

UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS PUEBLA

Escuela de Ingenierías

Departamento de Computación, Electrónica y Mecatrónica



**Diseño e Implementación de un Espectrofotómetro
monocromático basado en un circuito electrónico para la
determinación de concentraciones de las Hemoglobinas A0 y S**

Tesis que, para completar los requisitos del Programa de Honores presenta el
estudiante

Juan Pablo Alvarez Romero

162692

Ingeniería Biomédica

Dr. Juan Horacio Espinoza Rodríguez

San Andrés Cholula, Puebla.

Primavera 2023

Hoja de firmas

Tesis que, para completar los requisitos del Programa de Honores presenta el
estudiante **Juan Pablo Alvarez Romero - 162692**

Director de Tesis

Dr. Juan Horacio Espinoza Rodríguez

Presidente de Tesis

Dr. Jorge Rodríguez Asomoza

Secretario de Tesis

M.C. Eduardo Javier Jiménez López

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por la realización de este proyecto, a mi asesor el Dr. Juan Horacio Espinoza Rodríguez por su guía a lo largo de la tesis, al Ing. Roberto Ramírez Calderón y al M.C. Eduardo López Sánchez, asistente y jefe de laboratorio del Departamento de Computación, Electrónica y Computación, respectivamente por el préstamo del equipo del almacén necesario para llevar a cabo los experimentos y al M.C. Eduardo Javier Jiménez López por el asesoramiento en la parte electrónica. A la Dra. Rocío Salazar Varas, por sus observaciones a este proyecto de tesis en los seminarios de investigación de los lunes.

Agradezco al IB. Sergio Torre Blanca Guevara y la MBA. Verónica Zarate Zapata, auxiliar y jefe de laboratorios del Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, respectivamente por el resguardo de las muestras liofilizadas de Hemoglobinas A₀ y S, el préstamo de micropipetas, así como la donación de agua desionizada para la preparación del buffer PBS.

Finalmente, agradezco a mi familia por su apoyo incondicional en esta meta personal.

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Justificación del problema.....	14
1.2. Objetivos.....	15
1.2.1. Objetivo General.....	15
1.2.2. Objetivos Específicos.....	15
2. MARCO TEÓRICO	16
2.1. Espectrofotometría Óptica: Principio e Instrumentación básica	16
2.2. Biosensores basados en Espectrofotometría UV-Vis.....,	17
2.3. Ley de Beer-Lambert.....	21
2.4. Espectrofotometría de proteínas	22
2.5. La Hemoglobina: Proteína globular que transporte oxígeno	26
2.6. Sensores de luz.....	31
2.6.1. Fotorresistor (PR).....	31
2.6.2. Fotodiodo (PD)	32
2.6.3. Fototransistor (PT).....	33
2.7. Fuentes de luz.....	35
2.7.1. Diodo Emisor de Luz (LED)	35
2.7.2. Diodo Láser (LD)	36

3. MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1. Reactivos y Materiales.....	38
3.2. Instrumentación del espectrofotómetro basado en un circuito electrónico: LD/PT/OpAmp.....	40
3.3. Preparación de muestras de Hemoglobinas A ₀ y S.....	41
3.4. Estandarización de la curva de calibración para las muestras HbA ₀ y HbS.....	45
3.5. Mediciones de Absorbancia de la HbA ₀ y HbS por la instrumentación propuesta....	45
3.6. Análisis Estadístico de las muestras HbA ₀ y HbS.....	47
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
4.1. Construcción del espectrofotómetro basado en un circuito LD/PT/OpAmp.....	48
4.2. Calibración y límite de detección del circuito propuesto	53
4.3. Análisis de Absorbancia de las muestras HbA ₀ y HbS.....	56
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	61
BIBLIOGRAFÍA.....	63

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de subtipo de hemoglobina presente en el cuerpo humano	28
Tabla 2. Registro de la Absorbancia de Hb A ₀ , a partir de la lectura de voltaje eléctrico.....	54
Tabla 3. Registro de la Absorbancia de Hb S, a partir de la lectura de voltaje eléctrico.....	54
Tabla 4. Registro y cálculo de la relación concentración -volumen para las diluciones de las Hemoglobinas A ₀ y S.....	55

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Células sanguíneas presentes en los vasos sanguíneos del sistema circulatorio.....	12
Figura 2. Elementos básicos de un espectrofotómetro UV-Visible.....	17
Figura 3. El espectro de luz visible como parte del espectro electromagnético	17
Figura 4. Clasificación de los biosensores.....	18
Figura 5. Diagrama de bloques que muestra los componentes básicos de un biosensor.	19
Figura 6. a) Medición de la concentración de glucosa usando un potenciómetro y un biosensor de glucosa. b) Corriente medida de la dopamina con amperometría constante en una reacción redox. y c) la relación de la corriente eléctrica y la concentración de la molécula p-aminofenol mediante tasa de conteo del sensor.	20
Figura 7. Curva estándar de Absorbancia (a) y su aplicación para determinar una concentración, dada una absorbancia detectada (b).	22
Figura 8. Espectro de absorción molar a 785 nm de la Hemoglobina oxigenada (HbO ₂) en solución acuosa, como función de la concentración sanguínea.....	23
Figura 9. Circuito propuesto en artículo para sensar hemoglobina.....	24
Figura 10. Circuito propuesto en artículo para comparar sensibilidad del circuito.....	25
Figura 11. Circuito propuesto en artículo para sensar iones de hierro en agua.....	25
Figura 12. Composición de glóbulos rojos	26
Figura 13. Estructura de hemoglobina.....	27
Figura 14. Glóbulo rojo con Hb A ₀ (izquierda) y glóbulo rojo con Hb S (derecha).....	29
Figura 15. Representación gráfica del flujo sanguíneo.....	30

Figura 16. Diagrama esquemático de un fotoresistor.....	31
Figura 17. Fotodiodo en modo fotovoltaico.....	32
Figura 18. Fotodiodo en modo fotoconductor.....	33
Figura 19. Símbolo de fototransistor.....	33
Figura 20. Fototransistor en configuración emisor común (a) y modo colector común (b).....	34
Figura 21. Funcionamiento de LED.....	36
Figura 22. Comparación entre LED y láser.....	37
Figura 23. Hb A ₀ (izquierda), Hb S (en medio) y solución PBS (derecha).....	38
Figura 24. Esquemático del circuito propuesto.....	40
Figura 25. Reconstitución de las Hemoglobinas con el buffer PBS; a) Hb A ₀ y b) HbS	42
Figura 26. Uso del Vortex para obtener la solución de Hemoglobinas en una concentración stock de 200 mg/ml.....	43
Figura 27. Colocación de la solución de Hb en la celdilla de poliestireno, previo a la lectura de la absorbancia.....	44
Figura 28. Muestra de Hemoglobina en condiciones de enfriamiento.....	45
Figura 29. Circuito en Protobard.....	50
Figura 30. Circuito en Protoboard con zoom.....	50
Figura 31. Circuito propuesto soldado.....	52
Figura 32. Simulación de circuito.....	53
Figura 33. Gráfica final de Hb A ₀	57
Figura 34. Gráfica final de Hb S.....	59
Figura 35. Comparación de la absorbancia de ambas hemoglobinas.....	60
Figura 36. Muestra resultante de hemoglobina.....	60

RESUMEN

La espectrofotometría se puede definir como un método óptico que tiene como finalidad conocer la absorbancia de un material/molécula a una específica longitud de onda mediante su relación con la concentración del mismo. Diversas moléculas biológicas han sido estudiadas a través de esta técnica, con la finalidad de conocer la cantidad de sustancia o analito contenida en un cierto volumen (mg/ml). Diferentes investigaciones con enfoque en el monosacárido glucosa y el neurotransmisor dopamina reportan resultados en donde la curva estándar de absorción compara la concentración de los analitos en cuestión (variable independiente) y su respuesta eléctrica (variable dependiente). Varios artículos reportan el uso de espectrofotometría en el sensado de moléculas orgánicas de interés biológico con el énfasis particular en diseñar espectrofotómetros de bajo costo. En el caso de este proyecto, el analito de interés son dos tipos de hemoglobina: A₀ (tipo saludable) y S (tipo patológico).

De esta manera, en el presente proyecto el principal objetivo es proponer y diseñar un espectrofotómetro de bajo costo basado en un circuito de tres principales elementos electrónicos; fototransistor, amplificador operacional y resistencias, los cuales son implementados en una placa fenólica (circuito PCB) de tamaño 5.5x7 cm que permite sensar concentraciones tanto de Hemoglobina A₀ como de Hemoglobina S en un rango de interés clínico (1.0 a 20.0 g/dl), para así reportar su respuesta en voltaje (mV), y asociarla con la absorbancia de dichas muestras.

Palabras clave: Espectrofotómetro, Hemoglobina, circuito electrónico, Hb A₀, Hb S

ABSTRACT

Spectrophotometry can be defined as an optical method that aims to know the absorbance of a material/molecule at a specific wavelength by its relation to the concentration of the same. Several biological molecules have been studied through this technique, in order to know the amount of substance or analyte contained in a certain volume (mg/ml). Different studies focusing on the monosaccharide glucose and the neurotransmitter dopamine report results where the standard absorption curve compares the concentration of the analytes in question (independent variable) and their electrical response (dependent variable). Several articles report the use of spectrophotometry in the sensing of organic molecules of biological interest with the particular emphasis on designing low-cost spectrophotometers. In the case of this project, the analyte of interest are two types of hemoglobin: A₀ (healthy type) and S (pathological type).

Thus, in this project the main objective is to propose and design a low-cost spectrophotometer based on a circuit of three main electronic elements; phototransistor, operational amplifier and resistors, which are implemented in a phenolic plate (PCB circuit) of size 5.5x7 cm that allows to sense concentrations of both Hemoglobin A₀ and Hemoglobin S in a range of clinical interest (1.0 to 20.0 g/dl), to report its response in voltage (mV) and associate it with the absorbance of such samples.

Keywords: Spectrophotometer, Hemoglobin, Electronic circuit, Hb A₀, Hb S

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Actualmente los biosensores están presentes en muchas ramas de la ingeniería biomédica tales como en el diagnóstico de enfermedades, el chequeo progresivo de cómo un tratamiento va avanzando o bien detectar la presencia de algún analito de interés (Bhalla et al., 2016). A pesar de los diferentes tipos de biosensores que existen, los biosensores ópticos son muy comunes comercialmente. Un ejemplo puede ser el oxímetro de pulso, el cual tiene como objetivo detectar la saturación de oxígeno en la sangre mediante la medición de los espectros de absorbancia de la Hemoglobina en las longitudes de onda de 660 nm (rojo) y 940 nm (infrarrojo) (Yoon, 2016).

Comúnmente en los biosensores se busca detectar alguna proteína, alguna enzima o una célula de interés con importancia biológica. Una de las proteínas en las que se reportan varios estudios es la Hemoglobina (Hb). La sangre contiene tanto componentes líquidos como sólidos: hablando de líquidos se tiene el plasma (que tiene un alto porcentaje en la sangre) mientras que los componentes sólidos (tal y como se puede ver en la Figura 1) están compuestos por glóbulos blancos, plaquetas y glóbulos rojos. En el interior de los glóbulos rojos se pueden encontrar las proteínas de Hemoglobina.

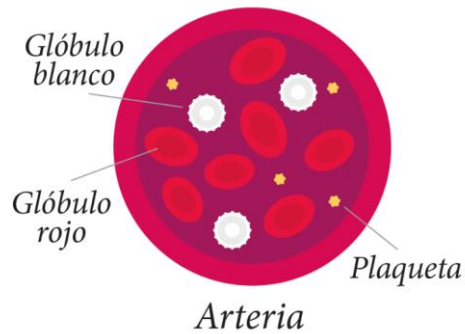


Figura 1. Células sanguíneas presentes en los vasos sanguíneos del sistema circulatorio.

(Roche Farma S.A., 2022).

Estas proteínas se encargan de transportar el oxígeno a través del torrente sanguíneo a todas las células del cuerpo y posteriormente transportar el dióxido de carbono de vuelta a los pulmones. El hecho de no contar con suficientes glóbulos rojos puede derivar en diferentes tipos de enfermedades como es la anemia por déficit de hierro, por déficit de ácido fólico o por herencia (ésta última resulta en que los glóbulos rojos tengan una forma falciforme y no puedan llevar a cabo correctamente su función).

Desde el principio de los años 2000 se han reportado diferentes investigaciones en donde se utilizan equipos complejos para detectar analitos (sustancias químicas analizadas en una muestra de interés) cómo la dopamina o la glucosa. No obstante, en la última década (aproximadamente desde el 2012) se ha visto un atractivo campo de investigación emergente que busca simplificar el proceso de detección para no requerir aparatos con un alto costo económico. Ejemplos de este campo de investigación incluyen reportes de artículos que comparan sus circuitos con un espectrofotómetro comercial y demostrar que hay una

linealidad aceptable, la detección de iones de hierro en diferentes muestras de agua o inclusive la detección de Hemoglobina a bajas concentraciones (no de uso clínico).

Tal y como se ha reportado en estas investigaciones, se subraya la importancia de explorar alternativas de los equipos convencionales (Espectrofotómetros UV-Vis) que puedan simplificar el costo y operación de los mismos, a expensas de una respuesta permisible que brinde información acerca de la concentración de una muestra de interés (por ejemplo, una proteína).

