



**Universidad Autónoma De San Luis Potosí**

**Facultad De Ciencias**

**Instituto De Investigación En Comunicación Óptica**

**TÉCNICA CONJUNTA ÓPTICA-ELÉCTRICA PARA EL  
MONITOREO NO INVASIVO DE GLUCOSA *IN VIVO***

Tesis que presenta:

**Edgar Guevara Codina**

Para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias Aplicadas**

Tesis escrita bajo la dirección de:

Dr. Francisco Javier González

San Luis Potosí, S.L.P., Septiembre de 2008



**Universidad Autónoma De San Luis Potosí**  
**Facultad De Ciencias**  
**Instituto De Investigación En Comunicación Óptica**

**TÉCNICA CONJUNTA ÓPTICA-ELÉCTRICA PARA EL  
MONITOREO NO INVASIVO DE GLUCOSA *IN VIVO***

Edgar Guevara Codina

SINODALES

\_\_\_\_\_  
Dr. Francisco Javier González Contreras (Asesor)

\_\_\_\_\_  
Dr. Salvador Guel Sandoval

\_\_\_\_\_  
Dr. Gustavo Ramírez Flores

\_\_\_\_\_  
Dr. Alejandro Ricardo Femat Flores

\_\_\_\_\_  
Dr. Facundo Ruiz

San Luis Potosí, S.L.P., Septiembre de 2008

*Dedico este trabajo a la memoria de mis abuelitos Rita y Juan*

*A mi mamá y a mi tía, Marta y Teresa por su cariño  
y apoyo incondicional en todos los proyectos de mi vida*

*Y a Jenny, por su amor y comprensión*

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a una serie de personas cuya orientación y ayuda han hecho posible este estudio. En primer lugar deseo extender mi mas sincero aprecio y mi gratitud al Dr. Francisco Javier González por su constante asesoría y por la confianza depositada en mí al haberme brindado la oportunidad de desarrollar este estudio. De igual modo agradezco al Dr. Ricardo Femat por la valiosa ayuda otorgada en el diseño de los experimentos. Al profesor José Ángel de la Cruz por haber facilitado el uso del equipo de medición de su laboratorio. Un agradecimiento a los doctores Facundo Ruiz y Cuauhtémoc Araujo por las breves pero fructíferas conversaciones en las que despejaron muchas de mis dudas. Igualmente expreso mi gratitud a la maestra Quim. Blanca Torres por su apoyo en el laboratorio de química. Asimismo agradezco la colaboración de todos mis compañeros de laboratorio en las incómodas pruebas para las que fueron voluntarios.

Finalmente agradezco al Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de una beca para estudios de posgrado durante el periodo de septiembre de 2006 a agosto de 2008, así como a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, que a través del Fondo de Apoyo a la Investigación financió parte del equipo utilizado en este proyecto y solventó parcialmente mi participación en el X Mexican Symposium on Medical Physics en marzo de este año.

# CONTENIDO

Lista de tablas .....	vi
Lista de figuras .....	vii
<b>RESUMEN</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	11
<b>1.1 Diabetes Mellitus</b> .....	11
<b>1.2 Tecnologías para la medición no invasiva de glucosa</b> .....	12
<b>1.2.1 Tomografía de Coherencia Óptica</b> .....	13
<b>1.2.2 Espectroscopía Fotoacústica</b> .....	13
<b>1.2.3 Espectroscopía en el Medio Infrarrojo (MIR)</b> .....	14
<b>1.2.4 Espectroscopía en el Cercano Infrarrojo (NIR)</b> .....	14
<b>1.2.5 Espectroscopía Raman</b> .....	16
<b>1.2.6 Cambios en Polarización</b> .....	17
<b>1.2.7 Fluorescencia</b> .....	18
<b>1.2.8 Recolección de fluidos</b> .....	18
<b>1.2.9 Iontoféresis Inversa</b> .....	19
<b>1.2.10 Sensado Electromagnético</b> .....	19
<b>1.2.11 Espectroscopía por Impedancia Eléctrica</b> .....	20
<b>2. UNA TÉCNICA CONJUNTA PARA LA PREDICCIÓN DE CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA</b> .....	25
<b>3. MÉTODO EXPERIMENTAL</b> .....	27
<b>3.1 Espectroscopía en el cercano infrarrojo</b> .....	27
<b>2.2 Mediciones de impedancia eléctrica</b> .....	33
<b>3.3 Análisis multivariante: Regresión por mínimos cuadrados parciales</b> .....	38
<b>4. RESULTADOS</b> .....	43
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	49
<b>REFERENCIAS</b> .....	51

## LISTA DE TABLAS

TABLA I – MÉTODOS NO INVASIVOS DE DETECCIÓN DE GLUCOSA .....	22
TABLA II – COMPARACIÓN DE TÉCNICAS IN VITRO .....	44
TABLA III – RESUMEN DE RESULTADOS DEL MODELO DE REGRESIÓN .....	45

## LISTA DE FIGURAS

1.1	Estructura de la glucosa donde se muestran los grupos funcionales OH y el átomo C2, responsables de la absorción NIR [20]. . . . .	15
1.2	La “ventana terapéutica” se muestra entre las líneas punteadas, donde la absorción de varios componentes del tejido humano es débil [11]. . . . .	16
1.3	Espectro Raman de glucosa, el cual muestra los picos bien definidos que se pueden obtener con esta técnica [1]. . . . .	17
1.4	Esquema del sistema de sensado electromagnético [9]. . . . .	20
1.5	Correlación entre la impedancia (—■—) y concentración de glucosa (—◆— → ↖ ↗ ↘) [16]. . . . .	21
3.1	a) Espectro de emisión del sistema integrado USB-ISS-VIS, b) Espectro de transmisión de la cubeta de plástico empleada en los experimentos <i>in vitro</i> . . . . .	28
3.2	Gráfica de absorbancia contra concentración llamada curva de calibración..	30
3.3	Espectro de emisión de la lámpara de tungsteno–halógeno LS-1. . . . .	30
3.4	Acomodo de las fibras ópticas en la sonda de reflectancia R200-7-VIS/NIR. . . . .	31
3.5	Arreglo experimental utilizado en las mediciones de reflectancia. . . . .	32
3.6	Espectros de reflectancia para diferentes concentraciones de glucosa en un mismo sujeto. . . . .	33
3.7	Arreglo experimental para mediciones de impedancia <i>in vitro</i> . . . . .	34
3.8	Espectros de fase de impedancia para diferentes concentraciones de glucosa <i>in vitro</i> [34]. . . . .	35
3.9	Espectros de magnitud de impedancia para diferentes concentraciones de glucosa <i>in vitro</i> . . . . .	36
3.10	Arreglo experimental para espectroscopía de impedancia eléctrica. . . . .	37
3.11	Espectros de impedancia para diferentes concentraciones de glucosa en un mismo sujeto. . . . .	37
3.12	a) Espectro de fase de impedancia y b) su segunda derivada. . . . .	41

3.13	a) Espectro de reflexión NIR, b) el resultado de aplicar SNV, y c) un filtrado gaussiano. . . . .	42
4.1	Correlación entre los valores predichos y los valores de referencia para mediciones <i>in vitro</i> . . . . .	43
4.2	Concentraciones de glucosa capilar durante la prueba de respuesta a la glucosa. . . . .	44
4.3	Perfiles de glucosa para un sujeto dado. . . . .	46
4.4	Resultados de validación cruzada para todos los sujetos. La línea continua representa la línea teórica de regresión de 45°. Las líneas punteadas representan fronteras de error de 15%. . . . .	46
4.5	Análisis de error de Clarke para todas las mediciones <i>in vivo</i> (n = 140). . . . .	48

## RESUMEN

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica en la cual la glucosa en la sangre alcanza niveles muy altos. Estos niveles de glucosa anormales pueden dañar los vasos sanguíneos grandes y pequeños, pueden provocar ceguera, enfermedades de los riñones, amputaciones de extremidades, y enfermedades cardiovasculares. De acuerdo al Sistema Nacional de Información en Salud actualmente existen mas de 10 millones de personas diagnosticadas con diabetes y es la principal causa de mortalidad general en México, con el 13.6 % de los fallecimientos.

En los pacientes diabéticos un monitoreo frecuente de las concentraciones de glucosa en la sangre es crucial para seguir un tratamiento efectivo y así reducir la mortalidad. Sin embargo, el autoanálisis requiere que la persona diabética extraiga una gota de sangre de la yema del dedo. Este método es incómodo y doloroso para el paciente, sobre todo si se tiene que medir el nivel de glucosa varias veces al día, además conlleva riesgo de infección. Es por eso que se han llevado a cabo esfuerzos para desarrollar un medidor de glucosa no invasivo mediante métodos ópticos o eléctricos.

En este trabajo se describe una técnica conjunta basada en mediciones de impedancia eléctrica y de espectroscopía en el cercano infrarrojo (NIR) para predecir las concentraciones capilares de glucosa.

Diez voluntarios sanos participaron en el experimento, con concentraciones de glucosa desde 94 hasta 223 mg/dl. El error medio cuadrático de predicción (RMSEP) de la técnica conjunta electro - óptica fue de 21.96 mg/dl y el error porcentual medio absoluto tuvo un valor de 13.31%. El análisis de error de la rejilla de Clarke arrojó que el 77.86% de los valores se encontró en la zona A, un 22.14% en la región B y ninguno en las zonas C-E. Estos resultados muestran evidencia preliminar que una técnica conjunta electro-óptica puede utilizarse para predecir las concentraciones de glucosa capilar de forma no invasiva. Se deberán ejecutar mas estudios para evaluar la utilidad y limitaciones de dicha técnica en pruebas a largo plazo, así también como considerar los efectos en el modelo de predicción de los factores ambientales y fisiológicos.

## ABSTRACT

Diabetes mellitus is a chronic disease in which blood glucose levels are too high. Abnormally high levels of glucose can damage the small and large blood vessels, leading to diabetic blindness, kidney disease, amputations of limbs, stroke, and heart disease. According to the Mexican National Health Information System there are more than 10 million people who are currently diagnosed with diabetes and it is the main cause of mortality in Mexico, accounting for 13.6 percent of deaths in general.

Frequent determination of glucose concentrations in diabetic patients is crucial for effective treatment and reduction of the mortality of diabetes. However, self monitoring of blood glucose currently requires the diabetic person to perform finger-stick testing. This method is inconvenient and painful for the patient, specially when testing is required a number of times a day, furthermore it carries a risk of infection. That is why efforts to develop a noninvasive glucose meter using optical or electrical methods have been strong. This work describes a joint technique based on electrical impedance and near infrared (NIR) spectroscopy measurements to predict capillary glucose concentrations.

Ten healthy volunteers took part in the experiment, with glucose concentrations ranging from 94 to 223 mg/dl. The root mean square error of prediction (RMSEP) was 21.96 mg/dl and the mean absolute percent error (MAPE) value was 13.31%. Clarke error grid analysis showed 77.86% of the values in zone A, 22.14% in zone B and none in C-E. These results provide preliminary evidence that an electro-optical joint technique can be used to predict capillary glucose concentrations noninvasively. Further studies should be carried out to evaluate the usefulness and limitations of using such a technique in long term tests, as well as the effects of physiological and environmental factors on the prediction model.

# Capítulo 1

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica que se presenta como un complejo grupo de síndromes relacionados en gran parte con la producción de insulina o su utilización. La insulina es la principal hormona responsable de la regulación de la glucosa en el cuerpo humano, permite la entrada de glucosa en todas las células del organismo para su transformación en energía [1].

Una persona se considera como diabético cuando cumple con alguno de los tres criterios de diagnóstico: al presentar un nivel de glucosa en plasma en ayunas mayor a 126 mg/dl, definiendo el ayuno como no ingerir calorías durante al menos 8 horas, cuando el nivel de glucosa en plasma es mayor a 200 mg/dl a cualquier hora del día independientemente de la hora del último alimento y el tercer criterio dice que alguien tiene diabetes si presenta una concentración de glucosa en plasma mayor a 200 mg/dl a las dos horas de haber ingerido 75 g de glucosa disuelta en agua [2].

Aunque la causa de la diabetes continúa siendo un misterio, se ha observado que tanto los factores genéticos como los factores externos, como la obesidad y el sedentarismo desempeñan un papel importante [3].

Existen tres tipos de diabetes. La diabetes tipo 1, la cual se diagnostica generalmente en niños o adultos jóvenes; resulta de la incapacidad del cuerpo para generar insulina, por lo que se debe administrar esta hormona diariamente. La diabetes tipo 2 se presenta usualmente en adultos mayores de 45 años; en este tipo la persona presenta resistencia a la insulina y no puede utilizarla adecuadamente. El tercer tipo se denomina gestacional y ocurre durante el embarazo, si una mujer la presenta, tiene un 40% de posibilidades de contraer diabetes tipo 2 mas adelante [3], [4].

Los principales complicaciones derivadas de un nivel elevado de glucosa en la sangre son: daño en los riñones, la retina, el sistema nervioso, el sistema circulatorio, gangrena y la subsiguiente amputación de miembros [5], en general esto repercute en

una reducción de la longevidad. Por consiguiente un monitoreo frecuente de la glucosa es crucial para seguir un tratamiento efectivo a través de inyecciones de insulina, ejercicio y una dieta modificada, reduciendo así las complicaciones de la enfermedad. Para determinar la cantidad de insulina requerida se efectúan mediciones periódicas de los niveles sanguíneos de glucosa (hasta cinco veces al día), las cuales se llevan a cabo mediante una punción en la yema del dedo, para extraer una gota de sangre, lo cual es incómodo, provoca callosidades, es doloroso e incluso representa un riesgo de infección para el paciente.

Esta enfermedad representa un grave problema de salud pública en México: de acuerdo con el Sistema Nacional de Información en Salud existen más de 10 millones de personas diagnosticadas con diabetes y ésta fue la principal causa de mortalidad general, con el 13.6% de fallecimientos en 2005 [6].

El impacto económico de la diabetes es de especial interés debido a su magnitud. En 2007 en los Estados Unidos de América se estimó un costo de 127 mil millones de dólares, considerando tanto gastos médicos directos como indirectos relacionados con un descenso en la productividad económica [7]. En México el tratamiento de la diabetes representa 34% del presupuesto de servicios sociales del país con costos directos de 100 millones de dólares y costos indirectos de 330 millones de dólares, según un comunicado emitido por la Secretaría de Salud [8].

