

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA



**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

**DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN SISTEMA COLORIMÉTRICO PARA ANÁLISIS CLÍNICO  
BASADO EN UNA CÁMARA DIGITAL Y UNA FUENTE DE ILUMINACIÓN DIFUSA**

Trabajo Especial de Grado presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por el **Br. Jonathan Esteban Fernández Maita**, para optar al título de Licenciado en Química, opción tecnología.

Caracas, Mayo de 2011

Yo, profesor Héctor Gutiérrez, investigador asociado al laboratorio de electrónica, de la Escuela de Química, de la Facultad de Ciencias, de la Universidad Central de Venezuela certifico que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

**“DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN SISTEMA COLORIMÉTRICO PARA ANÁLISIS CLÍNICO  
BASADO EN UNA CÁMARA DIGITAL Y UNA FUENTE DE ILUMINACIÓN DIFUSA”**

Que presenta el Br. Jonathan Esteban Fernández Maita, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el laboratorio de espectroscopia laser de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, bajo mi dirección, durante los años 2010 y 2011, y con esta fecha autorizo su presentación.

Caracas, Mayo de 2011

---

Dr. Héctor Gutiérrez

(Tutor)

## ACTA

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del trabajo Especial de Grado titulado: **“DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN SISTEMA COLORIMÉTRICO PARA ANÁLISIS CLÍNICO BASADO EN UNA CÁMARA DIGITAL Y UNA FUENTE DE ILUMINACIÓN DIFUSA”**. Presentado por el Br. Jonathan Esteban Fernández Maita, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra magna casa de estudios para optar por el título de Licenciado en Química.

---

Dr. Héctor Gutiérrez  
(Tutor)

---

Dr. Jimmy Castillo  
(Jurado)

---

Dr. José Chirinos  
(Jurado)

## ÍNDICE

1. INTRODUCCION.....	1
2. ASPECTOS TEÓRICOS.....	3
2.1. Espectrofotometría.....	3
2.1.1. Región visible.....	4
2.1.2. Ley de Beer.....	4
2.1.3. Instrumentación para la medición de absorbancias de la luz visible.....	5
2.1.4. Obtención de un espectro de absorción.....	6
2.1.5. Curvas de calibración.....	7
2.2. Instrumentación.....	8
2.2.1. Fuentes.....	8
2.2.1.1. Lámpara incandescente.....	8
2.2.1.2. Diodos emisores de luz (LEDs).....	10
2.2.2. Selectores de longitud de onda.....	10
2.2.3. Compartimiento de muestras.....	11

2.3.4. Detectores.....	11
2.3.4.1. Cámara CCD como detector de luz.....	12
2.3.4.2. Modelo aditivo de color RGB.....	14
2.4. Imágenes digitales y espectroscopia.....	15
3. DESARROLLOS RECIENTES DE INSTRUMENTOS ESPECTROSCÓPICOS CON DETECCION DE IMÁGENES.....	16
4. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS DEL PROYECTO.....	19
5. OBJETIVOS.....	20
5.1. Objetivo general.....	20
5.2. Objetivos específicos.....	20
6. PARTE EXPERIMENTAL.....	21
6.1. Materiales.....	21
6.1.1. Cubetas.....	21
6.1.2. Fuente de iluminación.....	21
6.1.3. Cámara fotográfica.....	22
6.1.4. Espectrómetro.....	23
6.1.5. Reactivos.....	24
6.2. Montaje experimental desarrollado.....	24

7. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	28
7.1. Respuesta espectral de la cámara CCD.....	26
7.2. Procesamiento de la imagen digital.....	28
7.3. Estudio con soluciones sintéticas.....	29
7.4. Evaluación Instrumental.....	30
7.5. Estudio de la reproducibilidad.....	31
7.6. Curvas de calibración para azul de bromofenol.....	32
7.7. Preparación de la muestra.....	35
7.8. Determinación de glucosa en suero sanguíneo.....	35
7.8.1. Medidas realizadas.....	37
8. CONCLUSIONES.....	49
9. RECOMENDACIONES.....	50
10. BIBLIOGRAFÍA.....	51
11. AGRADECIMIENTOS.....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Espectro electromagnético.....	4
<b>Figura 2.</b> Esquema de un espectrofotómetro.....	6
<b>Figura 3.</b> Espectros de Absorción de tres sustancias biológicas.....	7
<b>Figura 4.</b> Curva de calibración.....	8
<b>Figura 5.</b> Espectro de emisión para una lámpara de tungsteno.....	9
<b>Figura 6.</b> Espectro de emisión para un arreglo de LEDs.....	10
<b>Figura 7.</b> Esquema de un detector CCD.....	12
<b>Figura 8.</b> Detector CCD.....	13
<b>Figura 9.</b> Representación del principio del modelo aditivo de color RGB.....	14
<b>Figura 10.</b> Cubeta de plástico.....	21
<b>Figura 11.</b> Espectro típico de la respuesta espectral de una cámara digital CCD...23	
<b>Figura 12.</b> Espectrómetro Ocean Optics USB2000.....	23
<b>Figura 13.</b> Esquema del montaje. (a) fuente de luz y espectro de emisión respectivo, (b) pantalla difusora (c) celda con muestra y espectro de absorción de la misma, (d) cámara digital y respuesta espectral de la CCD.....	25

<b>Figura 14.</b> Respuesta espectral obtenida para la cámara CCD utilizada.....	27
<b>Figura 15.</b> Montaje a) cámara digital, b) lente, c) monocromador, d) lente, e) fibra óptica.....	27
<b>Figura 16.</b> Espectro de absorción para una solución de azul de bromofenol.....	29
<b>Figura 17.</b> Superposición (cualitativa) con el espectro del azul de bromofenol (línea negra) al espectro RGB.....	30
<b>Figura 18.</b> Imágenes obtenidas con el montaje ensamblado de las muestras de azul de bromofenol preparadas a diferentes concentraciones.....	30
<b>Figura 19.</b> Representación gráfica de la variación de la señal de azul de bromofenol en función de la concentración para el formato Raw y JPG.....	32
<b>Figura 20.</b> Curva de calibración con solo valores comprendidos de 0 a 10 mg/L para el formato Raw y JPG.....	33
<b>Figura 21.</b> Curvas de calibración del sistema colorimétrico propuesto y un espectrofotómetro comercial.....	34
<b>Figura 22.</b> Imágenes obtenidas con el montaje ensamblado de las muestras de suero sanguíneo luego de la incubación.....	37
<b>Figura 23.</b> Curvas de calibración empleando el patrón de glucosa de 100 mg/dl para los dos tipos de archivos de foto.....	39
<b>Figura 24.</b> Representación gráfica de la variación de la señal en función de la concentración para el formato Raw y JPG.....	41



<b>Figura 25.</b> Curvas de calibración empleando el patrón de glucosa de 100 mg/L con un espectrofotómetro comercial (Ocean Optics USB 2000).....	43
<b>Figura 26.</b> Representación gráfica de las absorbancias en función de la concentración del sistema colorimétrico propuesto y un espectrofotómetro comercial.....	44
<b>Figura 27.</b> Grafica de valores de concentración del sistema colorimétrico en función de los valores de concentración de un espectrofotómetro comercial.....	47

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Estudio de la reproducibilidad en las absorbancias medidas en los dos tipos de archivos Raw y JPG.....	31
<b>Tabla 2.</b> Parámetros analíticos de la curva de calibración, para el sistema colorimétrico con ambos tipos de archivos Raw y JPG.....	33
<b>Tabla 3.</b> Parámetros analíticos de la curva de calibración, para el sistema colorimétrico y un espectrómetro comercial.....	35
<b>Tabla 4.</b> Valor de absorbancia medido para el patrón de glucosa para archivo tipo Raw.....	37
<b>Tabla 5.</b> Valor de absorbancia medido para el patrón de glucosa para archivo tipo JPG.....	38
<b>Tabla 6.</b> Parámetros analíticos de la curva de calibración, para el sistema colorimétrico con ambos tipos de archivos Raw y JPG.....	39
<b>Tabla 7.</b> Valores de absorbancia medidos mediante el sistema para el tipo de archivo Raw.....	40
<b>Tabla 8.</b> Valores de absorbancia medidos mediante el sistema para el tipo de archivo JPG.....	40

<b>Tabla 9.</b> Parámetros analíticos de la curva de calibración, para el sistema colorimétrico con ambos tipos de archivos Raw y JPG.....	42
<b>Tabla 10.</b> Valor de absorbancia medido para el patrón de glucosa mediante un espectrofotómetro comercial (Ocean Optics USB 2000).....	42
<b>Tabla 11.</b> Valores de absorbancia medidos mediante el espectrofotómetro comercial (Ocean Optics USB 2000).....	43
<b>Tabla 12.</b> Parámetros analíticos de la curva de calibración, para el sistema colorimétrico y un espectrómetro comercial.....	45
<b>Tabla 13.</b> Comparación de los valores de concentración medidos con el sistema colorimétrico formato Raw y un espectrofotómetro comercial.....	46
<b>Tabla 14.</b> Comparación de los valores de concentración medidos con el sistema colorimétrico Formato JPG y un espectrofotómetro comercial.....	46
<b>Tabla 15.</b> Comparación de t estadístico para los dos métodos comparados.....	48

## INDICE DE ECUACIONES

<b>Ecuación 1.</b> Fórmula utilizada por el programa para la determinación de absorbancia.....	28
<b>Ecuación 2.</b> Fórmula para determinación de la concentración de glucosa mediante el método glucosa oxidasa enzimática colorimétrica.....	36

## RESUMEN

En el presente trabajo se diseñó y evaluó un prototipo de lector de absorbancia usando como sistema de detección una cámara digital, para el análisis cuantitativo simultáneo de un número elevado de muestras sintéticas y biológicas como futura aplicación al análisis clínico.

Para el sistema de lector de absorbancia se empleó una fuente de iluminación difusa como lámparas fluorescente e incandescente, una cubeta de plástico como compartimiento de muestra y una cámara digital CCD como registrador de la imagen, que permitió digitalizarla, separarla en sus componentes RGB e intensidad.

Las imágenes se transformaron en superficies de respuesta de intensidades para cada color al que responde los filtros de la cámara CCD, de esta manera al compararla con una referencia, se pudo calcular la absorbancia de un punto en particular de la imagen y mediante una curva de calibración se obtuvo la concentración de una determinada sustancia en ese punto.

El sistema diseñado se utilizó para medir concentraciones de una solución sintética de azul de bromofenol preparada a distintas concentraciones y luego se trabajó con un grupo de muestras de suero sanguíneo humano midiendo concentraciones de glucosa, cuyos valores oscilaron de 25 a 250 mg/dl. Obteniendo una alta linealidad y sensibilidad, comparado con equipos comerciales, lo que permite realizar análisis cuantitativos de un número elevado de muestras.

## 1. INTRODUCCION

Muchos análisis bioquímicos y pruebas clínicas como la glucosa, hemoglobina, colesterol, hierro, entre otros, son fundamentales para el diagnóstico precoz de enfermedades como la diabetes, la anemia y la mortalidad general coronaria. La mayoría de estos análisis se realizan con equipos que se encuentran disponibles en grandes laboratorios ubicados en zonas urbanas, centralizando los análisis clínicos a algunas regiones específicas. Esto limita la eficiencia de los análisis clínicos en países en vías de desarrollo o regiones de baja actualización tecnológica, donde usualmente no se dispone de una infraestructura adecuada a nivel nacional, que suministre las condiciones idóneas para la realización de dichos análisis en toda la región.

Uno de los métodos más sencillos, accesibles, útiles y utilizados es la espectroscopia ultravioleta-visible. Se pueden identificar y cuantificar biomoléculas en solución y en muestras biológicas, con el empleo de reactivos específicos que reaccionan con el compuesto a analizar y forman un producto coloreado que permite detectarlo en muestras complejas. La dependencia entre la concentración y la magnitud del color de dichas especies se relacionan mediante la ley de Lambert-Beer, esta permite cuantificar la sustancia en estudio mediante métodos espectroscópicos. La detección de radiación suele realizarse mediante fotómetros o espectrofotómetros. Estos lectores, permiten la mayor disponibilidad de equipos para análisis clínicos, no obstante estos son costosos, requieren de personal especializado y de ciertas condiciones ambientales específicas y en algunos casos largos tiempo de análisis.

Por otro lado, recientemente diversos investigadores han explorado el uso de sistemas de cámaras digitales como sistemas de detección espectroscópicos en conjunto con fuentes de radiación no-convencionales tales como pantallas de computadoras, diodos de emisión de luz, con la finalidad de evaluar la aplicación de la

fotografía digital y el procesamiento computarizado de imágenes en la construcción de nuevos diseños de espectrofotómetros. Estas nuevas tecnologías han sido aplicada en los lectores de absorbancia, obteniendo resultados satisfactorios en la cuantificación de ciertos compuestos químicos en muestras de suero sanguíneo. No obstante su aplicación en análisis clínicos no ha sido suficientemente explotada. Debido a que estos dispositivos son de coste relativamente bajo, permiten analizar gran número de muestra simultáneamente y en corto tiempo, resulta de gran interés la validación de estos dispositivos en el área médica. Esto permitiría descentralizar la realización de los exámenes clínicos <sup>[1]</sup>.

El presente trabajo tiene como objetivo principal evaluar un prototipo de lector de absorbancia usando como sistema de detección una cámara CCD, aplicado para el análisis cuantitativo simultáneo de un número elevado de muestras de futura aplicación al análisis clínico.