En el presente trabajo, se propone el diseño y construcción de un espectrofotómetro de absorbancia a una longitud de onda específica (a diferencia de un barrido en el espectro UV-Vis), en donde se pueda obtener información acerca de la concentración proteica de la Hemoglobina, la cual se sabe es un absorbente de luz alrededor de esta longitud de onda específica. El espectrofotómetro monocromático (una sola longitud de onda) propuesto consiste en componentes electrónicos mínimos necesarios que en conjunto con un diodo láser como fuente de luz sean capaces de detectar concentraciones de interés clínico de la Hemoglobina (concretamente de la HbA₀ y Hb S, las cuales son las dos proteínas de las familias de la Hb que están bien caracterizadas su estabilidad en solución fisiológica, (Clark et al., 2012)).

1.1 Justificación

Debido a la importancia de los espectrofotómetros como un equipo esencial en los laboratorios clínicos y de investigación para medir las concentraciones de una amplia variedad de analitos específicamente en el área clínica, las llamadas macromoléculas biológicas como: las proteínas, las enzimas, el ADN, etc., las cuales son primordiales para determinar el contenido de una cierta muestra biológica de interés. Sin embargo, algunos de los laboratorios clínicos y de investigación pública en nuestro país cuentan con limitaciones de recursos y no pueden permitirse comprar estos útiles dispositivos de medición en el área.

Para satisfacer la anterior necesidad, se propone un espectrofotómetro de absorbancia a una longitud de onda específica, el cual consiste en una triada de componentes electrónicos (Fototransistor, OPAMP y Resistencias) mínimos necesarios (bajo costo) que, en conjunto con un diodo láser sean capaces de detectar concentraciones de una proteína de interés clínico. En este caso, se eligió la Hemoglobina (Hb) como proteína de estudio, la cual ha sido mencionado anteriormente su gran importancia en los glóbulos rojos y su asociación con la anemia, específicamente se seleccionaron la Hb A₀ y Hb S como modelos experimentales para el estudio de la absorbancia, esto debido a que ambas proteínas son las más estables de la familia de Hb en soluciones fisiológicas de acuerdo con (Clark et al., 2012).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Construir un prototipo fácilmente accesible de espectrofotometría de absorción a 635 nm que sea capaz de relacionar la respuesta eléctrica de las principales proteínas asociadas a los glóbulos rojos (hemoglobinas) con la absorbancia de las mismas, para fines de obtener una detección de concentraciones de Hemoglobinas A₀ y S.

1.2.2. Objetivos Específicos

- i. Diseñar y evaluar el circuito electrónico asociado al espectrofotómetro en el software simulador Multisim NI y posteriormente en una placa protoboard.
- ii. Construir el espectrofotómetro monocromático basado en una triada de elementos electrónicos mínimos necesarios en conjunto con un diodo láser, capaz de detectar diversas concentraciones de las Hemoglobinas A₀ y S.
- iii. Obtener las curvas de calibración (Absorbancia *versus* concentración) para las Hemoglobinas A₀ y S, respectivamente.
- iv. Establecer el rango de concentraciones de las Hemoglobinas (A₀ y S), para las cuales es posible diferenciarse entre ellas, por medio del espectrofotómetro propuesto.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1 Espectrofotometría Óptica: Principio e Instrumentación básica

La espectrofotometría se puede definir como un método óptico que tiene como finalidad conocer la absorbancia de un material mediante su relación con la concentración del material (analito) y su grosor (Hou et al., 2018). Este término fusiona los conceptos de fotometría y espectrometría: mientras que el primero se refiere a una medida de una longitud de onda específica, el segundo concepto se enfoca más en un rango de varias longitudes de onda. El espectro se refiere a la intensidad de luz resultante. Juntando los tres conceptos se obtiene espectrofotometría (Yoon, 2016).

En cuanto a instrumentación, la Figura 2 señala los componentes básicos encontrados en un espectrofotómetro básico (JASCO, 2023). Tal y como se aprecia, básicamente consiste en una fuente de luz, un elemento dispersivo (encargado de expandir el rango de colores), el elemento a medir (una sustancia biológica, por ejemplo) y un detector (capaz de medir la luz una vez que haya atravesado la muestra). En la espectrofotometría se busca analizar al material biológico a una longitud de onda en específico. Si se compara la intensidad de luz inicial con la final se obtiene un concepto llamado transmitancia: la cantidad de luz que atraviesa al objeto. Su opuesto es la absorbancia: la cantidad de luz absorbida por el material.

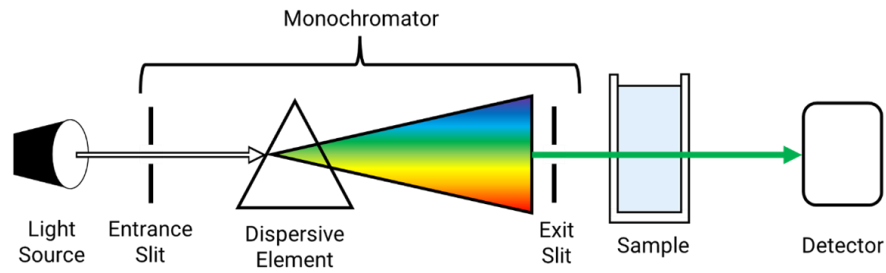


Figura 2. Elementos básicos de un espectrofotómetro UV-Visible. (JASCO, 2023).

2.2 Biosensores basados en Espectrofotometría UV-Vis

Para aplicar la espectrofotometría en casos enfocados en la salud humana, existen dispositivos llamados biosensores que aplican este concepto para obtener respuesta de alguna proteína, molécula o célula en particular. Para su funcionamiento, estos equipos trabajan a cierta longitud de onda dependiendo si son diseñados para trabajar con luz visible o UV. La luz visible tiene entre 400 y 700 nm, mientras que la UV se encuentra entre 100 y 400 nm (tal y como la Figura 3 lo representa).

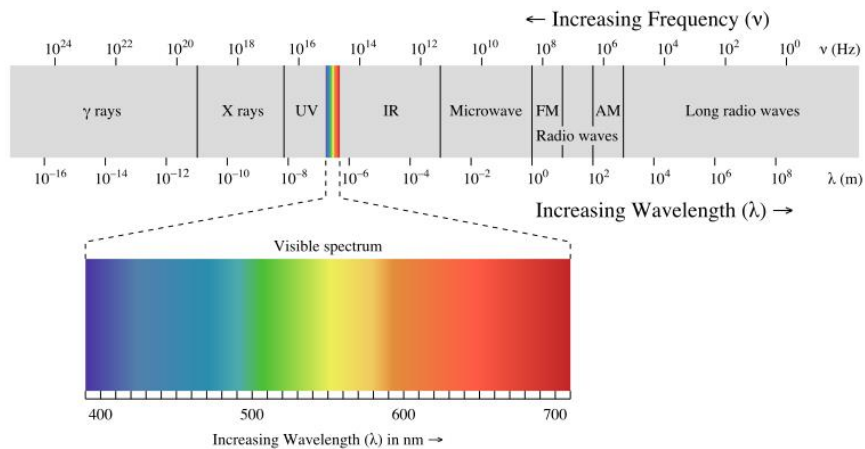


Figura 3. El espectro de luz visible como parte del espectro electromagnético.

(Electromagnetic Radiation, 2013).

Los biosensores se pueden dividir en cuatro categorías generales (bioreceptores, ópticos, de transductores y electroquímicos), cada uno teniendo diferentes subtipos (Belén & Ec, 2018). La espectrofotometría es la base de los biosensores ópticos, los cuales utilizan la luz para sensar concentraciones de muestras biológicas. La Figura 4 muestra de manera detallada la clasificación previamente discutida.

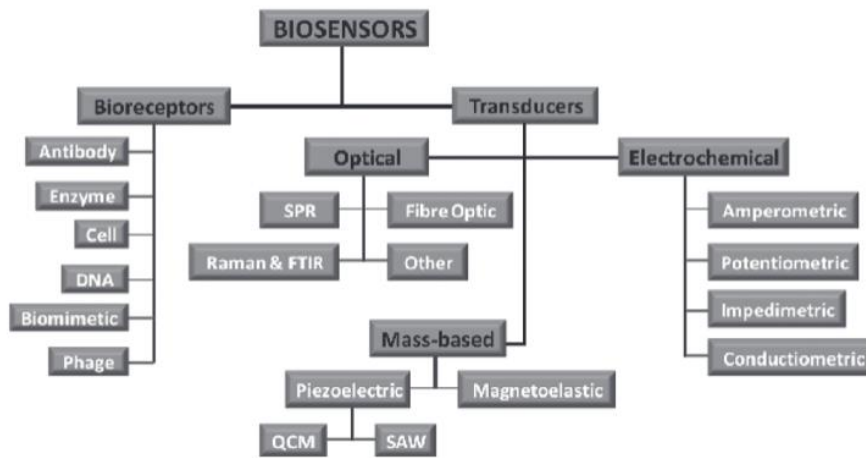


Figura 4. Clasificación de los biosensores.

Otro elemento importante con relación a sus funciones son los componentes que todo biosensor debe tener sin importar el tipo: un elemento de reconocimiento, un elemento transductor de señal y un componente que evalúe la información que se presenta, para que sea de utilidad para el usuario (Sabu et al., 2019). De manera más detallada se puede observar en la Figura 5.

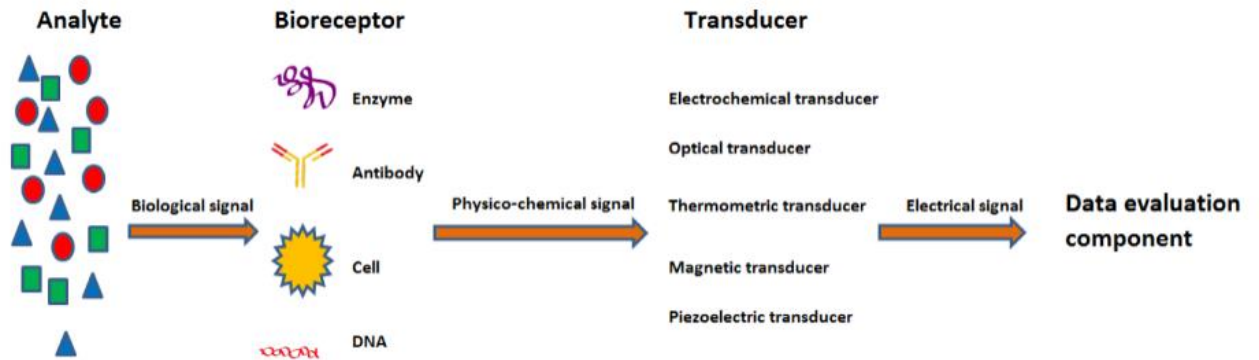


Figura 5. Diagrama de bloques que muestra los componentes básicos de un biosensor.

Obsérvese que independientemente del tipo de transductor empleado (electroquímico, óptico, térmico, etc.), la señal de salida será del tipo eléctrico (por lo general voltaje o corriente eléctrica), la cual es utilizada para correlacionarla con la cantidad o concentración de la muestra de interés (por ejemplo, una proteína) depositada en el bioreceptor.

Para explicar cuantitativamente lo anterior, se mencionan a los grupos de investigación de (Ahmadi & Jullien, 2009; Guo et al., 2016; Schienle et al., 2004), los cuales se han enfocado en la detección y sensado de la glucosa monosacárido y del neurotransmisor dopamina. Para ello, se suele reportar la relación que existe entre la corriente eléctrica registrada en la muestra (del orden de mA y nA) en función de la concentración de las moléculas de interés biológico (por lo general del orden de μM y mM). En la Figura 6 se resumen de manera ejemplificada las principales curvas respuestas obtenidas por los grupos de investigación antes mencionados.

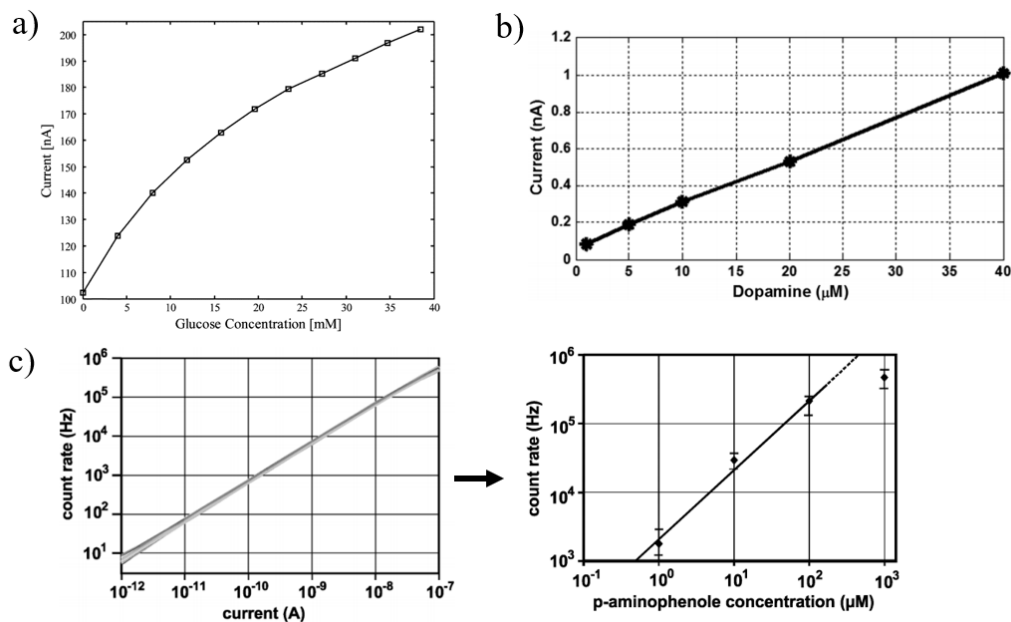


Figura 6. a) Medición de la concentración de glucosa usando un potenciómetro y un biosensor de glucosa. (Ahmadi & Graham 2009), b) Corriente medida de la dopamina con amperometría constante en una reacción redox. (Guo et al. 2015), y c) Relación de la corriente eléctrica y la concentración de la molécula p-aminofenol mediante tasa de conteo del sensor. (Schienle et al., 2004)

Ahora bien, el ejemplo más conocido y comercialmente exitoso hoy en día, es el biosensor basado en espectrofotometría, el cual lo conocemos como el oxímetro de pulso.

