

Estudio de la caracterización de colesterol total presente en suero de sangre por técnicas ópticas.



Universidad de Morelos
Facultad de Ingeniería y Tecnología

Estudio de la caracterización de colesterol total presente en suero de sangre por técnicas ópticas.

Autor:

JUAN ALBERTO GONZÁLEZ SOSA

22 de abril de 2016

Asesores:

JUANA ROSAURA KANTÚN MONTIEL
GILDARDO PABLO LEMUS ALONSO

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
A. Antecedentes.....	1
B. Definición del problema.	1
C. Justificación del problema.	1
D. Objetivos.....	2
E. Hipótesis.....	2
II. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	2
A. Marco teórico.....	2
1) Interferometría.....	4
2) Absorción (Ley Lambert - Beer)	5
3) Índice de refracción	5
4) Coloides.....	6
5) Colesterol.....	6
6) Colesterol total.....	6
7) Colesterol LDL.....	6
8) Colesterol HDL	7
9) Triglicéridos	7
10) Plasma fresco congelado (PFC)	7
B. Estado del arte.....	7
1) Estudios relacionados con la caracterización de suero de sangre, sus componentes, y la sangre misma.	9
III. METODOLOGÍA.....	14
IV. RESULTADOS	15
V. DISCUSIONES	16
VI. CONCLUSIÓN.....	18
VII. AGRADECIMIENTOS.....	18
VIII. REFERENCIAS.....	18

Estudio de la caracterización de colesterol total presente en suero de sangre por técnicas ópticas.

J. A. González-Sosa, J. R. Kantún-Montiel, P. G. Lemus-Alonso.

Facultad de Ingeniería y Tecnología, Universidad de Montemorelos, Montemorelos, Nuevo León, México.

Resumen—Las técnicas convencionales para cuantificar colesterol total en suero de sangre requieren de un proceso meticuloso y tardado, empleando reactivos químicos como fenol y peroxidasa, que hacen dichas técnicas costosas. Para minimizar estas desventajas, algunos estudios han sugerido el uso de técnicas ópticas como la interferometría para caracterizar el colesterol en muestras congeladas y frescas. En un interferómetro controlado podemos suponer que el índice de refracción de una muestra es el factor predominante en la forma de las franjas de un interferograma. En el presente trabajo se analizó el índice de refracción de 70 muestras de suero de sangre con ayuda de un refractómetro, para determinar si existe una relación entre éste y la cantidad de colesterol total. Los resultados obtenidos contradicen los hallazgos de investigaciones anteriores.

Palabras clave - *interferometría, suero de sangre, colesterol total, índice de refracción.*

I. INTRODUCCIÓN

A. Antecedentes

A lo largo del último siglo se han realizado diversos estudios relacionados con la caracterización del suero de sangre y sus componentes químicos. Entre ellos destacamos la caracterización del colesterol total presente.

En estudios recientes se planteó la posibilidad de caracterizar el colesterol en suero de sangre utilizando técnicas interferométricas, teniendo como herramienta principal para la posible caracterización un interferómetro de Mach-Zehnder. Se analizaron muestras de suero de sangre congeladas [1] previamente cuantizadas por la escuela de químicos de la Universidad de Montemorelos y agrupadas como muestras de suero con colesterol bajo, medio y alto. Se prosiguió con el análisis de las muestras bajo la técnica interferométrica escogida para poder encontrar patrones y posibles correlaciones entre la información proporcionada por los interferogramas resultantes y los valores cuantizados dados.

Los resultados interferométricos finales no presentaron concordancia en la agrupación de las muestras con colesterol alto, pero sí se manifestó concordancia en los niveles de colesterol bajo y medio. Concluyeron que esta discrepancia fue causada por el congelamiento de las muestras analizadas, y que para eliminar dicho error era necesario el análisis de muestras frescas. En el 2015 [2] se realizó el mismo estudio con muestras de suero “frescas”. Donde se encontraron resultados similares. Debido a lo anterior concluyeron que las discrepancias podrían deberse a errores de ruido ambiental

como vibraciones mecánicas y errores propios de los dispositivos usados en el arreglo interferométricos.

En la presente investigación bajo un análisis teórico-práctico se pretende verificar la viabilidad del método propuesto y sugerir un proceso adecuado para la caracterización del suero, eliminando errores que no se habían tomado en cuenta.

B. Definición del problema.

Algunas técnicas actualmente utilizadas para la determinación de colesterol total, así mismo como de colesterol HDL y LDL, requieren de una serie de compuestos químicos o reactivos indispensables para el proceso de cuantificación. Entre estos compuestos se destacan el fenol, la aminofenazona y la peroxidasa [3]. Además de requerirse dichos reactivos, estos procesos también hacen uso de diferentes aparatos e instrumentos de laboratorio como tubos de ensayo, micropipetas, y espectrofotómetros o analizadores para lecturas a 500-550 nm. para manipular las sustancias y realizar los cálculos [4]. Como es evidente, los utensilios que se emplean tienen un valor, un costo monetario, y muchos de ellos son degradables al realizarse un determinado proceso de análisis, como es el caso de los reactivos. De acuerdo con la escuela de Químicos de la Universidad de Montemorelos, el análisis del colesterol total presente en una muestra de suero tiene un costo cercano a los \$80 pesos, los cuales al analizar 10 muestras diariamente se convierten en \$400 pesos; con el tiempo, dichos \$400 pesos se convierten en \$4,000 y así sucesivamente mientras más muestras sean analizadas.

La propuesta consiste en el desarrollo de un método alternativo para la caracterización y consecuente cuantificación del colesterol total presente en muestras de suero de sangre mediante técnicas ópticas, las cuales son no destructivas [5] y no requieren reactivos adicionales para poder determinar la cantidad de colesterol en una muestra. La relevancia del proyecto se haría significativa a largo plazo ya que sería así como se evidenciaría un gran ahorro de recursos al utilizar técnicas ópticas frente técnicas convencionales en lo que respecta a la determinación de los niveles de colesterol en muestras de suero de sangre.

C. Justificación del problema.

Estudios experimentales en animales, así como genéticos y epidemiológicos, han mostrado que los valores elevados de

colesterol total y particularmente de las lipoproteínas de baja densidad (c-LDL), constituyen un importante factor de riesgo para el desarrollo de la cardiopatía aterosclerosa (CAE). Las investigaciones epidemiológicas prospectivas consistentemente han detectado una relación directa entre las concentraciones de colesterol sérico y la incidencia de CAE [6]. La ingesta excesiva de colesterol y las mutaciones genéticas en el rLDL promueven el incremento de colesterol sérico por encima de los niveles recomendables, lo que favorece la génesis de la aterosclerosis. Estilos de vida saludables, tratamientos dietéticos y farmacológicos logran reducir las concentraciones de colesterol plasmático, lo que disminuye la probabilidad de sufrir un evento coronario [7].

La relevancia del presente trabajo radica en poder acercarnos al la identificación de un método alternativo más económico y sustentable para la caracterización y futura cuantización del colesterol total en suero de sangre, que pueda otorgar un tiempo de análisis más corto a los tiempos requeridos por las técnicas convencionales actuales y así promover el rápido inicio tanto de los tratamientos dietéticos como farmacológicos destinados al control y nivelación de la cantidad de colesterol total en los pacientes analizados.

D. *Objetivos.*

- Identificar un método alternativo válido para la caracterización del colesterol total presente en muestras de suero de sangre, por medio de revisión bibliográfica.
- Analizar si existe una entre relación los compuestos químicos del suero de sangre con sus propiedades ópticas.

E. *Hipótesis*

Los cambios en la cantidad de lipoproteínas de baja y alta densidad que determinan el colesterol presente en suero de sangre, además de variar sus propiedades químicas, también varían sus propiedades ópticas como son el índice de refracción, índice de absorción óptica, esparcimiento, entre otras. Si estos fenómenos ópticos son medidos y caracterizados es posible encontrar una relación entre ellos y el aumento o disminución del colesterol presente en muestras de suero sin la necesidad de agregar reactivos químicos.

Mediante técnicas ópticas, con el paso del tiempo se ahorrarían recursos monetarios en cantidades considerables al analizar la presencia de colesterol en muestras de suero ya que se eliminaría la constante adquisición de reactivos. El factor importante a tomar en cuenta en favor de la importancia del proyecto es el hecho de poder analizar más muestra en menos tiempo. Este hecho se debe a que no sería necesaria la operación de separación de los diferentes componentes del suero para cuantificar el HDL y LDL por el hecho de tratarse de una técnica no destructiva [8].

II. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.

A. *Marco teórico*

Los lípidos, como por ejemplo el colesterol, se unen a apoproteínas en suero para formar lipoproteínas. Las lipoproteínas se clasifican típicamente en quilomicrones, lipoproteínas de densidad muy baja (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de alta densidad (HDL), etc., según las propiedades químicas. Entre ellas, se sabe que LDL es una sustancia causal que induce a la arteriosclerosis. Diversos estudios epidemiológicos han aclarado que el nivel de colesterol LDL está fuertemente relacionado con la frecuencia del inicio de enfermedades arterioscleróticas. Por lo tanto, la realización de medidas del colesterol LDL a través de un método de rutina sencillo podría ser muy útil clínicamente.

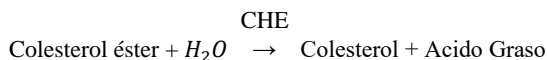
En lo que se refiere a los métodos convencionales para medir el colesterol LDL, se conocen diferentes métodos [8], por ejemplo un método en el que se separa LDL de otras lipoproteínas por ultra centrifugado para medir el colesterol. Otro método consiste en manchar los lípidos tras la separación por electroforesis con el fin de medir la intensidad del color revelado. Sin embargo, la mayoría de estos métodos no se utilizan rutinariamente como consecuencia de las complicadas operaciones y limitaciones que suponen el manejo de los diversos especímenes. Un tercer método sensibiliza un vehículo con un anticuerpo que se une a una lipoproteína distinta a LDL, después se mezcla con una muestra, y se fracciona tomando una parte no unida al vehículo para medir los colesteroles que contiene. Aunque este método es más adecuado para un ensayo de rutina, en comparación con el método anterior, el procedimiento de ensayo implica etapas manuales, lo que hace que la automatización de los procedimientos de ensayo sea difícil. De esta forma, sigue sin contarse con un método adecuado para manejar un amplio número de espécimes.

Al mismo tiempo, en lo que se refiere a un método para determinar cuantitativamente y fraccionadamente lipoproteínas en una muestra sin utilizar medios de separación como ultra centrifugado o electroforesis, se conoce un método según el cual, tras la determinación fraccionada de colesteroles en HDL y otras lipoproteínas (es decir, quilomicron, VLDL y LDL), se emplea la reactividad de enzimas (típicamente colesterol oxidasa y colesterol esterasa) para inducir exclusivamente colesterol HDL a la reacción de enzima [8].

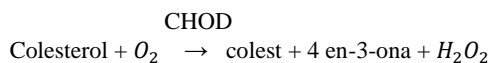
La Escuela de Químico Clínico Biólogo (QCB) de la Universidad de Morelos (UM), para determinar la cantidad de colesterol presente en las muestras de suero de sangre que recibe, utiliza técnicas analítica enzimáticas; el método enzimático colorimétrico.

Los métodos enzimáticos para el análisis de colesterol se desarrollaron en los años 70s, y desde entonces han reemplazado a los métodos químicos casi por completo. En los mé-

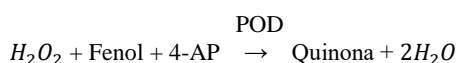
todos enzimáticos se determina el colesterol total directamente en plasma o en suero, en una serie principal de tres reacciones simultaneas [3]:



Un colesterol esterasa o éster (CHE) hidroliza los ésteres de colesterol a colesterol más ácidos grasos libre.



A continuación, un colesterol oxidasa (CHOD) oxida todo el colesterol a colestenona y peróxido de hidrógeno.



El peróxido de hidrógeno es sustrato de una peroxidasa (POD) que junto con 4-aminoantipirina (4-AP) da lugar a la formación de un colorante quinoemia o quinona roja. La quinona formada es proporcional a la concentración de colesterol en la muestra, la cual es determinada con la ayuda de un espectrofotómetro.

Determinación de colesterol total.

Material adicional

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 505 nm.
- Cubetas de 1.0 cm. de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

Para la determinación total del colesterol de una muestra, es útil disponer de tubos de ensayo rotulados como blanco, estándar y muestra. La muestra se refiere al suero a valorar y se colocan tantos tubos muestras como sueros se quieran valorar.