## 2. ASPECTOS TEÓRICOS

### 2.1. Espectrofotometría

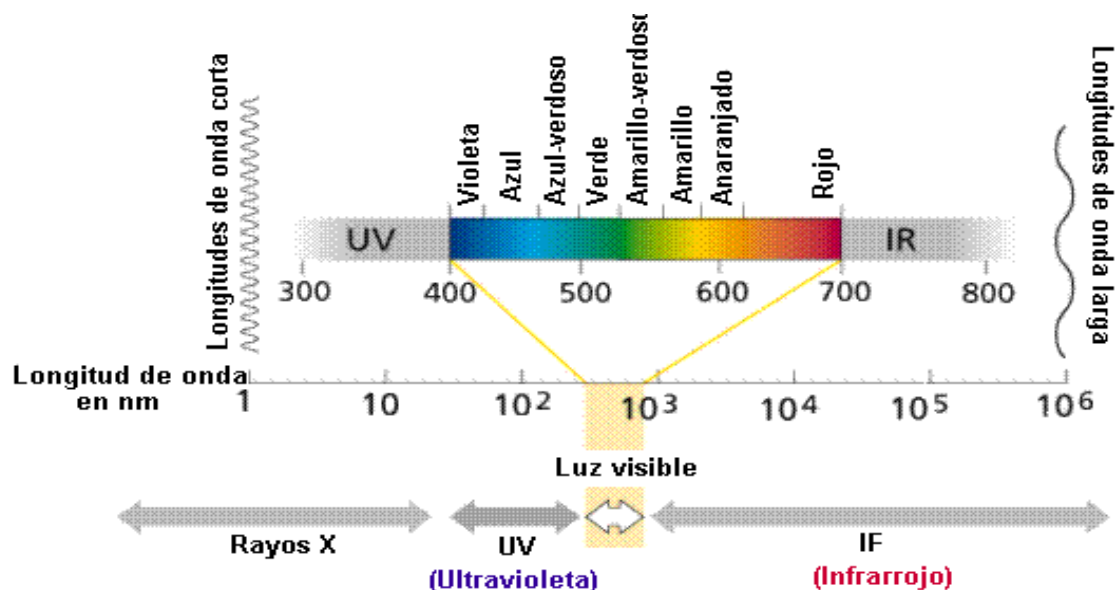
La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se utiliza un espectrofotómetro.

El fundamento de la espectroscopía se debe a la capacidad de las moléculas de absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV-visible. Las longitudes de ondas de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que absorben depende de la estructura atómica y las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, etc.).

En espectroscopía el término luz no solo se aplica a la forma visible de radiación electromagnética, sino también a las formas UV e IR. <sup>[3]</sup>

En la figura 1 se puede observar el espectro electromagnético que representa donde se encuentra toda la región UV- Visible que puede ser captada por el ser humano.





**Figura 1.** Espectro electromagnético <sup>[4]</sup>.

### 2.1.1. Región Visible

En la región visible apreciamos el color visible de una solución y que corresponde a las longitudes de ondas de luz que transmite, no que absorbe. El color que absorbe es el complementario del color que transmite.

Por tanto, para realizar mediciones de absorción es necesario utilizar la longitud de onda en la que absorbe luz la solución coloreada. <sup>[3]</sup>

### 2.1.2. Ley de Beer

La absorbancia,  $A$ , es la cantidad de intensidad de luz que absorbe una muestra. Está definida como:

$$A = -\log \frac{I}{I_0}$$

siendo  $I$  la intensidad después de haber habido la absorción e  $I_0$  la intensidad de la luz que se hace incidir en la muestra.

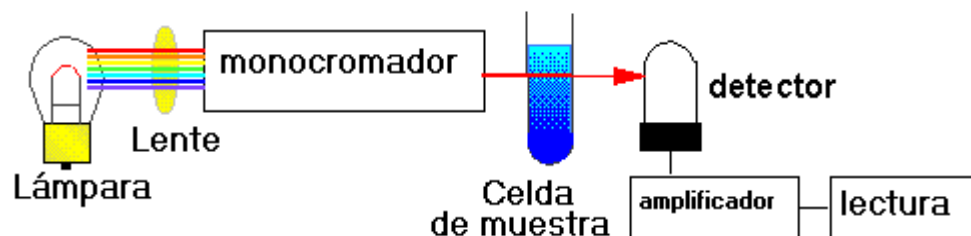
Para una radiación monocromática, la absorbancia ( $A$ ) es directamente proporcional al camino óptico  $b$  a través del medio y la concentración  $c$  de la especie absorbente,  $A = abc$  donde  $a$  es una constante de proporcionalidad denominada absorptividad molar. La magnitud de  $a$  claramente dependerá de las unidades utilizadas para  $b$  y  $c$ .<sup>[5]</sup>

### 2.1.3. Instrumentación para la medición de absorbancias de la luz visible

La medición de absorbancia de la luz por las moléculas se realiza en los espectrofotómetros. Aunque pueden variar en diseño, en especial con la incorporación de predomina para el análisis de datos, todos los espectrofotómetros constan, según se indica en la figura, de:

1. Una fuente de energía radiante: lámpara de deuterio y tungsteno.
2. Un monocromador para la selección de radiaciones de una determinada longitud de onda: filtros, prismas, redes de difracción.
3. Un recipiente transparente (cubetas o tubos) que contenga la muestra. Pueden ser de vidrio, cuarzo o plástico transparente. Para medir en UV no se deben usar las de vidrio ya que estas absorben en el UV, es recomendado usar las de cuarzo o sílice fundido,
4. Un detector de luz y un amplificador convertidor de las señales luminosas en señales eléctricas.
5. Un registrador o sistema de lectura de datos

En la figura 2 se muestra un esquema de los componentes de un espectrofotómetro comercial.

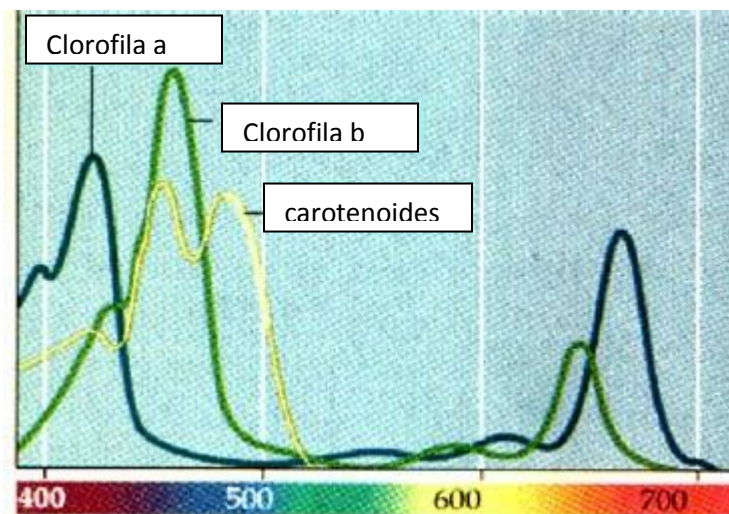


**Figura 2.** Esquema de un espectrofotómetro.

#### 2.1.4. Obtención de un espectro de absorción

El espectro de absorción es una representación gráfica que indica cantidad de luz absorbida ( $\epsilon$ ) a diferentes valores de  $\lambda$ . A partir de una solución diluida de un compuesto, cuya absorbancia máxima entra dentro del rango de medida del espectrofotómetro, se verá el valor de absorbancia a diferentes longitudes de onda frente a un blanco que contenga el disolvente de la solución de la muestra a caracterizar. A partir del espectro de absorción se obtendrá el valor de  $\lambda$  al que el compuesto presenta la mayor absorbancia ( $\lambda_{\text{max}}$ ). Dicho  $\lambda$  se utilizará a la hora de hacer determinaciones cualitativas y cuantitativas del compuesto. El espectro de absorción de un cromóforo depende, fundamentalmente, de la estructura química de la molécula. <sup>[3]</sup>

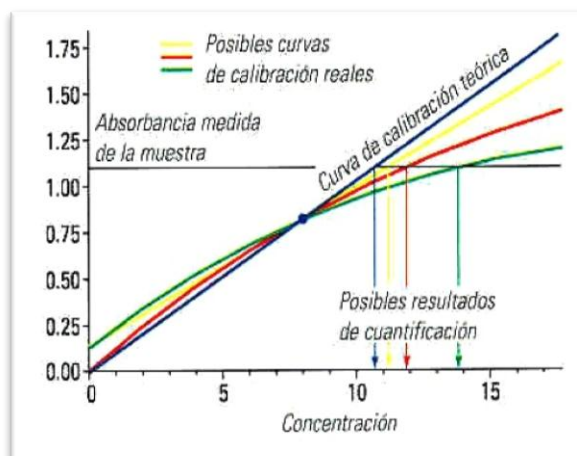
En la figura 3 se puede observar un espectro de absorción para una muestras de colorantes naturales donde se representa la absorbancia en función de la longitud de onda.



**Figura 3.** Espectros de Absorción de tres sustancias biológicas. <sup>[3]</sup>

#### 2.1.5. Curvas de Calibración

Para obtener una curva de calibración de un compuesto se preparan soluciones de diferentes concentraciones del mismo, determinándose para cada una de ellas el valor de absorbancia a  $\lambda_{max}$ . Estos valores de absorbancia se representan en el eje de ordenadas ( eje y) y los de concentración en el eje de abscisas (eje de x) (ver figura 4). Se observará que, a bajas concentraciones, el aumento de concentración se corresponde con un incremento lineal en la absorbancia (zona de cumplimiento de la ley de Lambert-Beer). A concentraciones altas la linealidad se pierde y se observa la línea se aplana, por lo que las medidas son poco fiables. <sup>[3]</sup>



**Figura 4.** Curva de calibración

## 2.2. Instrumentación

Los componentes esenciales que constituyen un espectrofotómetro son: una fuente de luz, un filtro o selector de longitud de onda, recipientes para la muestra y un detector.

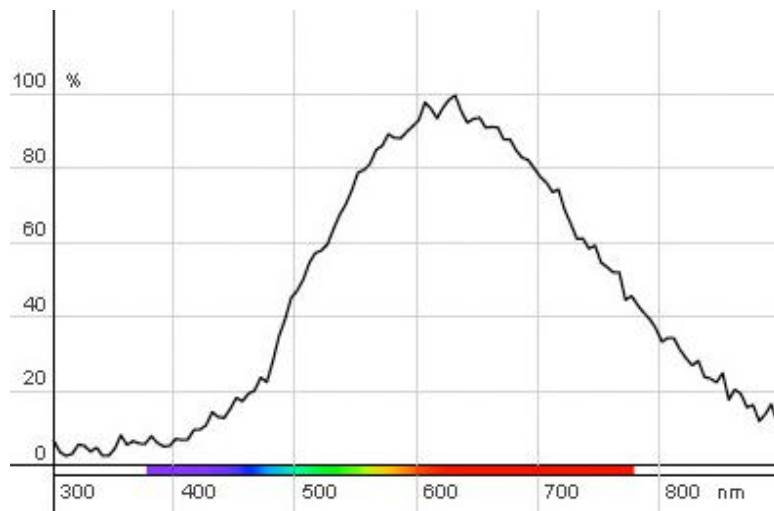
### 2.2.1. Fuentes

#### 2.2.1.1. Lámpara incandescente

Las lámparas incandescentes fueron la primera forma de generar luz a partir de la energía eléctrica. Desde que fueran inventadas, la tecnología ha cambiado mucho produciéndose sustanciosos avances en la cantidad de luz producida, el consumo y la duración de las lámparas. Su principio de funcionamiento es simple, se pasa una corriente eléctrica por un filamento hasta que este alcanza una temperatura tan alta que emite radiaciones visibles por el ojo humano. <sup>[6]</sup>

En la figura 5 se muestra el espectro de emisión para una lámpara de tungsteno.

La duración de una lámpara viene determinada básicamente por la temperatura de trabajo del filamento. Mientras más alta sea esta, mayor será el flujo luminoso pero también la velocidad de evaporación del material que forma el filamento. Las partículas evaporadas de tungsteno, cuando entren en contacto con las paredes del tubo se depositarán sobre estas, ennegreciéndolo. De esta manera se verá reducido el flujo luminoso por la obstrucción de material depositado. Pero, además, el filamento se habrá vuelto más delgado por la evaporación del tungsteno que lo forma y se reducirá, en consecuencia, la corriente eléctrica que pasa por él, la temperatura de trabajo y el flujo luminoso. Esto seguirá ocurriendo hasta que finalmente se rompa el filamento. A este proceso se le conoce como depreciación luminosa. [6]



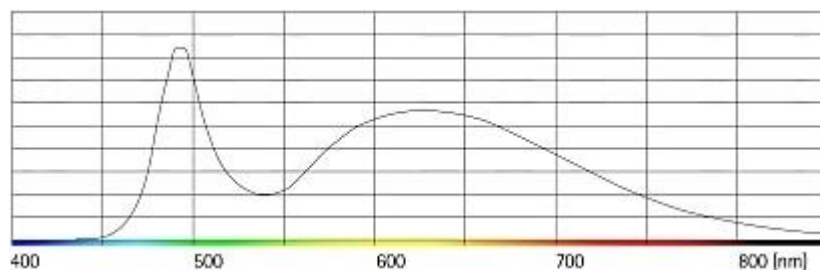
**Figura 5.** Espectro de emisión para una lámpara de tungsteno.

### 2.2.1.2. Diodos Emisores de Luz (LEDs)

Los diodos de emisión de luz, también conocido como LED (acrónimo del inglés de *Ligth-Emitting Diode*) se ha venido empleando recientemente como una fuente de iluminación en equipo espectrofotométricos. El LED es un dispositivo semiconductor (diodo) que emite luz incoherente de espectro reducido cuando se polariza de forma directa la unión PN del mismo y circula por el una corriente eléctrica. <sup>[7]</sup>

Hoy en día se disponen de LEDs en una gama amplia de longitudes de onda y de intensidad variable y cada día gracias a la investigación en el campo de la optoelectrónica hay mayor variedad. En la figura 6 se representa un espectro para un arreglo de LEDs.

