

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**UTILIZZO DELL' EFFETTO FOTOACUSTICO
PER LA STIMA DEL LIVELLO DI GLUCOSIO NEL SANGUE**

TESI IN
LABORATORIO DI BIOINGEGNERIA

Relatore: Prof. Ing. Stefano Severi

Presentata da: Michele Beltrano

Correlatore: Dott. Enrico Ravagli

Sessione di Laurea
Anno Accademico 2015/2016

RINGRAZIAMENTI

I miei più sentiti ringraziamenti vanno al professor Stefano Severi per aver accettato l'impegno di relatore in questa tesi e per la sua continua disponibilità. Un sentito e sincero ringraziamento al dottor Enrico Ravagli, che, nelle vesti di correlatore, sin da subito ha offerto la sua professionalità ed esperienza in materia, aiutandomi con il suo apporto in parecchi approfondimenti e spiegazioni, essendo sempre disponibile ad ogni chiarimento e richiesta.

Infine un grazie ad entrambi per avermi fatto appassionare durante questa ricerca e analisi scientifica che sicuramente ha contribuito ad ampliare le mie conoscenze nell'ambito biomedico.

Ringrazio inoltre la mia famiglia per la sua vicinanza in questo percorso di studi da me affrontato.

INDICE

INTRODUZIONE	1
1. EFFETTO FOTOACUSTICO	2
1.1 PROPRIETÁ OTTICHE DEI TESSUTI BIOLOGICI	2
1.2 EQUAZIONE DEL CALORE ED EFFETTO FOTOACUSTICO	8
2. REVISIONE DELLA LETTERATURA: SET-UP E ASPETTI TECNICI	10
2.1 MECCANISMI DI FUNZIONAMENTO	10
2.2 LUNGHEZZA D'ONDA	12
2.3 FREQUENZA	13
2.4 DURATA DELL' IMPULSO (<i>PULSE DURATION</i>)	13
2.5 MATERIALE BIOLOGICO: IN-VITRO, IN-VIVO ED EX-VIVO	15
3. REVISIONE DELLA LETTERATURA: RISULTATI	16
4. DISCUSSIONE	20
BIBLIOGRAFIA	23
FONTI DELLE IMMAGINI	24

INTRODUZIONE

In questo elaborato di tesi è stato trattato l'effetto fotoacustico spiegandone le proprietà e le caratteristiche grazie alle quali è possibile svolgere alcune analisi specifiche nell'ambito biomedico. Fra i vari utilizzi che l'effetto fotoacustico offre, si è voluto studiare e approfondire quello che permette di stimare il livello di glucosio nel sangue. Tale tecnologia, seppur ancora in via di sviluppo, potrebbe fornire in futuro la possibilità di monitorare la glicemia di pazienti affetti da diabete.

Nel presente lavoro è stata evidenziata la componente ingegneristica e tecnica che riguarda i sistemi fotoacustici, viene spiegato il *set-up* ovvero quali sono gli elementi che lo compongono il sistema e a seguire quali sono le caratteristiche richieste dall'utilizzatore al fine di avere una stima il più precisa ed accurata possibile. Dai vari esperimenti e progetti presenti in letteratura scientifica, sono stati estrapolati e confrontati alcuni parametri fondamentali da cui la sorgente ottica è caratterizzata, quali la lunghezza d'onda, la frequenza e la durata dell'impulso. Sono stati descritti sia il procedimento di analisi attuato grazie a questo fenomeno sia le tipologie di materiale biologico su cui si può applicare. Infine l'elaborato termina con una discussione riguardo i risultati ottenuti dai vari esperimenti e progetti presi in considerazione, con annessi vantaggi e svantaggi che sono emersi nei vari lavori.

Capitolo 1: Effetto fotoacustico

In questo capitolo verrà descritto l'effetto fotoacustico ovvero il fenomeno per cui in un liquidocapace di assorbire determinate radiazioni ottiche s'instaurano onde acustiche, più in generale elastiche, qualora esso sia sottoposto a intervalli periodici a tali radiazioni; poiché l'effetto consegue ai periodici riscaldamenti cui dà luogo l'assorbimento della radiazione, esso è chiamato anche effetto foto-termoacustico [1].

