



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Ingeniería Biomédica



**Dispositivo detector de Glucosa no Invasivo instrumentado con
Electrodos Serigrafiados Modificados con la Enzima Glucosa
Oxidasa.**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el título de
Ingeniero Biomédico línea terminal en Bioseñales y
Bioinstrumentación.

Presenta:

LUIS ENRIQUE PACHECO RUBIO.

Dirigida por:

DR. CARLOS ANDRÉS PÉREZ RAMÍREZ.

DRA. VANESSA VALLEJO BECERRA

DR. GERMÁN GONZÁLEZ PÉREZ

Santiago de Querétaro, Qro., marzo del 2019.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE INGENIERÍA
CAMPUS AEROPUERTO



**DISPOSITIVO DETECTOR DE GLUCOSA NO INVASIVO
INSTRUMENTADO CON ELECTRODOS SERIGRAFIADOS
MODIFICADOS CON LA ENZIMA GLUCOSA OXIDASA.**

T E S I S

Que como parte de los requisitos para obtener el título de

INGENIERO BIOMÉDICO

Línea Terminal

BIOSEÑALES Y BIOINSTRUMENTACIÓN

Presenta:

LUIS ENRIQUE PACHECO RUBIO

Dirigido por:

**DR. CARLOS ANDRÉS PÉREZ RAMÍREZ.
DRA. VANESSA VALLEJO BECERRA**

S I N O D A L E S :

DR. CARLOS ANDRÉS PÉREZ RAMÍREZ

Presidente

Firma

DRA. VANESSA VALLEJO BECERRA

Secretario

Firma

M. en C. GERMÁN GONZÁLEZ PÉREZ

Vocal

Firma

M. en C. GEORGINA DEL CARMEN MOTA VALTIERRA

Suplente

GEORGINA MOTA V.

Firma

Dr. Manuel Toledano Ayala
Director de la Facultad

Santiago de Querétaro, Qro., marzo del 2019.

RESUMEN

En los últimos años, la población mexicana y del mundo ha experimentado un incremento en la población diabética. Por la naturaleza de la enfermedad y de las complicaciones que pueden propiciar a otras enfermedades graves al organismo (enfermedad renal crónica, accidentes cerebrovasculares, enfermedades cardiovasculares, entre otras) para esta población es de suma importancia supervisar los niveles de glucosa en el organismo, además de que se trata de un signo vital importante para cualquier paciente hospitalizado y que se mide al menos, tres veces al día. Una forma de auxiliar a esta población es que esta medición sea lo menos invasiva posible, debido a esto se desarrolla un dispositivo detector de glucosa en saliva, mismo que es instrumentado con electrodos serigrafados utilizando la enzima glucosa oxidasa. Una de las ventajas notables de trabajar con electrodos serigrafados es que se pueden utilizar enzimas en ellos, las enzimas aportan especificidad al sistema de medición. En este trabajo se utiliza la enzima glucosa oxidasa, misma que es altamente específica a la molécula de la glucosa. Para poder trabajar con estos electrodos es necesario adecuar un circuito electrónico específico para esta aplicación, ya que se trata de un biosensor electroquímico, se utiliza una configuración de un circuito potencioestático, complementado a una fuente de alimentación y un conector para la conexión física con los electrodos serigrafados. Por otro lado, se tomaron muestras sanguíneas y salivales de 30 personas, mismas que se les indicó presentarse con higiene bucal nocturna, pero sin higiene bucal matutina (cepillado de dientes, uso de hilo dental y enjuague bucal), además de presentar 8 horas de ayuno. A las muestras sanguíneas se les realizaron pruebas de glucemia sanguínea. Las muestras salivales fueron procesadas por medio de centrifugación como preparación. Se comprobó el correcto funcionamiento del circuito midiendo un potencial fijo en la salida del circuito. Se colocaron las 30 muestras previamente procesadas en 30 electrodos serigrafados diferentes, se obtuvieron los voltajes máximos. Se analizó la correlación entre la concentración de glucosa del organismo, obtenida a través del examen de glucemia sanguínea y, el voltaje máximo obtenido a través de la

medición de la glucosa en saliva. Se realizó una aproximación matemática, misma que describe el comportamiento de los resultados con un polinomio de cuarto grado.

Palabras clave: glucosa, saliva, sangre, acondicionamiento, electrodos serigrafados, modelo matemático, correlación.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mis padres, Enrique Pacheco Marañón y Ma. Favian Rubio Pérez, quienes más allá de ser un ejemplo de superación, convicción y lucha, con mucho amor y paciencia me dieron mis primeras lecciones académicas, mi padre por su parte me enseñó a leer, escribir, sumar, restar, multiplicar y dividir, mientras que mi madre, en esas aulas de una secundaria técnica, me impartió mi primer curso de física.

A mi hermano, Erik Pacheco Rubio, quien es el mejor amigo que me pudo haber dado la vida, quien considero la persona más inteligente y buena que conozco, con quien comparto todas mis alegrías y tristezas. A mi hermana Mónica Teresa Pacheco Rubio, quien llegó a este mundo a inundarnos de alegría y gozo, siempre será nuestra princesa. A mi hermano Peque, quien es un hombre con una fortaleza ejemplar.

A mi abuelo paterno, papá Guenchi, quien es uno de los hombres más inteligentes y buenos que conozco, un ejemplo de fortaleza y sabiduría. A mi abuela paterna, mamá Queta, quien desde pequeño considero la mejor cocinera del mundo.

A mi abuelo materno, papá Nacho, quien es otro de los hombres más inteligentes y trabajadores que conozco. A mi abuela materna, mamá Cheva, quien siempre tiene un buen consejo que darme.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente le agradezco a mi familia, a mis padres, por el enorme sacrificio que realizaron para que yo pudiese cumplir cada uno de mis sueños durante esta etapa, a mis hermanos, quienes me motivaron día con día.

Agradezco al Dr. Carlos Pérez, quien además de un gran profesor lo considero un amigo, porque más allá de sus incontables enseñanzas, sus consejos siempre estuvieron presentes, en todo momento lideró y respaldó este trabajo mostrando verdadera vocación por su profesión. Agradezco a la Dra. Vanessa Vallejo, quien siempre nos acompañó, guió y aconsejó desde el primer semestre a un servidor y a esa memorable primera generación de alumnos, además de aportar, respaldar y acompañar el desarrollo de este trabajo. También agradezco al Dr. Germán González quien tuvo la iniciativa de este proyecto en esas primeras clases de Anatomía, quien me motivó a ir a ese primer seminario de investigación fuera de nuestra universidad a competir. A la Dra. Georgina Mota, quien me motivó a aspirar cada día más con este proyecto desde su creación.

Agradezco a todos los profesores de la carrera de ingeniería biomédica y de la facultad de ingeniería por apoyarnos en todo momento, en clases, en congresos, en eventos, etc.

Agradezco a mis compañeros y amigos de grupo, quienes en numerosos días se convirtieron en mi segunda familia, ya que pasábamos más tiempo en el campus que en casa.

Agradezco de igual forma a mis compañeros y amigos de mi actual equipo de trabajo liderado por el Dr. Sergio Blanca, equipo que ha marcado el inicio de una nueva etapa en mi vida, la cual con tres elementos fundamentales; humildad, convicción y lealtad, será exitosa.

ÍNDICE GENERAL

1. CAPÍTULO I: Introducción	1
1.1. Introducción.....	2
1.2. Antecedentes.....	3
1.3. Descripción del Problema.....	7
1.4. Justificación.....	8
1.5. Hipótesis y Objetivos.....	12
1.5.1. Hipótesis.....	12
1.5.2. Objetivo General.....	12
1.5.3. Objetivos Particulares.....	13
1.6. Planteamiento general.....	13
2. CAPÍTULO II: Revisión de Literatura	15
2.1. Revisión de Literatura.....	16
2.2. Diabetes.....	16
2.3. Circulación Sanguínea.....	18
2.4. Saliva.....	22
2.5. Biosensores.....	25
2.6. Electrodo Serigrafados.....	26
2.7. Instrumentación de Biosensores Amperométricos.....	29
2.8. Ajuste de Curvas.....	31
3. CAPÍTULO III: Metodología	34
3.1. Metodología.....	35
3.2. Material.....	38
3.3. Obtención de una curva de tendencia.....	39
4. CAPÍTULO IV: Resultados	43
4.1. Puesta de Experimento.....	44
4.2. Resultados.....	46

4.3. Discusión de Resultados.....	50
5. CAPÍTULO V: Conclusiones y Prospectivas.....	54
5.1. Conclusiones.....	55
5.2. Prospectivas.....	56
6. REFERENCIAS.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Descripción general del dispositivo.....	13
Figura 2.1	Mecanismo de funcionamiento de un biosensor.....	25
Figura 2.2	Electrodo serigrafiado y sus partes.....	27
Figura 2.3	Funcionamiento biosensor enzimático.....	28
Figura 2.4	Circuito potencioestático.....	30
Figura 2.5	Función $f(x)$	32
Figura 2.6	Función $f(x)$ aproximándose a los datos.....	33
Figura 3.1	Elementos de Metodología propuesta.....	35
Figura 3.2	Centrifugadora usada.....	36
Figura 3.3	Conector para los electrodos serigrafiados.....	37
Figura 3.4	Selección de datos.....	39
Figura 3.5	Selección de opción insertar.....	39
Figura 3.6	Selección de gráfico deseado.....	40
Figura 3.7	Inserción de gráfico.....	40
Figura 3.8	Clic derecho sobre la ecuación.....	40
Figura 3.9	Agregar línea de tendencia.....	41
Figura 3.10	Selección la opción adecuada.....	41
Figura 3.11	Selección para mostrar ecuación y valor de R.....	41
Figura 4.1	Muestras de saliva identificadas.....	44
Figura 4.2	Biosensor instrumentado.....	46
Figura 4.3	Salida de 7mV del circuito energizado en reposo.....	47
Figura 4.4	Señal medida de la muestra número 26.....	49
Figura 4.5	Relación entre concentración de glucosa y voltaje medido.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Prevalencia de la diabetes y número de personas con la enfermedad.....	9
Tabla 1.1 Representación porcentual clasificada por edades de adultos que cuentan con diagnóstico clínico de Diabetes Mellitus.....	10
Tabla 1.3 Representación porcentual clasificada por edades de adultos que cuentan con diagnóstico clínico de Diabetes Mellitus en el estado de Querétaro.....	11
Tabla 2.1 Valores de componentes sanguíneos.....	21
Tabla 2.2 Elementos componentes de la saliva.....	24
Tabla 2.3 Criterios de clasificación de los biosensores.....	26
Tabla 4.1 Voltaje de las muestras 1 - 10.....	47
Tabla 4.2 Voltaje de las muestras 11 - 20.....	47
Tabla 4.3 Voltaje de las muestras 21 - 30.....	47
Tabla 4.4 Concentración de glucosa en las muestras 1 - 10.....	48
Tabla 4.5 Concentración de glucosa en las muestras 11 - 20.....	48
Tabla 4.6 Concentración de glucosa en las muestras 21 - 30.....	48
Tabla 4.7 Relación entre concentración de glucosa y voltaje medido en las muestras 1 – 10.....	48
Tabla 4.8 Relación entre concentración de glucosa y voltaje medido en las muestras 11 – 20.....	49
Tabla 4.9 Relación entre concentración de glucosa y voltaje medido en las muestras 21 – 30.....	49

CAPÍTULO I

Introducción

1.1 Introducción.

En la actualidad, la sociedad mexicana que padece diabetes mellitus de cualquier tipo se ha incrementado en los últimos años. En este sentido, el 9.4% de la población mexicana total adulta para el 2016 ha sido diagnosticada clínicamente con diabetes. Sin embargo, este porcentaje solo se refiere a las personas que han sido diagnosticadas clínicamente con este padecimiento, aunado a esta estadística hay personas que aún no han recibido un diagnóstico por esta enfermedad y la padecen. Esta población puede implicar otro 50% más de personas que están en la misma condición. Dentro de este 9.4% de la población diagnosticada con diabetes, el 54.5% de las personas reportaron tener visión disminuida, de los cuales el 11.19% sufrieron daño en su retina, el 9.9% pérdida de vista, siendo dos de las complicaciones más comunes de esta enfermedad, además de que únicamente el 20.9% supervisa el estado de salud de sus pies, siendo un porcentaje bajo para la población diabética debido a que otra complicación común, y además, causante de discapacidad en México, es la amputación de miembro inferior por pie diabético. El 5.5% de esta población diagnosticada con diabetes ha sufrido amputaciones (Secretaría de Salud | Instituto Nacional de Salud Pública, 2016).

Evidentemente, esta enfermedad crónica cuyas complicaciones ocupan los primeros lugares en la mortalidad de México (enfermedad renal crónica, enfermedades cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares, entre otros.), provoca discapacidad en algunos casos. Las personas que están diagnosticadas clínicamente con esta enfermedad y llevan un buen control de la misma, deben supervisar su nivel de glucosa diariamente, esto se puede monitorizar con un glucómetro tomando pequeñas muestras de sangre, lo cual se vuelve doloroso y costoso (Marattukalam et al., 2017). Adicionalmente, debe resaltarse que la medición de glucosa no es una actividad propiamente dicha para personas diabéticas, sino que debe hacerse para todas las personas.

En la última década se han desarrollado numerosos proyectos en giro a este tema; la medición de la glucosa de forma no invasiva, por ejemplo, Litinskaia et al. (2017) discuten diferentes métodos bajo un mismo fenómeno físico, esto con el fin de controlar una bomba de infusión a través de una medición no invasiva de

la medición de glucosa. Sin embargo, se vuelve una medición compleja por múltiples elementos que considerar independientemente de la metodología utilizada, esto porque se trata de muestras en las que la concentración de glucosa es muy pequeña, además de esto, en estas muestras existen otros componentes que integran ruido a la medición que se desea realizar.

Para medir este tipo de muestras se requiere de un sistema lo suficientemente específico para la molécula que se desea medir, en este caso la glucosa. En este trabajo se propone una metodología basada en la Instrumentación de un sistema electrónico que sea capaz de medir con especificidad la molécula de la glucosa en una muestra tomada de forma no invasiva y de esta forma erradicar la toma de muestra sanguínea, reduciendo el dolor a las personas que requieren sus niveles de glucosa. La saliva es un fluido que contiene en cantidades mínimas glucosa y otros elementos; por tanto, debe ser acondicionada con el fin de reducir las probabilidades que algún elemento interfiera en la medición.

1.2 Antecedentes.

Recientemente, se han desarrollado investigaciones enfocadas al tema de la detección de glucosa en el organismo de forma no invasiva debido a la importancia que esto implica para pacientes que requieran saber sus niveles de glucosa. Se ha trabajado bajo este marco porque las pruebas más comunes son invasivas para los pacientes, por el uso de sangre como muestra. Un ejemplo de ello es el trabajo desarrollado por Clovis (2003), en el cual propone el uso de unas gafas que permitan realizar esta medición con el mismo enfoque no invasivo para el paciente. Estas gafas cuentan con un emisor y un receptor de luz, la luz generada por el emisor se preveé entre directamente a través del humor acuoso del ojo, el receptor canalizará un porcentaje de luz residual (la cual pasa a través del ojo), posteriormente se analizarán los niveles de glucosa. La fuente de luz y el detector están conectadas a una máquina externa que interpretará las señales obtenidas de los ojos. Por otra parte, Lawand et al. (2015) utilizan otro fenómeno físico para la medición de la concentración de glucosa en el organismo, utilizan espectrofotometría (rango del infrarrojo), entre las longitudes de onda de 900 a 1100

nm. Este trabajo funciona con un par emisor y un receptor infrarrojo. El principio de funcionamiento de este sensor es la cantidad de luz recibida, misma que será proporcional a la concentración de glucosa presente en sangre. Para este fin, se amplifica la señal adquirida con el par emisor-receptor para ser procesada por un microcontrolador (Arduino), donde un filtro pasa bajas con frecuencias de corte 1 a 3 Hz es empleado para eliminar componentes no deseadas de alta frecuencia; por otra parte, también se usa un filtro pasa altas para quitar componentes residuales y offsets que la señal amplificada pudiera tener. Los autores hacen una regresión de segundo orden para encontrar la ecuación que define la relación entre concentración de glucosa y amplitud del voltaje capturado por el microcontrolador. Por otro lado, Marattukalam et al. (2017) realizan simulaciones con un resonador en forma de anillo para medir la concentración de glucosa en la piel. Para eso, desarrollan dos topologías: uno de doble pliegue y uno de pliegue sencillo, siendo el doble el que cubre una mayor zona de contacto (37.66% para el caso del sencillo y 59.74% para el caso del doble). Al utilizar este sistema se encuentra que la frecuencia de resonancia cambia según la concentración de glucosa, de 10 a 30 MHz por cada diferencia del 10% en la concentración de glucosa; sin embargo, por la mayor capacidad de contacto que tiene el resonador de doble pliegue resulta tener mejor alcance para ser aplicado como glucometro no invasivo. Por otro lado, Litinskaia et al. (2017) discuten acerca de dos grupos de diferentes métodos para optimizar la detección no invasiva de la glucosa en el organismo enfocado a un biosensor del tipo óptico. Se plantea que la mejora en la detección de la glucosa se puede darse: (1) por el uso de diodos láser de alta potencia, (2) aunado a una estabilización térmica de la fuente de luz y (3) la combinación de distintos métodos matemáticos en la medición. Las mejoras en los métodos matemáticos están basados en un análisis estadístico y algoritmos iterativos empleando los datos obtenidos. Este proyecto está enfocado para ser parte de un sistema de retroalimentación para una bomba de infusión de insulina.