Debido a su pequeño tamaño, los LEDs puede colocarse muy cerca de la muestra, evitando así la perdida de radiación por dispersión o por reflexión de los haces de luz en otros componentes ópticos (espejos, lentes), haciendo esto una ventaja cuando se requieren desarrollar equipos compactos. <sup>[7]</sup>



**Figura 6.** Espectro de emisión para un arreglo de LEDs.

### 2.2.2. Selectores de longitud de onda

El aislamiento de una radiación de una determinada longitud de onda desde la fuente de radiación puede conseguirse mediante filtros o monocromadores. En los instrumentos más sencillos se utilizan filtros de interferencia, filtros de vidrio coloreado.

De todos ellos, los filtros de interferencia son los más utilizados, pues los filtros transmiten más radiación y son menos costosos que los monocromadores. En el caso de equipos más complejos se utilizan monocromadores con redes que permiten la obtención de espectros con mayor resolución. <sup>[8]</sup>

### 2.2.3. Compartimiento de Muestras

Las cubetas utilizadas para las mediciones son generalmente rectangulares, por lo menos con dos caras adyacentes transparentes, pero también pueden ser cilíndricas. Las dos caras restantes pueden ser también transparentes o pueden tener una superficie reflectante para dirigir la emisión del haz al detector. Las cubetas de cuarzo se utilizan para medir radiaciones de luz UV-Visible y las de vidrio pueden utilizarse para medir solamente en la zona visible y son más económicas.

En muchos casos, se desea tener la capacidad de analizar un número relativamente elevado de muestras de forma simultánea, en vez de un análisis secuencial. En estos casos se emplean porta-muestras como los micropozos, que son bandejas que poseen contenedores en arreglos en el plano o cuadrícula. Estos contenedores se utilizan en los ensayos de inmuno-adsorción ligado a enzimas, denominado comúnmente ELISA, las cuales son fabricadas en material polimérico y sirven directamente como porta-muestras. <sup>[7]</sup>

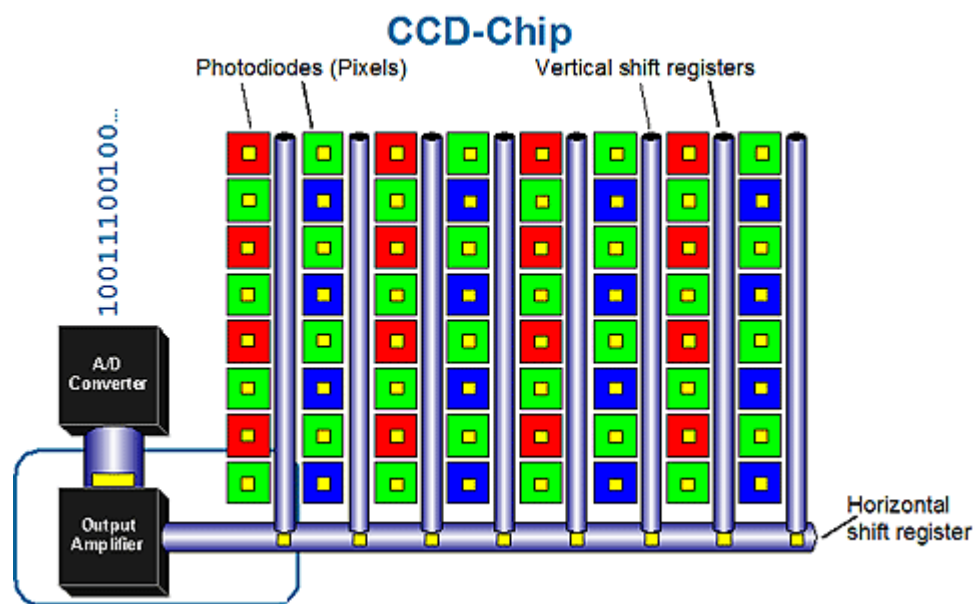
### 2.3.4. Detectores

Los detectores más utilizados en espectrometría son los tubos fotomultiplicadores. Más recientemente se vienen empleando detectores de estado sólido como las cámaras CCD, cuyo funcionamiento se basa principalmente en el sistema de procesamiento de imágenes. <sup>[5]</sup>



### 2.3.4.1. Cámara CCD como Detectores de Luz

Cuando adquirimos una imagen con una cámara digital, tenemos una serie de puntos en el área de la imagen conteniendo un color como una representación del modelo de color (R,G,B), que define el color e intensidad de la misma. Esto representa el principio básico de los sistemas de detección CCD (ver figura 7)



**Figura 7.** Esquema de un detector CCD

Hoy en día puede resultar común el término CCD, derivado del inglés término dispositivo de carga acoplada (*Charge Coupled Device*), ya que es uno de los elementos principales de las cámaras fotográficas y de videos digitales. En éstas, el

CCD es el sensor con pequeñas celdas fotoeléctricas que registran la imagen. Esta imagen es procesada por la cámara y registrada en la tarjeta de memoria o en una pantalla. La capacidad de resolución o detalle de la imagen depende del número de celdas fotoeléctricas del CCD. Este número se expresa en píxeles. A mayor número de píxeles, mayor resolución. Los píxeles del CCD registran la imagen en código RGB, por lo cual tres píxeles, uno para cada color, forman un conjunto de celdas fotoeléctricas capaz de captar cualquier color en la imagen (ver figura 8). Los detectores CCD al igual que las celdas fotovoltaicas, se basan en el efecto fotoeléctrico: la conversión la luz recibida o incidente en corriente eléctrica. La sensibilidad del detector CCD depende de la eficiencia cuántica, es decir la cantidad de fotones que deben incidir sobre cada detector para producir una corriente eléctrica. El número de electrones producido es proporcional a la cantidad de luz recibida. <sup>[9]</sup>

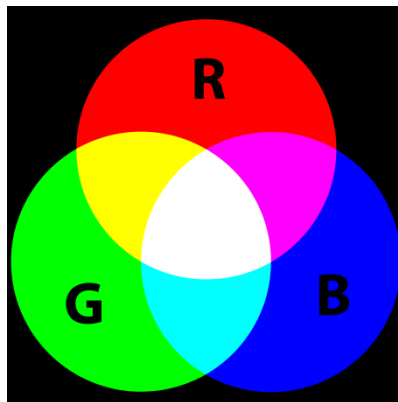


**Figura 8.** Detector CCD.

#### 2.3.4.2. Modelo aditivo de color RGB

El modelo de color RGB es un modelo aditivo de color en donde luz de color Rojo (Red) Verde (Green) y Azul (Blue) son combinadas en diferentes proporciones para generar una muy amplia gama de colores. El propósito del modelo RGB es generar una forma numérica de representación de los colores percibido por los humanos para sistemas electrónicos, tales como televisores, computadoras, cámaras, etc.

En la figura 9 se representan tres haces de luz: uno azul, uno verde y uno rojo que se proyectan en una pantalla negra y que se superponen parcialmente. La intensidad es nula en ausencia de luz y por lo tanto cada componente genera el color más oscuro, es decir el color negro, mientras que la intensidad máxima de los tres haces generaría el color blanco (zona central), esto es cuando el sistema está totalmente iluminado. <sup>[9]</sup>



**Figura 9.** Representación del principio del modelo aditivo de color RGB.

La zona de superposición de dos haces, por ejemplo el verde y rojo, genera el color amarillo. Si uno de estos dos haces posee mayor intensidad que el otro generaría

un amarillo verdoso o un amarillo rojizo (naranja). Entonces se puede generar una gama de colores muy grande solo con variar la superposición de estos tres haces y la intensidad de cada uno de ellos. La gran utilidad del modelo RGB se evidencia cuando lo llevamos a una representación numérica. El color se expresa como un triplete (R,G,B) en donde cada componente varía desde cero (ausencia total) hasta un máximo dado, si los tres componentes son cero (0,0,0), se obtiene el negro, por otro lado si todos poseen el valor máximo se genera el blanco. En el caso de sistemas digitales el máximo número viene expresado por la resolución digital, en el caso de un sistema de resolución de 8 bits (esto es  $2^8$ ) el máximo de 255, en el caso de una resolución de 16 bits ( $2^{16}$ ) será 65.535. en el caso que se quiera representar el color rojo puro con 8 bits se escribiría (255,0,0) es decir intensidad máxima para el componente R (rojo) intensidad cero para el componente G (verde) y cero para el B (azul). Para la representación de 16 bits será (65.535,0,0). Para representar cualquier tono de amarillo se deberá incrementar el componente verde. Mientras más elevada sea la resolución, mayor será la capacidad de reproducir mayor gamma de colores. <sup>[9]</sup>

#### **2.4. Imágenes digitales y espectroscopia**

El uso de imágenes digitales en la espectroscopia abrió un campo enorme de aplicaciones, así como de las posibilidades de tratamiento de las mismas mediante computadoras, conllevan a un ahorro sustancial de tiempo comparado con sistemas espectroscópicos convencionales. En particular la capacidad de tomar información simultánea de un gran número de muestras que posteriormente serán tratadas matemáticamente para extraer información como absorción, fluorescencia, entre otras propiedades. Sumado esto al hecho del desarrollo acelerado de cámaras con mayor resolución y de menor costo, cada día ha generado que sea más común encontrar desarrollos instrumentales de técnicas espectroscópicas con detección de imágenes,

para la realización de análisis clínicos de laboratorio, en consecuencia, diferentes autores han reportado aplicaciones de cámaras web en el análisis de distintos tipos de muestras biológicas, alimentos, etc. Todos los autores coinciden en la potencialidad del desarrollo de equipos muy económicos, ensamblados con componentes comúnmente empleados en computadoras. Abriendo esto la posibilidad de una nueva generación de equipos portátiles. <sup>[10] [11] [12] [13]</sup>

### 3. DESARROLLOS RECIENTES DE INSTRUMENTOS ESPECTROSCÓPICOS CON DETECCIÓN DE IMÁGENES

**N. Maleki y colaboradores** <sup>[14]</sup> (2004) trabajaron en una red neuronal artificial (RNA) el cual es un modelo desarrollado para la determinación simultánea de Al (III) y Fe (III) en aleaciones de cromo utilizando azulol S (CAS) como el reactivo cromogénico y una cámara CCD como el sistema de detección. La cámara suministra datos estándares de código RGB con una resolución de 8 bits. Todos los datos de calibración, la predicción y la de muestras reales se obtuvieron mediante la adopción de una sola imagen. Las condiciones experimentales se establecieron para reducir las interferencias y aumentar la sensibilidad y la selectividad en el análisis de Al (III) y Fe (III). De esta manera, tanto Al (III) y Fe (III) se puede determinar en el intervalo de concentraciones de 0,25 a 4 mg ml<sup>-1</sup> con una respuesta satisfactoria y precisa. El método propuesto se aplicó también satisfactoriamente a la determinación de iones metálicos considerados en dos aleaciones sintéticas.

**D. Filippini y colaboradores** <sup>[10]</sup> (2007) realizaron un trabajo en donde se demuestra por primera vez y en el caso de una muestra compleja como el vino tinto, que también la cuantificación de los parámetros integral (indicadores de color) y compuestos específicos (polifenoles totales) es posible a través de un análisis

multivariado de CSPT huellas dactilares. La mayoría de las propiedades del método se deben a la combinación de emisión de luz y las propiedades de absorción, que son capturados por la plataforma CSPT. Gracias a esta combinación, una huella digital CSPT puede contener una cantidad comparable de información con respecto a los espectrofotómetros estándar. Mediciones del vino se realizaron en muestras intactas sin la intervención de mediadores químicos. Dado que las funciones de cálculo, captura de vídeo y la pantalla se incrustan en un número cada vez mayor de equipos ubicuamente distribuidas (desde ordenadores portátiles a teléfonos celulares), estos resultados indican una metodología viable de bajo costo y ampliamente difundido capacidades analíticas

**Castillo y colaboradores** <sup>[1]</sup> (2007) presentan un prototipo portátil de bajo costo de multi-lector de placas bien diseñado para el análisis clínico. En el que una emisión de luz diodos (LED) se utiliza como fuente de excitación y una webcam de bajo costo como detector. La fuente de luz ilumina 96 placas y la cámara tome la imagen de 640x480 píxeles. Los datos son adquiridos y procesados mediante el uso de una computadora portátil y 96 muestras se pueden leer de manera simultánea y los datos de absorción de la luz se procesan mediante un software MATLAB diseñado en su laboratorio para obtener curvas de calibración y la concentración de las muestras. El sistema fue evaluado utilizando diferentes soluciones en serie de analitos: rojo neutro, cobre (II) complejos de amoniaco y naranja de metilo. Los resultados muestran que es posible medir pocos microlitros de soluciones con exactitud y una precisión adecuada de menos del 3%. Teniendo una posible aplicación clínica analítica, también se realizó la determinación de hierro a través de Fe (III)-tiocianato. Este método se aplica generalmente en el suero de análisis de muestras. La sensibilidad alcanzados con las configuraciones de instrumentación propuesto permite el análisis de hierro en muestras de suero en las referencias de los valores del rango normal (0,75 - 1,5 mg / L) en humanos.

**A. Alimelli y colaboradores** <sup>[17]</sup> (2007) realizaron un trabajo en el que se ha demostrado que con el uso combinado de una pantalla de ordenador y una webcam proporciona una plataforma para medir las propiedades ópticas de las muestras líquidas y sólidas. Aquí el método se utiliza para medir el cambio de absorbancia en un procedimiento de análisis destinados a determinar la cantidad de cromo hexavalente (Cr (VI)) en el agua. El método de calibrado en las soluciones estándar ha sido probado en campo en las aguas de manantial contaminada de manera natural. Los resultados muestran una resolución suficiente para medir el Cr (VI) de concentración de hasta 5 ppb. La Organización Mundial de la Salud recomienda una concentración máxima de 0,05 mg / l (50 ppb) para el cromo (como hexavalente) en aguas potables.