1.1 Proprietà ottiche dei tessuti biologici

Per spiegare meglio tale fenomeno è importante capire il modo in cui la luce si propaga attraverso un mezzo e più precisamente attraverso un tessuto biologico. Il meccanismo che permette tutto ciò è chiarito dal concetto di assorbimento di onde elettromagnetiche appartenenti alla regione ottica dello spettro elettromagnetico. In particolar modo, per l'effetto fotoacustico è di particolare interesse la banda degli infrarossi, ed in particolar modo degli infrarossi più vicini al visibile, quelli corrispondenti alla lunghezza d'onda di 700-2000 micrometri, spesso chiamati con l'abbreviazione NIR cioè *NearInfraRed*.

L'intervallo di frequenze in cui agiscono i raggi infrarossi può essere associato alla frequenza naturale alla quale atomi e molecole oscilleranno in assenza di un campo magnetico applicato. Quando le radiazioni colpiscono il materiale, l'energia viene trasferita dal campo incidente al sistema e l'agitazione delle molecole aumenta notevolmente. Nonostante la durata dello stato di eccitamento duri circa 10^{-7} s, gli atomi o le molecole solitamente perdono la loro energia durante la collisione con le altre particelle coinvolte in 10^{-12} s, facendo così aumentare l'energia cinetica delle molecole circostanti che vi partecipano. Quindi, come verrà in seguito spiegato dall'equazione (1.1), l'energia cinetica associata al campo incidente è molto spesso dissipata come calore all'interno del mezzo [2].

Questo processo, noto come assorbimento e rappresentato anche in figura 1, ha come altro effetto la riduzione dell'intensità del fascio di luce attraversante il mezzo; una relazione tra l'assorbimento di luce in un mezzo, la sua natura chimica e lo spessore dello stesso mezzo attraversato viene descritta matematicamente nel 1760 dalla legge di Lambert-Bouger nota anche come legge di Lambert-Beer:

$$\frac{dI}{I} = \mu * dL \quad (1.1)$$

Dalla quale si può determinare la frazione di intensità luminosa assorbita da ogni strato infinitesimo dL del mezzo attraversato, tramite una costante μ che indica il coefficiente di assorbimento, il quale ha unità di misura inversa della lunghezza (ad esempio, mm^{-1}). Il coefficiente μ rappresenta anche la probabilità per unità di lunghezza che un fotone possa essere assorbito dal mezzo.

La stessa legge di Lambert-Beer può anche essere scritta come:

$$I = I_0 * e^{(-\mu * L)} \quad (1.2)$$

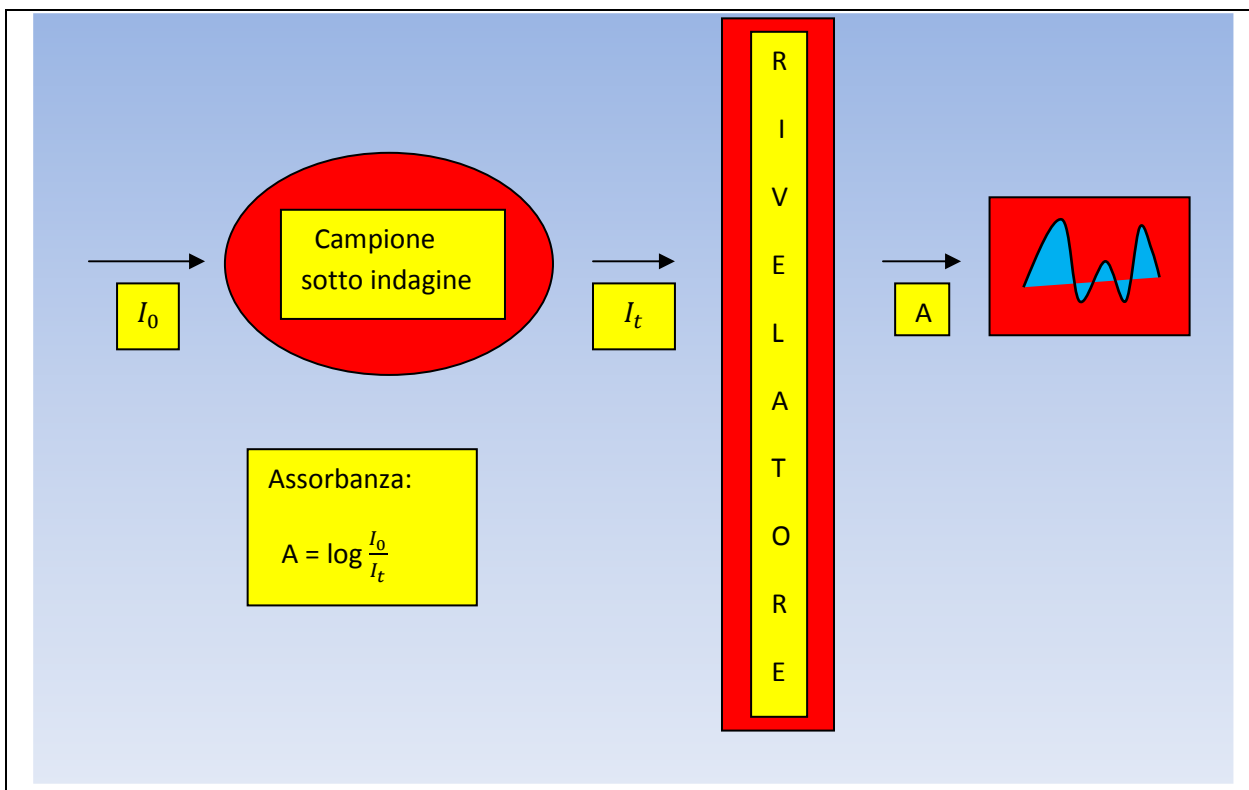


Fig.1: Schema a blocchi raffigurante il principio del metodo fotoacustico, tramite semplificazione della legge di Lambert-Beer: i segnali I_0 ed I_t sono i segnali ottici rispettivamente incidente e trasmesso, A indica l'assorbanza ottica ed è espressa come rapporto tra intensità di luce trasmessa e intensità della luce che attraversa il campione, espressa in logaritmo.

Nel meccanismo fotoacustico i fotoni assorbiti dal mezzo, che nel nostro caso è costituito da tessuto biologico, inducono un'espansione volumetrica e generano onde di pressione. Questo accade per via della frequenza degli impulsi ottici, che si succedono ad una frequenza sufficientemente alta da non consentire al tessuto di accumulare energia sotto forma di calore.

La forma della sorgente acustica dipende dalla distribuzione spaziale dei fotoni nel campione e dalle proprietà di assorbimento degli elementi che lo compongono[3].

All'interno dell'organismo umano l'acqua è la molecola che assorbe maggiormente le radiazioni; il sangue che invece è costituito da una componente fluida detta plasma e da una componente corpuscolare, che comprende eritrociti ricchi di emoglobina, leucociti (globuli bianchi) e piastrine, come si può osservare nella seguente figura 2, ha un alto coefficiente di assorbimento, ma inferiore rispetto alla molecola d'acqua e soprattutto presenta assorbimento solo nel *range* di lunghezze d'onda comprese fra 0,4 e 1 micrometri. In figura 2 si possono osservare i valori di assorbanza per diverse componenti biologiche a determinati intervalli di lunghezza d'onda.