Posteriormente, deben administrarse con la ayuda de una pipeta los componentes indicados en la Tabla 1, añadiendo en último lugar el reactivo de trabajo de colesterol. La Escuela de QCB de la UM utiliza un reactivo de la empresa SPINREACT incluido en su método para determinar colesterol CHOD-POD Líquido, el cual contiene [9]:

PIPES pH 6.9	90 mmol/L
Fenol	26 mmol/L
Colesterol esterasa (CHE)	1000 U/L
Colesterol oxidasa (CHOD)	300 U/L
Peroxidasa (POD)	650 U/L
4-Aminofenazona (4-AF)	0,4 mmol/L

Tabla 1. Componentes necesarios y cantidades para determinar colesterol total.

	Blanco	Estándar	Muestra
Estándar de colesterol (patrón)	-	10 μ l.	-
Suero (muestra)	-	-	10 μ l.
Reactivo de trabajo	1 ml.	1 ml.	1 ml.

A continuación, se realizan los pasos siguientes [9]:

- Mezclar e incubar 5 min a 37 °C (ó 10 min a temperatura ambiente entre 15 y 25 °C.).
- Leer la absorbancia (A) del patrón y la muestra frente al blanco de reactivo a 505 nm. con la ayuda del espectrofotómetro. El color es estable como mínimo 60 minutos.
- Calcular la concentración de colesterol total de cada una de las muestras de suero del siguiente modo:

$$\text{mg/dl} = \frac{\text{Absorbancia} - \text{Muestra}}{\text{Absorbancia} - \text{Estándar}} * \text{Conc. estandar}, \quad (1)$$

donde:

- Absorbancia - Muestra = Nivel de absorbancia de la muestra de suero a 505 nm.
- Absorbancia - Estándar = Absorbancia estándar a 505 nm.
- Conc. Estandar = Valor del estándar, usualmente 200 mg/dl.

El método enzimático colorimétrico SPINREACT para cuantificar colesterol en suero de sangre posee un control de calidad que plantea la conveniencia de analizar junto con las muestras sueros de control valorados: SPINTROL H Normal y Patológico. Enfatiza que si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, se debe revisar los instrumentos, los reactivos y la calibración.

Alguna de las características más sobresalientes del método enzimático SPINREACT es que presenta un rango de medida que va desde el límite de detección 0,113 mg/dL hasta el límite de linealidad 750 mg/dL. Además, cuenta con una sensibilidad analítica de 1mg/dL.

El presente trabajo tiene como objetivo principal la identificación de un método adecuado para relacionar las propiedades químicas del suero de sangre con sus propiedades ópticas de modo que la caracterización y cuantificación del colesterol total presente sea más rápida y sencilla. Entre las principales propiedades ópticas se encuentran la absorción, el índice de refracción y la dispersión, entre otras. Algunas de las técnicas utilizadas para medir estos fenómenos ópticos son:

1) Interferometría

Las técnicas ópticas no destructivas y sus aplicaciones industriales han jugado un papel muy importante en los últimos años. Con ellas pueden llevarse a cabo mediciones sin estar en contacto con los objetos a medir y permiten hacer la medición en campo completo en un tiempo muy cercano al tiempo real [10]. Entre las técnicas ópticas no destructivas más importantes encontramos la interferometría [11].

El principio fundamental de la interferometría consiste en la interacción o interferencia entre dos ondas luminosas [12], una onda conocida y la otra con la información que se desea medir. Cuando la cresta de una onda coincide con el valle de la otra, la interferencia es destructiva y las ondas se ven anuladas mutuamente. El campo óptico resultante de la suma de las ondas luminosas se representa matemáticamente como:

$$E = E_r + E_t, \quad (2)$$

donde E_r es equivalente al campo de referencia y E_t representa el campo de prueba. El patrón de interferencia resultante se identifica como $I = a + b\cos\phi$, donde a representa la luz de fondo, b corresponde a la luz de modulación y ϕ es la relación entre las fases de los haces que interfieren. El patrón de franjas adquirido depende del índice de refracción, la diferencia de camino óptico recorrido por los haces y la diferencia de amplitudes (absorción). La información relevante del objeto de prueba está codificada en la función de fase ϕ . Para descifrar dicha fase, una de las técnicas más utilizadas es la Interferometría de Corrimiento de Fase (PSI). El concepto de PSI está relacionado con un cambio de fase que varía en el tiempo al ser introducido entre los frentes de onda. Una señal que varía en el tiempo es entonces producida en cada punto de medición en el interferograma, y la fase relativa entre los dos frentes de onda en esa ubicación está codificada en esas señales [13].

Una superficie con errores de altura $h(x, y)$ probada en reflexión producirá un error de frente de onda $\phi(x, y)$:

$$\phi(x, y) = \frac{4\pi h(x, y)}{\lambda}, \quad (3a)$$

y para la refracción

$$\phi(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda} \int n(x, y, z) dz \quad (3b)$$

donde x, y y z son las coordenadas espaciales y λ es la longitud de onda.

Las expresiones generales para los frentes de onda de prueba y de referencia en el interferómetro son:

$$w_r(x, y, t) = a_r(x, y)e^{i[\phi_r(x, y) - \delta(t)]}, \quad (4)$$

y

$$w_t(x, y) = a_t(x, y)e^{i[\phi(x, y)]}, \quad (5)$$

donde $a_r(x, y)$ y $a_t(x, y)$ son las amplitudes, $\phi_r(x, y)$ y $\phi_t(x, y)$ son las respectivas fases de los haces que se suman, y $\delta(t)$ es un cambio de fase que varía en el tiempo introducido dentro del haz de referencia, el cual puede resultar físicamente de cambios ya sea en el haz de referencia o en el haz de prueba [13]. El patrón de intensidad resultante es

$$I(x, y, t) = |w_r(x, y, t) + w_t(x, y)|^2, \quad (6)$$

o bien,

$$I(x, y, t) = I'(x, y) + I''(x, y) \cos[\phi_t(x, y) - \phi_r(x, y) + \delta(t)], \quad (7)$$

donde $I'(x, y) = a_r^2(x, y) + a_t^2(x, y)$ es la intensidad promedio, y $I''(x, y) = 2a_r(x, y)a_t(x, y)$ es la modulación de intensidad. Si se define $\phi(x, y)$ para ser la diferencia de fase del frente de onda $\phi_t(x, y) - \phi_r(x, y)$, se obtiene

$$I(x, y, t) = I'(x, y) + I''(x, y) \cos[\phi(x, y) + \delta(t)], \quad (8)$$

la cual es la ecuación fundamental de la Interferometría de Corrimiento de Fase (PSI, en sus siglas en inglés). La intensidad en cada punto varía como una función sinusoidal del cambio de fase introducido $\delta(t)$ con un desfase temporal dado por la fase de frente de onda desconocida.

a) Interferómetro de Michelson

Entre los muchos interferómetros existentes, destacamos el interferómetro de Michelson por su mínima cantidad de componentes necesarios, su fácil implementación y sencilla calibración. El interferómetro de Michelson consiste, de forma básica, en una fuente láser divergente, la cual, al encontrarse con un divisor de haz, es separada en dos frentes de onda idénticos, propagándose en direcciones perpendiculares. Estos haces se reflejan en sendos espejos planos, volviéndose a recombinar al atravesar de nuevo un divisor de haz. Si los espejos estuviesen situados a la misma distancia del divisor de haz, entonces, despreciando las diferencias debidas al espesor del espejo, los haces se recombinarían en fase, y no se obtendría ningún patrón de interferencia [14].

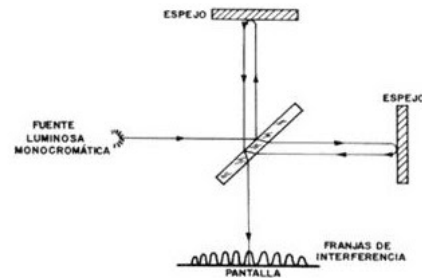


Figura 1. Esquema de interferómetro de Michelson.

En general, un interferómetro puede ser utilizado de dos formas: introduciendo cambios específicos en el camino del

haz, lo que permite obtener información acerca de la fuente de luz que es utilizada, y por otra parte, si las características de la fuente de luz son conocidas con precisión, se pueden producir cambios en el recorrido del haz y estudiar sus efectos en el patrón de interferencia. En el interferómetro de Michelson, las características del patrón de interferencias dependen de la relación de fase entre los dos haces que interfieren. Hay dos formas de cambiar la relación de fase: a) modificar la distancia que viaja uno de los haces y b) cambiar el medio a través del cual pasa uno de los haces. Cualquiera de los dos métodos modifica el patrón de interferencia [15]. La última forma de cambiar la relación de fase toma lugar cuando una muestra sustancial necesariamente translúcida es puesta en uno de los caminos ópticos generados al dividir el haz incidente inicial debido a que modificamos el medio de propagación.

El interferómetro Michelson es históricamente importante, cuyo diseño proporciona una configuración muy simple de la interferometría empleando principios básicos. Se pueden realizar mediciones de longitud de onda de la luz, índice de refracción del aire y otras sustancias [16].

2) Absorción (Ley Lambert - Beer)

La Ley Lambert-Beer es un medio matemático para expresar cómo la materia absorbe la luz. Esta ley afirma que la cantidad de luz que atraviesa una muestra es disminuida por tres fenómenos físicos [17], los cuales son:

- La cantidad de material de absorción en su trayectoria (concentración molar del absorbente).
- La distancia que la luz debe pasar a través de la muestra (distancia de la trayectoria óptica).
- La probabilidad de que el fotón de esa amplitud particular de onda sea absorbido por el material (absorbencia o coeficiente molar de extinción).

A medida que un haz de luz atraviesa un medio absorbente, la cantidad de luz absorbida en cualquier volumen es proporcional a la intensidad de luz incidente multiplicado por el coeficiente de absorción. Consecuentemente, la intensidad de un haz incidente decae exponencialmente a medida que pasa a través del absorbente.

Esta relación cuando se expresa como Ley de Lambert es:

$$T = 10 - \epsilon cd, \text{ o bien, } T = 10 - A; T = \frac{I_1}{I_0}, \quad (9)$$

donde

T = Transmitancia.

ϵ = Coeficiente molar de extinción.

c = Concentración molar del absorbente.

d = Distancia de la trayectoria óptica en cm.

En un enfoque simplificado, la transmitancia puede ser expresada como la intensidad de la radiación incidente, I_0 ,

que divide a la luz emergente de la muestra, I_1 . La Figura 2 presenta de manera más comprensible el fenómeno de absorción óptica, así mismo como la identificación de I_0 y I_1 .

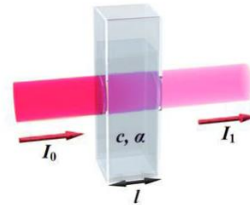


Figura 2. Fenómeno de absorción óptica.

De esta manera, la absorción es medida como:

$$A = -\log_{10} \left(\frac{I_1}{I_0} \right) \quad \text{o} \quad A = -\log_{10} (T) \quad (10)$$

3) Índice de refracción

El índice de refracción es un parámetro muy útil de los medios homogéneos, este está estrechamente vinculado a las fuerzas intermoleculares a través de su dependencia con la densidad. Es ampliamente utilizado en la determinación de la concentración de numerosas soluciones (por ejemplo: sacarosa y cloruro de sodio), además es un medio sencillo y barato de caracterización de compuestos simples en colaboración con otras técnicas [18].

El fenómeno de refracción consiste en la desviación de trayectoria que sufre un haz de radiación monocromática al pasar desde el vacío a otro medio material de distinta densidad (Figura 3). A nivel molecular este fenómeno se debe a la interacción entre el campo eléctrico de la radiación y los electrones de las moléculas, originándose temporalmente momentos dipolares inducidos [19].

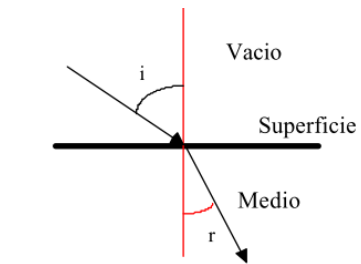


Figura 3. Fenómeno de refracción.

Se cumple la siguiente relación, conocida como ley de Snell, que define el llamado índice de refracción "n":

$$n = \frac{\text{sen } i}{\text{sen } r}, \quad (11)$$

donde i y r son los ángulos de incidencia y refracción que forma el haz con la normal a la superficie de separación.