El oxímetro de pulso utiliza la luz para medir la cantidad de hemoglobina en saturación de oxígeno en los vasos sanguíneos, ya que la cantidad de luz absorbida por el tejido es proporcional a la presencia de moléculas de Hb (Bencomo et al., 2016). Por otro lado, al ser un método sencillo, sin tener componentes voluminosos y en tiempo real, hace que los biosensores para medir glucosa sean muy solicitados para prevenir y controlar de manera correcta la diabetes (Sabu et al., 2019).

De igual manera, un biosensor electroquímico común es el medidor de glucosa, ya que utiliza una enzima llamada glucosa oxidasa para lleva a cabo reacciones químicas y detectar la corriente eléctrica que refleje la concentración de glucosa (Ceballos-Camargo et al., 2014).

2.3 Ley de Beer-Lambert

La ley de Beer-Lambert es una ley que “describe cómo la atenuación de la luz se relaciona con las propiedades del medio por el cual viaja” (Oshina & Spigulis, 2021), y se representa en la Ecuación 1, donde I y I_0 representan la intensidad final e inicial de luz, respectivamente, ε es el coeficiente de extinción molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$), c representa la concentración de la muestra (M) y l es la longitud de la muestra (cm) (Baker et al., 2014)

$$I = I_0 e^{-\varepsilon c l} \quad (1)$$

Esta ley es de suma importancia en el campo de la biofotónica, fotomedicina y otras ciencias que relacionan la luz con sus interacciones, por ejemplo para calcular la saturación de oxígeno en diversos tejidos del cuerpo humano o establecer las concentraciones de hemoglobina en una muestra (Oshina & Spigulis, 2021). La Ecuación 2 es una manera diferente de representar la ley de Beer-Lambert, y se puede expresar como:

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = \varepsilon c l \quad (2)$$

Donde A es la absorbancia e I_0 es la intensidad de luz antes de incidir en la muestra, mientras que I es la intensidad de luz después de atravesar la muestra en solución. Ahora bien, de acuerdo a (Yoon, 2016) esta ecuación se puede expresar en términos de variables eléctricas y se obtiene la siguiente ecuación (3).

En este caso en lugar de comparar las intensidades se divide el voltaje inicial (referencia, por ejemplo, el registrado solo con el sobrenadante de la muestra) y el voltaje final (registrado con el sobrenadante más la muestra contenida).

$$A = \log_{10}\left(\frac{V_0}{V}\right) \quad (3)$$

2.4 Espectrofotometría de proteínas

Tal y como se explicó previamente, una de las aplicaciones de la espectrofotometría es medir la cantidad, es decir concentración de una muestra (biológica, contaminante, colorante, etc.). Para ello, se elabora una curva estándar preparando una serie de soluciones (típicamente de cinco a seis) que contienen la muestra de interés (por ejemplo, una proteína); cada solución solo varía por una diferencia en la concentración c . La absorbancia A se mide y representa en función de la concentración c dada. Es decir, se realiza una regresión lineal para obtener $A = (\text{pendiente}) \times c$. La concentración c de la muestra, por ejemplo, la proteína en una muestra desconocida se puede evaluar midiendo primero A y luego calculando de nuevo c usando la ecuación experimental anterior. (Ver figura 7).

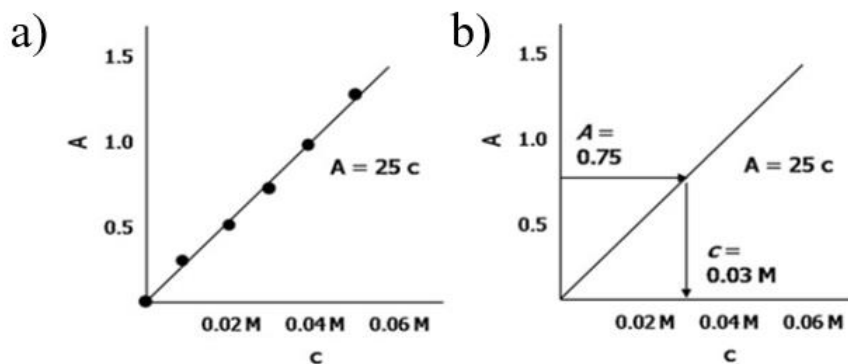


Figura 7. Curva estándar de Absorbancia a) y su aplicación para determinar una concentración, dada una absorbancia detectada b). (Yoon, 2016).

La siguiente Figura 8 muestra un ejemplo de cómo se puede ver la pendiente previamente explicada, así como la ecuación característica de una recta. Nótese que en el eje horizontal se tiene en este caso concentración de sangre mientras que el coeficiente de absorción se muestra en el eje vertical. A pesar de que la pendiente es pequeña sigue siendo significativa.

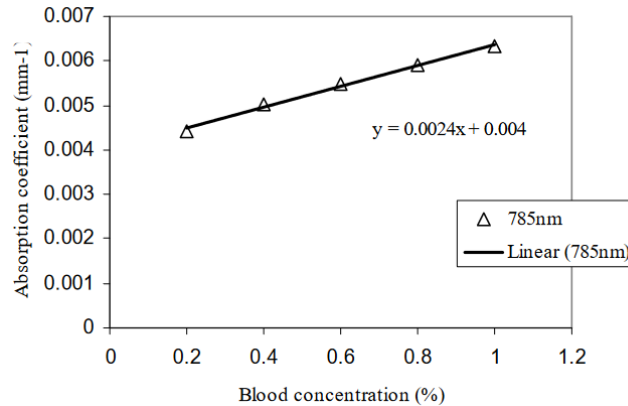


Figura 8. Espectro de absorción molar a 785 nm de la Hemoglobina oxigenada (HbO₂) en solución acuosa, como función de la concentración sanguínea. (Srinivasan et al., 2003).

Así como se mencionó en la introducción, hay diversos grupos que reportan este tipo de gráficas con diferentes analitos: en el caso de la Figura 9 se propone un arreglo de circuito (compuesto por resistencias, fotodiodos, LED y amplificadores operacionales) que permite sensor concentraciones de hemoglobina hasta un miligramo sobre mililitro ocupando la fórmula vista en los párrafos anteriores. Es importante enfatizar que el arreglo no es muy complejo y aun así logra dar una respuesta estable teniendo un factor de correlación de 0.96 (Yoon, 2016).

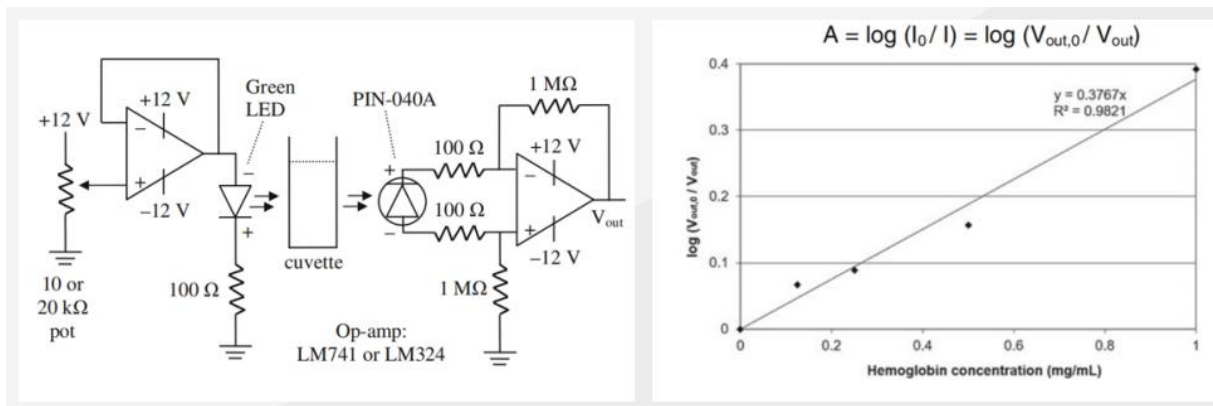


Figura 9. Circuito propuesto en la literatura para detectar hemoglobina. (Yoon, 2016).

Por otro lado, en la Figura 10 se presenta como un grupo de investigación diseñó un circuito a base de componentes Lego que permite comparar si la absorbancia calculada por ellos es similar a la de un espectrofotómetro comercial (en este caso Ocean Optics USB 2000). Se puede ver cómo la gráfica presenta una linealidad casi perfecta, lo cual sugiere que este arreglo funciona con la misma precisión que un espectrofotómetro convencional (Albert et al., 2012). La diferencia con el ejemplo anterior es que no se utilizó la hemoglobina como base para sensor sino azul de bromotimol, el cual es un regulador de PH; es decir, al hacer más básica la concentración, la solución cambia a diferentes colores.

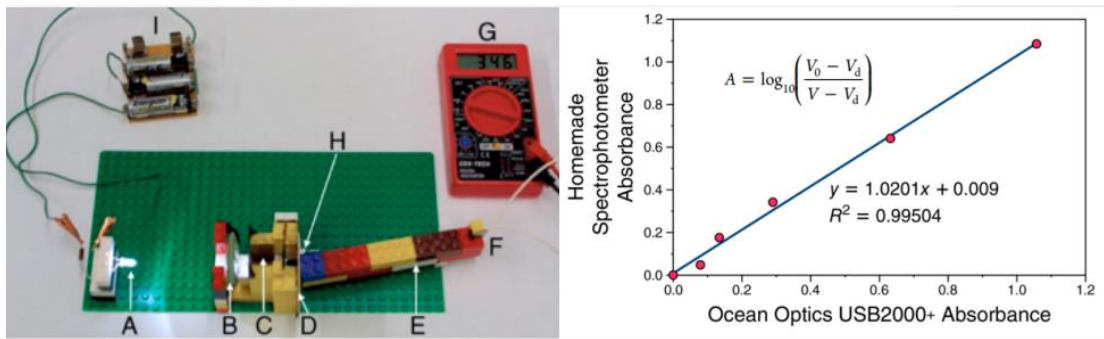


Figura 10. Circuito propuesto en artículo para comparar sensibilidad del circuito.

(Albert et al., 2012).

Adicionalmente, un tercer grupo de investigación propone un arreglo sencillo ocupando simplemente un LED emisor, un led receptor y una resistencia para proponer un espectrofotómetro que puede sentir las concentraciones del ion Fe^{2+} más en diferentes muestras de agua (Place, 2019). Ver Figura 11.

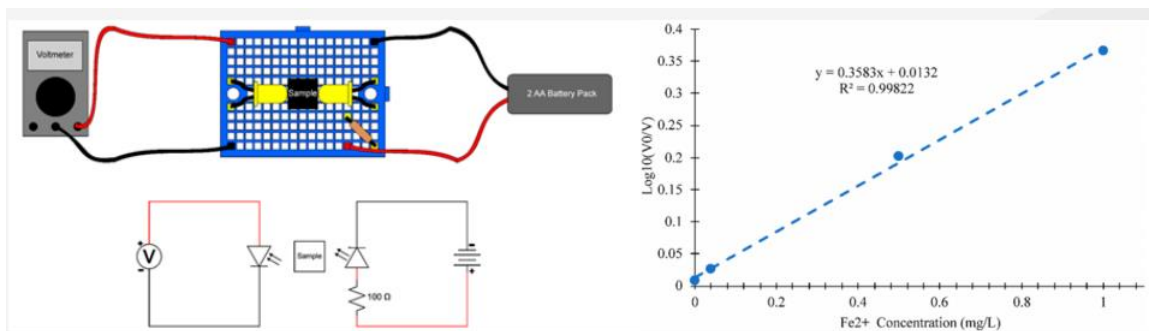


Figura 11. Circuito propuesto en artículo para sentir iones de hierro en agua. (Place, 2019).

2.5 La Hemoglobina: Proteína globular que transporte oxígeno

Dentro de la sangre se encuentran células con funciones específicas para el correcto funcionamiento del cuerpo humano, tales como los glóbulos blancos, plaquetas o glóbulos rojos (Ramirez-Martinez, 2022). Dentro de los glóbulos rojos se encuentra la Hemoglobina (véase Figura 12). Su principal función es transportar oxígeno hacia todo el cuerpo humano a través de la sangre. A su vez, es responsable de transportar dióxido de carbono a los pulmones para el proceso de intercambio gaseoso (*Definición de hemoglobina - Diccionario de cáncer del NCI - NCI, 2011*).

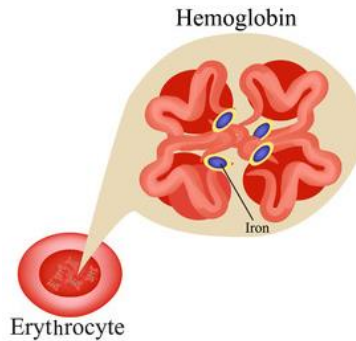


Figura 12. Composición de glóbulos rojos.