## **1.2 Tecnologías para la medición no invasiva de glucosa**

El uso de técnicas de detección no invasivas ofrece varias ventajas, tales como la ausencia de dolor al no emplear objetos punzo-cortantes ni materiales que presenten un riesgo de infección, además con estas técnicas no invasivas se tiene la capacidad para realizar un monitoreo continuo y por consiguiente tener un control más riguroso de la concentración de glucosa; inclusive estas técnicas tienen el potencial para constituir la retroalimentación de un sistema de lazo cerrado que incluya una bomba de insulina [9].

### **1.2.1 Tomografía de Coherencia Óptica (OCT)**

Es una técnica en la cual una fuente de luz con una longitud de coherencia muy corta se acopla a un interferómetro con la muestra en un brazo y un espejo de referencia en el otro. Al desplazar el espejo, se producen franjas de interferencia cuya amplitud depende de la amplitud de la radiación esparcida. Un incremento en la concentración de glucosa en el fluido intersticial provoca un incremento en su índice de refracción determinando un decremento en el índice de esparcimiento. Por lo tanto esta variación puede detectarse como un cambio en la amplitud de OCT, y así estimarse la concentración de glucosa [1], [10].

Aunque esta técnica puede ser particularmente sensible a cambios en el índice de refracción, también lo es a los artefactos inducidos por movimiento [10].

### **1.2.2 Espectroscopía Fotoacústica**

Para adquirir un espectro de absorción de manera no invasiva se puede emplear la espectroscopía fotoacústica. La señal se obtiene al hacer incidir un láser pulsado en el tejido. La radiación absorbida por la muestra resulta en un calentamiento localizado de corta duración. Esta expansión térmica da lugar a una onda de presión, la cual puede detectarse con un transductor adecuado. Una ventaja de esta técnica es que la señal registrada depende únicamente de la absorción, ya que el esparcimiento y la dispersión no desempeñan ningún papel en la señal adquirida. Esta tecnología requiere que se desarrollen complicados modelos de calibración empírica para explicar el traslape de bandas espectrales de absorción de otros compuestos distintos a la glucosa. Además se requiere instrumentación cara y las mediciones son sensibles a variables como la temperatura, la presión aplicada al transductor y la morfología [1].

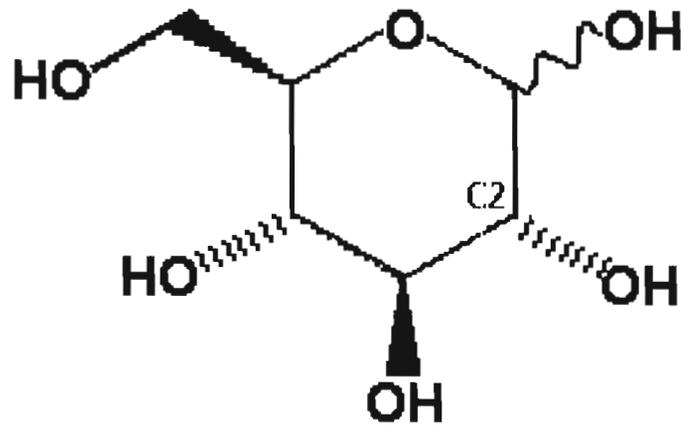
### 1.2.3 Espectroscopía en el Medio Infrarrojo (MIR)

Se efectúa en el rango de 2.5 – 10  $\mu\text{m}$  [10], donde resulta especialmente atractiva la región de 2.5 – 5  $\mu\text{m}$  debido a que se encuentra en un valle entre dos regiones de fuerte absorción debido al agua [1], permitiendo profundidades de penetración del orden de milímetros, conteniendo picos específicos de absorción de la glucosa a 2.13, 2.27 y 2.34  $\mu\text{m}$ . La instrumentación requerida es algo más cara que la utilizada para longitudes de onda más cortas, ya que las fibras que exhiben buena transmisión en esta región, como las de zafiro son más costosas, más frágiles y menos flexibles que las de vidrio.

Para el rango comprendido entre 5 y 10  $\mu\text{m}$ , una fuerte limitante es su poca penetración, y una fuerte dependencia del espectro en el contenido de agua [10].

### 1.2.4 Espectroscopía en el Cercano Infrarrojo (NIR)

Esta técnica aprovecha una parte de la denominada “ventana terapéutica”, es decir donde la mayor parte del tejido tiene una absorción débil y permite una penetración significativa de la luz [11], ya que en longitudes de onda menores existe absorción por parte de los pigmentos de la piel y la sangre y a mayores longitudes de onda predomina la absorción del agua [22], como se indica en la figura 1.2. Varios autores han propuesto la detección de glucosa en la región de 700 a 1300 nm, la cual abarca dos bandas de absorción debidas a los grupos 3vOH y 3vCH [9]. La primera de estas bandas de absorción ocurre en 939 nm ( $10650\text{ cm}^{-1}$ ) y corresponde al segundo armónico del grupo OH, cuya vibración fundamental se presenta al absorber luz infrarroja con una longitud de onda igual a 2.9  $\mu\text{m}$  ( $3418\text{ cm}^{-1}$ ). Para el grupo CH también hay una banda de absorción en 1126 nm ( $8880\text{ cm}^{-1}$ ) correspondiente al segundo armónico, cuya vibración fundamental se encuentra en 3.37  $\mu\text{m}$  ( $2963\text{ cm}^{-1}$ ) [19]. Esta vibración se presenta en el segundo átomo de carbono C2 de la molécula mostrada en la figura 1.1.



**Figura 1.1** Estructura de la glucosa donde se muestran los grupos funcionales OH y el átomo C2, responsables de la absorción NIR [20].

La luz enfocada hacia el tejido es parcialmente absorbida y esparcida, debido a su interacción con los diferentes compuestos químicos dentro del tejido. La concentración de glucosa puede estimarse midiendo las variaciones de intensidad de la luz que es reflejada por el tejido que la contiene [10]. Una característica atractiva de esta región del infrarrojo es que los detectores y fuentes son comunes, la transmisión a través del tejido es bastante buena y se pueden emplear fibras ópticas para facilitar el diseño de las sondas [1], [42].

Sin embargo las bandas de absorción de la glucosa son particularmente débiles en esta región y puede ser difícil adquirir datos con una relación señal a ruido sustancial que permitan mediciones robustas. Además existen otros parámetros físicos y químicos que pudieran interferir con la medición, tales como presión arterial, temperatura corporal y concentración de triglicéridos y albúmina [10]. Ya que es prácticamente imposible tener información cuantitativa de todos los componentes que contribuyen a la medición espectroscópica, se requiere efectuar una regresión de las concentraciones de glucosa contra los datos espectrales, utilizando un algoritmo de análisis multivariante, en el cual se hace una calibración con datos que abarquen todo el rango que pueda tener influencia en los espectros de futuras muestras desconocidas. Estos sistemas de calibración por lo general presentan dependencias lineales en los datos espectrales, por lo que se aplica comúnmente el método de regresión de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) [12].

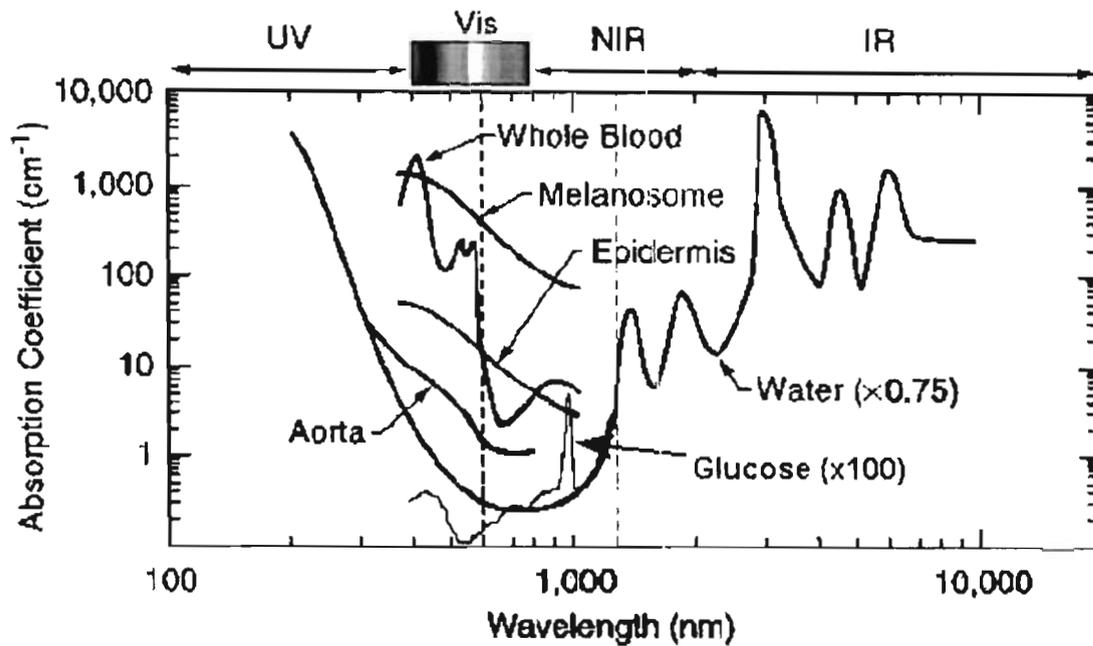


Figura 1.2 La “ventana terapéutica” se muestra entre las líneas punteadas, donde la absorción de varios componentes del tejido humano es débil [11].

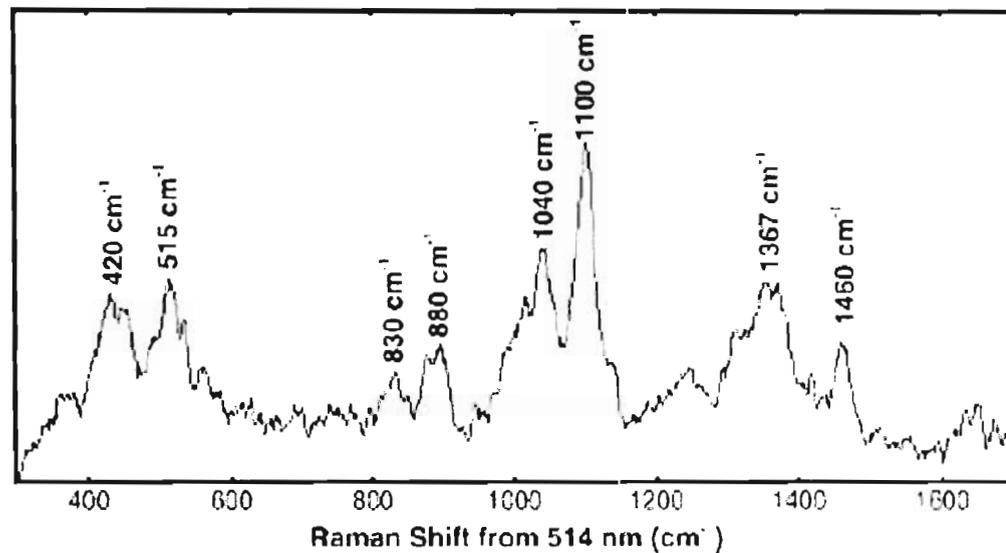
### 1.2.5 Espectroscopía Raman

Cuando se hace incidir radiación monocromática en un medio activo Raman, la mayor parte de la luz incidente a una frecuencia  $\nu_0$  se esparce inelásticamente a la misma frecuencia (esparcimiento Rayleigh); sin embargo, una porción muy pequeña de la luz presenta esparcimiento Raman y exhibe corrimientos de frecuencia  $\pm \nu_m$  que se asocian con transiciones entre los niveles rotacionales y vibracionales. Un decremento en la energía ( $\nu_0 - \nu_m$ ) se denomina corrimiento Stokes y un incremento en la energía ( $\nu_0 + \nu_m$ ) se denomina corrimiento anti-Stokes. Ya que los corrimientos Stokes son mucho más frecuentes, la mayoría de los estudios los utilizan, centrando el interés sobre las bandas recorridas a mayores longitudes de onda que la longitud de onda de excitación [1].

La emisión de luz esparcida está influenciada por la vibración de las moléculas, la cual depende de la concentración de éstas en la solución. Por lo tanto es posible

obtener una estimación de la concentración de glucosa presente en fluidos corporales. El espectro Raman de la glucosa se puede diferenciar de otros compuestos en el intervalo de  $200 - 1800 \text{ cm}^{-1}$  ( $50 - 5.5 \text{ }\mu\text{m}$ ). Esta técnica proporciona picos más definidos (figura 1.3) que otras técnicas como espectroscopía NIR, otras ventajas son una modesta interferencia de fenómenos de luminiscencia y fluorescencia, además de la utilización de láseres de longitud de onda fija a un relativo bajo costo.

Las mayores limitantes se relacionan con la inestabilidad de la longitud de onda e intensidad del láser y los tiempos largos de adquisición espectral, así como el traslape debido a interferencia de otros compuestos [10].



**Figura 1.3** Espectro Raman de glucosa, el cual muestra los picos bien definidos que se pueden obtener con esta técnica [1].

### 1.2.6 Cambios en Polarización

Se basa en el fenómeno que ocurre cuando la luz polarizada atraviesa una solución que contiene solutos ópticamente activos: la luz rota su plano de polarización un determinado ángulo, el cual está relacionado con la concentración de estos solutos ópticamente activos. Esta técnica se reporta como el primer método no invasivo para medición de glucosa en humanos. Una ventaja es que puede hacer uso de la luz visible,

fácilmente disponible y que los dispositivos ópticos pueden miniaturizarse fácilmente [10].

Realizar estas mediciones en la piel no es factible debido a su alta propiedad de esparcimiento de la luz [5], lo cual tiende a despolarizar la luz y disminuir el valor medido del ángulo de polarización [9].

### **1.2.7 Fluorescencia**

Esta técnica se basa en la generación de fluorescencia de tejido humano cuando se excita por luz a longitudes de onda específicas. En el caso de la glucosa un estudio demuestra que cuando se excita una solución de glucosa con luz ultravioleta de un láser a 308 nm, se puede detectar fluorescencia a 340, 380, 400 nm, con un máximo a 380 nm. Una ventaja es que la intensidad de la fluorescencia depende de la concentración de glucosa. Sin embargo, también depende de otros parámetros, como la pigmentación de la piel, enrojecimiento y grosor de la epidermis [10].