A su vez, la interacción entre la radiación y el medio ocasiona una reducción en la velocidad de la luz mientras ésta

camina a través del medio. Este fenómeno está relacionado con el índice de refracción por:

$$n = \frac{c}{v}, \quad (12)$$

donde c y v son las velocidades de propagación de la radiación en el vacío y en el medio.

El índice de refracción de un medio depende de la temperatura y de la longitud de onda de la radiación, por lo que al referirse a un índice de refracción han de especificarse los valores de estas magnitudes.

4) Coloides

El reconocimiento de los coloides comienza con la diferenciación de las soluciones acuosas en cristaloides o verdaderas y coloidales [20].

El coloide es un sistema formado por dos o más fases, principalmente: una continua, normalmente fluida, y otra dispersa en forma de partículas; por lo general sólidas. La fase dispersa es la que se halla en menor proporción. Normalmente la fase continua es un líquido, pero pueden encontrarse coloides cuyos componentes se encuentran en otros estados de agregación. Los coloides se clasifican según la magnitud de la atracción entre la fase dispersa y la fase continua o dispersante. Si esta última es líquida, los sistemas coloidales se catalogan como «soles» y se subdividen en liófilos (poca atracción entre la fase dispersa y el medio dispersante) y «liófilos» (gran atracción entre la fase dispersa y el medio dispersante). Si el medio dispersante es agua se denominan «hidrófobos» (repulsión al agua) e «hidrófilos» (atracción al agua) [21].

Características de los coloides:

- Tamaño de partícula de 50-1000 nm.
- Las partículas no se ven al microscopio pero presentan “efecto Tyndall”.
- No pasan las membranas semipermeables.
- Las partículas tienen una carga eléctrica, el potencial de superficie, que contribuye a su estabilidad.
- Solución cristaloides “verdadera”: transparente y sin dispersión de la luz.
- Solución o dispersión coloidal: efecto Tyndall y/o dispersión de la luz opalescencia.

Nombre	Fase dispersa	Fase dispersora	Ejemplo
Sol	Sólido	Líquido	Proteínas en agua, leche descremada
Espuma	Gas	Líquido	Crema batidas
Espuma sólida	Gas	Sólido	Helados, pan
Emulsión	Líquido	Líquido	Mayonesa, leche
Gel	Líquido	Sólido	Gelatinas
Aerosol (humo)	Líquido	Gas	Humo para productos cárnicos
Sol sólido	Sólido	Sólido	Poco importantes

5) Colesterol

Es una sustancia adiposa (lípidos) producida por el hígado y se encuentra en todas las partes del organismo. Si bien, hay que advertir que su presencia es necesaria ya que el organismo utiliza el colesterol para producir hormonas, vitamina D y los ácidos biliares que ayudan a digerir la grasa. Pero basta con cantidades mínimas de colesterol en la sangre para satisfacer estas necesidades y el hígado produce todo el colesterol que el cuerpo necesita.

Los niveles de colesterol elevados en la sangre pueden aumentar el riesgo de enfermedades cardíacas. Los niveles de colesterol tienden a aumentar con la edad. El aumento de colesterol no suele tener signos ni síntomas, pero puede detectarse con un análisis de sangre [23].

6) Colesterol total

Se entiende como el nivel total de colesterol en la sangre. Un nivel superior a los 200 mg/dl se considera alto. El colesterol alto en la sangre indica un riesgo mayor de sufrir ataque al corazón y ataque cerebral [24].

a) Niveles totales de colesterol en la sangre:

- Menos de 200 mg/dL = Deseable (menor riesgo).
- 200 a 239 mg/dL = Límite elevado (mayor riesgo).
- 240 mg/dL y superior = Colesterol en la sangre elevado.
- Más del doble de riesgo que el nivel deseable.

7) Colesterol LDL

Las lipoproteínas de baja densidad, también se denomina colesterol “malo” debido a la relación comprobada entre los niveles altos de LDL y la enfermedad cardíaca. La meta principal de cualquier programa de tratamiento para el coles-

Tabla 2. Fase dispersora y fase dispersa de los coloides [22].

terol es reducir el colesterol LDL. La cantidad de LDL que debe reducirse depende de sus otros factores de riesgo de enfermedad cardíaca [25].

Por ejemplo, un nivel de LDL de 130 mg/dL es aceptable en una persona sana que no tiene factores de riesgo de enfermedad cardíaca. Sin embargo, si usted ya tiene una enfermedad cardíaca u otros factores de riesgo significativos como diabetes o enfermedad renal crónica, debe reducirse su nivel de LDL en la mayor medida posible. Los pacientes pertenecientes a este grupo de alto riesgo deben tener un nivel de LDL igual o inferior a 70 mg/dl.

a) *Niveles de colesterol LDL:*

- Menos de 70 mg/dL = Objetivo opcional si tiene un riesgo muy alto de ataque al corazón o muerte por ataque al corazón.
- Menos de 100 mg/dL = Óptimo para personas con enfermedades del corazón o diabetes.
- 100 a 129 mg/dL = Cerca o por encima del nivel óptimo.
- 130 a 159 mg/dL = Límite elevado.
- 60 a 189 mg/dL = Elevado.
- 190 mg/dL y superior = Muy elevado.

8) Colesterol HDL

Denominado como lipoproteínas de alta densidad, también se denomina colesterol “bueno”. Se ha demostrado que niveles más altos de colesterol HDL reducen el riesgo de enfermedad cardíaca. El HDL ayuda a eliminar parte del colesterol del torrente sanguíneo y lo lleva de regreso hacia el hígado. Los niveles objetivos de HDL son superiores a 40 mg/dl en el caso de los hombres y superiores a 50 mg/dl en el caso de las mujeres. En el caso de pacientes con enfermedad cardíaca, el nivel de colesterol HDL debe ser el más alto posible [25].

a) *Niveles de colesterol HDL:*

- Menos de 40 mg/dL en hombres = HDL bajo (mayor riesgo).
- Menos de 50 mg/dL en mujeres = HDL bajo (mayor riesgo).
- 40 a 59 mg/dL = Cuanto más elevado, mejor.
- 60 mg/dL y superior = HDL elevado (menor riesgo).

9) Triglicéridos

Son grasas transportadas en la sangre de las comidas que comemos. El exceso de calorías, el alcohol o el azúcar en la sangre en el cuerpo son convertidos en triglicéridos y guardados en células grasas a través del cuerpo [26].

b) *Niveles de triglicéridos:*

- Menos de 150 mg/dL = Normal
- 150 a 199 mg/dL = Límite elevado
- 200 a 499 mg/dL = Elevado
- 500 mg/dL y superior = Muy elevado

Tanto los triglicéridos como el colesterol son sustancias grasas conocidas como lípidos. Los triglicéridos son grasas, el colesterol no lo es. El colesterol es una sustancia cerosa y sin olor hecha por el hígado. Es una parte esencial de las partes celulares y los nervios. El colesterol también juega un rol importante en las funciones del cuerpo tales como la digestión y la producción hormonal. Además de ser producido por el cuerpo, el colesterol proviene de los alimentos animales que nosotros comemos.

Los triglicéridos son las reservas del cuerpo en forma de grasa, guardados para su uso como energía. Los triglicéridos vienen de los alimentos que comemos y también son producidos por el cuerpo.

Por sí mismo, el colesterol no se puede mezclar o disolver en la sangre. Por lo tanto, el hígado empaqueta el colesterol con los triglicéridos y las proteínas en transportadores llamados lipoproteínas para transportarlos a otros lugares a través del cuerpo.

10) Plasma fresco congelado (PFC)

El plasma extraído de la sangre total, es congelado y guardado; para llevar a cabo este proceso es necesario tomar en cuenta algunas normas de seguridad, tales se pueden observar en manuales de hemoterapia.

El plasma debe ser congelado a -20°C ; con un volumen de 200 a 250cc aprox. y una duración máxima de 6 meses, podría durar hasta 1 año si se conserva a una temperatura inferior a -30°C [4]. Este hemocomponente contiene agua, carbohidratos, grasa, minerales, proteínas y, dentro de las últimas, todos los factores de coagulación (lábil y estables), si es obtenido dentro de las 6 horas de la extracción. Se recomienda procesar las muestras dentro de las 48 a 72 horas después de la adquisición [27].

B. *Estado del arte.*

Se han realizado hasta nuestros días diversas exploraciones basadas en conocimientos ópticos para la caracterización de elementos cuya diferenciación es importante y se encuentran presentes en procedimientos industriales, en institucio-

nes de investigación médica, y en otros ámbitos científicos. Se muestran a continuación algunas investigaciones desarrolladas para estimar la viabilidad de caracterización de partículas poliméricas y membranas termoneumáticas por técnicas ópticas, y como con el uso de dichas técnicas también pueden conocerse las propiedades de determinados minerales dentro de la industria petrolera.

En 1993, en la Universidad Nacional de la Plata, Yebrin realizó un trabajo para determinar el tamaño de partículas poliméricas por medio de distintas técnicas ópticas. Entre estas técnicas se encontraron los métodos de distribución angular y los métodos de atenuación o extinción. Las dos variaciones de los métodos de atenuación o extinción utilizadas fueron identificadas como importantes en la caracterización, pero los métodos de distribución angular fueron los más precisos.

La primera variante de los métodos de atenuación o extinción, denominada de transmitancia espectral (TE), ajusta mediciones en el rango de longitudes de onda normal de un espectrofotómetro ultravioleta-visible (200-900 nm.); la otra, más simple, está basada en la comparación de la atenuación medida a varias concentraciones N para una sola longitud de onda, siendo N el número de partículas por unidad de volumen [28].

El método de distribución angular, el cual emplea un nefelómetro polar para medir la distribución angular de la luz dispersada, en conjunto con una celda portamuestras y un detector montado sobre un brazo móvil que incluye ciertos elementos ópticos que permiten recoger la luz dispersada en una pequeña zona de la muestra, fue catalogado como el más preciso para la determinación del tamaño de las partículas poliméricas ya que es poco sensible a variaciones del índice de refracción complejo, y sí lo es, en cambio, a variaciones del radio de la forma de las partículas.

Por otro lado, Mercedes Pérez (2012), integrante del Instituto Geociencias de Madrid, expone que las técnicas de caracterización óptica que destacan en la industria petrolera, son: la Microscopía Óptica de Polarización (MOP) y la Difracción de Rayos X (DRX).

Con la técnica de microscopía óptica de polarización, las propiedades ópticas de los minerales se estudian con luz polarizada, esto es, luz que vibra en una única dirección. Para ello, se emplean materiales que actúan como filtros, dejando pasar sólo una dirección de vibración. Los microscopios petrográficos tienen dos de estos filtros, el polarizador y analizador, refiriéndose a ambos como nícoles. Según su colocación, los minerales se observarán con los nícoles paralelos o cruzados, a 90° [29].

Los minerales que cristalizan en el sistema cúbico son isotropos a la velocidad de la luz. El rayo de luz no se desdobra en su interior y, al cruzar los nícoles, la dirección de vibración atravesada por el polarizador es totalmente anulada por el analizador y el campo de visión queda completamente oscuro.

Los minerales opacos se observan de igual modo con los nícoles paralelos y cruzados, siendo necesarias técnicas petrográficas de luz reflejada para su identificación [29].

Los métodos difractométricos se basan en la difracción de radiaciones que produce la materia cristalina. Entre estos métodos (de rayos X, de electrones, de neutrones..., según la longitud de onda de la radiación aplicada) la DRX supone el más versátil y utilizado. Los rayos X corresponden a la parte del espectro electromagnético comprendida entre la radiación ultravioleta y los rayos gamma. Se trata de una radiación capaz de atravesar cuerpos opacos a la luz, de ahí su utilidad. Los cristalógrafos Laue y Ewald descubrieron que los cristales pueden ser utilizados como rendijas de difracción de la radiación X, al presentar el espaciado reticular entre sus planos magnitudes del mismo orden que la longitud de onda de la radiación X. Por este motivo, los rayos X pueden experimentar fenómenos de difracción al interaccionar con la materia cristalina.

Cada especie cristalina contiene un conjunto de planos reticulares característicos que permiten su identificación. Un difractograma es un listado de los espaciados de estos planos, representados mediante una serie de picos. Cada ángulo de difracción queda representado en un pico y el conjunto de estos picos se denomina difractograma de rayos X. Cada mineral tiene su serie de picos característicos y su identificación es posible atendiendo a sus tres picos de mayor intensidad.