Cada molécula de hemoglobina contiene dos pares de cadenas polipeptídicas, aminoácidos, grupos hemo (los cuales son átomos de hierro que tienen como función el correcto plegamiento de las proteínas globulares) y globina (fija y transporta oxígeno) (Bencomo et al., 2016). La Figura 13 presenta un modelo de hemoglobina con las características previamente mencionadas.

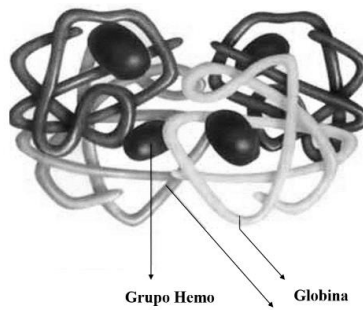


Figura 13. Estructura de la Hemoglobina.

Existen varios tipos de hemoglobina, siendo Hb A, Hb A2 y Hb F (en neonatos) las más comunes. Casi el 100% del tipo de hemoglobina encontrado en un adulto promedio es Hb A (97%), mientras que la presencia de Hb A2 (3%) es sumamente baja. Hb F es abundante en neonatos ya que se sustituye por la HB A cuando la persona madura (Peñuela, 2005). Es importante conocer si se tiene suficientes proteínas de hemoglobina en la sangre, ya que la falta de estas puede ocasionar enfermedades como la anemia por deficiencia de hierro. De hecho, esta es la causa más común de anemia a nivel mundial, con el 25% de la población mundial padeciendo anemia y aproximadamente el 12% por deficiencia de hierro (Mantadakis et al., 2020). La Tabla 1 muestra las diferentes concentraciones recomendadas por la Organización Mundial de la Salud en cuanto a concentraciones saludables y concentraciones que son consideradas en pacientes que tienen anemia. Cabe destacar de esta tabla que las concentraciones varían dependiendo el tipo de población tales como hombres, mujeres, mujeres embarazadas y niños. (Organización Mundial de la Salud, 2011). A su vez se recomiendan diferentes concentraciones de anemia dependiendo el nivel de seriedad. Por ejemplo, si se tiene anemia leve es común que los síntomas sean cansancio, dolores de cabeza o pérdida de apetito. En cambio, una anemia grave tiene síntomas tales como dificultad para

respirar (después de realizar actividad física), piel pálida o coiloniquia (forma anormal de las uñas por déficit de hierro) (Anemia, 2022).

Población	Concentraciones saludables ($\frac{g}{dL}$)	Concentraciones de anemia ($\frac{g}{dL}$)		
		Leve	Moderada	Grave
Hombre	>13	Entre 10 y 11	Entre 7 y 10	< 7
Mujer	>12	Entre 11 y 12	Entre 8 y 11	< 8
Mujeres Embarazadas	>11	Entre 10 y 11	Entre 7 y 10	< 7
Niños	>11.5	Entre 10 y 12	Entre 8 y 11	< 8

Tabla 1. Porcentaje de subtipo de hemoglobina presente en el cuerpo humano

Existen varios tipos de anemia, tales como la anemia por déficit de vitamina B12, déficit de hierro o por deficiencia de ácido fólico. Uno de los tipos de anemia se denomina anemia drepanocítica. Esta enfermedad se debe a la presencia de la Hemoglobina tipo S, la cual es una mutación que cambia de forma los glóbulos rojos de una apariencia de disco a una apariencia de medialuna (ver Figura 14). Estas mutaciones son hereditarias y son más comunes en regiones tales como Sudamérica, África y Medio Oriente (Díaz-Matallana et al., 2021).



Figura 14. Glóbulo rojo con Hb A₀ (izquierda) y glóbulo rojo con Hb S (derecha).

Se considera anemia ya que la vida media de los glóbulos rojos con Hb S es de 20 días (*Enfermedad de Células Falciformes - Causas y Factores de Riesgo | NHLBI, NIH, 2022*), mientras que con Hb A₀ es de 120 días (Álvarez Seijas et al., 2009). En otras palabras, los glóbulos rojos se rompen a una tasa más elevada de la que el cuerpo puede producir nuevas. Debido a la forma de glóbulo rojo con hemoglobina patológica, el flujo de glóbulos rojos en la sangre se entorpece y no permite que el oxígeno pueda llegar a todas las células del cuerpo (Figura 15), derivando en malestar en el paciente. En casos de anemia drepanocítica, se tiene una relación 60:40, en donde el 40% de los eritrocitos contienen Hb S (Sridhar & Idowu, 2021)

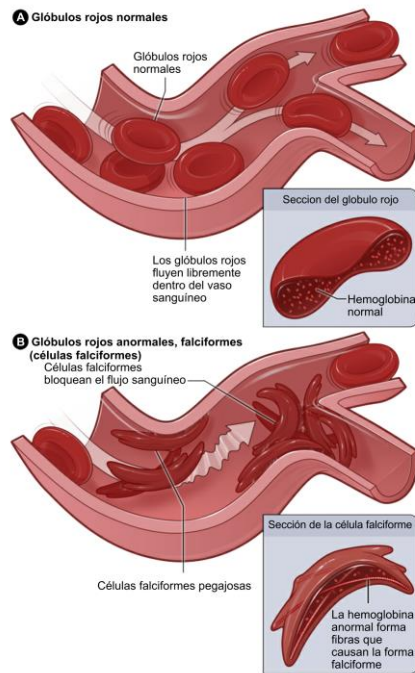


Figura 15. Representación gráfica del flujo sanguíneo

Para conocer los niveles de Hemoglobina presentes en la sangre, se realiza un procedimiento clínico llamado electroforesis de hemoglobina. Esta técnica se lleva a cabo con la finalidad de conocer la presencia de los tipos de hemoglobina así como sus porcentajes (*Análisis de hemoglobina, 2022*). Para esto, se extrae una muestra de sangre y se analizan para poder dar resultados entre uno y dos días después de la consulta. Este método se considera seguro y con riesgos mínimos (dado el hecho de que se utilizan agujas o que se puedan desarrollar hematomas posteriores a la extracción de sangre, los cuales deben de desaparecer a los pocos días) (Johns Hopkins: All Children's Hospital, s. f.).

2.6 Sensores de luz

2.6.1 Fotorresistor (LDR)

Ruiz et al. definen al fotorresistor o LDR (por sus siglas en inglés Light Dependent Resistor) como “un componente electrónico cuya resistencia disminuye con el aumento de intensidad de luz incidente” (Ruiz et al., 2010). Para cumplir esta función, se utilizan materiales como sulfuro de cadmio (CdS), sulfuro de plomo (PbS) y seleniuro de cadmio (CdSe) (Yoon, 2016). Este componente tiene la resistencia en forma de onda para cubrir una mayor área y detectar una mayor cantidad de luz (ver Figura 16). Al recibir luz, se forman los pares hueco-electrón, haciendo que el material sea más conductivo y reduciendo su resistencia. Así que mientras haya menos luz, habrá una mayor resistencia. Este fenómeno no es lineal, sino que obedece a una función exponencial (Ruiz et al., 2010).

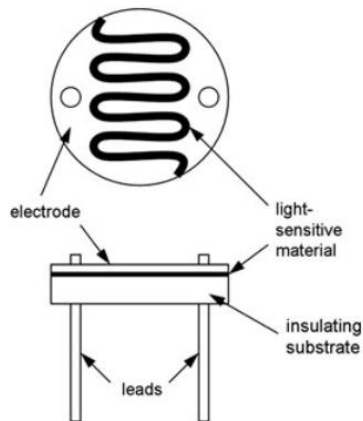


Figura 16. Diagrama esquemático de un fotorresistor (Yoon, 2016).

2.6.2 Fotodiodo (PD)

Se puede definir como un fotodetector que es sensible a los fotones (Betta, 2011). Existen dos modos en los cuales se puede encontrar un fotodiodo: modo fotovoltaico y modo fotoconductor.

En el primer caso, la parte P contiene huecos mientras que la parte N contiene electrones. Dado a que los semiconductores de tipo N y tipo P se repelan, hay una zona en donde no hay contacto. Al haber luz, se crean más electrones y más huecos dado que los electrones de valencia aumentan su nivel de energía. El semiconductor tipo P es delgado, así que ciertos fotones de luz logran salir hacia lados opuestos (de N a P y viceversa), lo cual hace que el fotodiodo sea más conductor (ver Figura 17). En cambio, en el modo fotoconductor (polarizándolo inversamente) se puede obtener más corriente y se puede alcanzar una mayor sensibilidad (ver Figura 18) (Yoon, 2016).

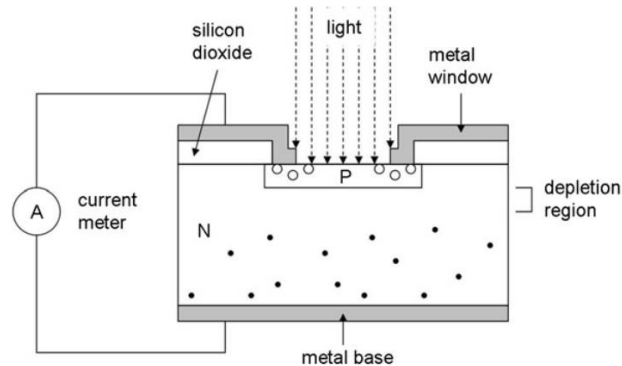


Figura 17. Fotodiodo en modo fotovoltaico (Yoon, 2016).

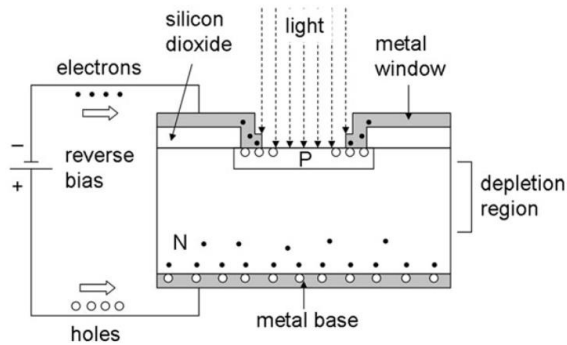


Figura 18. Fotodiodo en modo fotoconductorio (Yoon, 2016).

2.6.3 Fototransistor (PT)

Otro de los sensores de luz más utilizados es el fototransistor. En la Figura 19 se muestra el símbolo que este componente tiene. Básicamente es un transistor convencional con los típicos pines llamados base, colector y emisor con la diferencia que en el pin de base no se va a alimentar de corriente como un transistor convencional, sino que dependiendo la cantidad de luz que detecte el fototransistor va a hacer que cambie el voltaje entre el colector y el emisor.

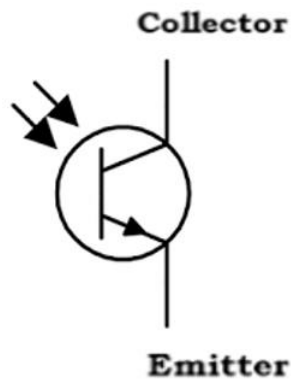


Figura 19. Símbolo de un fototransistor

El fototransistor se puede ocupar en 2 configuraciones: puede ser en configuración emisor común o colector común. En el emisor común se utiliza como se muestra en la Figura 20 (izquierdo) mientras que en el colector común se representa como en la Figura 20 (derecha) en donde se puede ver claramente cómo el fototransistor tiene un pin que va a la resistencia que va hacia la tierra, mientras que del otro lado va directamente hacia el voltaje de entrada. A su vez el fototransistor puede estar en modo switch o en modo activo. El modo switch significa que el fototransistor solamente tiene dos posibles opciones: encendido y apagado. Esto sucede cuando la base del fototransistor detecta luz, por lo tanto, estará apagado hasta que pase un umbral. Cuando el fototransistor se satura (pasando el umbral) ya se considera encendido. Esta configuración es muy utilizada para sensores de detección de movimiento y para otros tipos de aplicaciones en donde solamente se requiere saber si hay presencia o no de luz. La otra configuración (modo activo) básicamente muestra que la señal eléctrica de salida va a ser proporcional a la intensidad de luz que se detecta. Es decir, habrá una respuesta lineal del fototransistor dependiendo de cuánta luz es recibida (Semiconductor Components Industries, 2017).

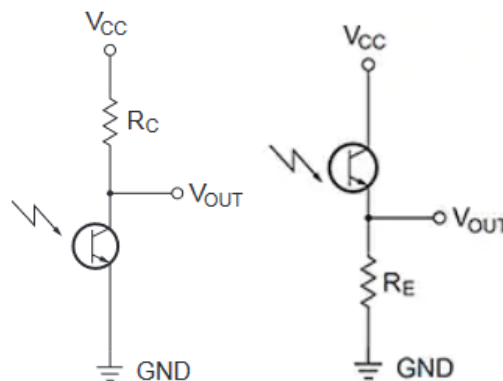


Figura 20. Fototransistor en configuración emisor común (izquierdo) y modo colector común (derecho).