### **1.2.8 Recolección de fluidos**

Esta técnica se basa en el uso de luz láser o ultrasonido para crear un arreglo de agujeros microscópicos, denominados microporos, en la piel humana. El fluido intersticial, que contiene glucosa, tiende a migrar a través de estos microporos hacia un sensor de glucosa, de tipo tradicional, puesto en contacto con la piel en el lugar donde se hicieron los microporos y así llevar a cabo una medición directa de la glucosa. Al ser mínimamente invasiva se reduce la herida, se tiene un sanado mas rápido y se elimina la lanceta como fuente potencial de contaminación del tejido [1].

No se han reportado desventajas, excepto un posible desacuerdo entre las mediciones de glucosa en fluido intersticial y las de glucosa en sangre[10].

### 1.2.9 Iontoféresis Inversa

Es un tipo de extracción de fluidos, el cual utiliza una corriente eléctrica aplicada a la piel. Esta corriente extrae la sal, la cual lleva consigo agua, la que a su vez contiene glucosa. La concentración de glucosa de este fluido extraído se mide y es proporcional a la concentración en la sangre [13]. Esta técnica se denomina mínimamente invasiva, ya que atraviesa la barrera de la piel, pero no perfora ningún vaso sanguíneo [14]. Una desventaja de este método es que tiende a causar irritación en la piel. Además esta técnica no puede ser usada si el paciente esta sudando de manera significativa [10].

Cabe mencionar que el dispositivo GlucoWatch® de la compañía Cygnus, Inc. Es el único glucómetro “no invasivo” aprobado por la FDA [4] y se basa en esta técnica para su funcionamiento. Aunque no puede reemplazar la medición convencional de glucosa, debido a la incapacidad de detectar cambios rápidos de concentración, lo cual es un problema general de toda medición no se efectúa directamente en la sangre [10], es de gran utilidad para detectar tendencias y patrones en los niveles de glucosa, al poderla monitorear de manera continua, hasta tres mediciones por hora.

### 1.2.10 Sensado Electromagnético

Este tipo de medición aprovecha el acoplamiento electromagnético entre dos bobinas, las cuales se enrollan alrededor del medio bajo estudio: en un contexto *in vitro* el sistema se puede describir como el bosquejo de la figura 1.4. Los tubos que contienen sangre simulan las venas del cuerpo humano. El acoplamiento entre ambas bobinas se modifica por variaciones en los parámetros dieléctricos de la sangre, los cuales son influenciados por la glucosa, de ahí que se pueda derivar un estimado de la concentración de glucosa. La temperatura tiene un fuerte efecto en la medición y debido a su reciente introducción, todavía no se han llevado a cabo estudios en humanos con esta técnica [10].

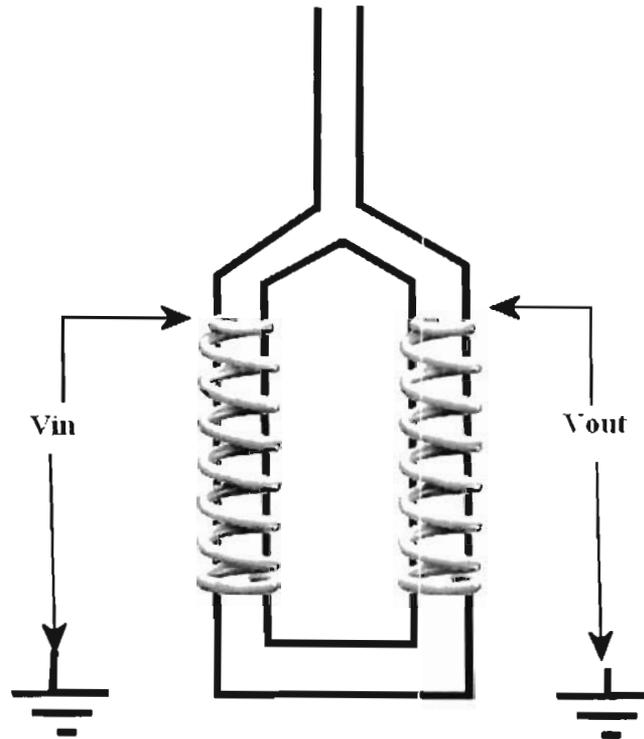


Figura 1.4 Esquema del sistema de sensado electromagnético [9].

### 1.2.11 Espectroscopía por Impedancia Eléctrica

La impedancia de un tejido puede encontrarse al hacer circular una corriente de una intensidad conocida a través de este tejido. Si el experimento se repite con corriente alterna a diferentes frecuencias, se puede determinar un espectro de impedancia eléctrica. Debido a las reacciones específicas de la sangre y las células del tejido ante las variaciones de glucosa en el plasma, hay un cambio en el balance de electrolitos entre las membranas de la sangre y el tejido subyacente. Es decir, las propiedades dieléctricas del tejido son sensibles a los cambios en el balance electrolítico, lo cual está relacionado con los niveles de glucosa en la sangre. El intervalo de frecuencia en el que es posible detectar estas variaciones no debe ser demasiado alto ya que se perdería sensibilidad a la conductividad por iones ( $< 200$  MHz) ni tampoco demasiado bajo ya que se tendrían

problemas con la polarización de los electrodos y las variaciones por humedad en la piel ( $> 100$  KHz). Por lo tanto se elige un rango de frecuencias entre 1 y 200 MHz [15], [16].

La figura 1.5 ilustra como la magnitud de la impedancia varía de manera directa con la concentración de glucosa. Una limitante es que los factores externos y fisiológicos pueden afectar la medición, tales como flujo de sangre, la temperatura corporal y posicionamiento del sensor [17].

Esta técnica fue empleada por el dispositivo Pendra <sup>®</sup> de Pendragon Medical, el cual fue retirado del mercado poco después de su lanzamiento en el 2003, debido su pobre precisión y la necesidad de calibrarse para cada paciente [18].

En la tabla I se resumen tanto las ventajas como las desventajas de cada técnica no invasiva que se ha utilizado para la detección de glucosa.

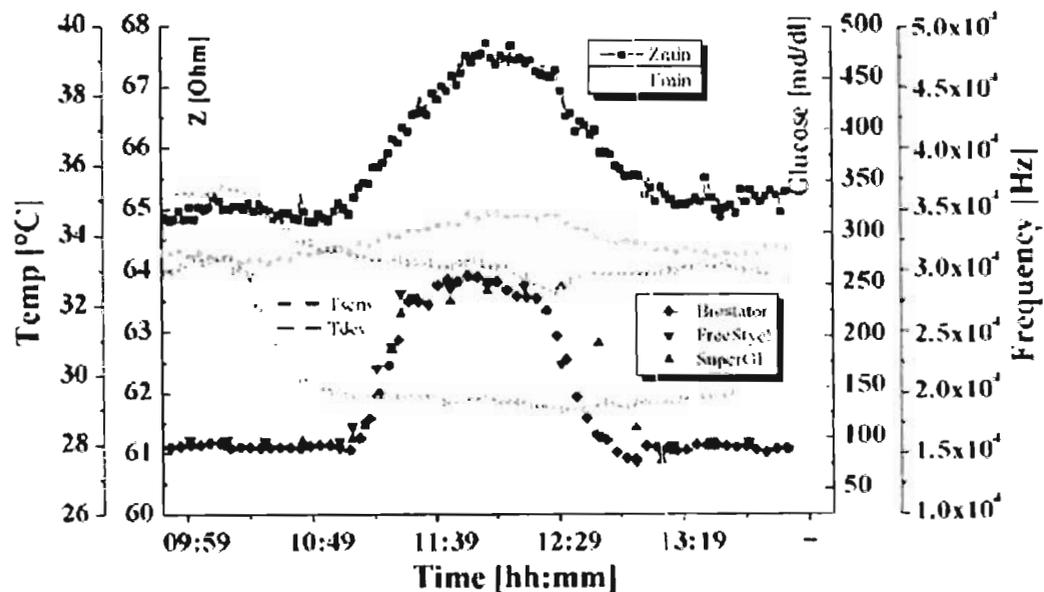


Figura 1.5 Correlación entre la impedancia (—■—) y concentración de glucosa (—◆—▽—▲—) [16].

TABLA I  
MÉTODOS NO INVASIVOS DE DETECCIÓN DE GLUCOSA

Tecnología	Ventajas	Desventajas
Tomografía de Coherencia Óptica (OCT)	Particularmente sensible a cambios en el índice de refracción.	Muy sensible a artefactos inducidos por movimiento.
Espectroscopía Fotoacústica	La señal registrada depende únicamente de la absorción, no del espacimiento ni la dispersión	Instrumentación cara. Sensible a otros factores como la presión aplicada al transductor.
Espectroscopía en el Medio Infrarrojo (MIR)	Profundidad de penetración del orden de mm. Existen picos específicos de absorción de la glucosa	Instrumentación mas cara y difícil de conseguir que para NIR. Fuerte dependencia del contenido de agua en el tejido.
Espectroscopía en el Cercano Infrarrojo (NIR)	Los detectores y las fuentes son económicos y comunes. Este rango permite una buena transmisión a través del tejido. Aprovecha la ventana terapéutica entre la influencia de pigmentos de la piel y la absorción del agua.	Bandas de absorción de la glucosa débiles. Interferencia de otros compuestos. Necesidad de elaborar modelos de calibración multivariantes.

Espectroscopía Raman	<p>Picos del espectro Raman de la glucosa muy definidos.</p> <p>Los láser empleados son relativamente de bajo costo.</p>	<p>Influencia substancial de la fluorescencia en tejido biológico.</p> <p>Inestabilidad de la longitud de onda y potencia del láser.</p> <p>Traslape de picos de otros compuestos.</p>
Cambios en Polarización	<p>Uso de luz visible.</p> <p>Posible miniaturización de los componentes empleados.</p>	<p>El esparcimiento en la piel disminuye el valor medido del ángulo de polarización.</p>
Fluorescencia	<p>La intensidad de la fluorescencia depende de la concentración de glucosa.</p>	<p>También depende de la pigmentación de la piel, enrojecimiento y grosor de la epidermis.</p>
Recolección de fluidos	<p>Se elimina el uso de lancetas como fuente posible de infección.</p>	<p>Mínimamente Invasivo</p> <p>Posible disparidad entre la concentración en el fluido intersticial y en la sangre.</p> <p>Lesiones muy leves.</p>
Iontoféresis Inversa	<p>No perfora ningún vaso sanguíneo.</p> <p>Técnica utilizada en el glucómetro menos invasivo aprobado por la FDA.</p>	<p>Mínimamente Invasivo</p> <p>Posible disparidad entre la concentración en el fluido intersticial y en la sangre.</p> <p>Irritación en la piel.</p>

---

Sensado Electromagnético

-

La temperatura posee una fuerte influencia en la medición.

No hay reportes de experimentos *in vivo*.

Espectroscopía por impedancia eléctrica

Los cambios en la concentración de glucosa se pueden detectar debido a variaciones en el balance electrolítico  
Es el único método eléctrico totalmente no invasivo.

Los factores externos y fisiológicos pueden afectar la medición, tales como flujo de sangre, la temperatura corporal y posicionamiento del sensor.

---

## Capítulo 2

# UNA TÉCNICA CONJUNTA PARA LA PREDICCIÓN DE CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA

En este trabajo se utiliza una técnica conjunta basada en mediciones de impedancia eléctrica, en un rango de 1 a 200 MHz; y de espectroscopía en el cercano infrarrojo, en la región de 700 a 1000 nm. Con ambos conjuntos de datos se desarrolla un modelo de calibración empleando una técnica de análisis multivariante como PLS.

Al emplear de manera conjunta las mediciones de impedancia eléctrica (1 - 13 MHz) y de absorción en el cercano infrarrojo (850 – 1740 nm) para soluciones acuosas de glucosa con un rango de concentraciones de 0.5 a 10 g/dl se demuestra que existe una reducción de 18% en el porcentaje de error medio cuadrático de predicción (RMSEP por sus siglas en inglés), al hacer la comparación con el modelo que usa solo las mediciones de espectroscopía NIR.

Como se observó una mejoría en el error de predicción al usar ambas mediciones, se diseñó una serie de experimentos *in vivo* para aprovechar la ventaja de combinar ambas técnicas, y así reducir el error de predicción.

Al hacer uso de esta técnica conjunta en experimentos *in vivo* para un estudio de 10 voluntarios se logró un modelo de predicción con un error medio cuadrático RMSEP de 21.96 mg/dl y un error medio absoluto porcentual MAPE de 13.31 %, el cual es del mismo orden del que presentan glucómetros portátiles convencionales; estos dispositivos tienen una desviación de entre 0.14% y 16.9% [50] cuando se comparan con el método de laboratorio, lo que lleva a pensar que si se hiciera la calibración de nuestro método no invasivo con la referencia de laboratorio podría mostrar un desempeño comparable al de los glucómetros portátiles.

Una desventaja que presenta este método, al igual que otras técnicas no invasivas, es la necesidad de calibrarse individualmente, ya que no es un método para medir directamente la glucosa, sino para predecir su concentración a partir de mediciones de parámetros ópticos y eléctricos, y estos varían de un individuo a otro.

Ahora bien, esta técnica muestra gran potencial para el monitoreo continuo de los niveles de glucosa al lograr la totalidad de estas predicciones dentro del margen de error clínicamente aceptable, según el análisis de error de Clarke y por alcanzar una disminución en el RMSEP, respecto a trabajos previos donde han desarrollado técnicas no invasivas para la medición de glucosa.