Entre algunas otras técnicas ópticas utilizadas en la actualidad para caracterizar diferentes objetos o sustancias se encuentra la interferometría. En un estudio realizado en España en 2007, Duarte et al. utilizaron la interferometría para la caracterización y medición de la distribución de desplazamiento de membranas termoneumáticas, utilizando un interferómetro de Michelson. Como resultados del estudio se obtuvo que con la ayuda de un interferómetro de Michelson es posible realizar una caracterización precisa del comportamiento dinámico de una membrana. Así mismo, se concluyó que el método interferométrico planteado es fácilmente adaptable a la caracterización de dispositivos, con dimensiones reducidas, que presenten como principio de funcionamiento la variación de su geometría [30].

Como es evidente, se ha logrado la caracterización de diferentes elementos por medio de técnicas ópticas pero ninguno de los experimentos antes mencionados se enfoca en el estudio de sustancias presentes en biofluidos como el suero de sangre y la sangre misma. Ahora, nos enfocaremos en estudios relacionados con la caracterización de estos biofluidos cuyas metas fueron el determinar la cantidad presente de sus diferentes compuestos y hacer diferencia entre ellos. El objetivo de esta sección es para explorar las diversas técnicas ópticas ya utilizadas en sangre y sus derivados cuyos resultados y potencial para la caracterización han sido comprobados y analizados, a fin de observar su viabilidad para la caracterización del colesterol presente en muestras de suero.

- 1) Estudios relacionados con la caracterización de suero de sangre, sus componentes, y la sangre misma.

Método y sistema para el diagnóstico de cáncer por medio de espectroscopía de suero de sangre.

Este estudio, realizado por el departamento de biología de la Universidad de Liaoning, China, presenta el desarrollo de un instrumento práctico para la caracterización de suero de sangre por Fluorescencia de Láser Inducido (LIF) y el espectro Raman, para el diagnóstico de cáncer. De acuerdo con el propósito del instrumento, se eligió el plan tradicional de doble espectrómetro equipado con un fotomultiplicador (PMT). Se utilizó un láser de iones de argón como la fuente de excitación de la luz. Después de ser modulado por un divisor, el haz es reflejado hacia la muestra. En la dirección vertical del haz, la fluorescencia y el espectro Raman son enfocados por un lente dentro del doble espectrómetro. Una vez siendo amplificado por un amplificador lock-in, los datos espectrales son ingresados a una computadora y transmitidos, posteriormente, de acuerdo con el espectro en la pantalla, los resultados del diagnóstico pueden ser obtenidos [31]. El instrumento de diagnóstico de cáncer basado en un sistema de auto-fluorescencia de suero de sangre con láser inducido y espectroscopía Raman es considerado en tres partes, o en otras palabras, es compuesto por tres sistemas: sistema de fuente óptica, sistema de detección y sistema de control.

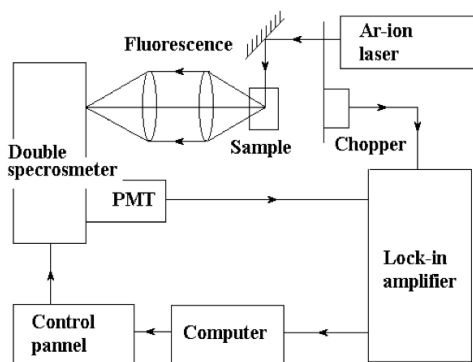


Figura 4. Instrumento utilizado para la caracterización de suero mediante LIF y espectroscopía Raman.

Variaciones en los picos de fluorescencia y decrementos de intensidad de ésta fueron observados después de que las muestras recibieron radiación por láser. Las propiedades de la biología molecular y la bioquímica que permiten los cambios espectrales característicos entre las muestras normales y cancerígenas dieron paso a una caracterización con un alto grado de precisión.

Fueron investigadas cuatrocientas cincuenta y nueve muestras usando el método espectroscópico propuesto y el método clínico para una comparación posterior. De las 159 muestras que fueron diagnosticadas como malignas (presencia de cáncer) por patología, 130 casos (81.76%) de éstos fueron así mismo detectados por medios del método espectroscópico. 48 casos benignos de 52 (92.31%) fueron diagnosticados

mediante la técnica óptica en relación con el diagnóstico clínico.

Luego de que el diagnóstico de cáncer inducido por un láser resultó un éxito, dicha técnica ha sido llevada a cabo satisfactoriamente en el diagnóstico de algunos cánceres, tales como cáncer de estómago, de hígado, entre otros; la precisión de la técnica desarrollada es cerca del 85%. Esto desarrolla una nueva tecnología en el campo de diagnóstico de cáncer [31].

Detección de cáncer colorectal por medio de espectroscopía Raman de superficie mejorada basada en nanopartículas de oro, aplicada en suero de sangre y bajo un análisis estadístico.

Duo et al. (2011), profesores de la Universidad Normal de Fujian, presentaron la viabilidad de un método alternativo para la detección de cáncer colorectal por medio del análisis del suero de sangre a través de la Espectroscopía de Raman de Superficie Mejorada (SERS, por sus siglas en inglés) añadiéndole una solución de nanopartículas de oro a las muestras [32]. Soluciones nanocoloidales de oro estable fueron preparadas usando el proceso desarrollado por Grabar et al. En pocas palabras, 500 ml. de 1 mmol HAuCl₄ fue llevado a su punto de ebullición con un movimiento vigoroso. Rápidamente, se le agregó a la solución en ebullición 50 ml. de 38.8 mmol de citrato de sodio, cambiando así su color. El proceso de ebullición continuó por 10 minutos; se retiró la mezcla de la fuente de calor manteniendo el movimiento que duró por 15 minutos más. La sustancia resultante de partículas coloidales es caracterizada por una absorción máxima en 527 nm.

Las muestras experimentales de suero fueron obtenidas de 45 voluntarios saludables tomados como el grupo de control y de 38 pacientes con diagnósticos histopatológicos y clínicos confirmados como positivos. Todos los pacientes fueron tomados del Hospital de Tumores de Fuzhou y éstos tenían trasfondos similares tanto étnicos como socioeconómicos.

Después de 12 horas de ayuno durante la noche, una muestra única de sangre periférica fue obtenida de los sujetos bajo estudio entre 7:00 - 8:00 a. m. con el uso de un coagulante. Antes de la medición SERS, 30 µl de suero de sangre fueron mezclados con 30 µl de nanopartículas coloidales de oro. Ambas sustancias fueron diluidas mutuamente con la ayuda de la punta de una pipeta para crear una mezcla tan homogénea como fuese posible. La sustancia resultante fue incubada durante 2 horas a una temperatura de 4 °C antes de la medición. Entonces, una gota de la mezcla fue transferida sobre un plato de aluminio rectangular para el análisis SERS.

Un micro-espectrómetro Raman confocal (Renishaw, Gran Bretaña) y una excitación de láser de diodo de 785 nm. fueron usados para la medición del espectro SERS en el rango de 300-1800 cm⁻¹. Los espectros SERS fueron adquiridos con un tiempo de integración de 10 s. en geometría de retro-

dispersión usando un microscopio equipado con un objetivo Leica 20x con una resolución espectral de 2 cm^{-1} . La detección de las señales Raman fue realizada con una cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD) refrigerado Peltier. El volumen iluminado por el láser fue cercano a $3 \times 10^3 \mu\text{l.}$, y el número de partículas medidas fue aproximado a 7.5×10^7 . El paquete de software WIRE 2.0 (Renishaw) fue empleado para la adquisición y el análisis espectral. La calibración de frecuencia fue asignada por referencia a la banda vibracional 520 cm^{-1} de una oblea de silicio.

Para estudiar los efectos del mejoramiento del coloide de oro sobre la dispersión Raman del suero humano, se obtuvieron y grabaron espectros Raman y espectros SERS de muestras de suero del grupo de voluntarios saludables y del grupo de voluntarios con cáncer colorectal. Los espectros SERS de suero con solución de oro añadida, el espectro Raman de suero regular sin solución de oro y la señal Raman de fondo del coagulante con solución de oro añadida fueron medidos bajo la misma configuración de instrumentación con un poder de láser de 5 mW y un tiempo de adquisición de datos espectrales de 10 s. La intensidad de las muchas bandas de vibración dominantes incrementan dramáticamente, indicando que hay una fuerte interacción entre los coloides de oro y el suero. Debido a esta interacción, sustancias bioquímicas del suero son estrechamente ligadas a superficies de coloides de oro nanotexturizadas, dirigiendo así a un extraordinario mejoramiento en la intensidad de la dispersión Raman.

Después de obtener los espectros SERS (con solución de oro añadida) para los pacientes voluntarios con cáncer colorectal y para los voluntarios catalogados como saludables, se llega a la conclusión que las intensidades pico SERS a 725 y 638 cm^{-1} aparecen obviamente diferentes entre el suero de cáncer y suero normal, lo cual ha sido considerado como un importante diagnóstico diferencial de enfermedades. En este estudio, un algoritmo de diagnóstico empírico basado en el radio de intensidad pico SERS en 725 cm^{-1} para adenina a la intensidad pico en 638 cm^{-1} para tirosina fue empleado para clasificar muestras de suero de cáncer colorectal y normales [32].

Los resultados finales del estudio exploratorio demostraron que hay diferencias específicas en los espectros SERS entre suero normal y suero canceroso, sugiriendo gran potencial para análisis SERS de suero en la detección de cáncer colorectal y aplicaciones de examinación [32].

Medición de concentración química de muestras de suero de sangre y orina usando Espectroscopía Raman de Fibra Óptica con Núcleo Líquido (LCOF).

Qi y Berger (2007), realizaron este trabajo con un propósito doble. El primer objetivo fue la realización de la primera espectroscopía Raman basada en LCOF para la cuantifica-

ción de concentraciones de analitos en biofluidos. El segundo fue el establecer si los métodos de corrección mejoran la precisión de predicción [33].

La instrumentación utilizada para el desarrollo del proyecto es mostrada en la Figura 6. Brevemente, la muestra de biofluido fue colocada entre el LCOF e iluminada secuencialmente por un láser de 830 nm. (L) y una fuente termal de banda ancha a través de una fibra (OF₁). Espectros retrodispersados Raman y de luz blanca transmitidos fueron grabados para el mismo rango de longitud de onda por un espectrógrafo y un detector CCD. Dos fibras adicionales estuvieron localizadas en el extremo final más lejano del LCOF: la fibra OF₂ guía la luz de el LCOF hacia un contador de potencia (PM) para la calculación del coeficiente de absorción en la determinada longitud de onda del láser, y OF₃ envía la luz del láser transmitida hacia un espectrómetro (Ocean Optics, Dunedin, Florida) para monitorear posibles cambios en los picos del láser durante el experimento.

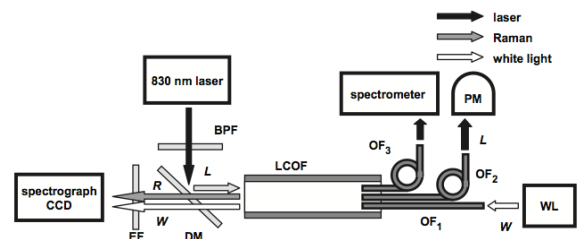


Figura 5. Esquema del instrumento utilizado.

El LCOF fue hecho de Teflon-AF y manufacturado por Bio-general Incorporated. La longitud del LCOF fue 30 cm., con diámetros internos y externos de 600 y $800 \mu\text{m.}$; el volumen total fue por lo tanto menor a 0.1 ml. La potencia del láser fue de aproximadamente 160 mW. en la entrada de el LCOF. La resolución espectral fue aproximadamente 7 cm^{-1} como fue determinada usando líneas de emisión de neón. La resolución Raman fue no inferior a 13 cm^{-1} como se especifico por el pico de fenilalanina 1004 cm^{-1} .

Las muestras de suero de sangre y orina fueron colectadas de espécimes previamente obtenidos clínicamente en el Centro Médico de la Universidad de Rochester siendo eliminada la identificación del donador. 80 muestras de suero de sangre se obtuvieron en 4 días con una taza de 20 por día. Durante los 9-14 días que transcurrieron entre las mediciones de concentración de referencia clínicas y el experimento Raman, las muestras fueron refrigeradas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Así mismo, 80 muestras de orina se recolectaron al cabo de una semana con una proporción de 10 a 20 muestras por día. En este caso, de 2 a 8 días transcurrieron entre la referencia y las mediciones Raman [33].

Para la adquisición de los espectros, las muestras fueron puestas lenta y establemente dentro del sistema LCOF con la ayuda de una jeringa de 1 ml. para minimizar la formación de burbujas de aire, las cuales dispersan la luz y de esta forma degradan el rendimiento LCOF. En el experimento de la orina, tres inyecciones de 1 ml. cada una fueron añadidas a

cada muestra; las primeras dos inyecciones fueron hechas para evacuar posibles residuos.