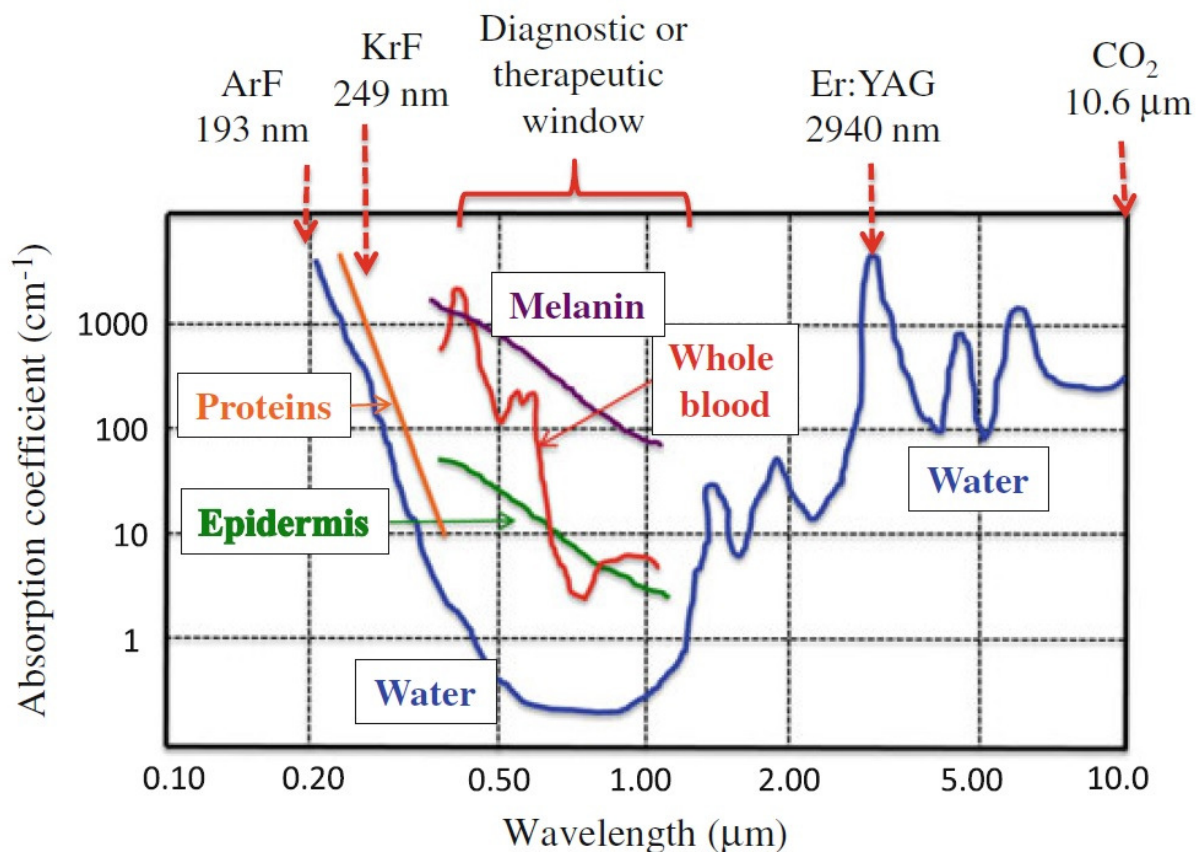


Fig.2: Sono raffigurati gli andamenti dei coefficienti di assorbimento espressi in cm^{-1} dell'acqua, del sangue intero, dell'epidermide, delle proteine e infine della melanina in funzione della lunghezza d'onda della sorgente nell'intervallo compreso tra 0,10 e 10 micrometri.

Oltre all'assorbanza, è presente un secondo fenomeno di tipo ottico, lo scattering (o diffusione). Lo scattering elastico della luce è un fenomeno che accade quando in un mezzo delle particelle cariche sono messe in un moto oscillatorio dal campo elettrico dell'onda incidente (fascio di luce di un laser o LED, per esempio). Il mezzo ripropaga almeno una parte della luce alla stessa frequenza dell'onda primaria a cui era stata messa in oscillazione.

In questo caso non si tratta quindi di assorbimento, ma si osserva una ridirezione della potenza luminosa verso determinate direzioni.

In un mezzo omogeneo e denso in cui la separazione fra le molecole è molto più piccolo della lunghezza d'onda del raggio incidente i vari atomi e molecole diffonderanno la radiazione in tutte le direzioni del mezzo.