## Capítulo 3

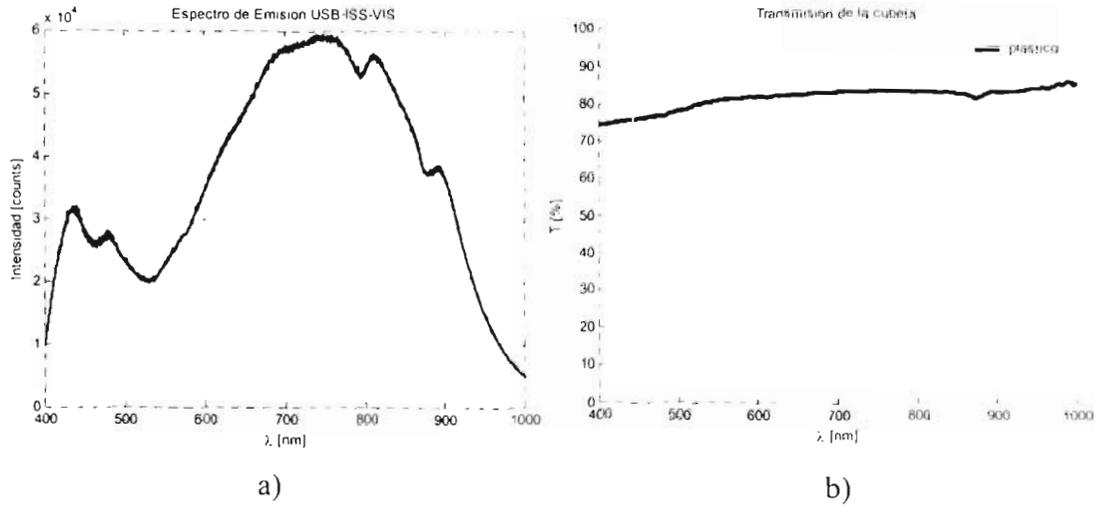
### MÉTODO EXPERIMENTAL

#### 3.1 Espectroscopía en el cercano infrarrojo

Varios estudios recientes se han enfocado en la posibilidad de utilizar técnicas espectroscópicas en el cercano infrarrojo (NIR) para monitorear un cambio en la concentración de glucosa en el tejido. La base de este método radica en el hecho que un cambio de índice de refracción en el fluido extracelular debido a la presencia de glucosa adicional causa un pequeño cambio en las propiedades de esparcimiento del tejido, el cual puede ser detectado por espectroscopía NIR [33].

Todos los experimentos se llevaron a cabo en un espectrómetro USB4000-VIS-NIR (Ocean Optics) el cual está configurado para efectuar mediciones en el rango de 350 a 1000 nm. El USB4000-VIS-NIR contiene un arreglo lineal CCD de 3648 pixeles, cada uno de dimensiones de  $8 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ . El espectrómetro viene con una rendija de entrada de  $25 \mu\text{m}$ , alcanzando una resolución óptica de aproximadamente 1.5 nm (FWHM). Su relación señal a ruido es de 300:1. La conversión de datos la realiza con un convertidor analógico digital de 16 bits a 3 MHz, mientras que la transmisión de éstos hacia la computadora la efectúa vía USB 2.0 a 480 Mbps.

Para las mediciones *in vitro* se utilizó un sistema de pruebas integrado USB-ISS-VIS (Ocean Optics), que contiene el espacio para colocar una cubeta de 1 cm de longitud de camino óptico, en la cual se coloca la solución a analizar. También tiene incluida una fuente de excitación de tungsteno y LED con un rango espectral de 390 a 2000 nm, mostrado en la figura 3.1 a). Las cubetas empleadas para los experimentos fueron de plástico, desechables, con un espectro de transmisión de aproximadamente 80% , mostrado en la figura 3.1 b) el cual es casi plano en todo el rango del espectrómetro.



**Figura 3.1** a) Espectro de emisión del sistema integrado USB-ISS-VIS, b) Espectro de transmisión de la cubeta de plástico empleada en los experimentos *in vitro*

Se prepararon 16 muestras de solución acuosa con concentraciones de glucosa en el rango de 70 a 500 mg/dl, es decir dentro del rango fisiológico [23]. A cada una de las muestras se le hizo medición de absorbancia [24], [25], también llamada atenuación o densidad óptica (O.D.) [11] la cual se define como:

$$A = -\log_{10} \left( \frac{I}{I_0} \right) \quad (1)$$

Donde:

$A$  = absorbancia

$I$  = intensidad transmitida

$I_0$  = intensidad incidente

Para mediciones prácticas es necesario modificar la ecuación (1) para eliminar la contribución hecha por el instrumento utilizado, ya que el espectrómetro siempre presenta una señal eléctrica de 2 a 5 mV [26] en el arreglo de detectores, aunque no capte nada de luz, esta lectura se denomina espectro de oscuridad  $D_\lambda$  y se incluye en la definición de absorbancia de la siguiente manera:

$$A = -\log_{10} \left( \frac{I - D_\lambda}{I_0 - D_\lambda} \right) \quad (2)$$

La expresión básica que relaciona la intensidad de la luz absorbida con la concentración del soluto [24],[25] es la denominada ley de Beer–Lambert:

$$A = -\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon lc \quad (3)$$

Donde:

$\epsilon$  = coeficiente de extinción molar [ $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ]

$l$  = longitud de camino óptico [cm]

$c$  = concentración molar [ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]

Podemos observar que la ecuación (3) es análoga a la fórmula para una línea recta:

$$y = mx + b \quad (4)$$

Donde:

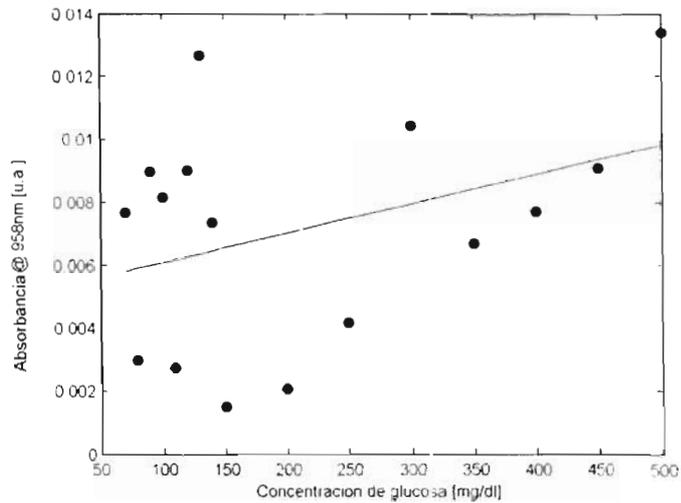
$y$  = valor de las ordenadas para cada punto de datos

$m$  = pendiente de la recta

$x$  = valor de las abscisas para cada punto

$b$  = intersección de la recta con el eje de las ordenadas

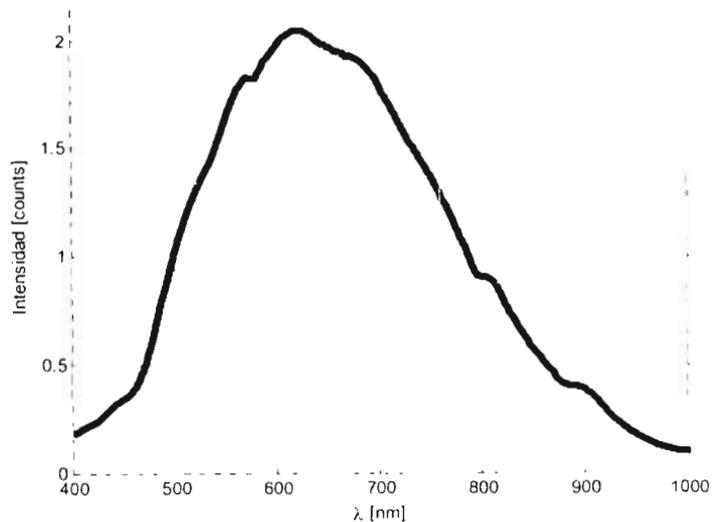
Al comparar las ecuaciones (3) y (4) se observa que una gráfica con absorbancia en el eje de las  $y$  vs. concentración en el eje de las  $x$ , debería dar una línea recta con una pendiente de  $\epsilon l$  y una intersección de cero. Para el análisis de la concentración de glucosa, se puede hacer esta curva de calibración al medir la absorbancia de una serie de soluciones conocidas a cierta longitud de onda donde se presente un pico de absorbancia. Para predecir la concentración desconocida simplemente se divide la absorbancia medida para la muestra desconocida entre la pendiente de la curva de calibración. Sin embargo al graficar las mediciones in vitro, se observa en la figura 3.2 que no se obedece la relación lineal de la ley de Beer–Lambert entre absorbancia y glucosa, lo que puede atribuirse a fluctuaciones en el funcionamiento del instrumento o a la precisión al preparar las muestra, debido a la bajísima concentración de las soluciones.



**Figura 3.2** Gráfica de absorbancia contra concentración llamada curva de calibración

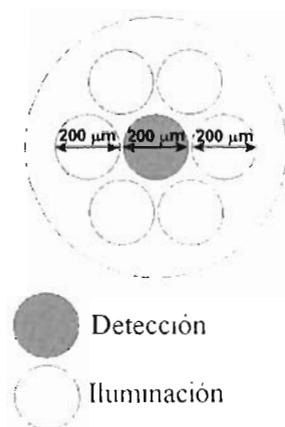
Debido a la pobre correlación entre las mediciones de absorbancia y la curva de ajuste de la ley de Beer–Lambert para poder predecir estas concentraciones de glucosa se tuvo que recurrir a técnicas de análisis multivariante como se explica en la sección 3.3.

Como fuente de excitación para las mediciones *in vivo* se empleó una lámpara de tungsteno–halógeno LS-1 (Ocean Optics) optimizada para el visible y cercano infrarrojo, capaz de proveer un amplio espectro de emisión de radiación electromagnética [12] que abarca desde los 360 hasta los 2500 nm con una potencia de salida de 6.5 W y se muestra en la figura 3.3.



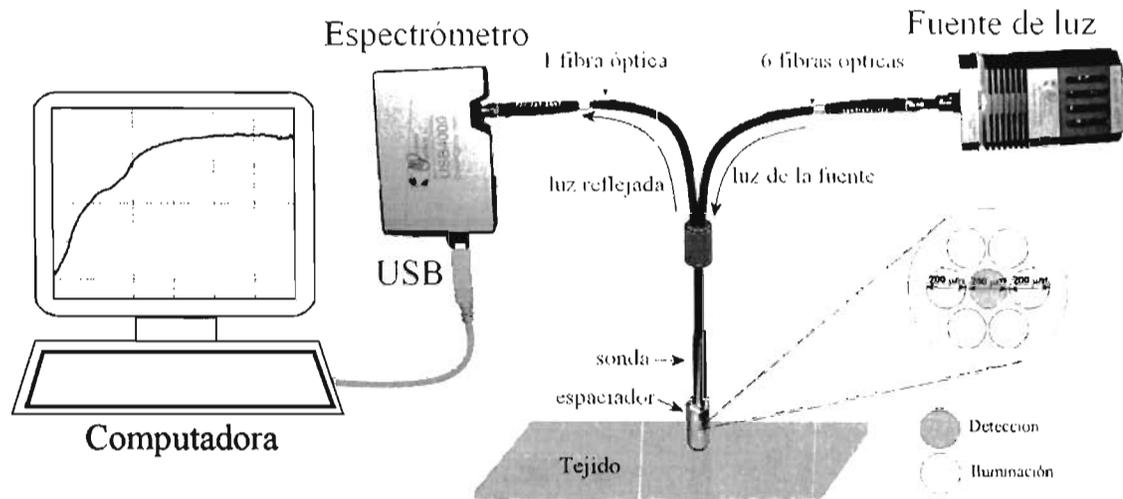
**Figura 3.3** Espectro de emisión de la lámpara de tungsteno–halógeno LS-1

En el presente estudio se emplea una sonda de reflectancia R200-7-VIS/NIR (Ocean Optics). Esta sonda posee una punta ergonómica formada por un cilindro de acero inoxidable de  $\frac{1}{4}$ " de diámetro externo y 3" de longitud, que alberga en su interior 7 fibras ópticas de sílice. Cada fibra tiene un diámetro de  $200\ \mu\text{m}$ , apertura numérica  $NA = 0.22$ , y están optimizadas para transmitir desde el visible hasta el infrarrojo cercano ( $400 - 2000\ \text{nm}$ ). Un haz de seis fibras colocadas en forma de anillo llevan la luz desde la fuente hasta la piel y la luz reflejada se recolecta por medio de la fibra central, como se indica mediante la figura 3.4. Para mantener fija la distancia de la sonda respecto al lugar de medición se utilizó como separador un cilindro hueco de aluminio, se fijó con un tornillo, a la vez protegiendo a la fibra de interferencia por la luz externa.



**Figura 3.4** Acomodo de las fibras ópticas en la sonda de reflectancia R200-7-VIS/NIR.

Antes de cada medición se tomó un espectro de referencia para normalizar, se empleó un cilindro de teflón ya que es el mismo material que emplean los estándares de reflectancia comerciales. En la figura 3.5 se muestra un esquema del arreglo experimental para llevar a cabo estas mediciones ópticas.



**Figura 3.5** Arreglo experimental utilizado en las mediciones de reflectancia.

Para efectuar la predicción de niveles de glucosa a través de las mediciones de reflectancia en el cercano infrarrojo se llevó a cabo una serie de pruebas de tolerancia a la glucosa oral (OGTT por sus siglas en inglés) en diez sujetos sanos. La población que participó en el experimento tiene las siguientes características (media  $\pm$  desviación estándar): edad  $26.1 \pm 3.7$  años, índice de masa corporal  $25.24 \pm 3.67$  kg/m<sup>2</sup>. El protocolo de prueba consistió en un periodo de ayuno de aproximadamente 8 horas, luego del cual se hizo la primera punción para tener una medición de referencia, en seguida se les suministró vía oral 100 gramos de glucosa disueltos en 300 ml de agua [21] [41] [47]; después de esta ingesta se hicieron otras trece mediciones, cada 15 minutos. Para obtener cada espectro de reflectancia se promediaron 100 mediciones con un tiempo de integración de 40 ms, la reflectancia está definida como:

$$R = \frac{I - D_{\lambda}}{I_0 - D_{\lambda}} \quad (5)$$

Donde:

$R$  = reflectancia

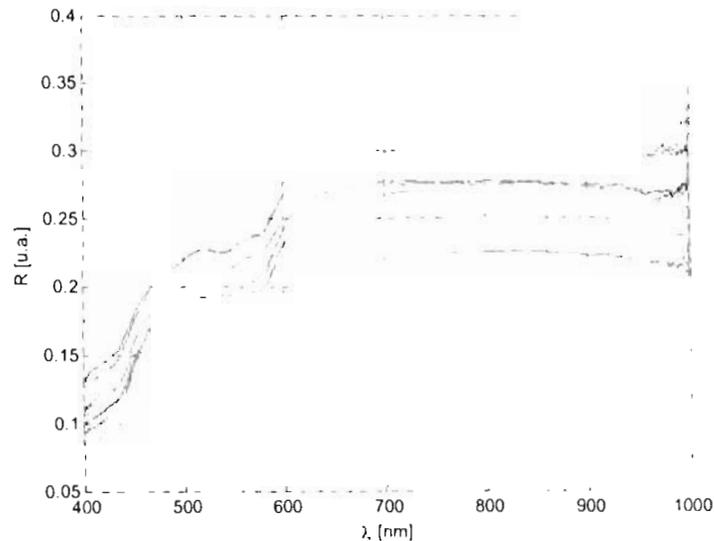
$I$  = intensidad de la luz reflejada por la muestra

$I_0$  = intensidad de la luz reflejada por el estándar

$D_{\lambda}$  = espectro de oscuridad

La figura 3.6 muestra los catorce espectros de reflectancia que se tomaron para un mismo voluntario durante el experimento.