En cuanto a características, el fototransistor muestra una respuesta espectral óptima en longitudes cercanas a la región infrarroja, es dependiente de la entrada base (ya que dependiendo de la cantidad de luz emitida hacia esa entrada, la salida del dispositivo cambia), tiene una relación entre la ganancia de corriente con baja intensidad de luz (es lineal hasta llegar a un punto en donde a pesar del aumento de intensidad de luz, la ganancia disminuye) y tiene una gran velocidad en cuanto a respuesta directa de la iluminación (Bansal & Maiya, 2020)

2.7 Fuentes de luz

2.7.1 Diodo Emisor de Luz (LED)

Prasad et al. definen al diodo emisor de luz (LED) como un semiconductor que, cuando fluye corriente a través de él, emite luz (2020). Para comprender de mejor manera su funcionamiento, la Figura 21 presenta el mecanismo por el cual el LED (tipo unión PN) puede generar luz: al aplicar corriente, los electrones buscan llenar huecos, creando conexiones agujero-hueco. Al ocurrir esto, la emisión de luz ocurre al generar fotones (Yoon, 2016).

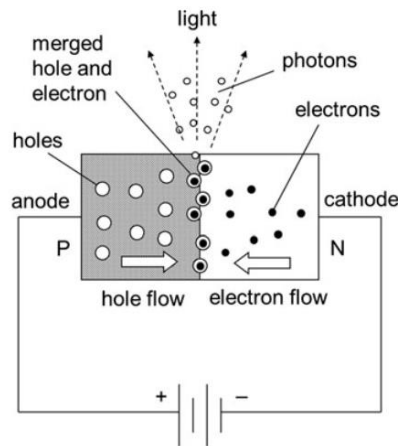


Figura 21. Funcionamiento de LED (Yoon, 2016).

En cuanto a voltaje, los LEDs tienen un crecimiento exponencial de corriente a partir de 1.2V, hasta llegar a 1.6V. A este valor de voltaje, sólo la corriente puede seguir aumentando mientras que el voltaje permanece constante. El diodo emisor de luz es muy popular ya que es un componente electrónico capaz de generar luz cuando un bajo poder de consumo, si es que se compara con fuentes de luz como halógenos, incandescentes, o bombillas fluorescentes (Yoon, 2016). Estos diodos se pueden encontrar en diferentes colores (azul, verde, rojo), inclusive existen LEDs de luz blanca, los cuales son más potentes y disminuyen su tamaño.

2.7.2 Diodo Láser (LD)

A diferencia del LED, el diodo láser (por sus siglas en inglés Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) es un tipo de diodo que permite emitir una luz monocromática, con poca dispersión, que alcanza longitudes considerables y que concentra toda su energía en un punto en específico (Cañas Ortega, 2022).

En cuanto a su funcionamiento, una columna se encuentra en dos espejos que, al aplicarse voltaje directo, se generan fotones a una longitud de onda específica. Al encontrarse entre dos espejos, cada vez que los fotones rebotan aumenta su intensidad. Dado que hay un espejo semitransparente, parte de esos fotones logran atravesar el espejo y es lo que se conoce como láser. El ancho del láser suele tener un diámetro de 1mm y puede enfocar una zona de interés de 1µm (Yoon, 2016). En la Figura 22 se ve claramente las características de potencia y rango de iluminación entre el LED y el láser, esto con relación a los anchos espectrales de los LED, los cuales son del orden de 20 nm a 50 nm, mientras que los láseres son del orden de 1 a 2 nm.

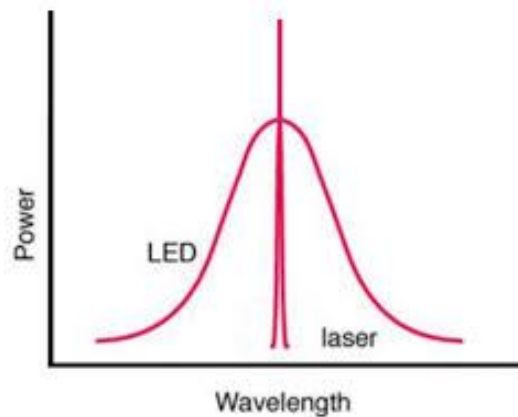


Figura 22. Comparación entre LED y láser. (Weik, 2000).

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos y Materiales

Los reactivos que se utilizaron para llevar a cabo la preparación de las Hemoglobinas en condiciones fisiológicas son los que se muestran en la Figura 23 y son los siguientes:

- Solución salina tamponada con fosfato - PBS (Sigma-Aldrich P4417-100TAB)
- Hemoglobina A₀, Ferroso Estabilizado, humano – Hb A₀ (Sigma-Aldrich H0267-25MG)
- Hemoglobina S, Ferroso Estabilizado, humano – Hb S (Sigma-Aldrich H0392-25MG)



Figura 23. Hb A₀ (izquierda), Hb S (en medio) y solución PBS (derecha). Imágenes obtenidas

de Sigma Aldrich México: <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es>

Por otro lado, el equipo utilizado incluye:

- *Labnet* S0200 Model VX-200 Vortex Mixer with CombiCup Head, 120V
- Cubetillas desechables *BRAND* 1.5 ml
- Micropipeta 10 – 100 μ l
- Micropipeta 100 – 1000 μ l
- Guantes de látex
- Contenedor con bolsas de hielo
- Láser de 635 nm *Ocean Optics* L635A
- Generador de voltaje *Rigol* DP832
- Multímetro *Fluke* 175
- Seis pares cables tipo banana-pin
- *Steren* CAU-190 Cautín de Estación con Control de Potencia, 45W
- Pasta Para Soldar *Soldek* 60grs
- Rollo de soldadura SOL60-100, 100g, Estaño/Plomo, *Steren*

En cuanto a componentes electrónicos:

- 1 Fototransistor PT311C
- OPAMP UA741
- 2 resistencias de 1 k Ω
- 1 resistencia de 510 Ω
- 9 cables tipo jumper
- Placa fenólica 5.5 x 7 cm tipo Protobard

3.2 Instrumentación del espectrofotómetro basado en un circuito electrónico:

LD/PT/OpAmp

En la Figura 24 se presenta el circuito utilizado para la detección de los dos tipos de Hemoglobina (A_0 y S). Este modelo fue diseñado con el software de National Instruments, NI Multisim Versión 14. En la misma figura se puede apreciar el arreglo experimental general del espectrofotómetro propuesto.

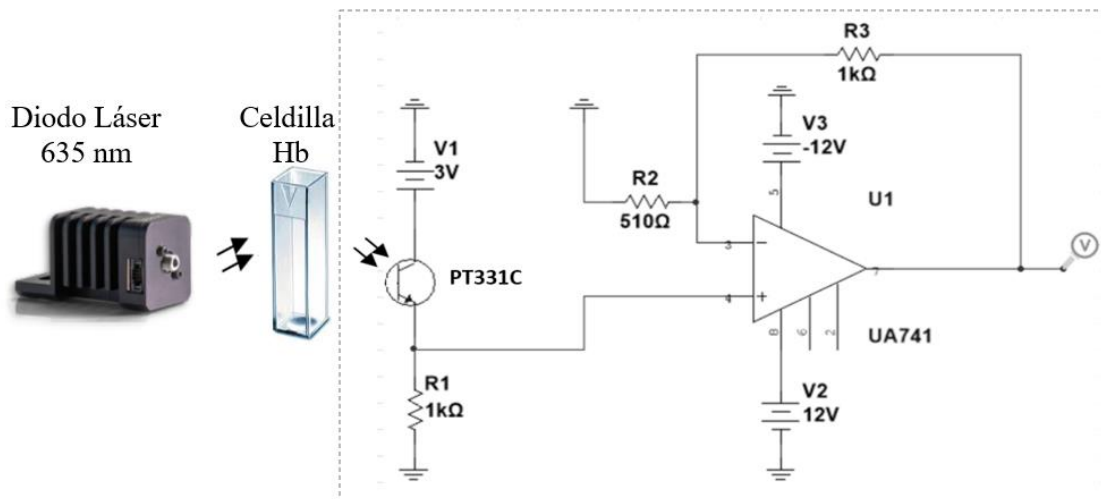


Figura 24. Esquemático del circuito propuesto

Principalmente, el circuito está compuesto por dos partes fundamentales: la primera parte (que corresponde al fototransistor PT, al voltaje V1 y a la resistencia R1) se encarga únicamente del sensado y convertir la luz recibida en una señal eléctrica. Ya que el circuito tiene la configuración de colector común y está en modo activo, a mayor incidencia de luz se obtiene mayor respuesta en voltaje. A su vez, con menor iluminación el voltaje se reduce. El fototransistor tiene el pin colector conectado al voltaje V1 y el pin emisor conectado a la

resistencia R1 y posteriormente a tierra. Entre el fototransistor y la resistencia R1 uno se obtiene la señal de voltaje que va a ser amplificada.

La segunda parte del circuito es compuesta por la sección amplificadora (R2, R3 y el amplificador operacional UA741), ya que se busca obtener una mayor señal de voltaje obtenido de la primera parte del circuito con el objetivo de tener una señal de salida significativa. El OPAMP está en la configuración no-inversora, lo que significa que únicamente va a amplificar la señal que se detecte en la entrada no-inversora del mismo. Para determinar la ganancia del UA741 en modo no-inversor se utiliza la siguiente formula (3):

$$Ganancia = 1 + \left(\frac{R3}{R2}\right) \quad (3)$$

Con las resistencias R3 igual a 1 k Ω y R2 igual a 510 Ω , se obtiene la ganancia igual a 3. Se propuso esta ganancia ya que no se quería forzar al OPAMP a llegar a valores muy altos. Al final del circuito se puede medir el voltaje de salida y es lo que se ve reflejado en el multímetro. Los valores de voltaje de V2 y V3 se encargan de alimentar al amplificador operacional. Se utiliza un láser a 635 nm ya que se ha reportado que es un valor en donde la Hemoglobina tiene respuesta efectiva con respecto a la luz (Edwards et al., 2017).

3.3 Preparación de soluciones de las Hemoglobinas A₀ y S

Con el propósito de realizar el experimento de las Hemoglobinas en condiciones fisiológicas (pH = 7.2), se utilizó una solución PBS. Para preparar esta solución, se utilizó una pastilla

concentrada de PBS y se disolvió en 200 ml de agua desionizada. Enseguida, se dejó reposar por un periodo de tiempo de entre seis a ocho horas. Posteriormente se utilizó el agitador Vortex, con el fin de mezclar de manera adecuada la solución. Finalmente, la solución estaba lista para poder utilizarse en los experimentos tanto de la Hemoglobina tipo A₀ como la de tipo S.

La Figura 25 muestra cómo se está utilizando la micropipeta para agregar un volumen de 125 μ l de solución PBS en los recipientes de Hemoglobina de 25 mg de (a) Hb A₀ y (b) Hb S, respectivamente para obtener una concentración inicial de 200 mg/ml la cual se utilizó como solución stock para realizar las diluciones correspondientes a las concentraciones deseadas. Cabe de mencionar que el volumen mínimo necesario para llevar a cabo las lecturas de medición con nuestro circuito propuesto es de 125 μ l, el cual es imprescindible para cubrir la detección de luz por parte del fototransistor, proveniente de la celdilla.

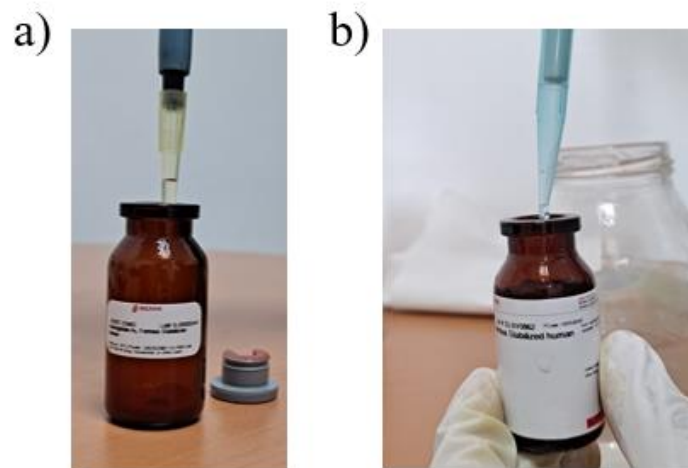


Figura 25. Reconstitución de las Hemoglobinas con el buffer PBS; a) Hb A₀ y b) Hb S

Posteriormente se ocupó el dispositivo vórtex para poder mezclar de manera correcta la solución PBS con la Hemoglobina (en estado liofilizado) para que resultara una solución y se pudiera ocupar para las mediciones deseadas. El uso del mezclador Vortex fue utilizado en nivel moderado de aceleración para poder garantizar un correcto homogenizado de la muestra proteica. Ver Figura 26.



Figura 26. Uso del Vortex para obtener la solución de Hemoglobinas en una concentración stock de 200 mg/ml.

Una vez que ambas proteínas (Hb A₀ y Hb S) hayan quedado perfectamente disueltos y su producto final este en forma líquida, entonces es utilizada una micropipeta para verter la solución en la celdilla de poliestireno que posteriormente será utilizada para la medición de los experimentos de absorbancia. Algo importante de mencionar es que se debe tener mucho cuidado al momento de verter esta solución de Hemoglobina en la celdilla dado que pueden generarse burbujas o bien puede quedarse parte de la solución pegada en las paredes

de la celdilla y al final eso afecta a las mediciones ya que no toda la concentración se está utilizando. Esta parte del proceso se puede ver reflejado en la siguiente Figura 27.



Figura 27. Colocación de la solución de Hb en la celdilla de poliestireno, previo a la lectura de la absorbancia.

Para obtener diferentes concentraciones de Hemoglobinas, se procedió a realizar diluciones a partir de la muestra stock contenida en la celdilla de poliestireno para cada una de las Hemoglobinas (A₀ y S). Esta metodología se explicará a más detalle en la sección 4.2.