En México se ha trabajado sobre sensores de glucosa, un ejemplo de ello es la tesis de Téllez Giron (2002), en la cual se describe el desarrollo de un biosensor amperométrico de matriz rígida utilizando la enzima Glucosa Oxidasa.

Este biosensor está compuesto de dos elementos, el cuerpo y el biocomponente. El cuerpo del biosensor está conformado por un tubo de PVC en el cual se introduce el biocomponente bajo presión, siendo éste la enzima Glucosa Oxidasa. Este biosensor fue utilizado para cuantificar la glucosa en sueros glucosados. Otro trabajo es el de Barredo Ochoa (2009), mismo en el que propone una interfaz optoeléctrica para biosensores no invasivos. Este proyecto emplea un fotodiodo, cuyo objetivo es capturar y transformar la luz en una señal amperométrica, para posteriormente transformar esa señal en un nivel de voltaje y ser interpretado. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un dispositivo para apoyar proyectos relacionados con interfaces optoelectrónicas con aplicación en espectrofotómetros, sin embargo estas aplicaciones no se describen. Un punto importante que se menciona es que dependiendo de la longitud de onda de la aplicación que se pretende estudiar se deben usar ciertos tipos de fotodiodos que midan el rango en el que se encuentre la longitud de onda de la aplicación. Por otro lado, el trabajo de Gallardo Hernández (2011), explica el desarrollo de un controlador de tercer orden, mismo que es simulado por dos métodos matemáticos, el Modelo Mínimo de Bergman y el Modelo de Sorensen, siendo el Modelo Mínimo de Bergman el más reducido y que cuenta con un alto grado de precisión para un sistema de regulación de glucosa. Estos modelos permiten integrar variables que usualmente no se consideran, con el objetivo de eficientar este controlador. Es importante mencionar que un sistema de control que contiene más variables que puedan afectar al mismo, se trata de un sistema de control más adecuado. Otro trabajo dedicado a los biosensores de glucosa es el de López Aparicio (2018), donde se describe el diseño, desarrollo e implementación de una plataforma miniaturizada capaz de detectar de forma biológica la diabetes mellitus tipo II. Este dispositivo fue capaz de medir concentraciones en el rango de 2.5mg/dL a 300mg/dL. El método de detección de biomoléculas es mediante inmovilización adjunta a enzimas por competencia, el cual se compone por 3 partes; un equivalente a la muestra de interés, un anticuerpo marcado por medio de fluorescencia y micropartículas magnéticas.

A nivel local, dentro de la Universidad Autónoma de Querétaro, se han desarrollado diferentes trabajos con relación al tema de la medición de la glucosa,

algunos proyectos están orientados a la importancia de supervisar los niveles de glucosa, un ejemplo de ello es el trabajo de Lazo Mendoza (2000), en el cual expone el diseño de una evaluación descriptiva sobre los niveles de glucosa en pacientes embarazadas. Esta evaluación se llevó a cabo en las Unidades de Medicina Familiar números 2 y 14 del instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Delegación Querétaro. El total de personas estudiadas fue de 462. Fueron pacientes derechohabientes del IMSS, se excluyeron las que presentaban arriba de 120mg/dL de nivel de glucosa en el organismo. Este trabajo concluye en que los valores de glucosa en el organismo de pacientes embarazadas, tienen una tendencia homogénea para diferentes grupos clasificados en un rango de edad. Otro trabajo que estudia los niveles de glucosa fue el de Guerrero de León (2013), en el cual se realizó un estudio que buscaba una correlación entre la concentración de glucosa en el organismo y la funcionalidad familiar. Este proyecto trabajó con pacientes diabéticos que fueron atendidos en las Unidades de Medicina Familiar 9, 13 y 16 en el área de consulta externa del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Delegación Querétaro. Se evaluaron las variables sociodemográficas, de funcionalidad familiar, así como la concentración de hemoglobina glicosilada y glucosa. Para tratar la funcionalidad familiar como variable se utilizó la prueba de Emma Espejel. Se estudiaron 88 pacientes entre los rangos de edad de 33 y 88 años. La media del nivel de glucosa en los pacientes fue de 155mg/dL aproximadamente. No se obtuvo correlación entre la funcionalidad familiar y los niveles de glucosa en los pacientes. Otro trabajo desarrollado en el estado de Querétaro fue el de Escalona Villalpando (2014). Este trabajo tiene un enfoque distinto, está orientado a la manipulación de la enzima glucosa oxidasa, enzima que se ha utilizado en proyectos antes mencionados. En esta tesis se describe el uso de la enzima glucosa oxidasa como bioánodo en una celda de combustible. Se explican tres métodos para la inmovilización de la enzima; adsorción física, estre cruzamiento e inmovilización covalente. A pesar de que en la Universidad Autónoma de Querétaro se ha estudiado desde diferentes perspectivas los niveles de glucosa, es importante estudiar este tema desde el campo de la instrumentación médica, misma que debe tener como objetivo la no invasividad

A partir de los trabajos de biosensores de glucosa utilizando diversas técnicas o metodologías, se observa que deben estar orientados a medir los niveles de glucosa no solo en productos de las industrias farmacéuticas o alimenticias, sino en el sector salud, donde el nivel de glucosa representa un signo vital o información útil para llevar a cabo un diagnóstico y/o tratamiento adecuado. Aunado a lo anterior se debe buscar la no invasividad con el objetivo de mejorar la calidad de vida de toda aquella persona que requiera supervisar el nivel de glucosa. Es por tal motivo que se deben desarrollar, investigar e implementar nuevas tecnologías basadas en diferentes técnicas ya conocidas con este enfoque (no invasividad), siendo ésta la razón principal del porque hacer este trabajo.

1.3 Descripción del Problema.

El indicador más accesible para medir el estado del metabolismo de los hidratos de carbono es medir la concentración de glucosa en sangre, misma que puede ser censada de forma inmediata en distintos tipos de muestras como lo son; sangre capilar o venosa, sangre desproteinizada, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, entre otros. Se entiende que el resultado de la relación que existe entre número de moléculas de glucosa por cada unidad de volumen sanguíneo, es la concentración de glucosa a la que están expuestos los órganos y sistemas.

Actualmente se cuenta con fácil accesibilidad a dispositivos que miden la cantidad de glucosa en el organismo, como lo son los glucómetros convencionales, mismos que utilizan sangre o plasma como muestras. Sin embargo, este tipo de dispositivos cuentan con numerosas desventajas, como el ser susceptible a la alteración de los resultados por factores físicos (temperatura), y siendo el más importante, el uso de una muestra que es obtenida de forma invasiva para los pacientes, la sangre.

Dicho lo anterior, con ayuda de los avances tecnológicos actuales, las tendencias de la medicina hacia la tecnología no invasiva, es necesaria la creación de un dispositivo detector de glucosa que use muestras obtenidas de forma no invasiva al organismo. Es necesario encontrar una técnica que involucre a las enzimas debido a las numerosas ventajas que aportan a un sistema de medición,

por ejemplo, alta especificidad. Sin embargo, es aún más necesario que independientemente de la técnica que se utilice para medir los niveles de glucosa, la medición se realice con una muestra tomada de forma no invasiva. Una muestra no invasiva implica que al ser extraída o tomada del cuerpo no cause dolor a las personas. Para este trabajo se utilizará como muestra la saliva, la cual, a pesar de ser un fluido que se puede extraer de forma “sencilla”, para esta aplicación (medir los niveles de glucosa) no es comúnmente utilizada; por lo tanto, es necesario indagar sobre la composición de este fluido, así como proponer un manejo adecuado.

1.4 Justificación

Existe la preocupación de que la actual generación tenga una menor longevidad por falta de actividad física y una ingesta dietética no saludable. Las consecuencias de la obesidad, en términos de la salud y de muerte prematura, pueden llevar a gastos excesivos en salud para la población sin servicios de seguridad o protección social, así como a empobrecer a las familias de quienes padecen esta condición. El gasto anual para atención médica de 14 complicaciones vinculadas con la obesidad en 2008 se estimó en 42 000 millones de pesos, equicalente al 13% del gasto total en salud, sin embargo, para el año 2012 se estimó únicamente para el gasto atribuible a la diabetes entre 82 000 y 98 000 millones de pesos (Rivera Dommarco et al., 2013).

Una de las principales consecuencias de la obesidad es la diabetes, enfermedad que se puede definir como una enfermedad crónico-degenerativa, ocasionada por diversos factores como la predisposición hereditaria, los factores ambientales y de estilos de vida, se caracteriza por hiperglucemia crónica (altos niveles de azúcar en sangre por periodos prolongados) debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, lo que afecta al metabolismo de los carbohidratos, proteínas y grasas (Arredondo López et al., 2016).

A comparación del año 1980, se estima que a nivel mundial 422 millones de adultos padecieron de diabetes mellitus en el año del 2014. La prevalencia de la diabetes ha crecido a casi el doble; del 4.7% al 8.5% en la población adulta, mismo

fenómeno está relacionado con el comportamiento de sus factores de riesgo como lo son el sobrepeso y la obesidad. Otro factor importante es que la diabetes mellitus en la población de países de ingreso medio crece de mayor manera en comparación a países con un ingreso alto. El porcentaje de personas que padecen diabetes mellitus sin contar con un diagnóstico clínico varía entre el 0 y el 50% incluso en países con altos ingresos.

A nivel nacional en el año 2012 las elevaciones por encima de los valores normales de la glicemia (hiperglicemia) provocaron 2.2 millones de muertes, esto por consecuencia de un crecimiento en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y otros tipos. El 43% de las muertes relacionadas a los anteriores padecimientos se produce antes de los 70 años (aproximadamente 1.6 millones de muertes). En las regiones de Europa, Asia Sudoriental y las Américas, los porcentajes de defunción relacionados a los índices de glicemia elevados son más altos en los hombres que en las mujeres.

La prevalencia de la diabetes en la Región de las Américas (según la OMS) ha crecido del 5% en el año de 1980 al 8.3% en el 2014, la estadística reflejada en millones de personas es; de 6 millones de personas en 1980 a 43 millones de personas en 2014. En la tabla 1.1 Se observa la prevalencia de la diabetes y número de personas con esta enfermedad (Organización Mundial de la Salud, 2016).

Tabla 1.1 Prevalencia de la diabetes y número de personas con la enfermedad (Organización Mundial de la Salud, 2016)

Regiones de la OMS	Prevalencia (%)		Número (millones)	
	1980	2014	1980	2014
Región de África	3.1%	7.1%	4	25
Región de las Américas	5%	8.3%	18	62
Región del Mediterráneo Oriental	5.9%	13.7%	6	43
Región de Europa	5.3%	7.3%	33	64
Región de Asia Sudoriental	4.1%	8.6%	17	96
Región de Pacífico Occidental	4.4%	8.4%	29	131
Total	4.7%	8.5%	108	422

El 9.4% de adultos en México refirieron tener un diagnóstico médico previo de diabetes (reportado en el año 2016), componiéndose de 10.3% de mujeres y 8.4% de hombres. El grupo en el que se concentra la mayor población de personas con diagnóstico clínico de diabetes es entre los 60 y 69 años de edad, teniendo como porcentaje el 30.3% del total de la población que padece esta enfermedad, lo que representa 2 180 200 personas. En la tabla 1.2 se muestra la representación porcentual representada en grupo de edades de adultos que padecen diabetes.

Tabla 1.2 Representación porcentual clasificada por edades de adultos que cuentan con diagnóstico clínico de Diabetes Mellitus (Secretaría de Salud | Instituto Nacional de Salud Pública, 2016)

Grupo por edad	Hombres		Mujeres		Total	
	Número (miles)	%	Número (miles)	%	Número (miles)	%
20 a 29 años	23.2	0.3	153.1	1.6	176.3	1.0
30 a 39 años	70.0	0.9	275.6	3.1	345.6	2.1
40 a 49 años	543.6	9.4	582.6	8.2	1 126.2	8.7
50 a 59 años	743.9	17.7	872.1	17.2	1 616.0	17.4
60 a 69 años	951.8	27.7	1 228.4	32.7	2 180.2	30.3
70 a 79 años	280.1	19.3	500.5	29.8	780.5	24.9
80 y más años	80.6	12.5	159.3	21.8	239.9	17.5
Total	2 693.2	8.4	3 771.6	10.3	6 464.8	9.4

El 87.8% de la población diagnosticada con diabetes mellitus afirmó estar en tratamiento médico para tener un control del padecimiento; sin embargo, los porcentajes de supervisión de glucosa en el organismo son bajos, solo el 15.2% lo hicieron por la hemoglobina glicosilada, el 4.7% por microalbuminuria y 20.9% supervisó el estado de salud de sus pies.

El 54.5% de las personas que tenían un diagnóstico clínico de diabetes reportaron que tenían visión disminuida, el 11.19% daño de retina, el 9.9% pérdida de la vista, el 9.14% úlceras y el 5.5% sufrió amputaciones. Estadísticamente más mujeres tienen un diagnóstico clínico de su enfermedad previo a comparación de los hombres, tratándose del caso de las mujeres de un 70.5% contra un 48.6% de los hombres (Secretaría de Salud | Instituto Nacional de Salud Pública, 2016).

La prevalencia de la diabetes mellitus en el estado de Querétaro para el año del 2012 con diagnóstico clínico en personas mayores a los 20 años de edad

fue del 7.5%, por debajo de la media a nivel nacional de ese año, que fue del 9.2% (9.4% para el 2016), la prevalencia de la diabetes mellitus fue mayor en mujeres con un 8.7% comparado con un 6% en hombres. En el rango de edad de los 20 a los 39 años de edad se reporta que el 1.8% de la población tiene diagnóstico de diabetes mellitus, componiéndose de 1.3% de hombres y 2.2% de mujeres. En el rango de edad de los 40 a los 59 años de edad se reporta que el 12.5% de la población tiene diagnóstico de diabetes mellitus, componiéndose de 10.1% de hombres y 14.7% de mujeres. En rango de edad de los 60 o más años de edad se reporta que el 19% de la población tiene diagnóstico de diabetes mellitus, componiéndose de 15.2% de hombres y 22.3% de mujeres. En la tabla 1.3 se muestran los porcentajes por grupo por edad de las personas del Estado que padecen diabetes mellitus (Instituto Nacional de Salud Pública, 2013).

Tabla 1.3 Representación porcentual clasificada por edades de adultos que cuentan con diagnóstico clínico de Diabetes Mellitus en el estado de Querétaro (Instituto Nacional de Salud Pública, 2013)

Grupo por edad	Hombres		Mujeres		Total	
	Número (miles)	%	Número (miles)	%	Número (miles)	%
20 a 39 años	3.5	1.3	7.3	2.2	10.8	1.8
40 a 59 años	17.8	10.1	28.4	14.7	46.3	12.5
60 o más	10.0	15.2	16.3	22.3	26.3	19.0
Total	31.3	6.0	52.0	8.7	83.3	7.5

Se ha demostrado que el aumento en la incidencia de padecer diabetes mellitus tiene una relación con la obesidad. De hecho, se ha demostrado que si las personas que tienen los dos padecimientos (obesidad y diabetes) pierden peso, entre 10 y 20%, mejoran sus niveles de glucemia y sensibilidad a la insulina, también disminuye el riesgo de mortalidad por complicaciones de estas enfermedades. Como se comentó previamente, la diabetes es una de las principales complicaciones de la obesidad, sin embargo existen otras complicaciones, como la hipertensión arterial, enfermedad pulmonar, ente otras. La obesidad y otras enfermedades crónicas, están relacionadas con el 29% de la mortalidad en México. La obesidad y sus complicaciones deben tener un tratamiento multidisciplinario,

para su correcto manejo se debe medir sistémicamente la glucemia, presión arterial y control de lípidos sanguíneos (Rivera Dommarco et al., 2013).

Las personas que padecen obesidad o diabetes mellitus, además de las personas que se encuentran hospitalizadas, deben supervisar su nivel de glucosa en el organismo, por lo que evidentemente es posible mejorar la calidad de vida de estas personas desarrollando tecnología no invasiva. En la presente tesis se decide utilizar saliva como muestra para la detección de glucosa, lo anterior debido a que la saliva es una muestra que se puede obtener de manera no invasiva; sin embargo, a diferencia de las muestras sanguíneas, éstas poseen concentraciones de glucosa en niveles mínimos, además de un incremento en los factores externos que puedan incluir “ruido” al procesar las muestras obtenidas. La instrumentación de electrodos serigrafiados son una opción viable para una aplicación no invasiva para los pacientes diabéticos, debido a que utilizan enzimas, lo cual aporta exactitud y especificidad a la molécula que es de interés (glucosa). Para detectar en una muestra tan compleja como la saliva, se debe encontrar una configuración específica para estos electrodos y nos permita obtener información que debe ser interpretada a fin de evaluar la viabilidad de la detección de glucosa en la saliva.