Las mediciones invasivas de referencia con las cuales se hace la calibración se efectuaron con un glucómetro portátil Accu-Check<sup>®</sup> (Roche), instrumento que tiene un rango de medición de 10 – 600 mg/dl, con un límite de detección de 10 mg/dl, este instrumento presenta un error estándar de 12.2 mg/dl [27] al compararse con el método de hexoquinasa para un rango entre 13.1 y 572.1 mg/dl. Cabe mencionar que el aparato mide la concentración de glucosa a nivel capilar, la cual es significativamente mas alta que la glucosa en sangre venosa después de una ingesta oral de glucosa [28] en un promedio de 32.4 mg/dl, para mediciones entre 15 y 90 minutos posteriores a dicha ingesta [29].



**Figura 3.6** Espectros de reflectancia para diferentes concentraciones de glucosa en un mismo sujeto.

### 3.2 Mediciones de impedancia eléctrica

Dentro de los enfoques no ópticos para predecir concentración de glucosa, la espectroscopía de impedancia eléctrica, también llamada espectroscopía dieléctrica, se utiliza ampliamente. Varios reportes describen el uso de sistemas de detección basados en impedancia para el monitoreo no invasivo de la glucosa [15] – [17]. Se menciona que los cambios dentro de los niveles fisiológicos de glucosa no afectan directamente el

espectro dieléctrico de la piel y el tejido subyacente en un amplio espectro de frecuencia. Por lo tanto, la concentración no podría medirse directamente por medio de la espectroscopía dieléctrica. Sin embargo, los cambios en la concentración de glucosa conducen a cambios en el balance electrolítico de la sangre, de las células y del fluido intersticial tanto en sujetos sanos como en pacientes con diabetes [31]. Los cambios resultantes en la conductividad de CA y CD pueden medirse a través de espectroscopía de impedancia. No obstante, existen resultados parcialmente contradictorios, que mencionan que la glucosa afecta directamente los parámetros de impedancia de soluciones acuosas, especialmente en frecuencias menores a la banda de los MHz y que el cambio es mas evidente en la magnitud de la impedancia [32].

En la primera serie de experimentos se determinó la concentración de glucosa en soluciones mediante mediciones de fase de impedancia, ya que la magnitud de la impedancia no presentó cambios tan evidentes como ocurrió con el espectro de fase, el cual si mostró cambios evidentes, tal y como se aprecia en la figura 3.8.



Figura 3.7 Arreglo experimental para mediciones de impedancia *in vitro*.

El arreglo experimental de la figura 3.7 se basa en un analizador de impedancias HP4192A (Hewlett-Packard), el cual puede trabajar en una rango de frecuencias desde 5 Hz hasta 13 MHz con una resolución máxima de 1 mHz. El rango de medición del valor

absoluto de la impedancia  $|Z|$  es de  $0.1\text{m}\Omega$  a  $12999\Omega$ ; para el ángulo de fase  $\theta$  es desde  $-180^\circ$  hasta  $+180^\circ$ , con una precisión de  $0.1\%$ .

La solución acuosa de glucosa se utiliza como dieléctrico en una celda capacitiva de placas paralelas con un área de  $2.56\text{ cm}^2$  y una separación entre placas de  $63.5\text{ mm}$ , la cual se conecta al adaptador HP16047A (Hewlett-Packard) de modo que nuestra celda de dos terminales se pueda medir con el analizador que emplea cuatro puntas para determinar la impedancia. Los datos de la medición se transmiten a la computadora, vía la interfaz IEEE-488. El rango de los MHz se ve limitado por el propio instrumento. Un total de 241 mediciones por muestra se efectuaron en este intervalo, con pasos de  $50\text{ kHz}$ .

Los espectros de fase de impedancia se grafican en la figura 3.8, donde puede observarse que el ángulo de fase varía notoriamente de acuerdo a la concentración de glucosa, lo que no ocurre con el espectro de la magnitud de impedancia, en donde se traslapan los espectros correspondientes a diferentes concentraciones, como así se aprecia en la figura 3.9, y por consiguiente no se pueden emplear estos espectros de magnitud de impedancia para encontrar la concentración de glucosa.

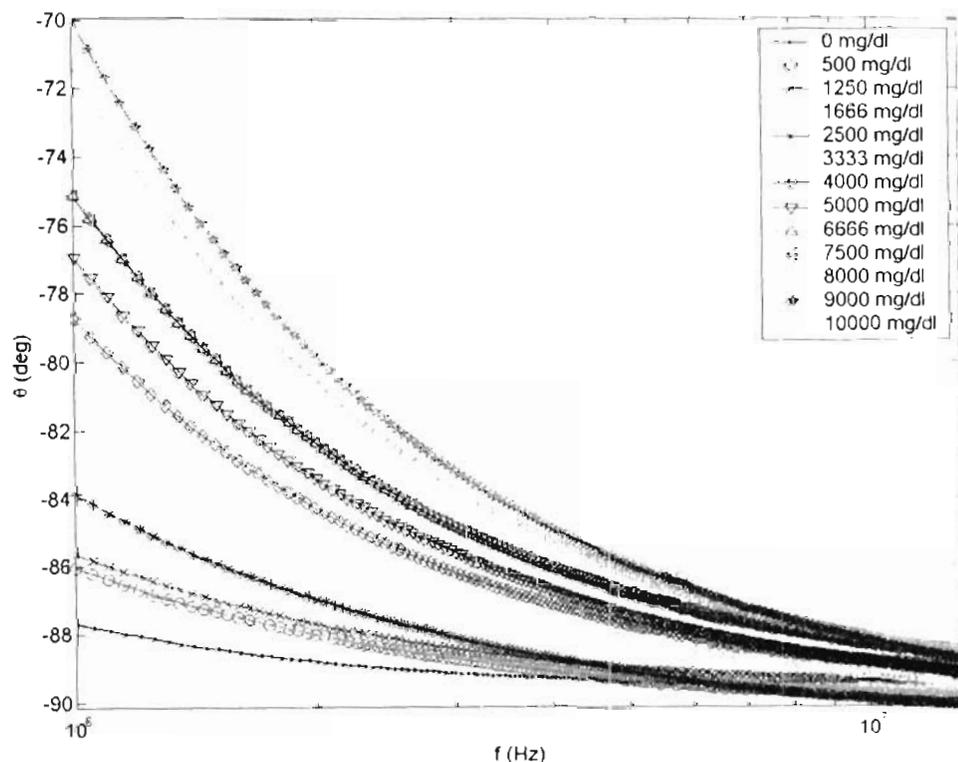
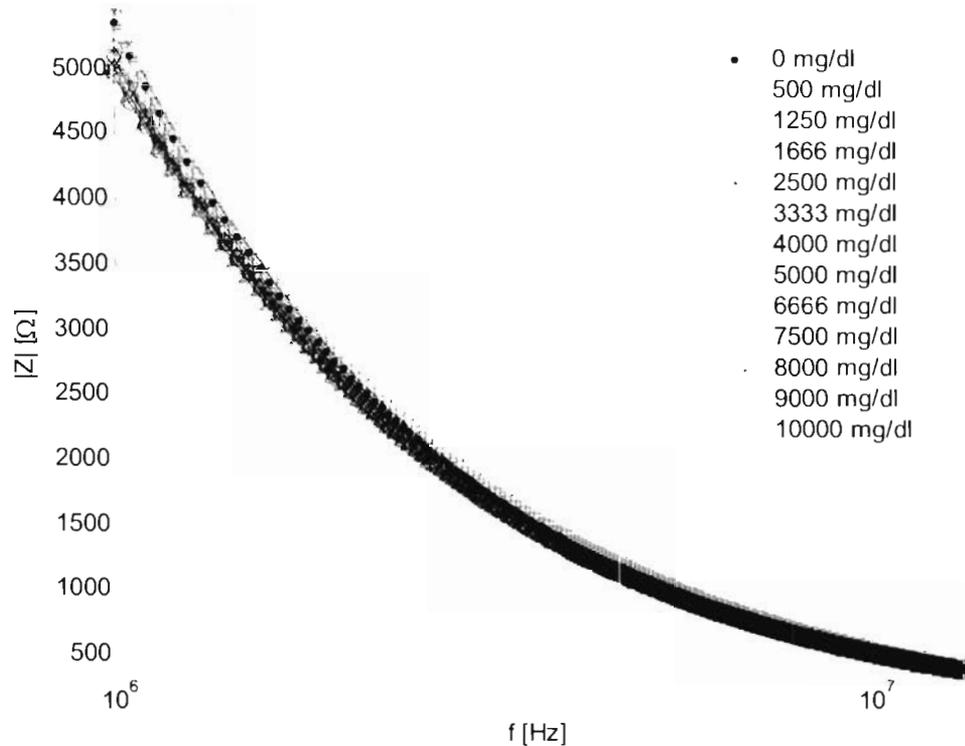


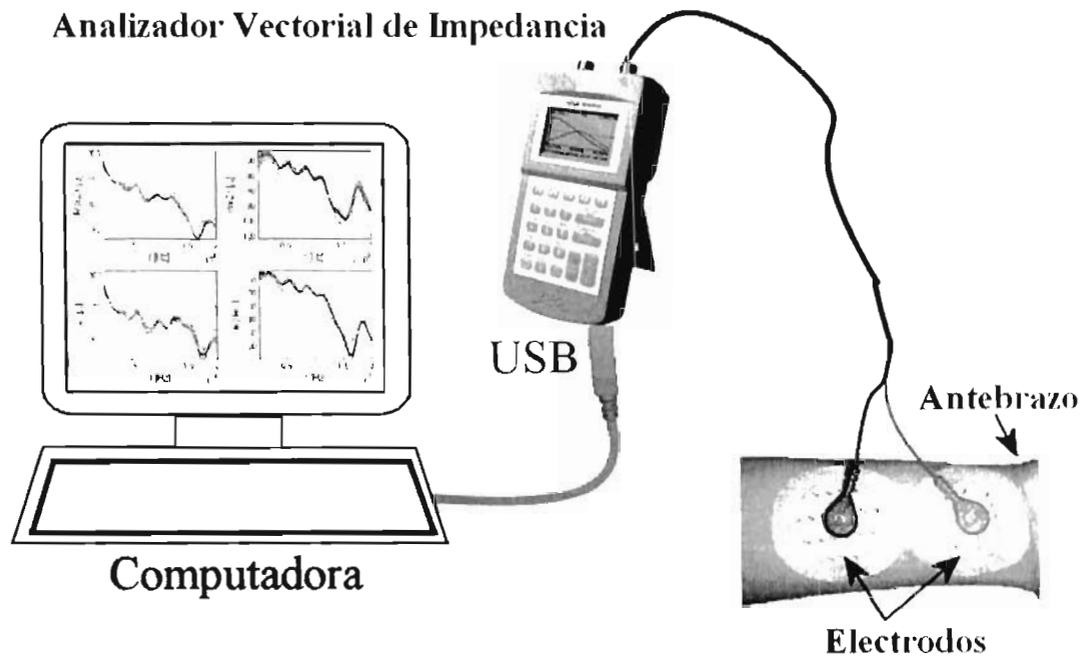
Figura 3.8 Espectros de fase de impedancia para diferentes concentraciones de glucosa *in vitro* [34].



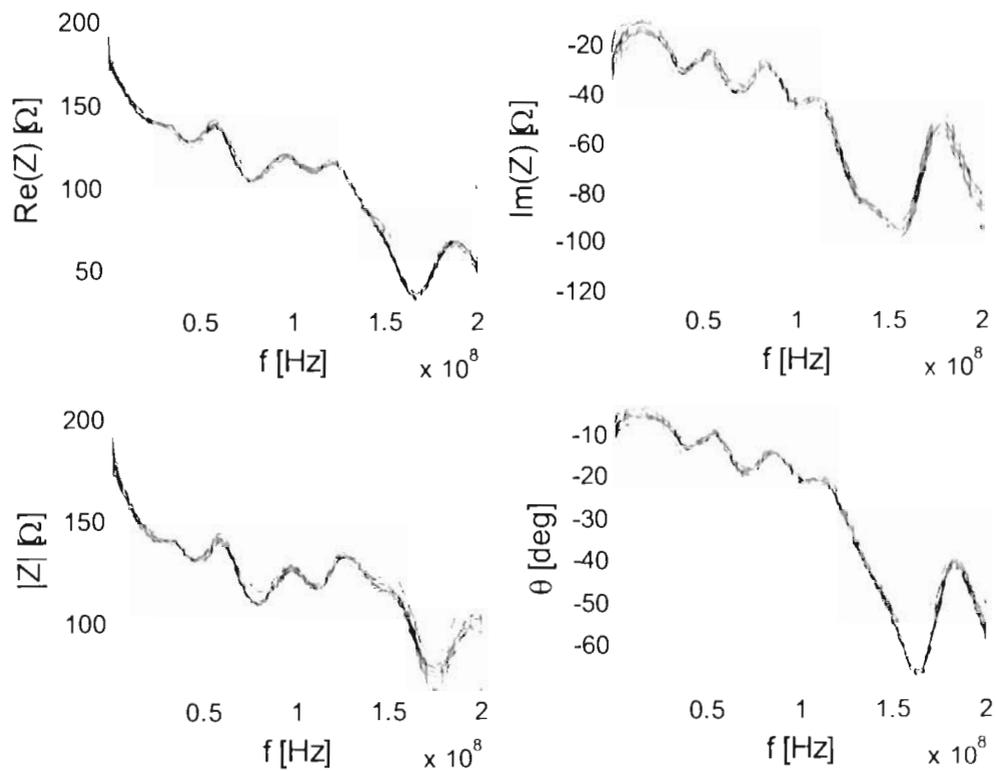
**Figura 3.9** Espectros de magnitud de impedancia para diferentes concentraciones de glucosa *in vitro*.