Es importante mencionar que cada vez que no se utilizaba las muestras de Hemoglobina para realizar el experimento (medición de absorbancia), se procedía a depositar las muestras Hb entre bolsas de hielo para que no fueran a perder sus propiedades fisiológicas. En la Figura 28 se puede observar de manera de ejemplo cómo se mantenían los recipientes de Hemoglobina A₀ y S en aquel momento.



Figura 28. Muestra de Hemoglobina en condiciones de enfriamiento.

3.4 Estandarización de la curva de calibración para las muestras Hb A₀ y Hb S

Tal y como se explicó en el marco teórico, existe una relación entre el voltaje eléctrico y la absorción de acuerdo con la siguiente fórmula (4):

$$A = \log_{10}\left(\frac{V_0}{V}\right) \quad (4)$$

donde V_0 representa el voltaje mínimo obtenido y que sirve como referencia para los demás cálculos. Es decir, cuando se tiene la concentración de hemoglobina más baja y por ende hay más luz que recibe el fototransistor. V es, por lo tanto, el voltaje correspondiente a la concentración con la cual se está trabajando. De esta manera se puede obtener la absorbancia A , tal como se reporta en la literatura por (Yoon, 2016) y (Place, 2019).

3.5 Mediciones de Absorción de la Hb A₀ y Hb S por la instrumentación propuesta

Una vez preparadas las muestras de hemoglobina y con el circuito instalado correctamente, se comenzó la etapa de experimentación que se dividió en dos días: el primer día se trabajó con la Hemoglobina tipo A₀, mientras que en el segundo día se trabajó con la Hemoglobina

tipo S. Ahora bien, dadas las 9 o 10 diferentes concentraciones propuestas, (acordando con la relevancia clínica) se comenzó con la concentración más densa dado que eventualmente se le irá agregando más solución PBS. Al haber más concentración de PBS, la Hemoglobina estará menos concentrada.

Con base a este dato, se decidió comenzar cada uno de los experimentos. Se llevó a cabo cada experimento con una $n = 3$, con el fin de obtener valores más precisos y obtener el promedio de los voltajes, para después acercarse a un valor mucho más correcto que si solo se hace una sola vez. Entre cada una de las pruebas, se ocuparon ya sea el Vortex o la micropipeta para mezclar la muestra. Cabe destacar que las pruebas se hicieron en condiciones de obscuridad para evitar una contribución adicional por las lámparas del laboratorio en donde fue realizado el experimento. Se notó que existía una diferencia de 0.2 V si se realizaban las pruebas con y sin la luz encendida del laboratorio.

Hay que mencionar que los experimentos con las Hemoglobina A₀ y S, se realizaron de la manera anteriormente descrita y bajo condiciones similares. Posteriormente, los datos obtenidos fueron recolectados en una hoja de Excel para poder obtener la absorbancia de cada muestra correspondiente a cada voltaje y eventualmente obtener el promedio de las absorbancias para cada concentración y eso es al final es lo que se ve reflejado mediante una curva de calibración (absorbancia versus concentración).

3.6 Análisis Estadístico de las muestras Hb A₀ y Hb S

Una vez obtenidas las gráficas (las curvas de calibración) tanto de la hemoglobina A₀ como de la Hemoglobina tipo S, se tomarán en cuenta dos variables que reflejarán el funcionamiento correcto del espectrofotómetro. En primer lugar, se tiene la ecuación de la recta (la cual está determinada por la ecuación $y = mx + b$, siendo b la intersección en el eje vertical de la gráfica y m siendo la pendiente de la recta. En algunos trabajos se reporta la gráfica sin la variable b (Yoon, 2016). Sin embargo, se decidió tomarla en cuenta para este proyecto dado que los resultados considerando esta variable son más precisos.

La segunda variable que se considera importante es el factor de correlación R^2 . Esta variable es de suma importancia ya que refleja si los puntos obtenidos en la medición responden a una linealidad, la cual es una característica que se busca en este tipo de dispositivos. En los artículos consultados para referencia se reporta esta variable en el apartado de resultados, siendo el valor óptimo un valor de R^2 cercano a uno (normalmente para saber si un biosensor o espectrofotómetro tienen una respuesta favorable, se busca un factor de correlación mayor a 0.90; cualquier valor por encima de este valor comprueba que los puntos obtenidos tienen relación y no están dispersos) (Dagnino, 2014).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Construcción del espectrofotómetro basado en un circuito LD/PT/OpAmp

Una vez que se propuso el circuito esquemático del espectrofotómetro, se decidió primero armarlo en una Protoboard para un adecuado uso de los diferentes componentes, ya que de esta manera es más sencillo adaptar y cambiar los diferentes componentes como las resistencias, el OPAMP o el fototransistor. Había que asegurarse de que los componentes que fueran utilizados funcionarían correctamente, así que había que corroborar que cada uno estuviera en buenas condiciones. En el caso de las resistencias, por ejemplo, se buscó que mostrarán el valor de ohm (Ω) que el fabricante sugería. En el caso del amplificador operacional, era importante que amplificará adecuadamente o que las entradas no estuvieran rotas o dañadas. Para el fototransistor, se buscaba un modelo que trabajara adecuadamente en la longitud de onda deseada y con un valor de corriente adecuado. Esto es importante ya que hay diferentes modelos de fototransistor (recubiertos con plástico negro o con tres pines de entrada). Se probaron diferentes tipos de fototransistores y comparando su modo de respuesta, se concluyó entonces que el modelo PT331C cumplía con los requerimientos iniciales. Se armó el circuito base compuesto por la resistencia R1, el voltaje V1 y el fototransistor FT. Se pudo observar que al haber mucha luz había una señal alta de voltaje y con poca luz ausencia de la misma. Otro factor importante es que el circuito podía inclusive

detectar cambios graduales de luz, lo que traducía en cambios graduales de voltaje. Esa característica serviría posteriormente para comparar las diferentes concentraciones de Hemoglobina.

Una vez probada esta parte, se decidió armar el circuito completo (incluida la parte amplificadora). Debido a las muestras finitas adquiridas para el experimento, se decidió primero hacer la simulación del experimento con celdillas rellenas de alcohol líquido y diferentes concentraciones de tinta negra de plumón emulando la presencia a diferentes cantidades de Hemoglobina. Era importante primero realizar estas pruebas ya que las Hemoglobinas una vez descongeladas tienen pocos días con una función útil, así que en caso de alguna corrección no iba a haber mucho tiempo para aprovechar las Hemoglobinas. Se tomó la decisión de descongelar las Hemoglobinas únicamente después de que las pruebas de alcohol con tinta de plumón fueran satisfactorias. Al llevar a cabo estas pruebas se pudo observar que el espectrofotómetro daba respuestas favorables, es decir, un nivel de voltaje proporcional a la luz inducida.

En las Figuras 29 y 30 se puede observar el prototipo del circuito montado en una Protoboard. De esta manera podían hacerse las correcciones necesarias sin comprometer los componentes y asegurarse de que sirviera, para así pasar a la siguiente fase del proyecto y se pudiera soldar el circuito en una placa fenólica (PCB).

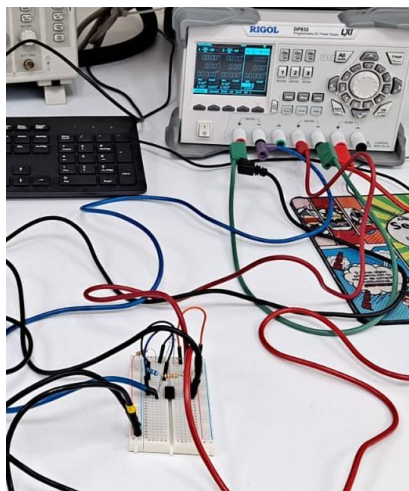


Figura 29. Circuito en Protobard

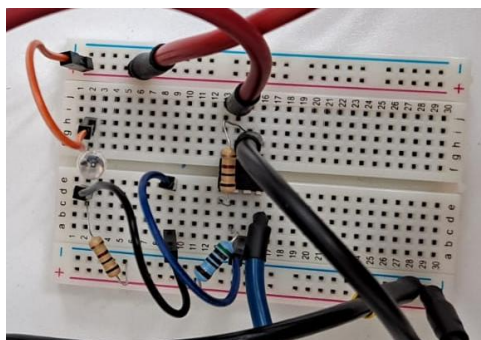


Figura 30. Circuito en Protoboard con zoom

Ahora bien, para la soldadura se utilizó un cautín, pasta para soldar y estaño. Estos tres componentes son fundamentales para una correcta soldadura, ya que el cautín se calienta a altas temperaturas y al ponerse en contacto con el estaño, se derrite inmediatamente. Al momento de enfriarse, se solidifica. Esto es muy conveniente ya que se pueden fijar los componentes del circuito. La pasta para soldar es útil para que los componentes se integren con mayor facilidad. Se utilizó una placa fenólica con las dimensiones de 5.5 por 7 cm tipo

Protoboard (otros diseños no eran convenientes ya que se necesita alimentar el circuito con los voltajes tanto para el fototransistor como para el OPAMP). Se debía tener mucha precaución con soldar los componentes ya que puede suceder que estos se quemen por las altas temperaturas del caudín. Una precaución relacionada a este tema fue el adquirir una base tipo socket para el amplificador operacional ya que los pines de este componente son muy sensibles y se pueden dañar fácilmente. De esta manera si se llegaba a dañar algo solamente iba a ser la base y se podía reemplazar sin ningún problema. A su vez, la ventaja de ocupar este tipo de base en un circuito soldado es que si se llegara a necesitar un cambio de OPAMP simplemente se retira y se coloca uno nuevo sin la necesidad de desoldar todo el componente. Aparte de los componentes mencionados anteriormente, se soldaron cables tipo jumpers para aprovechar el tamaño de la placa y también se soldaron otro tipo de cables jumper con la característica de pin-hueco, en donde en el hueco se van a conectar posteriormente los cables banana-pin del multímetro y generador de voltaje. Estos últimos cables se colocaron con colores específicos para que no hubiera confusión al momento de conectarlos: los amarillos corresponden al multímetro, un par de cables rojo y negro corresponden a los 3 Volts del generador y por último un par de cable rojo y azul corresponden a la alimentación del OPAMP. Se tuvo la necesidad de soldar estos cables ya que si se omitían y se procuraba conectar directamente los cables tipo banana-pin al circuito no quedaban bien fijos y eso reflejaba que el circuito no se alimentaba correctamente, por lo tanto, no había una respuesta satisfactoria. Esto se solucionó precisamente soldando cables para que fuera más sencilla la ejecución del experimento.

Tal y como se hizo con el circuito en Protobard, se realizó la prueba de alcohol con tinta ya con el circuito soldado (Figura 31) para asegurar su correcto funcionamiento y no descongelar las hemoglobinas antes de tiempo. Al correr el experimento y notar que en efecto funcionaba correctamente, se decidió descongelar las muestras de Hemoglobina que se tenían guardadas en refrigeración a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

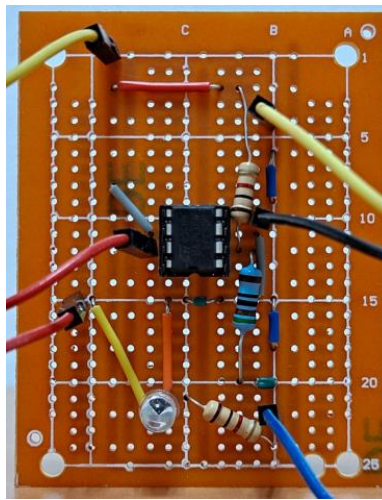


Figura 31. Circuito propuesto soldado

Para tener una idea del resultado esperado, se utilizó el software *Multisim*. Dado a que este programa no cuenta con el bloque de fototransistor, simplemente se colocó un transistor tipo NPN bipolar modelo 2N3904 (el cual es un transistor bastante común y genérico) y se inyecta en el pin base la corriente que proporciona el generador de voltaje (25 mA). Con estos parámetros se esperaba al final del circuito tener el voltaje máximo de lo que se esperaba en el circuito armado, lo cual se obtiene 8.93 V (se espera obtener un valor similar ya que nos está utilizando el fototransistor). Ver Figura 32.