1.5 Hipótesis y Objetivos.

1.5.1 Hipótesis.

Mediante el uso de la saliva y un electrodo serigrafiado, así como de un circuito de instrumentación potencioestático, es posible medir la concentración de glucosa presente en la saliva de una manera rápida y sencilla.

1.5.2 Objetivo General.

Desarrollar e instrumentar un dispositivo detector de glucosa en saliva que mida la concentración de glucosa, utilizando electrodos serigrafiados modificados con la enzima glucosa oxidasa.

1.5.2 Objetivos Particulares

1. Realizar una búsqueda exhaustiva sobre un sistema de instrumentación específico para un electrodo serigrafiado, empleando bases de datos de prestigio para desarrollar un sistema propio.
2. Desarrollar la instrumentación necesaria para acondicionar la señal que se obtiene de los electrodos serigrafiados, misma que permita detectar pequeñas concentraciones de glucosa en saliva.
3. Verificar el correcto funcionamiento del circuito desarrollado, utilizando un instrumento de medición y los electrodos serigrafiados midiendo la diferencia de potencial generada por el propio electrodo.
4. Determinación de glucosa sanguínea, utilizando una prueba de laboratorio convencional, examen de glucemia sanguínea, para ser comparada con la muestra de saliva.
5. Relacionar el nivel de voltaje medido obtenido en la muestra salival y la concentración de glucosa medida en el examen de glucemia sanguínea mediante un modelo matemático, con el fin de medir de manera automática la concentración de glucosa en saliva.

1.6 Planteamiento General

La Figura 1.1 muestra la descripción general del dispositivo detector de glucosa que se plantea desarrollar.

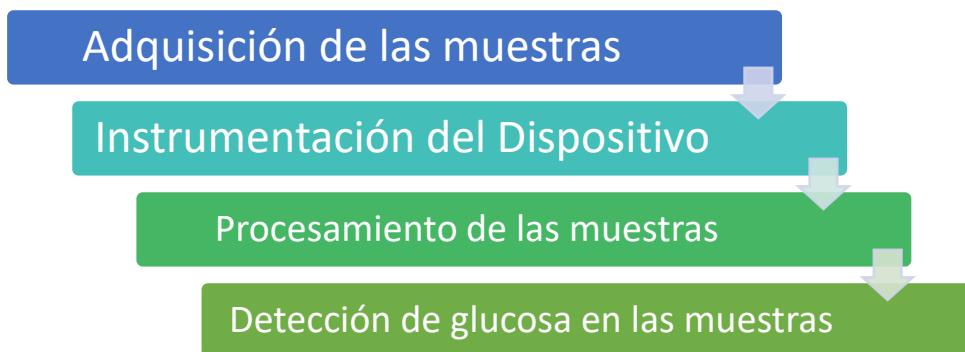


Figura 1.1 Descripción general del dispositivo.

Como se muestra en la Figura 1.1, la propuesta al problema descrito previamente, integra 4 pasos. El primer paso consiste en la adquisición de una muestra de forma no invasiva (saliva), misma que será procesada a fin de eliminar impurezas. Posteriormente se hace de uso del electrodo serigrafiado instrumentado en el dispositivo desarrollado, a fin de detectar pequeñas concentraciones de glucosa. Para esto, se debe integrar una evaluación y selección de componentes específicos para esta aplicación. Posteriormente, como último punto los datos obtenidos se emplean para encontrar una ecuación matemática que describa la relación entre el voltaje medido y la concentración de glucosa en el organismo; de esta manera, es posible hacer la detección de glucosa en saliva.

CAPÍTULO II

Revisión de Literatura

2.1 Revisión de Literatura.

En esta sección de la tesis se realiza la consulta bibliográfica y se definen los elementos teóricos principales primordiales para el desarrollo de la metodología propuesta. Además, se definen los conceptos de diabetes, la saliva, la sangre, así como también se hace mención de la definición de biosensor y de los elementos que lo constituyen.

2.2 Diabetes.

El término diabetes mellitus detalla un trastorno metabólico ocasionado por distintas causas distinguido por presentar concentraciones excesivas de glucosa en sangre (hiperglicemia) de manera crónica aunado a alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas como consecuencia de modificaciones en la secreción y/o acción de la insulina ((OMS), Organización Mundial de la Salud, 1999).

La diabetes mellitus se distingue también por ser una enfermedad crónico degenerativa, lo cual se interpreta que es una enfermedad incurable, por lo que, si no es diagnosticada y manejada de manera adecuada, sin tener un control oportuno de dicha enfermedad, puede ocasionar un deterioro anormal en el organismo, mismo que puede generar un impacto en la salud de la persona, así como discapacidad o incluso la muerte (Arredondo López et al., 2016).

La diabetes puede generar complicaciones en diferentes partes del organismo, mismas que son capaces de ocasionar muerte prematura. Puede intervenir, o ser factor de predisposición para algunas enfermedades que generen complicaciones como son; eventos cerebrovasculares, enfermedad renal, amputación de miembros inferiores, pérdida de visión, daños neurológicos e incluso disfunción sexual ((OMS), Organización Mundial de la Salud, 2016).

Aunado del sufrimiento humano que generan las complicaciones de la diabetes mellitus, tanto para las personas que padecen dicha enfermedad como para las personas cuidadoras, los costos económicos son altos. Los costos incluyen la atención médica, la pérdida de ingresos y los costos económicos para la sociedad, pérdida de productividad por parte de la persona que la padece y un

estancamiento en el desarrollo económico ((IDF), International Diabetes Federation, 2009).

La diabetes mellitus tipo I puede conocerse como diabetes insulino dependiente o de inicio juvenil. Este tipo de diabetes es ocasionado por la destrucción de las células productoras de insulina del páncreas, cuya causa puede ser una reacción autoinmune; es decir, que sean destruidas por el mismo sistema de defensa del cuerpo. Por tal motivo, las células beta del páncreas no pueden producir insulina o pueden producir una cantidad mínima, y así impedir que dicha hormona (insulina) lleve de forma correcta su función de forma sistemática, permitir el ingreso de la glucosa en las células.

Las personas con diabetes tipo I necesitan inyecciones de insulina de manera cotidiana para controlar sus niveles de glucosa sanguíneos, ya que de lo contrario podría ocasionarles la muerte. Los síntomas para este tipo de diabetes pueden incluir: sed/sequedad en la boca anormal, micción frecuente, cansancio extremo/falta de energía, pérdida repentina de peso, cicatrización lenta de heridas, infecciones recurrentes, visión borrosa.

La incidencia de este tipo de diabetes está aumentando, existen algunas teorías las cuales describen que es probable que esto genere debido a los cambios de factores ambientales, como son; factores relacionados al desarrollo del aumento de peso, aumento en la edad materna en el momento del parto, factores relacionados a la dieta, la exposición a algunas infecciones virales que pueden iniciar la autoinmunidad o acelerar la destrucción de células beta, entre otros factores ((IDF), International Diabetes Federation, 2009).

La diabetes mellitus tipo II se distingue por la resistencia a la insulina y la deficiencia a la misma, cualquiera de los dos casos se puede manifestar cuando la enfermedad esté clínicamente presente. La diabetes mellitus tipo II comúnmente se diagnostica después de los 40 años; sin embargo, cuando la población tiene prevalencia a esta enfermedad puede ocurrir antes.

Esta enfermedad puede permanecer sin ser diagnosticada durante años, de forma asintomática, pero en cuanto aparecen complicaciones asociadas se hace la detección.

La diabetes tipo II a menudo puede ser asociada con la obesidad, que puede generar resistencia a la insulina y por lo tanto tener niveles elevados de glucosa en la sangre. La prevalencia por tener familiares diabéticos es alta; aun así, los genes susceptibles a este tipo de diabetes aún no han sido identificados.

Hay numerosos factores de predisposición para desarrollar diabetes mellitus tipo II, los cuales pueden incluir: obesidad, dieta, inactividad física, aumento de la edad, resistencia a la insulina, antecedentes familiares de diabetes, entorno intrauterino menos óptimo, por mencionar algunos factores.

En comparación a la diabetes tipo I, las personas con diabetes tipo II no dependen estrictamente de la insulina, sin embargo, pueden requerirla para controlar niveles altos de glucosa en la sangre (hiperglicemia) si es el caso que no se pueda regular con dieta. Existe una prevalencia creciente con este tipo de diabetes, la cual está relacionada con transiciones culturales y sociales, envejecimiento de la población, crecimiento de la urbanización, modificaciones en la dieta, sedentarismo y estilos de vida poco saludables ((IDF), International Diabetes Federation, 2009).

2.3 Circulación Sanguínea.

La principal función de la circulación sanguínea es abastecer los requerimientos que demanda el organismo, como lo es; transportar nutrientes a los tejidos, transportar desechos, transportar hormonas, en otras palabras, generar y preservar un medio óptimo en los diferentes fluidos tisulares del organismo para un adecuado funcionamiento.

Existen diferentes componentes dentro de la circulación como lo son: las arterias, venas, arteriolas, vénulas, capilares, entre otros. La función de las arterias es transportar sangre oxigenada con alta presión al organismo, debido a lo anterior éstas poseen paredes vasculares fuertes. Las arteriolas son las últimas ramificaciones del sistema arterial, por lo que controlan los ductos por los que fluye sangre en los capilares. Las arteriolas poseen paredes musculares fuertes, lo que permite dilatar o contraer la apertura o lumen, y de esta manera controlar el flujo sanguíneo a fin de satisfacer las necesidades del tejido irrigado. Los capilares

actúan en el intercambio de líquidos, nutrientes, iones, hormonas, por mencionar algunas propiedades, ya que son permeables al agua y otras moléculas, lo que permite el intercambio de estas moléculas con el tejido circundante. La función de las vénulas es recopilar la sangre con CO₂ con los residuos resultantes del intercambio de moléculas con el tejido circundante y, drenarla hacia las venas, cuya función es transportar sangre con CO₂ principalmente, misma que vuelve desde las vénulas al corazón, en menor presión a comparación de las arterias, por tal motivo, las venas están estructuradas por paredes finas.

La circulación sistémica, que retiene el 84% de todo el volumen de sangre en el organismo, se compone principalmente de venas, arterias y arteriolas. Del 84% antes mencionado, aproximadamente el 64% de la sangre se encuentra en venas, el 13% en arterias, y el 7% en arteriolas y capilares. El 16% restante de todo el volumen de sangre en el organismo se encuentra dentro del corazón (7%) y pulmones (9%) (Guyton et al., 2016). La microcirculación tiene como objetivo el transporte de nutrientes a los tejidos y la eliminación de restos del intercambio de nutrientes. Las arteriolas juegan un papel importante en la microcirculación, porque controlan el fluido sanguíneo a cada tejido y, a su vez, las necesidades del tejido controlan el diámetro de apertura o lumen de las arteriolas. Los capilares por otra parte, como se describió anteriormente están estructurados con paredes finas, de una sola capa de células endoteliales dando como resultado el ser muy permeables, lo que permite que el agua, los nutrientes y los restos celulares puedan intercambiarse fácilmente entre el tejido circundante y el fluido sanguíneo. La circulación periférica cuenta con 10 mil millones de capilares en el organismo, lo que se estima en 500 a 700 metros cuadrados.

Usualmente cada arteria que irriga un órgano se ramifica seis u ocho veces antes de que se pueda considerar arteriola, mismas que pueden tener un diámetro que oscila entre los 10 y 15 micrómetros. Posteriormente las arteriolas se ramifican entre dos y cinco veces más, llegando a medir de diámetro entre 5 y 9 micrómetros. Las arteriolas en su porción terminal se denominan metaarteriolas, éstas no cuentan con una estructura celular muscular continua, tienen fibras musculares lisas rodeando el ducto de forma esporádica. En el vértice donde se origina un capilar

desde una metaarteriola, se encuentra el esfínter precapilar, mismo que dilata o estrecha la entrada al capilar. Posteriormente se encuentran las vénulas, mismas que son mayores a las arteriolas, sin embargo, cuentan con una capa muscular más débil, esto porque la presión es menor en comparación a las arteriolas (Guyton et al., 2016).

Los capilares están estructurados de células endoteliales y rodeados por una membrana basal muy fina. El grosor de la pared capilar es aproximadamente de 0.5 micrómetros, su diámetro interno oscila entre los 4 y 9 micrómetros. A lo largo de la pared capilar se tienen canales intercelulares, entre la unión de células endoteliales, se estima que gran parte de las sustancias hidrosolubles se difunden a través de la membrana capilar. Las células endoteliales también tienen invaginaciones o hendiduras llamadas cavéolas, son importantes para el transporte de macromoléculas (además de los canales intercelulares antes mencionados). Los espacios intercelulares usualmente cuentan con un tamaño similar, alrededor de 6 y 7 nanómetros. Los espacios o canales intercelulares únicamente representan un milésimo de la superficie total de la pared capilar, sin embargo, la velocidad de movimiento de las moléculas de agua, así como los iones y moléculas hidrosolubles es muy rápida, tan rápida que permite que fluyan estas macromoléculas a través de las hendiduras (aunado a la teoría de que las cavéolas también participan en este intercambio). Para explicar un poco más esta rapidez, la velocidad con la que fluyen las moléculas hidrosolubles en agua a través de los poros intracelulares en la membrana capilar, es unas 80 veces mayor que la velocidad con la que el propio plasma fluye por el capilar. Estas moléculas pueden ser iones de sodio, cloro, glucosa, entre otras macromoléculas. La glucosa tiene una permeabilidad relativa en los poros capilares aceptable, siendo el agua la unidad (1), la glucosa tiene una permeabilidad de 0.6 (Guyton et al., 2016).

En la siguiente tabla se muestran algunas macromoléculas y valores relevantes contenidos en el organismo.

Tabla 2.1 Valores de componentes sanguíneos (Guyton et al., 2016)

Sustancia	Concentración	Intervalo	Observaciones
Electrolitos			
Sodio	142 mmol/l	135-145 mmol/l	mmol/l = milimoles por litro
Potasio	4.2 mmol/l	3.5-5.3 mmol/l	
Cloruro	106 mmol/l	98-108 mmol/l	
Hiato aniónico	12 mEq/l	7-16 mEq/l	mEq/l = miliequivalentes por litro
Bicarbonato	24 mmol/l	22-29 mmol/l	
Hidrogenión	40 nmol/l	30-50 nmol/l	nmol/l = nanomoles por litro
pH arterial	7.4	7.25-7.45	
pH venoso	7.37	7.32-7.42	
Ion calcio	5 mg/dl	4.65-5.28 mg/dl	mg/dl = miligramos por decilitro
Calcio total	10 mg/dl	8.5-10.5mg/dl	
Ion magnesio	0.8 mEq/l	0.6-1.1 mEq/l	
Magnesio total	1.8 mEq/l	1.3-2.4 mEq/l	
Fosfato total	3.5 mg/dl	2.5-4.5 mg/dl	
Química de la sangre, no electrolitos			
Albumina	4.5 g/dl	3.5-5.5 g/dl	g/dl = gramos por decilitro
Fosfatasa alcalina		H: 38-126 U/l M: 70-230U/l	U/l = unidades por litro
Bilirrubina total		0.2-1 mg/dl	
Bilirrubina conjugada		0-0.2 mg/dl	
Nitrógeno ureico	14 mg/dl	10-26 mg/dl	
Creatinina	1 mg/dl	0.6-1.3 mg/dl	
Glucosa	90 mg/dl	70-115 mg/dl	
Osmolaridad	282 mOsm/l	275-300 mOsm/l	mOsm/l = miliosmoles por litro
Proteína total	7 g/dl	6-8 g/dl	
Ácido úrico		H: 3-7.4 mg/dl M: 2.1-6.3 mg/dl	

Para conocer el valor de la glicemia en el organismo se pueden utilizar varias pruebas: por punción en un dedo para obtener una gota de sangre y usar un glucómetro, o por una prueba en orina. Sin embargo, la más empleada es la sanguínea. El examen de glucemia sanguíneo refleja la concentración plasmática, que es la glucosa a la que están expuestos los sistemas y órganos. La muestra de sangre por punción en el dedo se usa únicamente como una medición inmediata para conocer de forma general el estado de la glucemia del paciente. Por otro lado, la medición de glucosa en orina refleja mal las concentraciones cambiantes de hiperglucemia, el umbral renal varía en cada sujeto, además de falta sensibilidad y especificidad. Es por esto que el examen de glicemia sanguíneo es el ideal para realizar una medición precisa del estado de glucemia del organismo, mismo que es usado como referencia para pruebas alternativas (Hans et al., 2005).

2.4 Saliva.

La saliva es un fluido de composición compleja secretado por las glándulas salivales mayores (parótidas, submandibular y sublingual) y menores, además de componentes que no son salivales propiamente, como lo son; fluido crevicular, células de sangre, bacterias y productos derivados de las mismas, células del epitelio desprendidas del tejido circundante, entre otras (de Echeverri, 1995).