En la serie de experimentos *in vivo* se utilizó un analizador vectorial de impedancias VIA Echo 2500 (AEA Technologies) con un rango en frecuencia de 1 MHz – 2.5 GHz, un rango de impedancia de 2 – 2000  $\Omega$ , con una resolución de 1 KHz. Los electrodos desechables se fijaron en la parte interna del antebrazo izquierdo de cada voluntario, como el arreglo experimental descrito en la figura 3.10. Se empleó una característica que tiene este instrumento, denominada *cable nulling*, la cual sirve para eliminar los efectos del cable en la medición, de modo que la línea de transmisión que se conecta de los electrodos hacia el analizador vectorial de impedancias no afecte el experimento. El rango empleado fue de 1 – 200 MHz, el cual se eligió para no tener problemas con la polarización de los electrodos y minimizar la contribución de la humedad en el tejido humano, ya que en este intervalo de frecuencias la piel presenta propiedades dieléctricas muy similares independientemente de su contenido de humedad [31]. El espectro obtenido consistió de 251 puntos en el rango con una diferencia de 800 KHz entre cada medición. Estos catorce espectros de impedancia, capturados para cada voluntario se grafican en la figura 3.11. Para desarrollar el modelo de predicción se

utilizó el espectro de fase de impedancia ya que muestra una mayor variación relacionada con cambios en la glucosa que el espectro de magnitud de impedancia [34].



**Figura 3.10** Arreglo experimental para espectroscopia de impedancia eléctrica.



**Figura 3.11** Espectros de impedancia para diferentes concentraciones de glucosa en un mismo sujeto.

### 3.3 Análisis multivariante: Regresión por mínimos cuadrados parciales

Para analizar los datos espectrales obtenidos, se emplearon métodos de análisis multivariante. Estas técnicas de análisis multivariante se utilizan para medir la concentración de un componente dentro de una mezcla compleja. Uno de las técnicas mas conocida es la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS por sus siglas en inglés), inventada y popularizada por Wolde en 1975 [35]. Es un método de calibración que es capaz de relacionar la concentración de elementos directamente con los espectros medidos, enfatizando en la predicción de las concentraciones pero no necesariamente en la comprensión de las relaciones existentes entre las variables [36]

Su ventaja radica en la baja sensibilidad a las impurezas y al empleo de todos los datos espectrales que describen cierta muestra, por consiguiente es bastante tolerante a datos tomados con baja resolución, con ruido o con artefactos, los cuales se pueden emplear con éxito en el análisis multivariante. La principal desventaja es que al ser un algoritmo iterativo las operaciones matemáticas son pueden llegar a ser laboriosas [25].

Sin embargo existen paquetes comerciales de cómputo que facilitan esta tarea como The Unscrambler (Camo Software AS), que se empleó en este trabajo, ya que el desarrollar un programa para la regresión por PLS está fuera del alcance de esta tesis. El principal propósito de este paquete es proveer herramientas para analizar datos multivariantes, nos permite encontrar la relación entre una matriz de respuesta y su matriz de factores de predicción, y así de este modo estimar la concentración de un componente en una mezcla a partir de datos espectrales que describan la mezcla.

El proceso de calibración se llevó a cabo de manera individual, es decir desarrollando un modelo de predicción para cada sujeto, empleando 14 muestras de sangre. Las variables espectrales, reflectancia e impedancia se introdujeron en una matriz  $\mathbf{X}$ , en la que el número de filas es igual al número de muestras (14) y el número de columnas es igual al número de variables, o sea el número de puntos que conforman cada espectro tomado: 251 de impedancia + 1675 de reflectancia = 1926 puntos. Esta matriz  $\mathbf{X}$  es llamada matriz de datos. Las concentraciones relacionadas con cada espectro se forman en una matriz  $\mathbf{Y}$  con el mismo número de filas (14) y con una sola columna, ya que se quiere predecir la concentración de un solo componente, glucosa en este caso.

La regresión por PLS encuentra las componentes de  $\mathbf{X}$  que son relevantes para  $\mathbf{Y}$ . Así, el método PLS busca un conjunto de componentes, llamado vectores latentes, que lleven a cabo una descomposición simultánea de  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$ , con la restricción que estas componentes expliquen tanto como sea posible la relación entre  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$ . Así la matriz de datos independientes se descompone como  $\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T$ . Por analogía con el análisis de componentes principales (PCA) a  $\mathbf{T}$  se le denomina matriz de variables latentes o *scores*, y a  $\mathbf{P}$  se le llama matriz de cargas o *loadings*. De manera similar  $\mathbf{Y}$  se estima con la relación  $\hat{\mathbf{Y}} = \mathbf{TBC}^T$  donde  $\mathbf{C}$  es la matriz de pesos (*weights*) de la variable dependiente y  $\mathbf{B}$  es una matriz diagonal con los coeficientes de regresión como elementos de la diagonal. Nótese que en general  $\hat{\mathbf{Y}}$  no es igual a  $\mathbf{Y}$ , sino que únicamente es una estimación [37].

El método de regresión por PLS comprime las variables originales en un número de variables latentes. La primera variable latente tiende a describir la varianza sistemática en los datos, es decir la relación entre espectros y concentraciones, y en menor medida al ruido. Conforme el número de variables latentes se incrementa, la contribución del ruido también aumenta. Por consiguiente, es importante elegir un número óptimo de variables latentes, de modo que nuestro modelo tenga una buena capacidad de predicción. Esta optimización se calcula principalmente cuando el error medio cuadrático de predicción RMSEP [36] definido en la ecuación (6) es mínimo.

$$RMSEP = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n} \quad (6)$$

Donde:

$y_i$  = valores de referencia

$\hat{y}_i$  = valores de predicción

$n$  = número de pares de datos evaluados

Este valor de RMSEP es una medida de la diferencia entre los valores de concentraciones conocidas y los predichos por el modelo. El cálculo del RMSEP se

realizó mediante una validación cruzada, ya que se tiene solamente un número limitado de muestras ( $n = 14$ ) para construir y validar la calibración. En la validación cruzada se excluye una muestra del conjunto de datos de calibración y se construye el modelo con los datos restantes. Entonces se predice el valor para esta muestra que fue excluida y se calculan las desviaciones. El proceso se repite con las muestras restantes, hasta que todas hayan sido excluidas una sola vez; entonces todas las desviaciones se combinan para calcular el RMSEP [39].

Otra medida de la capacidad de predicción es el error medio absoluto porcentual MAPE [38], definido como:

$$MAPE = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \frac{|y_i - \hat{y}_i|}{\frac{y_i + \hat{y}_i}{2}} \quad (7)$$

Aunque esta medida del error de un modelo de predicción presenta serios problemas cuando el valor medido es cero [40], se puede emplear sin ningún problema por el rango fisiológico de la glucosa (40 – 400 mg/dl) [1] en el que se está trabajando.

Para mejorar la capacidad de predicción de nuestro modelo de regresión por PLS se procesaron los espectros: al de impedancia eléctrica se derivó dos veces de modo que la presencia de picos se hiciera mas evidente [35], como lo señala la figura 3.12. En el caso de los espectros NIR el proceso fue primero transformar los espectros mediante SNV (Standard Normal Variate), definida en (8) y cuyo efecto práctico es el eliminar efectos de espesamiento en estos datos espectrales [39]; después se aplicó un filtro Gaussiano para reducir el efecto del ruido [35] en nuestras mediciones, como lo muestra la figura 3.13.

$$X_{i,j}(SNV) = \frac{X_{i,j} - X_i}{\sigma(X_i)} \quad (8)$$

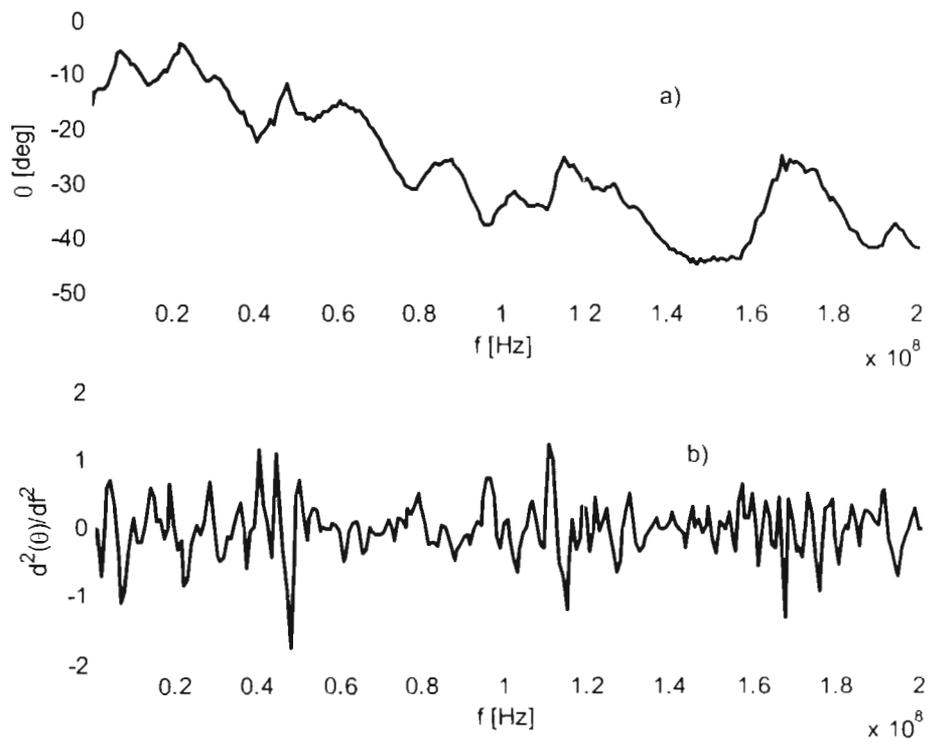
Donde:

$X_{i,j}(SNV)$  = Valor corregido de cada punto espectral.

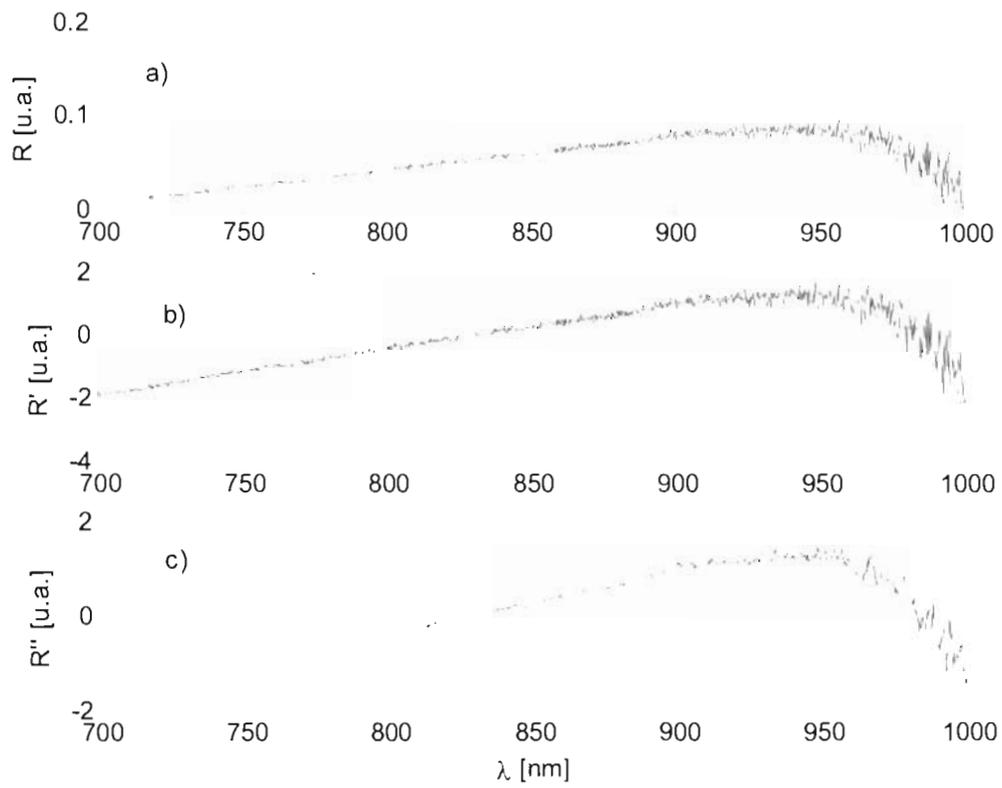
$X_{i,j}$  = Valor medido de cada punto espectral.

$X_i$  = Media aritmética de los datos espectrales de la  $i$ -ésima muestra.

$\sigma(X_i)$  = Desviación estándar de los datos espectrales de la  $i$ -ésima muestra.



**Figura 3.12** a) Espectro de fase de impedancia y b) su segunda derivada.



**Figura 3.13** a) Espectro de reflexión NIR, b) el resultado de aplicar SNV, y c) un filtrado gaussiano.

## Capítulo 4

### RESULTADOS

En el estudio realizado *in vitro* se hizo una regresión mediante PLS con tres conjuntos de datos: el primero de ellos consta de doce espectros NIR, capturados en los experimentos de Facundo Ruiz *et al.* [36], el segundo está conformado por doce espectros de impedancia eléctrica que describen las soluciones de glucosa a las mismas concentraciones, mientras que el último conjunto de datos se constituyó por la combinación de los dos anteriores. Se demuestra así que al utilizar datos generados de diferentes mediciones, unas ópticas y las otras eléctricas, se mejora la capacidad de predicción del modelo, ya que el RMSEP se reduce en un 18% al descender de 872.41 mg/dl hasta 659.15 mg/dl, como se señala en la tabla II. En la figura 4.1 se muestra la correlación entre los valores predichos por el modelo y los valores de referencia, es decir la concentración indicada por el glucómetro.