**Recientemente Fernández y colaboradores** <sup>[15]</sup> (2009) trabajaron en la aplicación de un lector de placas de ELISA que emplea como fuente LEDs luminosos y una webcam como detector que les permite determinar la concentración de soluciones coloreadas en los 96 pozos de la placa de ELISA simultáneamente. Se diseñó un software que permite tomar imágenes de la placa de ELISA, digitalizarla, separarla en sus componentes RGB e intensidad. De esta manera se transforman las imágenes en superficies de respuesta de intensidades para cada color al que responde los filtros de la cámara, permitiendo de esta forma al compararlo con una referencia, calcular la absorbancia de un punto en particular de la imagen y así mediante una curva de calibración obtener la concentración de una determinada sustancia en ese punto. El sistema diseñado se empleó para medir concentraciones de glucosa, cuyos valores oscilaron entre 700 y 1050 mg L<sup>-1</sup> en sangre de ratas.

#### 4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PROYECTO

El análisis de muestras biológicas se realiza en la actualidad de manera exclusiva en centros asistenciales que poseen la tecnología necesaria. Esta tecnología consta en la mayoría de los casos de grandes analizadores químicos que requieren reactivos específicos y que confieren altos costos a las pruebas bioquímicas; además de una limitada disponibilidad.

En la actualidad existe una nueva tendencia de atención al paciente llamada *Point of Care* (POC) en la que se pretende aumentar el número de pruebas que puedan realizarse en el mismo lugar donde se atiende al paciente. Esto facilitaría el procesamiento de muestras al disminuir los costos y el tiempo de entrega de los resultados.<sup>[2]</sup>

En este trabajo se propone un prototipo de lector de absorbancia para ser utilizado en muestras sintéticas y biológicas como futura aplicación al análisis clínico.

Este prototipo ofrece la posibilidad de realizar determinaciones bioquímicas de un elevado número de muestras de manera simultánea, sin necesidad de trasladar al paciente a un centro asistencial, contribuyendo al desarrollo del *Point of Care*.

En el presente trabajo se realizara la evaluación integral del prototipo mencionado, proponiendo en una primera fase las modificaciones instrumentales necesarias para optimizar el procesamiento de las muestras y en una segunda fase la evaluación cuantitativa en muestras biológicas, con el fin de garantizar la obtención de resultados adecuados.



## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo General**

Evaluar un prototipo de lector de absorbancia, para ser utilizado en el análisis cuantitativo de analitos de interés en muestras biológicas como futura aplicación al análisis clínico, usando como sistema de detección una cámara digital, y como fuente de iluminación difusa.

### **5.2. Objetivos Específicos**

- Calibrar la respuesta espectral del sensor CCD de la cámara digital por medio de la medición del espectro de una tarjeta de calibración IT8.
- Evaluar la sensibilidad del software utilizando las imágenes tomadas con una cámara CCD a muestras sintéticas patrones de distintas concentraciones.
- Determinación de concentración de analitos de interés clínico en muestras biológicas utilizando reacciones colorimétricas cuya intensidad pueda ser cuantificada por el software evaluado.

## 6. PARTE EXPERIMENTAL

### 6.1. Materiales

#### 6.1.1. Cubetas.

Se utilizaron cubetas de plástico para realizar las medidas, debido a que se trabajó en la zona del visible. En la figura 10 se muestra una de estas cubetas.



**Figura 10.** Cubeta de cuarzo. <sup>[19]</sup>

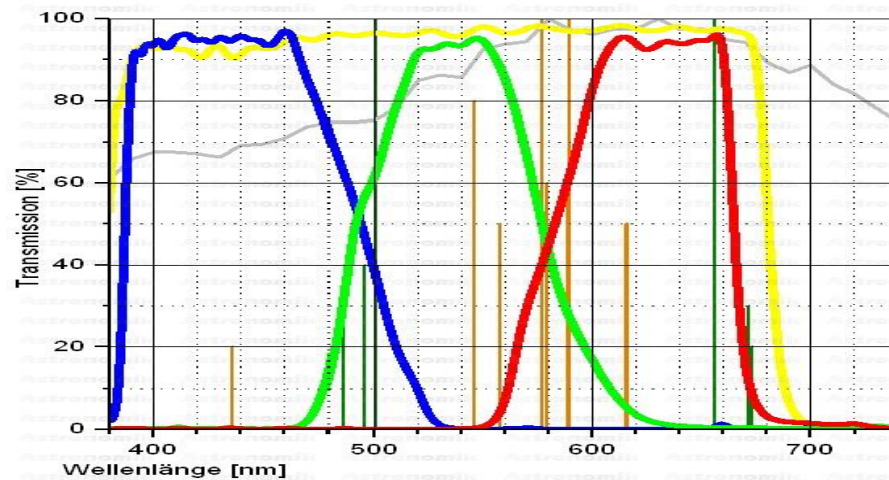
#### 6.1.2. Fuente de iluminación.

Se utilizó como fuente de iluminación una lámpara incandescente comercial, que posee una buena eficiencia energética, y tiene un espectro de emisiones continuo logrando contener todas las longitudes de onda en la parte que emite del espectro.

### 6.1.3. Cámara fotográfica.

Se empleó como sistema de detección una cámara fotográfica digital comercial marca Canon modelo power shot A570ls, con una resolución de 7.1 megapíxel, Zoom de 4x, lente de 5.8-23,2 mm y aperturas de f/2.6 a f/5.5, usando la opción macro. La cámara nos permitió obtener las imágenes en dos tipos de archivo RAW y JPG con la finalidad de comparar la sensibilidad, debido a que el archivo Raw es un formato de archivo digital que contiene la totalidad de los datos de la imagen tal y como ha sido captada por el sensor digital de la cámara fotográfica, mientras que el utiliza habitualmente un algoritmo de compresión con pérdida para reducir el tamaño de los archivos de imágenes. Esto significa que al descomprimir o visualizar la imagen no se obtiene exactamente la misma imagen de la que se partía antes de la compresión.

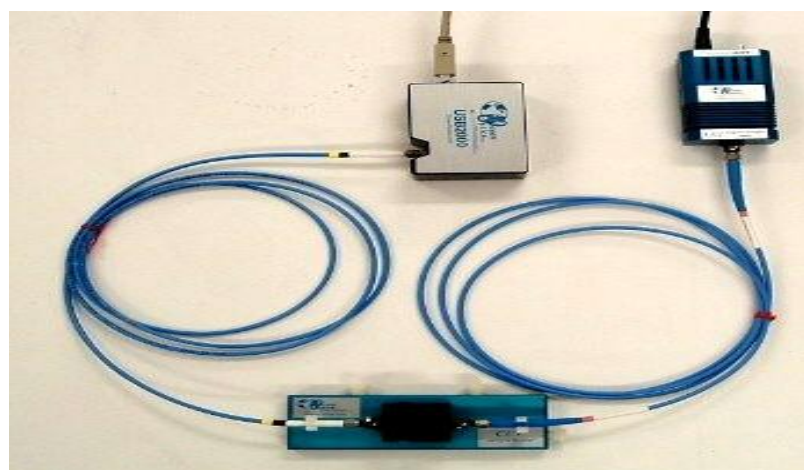
En general la curva de sensibilidad de los elementos detectores de la CCD se muestra en la figura 11. En esta gráfica se muestra la variación de la respuesta espectral en (u.a) en función de la longitud de onda (nm), para las curvas de sensibilidad de los tres componentes: rojo, verde y azul que cubren el intervalo de longitudes de ondas desde 390 a 720 nm. Al seleccionar el componente azul, estaríamos registrando la intensidad correspondiente a la luz debida a los fotones en la zona de 380 a 540 nm, en el caso de seleccionar el verde estaríamos registrando en zona de 460 a 600 nm y en el caso del rojo corresponderían fotones de 540 a 690 nm.



**Figura 11.** Espectro Típico de la respuesta espectral de una cámara digital CCD.

#### 6.1.4. Espectrómetro

Se utilizara un espectrómetro de fibra óptica Ocean Optics modelo USB2000. Lámpara de tungsteno, detector lineal CCD de 2048 pixeles y de 42 mm de distancia focal, porta celda provista de cuatro conexiones tipo sma para fibras óptica y contenedor para celdas de un 1 cm de paso. En la figura 12 se muestra el equipo a utilizar.



**Figura 12.** Espectrómetro Ocean Optics USB2000. <sup>[21]</sup>

### **6.1.5. Reactivos**

#### **Muestra Sintética**

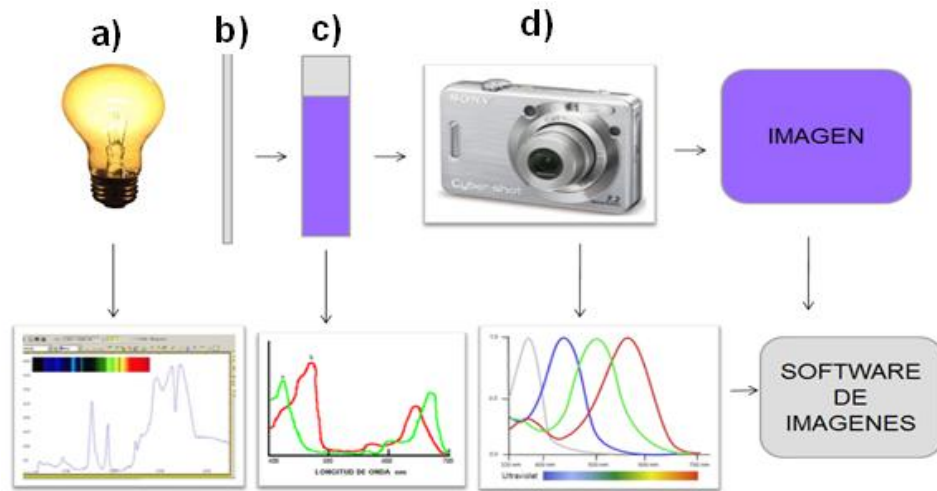
- Azul de bromofenol (sólido)

#### **Muestras biológicas**

- Kit de glucosa oxidasa líquida estable, marca Invelab.
- Suero Sanguíneo humano.

### **6.2. Montaje experimental desarrollado**

Para realizar las medidas necesarias y obtener las imágenes de las muestras, se creó un montaje en el laboratorio de espectroscopia láser de la escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela mostrado en la figura 13.



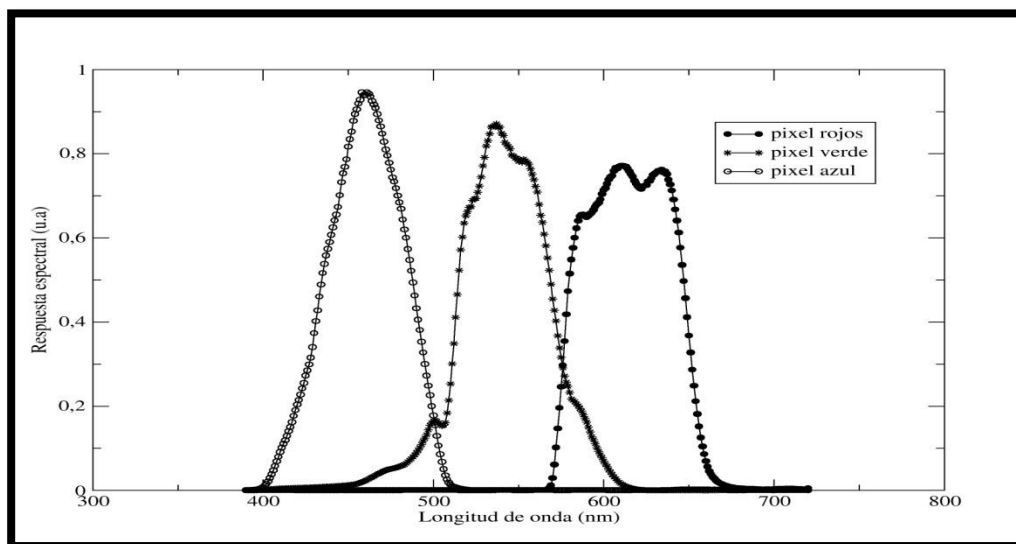
**Figura 13.** Esquema del montaje. (a) fuente de luz y espectro de emisión respectivo, (b) placa difusora, (c) celda con muestra y espectro de absorción de la misma, (d) cámara digital y respuesta espectral de la CCD.

Para realizar las medidas en el montaje elaborado, se procede a llenar con la solución de interés la cubeta y su respectivo blanco. Luego la solución es colocada sobre una base frente a la placa difusora y seguida a esta se encuentra la cámara CCD que nos permite tomar la fotografía.