El tipo de secreción salival puede variar dependiendo la glándula secretora. La glándula parótida secreta fluidos de textura serosa o acuosa, las glándulas submandibular y sublingual, además de las glándulas salivales menores, secretan un fluido mucho más viscoso, esto por la concentración de glicoproteínas contenidas. Las glándulas parótidas son las glándulas salivales más grandes, se encuentran frente a la oreja y posterior de la rama de la mandíbula. La glándula submandibular tiene un tamaño variable, puede ser aproximadamente la mitad de las dimensiones de la glándula parótida. La parte superficial está encajada entre el cuerpo de la mandíbula y el músculo milohioideo. La glándula sublingual es la de menor en tamaño dentro de las tres glándulas salivales mayores, es aproximadamente una quinta parte del tamaño de la glándula submandibular. Está ubicada en la pared inferior de la cavidad bucal, por debajo de los pliegues sublinguales de la membrana mucosa.

Las glándulas salivales menores se ubican en toda la cavidad bucal, mismas que contemplan las glándulas; bucal, labial, palatina, palatoglosa y lingual. Las glándulas; bucal y labial secretan fluido mucoso y seroso (son mixtas), las glándulas; linguales, palatina y palatoglosa son glándulas mucosas, las únicas serosas son las glándulas de Von Ebner, mismas que se encuentran en las papilas ubicadas en el dorso posterior de la lengua (Michael et al., 2012).

La glándula salival se compone por los extremos secretores (acinos) y el sistema ductal. En el caso de las glándulas serosas, las células del elemento final (acino) están estructuradas de forma aproximadamente esférica. Por otro lado, en las glándulas mucosas, están estructuradas de una forma tubular con un lumen (apertura o también llamado luz) central de mayor magnitud. Dentro del sistema ductal existen tres tipos de ductos. Primeramente, el fluido pasa por los conductos

intercalados, mismos que tiene un epitelio de forma cuboidal y un lumen de dimensiones pequeñas. Posteriormente, el fluido pasa por los conductos estriados, mismos que tienen células columnares, estas células tienen las características de contar con muchas mitocondrias. Por último, el fluido pasa por los conductos excretores, mismos que tienen células cuboidales hasta la parte terminal que está revestida con epitelio escamoso estratificado.

La formación del fluido en las glándulas salivales ocurre en los acinos (piezas finales). Para el caso de las células serosas, se produce una secreción seromucosa acuosa. Por otro lado, para el caso de las células mucosas, se produce una secreción viscosa rica en mucina. Este fluido se origina a partir del líquido intersticial de la sangre que se encuentran en los capilares, mismo que se modifica por las células de los acinos a través del lumen. Desde esa apertura (lumen) sufre la mayor parte de las modificaciones al pasar por el sistema ductal (en específico en los conductos estriados) ya que se producen intercambios iónicos. La última modificación se lleva a cabo en los conductos excretores, antes ser secretada a la boca (Michael et al., 2012).

La acción de secretar fluido salival es un reflejo que se lleva a cabo por los nervios, el sistema nervioso autónomo controla el volumen y tipo de saliva que puede ser secretada. Existen estímulos que pueden interferir en la acción de la salivación, los principales es el gusto y la masticación, sin embargo, otros también interfieren, como lo son; la vista, el pensamiento y el olfato. La secreción de la glándula parótida se rige por la sinapsis del nervio glossofaríngeo en el ganglio ótico. La secreción de las glándulas submandibulares y sublinguales se rigen por la sinapsis del nervio facial en el ganglio submandibular. La secreción de las macromoléculas en la saliva está regulada por la liberación de noradrenalina por los nervios simpáticos.

La secreción de la saliva también se ve influida por la irrigación de las glándulas salivales. Para la secreción rápida del fluido salival se requiere de un vasto abastecimiento de sangre. En el sistema ductal, específicamente en los conductos estriados, lugar donde se produce el intercambio iónico, existen en numerosa cantidad capilares alrededor estos conductos. Por otro lado, las piezas

finales o acinos, están rodeados por una menor cantidad de capilares. La irrigación a la glándula parótida se lleva a cabo a través de las arterias carótidas temporales y externas superficiales. La sangre desoxigenada es drenada a través de numerosas venas que drenan a las venas yugular retromandibular y externa. El drenaje linfático fluye principalmente por los nódulos parótidos superficiales y profundos hacia los ganglios cervicales profundos. La irrigación de la glándula submandibular se lleva a cabo a través de las ramas de la arteria facial y algunas de la arteria lingual. La sangre desoxigenada es drenada a través de las venas linguales y faciales comunes. El drenaje linfático fluye por los ganglios linfáticos submandibulares y, las cadenas cervicales y yugulares profundas. La irrigación de la glándula sublingual se lleva a cabo a través de la rama sublingual de la arteria lingual, así como también por la rama submental de la arteria facial. La sangre desoxigenada es drenada a través de la rama submental de la vena facial. El drenaje linfático fluye por los ganglios linfáticos submandibulares (Michael et al., 2012).

La secreción salival es variable dependiendo de numerosos factores, siendo uno de ellos el tipo de glándula que la secreta. La secreción por día de saliva varía entre los 500 y 600 mililitros. La constitución de la saliva estimulada y no estimulada por la masticación se muestra en la tabla siguiente:

Tabla 2.2. Elementos constituyentes de la saliva (Michael et al., 2012)

	No estimulada	Estimulada
Elementos Inorgánicos		
Sodio	5.76 mmol/l	20.67 ⁴ mmol/l
Potasio	19.47 mmol/l	13.62 ⁴ mmol/l
Calcio	1.32 mmol/l	1.47 ⁴ mmol/l
Magnesio	0.20 mmol/l	0.15 ⁵ mmol/l
Cloro	16.40 mmol/l	18.09 ⁴ mmol/l
Bicarbonato	5.47 mmol/l	16.03 ⁴ mmol/l
Fosfatos	5.69 mmol/l	2.70 ⁴ mmol/l
Yodo		13.8 ⁷ µmol/l
Fluoruros	1.37 ⁸ µmol/l	1.16 ⁹ mmol/l
Elementos Orgánicos		
Proteínas totales	1630 mg/l	1350 ¹⁰ mg/l
Inmunoglobulina A	76.1 mg/l	37.8 ⁶ mg/l
Mucina 5B	830 mg/l	460 ¹⁰ mg/l

Mucina 7	440 mg/l	320 ¹⁰ mg/l
Amilasa	317 (U=mg maltosa/ml/min)	453 ¹¹ U
Lisozima	28.9 mg/l	23.2 ⁶ mg/l
Lactoferrina	8.4 mg/l	5.5 ⁶ mg/l
Estaterina	4.93 ¹² µmol/l	
Albumina	51.2 mg/l	60.9 ¹¹ mg/l
Glucosa	79.4 µmol/l	32.4 ¹³ µmol/l
Lactato	0.20 mmol/l	0.22 ⁴ mmol/l
Total de Lípidos	12.1 ¹⁴ mg/l	13.6 ¹⁵ mg/l
Amino ácidos	780 ¹⁶ µmol/l	567 ¹⁷ µmol/l
Urea	3.57 mmol/l	2.65 ¹⁸ mmol/l
Amoníaco	6.86 ¹⁹ mmol/l	2.57 ²⁰ mmol/l

2.5 Biosensores.

El término biosensor se define como un dispositivo analítico que integra un componente de naturaleza biológica (capa biofuncional), que está conectado con un transductor fisicoquímico y que, en presencia de una muestra de interés, llamada analito, genera una respuesta eléctrica (señal), misma que puede ser interpretada o estudiada. El mecanismo de un biosensor está ilustrado en la Figura 2.1.

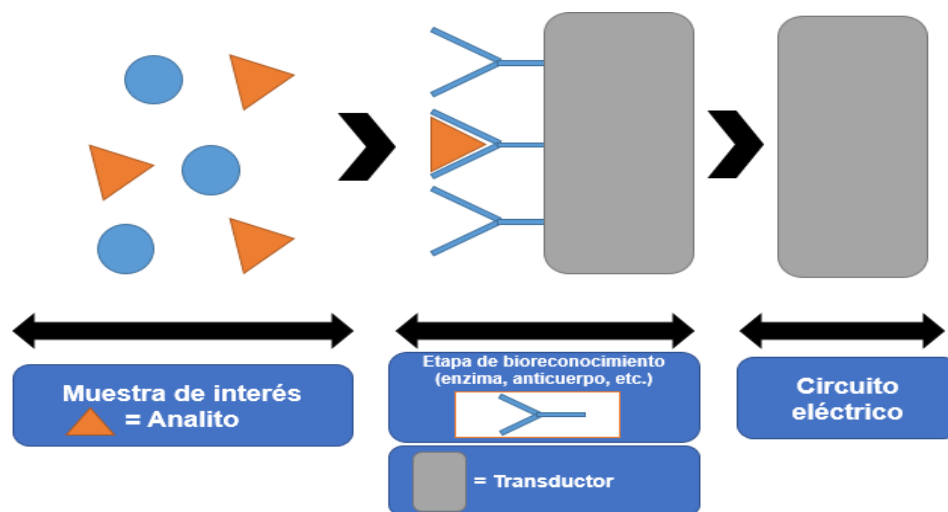


Figura 2.1 Mecanismo de funcionamiento de un biosensor

Los biosensores son dispositivos que cuentan con propiedades destacadas para aplicaciones de interés, como lo son; especificidad, alta sensibilidad, capacidad de respuesta apropiada para un tiempo de análisis corto, viabilidad para

ser incorporados a sistemas integrados, apto para ser trabajados en tiempo real, bajo coste, por mencionar algunas.

Los biosensores pueden ser utilizados como componentes de reconocimiento a diferentes muestras de interés; pueden ser “simples” o “complejos” dependiendo de cómo estén constituidos, es decir, pueden utilizar en su capa biofuncional elementos que son relativamente sencillos como las enzimas, o pueden utilizar otro tipo de productos como lo son derivados de la ingeniería genética, convirtiéndolos en herramientas más complejas.

Los biosensores se pueden clasificar dependiendo distintos criterios, pueden depender de su relación con el elemento de reconocimiento y el analito o componente deseado de medir, la técnica por la cual realizan esa interacción, así como por la naturaleza del elemento de reconocimiento y el transductor. Estos conceptos pueden representarse en la tabla 2.1 (Ortega Ortiz De Apodaca, 2006).

Tabla 2.3 Criterios de clasificación de los biosensores (Ortega Ortiz De Apodaca, 2006, Mayo)

Mecanismo de interacción	Metodología de la detección
Catalítico	Directa
Afinidad	Directa
Sistema de reconocimiento	Sistema de transducción
Enzima	Electroquímico
Orgánulo, tejido o célula	Óptico
Receptor biológico	Piezoeléctrico
Anticuerpo	Termométrico
Ácidos nucleicos	Magnético
PIM, PNA, aptámero	Nanomecánico

2.6 Electrodo serigrafados.

Los electrodos serigrafados son un tipo de sensor que se ha utilizado en los últimos años en el campo de la electroquímica. Por definición al incorporar un componente de naturaleza biológica se convierte en un biosensor. Estos elementos

tienen fundamento amperométrico (ser generadores de una señal eléctrica), mismo que hace que sea utilizado como transductor. El electrodo serigrafiado cuenta con 4 elementos fundamentales; tres electrodos (auxiliar, de referencia y de trabajo) y del contacto eléctrico. El electrodo serigrafiado y sus partes se muestran en la Figura 2.2.

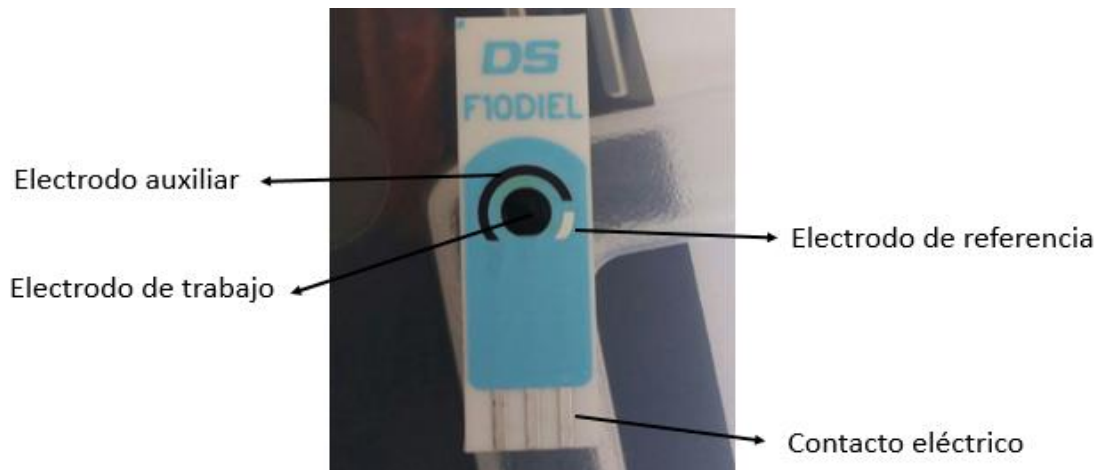


Figura 2.2 Electrodo serigrafiado y sus partes.

Los electrodos serigrafiados cuentan con numerosas ventajas que pueden ser clasificadas en:

a) Flexibilidad de diseño. Se pueden generar las geometrías de los electrodos a conveniencia de la aplicación del mismo, así como también se pueden modificar las tintas de serigrafías que son utilizadas para estos electrodos, esto con el objetivo de tener mejores propiedades dependiendo de la aplicación que se pretenda trabajar.

b) Automatización del proceso de producción. Teniendo un diseño óptimo para una aplicación en específico, además de tener seleccionados los materiales adecuados para el óptimo funcionamiento del electrodo, es posible reproducirlo en grandes cantidades y de esta forma disminuir los costos.

c) Materiales. Existe un gran umbral de materiales que pueden ser utilizados en los electrodos serigrafiados, como lo es el oro, platino, carbono, plata

o cloruro de plata, de esta forma incrementar el campo aplicativo en el que pueden ser utilizados (González García et al., 2010).

Para el caso exclusivo del electrodo serigrafiado modificado con la enzima glucosas oxidasa ya existen diversas configuraciones utilizando varias enzimas. En este trabajo se utilizará la siguiente configuración; en este caso el analito es la glucosa, biomolécula que se encuentra en una muestra de interés, para lo cual se seguirá el siguiente diagrama.

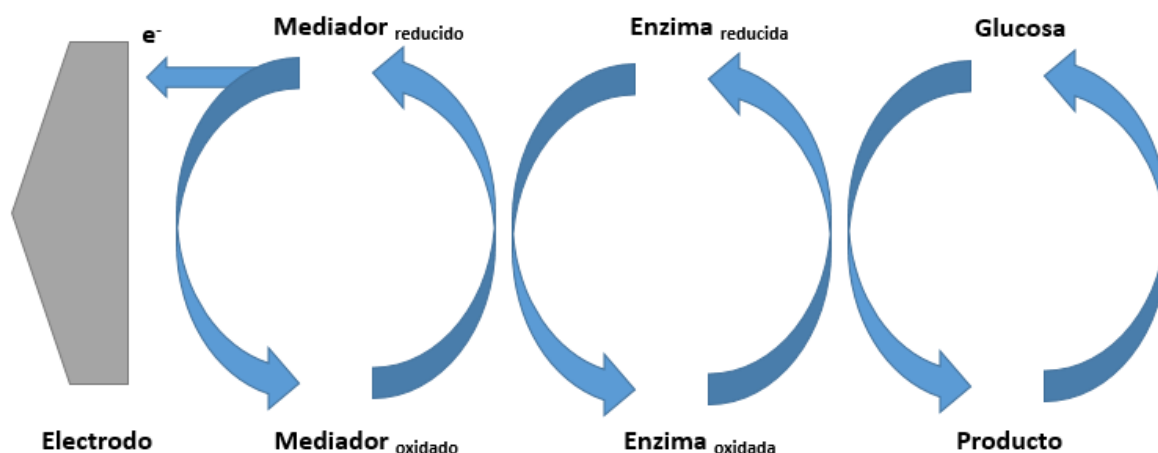
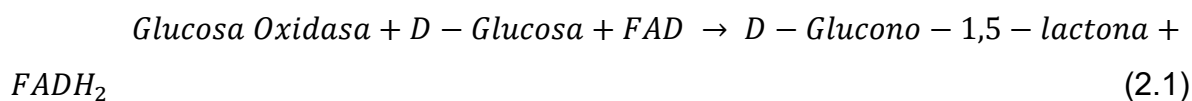


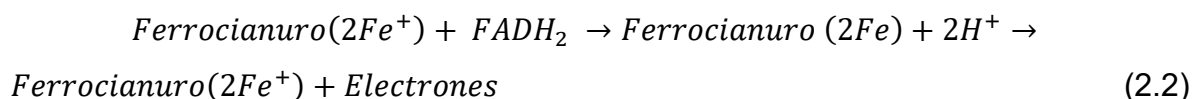
Figura 2.3 Funcionamiento biosensor enzimático

Para esta aplicación, como ya se ha mencionado, la enzima que se utilizará es la enzima glucosa oxidasa, mismo que requiere de un cofactor: flavín adenín dinucleótido (FAD). El cofactor es usado como un receptor inicial de electrones, que posteriormente será reducido a FADH₂; el mediador o receptor final de electrones es el ferricianuro. Se puede representar de igual manera en la siguiente ecuación:

Reacción Enzimática:



Reacción Faradaica:



Un problema para este tipo de biosensores es la necesidad de un mediador que conduzca electrones de forma eficiente, para este tipo de aplicaciones el Ferrocianuro es un mediador que cumple con las características de mejor manera (Ortega Ortiz De Apodaca, 2006).