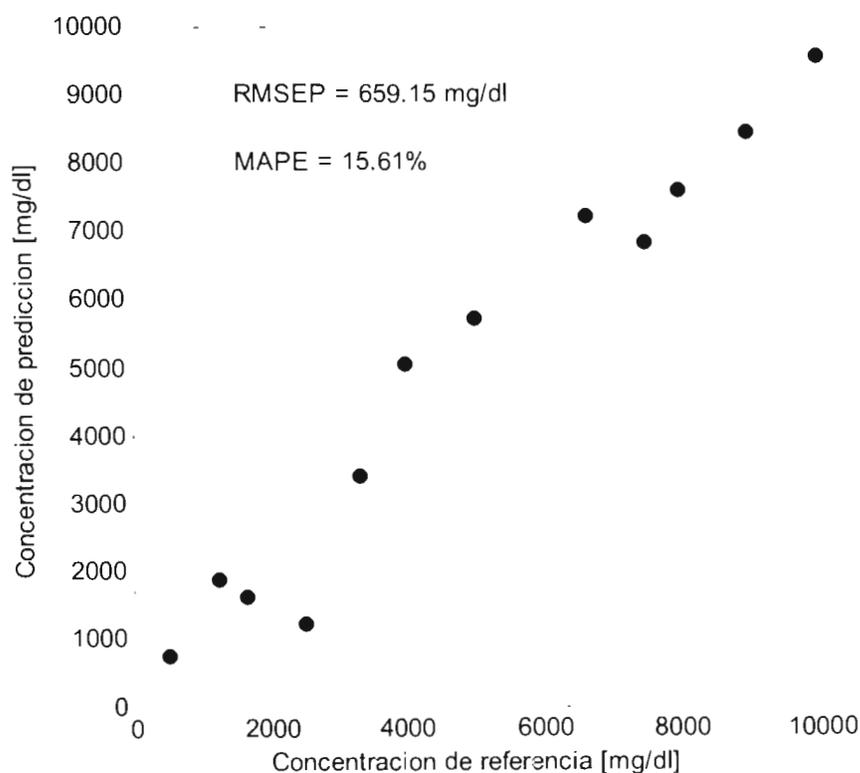


Figura 4.1 Correlación entre los valores predichos y los valores de referencia para mediciones *in vitro*.

TABLA II  
COMPARACIÓN DE TÉCNICAS *IN VITRO*

	RMSEP (mg/dl)	MAPE (%)
Espectroscopía NIR (850-1740nm)	872.41	28.13
Espectroscopía de impedancia (1-13 MHz)	807.15	18.78
Datos combinados de ambas técnicas	659.15	15.61

La figura 4.2 ilustra la prueba de respuesta a la glucosa oral y muestra los perfiles de glucosa vs. tiempo para todos los sujetos que participaron en el experimento; en esta gráfica se observa el comportamiento que tiene la concentración capilar al ingerir la carga de glucosa en ayunas. Cada punto corresponde a un valor indicado por el glucómetro para la muestra de sangre .

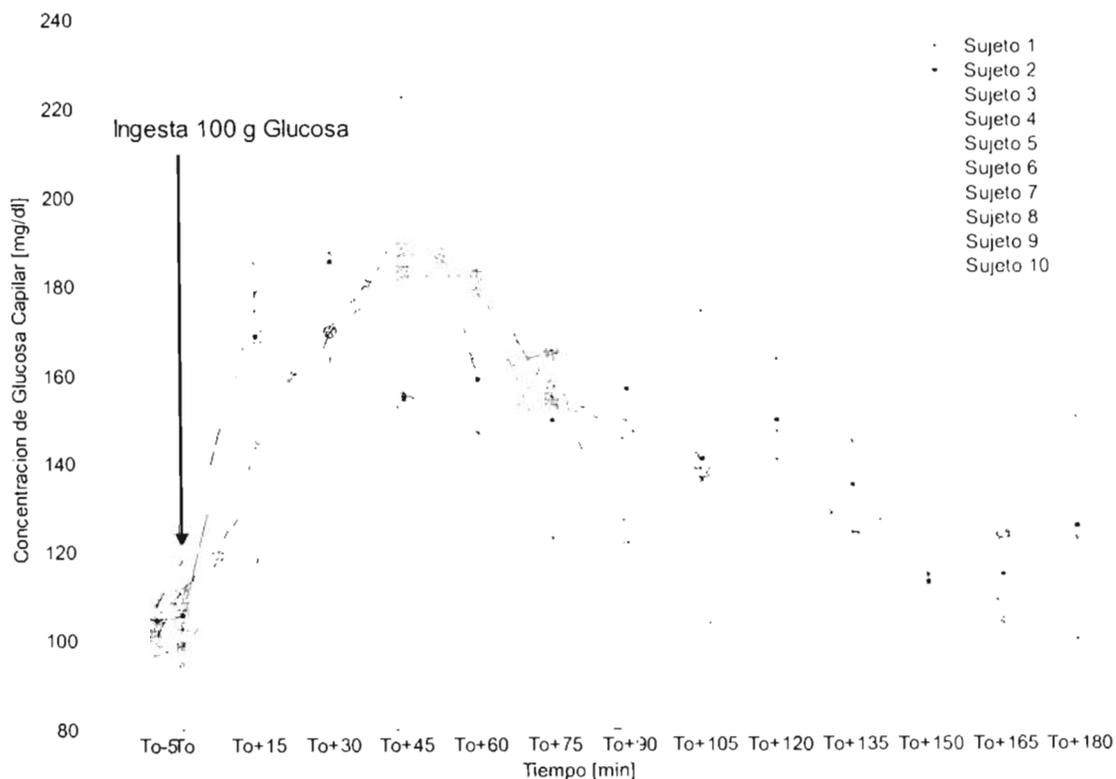


Figura 4.2 Concentraciones de glucosa capilar durante la prueba de respuesta a la glucosa.

Se desarrolló un modelo de predicción para cada individuo de manera individual, ya que las propiedades dieléctricas y ópticas varían de sujeto a sujeto y así no sería posible generalizar un modelo válido para toda la población, esta es una desventaja que presenta la medición indirecta de glucosa a través de mediciones eléctricas – ópticas. Este modelo se construyó con las 14 muestras tomadas durante esta prueba de respuesta a la glucosa, mediante el método de validación cruzada. La tabla III muestra un resumen con los resultados de la regresión para todos los sujetos, mientras que la figura 4.3 muestra los valores de glucosa capilar de un sujeto, que fueron obtenidos con el modelo de regresión por PLS, haciendo la comparación con los valores reales; es posible observar como los datos del modelo se aproximan bien a los de referencia, excepto en el penúltimo dato que se aleja 38.22 mg/dl del valor marcado por el glucómetro

TABLA III  
RESUMEN DE RESULTADOS DEL MODELO DE REGRESIÓN

	RMSEP (mg/dl)	MAPE (%)
Sujeto 1	27.44	18.58
Sujeto 2	17.87	11.58
Sujeto 3	18.08	10.77
Sujeto 4	20.41	13.05
Sujeto 5	27.91	17.27
Sujeto 6	21.14	13.39
Sujeto 7	16.25	9.13
Sujeto 8	21.25	12.89
Sujeto 9	23.56	13.29
Sujeto 10	22.58	13.16

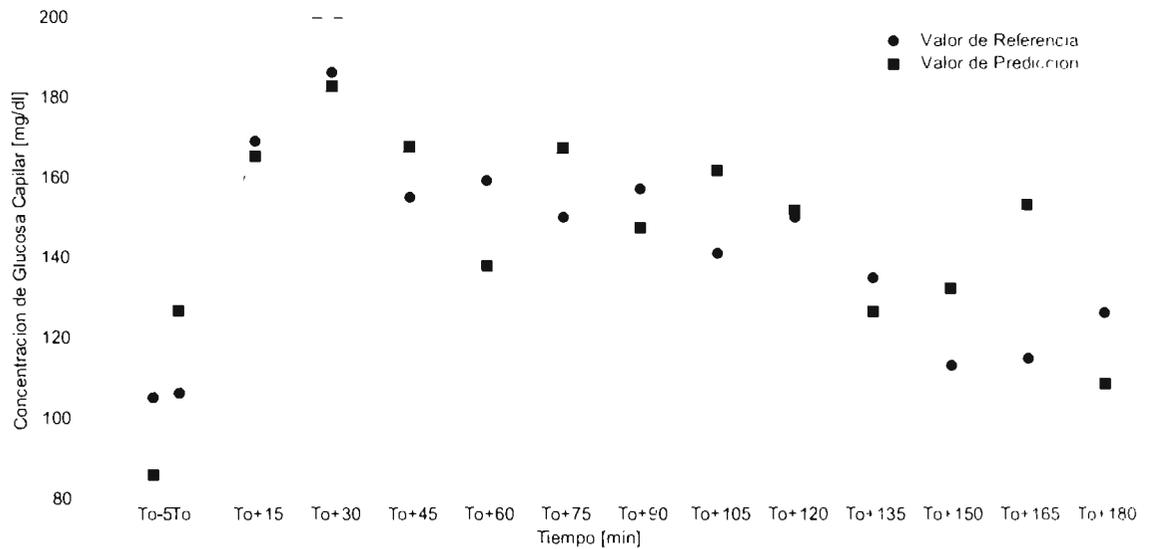


Figura 4.3 Perfiles de glucosa para un sujeto dado.

Los resultados de validación cruzada para la serie de experimentos *in vivo* se resumen en la figura 4.4 que muestra como la mayoría de los datos arrojados por el modelos de predicción se encuentran dentro de la frontera de error de 15%.

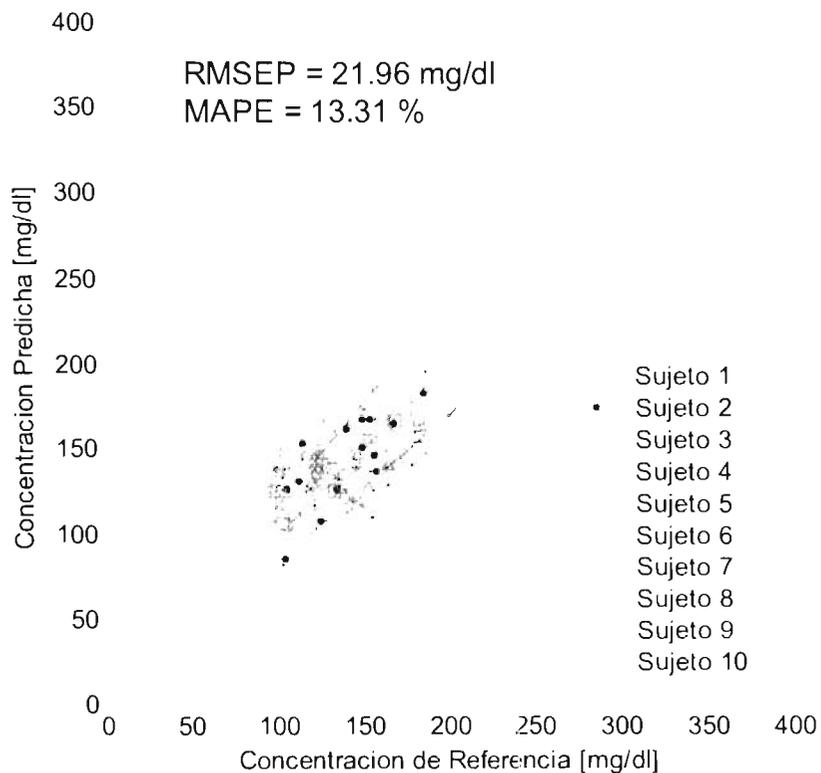
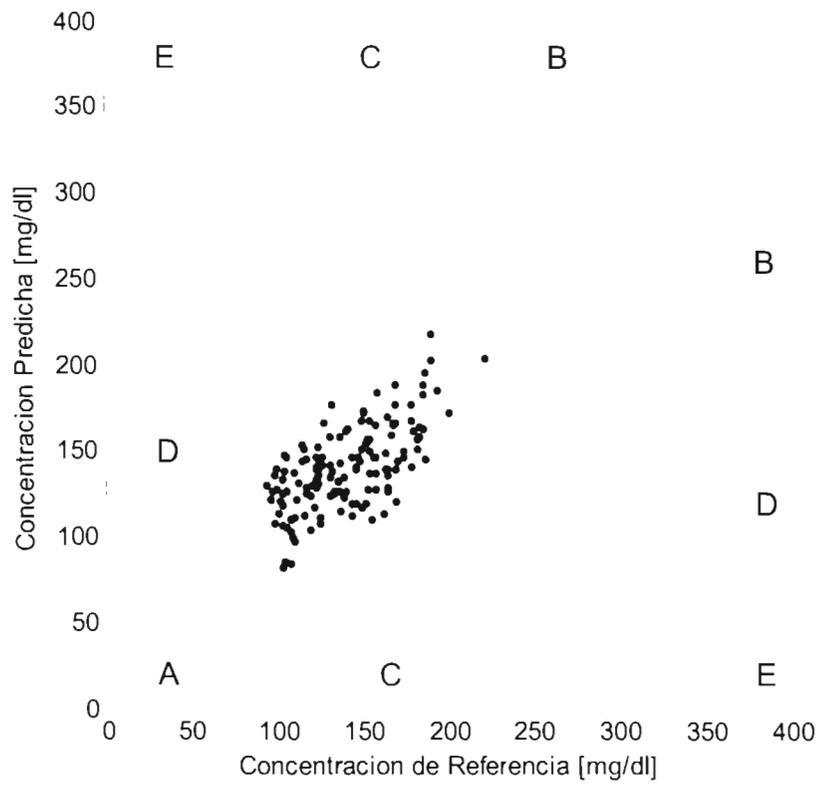


Figura 4.4 Resultados de validación cruzada para todos los sujetos. La línea continua representa la línea teórica de regresión de 45°. Las líneas punteadas representan fronteras de error de 15%.

Con este modelo de predicción creado a partir de una calibración individual se logró un error de predicción (RMSEP = 21.96 mg/dl) el cual es menor al publicado en trabajos previos [9] [12] [16] [21] [42] [45] [46] [47].

Se han empleado métodos estadísticos para describir el desempeño del método no invasivo para medición de glucosa, como el RMSEP y MAPE; pero además de estas descripciones del error de predicción es posible utilizar la rejilla de Clarke [43], [44] para presentar los datos. Esta rejilla es un diagrama cartesiano en el cual los valores generados por el método no invasivo se despliegan en el eje  $y$ , mientras que los valores tomados del método de referencia, es decir el glucómetro se despliegan en el eje  $x$ . La diagonal de 45° con línea punteada representa una perfecta predicción. La rejilla de Clarke se encuentra dividida en cinco zonas A – E. La zona A contiene los valores de glucosa que se alejan de los valores de referencia en  $\leq 20\%$  o los que se encuentran en el rango hipoglucémico ( $< 70$  mg/dl) cuando los valores de referencia también están en el rango hipoglucémico. Los valores dentro del rango de la región A son clínicamente exactos. La zona B se sitúa por encima y por debajo de la zona A; esta región contiene los datos con errores benignos. Los valores que se localizan en las zonas A y B son clínicamente aceptables, en cambio los que se encuentran en las regiones C, D y E son potencialmente peligrosos y existe la posibilidad de cometer fallas significativas clínicamente [44].