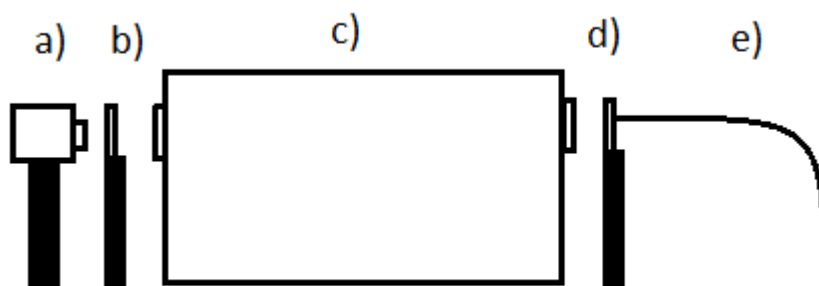
## 7. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

### 7.1. Respuesta espectral de la cámara CCD

. Esta respuesta se obtuvo a partir de la imagen tomada por la cámara de un patrón de calibración de color IT8, mediante un *software* especial desarrollado para este trabajo. El *software* recibe como entrada la imagen del patrón de color (una cuadrícula con toda la gama de colores del espectro visible) y los espectros de reflectancia de cada color, y genera la respuesta espectral para los tres tipos de elementos sensores que tienen los detectores CCD, rojo, verde y azul (RGB). Sin embargo la respuesta espectral obtenida con la tarjeta IT8 no fue lo suficientemente buena para realizar las medidas cuantitativas. Para ello se empleó una segunda respuesta espectral utilizando un monocromador (ver figura 15), donde se realizó el mismo procedimiento obteniendo la imagen de patrón de color, a longitudes de onda comprendida entre 390 y 720 nm y su respectivo espectro de reflectancia para cada valor. Esto generó una buena respuesta espectral como se muestra en la figura 14, lo que permitió poder realizar las medidas y obtener buenos valores.



**Figura 14.** Respuesta espectral obtenida para la cámara CCD utilizada.



**Figura 15.** Montaje a) cámara digital, b) lente, c) monocromador, d) lente, e) fibra óptica.



## 7.2. Procesamiento de la imagen digital

Una vez obtenida la imagen digital de la solución a cuantificar, se utiliza un programa computacional para seleccionar solo la zona de la cubeta que posee las dos soluciones tanto la coloreada como el blanco y son almacenadas al ordenador en una respectiva carpeta para ser procesada por el software desarrollado mediante el programa Matlab®.

El proceso comienza con introducir la imagen en el software, este lee la foto del blanco y calcula su intensidad  $I_b$  (en el canal R,G o B), luego lee la foto de la muestra y calcula su intensidad  $I_m$  (en el canal R,G o B). Después que tiene las respuesta de estas intensidades normaliza la señal de la muestra con la del blanco  $I_m/I_b=I_{Exp}$ .

Posteriormente realiza un ajuste no lineal minimizando el error de la ecuación general, obteniéndose el valor de  $\alpha$  que minimiza el error  $E_{(\alpha)}$  donde  $E_{(\alpha)}=(I_{Exp}-I_{teo(\alpha)})^2$ .

$$I_{Teo(\alpha)} = \int L(\lambda) (R,G,B)_c T_m(\lambda) \text{ donde } T_m(\lambda) = (T_p)^\alpha$$

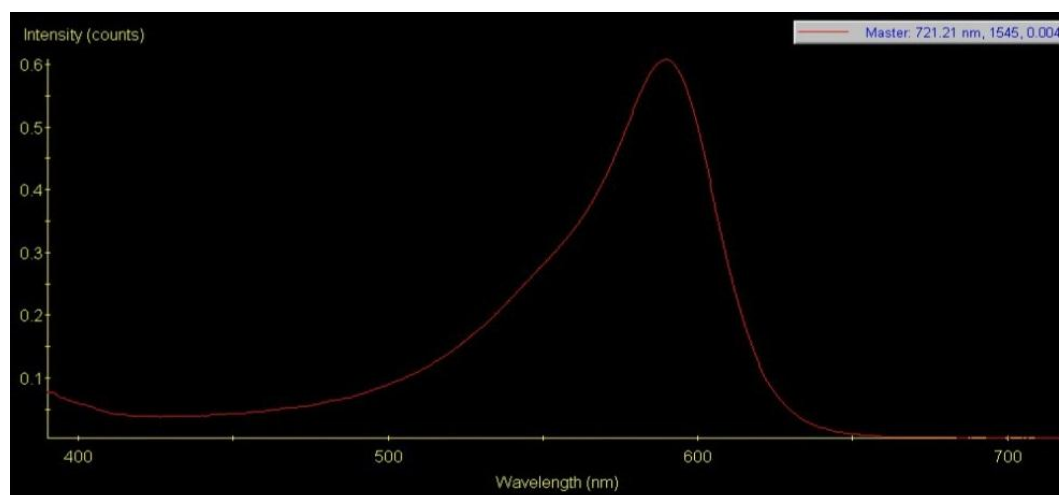
**Ecuación 1.** Fórmula utilizada por el programa para la determinación de absorbancia.

El valor de  $\alpha$  está relacionado con la absorbancia de la muestra, donde  $A_m=\alpha A_p$ , Siendo  $A_m$  la absorbancia de la muestra y  $A_p$  la absorbancia del patrón. La siguiente ecuación general representa todos las variables necesarias para determinar la absorbancia.

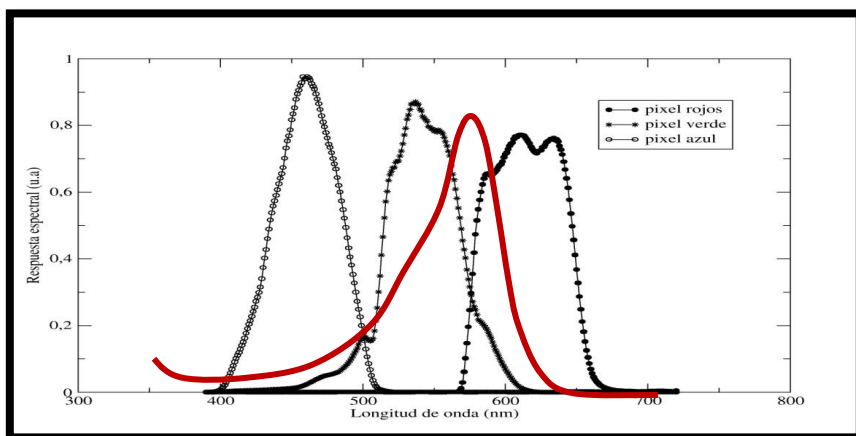
Para introducir las variables de la integral, primero se realiza la caracterización espectral del equipo ( $L(\lambda)$ ) introduciendo al ordenador los espectros de las fuentes de luz que se vaya a utilizar (lámpara incandescente, fluorescente, LEDs.) etc. En una segunda fase los espectros de muestras de concentración conocida ( $T_m(\lambda)$ ) como soluciones sintéticas preparadas a distintas concentraciones, y por ultimo determinar la respuesta espectral de la cámara digital ( $(R,G,B)_c$ ).

### 7.3. Estudio con soluciones sintéticas.

En la figura 16, se presenta el espectro de absorción de azul de bromofenol, obtenido con un espectrofotómetro comercial. Se puede observar que el máximo de absorción se presenta en 589 nm. Una superposición del espectro de absorción del azul de bromofenol (línea roja) al espectro típico RGB del detector CCD (ver figura 17) permite determinar que la banda de absorción del azul de bromofenol se encuentra en la zona que comprende los colores verde y rojo, en las coordenadas RGB.



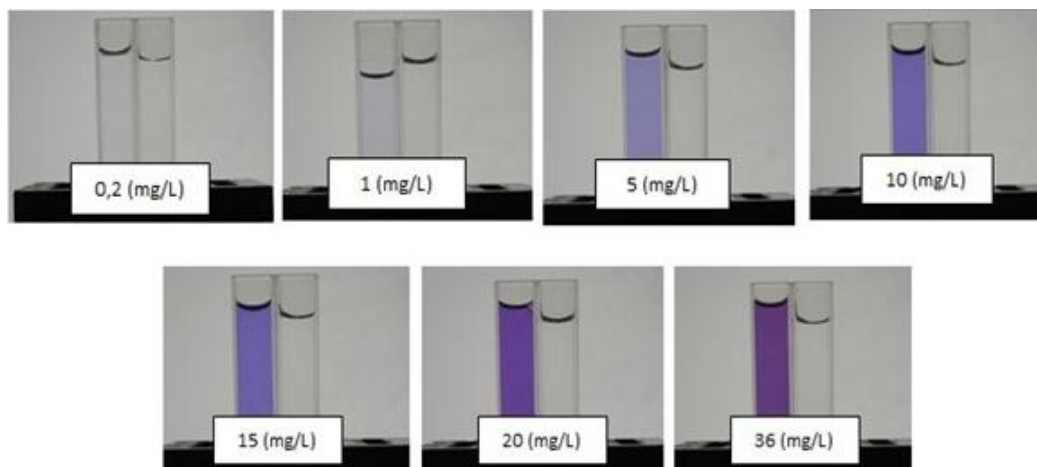
**Figura 16.** Espectro de absorción para una solución de azul de bromofenol.



**Figura 17.** Superposición (cualitativa) con el espectro del azul de bromofenol (línea negra) al espectro RGB.

#### 7.4. Evaluación Instrumental

En la figura 18, se presentan las imágenes captadas por la cámara digital en la cual se han colocado muestras de azul de bromofenol preparadas a diferentes concentraciones (0,2 a 36 mg/L), con su blanco o referencia.



**Figura 18.** Imágenes obtenidas con el montaje ensamblado de las muestras de azul de bromofenol preparadas a diferentes concentraciones.

Se puede observar claramente las distintas tonalidades de las soluciones obtenidas, mediante el montaje desarrollado.

### 7.5. Estudio de la Reproducibilidad.

Para evaluar la reproducibilidad instrumental se procedió a adquirir las imágenes por triplicado en intervalos de tiempo de 3 minutos. En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos de las 3 réplicas realizadas, y se procedió a determinar la medida promedio para cada una con su desviación estándar. Puede observarse que la desviación con respecto al promedio es muy pequeña y que las variaciones observadas se pueden atribuir a errores aleatorios. Estos resultados nos permiten asegurar que la reproducibilidad en el tiempo del sistema instrumental propuesto es aceptable.

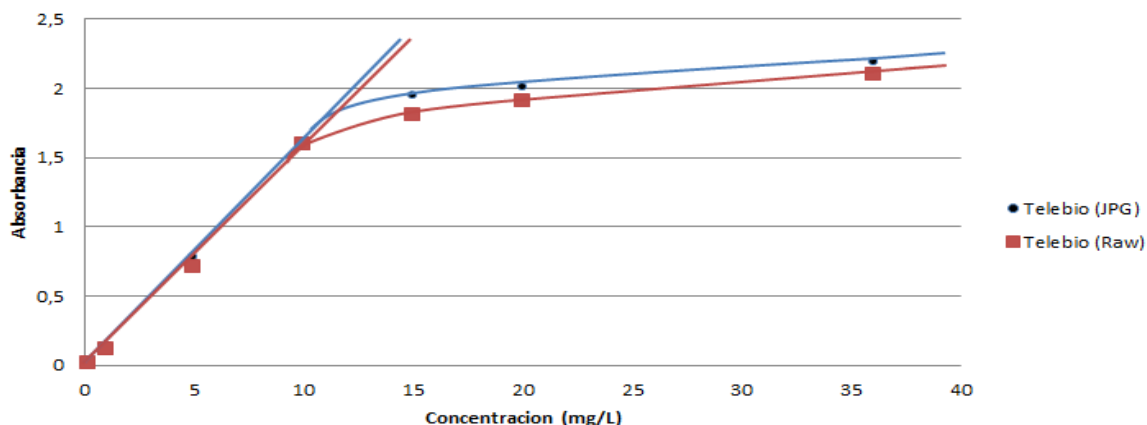
**Tabla 1.** Estudio de la reproducibilidad en las absorbancias medidas en los dos tipos de archivos Raw y JPG.

<b>Absorbancia (Raw)</b>			<b>Promedio Absorbancia</b>	<b>Desviación estándar</b>
0,015	0,018	0,014	<b>0,016</b>	0,002
0,119	0,122	0,114	<b>0,118</b>	0,004
0,708	0,714	0,708	<b>0,710</b>	0,003
1,596	1,601	1,598	<b>1,598</b>	0,003
<b>Absorbancia (JPG)</b>			<b>Promedio Absorbancia</b>	<b>Desviación estándar</b>
0,013	0,016	0,011	<b>0,013</b>	0,003
0,116	0,117	0,113	<b>0,115</b>	0,002
0,787	0,789	0,792	<b>0,789</b>	0,003
1,602	1,605	1,599	<b>1,602</b>	0,003

## 7.6. Curvas de calibración para azul de bromofenol

Se realizó una curva de calibración con la finalidad de evaluar el sistema, para ello se prepararon soluciones patrones de 0.2, 1, 5, 10, 15, 20, 36 mg/L, y se procedió a tomar la imagen para cada una de ellas en los dos formatos RAW y JPG.

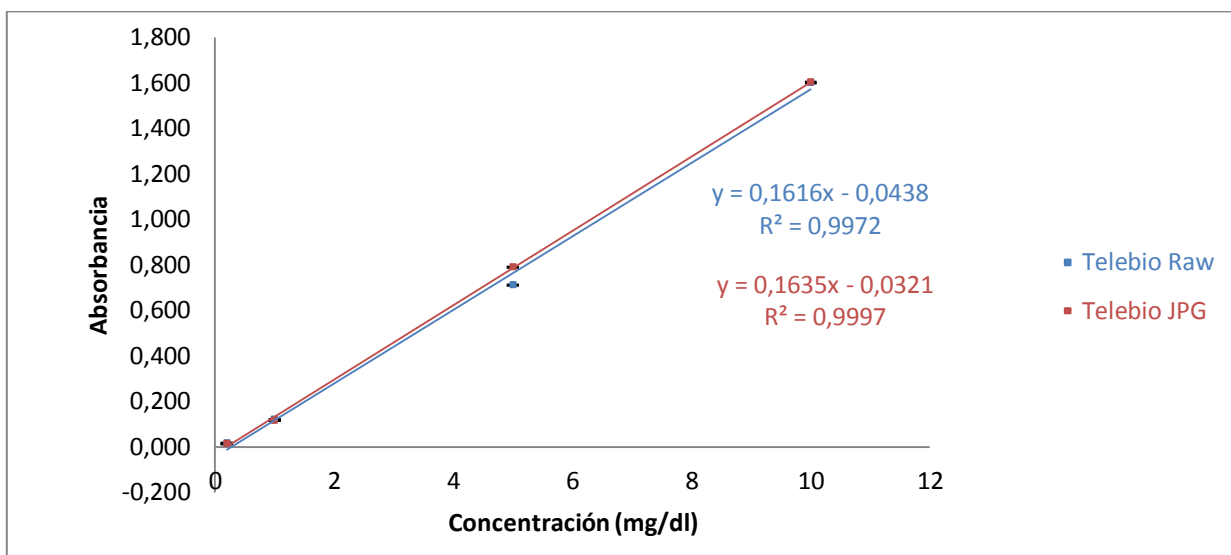
Las señales se graficaron en función de su concentración; en la figura 19 se presentan los resultados obtenidos. Se puede observar que en el intervalo de 0 a 10 mg/L existe una tendencia lineal con elevada pendiente, que luego decrece producto de la saturación.