La glucosa oxidasa es una enzima del grupo de las oxido-reductasas, cuya función es catalizar la oxidación de la glucosa, esto a través de la reducción del oxígeno a peróxido de hidrógeno. Se trata de una flava proteína (proteínas que contienen un nucleótido procedente de la vitamina B2) conteniendo FAD (flavín adenín di fosfato), misma que es altamente específica para la molécula de la glucosa. Esta enzima en presencia de glucosa y oxígeno tiene un comportamiento antibacterial. Su actividad máxima se encuentra entre las temperaturas de 20°C a los 40°C, encontrándose con un pH entre 3.0 y 6.5, siendo el 5.5 el ideal, temperaturas superiores a 60°C causa inactivación de esta enzima (Sosa Romero et al., 2010).

2.7 Instrumentación de Biosensores Amperométricos

Los biosensores amperométricos tienen la característica de producir una corriente eléctrica como salida, dicha corriente eléctrica es el resultado de las corrientes “faradaicas” que se generan por una diferencia entre dos elementos: a) un electrodo de un material que aporta un potencial continuo y, b) los electrones resultantes que se generan en las reacciones enzimáticas. Usualmente los biosensores del tipo amperométricos tienen enzimas del tipo óxido-reductasas, lo anterior porque los productos resultantes (electrones) son generados por la reacción oxido-reducción, mismos que son relativamente sencillos de detectar amperométricamente (Ortega Ortiz De Apodaca, Mayo).

Anteriormente se utilizaban sistemas de dos electrodos, sin embargo, para mejorar la estabilidad electroquímica es necesario un sistema de tres electrodos. El

electrodo de trabajo es el que está en contacto inmediato con la muestra, el objetivo de este electrodo es optimizar la reacción que se lleve a cabo en él. Se trata de una reacción enzimática para el caso de biosensores amperométricos. Es habitual que este electrodo se deteriore con el paso del tiempo por las reacciones que se puedan llevar a cabo. Para erradicar parcialmente este deterioro se coloca un electrodo de referencia, cuyo objetivo es fijar un potencial constante. El tercer electrodo es el electrodo auxiliar, cuya función es equilibrar la corriente generada en el electrodo de trabajo, es decir, la reacción que se lleva a cabo en electrodo de trabajo genera una reacción secundaria en el electrodo auxiliar misma que es la que equilibra la corriente de salida del sistema. Para este tipo de sistemas de tres electrodos es necesario utilizar una configuración especial. La configuración compatible para estos electrodos es un circuito potencioestático, ilustrado en la siguiente figura.

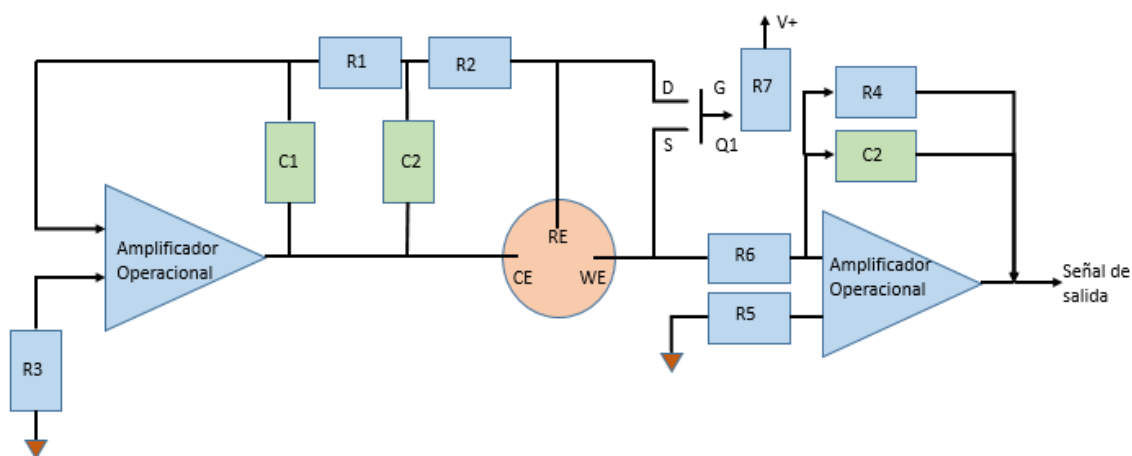


Figura 2.4 Circuito potencioestático

Estos electrodos requieren de un circuito electrónico de control para funcionar. Este circuito consta de dos amplificadores y un transistor del tipo JFET. Pueden cambiar algunos valores dependiendo de la aplicación, sin embargo, las salidas serán las mismas. El objetivo primordial de este circuito es conservar un voltaje entre los electrodos de referencia y de trabajo, esto para mejorar la estabilidad electroquímica y que la señal generada sea proporcional a la corriente generada en el electrodo de trabajo. La reacción de oxidación esperada se lleva a cabo en el electrodo de trabajo, misma reacción generará productos de la reacción y electrones. Los electrones fluirán a través del electrodo de trabajo y

posteriormente a una resistencia que estará conectada a un amplificador en configuración de transimpedancia, lo que permitirá que el amplificador convierta la señal eléctrica en un voltaje proporcional. Ese voltaje se puede interpretar con la siguiente fórmula:

$$\text{Voltaje} = i_{\text{sensor}} * R \quad (2.3)$$

Los productos de la reacción de oxidación generarán una corriente para que el electrodo auxiliar brinde el equilibrio electroquímico, lo cual se puede interpretar en una corriente necesaria inducida por el electrodo de trabajo. Esto permitirá que el sensor no se polarice cuando el circuito no tenga energía, de igual forma permite que el sistema tenga los mismos potenciales en el electrodo de trabajo y de referencia cuando no este energizado (Texas Instruments , 2013).

2.8 Ajuste de Curvas

El ajuste de curvas se emplea para conocer valores intermedios entre dos series de datos, o en otro caso, se obtenga una función matemática que acople a un conjunto de datos. Dependiendo de las características de los datos es que se elige el método para el ajuste de curvas.

En diversas ramas de las ciencias exactas se obtienen series de datos como resultado de un experimento, pueden ser representados como;

$$(x_0, y_0), (x_1, y_1), (x_2, y_2), \dots, (x_k, y_k), \dots, (x_n, y_n) \quad (2.4)$$

El problema con este tipo de datos puede girar en relación a dos incógnitas, La primera de ellas es la predicción de los datos; es decir, tener un modelo matemático que dé una respuesta en relación a los datos contemplados para realizar el modelo matemático. La segunda es el explicar o comprender la tendencia de los datos. Para resolver esta incógnita, existen dos principales metodologías:

La primera de ellas consiste en encontrar una función $y = f(x)$ cuya gráfica coincida exactamente con los datos obtenidos por la experimentación. Esto puede representarse en la siguiente figura:

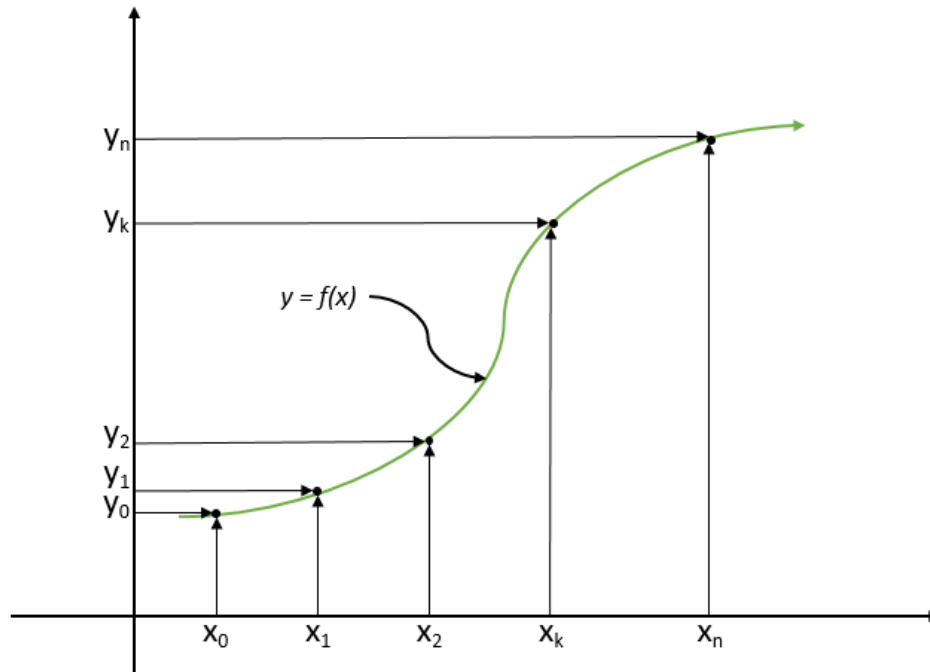


Figura 2.5 Función $f(x)$

Este método se le denomina interpolación, mismo que encuentra un polinomio con la siguiente forma: $f(x) = a_0 + a_1x + a_2x^2 + \dots + a_nx^n$ dando $y = f(x)$. El problema sustancial de este método es encontrar los coeficientes a_0, a_2, \dots, a_n . Desde el punto de vista algebraico esto es similar a elegir una función en el espacio vectorial de funciones generada por $\{1, x, x^2, \dots, x^n\}$ que genera un grupo de polinomios de orden n . Lo anterior nos dirige a un sistema de ecuaciones:

$$a_0 + a_1x_0 + a_2x_0^2 + \dots + a_nx_0^n = y_0 \quad (2.5a)$$

$$a_0 + a_1x_1 + a_2x_1^2 + \dots + a_nx_1^n = y_1 \quad (2.5b)$$

$$a_0 + a_1x_2 + a_2x_2^2 + \dots + a_nx_2^n = y_2 \quad (2.5c)$$

$$a_0 + a_1x_n + a_2x_n^2 + \dots + a_nx_n^n = y_n \quad (2.6)$$

Otra técnica utilizada para comprender en este caso la tendencia de los datos obtenidos experimentalmente es el método de los mínimos cuadrados, método que es frecuentemente utilizado en las ciencias exactas. Este método encuentra una función cuya representación se aproxima a los puntos graficados por los datos experimentales, la diferencia con el método anterior es que esta es una aproximación hacia la tendencia de los datos.

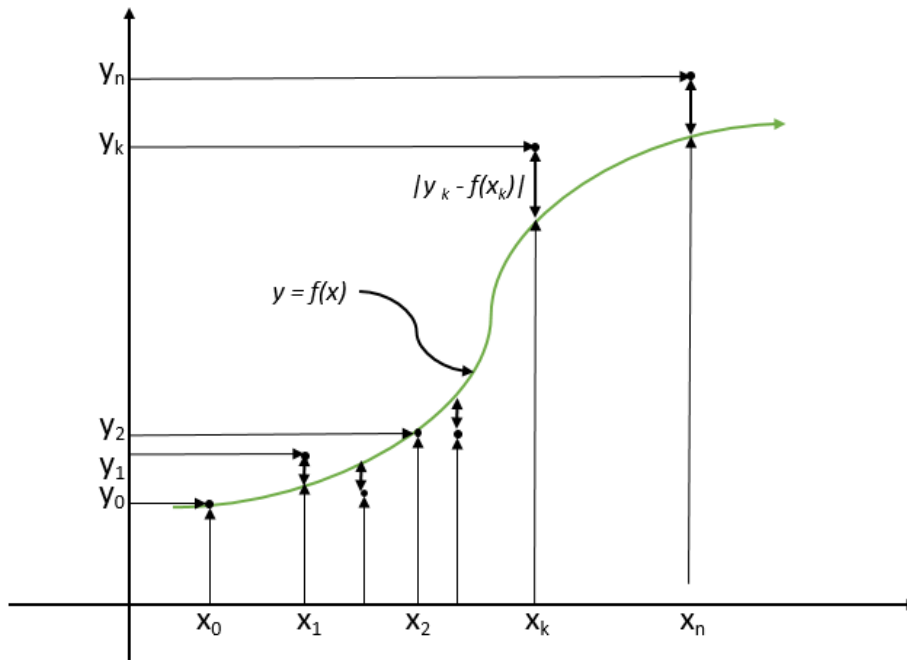


Figura 2.6 Función $f(x)$ aproximándose a los datos

Este método consiste en realizar la sumatoria de todas las diferencias que existen entre los datos experimentales y la función $f(x)$, y de esta forma hallar el modelo matemático que reduce el error (Hinestroza, 2002).

$$E = \sum_{i=1}^n (y_{\beta} - f(x_{\beta}))^2 \quad (2.7)$$

CAPÍTULO III

Metodología

3.1 Metodología.

En este capítulo se brindan los diferentes pasos que son necesarios para desarrollar un dispositivo que sea capaz de detectar glucosa. La metodología describe pasos sistemáticos que buscan detectar glucosa en saliva. El desarrollo del Dispositivo detector de glucosa en una muestra no invasiva se describe en cuatro pasos, como se muestra en la Figura 3.1:

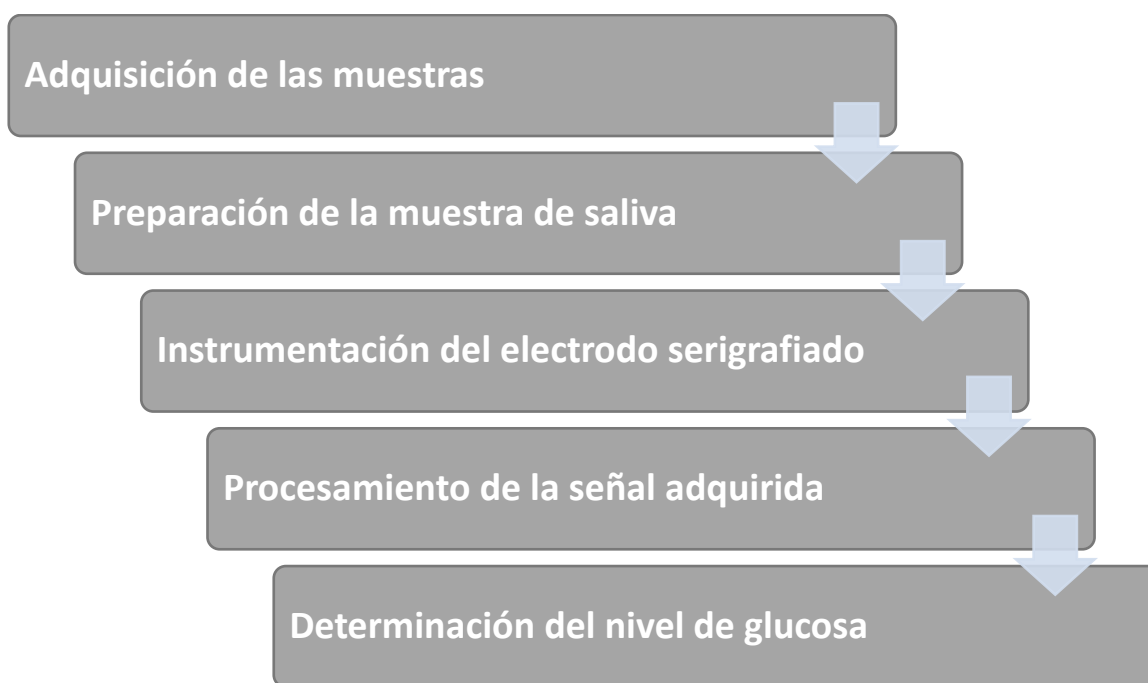


Figura 3.1 Elementos de Metodología propuesta.

Paso 1: Adquisición de la muestra. Se toman muestras, una de ellas de forma no invasiva (saliva) en un volumen de 3ml y la otra de forma invasiva (sangre) en un volumen de 3ml. Las muestras de saliva fueron obtenidas solicitando lo siguiente: 8 horas de ayuno, con higiene bucal nocturna (cepillado de dientes, uso de hilo dental y enjuague bucal) y sin higiene bucal matutina (cepillado de dientes, uso de hilo dental y enjuague bucal).

Paso 2: Preparación de la muestra. Las muestras de saliva fueron preparadas a través de una centrifugación de 4000 revoluciones por minuto durante 10 minutos,

para separar las partículas de mayor densidad y no alterar la medición de saliva que se coloca en el sensor. Posteriormente, se sometieron a refrigeración a una temperatura de -40°C (Hubel et al., 2011). Para el caso de las muestras de sangre se determinó de forma inmediata la concentración de glucosa que existía en ellas, con un examen de glucemia sanguínea. La centrifugadora usada fue una DRE Standard Centrifuge, aprobada por la FDA, CE, ISO, GMP, con dimensiones 270mm x 270mm x 250mm, misma que cuenta con una velocidad máxima de 4500 rpm. El proceso de centrifugación se muestra en la figura 3.2, misma que muestra la capacidad de la centrifugadora usada.