Las muestras visiblemente turbias fueron descartadas. Para cada muestra, Los espectros Raman se tomaron primero, seguidos rápidamente por los espectros de luz blanca para minimizar posibles cambios de la muestra. En el estudio del suero de sangre, el espectro Raman estuvo integrado por 60 marcos (frames) de 3 s. cada uno, y los espectros de luz blanca por un único marco de 30 s. En el estudio de la orina, los espectros Raman y de luz blanca fueron integrados por 40 marcos de 2 s. cada uno. En total, 75 espectros de suero de sangre y 73 espectros de orina fueron grabados tanto para Raman y luz blanca. Ambos experimentos espectrales se finalizaron en 2 días, con aproximadamente 40 corridas muestrales cada día. La realineación y reordenamiento del instrumento fue realizada entre los dos días para minimizar errores. El sistema fue alineado maximizando la intensidad Raman pico 890 cm^{-1} de una solución acuosa de etanol a 20%.

El resultado de los análisis espectrales, después de una serie de análisis gráficos y de patrones, demostró la capacidad de la técnica Raman de LCOF para realizar mediciones de múltiples analitos clave en muestras clínicas de suero de sangre y orina a concentraciones fisiológicas. Se llegó a la conclusión de que la mayoría de las concentraciones pueden ser predichas dentro de la precisión de un analizador clínico de referencia usando espectros de 10 s. Las correcciones basadas en absorción para las variaciones en la eficiencia de recolección de LCOF mejoraron las predicciones de la mayoría de los analitos, mostrando que la medida de transmisión de luz blanca adicional fue beneficiosa. Además, se notó que el sistema Raman LCOF se presta bien para el análisis automatizado de muestras a volúmenes altos tanto en geometría como cuando hay falta de consumibles [33].

Aplicación de Espectroscopía Molecular en la Región Infrarroja Media para la Determinación de Glucosa y Colesterol en Sangre y Suero de Sangre.

Los métodos enzimáticos actuales requieren frecuentes muestras de sangre y la utilización de varios compuestos químicos. Además, tales métodos proveen solo valores discretos. Estas deficiencias estimularon esta investigación dentro del potencial de la espectroscopía infrarroja (IR), particularmente en el rango infrarrojo cercano (near-IR), con una visión a la aplicación futura de esta técnica para el monitoreo continuo no invasivo de glucosa y otros componentes de sangre sin la necesidad de químicos adicionales [34].

La región infrarroja media (mid-IR) es útil dentro de los métodos invasivos para la determinación de componentes sanguíneos por medio de la técnica de reflectancia total atenuada (ATR, por sus siglas en inglés) pero las mediciones de transmitancia simples de la sangre líquida o del suero de sangre son imposibles de realizar dentro de la región infrarroja media debido a la presencia de agua en la matriz. Los experimentos realizados con la técnica de reflectancia atenuada (ATR) son realizados con la ayuda de celdas de flujo ZnSe a base de cristal. Este enfoque, de cualquier modo, está asociado con algunas deficiencias tales como la absorción de proteínas sobre el cristal, lo cual requiere que la celda sea desmontada y que el cristal sea frecuentemente pulido.

En este trabajo, desarrollado por Budínová en 1997, la técnica ATR fue evitada; en su lugar, se probó la factibilidad de emplear espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR) dentro de la región media infrarroja para determinar glucosa y colesterol en muestra de sangre y de suero de sangre puestas sobre una tarjeta o placa de polietileno y después secadas.

En el experimento, las muestras de sangre fueron obtenidas durante una examinación de rutina en el laboratorio bioquímico de Praha-Malešice. Las muestras de sangre fueron centrifugadas para obtener el suero y añadidas cada una a un vaso con capacidad de 2.5 ml. que contenía un anticoagulante, sal K_2EDTA seca o una gota de una solución de K_2EDTA . Las muestras fueron puestas sobre una tarjeta de polietileno con el uso de una pipeta automática, de modo que cubrieran un área no menor a 4 mm^2 , y secadas con aire. Sobre cada placa fueron colocadas cuatro muestras de sangre. Seis conjuntos de muestras fueron obtenidas de esta manera, comprendiendo un total de 131 muestras de sangre pura y 136 muestras de suero de sangre. Las concentraciones de glucosa y colesterol en los grupos de muestras recayeron sobre los rangos de 85.1 ± 275.3 y $158.5 \pm 301.5\text{ mg/dL}$, respectivamente.

Un grupo de muestras comprendido de 104 muestras de sangre pura y otro de 80 muestras de suero fueron preparados para ser utilizados en experimentos con KSCN como un estándar interno. Para esto, volúmenes de 500 ml. de una solución acuosa con 40 mg. de KSCN fueron pipeteados dentro de 50 recipientes, se les evaporó el agua, y se les añadió 500 ml. de sangre o suero; se mezclaron, y cuatro muestras se pipetearon sobre cada tarjeta. La concentración de glucosa en las muestras estuvo entre $99.6 \pm 346.0\text{ mg/dL}$.

Las concentraciones de glucosa y colesterol en las muestras fueron determinadas con la ayuda de un analizador Selectra (Merck), teniendo como base la medición fotométrica de los productos de reacción de las reacciones enzimáticas. Estándares de referencia con concentraciones de componentes certificados fueron utilizados.

Los espectros muestrales fueron escaneados utilizando un espectrómetro FT-IR Nicolet 210 controlado por computadora, equipado con un detector DTGS y un divisor de haz KBr. Sesenta y cuatro interferogramas se tomaron y midieron sobre la región de $400\text{ a }4000\text{ cm}^{-1}$ con una resolución de 8 cm^{-1} . La autogranancia fue aplicada. Una compartimiento de celda vacío representó el fondo, el cual fue medido después de cada remplazo de la placa de polietileno para optimizar la compensación de banda del CO_2 y el vapor de agua.

Se empleó la versión 1.2 del software OMNIC para el procesamiento de los espectros. En la Figura 6 se muestran ejemplos de los espectros de sangre, de suero de sangre, y de la tarjeta de polietileno limpia.

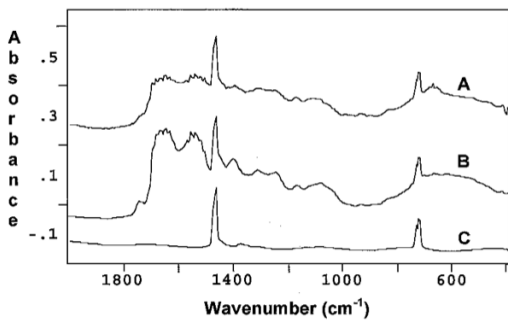


Figura 6. Espectros infrarrojos de sangre (A), suero de sangre (B), y una tarjeta limpia (C).

Desde que las muestras se aplicaron sobre tarjetas con diferente grosor, los diferentes espectros tuvieron que ser normalizados. La evaluación estuvo basada en la asunción de que la concentración total de los componentes de la sangre y del suero son casi constantes. La región espectral a través de la región $1850 - 950 \text{ cm}^{-1}$ fue integrada sobre la escala de absorbancia con respecto a la línea base, con el propósito de pasar a través de los dos lados de la región mencionada. La absorción del polietileno fue eliminada omitiendo el rango entre $1482 - 1422 \text{ cm}^{-1}$. El radio del área convencionalmente elegida, 100, al área del espectro integrado representó el factor de normalización por el cual los espectros experimentales fueron multiplicados.

Dentro de los resultados y la discusión del artículo, se dice que la repetitividad de las mediciones fue juzgada sobre un conjunto de 10 muestras de sangre pura y 10 muestras de suero. Los espectros fueron medidos el mismo día de la toma de muestras y después en cinco días. Entre las dos mediciones, las tarjetas de polietileno fueron almacenadas a temperatura ambiente. Las medias aritméticas y las desviaciones estándar se calcularon después de la eliminación de “outliers” de absorbancia para los números de onda por medio de la prueba de Dixon. Las absorbancias obtenidas por la doble medición de las mismas muestras fueron estadísticamente comparadas probando una hipótesis de identidad para los dos valores medios. Los resultados de la prueba, basados en los criterios de prueba que están tabulados y calculados, dieron evidencia de que los espectros de las muestras resultaron estadísticamente no significativos en cuanto a su diferencia. Por lo tanto, las mediciones fueron especificadas como repetitivas. Aparentemente, después de la aplicación de las muestras sobre las tarjetas de polietileno y el secado, las muestras de sangre y suero de sangre no cambian significativamente y pueden ser medidas en un periodo de tiempo más extenso sin tener que preservarlas o congelarlas [34]. Además, la varianza de dispersión de las absorbancias en los números de onda (longitudes de onda) seleccionados para la glucosa fueron analizados. El efecto de dos factores se analizó: la forma de insertar la tarjeta de polietileno (PE) dentro del instrumento y la variabilidad en la aplicación de la muestra. Una muestra de sangre entera fue usada para esta prueba. Los espectros de 10 muestras se midieron para cinco inserciones repetidas dentro del espectrómetro; los espectros fueron medidos cinco veces por cada inserción. El código ANOVA desarrollado por el Departamento de Química Ana-

lítica del Instituto de Tecnología Química de Praga, fue empleado para realizar el cálculo. Los resultados indicaron que ambos, el método de aplicación de la muestra y la reproducibilidad de la inserción de la tarjeta dentro del espectrómetro, tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la absorbancia en las longitudes de onda seleccionadas. Las diferencias en las diversas muestras se deben principalmente a las dificultades encontradas durante la aplicación sobre la tarjeta de PE; esto debido a que la sangre se pega a las paredes de la pipeta, su patrón de aplicación sobre la placa (tarjeta) de PE no es muy reproducible, y el grosor de la muestra falla en ser lo suficientemente uniforme.

Modelos de Mínimos Cuadrados Parciales (PSL). Treinta y dos modelos de calibración fueron establecidos para la glucosa. Los modelos fueron creados tanto para las muestras individuales como para todas las muestras en total. Los métodos mencionados, basados en longitudes de onda seleccionadas y en la región espectral entera pudieron ser aplicados en el cálculo. Los resultados mejores fueron logrados para el suero de sangre, con el uso de el método de la región espectral entera. Aparentemente, la aplicación de las muestras sobre la placa de polietileno es más reproducible para el suero de sangre que para la sangre en sí, y esta consideración tiene un efecto mayor sobre los resultados del análisis.

Diez modelos de calibración fueron establecidos para el colesterol. En este caso, solamente el método de calibración basado en la región espectral entera fue aplicado, debido a que el método alternativo dio gráficas de pobre calibración. Otra razón de por que el número de modelos fue tan bajo es que las concentraciones de colesterol no fueron conocidas para todas las muestras.

Tabla 3. Longitudes de onda y regiones espectrales (cm^{-1}) elegidas para los modelos de calibración establecidos para los dos componentes sanguíneos.

Method	Component	
	Glucose	Cholesterol
Wavenumbers	1035	955
	1078	1057
	1104	1371
	1146	
Entire region ^a	1185-950	1100-950

Los errores calculados en este documento fueron comparados con aquellos publicados en otros artículos que también tratan sobre la cuantificación de los componentes sanguíneos por medio de Reflectancia Total Atenuada (ATR). La pobre reproducibilidad del pipeteo de las muestras sobre la placa (tarjeta) de PE fue la mayor fuente de error en este trabajo. Los experimentos también sugirieron que el secado de la sangre está asociado con presiones que pueden perturbar la capa de polietileno (PE). Se encontró que los espectros de las muestras secadas son virtualmente invariables con el paso del tiempo, y que la pérdida de glucosa debido a la glicólisis durante el periodo a partir de la medición del valor de referencia a la aplicación de la muestra sobre la tarjeta puede ser una fuente sistemática de error. Se dice que sería deseable conocer la dependencia de tiempo de la pérdida de colesterol o glucosa, pero este experimento no fue realizado. El precio alto actual de las tarjetas de PE fue una desventaja para el enfoque sugerido [34].

Determinación de Componentes de Suero Humano sin reactivos usando Espectroscopía de Absorción Infrarroja.

En 2003, Hahn et al. [35] demostraron un nuevo enfoque para utilizar la técnica de absorción espectroscópica del infrarrojo medio (mid-IR) en la determinación en los niveles de concentración de componentes en suero humano tales como las proteínas, la albúmina, la globulina, y la glucosa dentro del rango de concentración fisiológica sin usar reactivos o algún paso adicional de secado del espécimen. Un total de 93 muestras de suero de sangre humana fueron obtenidas del Samsung Medical Center y analizadas por la construcción de un modelo de calibración multivariada. Los valores de referencia para la proteína total, la albúmina, la globulina y la glucosa se obtuvieron por medio del método convencional usando mediciones fotométricas basadas en reacciones enzimáticas.