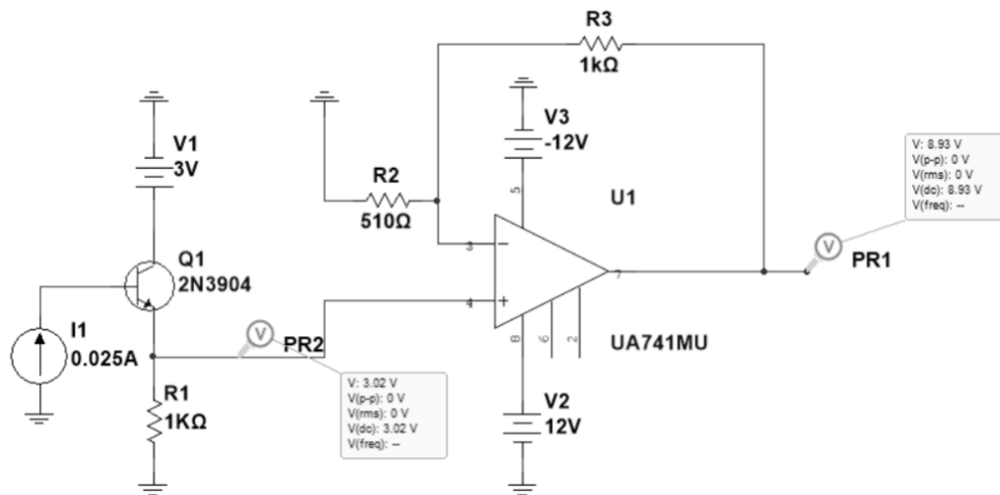


Figura 32. Simulación de circuito

4.2. Calibración y límite de detección del espectrofotómetro

Para calibrar de manera correcta el espectrofotómetro y su respuesta, en las Tablas 2 y 3 se pueden observar los valores obtenidos para la Hemoglobina A₀ y la Hemoglobina S, respectivamente. Se obtuvo que como mínimo se obtenía un voltaje de 7.3 V y como máximo un valor de 8 V. Es decir, cuando la muestra tenía el grado de concentración más alto pasaba menos luz y por lo tanto se obtenía menos voltaje y viceversa. Se puede señalar que el rango entre estos valores es de 600 mV. El resultado máximo de voltaje es adecuado ya que se está utilizando 3 V para alimentar el fototransistor y se tiene el OPAMP con ganancia de 3, lo cual nos podrá dar hasta 9 V, pero debido a factores principalmente como la resistividad eléctrica, la calidad de los materiales o la distancia entre el láser y el fototransistor, el voltaje máximo se ve ligeramente afectado (técnicamente la ganancia es de 2.96, pudiendo obtener un voltaje máximo de 8.88 V).

En las Tablas 2 y 3, se muestran los valores de voltaje obtenidos para la Hemoglobina sana (A₀) y patológica (S) respectivamente. Nótese que para cada valor de voltaje se calculó su absorbancia y posteriormente se promediaron esos datos, para que fueran los puntos a graficar.

Concentración	n=1	n=2	n=3	n=1	n=2	n=3	A
	Vout	Vout	Vout	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	
(g/dl)	(Volts)	(Volts)	(Volts)	(u.a)	(u.a)	(u.a)	(u.a)
0	7.9	7.9	7.9	0	0	0	0
1	7.82	7.83	7.84	0.00442034	0.00386533	0.00331103	0.00387
1.5	7.78	7.79	7.81	0.00664749	0.00608963	0.00497606	0.005904
2.5	7.8	7.77	7.76	0.00553249	0.00720607	0.00776537	0.006835
5	7.73	7.72	7.73	0.0094476	0.01000979	0.0094476	0.009635
7.5	7.63	7.67	7.71	0.01510255	0.01283173	0.01057271	0.012836
10	7.56	7.67	7.62	0.01911053	0.01283173	0.01567212	0.01587
15	7.66	7.36	7.65	0.01339832	0.03074928	0.01396566	0.019371
17.5	7.53	7.36	7.48	0.02083212	0.03074928	0.02372549	0.025102
20	7.52	7.29	7.26	0.02140925	0.03489956	0.03669047	0.031

Tabla 2. Registro de la Absorbancia de Hb A₀, a partir de la lectura de voltaje eléctrico

Concentración	n=1	n=2	n=3	n=1	n=2	n=3	A
	Vout	Vout	Vout	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	
(g/dl)	(Volts)	(Volts)	(Volts)	(u.a)	(u.a)	(u.a)	(u.a)
0	8	8.01	8	0	0	0	0
1	7.91	7.91	7.92	0.0049135	0.00545603	0.00436481	0.004911
1.5	7.9	7.91	7.9	0.0054629	0.00545603	0.0054629	0.005461
2	7.87	7.9	7.9	0.00711525	0.00600542	0.0054629	0.006195
5	7.82	7.85	7.84	0.00988323	0.00876286	0.00877392	0.00914
7.5	7.69	7.76	7.79	0.01716365	0.01377079	0.01155253	0.014162
10	7.75	7.79	7.81	0.01378828	0.01209506	0.01043895	0.012107
15	7.75	7.75	7.45	0.01378828	0.01433081	0.03093371	0.019684
20	7.19	7.56	7.83	0.0463611	0.02511072	0.00932822	0.026933

Tabla 3. Registro de la Absorbancia de Hb S, a partir de la lectura de voltaje eléctrico

Ahora bien, la obtención de los valores de concentración de cada Hemoglobina fueron realizados mediante diluciones de muestras stock de Hb A₀ y Hb S, siguiendo la siguiente formula (5):

$$C1V1 = C2V2 \quad (5)$$

Donde C1 es la concentración inicial, V1 el volumen inicial, C2 la concentración a la que se quiere llegar y V2 el volumen a aforar para obtener de dicha concentración. Dado que C1 y V1 estaban definidos desde el principio por la muestra stock (200 mg/ml), se fue recalculando el valor de V2 para saber cuántos mililitros había que agregarse para alcanzar la concentración adecuada. En la Tabla 4 se puede apreciar el registro de estas diluciones para obtener las concentraciones deseadas.

Prueba	C1 (mg/ml)	V1 (ml)	C2 (mg/ml)	V2 (ml)	V2 (en µl agregados)
C1	200	0.13	175	0.143	143
C2	175	0.14	150	0.167	167
C3	150	0.17	125	0.2	200
C4	125	0.2	100	0.25	250
C5	100	0.25	75	0.333	333
C6	75	0.33	50	0.5	500
C7	50	0.5	25	1	1000
C8	25	1	20	1.25	1250
C9	20	1.25	15	1.667	1667
C10	15	1.67	10	2.5	2500
C11	10	2.5	5	5	5000

Tabla 4. Registro y cálculo de la relación concentración -volumen para las diluciones de las Hemoglobinas A₀ y S.

4.3. Análisis de Absorción de muestras Hb A₀ y Hb S

Tal y como se mencionó en los apartados anteriores, la primera prueba se realizó con la Hemoglobina tipo A₀ en la Figura 33. En el eje horizontal se puede ver la concentración de Hemoglobina en gramos sobre decilitro ($\frac{g}{dL}$) mientras que en el eje vertical se tienen los valores de absorbancia (los cuales son de unidades arbitrarias). Cada uno de los 10 puntos presentados refleja el promedio de las absorbancias de las tres pruebas que se llevaron a cabo para cada una de las diferentes concentraciones. En la misma figura se aprecia un ajuste lineal, el cual es una característica importante en donde se muestra si los datos arrojados por el espectrofotómetro tienen o no linealidad, es decir, que los puntos tengan relaciones entre sí y no sean valores dispersos de la tendencia lineal. También, en la Figura 33 se puede observar que se presenta la ecuación de la pendiente que puede servir posteriormente para el hipotético caso de tener una celdilla con concentración desconocida de Hemoglobina. Al realizar el experimento con dicha celdilla, se puede obtener el valor de voltaje. Con la fórmula utilizada en el experimento se podría obtener la absorbancia y, dado que ya se tiene la curva de calibración, se podría estimar la concentración de Hemoglobina contenida en dicha celdilla. Esto es posible con el siguiente despeje:

$$A = 0.00133C + 0.00243$$

$$C = \frac{A}{0.00133} - 0.00243$$

Nótese que el que la constante de correlación R^2 tiene un valor de 0.987 lo cual refleja una linealidad del sensor notable tomando como referencia la pendiente de inclinación de una curva típica reportada en la literatura por (Srinivasan et al., 2003).

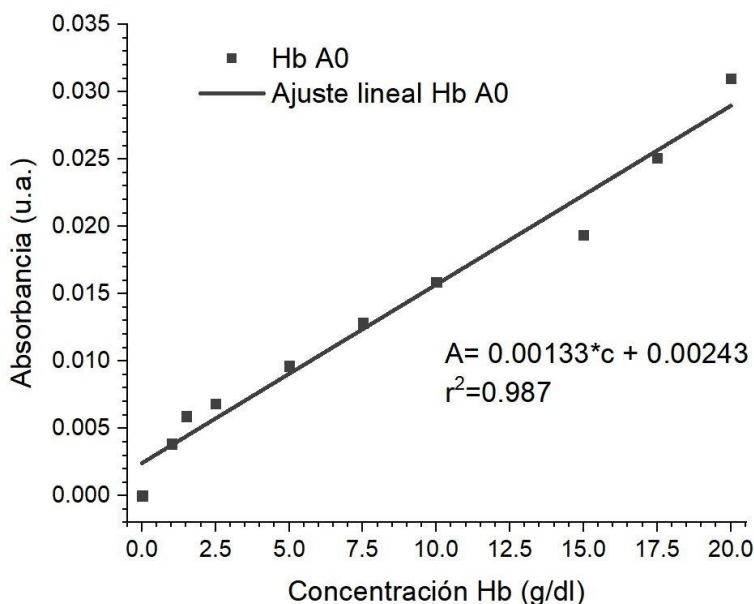


Figura 33. Gráfica final de Hb A0

Por otro lado, para el caso de la Hemoglobina tipo S se llevó a cabo el mismo proceso con las mismas características tanto de preparación como del ensamblado de circuito y se obtuvo la respuesta lineal de la Figura 34. Al igual que la Figura 33, cada punto de la curva refleja el promedio de las tres mediciones, en este caso de igual manera el eje X representa la concentración (en gramos sobre decilitro), mientras que el eje Y indica la absorbancia (en unidades arbitrarias). Cabe destacar que la pendiente de inclinación de la curva es muy similar, así como la intersección en el eje Y de ambas Figuras (33 y 34). El

mayor cambio sucede en el factor de correlación ya que se obtiene un factor de 0.920 en la curva de calibración para la Hb S en contraste con el factor de 0.987 para la curva de calibración de la Hb A₀. Esto significa que sigue habiendo linealidad y es una respuesta satisfactoria y reportable pero tal y como se puede apreciar, hay puntos que están dispersos unos en comparación con otros, lo cual hace que el factor R^2 disminuya. Esto se puede deber a varias razones, por ejemplo: (1) debido que la Hemoglobina tipo S sea un agregado de proteínas afectadas por la conformación del glóbulo rojo quién le da la forma característica falciforme, (2) al hecho de la Hemoglobina S tiene una menor área superficial de absorción que la Hb A₀, esto debido a su forma falciforme, lo cual permite una mayor transmitancia de luz en dicha Hemoglobina. (3) Otra razón podría ser el hecho de que, al momento de preparar la Hemoglobina patológica, se observó a la proteína fragmentada (hecho que no sucedió con la Hemoglobina A₀, ya que esta tenía forma toroidal). Esto podría significar que la Hb S es más inestable que la Hb A₀. Sin embargo, el espectrofotómetro es capaz de sensor la presencia de este tipo de Hemoglobina a pesar de que no sea tan predecible como en el caso anterior.

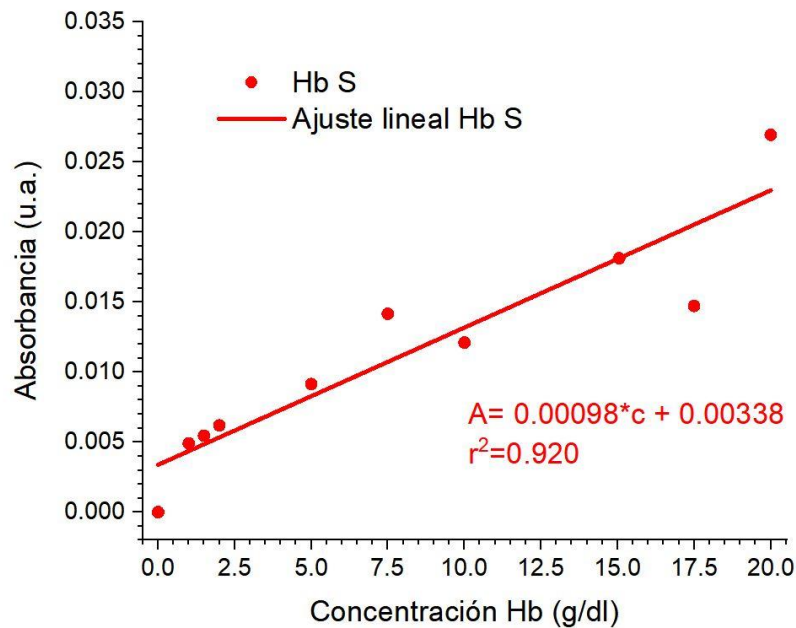


Figura 34. Gráfica final de Hb S

Por último, se realizó la Figura 35 con los dos tipos de Hemoglobina, para poder realizar una mejor comparación y se puedan identificar Hb A₀ y Hb S, tal y como se explicó en los párrafos anteriores. La Hemoglobina de tipo A₀ absorbió más luz, lo cual se traduce como una pendiente mayor comparada con la Hemoglobina patológica (S). A su vez, se ve claramente como los puntos obtenidos para la Hemoglobina patológica están más dispersos que en el caso de la Hemoglobina en condiciones normales (A₀). Cabe mencionar que esta diferencia de ajustes lineales se ve con más claridad a partir de 10.0 g /dl, porque a partir de esta concentración, los puntos entre ambas Hemoglobinas tienden a separarse cada vez más entre sí. Por otro lado, por debajo de los 10 gramos sobre decilitro, las pendientes no presentan una diferencia significativa, teniendo inclusive una intersección en 5.0 g/dl.