Figura 3.2 Centrifugadora usada

Paso 3: Selección del electrodo serigrafiado. Se adquirieron electrodos serigrafiados desechables modificados con la enzima glucosa oxidasa, flavín adenín dinucleótido (FAD), ferrocianuro y contactos eléctricos de plata. Los electrodos se deben almacenar en obscuridad en temperaturas entre los 2 y 8°C . Previamente al realizar mediciones se deben dejar a temperatura ambiente durante 20 y 30 minutos. Además, se adquirió un conector especializado, mismo que permite realizar la conexión entre el electrodo serigrafiado y el circuito electrónico para su procesamiento. Este conector acopla las 3 terminales de los electrodos del electrodo serigrafiado con 3 salidas que pueden conectarse al circuito electrónico. Este conector se muestra en la figura 3.3:

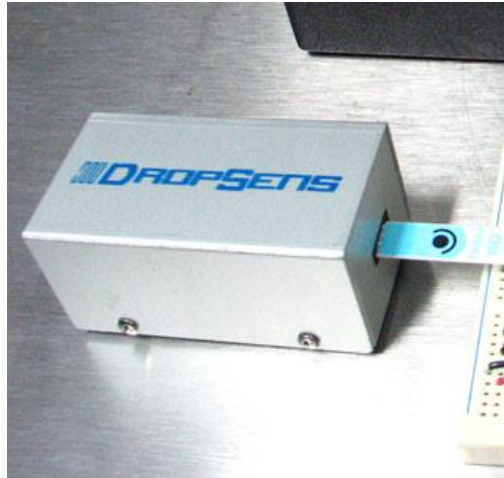


Figura 3.3 Conector para los electrodos serigrafiados

Paso 4: Procesamiento de la señal adquirida. La detección de glucosa en las muestras salivales se realiza a través de un circuito electrónico. Este circuito consta primeramente de una etapa de alimentación al circuito, un transductor (conector mostrado en la figura 3.3) que permitirá la conexión del circuito, y los electrodos serigrafiados modificados con la enzima glucosa oxidasa, un circuito potencioestático especializado para sistemas electroquímicos de 3 electrodos para el que se utilizaron los siguientes componentes; amplificadores operacionales LM 358N, transistores 2N5462, resistencias de 10 k Ω y capacitores cerámicos de 10 nF.

En este punto, debe resaltarse que un circuito potencioestático realiza la conversión de la corriente a voltaje. Evidentemente, se sabe que una corriente eléctrica se genera al darse movimiento de electrones, por lo que se asume que toda la corriente que se genera en el circuito se debe a la reacción química de la enzima presente en el sensor. En la realidad, este no es el caso, ya que la temperatura ambiental provoca una pequeña circulación de corriente que es conocida como ruido térmico (Edel et al., 2013). Esto motiva a que los componentes electrónicos empleados generen el menor voltaje posible debido a este fenómeno. La elección del transistor empleado, así como de los amplificadores operacionales dados garantizan que generan el menor ruido térmico posible. Debe resaltarse que habrá un voltaje muy pequeño de salida, pues el ruido es mitigado mas no eliminado en su totalidad (Texas Instruments, 2013).

Después de la verificación del correcto funcionamiento de la configuración electrónica, se realiza la detección de glucosa en la saliva a través de los siguientes pasos:

- Se coloca un electrodo serigrafiado al sistema electrónico.
- Se energiza el sistema electrónico.
- Se mide el circuito en estado de reposo.
- Se coloca una pequeña muestra de saliva procesada.
- Se observa la diferencia de voltaje.
- Se registra el voltaje máximo y se identifica con el número de muestra

colocado.

Paso 5: Determinación de nivel de glucosa. Se encuentra el valor de la glucosa en saliva mediante la obtención de una curva de tendencia utilizando los voltajes obtenidos de cada una de las muestras de saliva procesadas, con los niveles de glucosa obtenidos en las muestras sanguíneas. En el tema de circulación sanguínea se describe que el examen de glucemia sanguínea es el más adecuado para realizar una comparación. Es por ello que se considera como referencia para conocer la concentración de glucosa en el organismo. Por ello, se propone realizar la correlación entre la medición de la glucosa en saliva con el nivel de glucosa determinado por el examen de glucemia sanguínea.

3.2 Material.

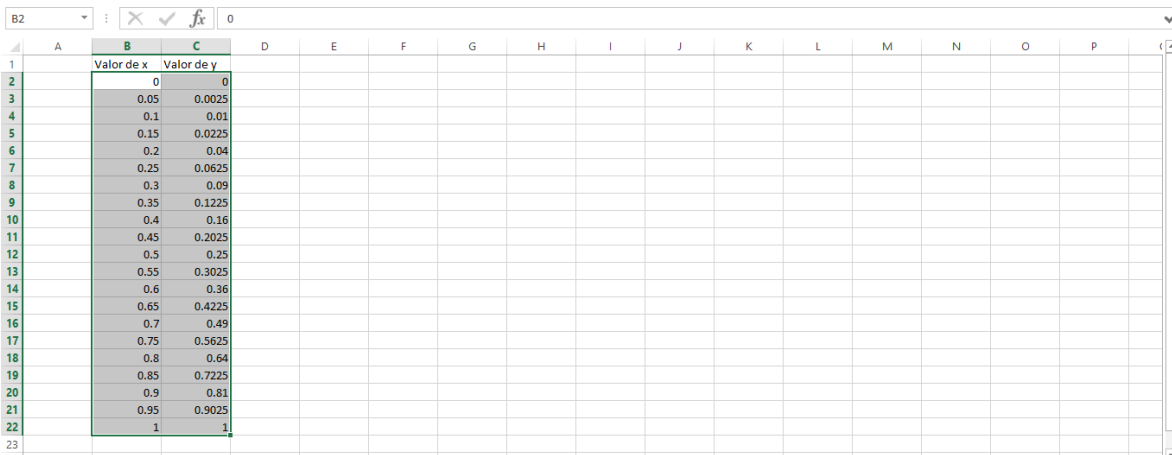
Para la realización del presente trabajo participaron 30 personas sanas con una edad media de 20 años. Las muestras fueron obtenidas en personas que presentaron 8 horas de ayuno, con higiene bucal durante la noche (cepillado de dientes, uso de hilo dental y enjuague bucal) y sin higiene bucal durante la mañana (cepillado de dientes, uso de hilo dental y enjuague bucal), esto con el objetivo que ningún residuo alimenticio interfiriera dentro del proceso al que se somete la muestra. Se tomaron 30 muestras con volúmenes de 3 ml de saliva y muestras con volúmenes de 3 ml de sangre. Las muestras se identificaron para posteriormente

comparar los resultados obtenidos de la muestra sanguínea con la muestra de la saliva.

3.3 Obtención de una curva de tendencia.

Un gráfico se puede describir como una representación visual de datos, normalmente numéricos, cuyo objetivo es poder realizar una interpretación visual de una correlación entre los mismos datos. Existen herramientas accesibles actualmente como lo es Excel. Para poder generar una gráfica en este Software de ciertos datos deseados, se sugiere seguir los siguientes pasos:

1. Seleccionar los datos que se desean graficar.



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
1		Valor de x	Valor de y													
2		0	0													
3		0.05	0.0025													
4		0.1	0.01													
5		0.15	0.0225													
6		0.2	0.04													
7		0.25	0.0625													
8		0.3	0.09													
9		0.35	0.1225													
10		0.4	0.16													
11		0.45	0.2025													
12		0.5	0.25													
13		0.55	0.3025													
14		0.6	0.36													
15		0.65	0.4225													
16		0.7	0.49													
17		0.75	0.5625													
18		0.8	0.64													
19		0.85	0.7225													
20		0.9	0.81													
21		0.95	0.9025													
22		1	1													
23																

Figura 3.4 Selección de datos

2. Seleccionar la opción de insertar.

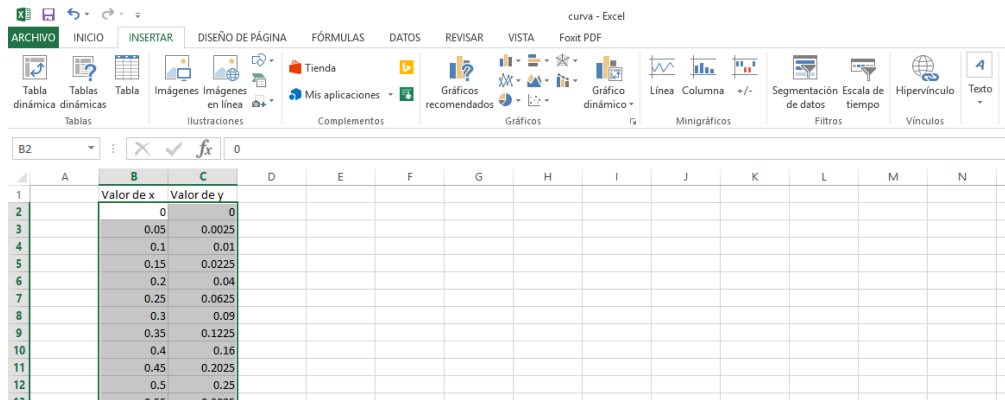


Figura 3.5 Selección de opción insertar.

3. Seleccionar la opción deseada de gráfico.

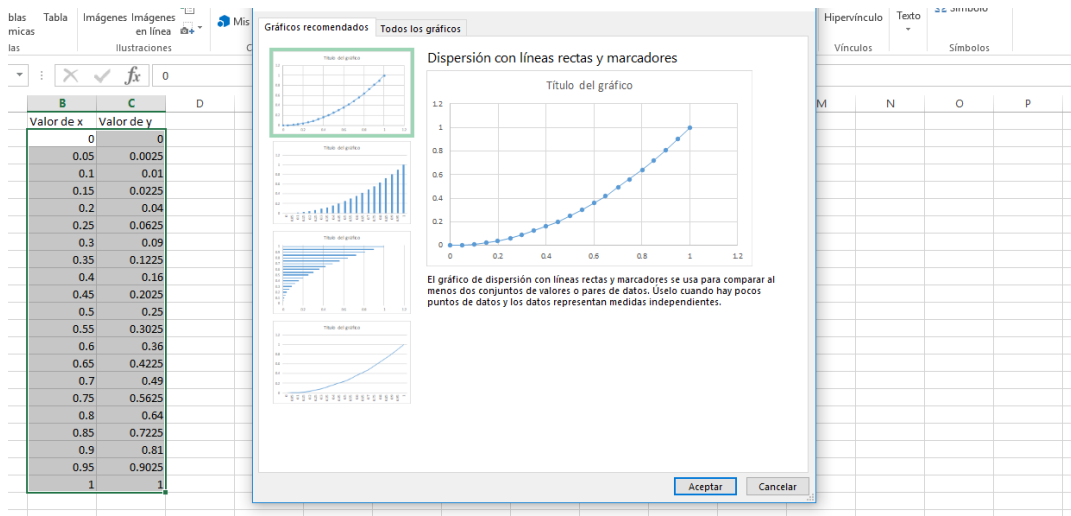


Figura 3.6 Selección de gráfico deseado

4. Seleccionar aceptar.

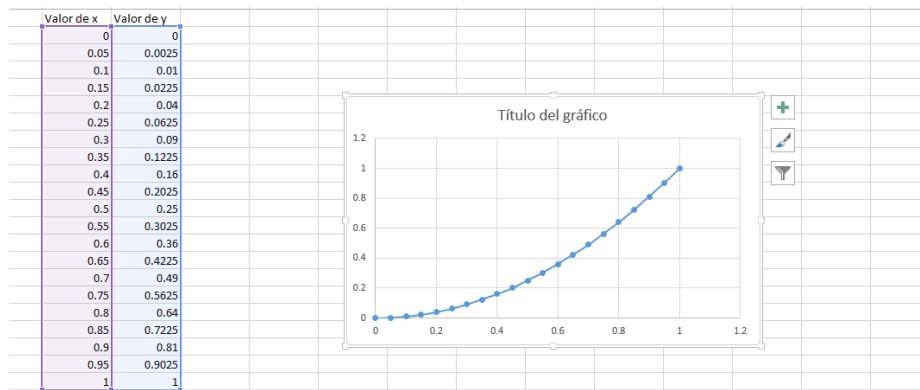


Figura 3.7 Inserción de gráfico

5. Para poder insertar una ecuación de tendencia primeramente debe hacer clic derecho sobre su gráfico

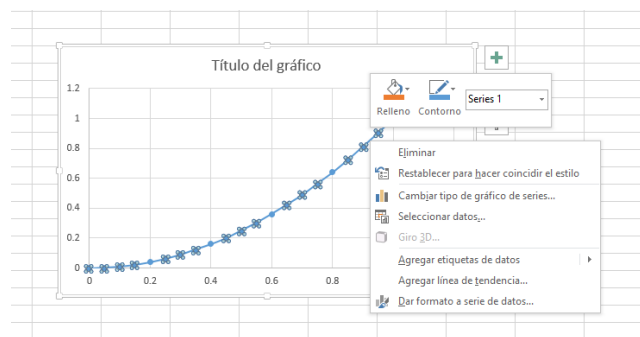


Figura 3.8 Clic derecho sobre la ecuación

6. Seleccionar agregar línea de tendencia.

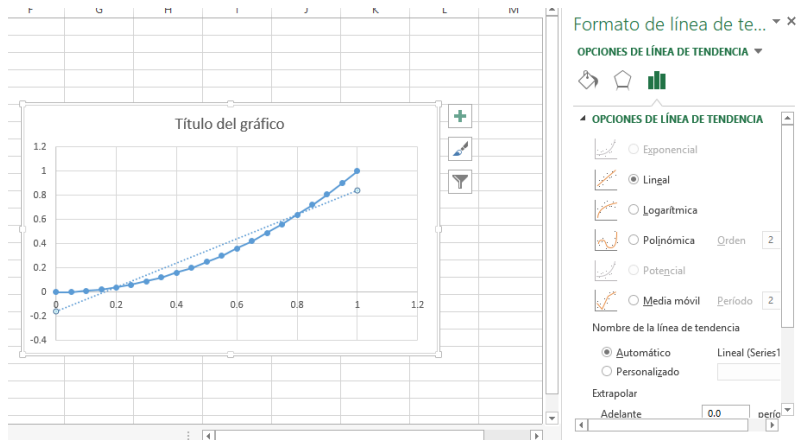


Figura 3.9 Agregar línea de tendencia

7. Seleccionar la opción adecuada.

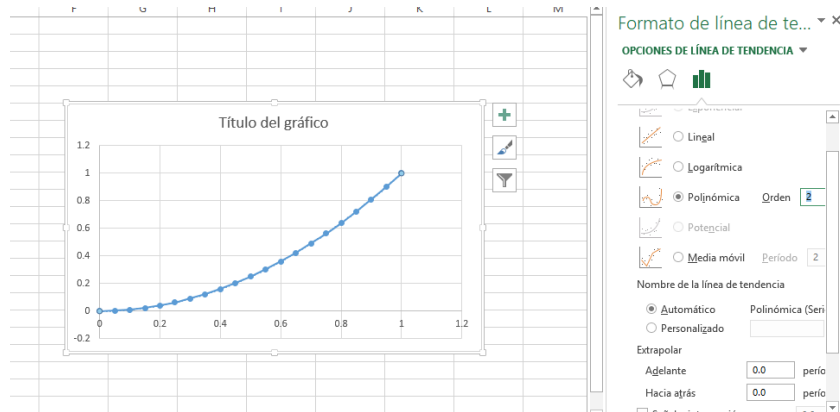


Figura 3.10 Selección la opción adecuada

8. Seleccionar **presentar ecuación en el gráfico** y **presentar valor de R cuadrado en el gráfico**.

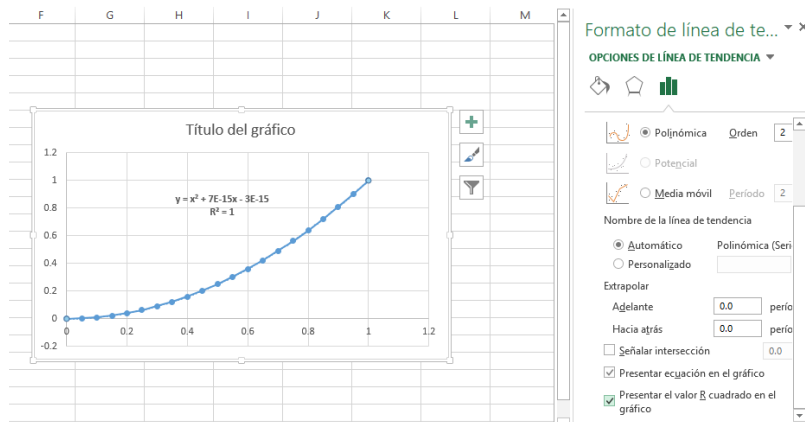


Figura 3.11 Selección para mostrar ecuación y valor de R

Una de las ventajas que aporta este software para el manejo de datos es que se pueden ingresar líneas de tendencia, las cuales se pueden interpretar como una línea puede ser representada en una ecuación matemática para describir el comportamiento de los datos que se están analizando. Esta ecuación tiene un valor de confiabilidad o error, para este software se representa con el valor de R. R tiene un valor entre 0 y 1, entre más acercado esté al 1, mejor confiabilidad tendrá, es decir que la ecuación matemática del gráfico, describe de manera adecuada el comportamiento de los datos. Existen diferentes tipos de línea que se pueden utilizar:

- Lineal: Los datos pueden interpretarse como lineales si la agrupación de datos se parece a una línea constante.
- Logarítmica: Los datos pueden interpretarse con una tendencia logarítmica cuando su comportamiento es el siguiente; si los datos cambian aumentando o disminuyendo rápidamente y posteriormente tienden a un valor (usualmente 0).
- Polinómica: Los datos pueden interpretarse con una tendencia polinómica cuando fluctúan. Puede ser útil cuando hay datos que oscilan y se pueden apreciar máximos y mínimos en la gráfica.
- Potencial: Los datos pueden interpretarse con una tendencia potencial cuando aumentan a un ritmo constante.
- Exponencial: Los datos pueden interpretarse con una tendencia exponencial cuando los valores aumentan o disminuyen en intervalos cada vez más grandes.
- Media móvil: Los datos pueden interpretarse con una media móvil cuando existen fluctuaciones entre los datos de diferente tamaño, utilizando un promedio entre un dato y otro.