Los espectros de absorción de los sueros de sangre fueron medidos con un espectrofotómetro Nicolet AVATAR 360 FT-IR. Este espectrofotómetro fue equipado con un divisor de haz KBr y un detector DTGS operando a temperatura ambiente. Las muestras fueron puestas y mantenidas durante el estudio en una celda de ventana de transmisión BaF₂ con una longitud de camino de 50 μm . Los espectros fueron razonados contra los espectros de único haz de una celda de ventana de transmisión vacía y convertidas a una escala de absorbancia.

Cerca de 100 μL . de suero de sangre fue usado para llenar las celdas. Los espectros de absorción fueron adquiridos de las muestras. Se obtuvieron los espectros FT-IT entre los rangos de longitud de onda de 8.404 a 10.25 μm . con una resolución espectral de 4 cm^{-1} y con una apertura de 8 mm. Cada espectro fue obtenido de 128 interferogramas y se aplicó la autogancia. Típicamente, tomó aproximadamente 10 minutos para obtener los espectros de absorción de cada muestra de suero. Se empleó la función de apodización Happ-Genzel para convertir los interferogramas a un espectro de absorción [35].

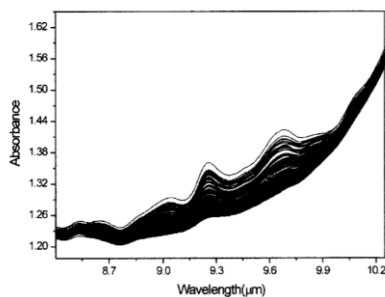


Figura 7. Espectros de absorción de suero de sangre en el rango espectral entre 8.404 y 10.35 μm .

Después de una serie de análisis estadísticos, los resultados obtenidos manifestaron que el método de espectroscopía del infrarrojo medio (mid-IR) puede ser aplicado al análisis de suero sin usar reactivos. Además, se expresó que la técnica parece ser un candidato muy atractivo para el desarrollo de un pequeño analizador con componentes simples.

El estudio demostró satisfactoriamente el potencial de la

espectroscopía de transmisión del infrarrojo medio en la determinación de las concentraciones de varios metabolitos mayores dentro del rango de concentración clínicamente relevante. En adición, los resultados indicaron que el rango de longitud de onda de 8.404 a 10.25 μm . puede ser usado para predecir las concentraciones de proteína total, albúmina, globulina y glucosa en suero de sangre humano. Fue enfatizado que es posible obtener un coeficiente de correlación más grande que 0.87 incluso de muestras biológicas acuosas, lo cual significa que la espectroscopía de transmisión del infrarrojo medio (mid-IR) de muestras biológicas acuosas sin reactivos y sin secado del espécimen es un método confiable para uso clínico [35].

Determinación Fluorométrica Directa de Colesterol Total en Suero de Sangre Usando Oxidasa de Colesterol Derivada.

Galbán et al. [36], Universidad de Zaragoza, estudiaron un método alternativo para la determinación de colesterol presente en suero basado en la derivación de las enzimas con un fluoróforo y siguiendo los cambios en su fluorescencia durante la reacción enzimática. En el experimento se reportó una determinación de colesterol total presente en suero de sangre usando oxidasa de colesterol (COD) derivada con éster succinimida (COD-FS). La ventaja principal de este método con otros similares es que la señal analítica es independiente de las concentraciones de enzimas y O₂.

Todas las mediciones de fluorescencia fueron realizadas por medio de un luminómetro Perkin - Elmer LS-50B equipado con un compartimiento para muestras que permite moverlas continuamente y controlar su temperatura. Una rendija con un ancho de 5 nm. fue usada para emisión y excitación de la muestra. El compartimiento para la muestra fue nivelado en temperatura con un termostato (37 \pm 0.1 $^{\circ}\text{C}$.) con un baño circulador Nesslab RTE-101, el cual permitía la recirculación continua del fluido actuando como termostato.

La separación de las enzimas etiquetadas fue llevada a cabo con un sistema de cromografía de baja presión que consiste en una columna de vidrio llena con Sephadex G-50. El eluyente fue proporcionado con una bomba peristáltica M312, y el fin de la columna fue conectada a un detector fotométrico de filtro UV-M seguido por una grabadora Unicam AR-25.

El recipiente del luminómetro fue llenado con 200 μL . de una solución de esterasa de colesterol, 100 μL . de la muestras conteniendo colesterol, y 1.5 mL. de solución de fosfato (pH = 6.5) con Triton X-100 de 1%. El sistema para el movimiento de la muestra fue conectado, y la mezcla fue movida por 30 minutos para completar la reacción de hidrólisis. La fluorescencia fue entonces medida a 519 nm. (excitación a 489 nm.). 300 μL . de la solución COD-FS fue añadida, y la variación en intensidad fue seguida hasta que la reacción se completó. La intensidad inicial fue dividida entre la intensi-

dad obtenida al final de la reacción para obtener el parámetro de cuantificación utilizado [36].

Para la determinación de colesterol en sangre, la muestra fue centrifugada en 1200 g. por 10 minutos. Veinte microlitros del supernatante fue agregado a 90 μL . de una solución reguladora de fosfato, y la mezcla resultante fue sujeta al procedimiento descrito anteriormente.

Las conclusiones del experimento mencionan que el uso de COD derivado con FS permitió el desarrollo de un método para la determinación directa del colesterol total en muestras de suero de sangre, el cual no depende de las concentraciones de enzimas u O_2 . Se añade que el uso de este tipo de reactivo puede ser una buena alternativa para la simplificación del diseño de sensores enzimático opto-químico. La opinión de los autores recalcan que en el futuro deberían realizarse investigaciones enfocadas en la derivación con nuevos reactivos, lo cual pueda extender esta alternativa para cualquier tipo de enzima y desplazar los máximos de absorción y fluorescencia hacia la región cercana al infrarrojo donde fluidos biológicos, como la sangre, tienen ventanas espectrales [36].

El Índice de Refracción del Suero de Sangre de Ratas Albinas a Diferentes Edades.

En el año 1918, Shinkishi Hatai desarrolló un estudio para determinar si existían cambios en el índice de refracción de muestras de suero de sangre de ratas albinas con edades diferentes [37].

Se utilizó un interferómetro Pulfrich para la investigación realizada y las pruebas fueron hechas con luz de sodio. La temperatura de las muestras de suero estudiadas fue regulada entre los 20 y 23 °C.

En el estudio, se usaron principalmente ratas albinas, pero en unas pocas instancias fueron empleadas también ratas híbridas (albino-noruegas). Las ratas fueron mantenidas a una dieta de laboratorio ordinaria y la sangre fue tomada antes de la alimentación; esto es, las ratas fueron alimentadas veinticuatro horas antes de la extracción de sangre. Solamente en los casos de las ratas más jóvenes, las que seguían siendo amamantadas por la madre, fueron tomadas a tiempos convenientes. En varias ocasiones las ratas que eran amamantadas todavía fueron aisladas de la madre por periodos variables para ponerlas en condiciones similares a las ratas más grandes.

Las muestras de sangre se obtuvieron de la siguiente manera. Las ratas fueron anestesiadas ligeramente con éter y se les abrió rápidamente la cavidad torácica para adquirir la sangre directamente del corazón. En el caso de las ratas más pequeñas, la sangre fue tomada realizando un corte en la arteria carótida. En orden de evitar cualquier mezcla de los fluidos corporales no se aplicó presión, pero solamente la sangre goteando espontáneamente fue recibida. La botella entonces se cerró para evitar la evaporación y dejarla a temperatura

ambiente hasta que el suero fue separado. Posteriormente, las muestras de sangre fueron centrifugadas y los sueros se transfirieron a pequeños tubos de muestra. El suero obtenido estaba entonces listo para una determinación del índice de refracción [37].

En total, 35 grupos conformados por 213 ratas albinas normales a diferentes edades fueron empleadas para el desarrollo de esta investigación. Este número grade de especímenes fue requerido debido al pequeño rendimiento del suero en los casos para las ratas más jóvenes. Como solo una gota o dos se obtuvieron de los especímenes recién y hasta de una semana de nacidos, la cantidad de suero deseada fue obtenida utilizando de cinco a siete ratas en una vez. Esta desventaja representada por la necesidad de tomar una gran cantidad de ratas fue compensada por el hecho de que pudieron eliminarse las variaciones individuales en un grado considerable.

Los resultados finales obtenidos en la investigación demuestran que el índice de refracción del suero de sangre de las ratas estudiadas cambió de acuerdo a la edad del espécimen, y en general es inversamente proporcional a la edad. Se observó, también, que el ayuno produce un ligero incremento en el índice de refracción, mientras que una dieta defectiva o falta de vitaminas solubles en agua produce una reducción leve en el índice resultante [37].

III. METODOLOGÍA

Teniendo como punto de referencia y base el trabajo realizado por Hatai [37] en el año de 1918 para la caracterización de suero de sangre de ratas albinas en cuestión de su tiempo de vida, se desarrolló un experimento para estudiar la posibilidad de caracterización del colesterol total presente en suero de sangre humano por medio de su índice de refracción, con el propósito de estudiar la relación y correlación de las propiedades químicas de muestras de suero de sangre con su propiedad óptica refractiva.

Se obtuvieron 70 muestras de suero previamente cuantificadas por medio del método enzimático colorimétrico y refrigeradas por un periodo de tiempo aproximado a un mes y medio. Cada una de las muestras estuvo compuesta por 0.7 ml. de suero de sangre y fueron proporcionadas por la escuela de Químico Clínico Biólogo de la Universidad de Morelos. Los especímenes se retiraron del congelador y fueron descongelados con la ayuda de un termoblock SYBRON | Thermolyne a una temperatura de 37 °C., tal y como se aprecia en la Figura 8, hasta el punto en que las muestras estuvieron completamente líquidas y sin cristales de hielo. Después de descongelar las muestras, éstas se dejaron reposar por un periodo de 20 minutos para nivelar su temperatura a la temperatura ambiental aproximada de 22 °C.

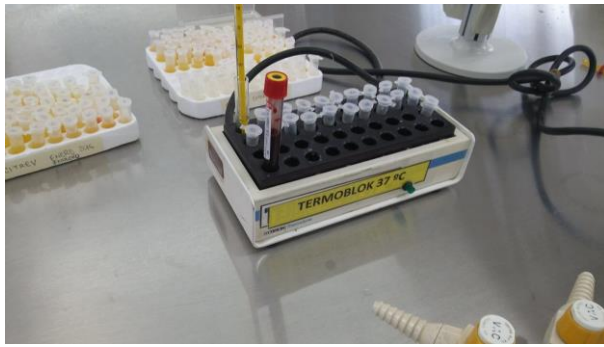


Figura 8. Termoblock y muestras utilizadas.

Cada muestra fue dividida en dos partes para obtener dos sub-muestras de 0.35 ml. cada una. Con la ayuda de una pipeta y diversos conos de laboratorio (ver Figura 9) se colocó cada sub-muestra dentro del espacio de medición de un refractómetro digital de bolsillo ATAGO presentado en la Figura 10, para determinar su índice de refracción y obtener así dos mediciones para cada una de las 70 muestras. Las expectativas manifestaban que ambos índices de refracción serían iguales o con variaciones insignificantes. Las dos mediciones de índice de refracción para cada sub-muestra se efectuaron para obtener una media de ambas y conseguir así una medición individual más exacta para cada muestra.

Entre cada medición de muestras y sub-muestras, el refractómetro fue limpiado con dextrán al 5% y posteriormente con agua destilada para eliminar los residuos y disminuir la probabilidad de interacción entre cada una de las muestras de suero estudiadas.



Figura 9. Proceso de pipeteo y división de muestras. Conos de laboratorio (elementos azules).



Figura 10. Refractómetro digital empleado en las mediciones del índice de refracción de las muestras.

Inicialmente se pensó seccionar cada muestra completa de suero en tres sub-muestras, pero únicamente se obtuvo 0.7

ml. de suero para cada muestra completa y el refractómetro ATAGO utilizado requiere un mínimo de 0.3 ml. de muestra para poder proporcionar una medición adecuada del índice de refracción del fluido contenido.