**Figura 19.** Representación gráfica de la variación de la señal de azul de bromofenol en función de la concentración para el formato Raw y JPG.

En la figura 20 observamos la curva de calibración obtenida al eliminar los valores donde se observa la saturación, dejando los valores comprendidos desde 0 a 10 mg/L, al ver los parámetros analíticos de la curva de calibración (ver tabla 2) se

observa que la curva en formato JPG presenta una ligera sensibilidad mayor a la del tipo de archivo Raw y coeficiente de correlación. Sin embargo presentan el mismo intervalo de medidas, pudiendo así utilizarse los dos tipos de archivos para realizar las medidas.



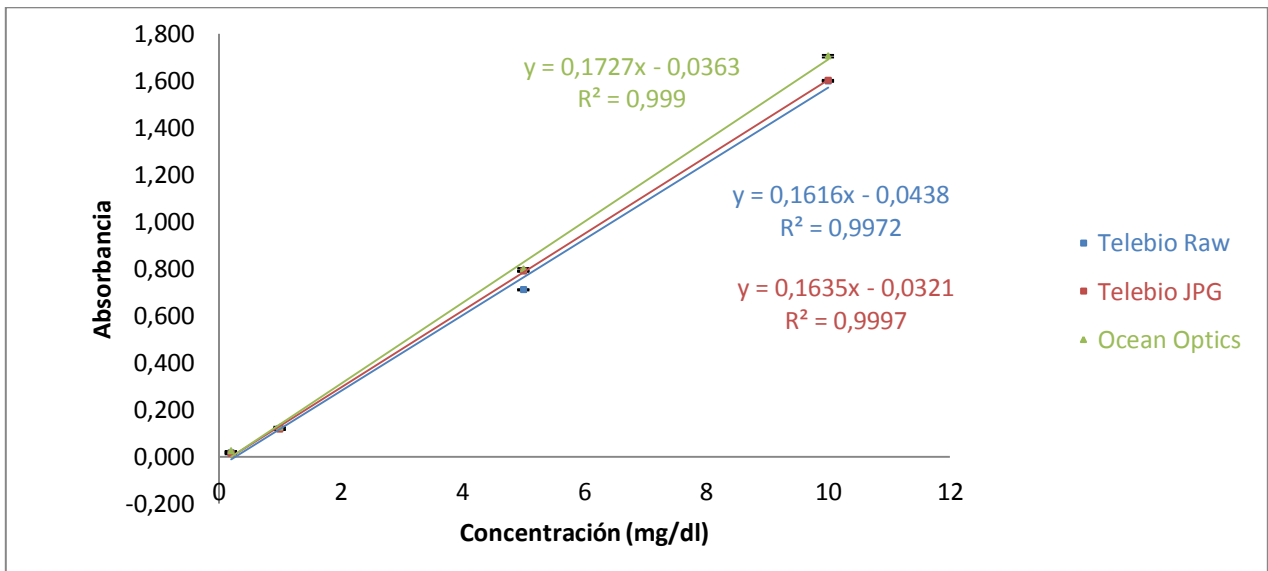
**Figura 20.** Curva de calibración con solo valores comprendidos de 0 a 10 mg/L para el formato Raw y JPG.

**Tabla 2.** Parámetros analíticos de la curva de calibración, para el sistema colorimétrico con ambos tipos de archivos Raw y JPG.

Equipo	a (mg/dl)	b	R <sup>2</sup>	Intervalo de trabajo (mg/L)
Sistema Colorimétrico (JPG)	0,1635	-0,0321	0,9997	0,2-10
Sistema colorimétrico (Raw)	0,1616	-0,0438	0,9972	0,2-10

Para efectos comparativos del sistema colorimétrico desarrollado, se procedió a construir una curva de calibración para la misma serie de soluciones patrones empleando un espectrofotómetro comercial (Ocean Optics USB 2000).

Se observa en la figura 21 que el sistema de medición propuesto presenta una sensibilidad relativamente igual al espectrómetro convencional. En otros trabajos previamente reportados <sup>[1][15]</sup> la sensibilidad reportada para el sistema colorimétrico fue mucho menor comparado con la de un espectrofotómetro comercial, y esto se atribuye al hecho de que la cámara web no es selectiva en la longitud de onda de medición de la absorbancia, sino que utiliza radiación policromática del canal RGB utilizado. Si se comparan los parámetros de la curva de calibración de ambos sistemas (ver tabla 3) se observa que estos poseen el mismo intervalo dinámico lineal, e igual coeficiente de correlación. Estos resultados indican que el sistema colorimétrico es comparable al espectrómetro convencional.



**Figura 21.** Curvas de calibración del sistema colorimétrico propuesto y un espectrofotómetro comercial.

**Tabla 3.** Parámetros analíticos de la curva de calibración, para el sistema colorimétrico y un espectrómetro comercial.

Equipo	a (mg/dl)	b	R <sup>2</sup>	Intervalo de trabajo (mg/L)
<b>Ocean Optics</b>	<b>0,1727</b>	<b>-0,0363</b>	<b>0,9990</b>	<b>0,2-10</b>
Sistema colorimétrico (Raw)	0,1616	-0,0438	0,9972	0,2-10
<b>Sistema Colorimétrico (JPG)</b>	<b>0,1635</b>	<b>-0,0321</b>	<b>0,9997</b>	<b>0,2-10</b>

Después que se obtuvo una buena sensibilidad, linealidad y reproducibilidad en las medidas con una solución patrón se procedió a llevar el sistema colorimétrico a medidas con muestras de interés clínico, en este caso la determinación de glucosa en suero sanguíneo humano.

### 7.7. Preparación de la muestra

Las muestras de suero sanguíneo, fueron obtenidas de pacientes humanos, suministradas por la Lic. Ana Karina González Morao del laboratorio del Centro Médico de Caracas. Las muestras fueron procesadas siguiendo las indicaciones del protocolo establecido por la casa productora del reactivo utilizado.

### 7.8. Determinación de glucosa en suero sanguíneo.

Para la determinación cuantitativa de glucosa en sangre, se puede utilizar el método glucosa oxidasa enzimática colorimétrica. <sup>[22]</sup>



Este método emplea glucosa oxidasa que cataliza la oxidación de glucosa a peróxido de hidrógeno y ácido glucónico y una modificación de la reacción de color Trinder <sup>[23]</sup> catalizada por la enzima peroxidasa. En presencia de peroxidasa, la 4 aminoantipirina e hidroxibenzoato es oxidada por el peróxido de hidrógeno para dar una coloración roja debido a la formación de quinoneimina, cuya longitud de onda de absorción esta entre 500-520 nm. La intensidad de color de la reacción es proporcional a la concentración de glucosa en la sangre. Finalmente la determinación de la glucosa, se lleva a cabo mediante la siguiente ecuación:

$$C_m \text{ (mg/dl)} = \frac{A_m \times C_p}{A_p}$$

**Ecuación 2.** Fórmula para determinación de la concentración de glucosa mediante el método glucosa oxidasa enzimática colorimétrica

C<sub>p</sub>: Valor del patrón de glucosa en mg/dl.

A<sub>m</sub>: Absorbancia de la muestra

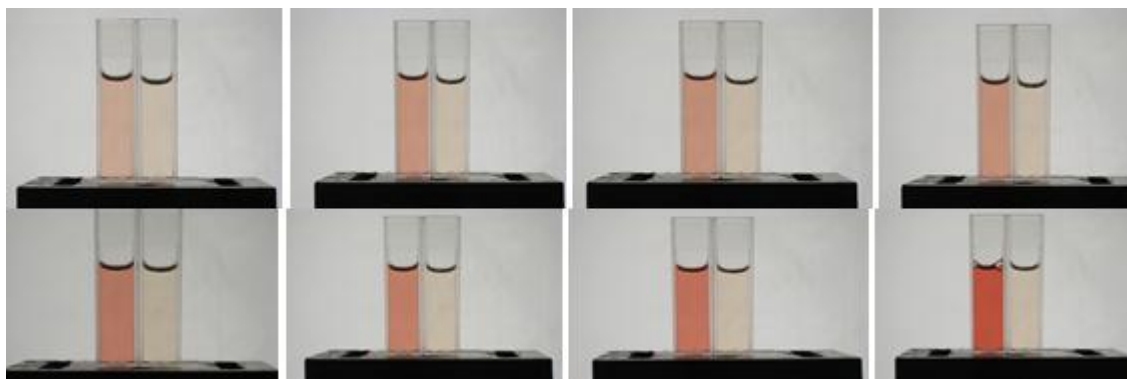
C<sub>m</sub>: Concentración de la muestra

A<sub>p</sub>: Absorbancia del patrón

El kit de reactivo proporciona un patrón de glucosa de 100 mg/dl para la determinación de la concentración de la muestra problema que es lo mismo a construir una curva de calibración con dos valores. Sin embargo se realizó una dilución del patrón de glucosa para obtener otro punto en la curva y asegurar mejores resultados.

### 7.8.1. Medidas realizadas

Después de obtener las muestras de suero sanguíneo y de llevar a cabo la reacción colorimétrica, se procedió a obtener las imágenes de las muestras tomadas mediante el sistema elaborado en ambos formatos tanto Raw y JPG, y se adquirieron tres imágenes de forma consecutiva en un lapso de 3 minutos. En la figura 22 se presentan las imágenes captadas por la cámara digital en la cual se han colocado la reacción colorimétrica de las muestras de suero y su blanco o solución de referencia.



**Figura 22.** Imágenes obtenidas con el montaje ensamblado de las muestras de suero sanguíneo luego de la incubación.

Se determinó el valor de absorbancia de la muestra del patrón de 100 mg/dl y 25 mg/dl con la finalidad de construir la curva de calibración.

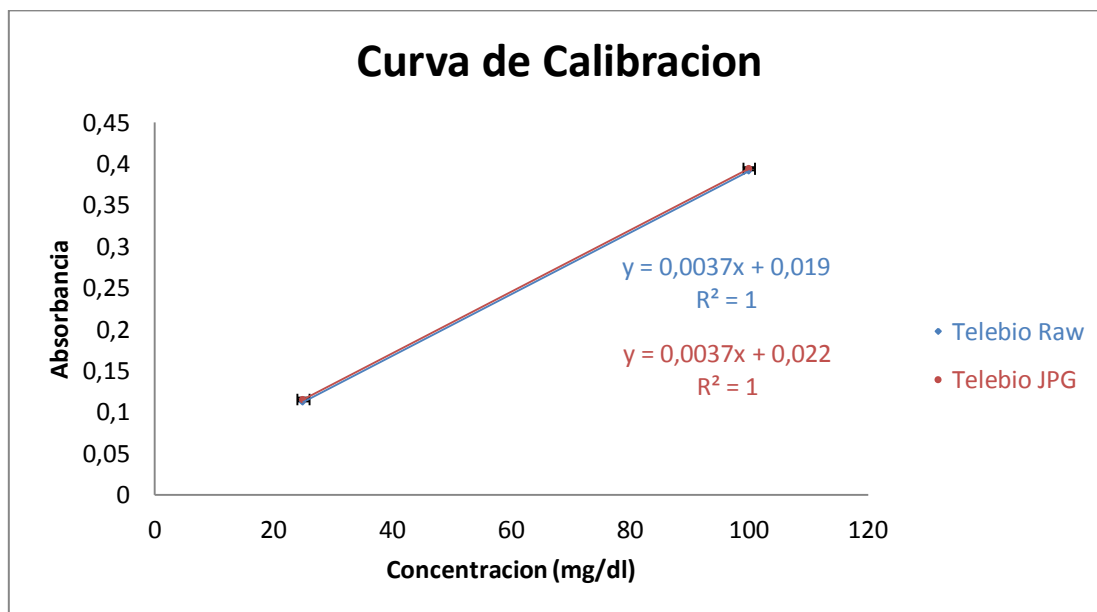
**Tabla 4.** Valor de absorbancia medido para el patrón de glucosa para archivo tipo Raw.

	Absorbancia			Promedio	Desviación Estándar
<b>Patrón 100 mg/dl</b>	0,392	0,393	0,390	0,391	0,002
<b>Patrón 25 mg/dl</b>	0,110	0,112	0,113	0,112	0,002

**Tabla 5.** Valor de absorbancia medido para el patrón de glucosa para archivo tipo JPG.

	<b>Absorbancia</b>			<b>Promedio</b>	<b>Desviación Estándar</b>
<b>Patrón 100 mg/dl</b>	0,392	0,394	0,397	0,394	0,002
<b>Patrón 25 mg/dl</b>	0,114	0,112	0,118	0,115	0,003

En la figura 23 se muestra la curva de calibración construida mediante el sistema para los dos tipos de archivos de foto. Si realizamos una sencilla comparación de los parámetros analíticos de las curvas ver (tabla 6), se observa que la pendiente para los dos tipos de archivos son iguales, pudiendo utilizar los dos para las medidas.