CAPÍTULO IV

Resultados

4.1 Puesta de experimento.

Como parte de la metodología planteada en el capítulo anterior, se obtienen muestras de sangre y saliva de 30 personas sanas con un promedio de edad de 20 años, que de forma voluntaria decidieron participar en el desarrollo de este proyecto. Para esto, los participantes firmaron un consentimiento informado. Dado que es necesario mantener un control en las condiciones en las que los participantes llegan a la toma de muestra, se les pide que tengan 8 horas de ayuno, así como también se indica presenten higiene bucal nocturna (cepillado de dientes, uso de hilo dental y enjuague bucal), y sin contar con higiene bucal durante la mañana (cepillado de dientes, uso de hilo dental y enjuague bucal), para de esta forma evitar cualquier estímulo fisiológico a la producción de la saliva y evitar algún cambio en las concentraciones de sus componentes. Las muestras de saliva obtenidas corresponden a saliva no estimulada, dado que esto permite medir de manera eficiente el estado de la glicemia, lo anterior debido al intercambio de macromoléculas que ocurren en las glándulas salivales y los capilares (Guyton et al., 2016). Se identificaron las muestras numeradas con relación a la muestra sanguínea.

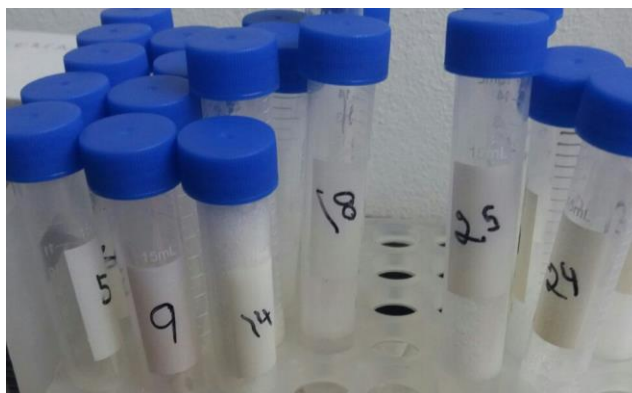


Figura 4.1 Muestras de saliva identificadas

Las muestras de saliva y sangre fueron procesadas por el método de centrifugación, cuyo objetivo es separar sólidos o fluidos de diferente densidad a través de un movimiento de rotación, lo que produce la sedimentación de las partículas de mayor densidad. La centrifugación es una herramienta comúnmente

utilizada en la química sanguínea, por ejemplo, es utilizada para la obtención del suero sanguíneo, mismo que es útil para la identificación de algunas moléculas de interés. (Instituto de diagnóstico y referencia epidemiológicos: Dr. Manuel Martínez Báez, 2015) Para el caso de la sangre, ésta se centrifuga a 3000 revoluciones por minuto, durante un periodo entre 10 minutos para la obtención del suero sanguíneo, mismo que contiene menos componentes bioquímicos y simplificar la medición de glucosa. Para el caso de estas muestras se estimaron de forma inmediata los niveles de glucosa, a través de un examen de glucemia sanguínea.

Los objetos punzocortantes residuales se colocaron en un recipiente rígido de polipropileno identificado según la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, contemplando los lineamientos de no rebasar el 80% del nivel del envase. Las muestras residuales de igual manera fueron manejadas en recipientes herméticos identificados por la misma norma.

Es importante comentar que en el REMU-MA-01 (Manual para la toma, envío y recepción de muestras para diagnóstico) publicado por la Secretaría de Salud a través de la Dirección General de Epidemiología, no se considera aún el fluido salival para medir la concentración de glucosa, por lo que utilizan las revoluciones por minuto y tiempo sugeridos por el departamento de investigación de odontología. La saliva se centrifugó a 4000 revoluciones por minuto durante 10 minutos para la obtención del suero salival. Posteriormente, esta sustancia se congeló a menos de -40°C , para conservar la integridad de sus compuestos de forma estable durante periodos largos de tiempo (Hubel et al., 2011). Después de permanecer a bajas temperaturas y verificar el correcto funcionamiento del sistema de detección de glucosa, se miden los voltajes generados de las 30 muestras de saliva previamente procesadas. Esto se realiza al poner las muestras en un electrodo serigrafiado instrumentado a un sistema que es medido con un osciloscopio.

El correcto funcionamiento de la configuración electrónica fue verificado midiendo el potencial que induce el electrodo serigrafiado sin muestra alguna a través del electrodo de referencia con un osciloscopio conectado a la salida del circuito, teniendo como resultado una estable señal de 7 mV. En la siguiente figura

se muestra el biosensor instrumentado. En este se pueden observar el electrodo serigrafiado en comunicación con el circuito a través del conector. El sistema consta de una etapa de alimentación, misma que sirve para ratificar el correcto funcionamiento de la misma, una etapa potencioestática, cuya salida se amplifica con un amplificador de instrumentación.

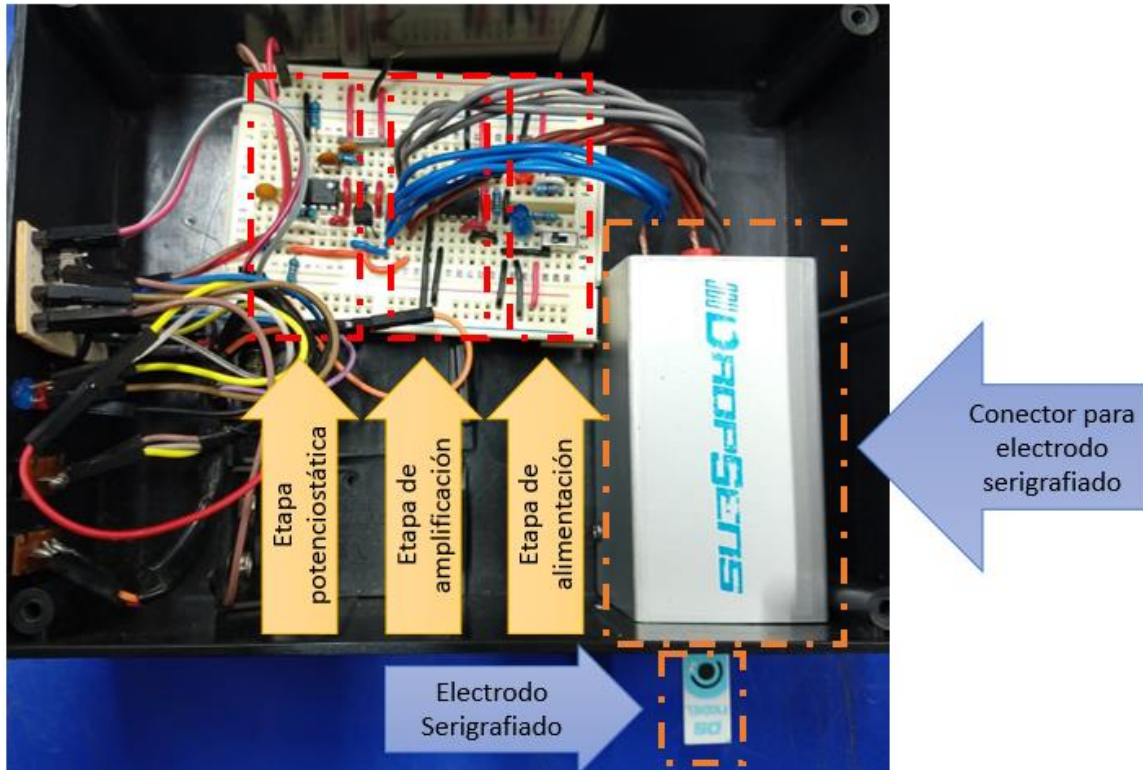


Figura 4.2 Biosensor instrumentado

4.2 Resultados.

Primeramente el voltaje de salida del circuito electrónico en reposo es de 7mV sin colocar una muestra, este voltaje se debe al potencial que genera el electrodo de referencia, cuya función es mejorar la estabilidad electroquímica durante la reacción, esta estabilidad generada por el potencial que induce a la medición se debe al material del que está hecho, el cual para esta aplicación es de plata (Texas Instruments , 2013). En la figura 4.3 se muestra la señal adquirida con el circuito energizado en reposo mostrando una salida de 7mV.

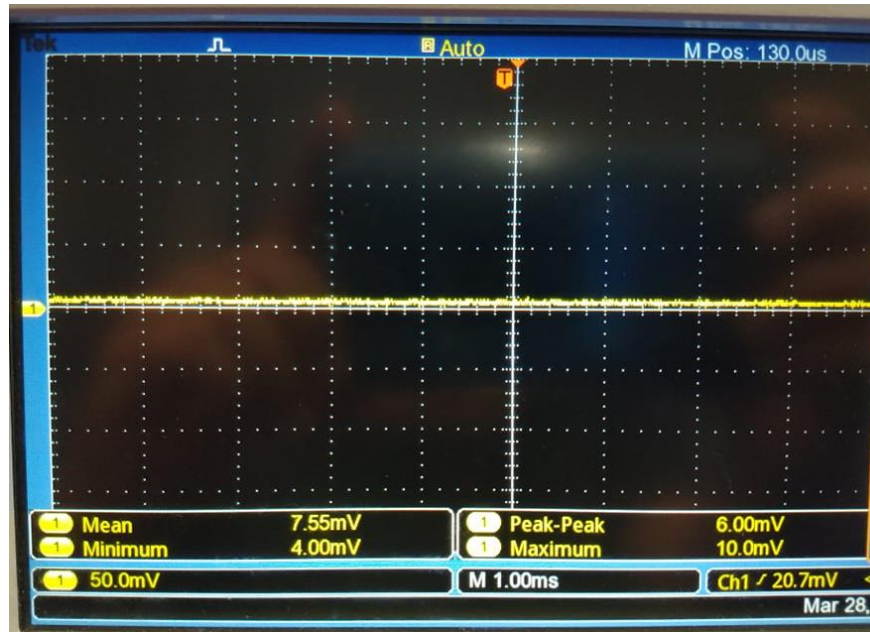


Figura 4.3 Salida de 7mV del circuito energizado en reposo

Las muestras de sangre fueron procesadas y sometidas a una prueba que mide la concentración de glucosa de forma tradicional en un laboratorio, un examen de glucemia sanguínea, por lo que funcionarán como punto de referencia para conocer la concentración real de glucosa de las muestras obtenidas. Las siguientes tablas muestran el valor del voltaje medido con el circuito desarrollado, así como la concentración de glucosa que cada muestra tiene.

Tabla 4.1 Voltaje de las muestras 1 - 10

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Voltaje (mV)	49	22	67.3	71	51.1	37.2	41.1	23.8	16.5	68.8

Tabla 4.2 Voltaje de las muestras 11 - 20

Muestra	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Voltaje (mV)	19	65.7	49.2	70.9	67.4	33	66.7	45.3	37	70.1

Tabla 4.3 Voltaje de las muestras 21 - 30

Muestra	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Voltaje (mV)	25.6	44.8	24.7	49.1	18	61	53.1	33.2	63.4	64.7

Tabla 4.4 Concentración de glucosa en las muestras 1 - 10

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentración (mg/dL)	69	75	89	94	82	70	72	80	78	84

Tabla 4.5 Concentración de glucosa en las muestras 11 - 20

Muestra	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Concentración (mg/dL)	81	92	94	87	91	101	88	82	87	85

Tabla 4.6 Concentración de glucosa en las muestras 21 - 30

Muestra	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Concentración (mg/dL)	77	100	104	83	79	93	97	73	91	85

Se realiza una tabla identificando la concentración de glucosa y voltaje obtenido en cada una de las muestras respectivamente, esto con el objetivo de identificar si existe una relación entre estas dos mediciones, puesto que en trabajos posteriores se desea explorar la posibilidad de desarrollar aún más el circuito planteado, ya que se desea observar si hay una relación lineal o no lineal, para explorar métodos de linealización. Se ordenan de menor concentración de glucosa a mayor concentración de glucosa, en este caso el voltaje será la variable dependiente, y la concentración de glucosa será la variable independiente, lo anterior debido a que el voltaje medido depende de la concentración de glucosa contenida en la muestra.

Tabla 4.7 Relación entre concentración de glucosa y voltaje medido en las muestras 1 - 10

Muestra	1	6	7	28	2	21	9	25	8	11
Concentración (mg/dL)	69	70	72	73	75	77	78	79	80	81
Voltaje (mV)	49	37.2	41.1	33.2	22	26.6	16.5	18	23.8	19

Tabla 4.8 Relación entre concentración de glucosa y voltaje medido en las muestras 11 - 20

Muestra	18	5	24	10	20	30	19	14	17	3
Concentración (mg/dL)	82	82	83	84	85	85	87	87	88	89
Voltaje (mV)	45.3	51	49	68.8	70	64.7	37	70.9	66.7	67.3

Tabla 4.9 Relación entre concentración de glucosa y voltaje medido en las muestras 21 - 30

Muestra	15	29	12	26	13	4	27	22	16	23
Concentración (mg/dL)	91	91	92	93	94	94	97	100	101	104
Voltaje (mV)	67.4	63	65.7	61	49.2	71	53	44.8	49.8	24.7

En la figura 4.4 se presenta la medición de la muestra número 26. Misma que identifica un incremento a 61 mV cuando se colocó la muestra de saliva.

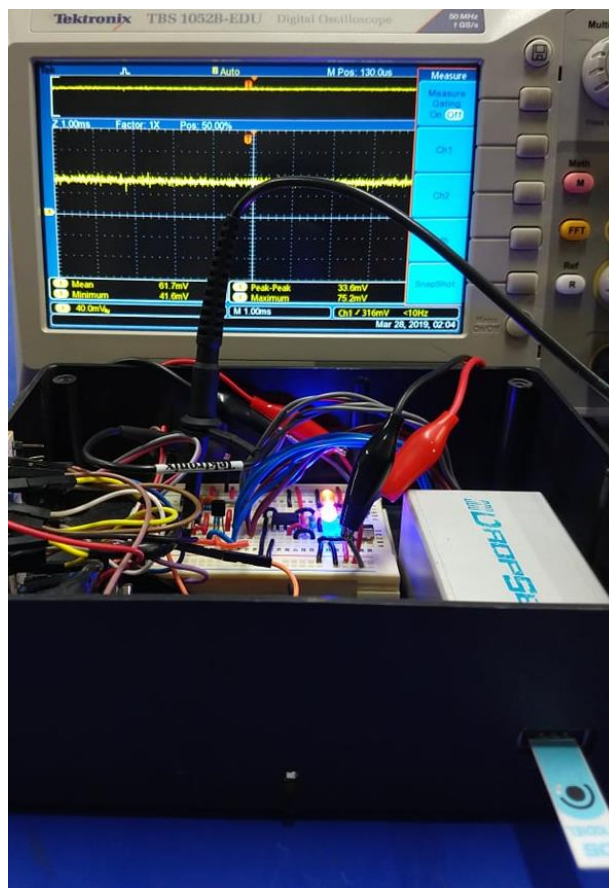


Figura 4.4 Señal medida de la muestra número 26

Se grafican en la figura 4.1 los datos de concentración de glucosa y voltaje medido, misma gráfica incluye una línea de tendencia que representa el comportamiento de estos datos, además también se representa un valor de R^2 .