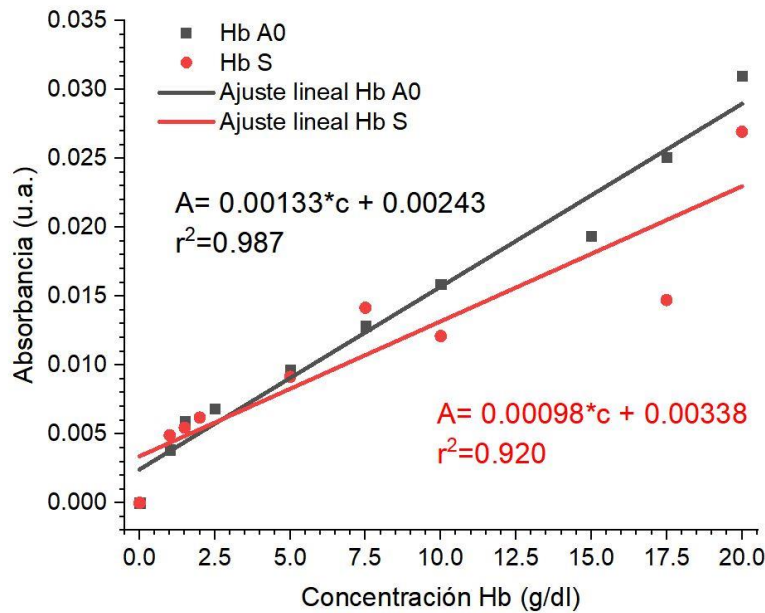


Figura 35. Comparación de la absorbancia de ambas Hemoglobinas

Finalmente, se presenta en la Figura 36 la muestra final de Hemoglobina después de alcanzar la última dilución de Hb con PBS. Esta muestra representa la concentración más diluida en el experimento, esto es 1 g/dl (10 mg/ml), que corresponde a la concentración menor registrada en la curva de calibración. Es importante notar que, a lo largo de todo el experimento, el color de la muestra siguió siendo rojo (a intensidades ligeramente diferentes, pero siempre con el color rojo distintivo de la sangre).



Figura 36. Muestra resultante de Hemoglobina

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este trabajo se propuso el diseño e implementación de un espectrofotómetro monocromático (absorción a una longitud de onda) que obedece la Ley de absorción óptica de Beer-Lambert necesaria para la determinación de diversas concentraciones de dos proteínas modelo de Hemoglobina (Hb A₀ y Hb S) de interés clínico, el cual mostró resultados cuantitativamente aceptables.

El prototipo electrónico propuesto (triada de componentes electrónicos básicos) para el espectrofotómetro monocromático, es capaz de correlacionar la absorbancia de luz y la concentración de una muestra proteica como lo es la Hemoglobina en un rango de concentraciones de uso clínico (mayor a 11 g/dl y menor a 7 g/dl para saludable y con anemia severa, respectivamente), de acuerdo con la (Organización Mundial de la Salud, 2011).

Como recomendaciones:

- Validar nuestros resultados con un espectrofotómetro convencional de uso clínico bajo las mismas condiciones de concentración proteica de las Hemoglobinas modelo Hb A₀ y Hb S.
- Reemplazar la fuente monocromática de luz roja (635 nm), por una fuente monocromática de infrarrojo cercano al visible (especialmente en el rango entre 700 nm y 900 nm), debido a lo reportado por (AlMulla et al., 2011), donde reportan que la Hb S muestra un patrón de absorción superior que la Hb A₀ normal en el rango de longitudes de onda mencionado.
- Explorar el uso de longitudes de onda por debajo de 600 nm como fuente de luz, debido que (Jacques, S., 2018), (Sydoruk, O., 2012) y (Uyuklu, M., 2011) han expresado que la hemoglobina es un absorbente de luz eficaz en el rango de 400 - 600 nm (parte del espectro visible), esto debido a que la absorción aumenta hacia longitudes de onda más cortas debido a la absorción de proteínas y hacia longitudes de onda más largas debido a la absorción de agua, por lo que podría pensarse en reemplazar la fuente monocromática de este trabajo por una policromática que abarque este rango sugerido, el cual podría ser luz blanca debido a la composición de las diversas longitudes de onda del espectro visible.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmadi, M. M., & Jullien, G. A. (2009). Current-Mirror-Based Potentiostats for Three-Electrode Amperometric Electrochemical Sensors. *IEEE Transactions on Circuits and Systems I: Regular Papers*, 56(7), 1339-1348. <https://doi.org/10.1109/TCSI.2008.2005927>
- Albert, D. R., Todt, M. A., & Davis, H. F. (2012, septiembre 7). *A Low-Cost Quantitative Absorption Spectrophotometer* (world) [Research-article]. ACS Publications; American Chemical Society and Division of Chemical Education, Inc. <https://doi.org/10.1021/ed200829d>
- Almulla, A. M. F., Agab, A. W., Almannai, L. S., & Henari, F. Z. (2011). Visible and near-infrared absorption properties of blood from sickle cell patients and normal individuals. *RCSIsmjBahrain*, 4, 82-83.
- Álvarez Seijas, E., González Calero, T. M., Cabrera Rode, E., Conesa González, A. I., Parlá Sardiñas, J., & González Polanco, E. A. (2009). Algunos aspectos de actualidad sobre la hemoglobina glucosilada y sus aplicaciones. *Revista Cubana de Endocrinología*, 20(3), 141-151.
- Análisis de hemoglobina: Prueba de laboratorio de MedlinePlus*. (s. f.). Recuperado 10 de enero de 2023, de <https://medlineplus.gov/spanish/pruebas-de-laboratorio/analisis-de-hemoglobina/>
- Anemia: MedlinePlus enciclopedia médica*. (2022). <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/000560.htm>
- Baker, W. B., Parthasarathy, A. B., Busch, D. R., Mesquita, R. C., Greenberg, J. H., & Yodh, A. G. (2014). Modified Beer-Lambert law for blood flow. *Biomedical Optics Express*, 5(11), 4053-4075. <https://doi.org/10.1364/BOE.5.004053>
- Bansal, M., & Maiya, R. R. (2020). Phototransistor: The Story So Far. *Journal of Electronics and Informatics*, 2(4), 202-210. <https://doi.org/10.36548/jei.2020.4.002>

- Belén, D., & Ec, C. (2018). *Biosensores y sistemas ópticos y de visión avanzados: Su aplicación en la evaluación de la calidad de productos IV gama*.
- Bencomo, S., Villazana, S., & Salas, B. (2016). *Design and construction of a pulse oximeter*. 23(2).
- Betta, G.-F. D. (2011). *Advances in Photodiodes*. BoD – Books on Demand.
- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 1-8. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>
- Cañas Ortega, I. J. (2022). Uso del láser de diodo en odontología. *instname:Universidad Antonio Nariño*. <http://repositorio.uan.edu.co/handle/123456789/7304>
- Ceballos-Camargo, L. E., Narro Céspedes, R. I., & Sandoval Cortés, J. (2014). Biosensores electroquímicos de glucosa. *Ciencias Biológicas y Químicas*.
- Clark, T. J., Houck, S. A., & Clark, J. I. (2012). Hemoglobin interactions with α B crystallin: A direct test of sensitivity to protein instability. *PLoS One*, 7(7), e40486.
- Definición de hemoglobina—Diccionario de cáncer del NCI - NCI* (nciglobal,ncienterprise). (2011, febrero 2). [NciAppModulePage]. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/hemoglobina>
- Díaz-Matallana, M., Márquez-Benítez, Y., Martínez-Lozano, J. C., Briceño-Balcázar, I., Benavides-Benítez, E., & Bernal, J. E. (2021). Anemia falciforme: Una revisión sobre el genotipo de la enfermedad, haplotipos, diagnóstico y estudios asociados. *Revista médica de Chile*, 149(9), 1322-1329. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872021000901322>
- Edwards, P., Zhang, C., Zhang, B., Hong, X., Nagarajan, V. K., Yu, B., & Liu, Z. (2017). Smartphone based optical spectrometer for diffusive reflectance spectroscopic measurement of hemoglobin. *Scientific Reports*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12482-5>
- Electromagnetic Radiation*. (2013, octubre 2). Chemistry LibreTexts. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Spectroscopy/Fundamentals_of_Spectroscopy/Electromagnetic_Radiation](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Fundamentals_of_Spectroscopy/Electromagnetic_Radiation)

- Enfermedad de células falciformes—Causas y factores de riesgo* | NHLBI, NIH. (2022, agosto 26). <https://www.nhlbi.nih.gov/es/salud/enfermedad-de-celulas-falciformes/causas>
- Guo, J., Ng, W., Yuan, J., Li, S., & Chan, M. (2016). A 200-Channel Area-Power-Efficient Chemical and Electrical Dual-Mode Acquisition IC for the Study of Neurodegenerative Diseases. *IEEE Transactions on Biomedical Circuits and Systems*, 10(3), 567-578. <https://doi.org/10.1109/TBCAS.2015.2468052>
- Hou, X., Xiao, F., Wang, J., & Amirkhanian, S. (2018). Identification of asphalt aging characterization by spectrophotometry technique. *Fuel*, 226, 230-239. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.04.030>
- Jacques, S. (2018). Optical Properties of Aorta. Assorted Spectra - OMLC. <https://omlc.org/spectra/aorta/>
- JASCO. (2023). *Instrumentation of a UV-Visible Spectrophotometer*. <https://jascoinc.com/learning-center/theory/spectroscopy/uv-vis-spectroscopy/instrumentation/>
- Johns Hopkins: All Children's Hospital. (s. f.). *Análisis de sangre: Electroforesis de hemoglobina*. Recuperado 3 de abril de 2023, de <https://www.hopkinsallchildrens.org/Patients-Families/Health-Library/HealthDocNew/Analisis-de-sangre-electroforesis-de-hemoglobina>
- Mantadakis, E., Chatzimichael, E., & Zikidou, P. (2020). Iron Deficiency Anemia in Children Residing in High and Low-Income Countries: Risk Factors, Prevention, Diagnosis and Therapy. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 12(1), e2020041. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2020.041>
- Organización Mundial de la Salud. (2011). *Concentraciones de hemoglobina para diagnosticar la anemia y evaluar su gravedad* (WHO/NMH/NHD/MNM/11.1). Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/85842>
- Oshina, I., & Spigulis, J. (2021). Beer–Lambert law for optical tissue diagnostics: Current state of the art and the main limitations. *Journal of Biomedical Optics*, 26(10), 100901. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.26.10.100901>

- Place, B. J. (2019). Activity Analysis of Iron in Water Using a Simple LED Spectrophotometer. *Journal of Chemical Education*.
<https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.8b00515>
- Prasad, A., Du, L., Zubair, M., Subedi, S., Ullah, A., & Roopesh, M. S. (2020). Applications of Light-Emitting Diodes (LEDs) in Food Processing and Water Treatment. *Food Engineering Reviews*, 12(3), 268-289. <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09221-4>
- Ramirez-Martinez, J. L. (2022). Componentes de la sangre. *Con-Ciencia Boletín Científico de la Escuela Preparatoria No. 3*, 9(18), 103-104.
- Roche Farma, S.A. (2022). ¿Cuáles son los componentes de la sangre?
<https://rochepacientes.es/hemofilia/componentes-sangre.html>.
- Ruiz, A. S., García, F. A. R., & Rico Noguera, J. C. (2010). *GUÍA PRÁCTICA DE SENSORES*. Creaciones Copyright SL.
- Sabu, C., Henna, T. K., Raphey, V. R., Nivitha, K. P., & Pramod, K. (2019). Advanced biosensors for glucose and insulin. *Biosensors and Bioelectronics*, 141, 111201.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.03.034>
- Schientle, M., Paulus, C., Frey, A., Hofmann, F., Holzapfl, B., Schindler-Bauer, P., & Thewes, R. (2004). A fully electronic DNA sensor with 128 positions and in-pixel A/D conversion. *IEEE Journal of Solid-State Circuits*, 39(12), 2438-2445.
<https://doi.org/10.1109/JSSC.2004.837084>
- Semiconductor Components Industries, LLC. (2017). AN-3005—Application Note AN-3005: Design Fundamentals for Phototransistor Circuits—Lichtsensoren / Helligkeitssensoren.
https://www.datasheetarchive.com/whats_new/3d800fc7c44d275e5aa99bdc4156820d.html
- Sridhar, A., & Idowu, M. (2021). *Hemoglobin Electrophoresis in Sickle Cell Disease: A Primer for the Clinician* - *Hematology.org*.
<https://www.hematology.org:443/education/trainees/fellows/trainee-news/2021/hemoglobin-electrophoresis-in-sickle-cell-disease>

- Srinivasan, S., Pogue, B. W., Jiang, S., Dehghani, H., & Paulsen, K. D. (2003, July). Validation of hemoglobin and water molar absorption spectra in near-infrared diffuse optical tomography. In *Optical Tomography and Spectroscopy of Tissue V* (Vol. 4955, pp. 407-415). SPIE.
- Sydoruk, O., Zhernovaya, O., Tuchin, V., & Douplik, A. (2012). Refractive index of solutions of human hemoglobin from the near-infrared to the ultraviolet range: Kramers-Kronig analysis. *Journal of biomedical optics*, 17(11), 115002-115002.
- Uyuklu, M., Canpolat, M., Meiselman, H. J., & Baskurt, O. K. (2011). Wavelength selection in measuring red blood cell aggregation based on light transmittance. *Journal of biomedical optics*, 16(11), 117006. <https://doi.org/10.1117/1.3652712>
- Weik, M.H. (2000). Spectral width. In: *Computer Science and Communications Dictionary*. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/1-4020-0613-6_17892
- Yoon, J.-Y. (2016). Light Sensors. En J.-Y. Yoon, *Introduction to Biosensors* (pp. 109-126). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27413-3_7