**Figura 23.** Curvas de calibración empleando el patrón de glucosa de 100 mg/dl para los dos tipos de archivos de foto.

**Tabla 6.** Parámetros analíticos de la curva de calibración, para el sistema colorimétrico con ambos tipos de archivos Raw y JPG.

Equipo	a (mg/dl)	b	R <sup>2</sup>	Intervalo de trabajo (mg/dl)
Sistema Colorimétrico (JPG)	0,0037	0,022	1	25-100
Sistema colorimétrico (Raw)	0,0037	0,019	1	25-100

Una vez obtenida la curva de calibración se procede a medir los valores de absorbancia de las muestras y su concentración, siguiendo el mismo parámetro para medir la reproducibilidad. Como se observa en la tabla 7,8 y 11 la desviación estándar del promedio es muy baja, lo que nos permite decir que la reproducibilidad sigue siendo aceptable para el sistema elaborado, aún cuando se trabaje con muestras sanguíneas.

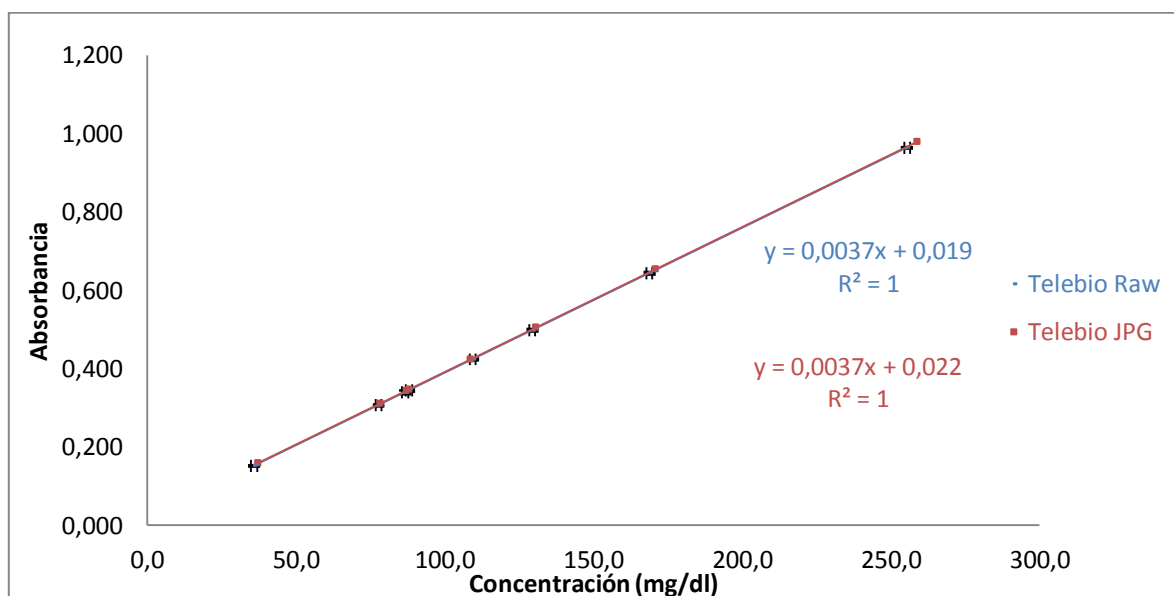
**Tabla 7.** Valores de absorbancia medidos mediante el sistema para el tipo de archivo Raw.

Muestra	Absorbancia (Raw)			Promedio	Desviación estándar	Concentración Telebio (curva de calibración mg/dl)
1	0,151	0,153	0,152	<b>0,152</b>	0,001	<b>35,9 ± 0,3</b>
2	0,306	0,309	0,305	<b>0,307</b>	0,002	<b>77,7 ± 0,6</b>
3	0,339	0,345	0,335	<b>0,340</b>	0,005	<b>86,7 ± 1,4</b>
4	0,344	0,342	0,348	<b>0,345</b>	0,003	<b>88,0 ± 0,8</b>
5	0,422	0,424	0,426	<b>0,424</b>	0,002	<b>109,5 ± 0,5</b>
6	0,499	0,501	0,494	<b>0,498</b>	0,004	<b>129,5 ± 1</b>
7	0,643	0,641	0,647	<b>0,644</b>	0,003	<b>168,8 ± 0,8</b>
8	0,965	0,962	0,965	<b>0,964</b>	0,002	<b>255,4 ± 0,5</b>

**Tabla 8.** Valores de absorbancia medidos mediante el sistema para el tipo de archivo JPG.

muestra	Absorbancia (JPG)			Promedio	Desviación estándar	Concentración Telebio (curva de calibración mg/dl)
1	0,159	0,164	0,156	<b>0,160</b>	0,004	<b>37,2 ± 1,1</b>
2	0,311	0,315	0,309	<b>0,312</b>	0,003	<b>78,3 ± 0,8</b>
3	0,343	0,346	0,344	<b>0,344</b>	0,002	<b>87,1 ± 0,4</b>
4	0,347	0,35	0,346	<b>0,348</b>	0,002	<b>88,0 ± 0,6</b>
5	0,425	0,421	0,427	<b>0,424</b>	0,003	<b>108,7 ± 0,8</b>
6	0,505	0,510	0,501	<b>0,505</b>	0,005	<b>130,6 ± 1,2</b>
7	0,653	0,657	0,652	<b>0,654</b>	0,003	<b>170,8 ± 0,7</b>
8	0,978	0,983	0,977	<b>0,979</b>	0,003	<b>258,7 ± 0,9</b>

En la figura 24 se representa la gráfica de los valores obtenidos de absorbancia en función de la concentración para los dos tipos de archivos. Se observa en los parámetros analíticos de la curva de calibración (ver tabla 9) que la curva en formato JPG presenta la misma sensibilidad a la del tipo de archivo Raw, coeficiente de correlación e intervalo de medidas, pudiendo así utilizarse los dos tipos de archivos para realizar las medidas.



**Figura 24.** Representación gráfica de la variación de la señal en función de la concentración para el formato Raw y JPG.

**Tabla 9.** Parámetros analíticos de la curva de calibración, para el sistema colorimétrico con ambos tipos de archivos Raw y JPG.

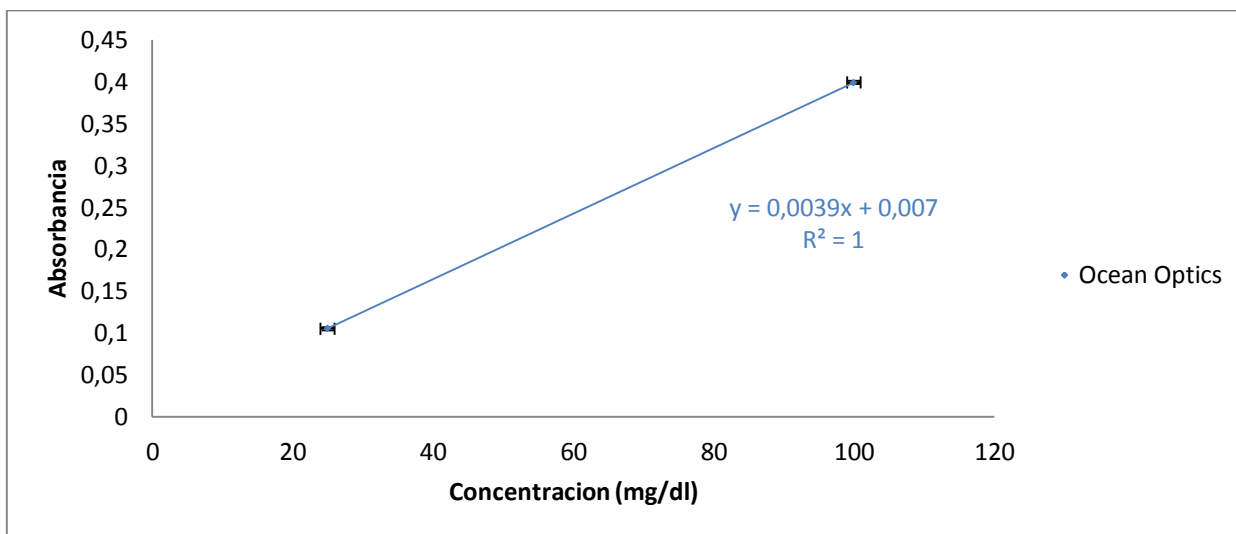
Equipo	a (mg/dl)	b	R <sup>2</sup>	Intervalo de trabajo (mg/dl)
<b>Sistema Colorimétrico (JPG)</b>	0,0037	0,022	1	25-250
<b>Sistema colorimétrico (Raw)</b>	0,0037	0,019	1	25-250

Al igual que se trabajó con el azul de bromofenol para efectos comparativos de la sensibilidad del sistema colorimétrico desarrollado, se procedió a realizar las medidas empleando un espectrofotómetro comercial (Ocean Optics USB 2000).

**Tabla 10.** Valor de absorbancia medido para el patrón de glucosa mediante un espectrofotómetro comercial (Ocean Optics USB 2000).

	Absorbancia			Promedio	Desviación Estándar
<b>Patrón 100 mg/dl</b>	0,398	0,399	0,401	0,399	0,002
<b>Patron de 25 mg/dl</b>	0,105	0,102	0,108	0,105	0,003

En la figura 25 se muestra la curva de calibración construida mediante el espectrofotómetro comercial (Ocean Optics USB 2000)



**Figura 25.** Curvas de calibración empleando el patrón de glucosa de 100 mg/L con un espectrofotómetro comercial (Ocean Optics USB 2000)

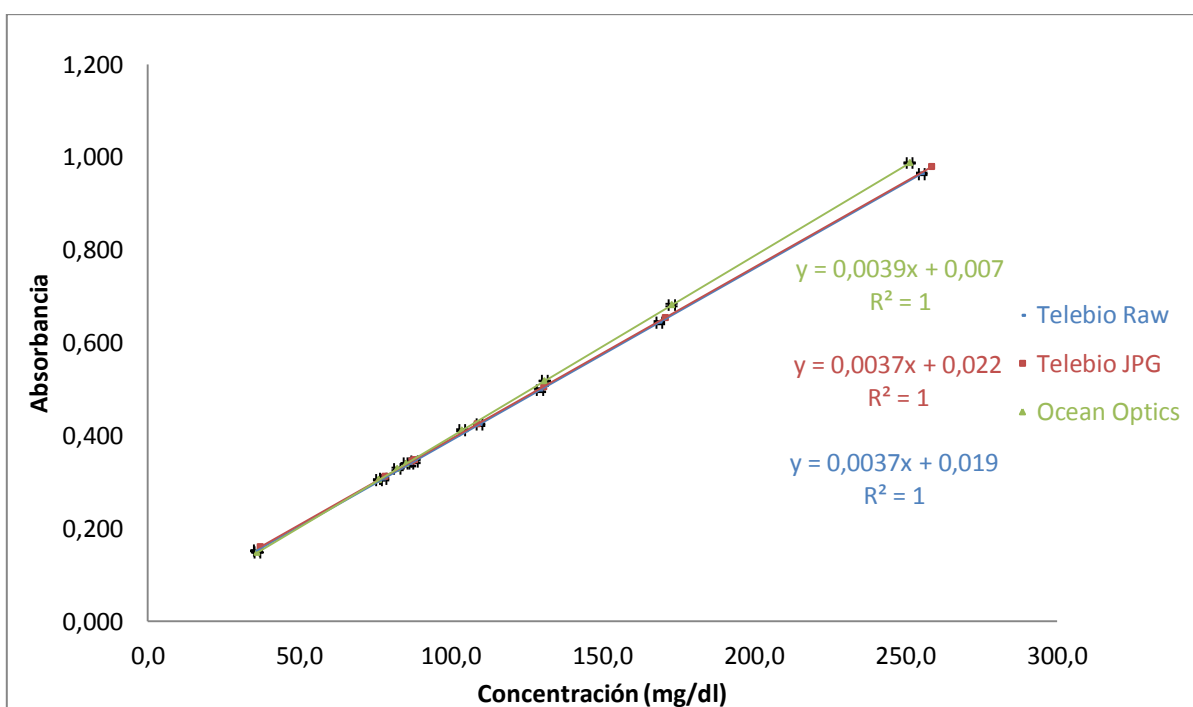
**Tabla 11.** Valores de absorbancia medidos mediante el espectrofotómetro comercial (Ocean Optics USB 2000).

Muestra	Absorbancia (Ocean Optics)			Promedio	Desviación estándar	Concentración (curva de calibración mg/dl)
1	0,148	0,149	0,147	<b>0,148</b>	0,001	<b>36,2 ± 0,3</b>
2	0,306	0,303	0,305	<b>0,305</b>	0,002	<b>76,3 ± 0,4</b>
3	0,328	0,331	0,326	<b>0,328</b>	0,003	<b>82,4 ± 0,6</b>
4	0,341	0,340	0,339	<b>0,340</b>	0,001	<b>85,4 ± 0,3</b>
5	0,409	0,414	0,412	<b>0,412</b>	0,003	<b>103,8 ± 0,6</b>
6	0,519	0,518	0,517	<b>0,518</b>	0,001	<b>131,0 ± 0,3</b>
7	0,684	0,681	0,679	<b>0,681</b>	0,003	<b>172,9 ± 0,6</b>
8	0,989	0,986	0,988	<b>0,988</b>	0,002	<b>251,5 ± 0,4</b>

En la figura 26, se presentan las curvas obtenidas para un número de muestras medidas mediante el sistema colorimétrico propuesto y el espectrómetro convencional.