El proceso de medición de los índices de refracción se llevó a cabo de forma lineal. Las mediciones para cada muestra se tomaron una después de la otra y se prosiguió con la siguiente muestra hasta conseguir las mediciones de índice de refracción para todas las muestras de suero. Después de realizadas las mediciones, nos dimos cuenta que únicamente 47 de las 70 muestras analizadas presentaban una cuantización previo de colesterol total por el método convencional, esto debido a que las otras 23 muestras fueron cuantificadas respecto a otros compuestos químicos presentes y no colesterol.

IV. RESULTADOS

Las cuantificaciones de colesterol obtenidas para las muestras por medio del método convencional (método enzimático colorimétrico) fueron comparadas con los índices de refracción adquiridos para cada una de las muestras con el propósito de encontrar alguna relación posible que permitiera la caracterización de las muestras de suero de sangre con respecto a su colesterol total presente y su índice obtenido. La Figura 11 presenta la gráfica de relación adquirida con la ayuda del software estadístico MINITAB 17.

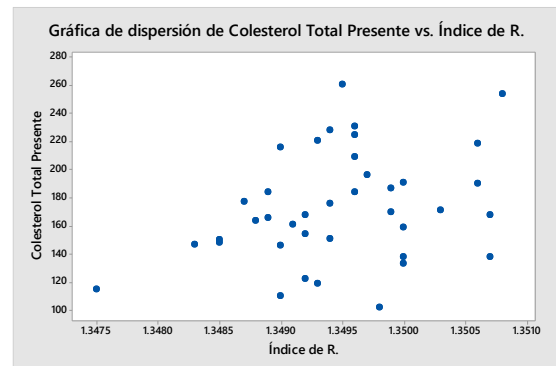


Figura 11. Gráfica de relación del índice de refracción contra la cantidad de colesterol total presente en las muestras de suero.

Fue realizada, a su vez, una prueba de correlación de Pearson entre los índices de refracción y las cuantificaciones de colesterol total de las muestras para estudiar la relación de una variable con respecto a la otra. El valor de Pearson obtenido fue de 0.368; el valor-p se situó en 0.011.

Para respaldar la información encontrada, se llevó a cabo un análisis de regresión cúbico para los datos teniendo como predictor el índice de refracción, y a la cuantificación de colesterol total como la variable de respuesta. Utilizando la herramienta MINITAB 17 se desarrolló dicha regresión, elegida debido a que se ajustó de mejor forma a los datos que la regresión lineal y la regresión cuadrada. La Figura 13 presenta la gráfica sobre el ajuste de los datos con la regresión cúbica desarrollada, así mismo como el valor de R^2

resultante. La regresión se realizó para obtener evidencias sobre el grado en que el índice de refracción es capaz de predecir un valor de colesterol total en una muestra de suero de sangre y apoyar así el valor de Pearson encontrado para la correlación existente.

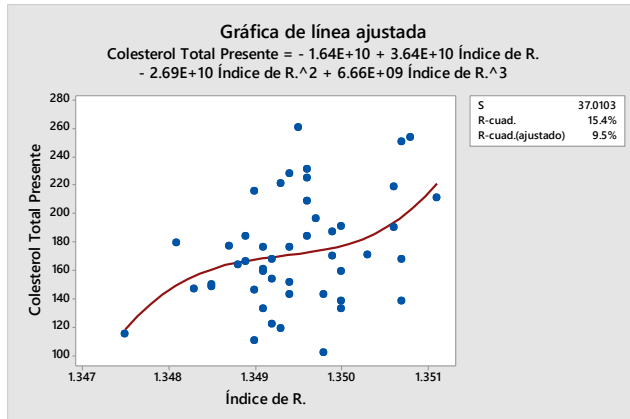


Figura 13. Ajuste de los datos con la regresión cúbica.

El valor de R^2 resultante para la regresión cúbica fue de 15.4%.

Las Figuras 14-16 muestran las gráficas sobre los residuales resultantes a partir de la regresión, los cuales debían cumplir los supuestos de normalidad, independencia y varianza constante para considerar válida la regresión.

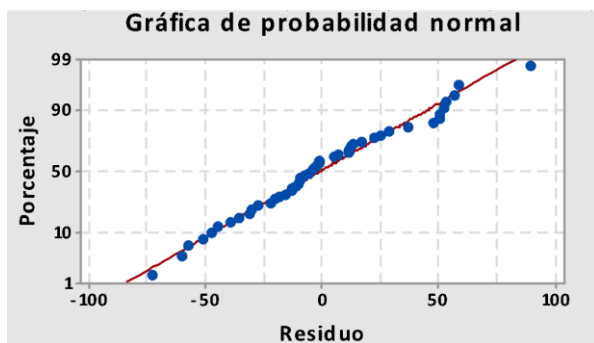


Figura 14. Normalidad de los residuales.

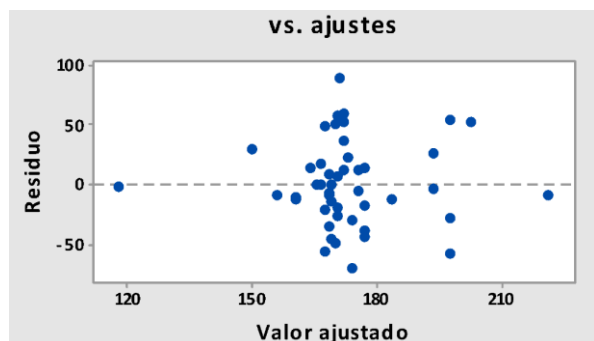


Figura 15. Varianza constante de los residuales.

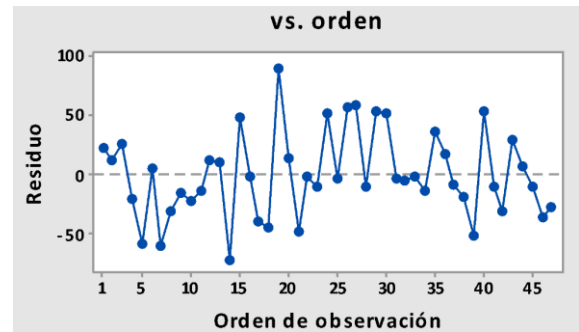


Figura 16. Independencia de los residuales.

Además de estudiar la correlación entre el índice de refracción y la cantidad de colesterol que presentaban las muestras, fue también estudiada la correlación existente entre los índices de refracción de las muestras y la edad de las personas de quienes los especímenes fueron adquiridos. El valor de Pearson obtenido para este segundo análisis de correlación fue de -0.163 , con un valor-p de 0.321 . Este valor negativo indica que se presenta una correlación negativa débil entre los índices de refracción de los sueros de sangre y la edad de las personas de quienes fueron extraídos.

V. DISCUSIONES

Los estudios realizados por Muñoz [1] y Hernández [2] aseguran que la cantidad de colesterol total presente en muestras de suero de sangre puede ser caracterizada por medio de técnicas de interferometría. En estos estudios se manejó una longitud de onda y un camino óptico constantes (mismas distancias en el interferómetro, misma longitud de onda). Básicamente, al obtener los interferogramas de las muestras de suero que se estudiaron en estos experimentos, con la ayuda de un software computacional se obtuvo el perfil de intensidad de cada interferograma. A dicho perfil le fueron medidos los anchos de los picos (FWHM) a una altura media para posteriormente determinar un valor promedio de FWHM. Cada FWHM promedio fue relacionado a la cantidad de colesterol total presente en su correspondiente muestra.

Es conocido que un patrón de interferencia depende principalmente de la longitud de onda, la diferencia de camino óptico, el índice de absorción y el índice de refracción de la muestra, como se menciona en la ecuación 3b. En las referencias [1] y [2], usaron un mismo láser y la longitud de onda se mantuvo constante. Debido a la falta de monturas ópticas especializadas, además que en el laboratorio no se cuenta con instrumentos de calidad óptica, los patrones de interferencia que fueron analizados dependieron de las tres variables restantes.

Para observar el cambio de patrones se realizaron diferentes experimentos usando el interferómetro de Michelson (Figura 17) descrito en la sección II.A.1.a debido al poco éxito y falta de precisión obtenidos con el interferómetro de Mach-

Zenhder. Para ello, se creó una base de plástico especial (Figura 18) destinada para el asentamiento de la muestra y para tratar de que todas las muestras se situasen en el mismo lugar al ser analizadas y garantizar que la luz recorriese el mismo camino óptico. Las imágenes fueron capturadas con una cámara Logitech HD C525.



Figura 17. Interferómetro de Michelson construido y utilizado.



Figura 18. Base creada para dar estabilidad y ubicación más precisa a las muestras

Al colocar celdas vacías en diferentes tiempos en uno de los brazos del interferómetro, se observó un ligero cambio en los patrones de interferencia, como se muestra en la Figura 19.

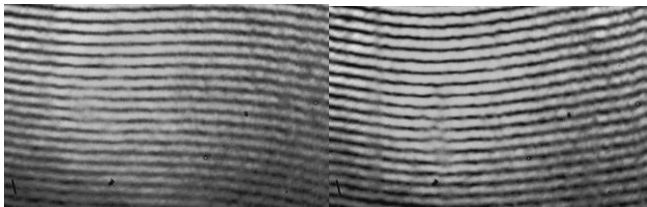


Figura 19. Patrones de interferencia de celdas vacías.

Nótese que a pesar de que se creyó que las celdas se ubicaron en el mismo lugar, existe un cambio en los patrones de interferencia lo cual indica que el camino óptico fue alterado, demostrando que un cambio en el patrón de interferencia no necesariamente conlleva un cambio en las propiedades ópticas de la muestra si no se tiene un control exacto de la posición de ésta.

Por otro lado, el índice de absorción no altera la forma de las franjas, mas bien, lo que altera es su visibilidad, como se muestra en la Figura 20. El experimento se desarrolló con muestras de agua con diferentes cantidades de colorante para

estudiar el comportamiento de los interferogramas resultantes. En recipientes con 4 litros de agua se disolvieron desde 0.1 gramos de colorante hasta 1 gramo, para poder analizar diversas muestras de agua con cantidades de colorante entre la escala del 0.1 a 1 con saltos de 0.1 gramos.

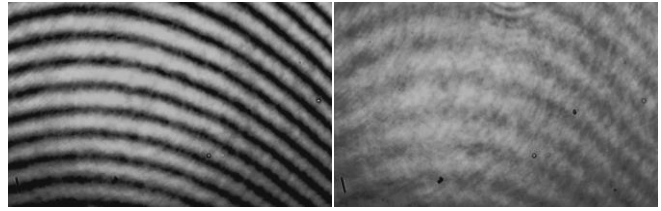


Figura 20. Interferogramas de agua con colorante. Izquierda: 0.025 gramos/litro. Derecha: 0.2 gramos/litro.

Un tercer experimento se realizó al mantener las celdas en el arreglo de Michelson sin ser removidas, añadiendo algunas sustancias como aceite de canola, glicerina, agua destilada, entre otros fluidos que se conocen poseen diferentes índices de refracción, para analizar el comportamiento de los interferogramas de cada una de estas sustancias. Se colocaron las celdas sobre la base diseñada (Figura 17) y posteriormente se les aplicó la técnica de Michelson para obtener su interferograma, a continuación, con una jeringa se les añadió cada uno de los fluidos y se capturó el interferograma resultante con el fluido en la celda. De esta forma, se observaron patrones diferentes debido a el efecto de refracción generado por cada sustancia. La figura 21 presenta los interferogramas obtenidos al interponer en uno de los brazos del interferómetro de Michelson las celdas vacías, y sin moverlas, las mismas celdas ya con los fluidos estudiados; debe estar claro que las celdas no fueron movidas ni siquiera por el vertimiento de los líquidos dentro de la celda.

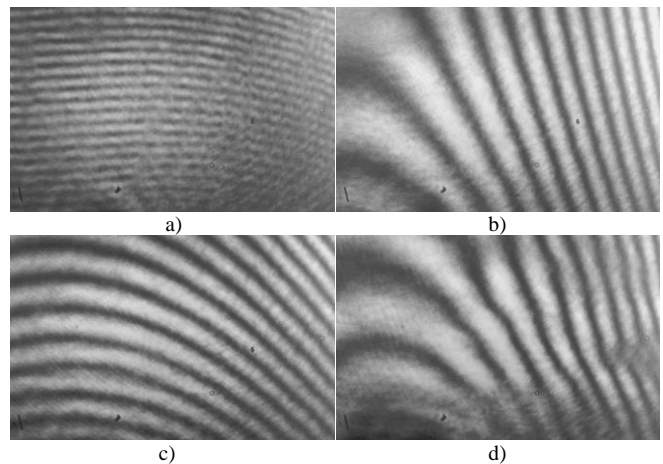


Figura 21. Interferogramas adquiridos para las diferentes sustancias: a) Cubeta vacía, b) Aceite de canola, c) Agua destilada y d) Glicerina.