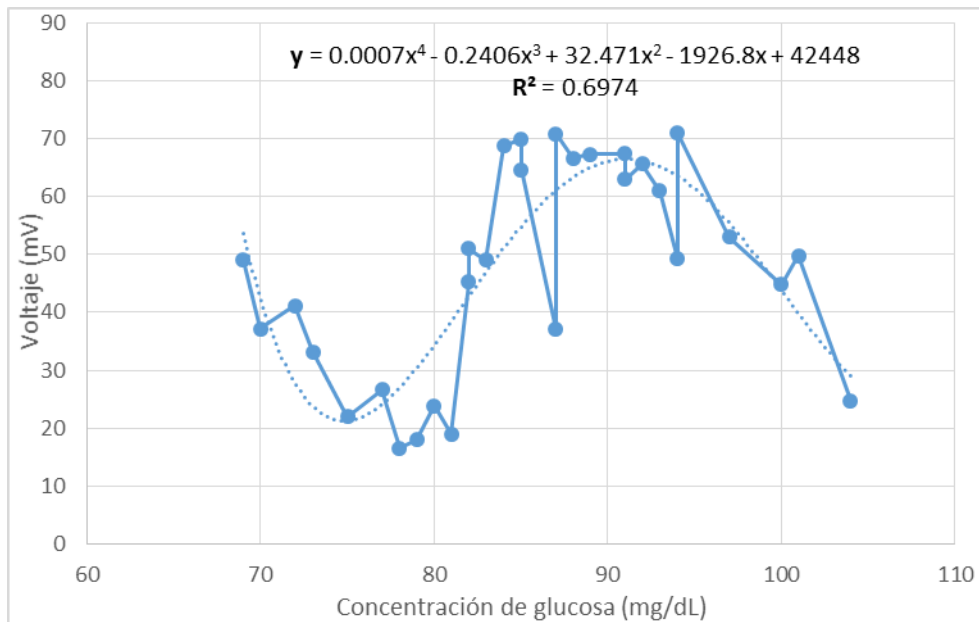


Figura 4.5 Relación entre concentración de glucosa y voltaje medido

La gráfica muestra que la relación entre estas dos variables puede aproximarse mediante un polinomio de cuarto orden, obtenido empleando el método de mínimos cuadrados. Debe aclararse que se realizaron diversas pruebas con el orden del polinomio interpolador, obteniéndose como resultado que un mayor orden no mejora el grado de ajuste obtenido (el coeficiente de correlación, R^2), siendo el orden 4 el que permitió encontrar el mejor compromiso entre el grado de ajuste y el valor de los coeficientes.

4.3 Discusión de Resultados.

La relación entre la concentración de glucosa obtenida en las muestras de saliva, y la concentración de glucosa en el organismo que en este caso son muestras sanguíneas, es representado por la ecuación:

$$y = 0.0007x^4 - 0.2406x^3 + 32.471x^2 - 1926.8x + 42448 \quad (4.1)$$

Con un coeficiente de correlación:

$$R^2 = 0.6974 \quad (4.2)$$

Lo anterior se puede interpretar como que los voltajes medidos a través de la degradación de la glucosa contenida en la saliva, tienen una relación no lineal con respecto a la glucosa en las muestras sanguíneas, la ecuación matemática es capaz de aproximar el comportamiento de estas mediciones en un 69.74%, este resultado se debe a dos factores que deben ser contemplados para mejorarse:

- La ecuación matemática es una representación de la tendencia de esta serie de datos; sin embargo, es importante mencionar que únicamente se realizaron 30 muestras, que fue la población que firmó el consentimiento. En este punto, es necesario hacer una prueba estadística para determinar el tamaño apropiado de la muestra que se debe hacer.

- Una de las ventajas del uso de los electrodos serigrafiados previamente mencionadas es la flexibilidad de diseño; es decir, que se puede modificar con el fin de optimizar el sistema. En el caso de esta aplicación, los electrodos serigrafiados median 5 mm; sin embargo, no se utilizó un sistema preciso para la aplicación de la muestra en el electrodo serigrafiado. Esto podría agregar cierta incertidumbre al no tener la certeza de si se cubre con totalidad el electrodo de trabajo y que éste actué de forma óptima. Por otro lado, se puede también generar una geometría del electrodo más conveniente para esta aplicación.

Otro trabajo que relacionó los niveles de glucosa obtenidos en su dispositivo, comparando con los resultados de la concentración de glucosa sanguínea fue el de Lawand et al. (2015), en los que compararon los resultados obtenidos por su dispositivo usando únicamente la muestra de 5 sujetos. En su trabajo utilizaron una fórmula la cual predecía el nivel de glucosa obtenido al medir de igual forma un voltaje. Para el caso de la aplicación desarrollada en el presente trabajo, se buscó relacionar el voltaje medido de la muestra de saliva con el resultado del examen de glucemia sanguínea, y sobre esta correlación fue sobre la

que se aproximó el modelo matemático. Esto sugiere resultados parcialmente más reales correlacionando las mediciones en saliva y sangre. El presente trabajo de igual forma define algunos factores en los sujetos que pueden interferir en la medición; por ello, se propone un control al tomar las muestras de sangre y saliva como se comentaron; 8 horas de ayuno, con higiene bucal nocturna y sin higiene bucal matutina (cepillado de dientes, uso de hilo dental y enjuague bucal). Por otro lado, Marattukalam et al. (2017) realiza simulaciones con un anillo resonador, mismo que sería capaz de medir la concentración de glucosa en sangre; sin embargo, hay consideraciones que realizar ya que como la saliva, la sangre de igual forma es un fluido complejo, con innumerables elementos constituyentes que pueden interferir en las mediciones. Por el contrario, en este trabajo se empleó la enzima glucosa oxidasa, que como se comentó, es altamente específica a la molécula de la glucosa, y que, se comprobó la actividad de esta enzima midiendo los voltajes máximos como se expuso anteriormente.

El aporte de este trabajo, tomando en consideración los trabajos citados anteriormente, puede deberse a varios puntos:

A) El uso de más muestras: en el presente trabajo se utilizan 30 muestras, significando mayor información al sistema matemático al que se aproximó el comportamiento de los datos obtenidos.

B) El uso de la saliva como muestra de interés: la saliva se trata de un fluido complejo, que puede ser obtenido de forma no invasiva, sin embargo, este fluido contiene mínimas concentraciones de los elementos que la constituyen, para esta aplicación, la glucosa. Aunado a esto, se toman algunas consideraciones al tomar las muestras, esto enriquece el control del experimento.

C) El uso de la enzima glucosa oxidasa en los electrodos serigrafados. El trabajar con una enzima brinda especificidad al sistema de medición, la enzima glucosa oxidasa es altamente específica a la molécula de la glucosa.

D) El uso de un sistema electroquímico de tres terminales, adecuado con un circuito en configuración potencioestático, esto con el fin de mejorar la estabilidad electroquímica en el sistema de medición.

Como se aprecia a partir de la hipótesis y objetivos planteados, es posible afirmar que se cumplieron a cabalidad. Se instrumentó, con base a una ardua investigación, un biosensor específico para la molécula de la glucosa, mismo que incorpora principalmente los electrodos serigrafiados y un circuito potencioestático. Por su parte, los electrodos serigrafiados aportaron especificidad al sistema, mientras por otro lado, el circuito potencioestático acondicionó la señal para transformarla en un voltaje de salida proporcional a la corriente generada por los electrodos serigrafiados. El circuito potencioestático fue capaz de brindarn información para corroborar su correcto funcionamiento, ya que se sabía que se generaría un pequeño potencial cuando el circuito estuviese en reposo; sin embargo no se conocía el valor, mismo que fue de 7 mV. Se realizó un ajuste de curvas usando las mediciones obtenidas entre la concentración de glucosa en la saliva y la concentración de glucosa en la sangre, se obtuvo un polinomio de cuarto orden, tuvo un coheficiente de R^2 de 0.6974. Con base a la investigación sobre todos y cada uno de los elementos que constituye este trabajo, se esperaba que las mediciones en la saliva fuesen complicadas por la complejidad del mismo fluido y por la mínima concentración de glucosa en este. Los resultados obtenidos permiten indicar que fue posible detectar la molécula de glucosa en la saliva a pesar de su complejidad, además de que la información brindada fue útil para generar un modelo matemático como se propuso, por lo que los resultados son favorables en este trabajo.

CAPÍTULO V

Conclusiones y Perspectivas

5.1 Conclusiones

En este trabajo se planteó el desarrollar un dispositivo detector de glucosa utilizando electrodos serigrafiados modificados con la enzima glucosa oxidasa a través de la saliva, esta enzima aportó especificidad a este sistema de medición y, por tal motivo se consideró como la mejor opción para ser usada en este biosensor. Para tal propósito, se generó un sistema electrónico compatible con los electrodos serigrafiados, se utilizó una configuración de circuito potencioestático, mismo que nos permitió corroborar su correcto funcionamiento gracias al electrodo auxiliar, mismo que inducía en todos los casos 7 mV de forma estable al medir en la salida del circuito. Una vez teniendo las muestras previamente procesadas, con el fin de contar con estas lo más limpias posible, se verifica la hipótesis planteada, se colocaron 30 muestras en 30 electrodos serigrafiados diferentes y se observó la diferencia voltajes al momento de colocar las muestras en el electrodo de trabajo (en este se encuentra la glucosa oxidasa inmovilizada), esto comprueba la actividad enzimática que se llevaba a cabo en el electrodo de trabajo, las mediciones describían una actividad ascendente, mismas que se estabilizaban en un “máximo” siendo los voltajes máximos medidos, estos se identificaron con respecto a la muestra. Con esta información se realizó una estimación matemática, misma que describe de forma aproximada el comportamiento de los datos obtenidos a través la medición de las muestras de saliva, este modelo matemático cuenta con un coeficiente R^2 de 0.6974. Es importante comentar, que desde un inicio se consideraron todas las dificultades que este proyecto tuvo, como lo es la complejidad del fluido salival para esta aplicación, esto por la mínima concentración de glucosa contenida y por todos los elementos constituyentes que contiene la saliva y que pudiesen interferir en la medición y, esto motivó a desarrollar una metodología lo más específica y eficiente posible para esta aplicación. Si bien la confiabilidad de los resultados fue de un 70% aproximadamente, es satisfactorio concluir que se pudo detectar la glucosa en saliva, al observar el crecimiento de voltaje al momento de colocar esa primera muestra de saliva en el primer electrodo serigrafiado conectado al sistema electrónico instrumentado.

5.1 Prospectivas

Una de las ideas para mejorar el dispositivo es contemplar el mejoramiento del diseño físico de los electrodos serigrafiados, con el fin de encontrar un diseño que garantice de manera simple colocar una muestra, en este caso la saliva, para cubrir el área en su totalidad y de forma homogénea del electrodo o zona de trabajo donde la enzima degradará la glucosa, y así optimizar el funcionamiento del sistema.

Otra consideración es el ampliar el tamaño de la muestra, esto con el fin de corroborar si el comportamiento de los datos, voltajes obtenidos por la medición de la glucosa contenida en la saliva a través de los electrodos serigrafiados, mantiene un comportamiento polinómico de cuarto orden. Para esto, es necesario hacer un ejercicio estadístico.

Por último, el estudio de la cinemática enzimática puede contemplar variables que enriquezcan esta aplicación, de esta forma puede ser un sistema más certero y poder mejorar la aproximación matemática, por consecuencia describir de mejor manera la cuantificación de la glucosa en saliva.

Referencias

- (IDF), International Diabetes Federation. (2009). *IDF Diabetes Atlas*. Montreal: IDF.
- (OMS), Organización Mundial de la Salud. (1999). *Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications*. Ginebra: (OMS).
- (OMS), Organización Mundial de la Salud. (2016). *Informe mundial sobre la diabetes*. OMS.
- (OMS), Organización Mundial de la Salud. (Octubre de 2017). *Obesidad y sobrepeso*. Obtenido de Nota descriptiva N°311: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
- Arredondo López, A. A., Barquera Cervera, S., Cisneros González, N., Ascencio Montiel, I. d., Encarnación Cruz, L. M., Larrañaga Flota, A. M., & Sakkal Morloy, G. (2016). *Asumiendo el control de la diabetes*. México: Fundación Midete.
- Barredo Ochoa, E. A. (2009). *Design and implementation of a CMOS interface for non-invasive optical biosensors*. (tesis de maestría). Monterrey: Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey.
- Clovis, D. (2003). Eyeglass glucometer. *2003 IEEE 29th Annual Proceedings of Bioengineering Conference* (pág. 2). Newark, NJ, USA, USA: IEEE.
- de Echeverri, M. T. (1995). La saliva: componentes función y patología. *Revista Estomatología*, 55-63.
- Edel, J. B., & Albrecht, T. (2013). *Engineered Nanopores for Bioanalytical Applications*. Oxford: Elsevier.
- Escalona Villalpando, R. A. (2014). *Desarrollo de bioánodos a partir de glucosa Oxidasa (GOx) para su aplicación en biomicroceldas que usan glucosa como combustible*. (tesis de maestría). Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro.
- Gallardo Hernández, A. G. (2011). *Controlador de glucosa en sangre*. (tesis doctoral). México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.
- González García, M. B., & Costa García, A. (2010). Los biosensores electroquímicos: herramientas de la analítica y del diagnóstico clínico.

MONOGRAFÍA XXX: Biomarcadores: Analítica, diagnóstico y terapéutica, 197-222.

- Guerrero de León, L. A. (2013). *Correlación entre la funcionalidad familiar y el control glucémico de la diabetes mellitus tipo 2 en el primer nivel de atención. (tesis especialidad)*. Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro.
- Guyton, A., & Hall, J. (2016). *Tratado de fisiología médica*. España: Elsevier.
- Hans, R., Phillip D., H., Ariyur S., K., & Claus-Chr. , H. (2005). *Diagnóstico y Monitorización de la Diabetes Mellitus desde el Laboratorio*. Madrid: Momento Médico Iberoamericana, s.l.
- Hinestroza, D. (2002). *Polinomios de interpolación y ajuste de curvas por mínimos cuadrados*. Cali: Universidad del Valle.
- Hubel, A., Aksan, A., Skubitz, A., Wendt, C., & Zhong, X. (2011). State of the Art in Preservation of Fluid Biospecimens. *BIOPRESERVATION AND BIOBANKING*, 237-244.
- Instituto de diagnóstico y referencia epidemiológicos; Dr. Manuel Martínez Báez. (2015). *Manual para la toma, envío y recepción de muestras para diagnóstico*. México: InDRE-DGE-Secretaría de Salud .
- Instituto Nacional de Salud Pública. (2013). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados por entidad federativa. Querétaro*. Cuernavaca: Instituto Nacional de Salud Pública.
- Lawand, K., Parihar, M., & N. Patil, S. (2015). Design and Development of Infrared LED Based Non Invasive Blood Glucometer. *2015 Annual IEEE India Conference (INDICON)* (pág. 6). New Delhi, India: IEEE.
- Lazo Mendoza, C. A. (2000). *Valores normales de glucosa en embarazadas derechohabientes de las UMF No. 2 y 14 del IMSS Querétaro, del 1° de enero al 31 de Diciembre de 1999. (tesis especialidad)*. Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro.
- Litinskaia, E. L., Bazaev, N. A., Pozhar, K. V., & Grinvald, V. M. (2017). Methods for improving accuracy of non-invasive blood glucose detection via optical glucometer. *2017 IEEE Conference of Russian Young Researchers in*

- Electrical and Electronic Engineering (EIConRus)* (pág. 3). St. Petersburg, Russia: IEEE.
- López Aparicio, J. (2018). *Diseño, desarrollo e implementación de un biosensor de glucosa miniaturizado e integración en una plataforma de medición dual para la diabetes mellitus tipo II. (tesis doctoral)*. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Marattukalam, F., & Sawant, D. (2017). Efficient Microstrip Ring Resonator Antennas for Glucose Measurement. *2017 International Conference on Wireless Communications, Signal Processing and Networking (WiSPNET)* (pág. 5). Chennai, India: IEEE.
- Michael, E., Colin , D., & Denis , O. (2012). *Saliva and oral health: an essential overview for the health professional*. Duns Tew, Reino Unido: Stephen Hancocks Limited.
- Ortega Ortiz De Apodaca, F. (2006). Biosensores y biochips: herramientas para el diagnóstico y la terapéutica. *Discurso presentado en el Real Instituto de España. Real Academia Nacional de Farmacia*. Madrid, España.
- Rivera Dommarco, J. Á., Hernández Ávila, M., Aguilar Salinas, C., Valdillo Ortega, F., & Murayama Rendón, C. (2013). *Obesidad en México: recomendaciones para un política de Estado*. México, D.F.: Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial.
- Secretaría de Salud | Instituto Nacional de Salud Pública. (2016). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 (ENSANUT MC 2016)*. Ciudad de México: Secretaría de Salud.
- Sosa Romero, M., & Galvis Franco, P. (2010). *Caracterización de la enzima glucosa oxidasa (GOX) (EC 1.1.3.4.) libre e inmovilizada en dos soportes (alginato de sodio y agarosa) para la producción de ácido glucónico*. Bogotá: Universidad Nacional Abierta y a Distancia .
- Téllez Giron, B. R. (2002). *Cuantificación de B-D-Glucosa en sueros glucosados comerciales empleando un biosensor bienzimático de GOD-HRP de tipo amperométrico (tesis de pregrado)*. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Texas Instruments . (2013). *AN-1798 Designing with Electro-Chemical Sensors*.
Dallas, Texas: Texas Instruments Incorporated.