Los resultados del experimento se presentan en la figura 4.5. El 77.857% de los valores obtenidos en el experimento *in vivo* se encuentran en la zona A clínicamente exacta y un 22.143% se localiza en la zona B de errores benignos. Ningún valor se encontró en las zonas C, D o E clínicamente inaceptables.



**Figura 4.5** Análisis de error de Clarke para todas las mediciones *in vivo* (n = 140).

## Capítulo 5

### CONCLUSIONES

#### 5.1 Conclusiones

Con la utilización de dos clases diferentes de mediciones espectroscópicas, es decir de impedancia eléctrica y de reflectancia se ha demostrado que es posible construir un modelo de predicción de concentración de glucosa en una solución acuosa consiguiendo además una mejor precisión que al utilizar los datos recolectados de forma independiente.

Al aplicar esta técnica conjunta a una población de individuos sanos y haciendo el modelo de calibración de forma individual se logró un error de predicción (RMSEP = 21.96 mg/dl) menor al publicado en trabajos previos.

Como se obtuvo la totalidad de los resultados de predicción dentro de las regiones A (77.86%) y B (22.14%) de la rejilla de Clarke, se puede concluir que el método es clínicamente válido, aunque se deben hacer mas estudios para determinar durante cuanto tiempo tendría validez la calibración realizada para un mismo sujeto.

Este método conjunto, no invasivo presentó un error porcentual (MAPE = 13.31%) similar al que tienen los glucómetros convencionales, que tienen una desviación de entre 0.14% y 16.9% cuando se comparan con el método de laboratorio [50]; en consecuencia, la técnica conjunta promete ser una opción para monitorear continuamente los niveles de glucosa en pacientes que se encuentren inmovilizados, por ejemplo al encontrarse bajo terapia intensiva.

Esta práctica frecuente de monitoreo de niveles de glucosa se menciona el protocolo de Portland [48] y se recomienda para así tener un control de glucosa estricto [49] y de esta manera evitar riesgos de infección en la cirugía.

Después de una calibración donde se toman las mediciones de referencia de forma invasiva, el método desarrollado se puede aplicar de manera frecuente sin extraer una sola gota de sangre al paciente y por lo tanto sin lastimarlo, reduciendo así también el riesgo de hematomas o infección por las punciones.

## 5.2 Trabajo a futuro

Como este método se validó únicamente con voluntarios sanos, se tendría que aplicar a una población de pacientes diabéticos para determinar su validez, lo que sería posible debido a que la prueba de tolerancia a la glucosa oral que efectuamos para la calibración es un prueba aceptada y segura [51]. A pesar de que la calibración es el mayor inconveniente de la técnica conjunta óptica – eléctrica, las mediciones que usualmente se tienen que hacer los diabéticos (de 4 a 7 al día [5]) pueden servir como referencia para el modelo, para posteriormente emplear el método no invasivo.

Los valores que se tomaron de referencia para la calibración se llevaron a cabo en condiciones relativamente controladas: un periodo de tiempo no mayor a 3 horas, una temperatura y humedad mas o menos estables, el voluntario se abstuvo de moverse al momento de tomar los espectros de impedancia eléctrica y reflectancia NIR, la humectación de la piel no debió de haber cambiado considerablemente, ya que los voluntarios no presentaron sudoración evidente; por consiguiente se tendría que hacer un estudio clínico durante un periodo de tiempo considerablemente largo para determinar si el modelo generado el día de la calibración individual sigue siendo válido días, semanas o meses después.

Otra actividad dentro del trabajo a futuro es efectuar las mediciones bajo diferentes condiciones de temperatura o de humedad, ya que estas condiciones hacen variar las propiedades dieléctricas y ópticas del tejido, lo que modificaría sustancialmente la capacidad de predicción del modelo. Al tomar en cuenta estas variaciones se podría desarrollar un modelo mas robusto que se pueda aplicar en condiciones menos controladas.

## REFERENCIAS

- [1] Coté G.L. and McNichols R.J., Glucose Diagnostics, Ch. 18 in *Biomedical Photonics Handbook*, Vo-Dinh T., Ed., CRC Press, 2003, pp. 18-1-18-17.
- [2] American Diabetes Association "Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus" *Diabetes Care* Vol. 31, Sup. 1, Jan 2008, pp. S55-S60.
- [3] American Diabetes Association Diabetes Information:  
<http://www.diabetes.org/about-diabetes.jsp>
- [4] U.S. Food and Drug Administration Diabetes Information:  
<http://www.fda.gov/diabetes>
- [5] Waynant R.W. and Chenault V. M., "Overview of Non-Invasive Fluid Glucose Measurement Using Optical Techniques to Maintain Glucose Control in Diabetes Mellitus," *IEEE LEOS Newsletter* Vol. 12, No. 2, 1998, pp. 3-6.
- [6] Sistema Nacional de Información en Salud. "Principales causas de mortalidad general," <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/index.html>
- [7] American Diabetes Association, "Economic Costs of Diabetes in the U.S. in 2007," *Diabetes Care* Vol. 31, No. 3, Mar 2008, pp. 596-615.
- [8] Secretaría de Salud, Comunicado de Prensa No. 058,  
[http://www.salud.gob.mx/ssa\\_app/noticias/datos/2003-03-20\\_534.html](http://www.salud.gob.mx/ssa_app/noticias/datos/2003-03-20_534.html)
- [9] Khalil O.S. "Spectroscopic and Clinical Aspects of Noninvasive Glucose Measurements," *Clinical Chemistry*, Vol. 45, No. 2, 1999, pp. 165-177.
- [10] Tura A., Maran A., Pacini G., "Non-invasive glucose monitoring: Assessment of technologies and devices according to quantitative criteria." *Diabetes Research and Clinical Practice* 77, 2007, pp. 16-40.
- [11] Mobley J. and Vo-Dinh T., Optical Properties of Tissue Ch. 2 in *Biomedical Photonics Handbook*, Vo-Dinh T., Ed., CRC Press, 2003, pp. 2-1-2-76.
- [12] Heise H. M., "Technology for Non-Invasive Monitoring of Glucose," *18th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, Amsterdam, 1996

- [13] Klonoff D.C. *et al.* "Mid-Infrared Spectroscopy for Non-Invasive Blood Glucose Monitoring," *IEEE LEOS Newsletter* Vol. 12, No. 2, 1998.
- [14] Klonoff D.C. "Continuous Glucose Monitoring: Roadmap for 21<sup>st</sup> century diabetes therapy," *Diabetes Care* Vol. 28, No. 5, 2005, pp. 1231 – 1239.
- [15] Caduff J. *et al.* "First human experiments with a novel non-invasive, non-optical continuous glucose monitoring system," *Biosensors and Bioelectronics* 19, 2003, pp. 209 – 217.
- [16] Caduff J. *et al.* "Non-invasive glucose monitoring in patients with diabetes: A novel system based on impedance spectroscopy," *Biosensors and Bioelectronics* 22, 2006, pp. 598 – 604.
- [17] Caduff J. *et al.* "Multisensor Concept for non-invasive Physiological Monitoring," *Instrumentation and Measurement Technology Conference IMTC 2007*, Warsaw, Poland. May 1-3, 2007
- [18] Wentholt I.M.E., Hoekstra J.B.L., Zwart A. and DeVries J.H. "Pendra goes Dutch: lessons for the CE mark in Europe," *Diabetologia* 48, 2005, pp. 1055 – 1058.
- [19] Ibrahim M. *et al.* "Analysis of the structure and vibrational spectra of glucose and fructose," *Eclética Química*, Vol. 31, No. 6, 2006, pp 15 – 21.
- [20] Clayden J. *et al.* *Organic Chemistry*. New York: Oxford University Press. 2001
- [21] Blank T.B., Ruchti T.L., Malin S.F. and Monfre S.L., "The use of near-infrared diffuse reflectance for the non-invasive prediction of blood glucose levels," *IEEE LEOS Newsletter* Vol. 13, No. 5, 1999
- [22] Danzer K., Fischbacher Ch., Jagemann K.U. and Retchelt K.J. "Near infrared diffuse reflection spectroscopy for non-invasive blood glucose monitoring," *IEEE LEOS Newsletter* Vol. 12, No. 2, 1998
- [23] Peura R.A. Chemical Biosensors, Ch. 10 in *Medical Instrumentation: Application and Design*, 3rd ed., Webster J.G., Ed., New York: Wiley, 1998, pp. 477–483.
- [24] Ball D.W., *The basics of spectroscopy*. Washington: SPIE Press, 2001, p. 59
- [25] Smith B. C., *Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy*. CRC Press, 1996 pp. 139-156.

- [26] Toshiba CCD (Charge Coupled Device) Linear Image Sensor TCD1304AP specs. Disponible: <http://www.oceanoptics.com/technical/detectortoshibatcd1304ap.pdf>
- [27] Roche Diagnostics ISO 15197. Disponible: [http://www.accu-chek.co.nz/news/advantage\\_iso.pdf](http://www.accu-chek.co.nz/news/advantage_iso.pdf)
- [28] Ellison J.M. *et al.* "Rapid changes in postprandial blood glucose produce concentration differences at finger, forearm and thigh sampling sites," *Diabetes Care* Vol. 25, No. 6, Jun 2008, pp. 961-963.
- [29] Larsson-Cohn U. "Differences between capillary and venous blood glucose during oral glucose tolerance tests," *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. Vol. 36, No. 8, 1976 pp. 805-808.
- [30] Ocean Optics "USB4000 Fiber Optic Spectrometer Installation and Operation Manual," 2006. p. 19.
- [31] Caduff A., "Impedance spectroscopy based glucose monitoring," *On the occasion of the Annual Meeting of the EASD*, Munich, Germany. September 5, 2004.
- [32] Tura A., Sbrignadello S., Barison S., Conti S., Pacini G., "Impedance spectroscopy of solutions at physiological glucose concentrations," *Biophysical Chemistry* 129, 2007, pp. 235-241
- [33] Liu H., Zhang Y., Kimura M., Chance B., "Theoretical and experimental investigations on solute-induced changes in optical properties in living tissues," *OSA TOPS on Biomedical Optical Spectroscopy and Diagnostics*, Vol. 3, 1996 pp. 10 – 12.
- [34] Guevara E. and González F. J., "Prediction of glucose concentrations by impedance phase measurements," in *Tenth Mexican Symposium on Medical Physics*, *AIP Conference Proceedings* 1032, 2008. pp. 259–261.
- [35] Adams M.J., *Chemometrics in Analytical Spectroscopy*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge UK, 2004, pp. 203 – 209.

- [36] Araujo-Andrade C., Campos-Cantón I., Martínez J.R., Ortega-Zarzosa G., y Ruiz F., “Modelo de predicción basado en análisis multivariante para la determinación de concentración de azúcar en una solución,” *Revista Mexicana de Física E* Vol. 51 No. 2, Dic. 2005, pp. 67 – 73.
- [37] Abdi H., “Partial least square regression (PLS regression),” in N.J. Salkind (Ed.): *Encyclopedia of Measurement and Statistics*. Thousand Oaks (CA), Sage, 2007, pp. 740-744.
- [38] U.S. Environmental Protection Agency, “Final model documentation report: modeling study of PCB contamination in the Housatonic river,” 2006, pp. 3.6–7.
- [39] CAMO Software AS, “The Unscrambler® Methods” 1996 – 2006, p. 122.
- [40] De Gooijer, Jan G. and Hyndman, Rob J., “25 Years IIF Time Series Forecasting: A Selective Review,” *Tinbergen Institute Discussion Papers* No. TI 05-068/4, June 2005. Disponible en SSRN: <http://ssrn.com/abstract=748904>
- [41] Zhang H. *et al.* “Study on the noninvasive blood glucose measurement by diffusion reflectance NIR spectroscopy,” in *Proc. SPIE*, Vol. 5630, 2005, pp. 460 – 467.
- [42] Araujo-Andrade C., Ruiz F., Martínez-Mendoza J.R., and Terrones H., “Non-invasive in-vivo blood glucose levels prediction using near infrared spectroscopy,” in *Eighth Mexican Symposium on Medical Physics, AIP Conference Proceedings* 724, 2004. pp. 234–238.
- [43] Kovatchev B.P., Cox D.J., Gonder-Frederick L.A. and Clarke W.L. “Evaluating the Accuracy of Continuous Glucose-Monitoring Sensors,” *Diabetes Care* Vol. 27, No. 8, 2004, pp. 1922 – 1928.
- [44] Maran A. *et al.* “Continuous Subcutaneous Glucose Monitoring in Diabetic Patients,” *Diabetes Care* Vol. 25, No. 2, 2002, pp. 347 – 352.
- [45] Yeh, S., Hanna C.F. and Khalil O.S. “Monitoring blood glucose changes in cutaneous tissue by temperature-modulated localized reflectance measurements,” *Clinical Chemistry* Vol. 49, No. 6, 2003, pp. 924 – 934.
- [46] Hopkins G.W. Mauze G.R. “In-vivo NIR diffuse-reflectance tissue spectroscopy of human subjects,” Technical report HP laboratories Palo Alto, January 1999.

- [47] Malin *et al.* "Noninvasive prediction of glucose by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy," *Clinical Chemistry* Vol 45, No. 9, 1999, pp. 1651 – 1658.
- [48] Portland: Portland Protocol. *Providence Health Systems*. Disponible: <http://www.providence.org/protocoldownload/Default.aspx?download=other>
- [49] Mangram A.J. *et al.* "Guideline For Prevention Of Surgical Site Infection, 1999" *Infection Control And Hospital Epidemiology* Vol. 20, No. 4, April 1999, pp. 247-278
- [50] Solnica B., Naskalski J.W.y Sieradzki J. "Analytical performance of glucometers used for routine glucose self-monitoring of diabetic patients," *Clinica Chimica Acta*, Vol. 331, No. 1-2, May 2003, pp. 29–35.
- [51] American Diabetes Association "The prevention or delay of Type 2 Diabetes," *Diabetes Care* Vol. 25, No. 4, 2002, pp. 742 – 749.