el cálculo de volúmenes fueron los siguientes:

- $C_{inicial} = 1 \text{ M}$,
- $C_{final} = 1 \text{ mM a } 10 \text{ mM}$,
- $V_{final} = 30 \text{ ml}$, correspondiente a la capacidad de llenado de un tubo Falcon de 50 ml,
- y $V_{inicial}$, el volumen a calcular y que se extrae de la solución madre de 1 M.

Una vez calculados los volúmenes para preparar cada solución de trabajo, se determinó la cantidad de agua desmineralizada a agregar. Este volumen se calculó como la resta entre el volumen final y el inicial.

Soluciones	$V_{inicial} (\mu\text{L})$	$V_{solvente} (\text{ml})$
1 mM	30	29,97
2 mM	60	29,94
3 mM	90	29,91
4 mM	120	29,88
5 mM	150	29,85
6 mM	180	29,82
7 mM	210	29,79
8 mM	240	29,76
9 mM	270	29,73

Soluciones	$V_{inicial}$ (μL)	$V_{solvente}$ (ml)
10 mM	300	29,70

Tabla 1: Volúmenes resultantes a mezclar para experimento de validación con agua desmineralizada.

Los cálculos de cada concentración y de los volúmenes de solvente a agregar se muestran a detalle a continuación:

Solución 1 mM

- Cálculo del volumen de lactato requerido para preparar la solución de trabajo:

$$V_{inicial} = \frac{1 \text{ mM} \times 30 \text{ ml}}{1 \text{ M}} = 30 \mu\text{L}$$

- Cálculo de la cantidad de solvente a agregar:

$$V_{solvente} = V_{final} - V_{inicial} = 30 \text{ ml} - 30 \mu\text{L} = 29,97 \text{ ml}$$

Solución 2 mM

- Cálculo del volumen de lactato requerido para preparar la solución de trabajo:

$$V_{inicial} = \frac{2 \text{ mM} \times 30 \text{ ml}}{1 \text{ M}} = 60 \mu\text{L}$$

- Cálculo de la cantidad de solvente a agregar:

$$V_{solvente} = V_{final} - V_{inicial} = 30 \text{ ml} - 60 \mu\text{L} = 29,94 \text{ ml}$$

Solución 3 mM

- Cálculo del volumen de lactato requerido para preparar la solución de trabajo:

$$V_{inicial} = \frac{3 \text{ mM} \times 30 \text{ ml}}{1 \text{ M}} = 90 \mu\text{L}$$

- Cálculo de la cantidad de solvente a agregar:

$$V_{solvente} = V_{final} - V_{inicial} = 30 \text{ ml} - 90 \mu\text{L} = 29,91 \text{ ml}$$

Solución 4 mM

- Cálculo del volumen de lactato requerido para preparar la solución de trabajo:

$$V_{inicial} = \frac{4 \text{ mM} \times 30 \text{ ml}}{1 \text{ M}} = 120 \mu\text{L}$$

- Cálculo de la cantidad de solvente a agregar:

$$V_{\text{solvente}} = V_{\text{final}} - V_{\text{inicial}} = 30 \text{ ml} - 120 \mu\text{L} = 29,88 \text{ ml}$$

Solución 5 mM

- Cálculo del volumen de lactato requerido para preparar la solución de trabajo:

$$V_{\text{inicial}} = \frac{5 \text{ mM} \times 30 \text{ ml}}{1 \text{ M}} = 150 \mu\text{L}$$

- Cálculo de la cantidad de solvente a agregar:

$$V_{\text{solvente}} = V_{\text{final}} - V_{\text{inicial}} = 30 \text{ ml} - 150 \mu\text{L} = 29,85 \text{ ml}$$

Solución 6 mM

- Cálculo del volumen de lactato requerido para preparar la solución de trabajo:

$$V_{\text{inicial}} = \frac{6 \text{ mM} \times 30 \text{ ml}}{1 \text{ M}} = 180 \mu\text{L}$$

- Cálculo de la cantidad de solvente a agregar:

$$V_{\text{solvente}} = V_{\text{final}} - V_{\text{inicial}} = 30 \text{ ml} - 180 \mu\text{L} = 29,82 \text{ ml}$$

Solución 7 mM

- Cálculo del volumen de lactato requerido para preparar la solución de trabajo:

$$V_{\text{inicial}} = \frac{7 \text{ mM} \times 30 \text{ ml}}{1 \text{ M}} = 210 \mu\text{L}$$

- Cálculo de la cantidad de solvente a agregar:

$$V_{\text{solvente}} = V_{\text{final}} - V_{\text{inicial}} = 30 \text{ ml} - 210 \mu\text{L} = 29,79 \text{ ml}$$

Solución 8 mM

- Cálculo del volumen de lactato requerido para preparar la solución de trabajo:

$$V_{\text{inicial}} = \frac{8 \text{ mM} \times 30 \text{ ml}}{1 \text{ M}} = 240 \mu\text{L}$$

- Cálculo de la cantidad de solvente a agregar:

$$V_{\text{solvente}} = V_{\text{final}} - V_{\text{inicial}} = 30 \text{ ml} - 240 \mu\text{L} = 29,76 \text{ ml}$$

Solución 9 mM

- Cálculo del volumen de lactato requerido para preparar la solución de trabajo:

$$V_{inicial} = \frac{9 \text{ mM} \times 30 \text{ ml}}{1 \text{ M}} = 270 \mu\text{L}$$

- Cálculo de la cantidad de solvente a agregar:

$$V_{solvente} = V_{final} - V_{inicial} = 30 \text{ ml} - 270 \mu\text{L} = 29,73 \text{ ml}$$

Solución 10 mM

- Cálculo del volumen de lactato requerido para preparar la solución de trabajo:

$$V_{inicial} = \frac{10 \text{ mM} \times 30 \text{ ml}}{1 \text{ M}} = 300 \mu\text{L}$$

- Cálculo de la cantidad de solvente a agregar:

$$V_{solvente} = V_{final} - V_{inicial} = 30 \text{ ml} - 300 \mu\text{L} = 29,7 \text{ ml}$$

Procedimiento

Cada solución preparada se dispuso en un tubo Falcon de capacidad 50 ml, los cuales fueron identificados y rotulados para sus respectivas muestras contenidas.

Se dispensó 1,3 ml de las soluciones en el tubo rectangular de vidrio de borosilicato. Luego de cada medición, se lavó el tubo de vidrio para evitar la contaminación de las muestras por trazos que hayan quedado de la anterior.

Las mediciones se registraron durante 4 minutos.