Se observa que el sistema colorimétrico propuesto, al igual que las medidas con una solución sintética preparada (azul de bromofenol) presenta una sensibilidad relativamente igual al espectrómetro convencional. Si se comparan los parámetros de la curva de calibración de ambos sistemas, (ver tabla 12), se observa que estos poseen el mismo intervalo dinámico lineal, e igual coeficiente de correlación. Estos resultados indican que el sistema colorimétrico es comparable al espectrómetro convencional.



**Figura 26.** Representación gráfica de las absorbancias en función de la concentración del sistema colorimétrico propuesto y un espectrofotómetro comercial.

**Tabla 12.** Parámetros analíticos de la curva de calibración, para el sistema colorimétrico y un espectrómetro comercial.

<b>Equipo</b>	<b>a (mg/dl)</b>	<b>b</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Intervalo de trabajo (mg/dl)</b>
<b>Ocean Optics</b>	<b>0,0039</b>	<b>0,007</b>	<b>1</b>	<b>25-250</b>
<b>Sistema colorimétrico (Raw)</b>	0,0037	0,019	1	25-250
<b>Sistema Colorimétrico (JPG)</b>	0,0037	0,022	1	25-250

En la tabla 13 y 14 se pueden comparar los valores de concentración obtenidos mediante el sistema colorimétrico y los que se reportarían en un análisis clínico de laboratorio en la determinación de glucosa con un espectrómetro comercial.

Se observa que los valores obtenidos en los errores del sistema colorimétrico comparado con un espectrómetro comercial, se encuentran en un rango de 0 al 5 %, lo que es suficiente para reportar esos valores al nivel clínico, debido a que el rango reportable de estos valores va del 5 al 10 % del valor real.

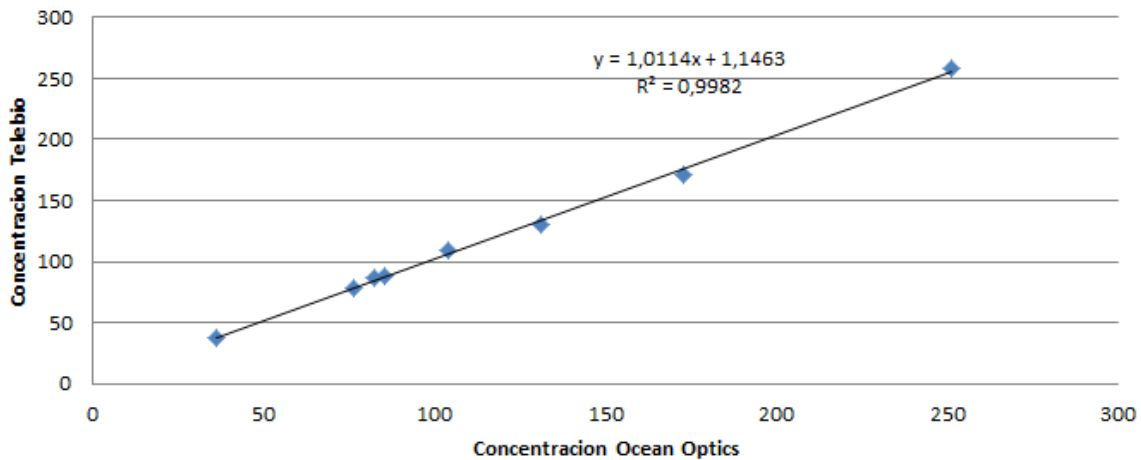
**Tabla 13.** Comparación de los valores de concentración medidos con el sistema colorimétrico formato Raw y un espectrofotómetro comercial.

<b>Concentración TELEBIO Raw mg/dl)</b>	<b>Concentración (mg/dl) Ocean Optics</b>	<b>% ERROR</b>
35,9 ± 0,3	36,2 ± 0,3	<b>0,8</b>
77,7 ± 0,6	76,3 ± 0,4	<b>1,8</b>
86,7 ± 1,4	82,4 ± 0,6	<b>5,2</b>
88,0 ± 0,8	85,4 ± 0,3	<b>3,0</b>
109,5 ± 0,5	103,8 ± 0,6	<b>5,5</b>
129,5 ± 1	131,0 ± 0,3	<b>1,1</b>
168,8 ± 0,8	172,9 ± 0,6	<b>2,4</b>
255,4 ± 0,5	251,5 ± 0,4	<b>1,6</b>

**Tabla 14.** Comparación de los valores de concentración medidos con el sistema colorimétrico Formato JPG y un espectrofotómetro comercial.

<b>Concentración TELEBIO JPG (mg/dl)</b>	<b>Concentración (mg/dl) Ocean Optics</b>	<b>% ERROR</b>
37,2 ± 1,1	36,2 ± 0,3	<b>2,8</b>
78,3 ± 0,8	76,3 ± 0,4	<b>2,6</b>
87,1 ± 0,4	82,4 ± 0,6	<b>5,7</b>
88,0 ± 0,6	85,4 ± 0,3	<b>3,0</b>
108,7 ± 0,8	103,8 ± 0,6	<b>4,7</b>
130,6 ± 1,2	131,0 ± 0,3	<b>0,3</b>
170,8 ± 0,7	172,9 ± 0,6	<b>1,2</b>
258,7 ± 0,9	251,5 ± 0,4	<b>2,9</b>

Como siempre existe variación entre las medidas debida a los errores aleatorios, además de las diferencias de los métodos e instrumentos utilizados, se procedió a construir una curva que represente los valores de concentración para el sistema colorimétrico desarrollado en función de los valores obtenidos con un espectrofotómetro comercial (ver figura 27). En esta se observa que se obtiene una pendiente cercana a 1 y un buen coeficiente de correlación.



**Figura 27.** Grafica de valores de concentración del sistema colorimétrico en función de los valores de concentración de un espectrofotómetro comercial.

Para ver si la diferencia entre los valores de las medidas por parejas de cada concentración son significativas, se realizó un cálculo estadístico denominado contraste t para datos emparejados. Este cálculo consiste en observar la diferencia,  $d$ , entre cada par de resultados dados por los dos métodos.

Si no existen diferencias entre los dos métodos, entonces estas diferencias se obtienen de una población con media  $\mu_d=0$ . Para probar la hipótesis nula, se prueba si  $d$  difiere significativamente de cero utilizando el t estadístico.

En la tabla 15 se observa los valores obtenidos del t estadístico para un intervalo de confianza del 95%. Puesto que el valor calculado (t experimental) es menor que el t crítico, no se rechaza la hipótesis nula: los métodos no proporcionan resultados significativamente diferentes para la concentración de glucosa en suero sanguíneo.

**Tabla 15.** Comparación de t estadístico para los dos métodos comparados.

	<b>t Experimental</b>	<b>t Critico</b>
<b>t estadístico</b>	2,31	2,36

## 8. CONCLUSIONES

- Se diseñó un prototipo de lector de absorbancia de muestras sintéticas y biológicas empleando equipos sencillos y de bajo costo. Como sistema de iluminación una lámpara incandescente, cubetas de plástico para contener la muestra y una cámara digital como detector y selector de la longitud de onda.
- Se calibro el sistema midiendo la respuesta espectral de la cámara CCD usando la tarjeta IT8 y un monocromador.
- El prototipo diseñado presento una buena reproducibilidad, sensibilidad y una respuesta lineal en la evaluación analítica empleando soluciones de azul de bromofenol.
- La sensibilidad del prototipo es comparable a la de un espectrómetro comercial, lo que permitió realizar análisis cuantitativos de analitos interés clínico como la glucosa en suero sanguíneo humano.
- No se encontró ninguna diferencia significativa en los valores obtenidos para los dos tipos de archivos de foto Raw y JPG.

## 9. RECOMENDACIONES

- Utilizar para el prototipo de lector de absorbancia nuevas fuentes de iluminación como lámparas fluorescentes, LEDs, entre otras.
- Evaluar la sensibilidad utilizando otras cámaras digitales como la de teléfonos celulares y web cam.
- Acoplar al programa evaluado la cámara digital de manera que se pueda procesar la foto directamente sin necesidad de hacerle un tratamiento previo a esta.
- Utilizar el prototipo en la determinación cuantitativa de otros analitos de interés clínico.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Castillo, H. Gutiérrez, Y. Vitta, M. Martínez, A. Fernández. “Development and testing of multi – well plates absorbance reader for clinical analysis using inexpensive web cam”. Laboratorio de Espectroscopía Laser, Escuela de Química Facultad de Ciencias. Caracas – Venezuela, 2007.
- [2] P. Connoly, Biosensors Bioelectronics, 1995, 10, 1–6. A comprehensive review on the opportunities of point-of-care systems for the clinical diagnostics market.
- [3] Nieves A, Barcena A, Fernández E, Galván A, Jorrín J, peinado J, Fermín T, Túnez I. Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Medicina. 14004-Córdoba.
- [4] Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, Light Sensitivity (2008), Scientific Rationale, p. 10.
- [5] Skoog D, Holler J, Nieman T, 2001. Principios de Análisis Instrumental. Mc Graw Hill. Quinta Edición. Madrid. España. 147p. 1028p.
- [6] Senner A. 1994. Principios de electrotécnica. Editorial Reverté, S.A. España. Barcelona. 352p.



- [7] Lakowicz J. 2006. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer. Third Edition. Baltimore. USA. 954p.
- [8] Fuentes X, Castiñeiras M, Queraltó J, 1998 Espectroscopia de Luminiscencia Molecular. pp: 243-258. Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Reverté. Segunda Edición. Ciudad de Mexico.
- [9] Poynton C. 2003. Digital Video and HDTV: Algorithms and Interfaces. The Morgan Kaufmann Series in Computer Graphics. NY
- [10] Alimelli, filippini D, Paolesse R, Moretti S, Ciolfi G, D'Amico A, Lundstrom I, Di Natale C. 2007. Direct quantitative evaluation of complex substances using computer screen phot-assisted technology: the case of red wine. Analytical Chemical Acta. 597 (1): 103-112.
- [11] Filipini D, Asberg P, Iganas O, Lundstrom I, 2006. Computers creen Photo-assisted detection of complementary DNA strand using luminicens. Sensors and Actuators B. 113: 410-418.
- [12] Filipini D, Svenson S, Lundstron I, 2003. Computers creen ass a programable Light source for visible absorption characterization of bio-chemical assays. Chemical communications. 2: 240-241.

- [13] Byrne, Baker J, Pernnarum G, Diamond D, 2000. Trends in Analytical Chemistry 19: 517.
- [14] Maleki N. Safavi A, Sedaghatpour, 2004. Single-Step calibration, prediction and real samples data acquisition for artificial neural network using a CCD camera. Talanta 64: 830-835.
- [15] Fernández A, Gonzales F, Castillo J, Vitta Y, Briceño A. 2009. Aplicaciones de un analizador colorimétrico de placas de ELISA basado en la detección con Webcams a la determinación de glucosa en plasma sanguíneo. BISTUA: 1-7p.
- [16] A. Alimelli, D. Filippini, R. Paolesse, S. Moretti, G. Ciolfi, A. D'Amico, I. Lundstrom, C. Di Natale. "Direct quantitative evaluation of complex substances using computer screen photo-assisted technology: the case of red wine". Analytica Chimica Acta 597,103-112 (2007).
- [17] A. Alimelli, D. Filippini, R. Paolesse, S. Moretti, G. Ciolfi, A. D'Amico, I. Lundstrom, C. Di Natale. "Detection of Natural Cr(VI) with Computer Screen Photo assisted Technology". Analytica Chimica (2009).
- [18] D. Filippini, G. Comina, I. Lundstrom. "Computer screen photo – assisted reflectance fingerprinting". Elsevier 107, 580 – 586, (2005).

[19] Instrumentacion científica técnica, S.L. 2009. Placa ELISA y placas para ensayos. <http://www.ictsl.net/productos>.

[20] Espectro de transmisión de una cámara CCD. 23 de octubre de 2010. [www.kodak.com](http://www.kodak.com).

[21] Ocean Optics USB2000. 18 de octubre de 2010. [www.news.directindustry.com](http://www.news.directindustry.com)

[22] A.S. Keston. Abstr, 129th Meeting Amer. Chemistry. Soc. p.31, 1956.

[23] P. Trinder. Ann Clin. Biochemistry 6:24, 1969.

## 11. AGRADECIMIENTOS

Agradecer primero a DIOS por darme mucha salud y guiarme en mis pasos. Por darme mucha sabiduría y perseverancia para terminar mi carrera.

A mi papa Demetrio Fernández y mi mama Violeta Maita por creer en mí y darme la oportunidad de estudiar en otra ciudad lejos de mi hogar. A mis tías y tios en especial Vicenta, perla y pury por siempre estar pendiente de mi progreso y ayudarme en mi carrera profesional. A mi hermana por estar siempre conmigo incondicionalmente.

Agradecer a mis abuelos por su apoyo siempre y en especial mi abuelo Hildemaro que desde donde este siempre guía mis pasos y vera su sueño hecho realidad.

Un gran agradecimiento a mi tutor el profesor Héctor Gutiérrez por permitirme ser su tesista, ayudarme y tenerme mucha paciencia.

A los profesores de la escuela el profesor Jimmy Castillo, Manuel Caetano, José Chirinos, Luis Gómez, Yosmery Vitta, Vincent, María Rodríguez, María Antonieta por su apoyo incondicional y sus conocimientos impartidos a lo largo de mi carrera.

A una persona muy importante en mi vida Ana Karina por estar conmigo siempre y compartir todos los buenos y malos momentos de mi vida y en el trascurso de mi carrera.

A mis amigos de toda la carrera Wiler y Claudia por siempre contar con ustedes en las buenas y en las malas y fastidiarlos tanto.

Muchas Gracias

Jonathan Fernández