Con estos resultados, se observa que el cambio mas significativo de la forma y del ancho de las franjas en un interferograma se debe al índice de refracción. En base a estos resultados y a la referencia [37], se pensó que sería mejor medir el índice de refracción para comprobar si puede determinarse una correlación entre dicho índice y la cantidad de colesterol total presente en una muestra de suero, siguiendo la idea de

Muñoz [1] y Hernández [2]. Este intento de correlación se presenta en la metodología del actual documento.

Sin embargo, los resultados obtenidos no son favorables como se observa en la sección de resultados. El diagrama de dispersión de la Figura 11 hace evidente un aspecto muy importante en relación con la posible caracterización: para un mismo índice de refracción corresponden varios valores de colesterol total; existe demasiada variabilidad y dispersión que no es posible determinar una tendencia.

El valor de correlación de Pearson manifiesta que no existe una relación fuertemente marcada entre el índice de refracción de una muestra de suero con la cantidad de colesterol total que dicha muestra contiene. Se conoce que si el valor de correlación resultante es cercano a -1 ó 1 , la correlación es negativa-fuerte o positiva-fuerte, respectivamente. Por lo tanto, el valor 0.368 obtenido se ubica dentro del lado positivo, pero en el extremo débil ya que es más cercano al 0 que al 1 . El valor- p , al ser inferior a 0.05 , deja claro que el supuesto de normalidad multivariada para la prueba de correlación de Pearson se cumple, haciendo a dicha prueba válida.

En cuanto al análisis de regresión, para que éste sea considerado como útil en predecir una variable de respuesta a partir de un factor predictor, el valor de R^2 debe estar situado lo más cercano posible al 100% . La regresión cúbica realizada, como se observa en la figura 13, otorgó un valor de ajuste R^2 de 15.4% , dejando de manifiesto que el índice de refracción de una muestra de suero de sangre no es significativo para predecir la cantidad de colesterol presente en la misma muestra. Lo anterior implica que otros factores diferentes al índice de refracción podrían tener mayor relevancia para la predicción del colesterol total. Además, como se muestra en las figuras 14-16, a pesar que los residuales de la regresión llevada a cabo no presentan violaciones evidentes en cuanto a los supuestos, la regresión efectuada no es útil para realizar predicciones debido al pobre ajuste con que cuenta.

Por otro lado, la prueba de correlación hecha para los índices de refracción de las muestras de suero contra la edad de las personas de quienes se obtuvieron, otorgó un valor de correlación de Pearson de -0.163 y un valor- p de 0.321 . Si bien, el valor de correlación indica la presencia de una correlación negativa muy débil (débil correlación inversamente proporcional), el valor- p , al resultar mayor a 0.05 que es el valor de significancia, manifiesta que el supuesto de normalidad multivariada de la correlación de Pearson se viola, haciendo la correlación dudosa.

Cabe mencionar que de acuerdo a los químicos de la escuela de Químico Clínico Biólogo, el factor de congelamiento cambia la concentración de colesterol total en las muestras de suero de sangre, pero, sabiendo que las muestras analizadas fueron todas congeladas durante el mismo tiempo y la misma temperatura, se espera que el cambio sea estándar, es decir, el mismo para cada muestra.

VI. CONCLUSIÓN

Con técnicas sencillas como la interferometría convencional o la medición del índice de refracción, no es posible la caracterización del colesterol total presente en suero de sangre. Entonces, es mejor utilizar técnicas como las aplicadas en la referencia [31] donde se usan métodos de espectroscopía, los cuales permiten una caracterización rápida, confiable y económica a largo plazo. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis inicial, y se sugiere que en futuras investigaciones se tomen en cuenta otros factores como la cantidad de proteínas, minerales, hormonas, entre otros componentes que puedan interferir en la caracterización óptica del suero de sangre.

VII. AGRADECIMIENTOS

Nuestros más sinceros agradecimientos a los químicos clínicos biólogos Santiago Chablé y Xiomara Gómez por su colaboración en la obtención de las muestras de suero sanguíneo y en el pipeteo de las mismas en el desarrollo del experimento realizado. Así mismo, agradecemos a los docentes de la Universidad de Morelos Joel Castro, Melquiades Sosa y Raúl Rodríguez por su guía y dirección a lo largo de la presente investigación.

VIII. REFERENCIAS

- [1] A. Muñoz, "Desarrollo de prototipado de Interferómetro de Mach - Zehnder para la Caracterización de Fluidos y Biocombustibles." Montemorelos, pp. 1-64, 2014.
- [2] B. Hernández, "Estudio de la sensibilidad en la medición de la prevalencia en colesterol total en suero de sangre por técnicas interferométricas." Universidad de Montemorelos, 2015.
- [3] J. B. Henry, "Colesterol," in *Laboratorio en el Diagnóstico Clínico*, Madrid: MARBÁN LIBROS, S. L., 2010, pp. 229 - 230.
- [4] R. Velázquez, "Manual De Prácticas Bioquímica Clínica," MÉXICO, D. F., 1807, 2009.
- [5] E. López-Alba, L. Sesé, J. M. Vasco-Olmo, and F. A. Díaz-Garrido, "Aplicaciones industriales de técnicas ópticas de campo completo para la medida de tensiones y deformaciones en elementos de máquinas," *Dyna*, vol. 181, pp. 98-108, 2013.
- [6] C. Posadas, J. Sepúlvera, R. Tapia, C. Magos, G. Cardoso, J. Zamora, and I. Lerman, "Valores de colesterol sérico en la población mexicana," *Salud Publica Mex.*, vol. 34, no. 2, pp. 157-167, 1992.
- [7] G. M. Ceballos, E. Méndez, O. Saavedra, I. Ramírez, and J. R. García, "Colesterol: Función biológica e implicaciones médicas," *Rev. Mex. Ciencias Farm.*, vol. 43, pp. 7-22, 2012.
- [8] M. Nakamura, K. Nakanishi, K. Hino, and M. Manabe, "Procedimiento de determinación cuantitativa de los colesterolos de las lipoproteínas de baja densidad," *ES 2 230 598 T3*, 2005.
- [9] SPINREACT, "Colesterol CHOD-POD. Líquido," Santa Coloma, 2013.
- [10] R. Rodríguez-Vera, J. A. Rayas, A. Martínez, and A. Dávila, "Algunas Aplicaciones Industriales de la Interferometría Electrónica de Patrones de Moteado," 2001. [Online]. Available: <https://www.cenam.mx/publicaciones/gratuitas/descarga/memorias-simposio/documentos/ta-or069.pdf>. [Accessed: 19-Nov-2015].
- [11] J. Schwider, "Advanced evaluation techniques in interferometry," *Prog. Opt.*, vol. 28, pp. 271-359, 1990.
- [12] E. Hecht, *Optics*. Addison Wesley, 1998.
- [13] D. Malacara, "Phase Shifting Interferometry," in *Optical Shop Testing*, Third., D. Malacara, Ed. New Jersey: WILEY, 2007, pp. 547-666.

- [14] EcuRed, "Interferómetro." [Online]. Available: <http://www.ecured.cu/index.php/Interfer%C3%B3metro>. [Accessed: 20-Nov-2015].
- [15] M. López-Quelle, "Introducción a la Física Experimental. Guía de la experiencia.," 2005.
- [16] U. T. D. LA MIXTECA, "INTERFERENCIA DE ONDAS DE LUZ," 2012. [Online]. Available: http://www.utm.mx/~yescas/Ondulatoria/3_Interferencia_de_onda_s_de_luz.pdf. [Accessed: 20-Nov-2015].
- [17] A. Herrera-Escudero, "Ley Debouguer-Lambert-Beer," 2014. [Online]. Available: <http://www.uv.mx/personal/aherrera/files/2014/05/L.-Ley-de-Bouguer-Lambert-Beer-0.pdf>. [Accessed: 06-Oct-2015].
- [18] F. J. Chao, "Método teórico para la predicción del índice de refracción en refractometría.," *Boletín Científico Técnico INIMET*, vol. 2, pp. 1–18, 2013.
- [19] Universidad de Salamanca, "Fundamento de la técnica," 2009. [Online]. Available: <http://campus.usal.es/~quimfis/apoyo/Carmen/Practicas/PracticaRefractometria.PDF>. [Accessed: 27-Nov-2015].
- [20] T. Graham, "Liquid Diffusion Applied to Analysis," *Philos. Trans. R. Soc. London*, vol. 151, pp. 183–224, 1861.
- [21] R. Morris and L. Collins, "Optical Properties of Multilayer Coloids," *J. Chem. Phys.*, vol. 41, pp. 33–57, 1964.
- [22] R. Chang, *Química General*, 9^ª ed. McGraw-Hill, 2007.
- [23] U. S. National Library Of Medicine, "Cholesterol: Also called HDL, Hypercholesterolemia, Hyperlipidemia, Hyperlipoproteinemia, LDL," *MedlinePlus*, 2015. [Online]. Available: <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/cholesterol.html>. [Accessed: 17-Nov-2015].
- [24] V. Tudela, "El colesterol: lo bueno y lo malo," 2009.
- [25] F. Dulbecco, "Comprenda el colesterol," *California Pacific Medical Center*, 2008. [Online]. Available: <http://www.cpmc.org/learning/documents/cholesterol-span.pdf>. [Accessed: 20-Nov-2015].
- [26] Cleveland Clinic, "Lo que necesitas saber acerca de los triglicéridos," 2006. [Online]. Available: <http://www.clevelandclinic.org/health/sHIC/doc/S11117.pdf>. [Accessed: 03-Nov-2015].
- [27] SOCIEDAD DE BIOQUÍMICOS DE SANTA FE, "Método enzimático colorimétrico para la determinación de colesterol en suero o plasma empleando la técnica manual o automatizada.," 2015. [Online]. Available: <http://myslide.es/documents/colesterol-plasma-o-suero-tenica-mannnual-o-automatizada.html>. [Accessed: 19-Nov-2015].
- [28] L. Yebrin, J. Tocho, and L. Scaffardi, "Determinación de tamaño de partículas poliméricas por distintas técnicas ópticas.pdf," *An. AFA*, vol. 4, no. 1, pp. 132–137, 1993.
- [29] E. M. Pérez-Monserrat, "Técnicas de caracterización petrológicas (I): Microscopía Óptica de Polarización (MOP) Y Difracción de Rayos X (DRX)," in *La conservación de los geomateriales utilizados en el patrimonio.*, 2012, pp. 23–30.
- [30] J. Duarte, H. Fernández, and M. Moreno, "Caracterización de membranas termoneumáticas mediante interferometría óptica.," *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, vol. 31, no. 118, pp. 79–87, 2007.
- [31] X. Li, J. Lin, and H. Jin, "Method and system for serum spectroscopy diagnosis of cancer," *Proc. SPIE*, vol. 5141, pp. 357–361, 2003.
- [32] D. Lin, S. Feng, J. Pan, Y. Chen, J. Lin, G. Chen, S. Xie, H. Zeng, and R. Chen, "Colorectal cancer detection by gold nanoparticle based surface-enhanced Raman spectroscopy of blood serum and statistical analysis.," *Opt. Express*, vol. 19, no. 14, pp. 13565–13577, 2011.
- [33] D. Qi and A. Berger, "Chemical concentration measurement in blood serum and urine samples using liquid-core optical fiber Raman spectroscopy," *Appl. Opt.*, vol. 46, no. 10, pp. 1726–1734, 2007.
- [34] G. Budinová, J. Salva, and K. Volka, "Application of molecular spectroscopy in the mid-infrared region to the determination of glucose and cholesterol in whole blood and in blood serum," *Appl. Spectrosc.*, vol. 51, no. 5, pp. 631–635, 1997.
- [35] S. Hahn, "Reagentless determination of human serum contents using infrared absorption spectroscopy," *J. Opt. Soc. Korea*, vol. 7, no. 4, pp. 240–244, 2003.
- [36] F. Sierra, M. Lo, P. E. Z. Sebastia, S. D. E. Marcos, and J. R. Castillo, "Direct Fluorometric Determination of Total Cholesterol in Serum Using Derivatized Cholesterol Oxidase," *Appl. Spectrosc.*, vol. 54, no. 8, pp. 1157–1162, 2000.
- [37] S. Hatai, "The refractive index of the blood serum of the albino rat at different ages," *J. Biol. Chem.*, vol. 35, no. 3, 1918.