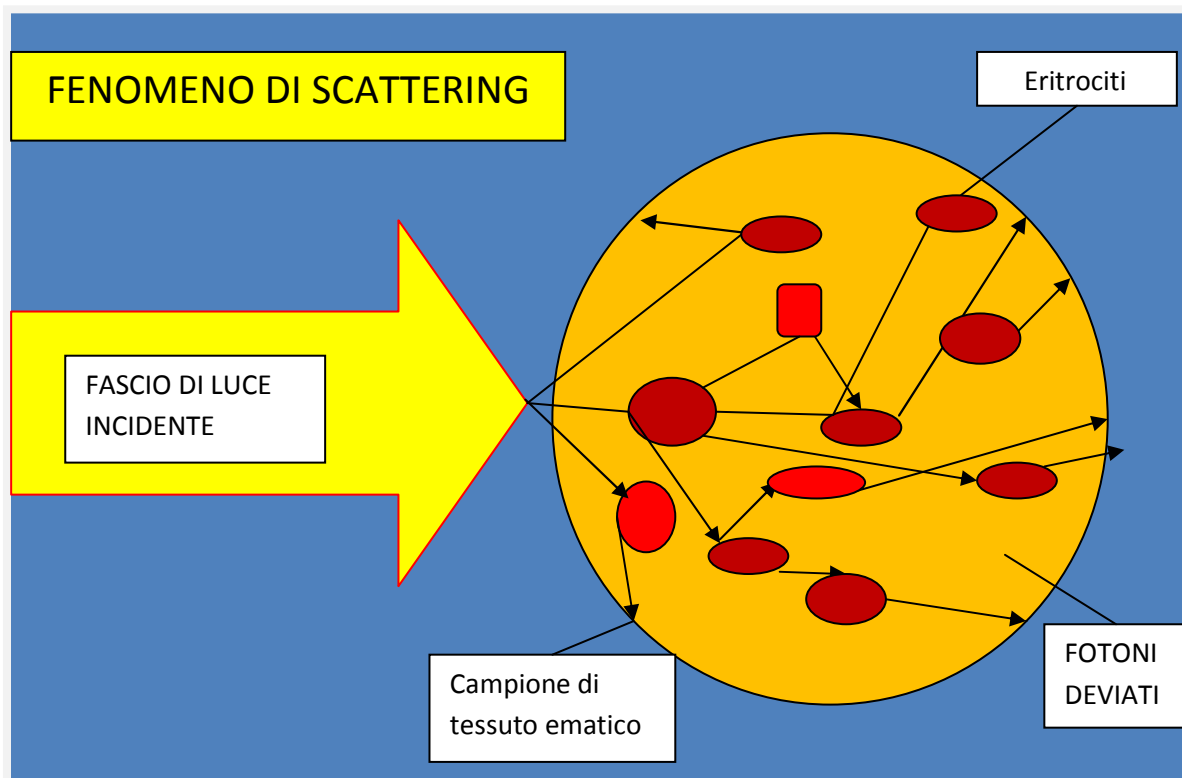


Fig.3: Rappresentazione del fenomeno di scattering per il quale un fascio di luce diretto lungo una precisa direzione, colpendo un campione di materiale (in questo caso sangue), viene diffuso o trasmesso in parte in tante nuove direzioni diverse. Un'altra frazione viene invece assorbita da molecole di sangue (per lo più della parte corpuscolata) e convertita in calore. Una parte della luce incidente viene infine riflessa.

Le onde luminose si propagano all'interno di un tessuto con velocità minore rispetto alla velocità della luce. Il rapporto fra le due velocità è dato dall'indice di rifrazione:

$$n = \frac{c}{v} \quad (1.3)$$

Dove c è la velocità della luce nel vuoto ($c = 3 \times 10^8$ m/s) e v è la velocità della luce nel mezzo.

Inoltre l'indice di rifrazione per un determinato mezzo cambia al variare della lunghezza d'onda della luce incidente, per cui questo fenomeno è dovuto alla dipendenza della frequenza della relativa fase variabile fra onda incidente e diffusa.

L'indice di rifrazione complesso è definito come:

$$N = n + ik \quad (1.4)$$

Dove n determina la velocità dell'onda e k indica l'assorbimento dell'onda che si propaga attraverso il mezzo.

Nell'equazione di Lambert-Beer(1.3) è presente il termine μ , coefficiente di attenuazione totale, meglio definito come:

$$\mu_{\text{tot}} = \mu_a + \mu_s \quad (1.5)$$

in cui μ_a indica il coefficiente di assorbimento e μ_s il coefficiente di scattering.

La grandezza reciproca di μ_{tot} rappresenta invece il cosiddetto percorso libero medio, e non è altro che la distanza che mediamente percorre un fotone nel tessuto senza eventi di scattering o assorbimento.

In un mezzo omogeneo i fotoni che viaggiano in una generica direzione possono essere deviati in una nuova direzione s' , con una determinata probabilità. Questa evenienza può essere descritta dal coefficiente differenziale di scattering $d\mu(s, s')$.

Integrando in seguito sull'intero angolo solido si ottiene il coefficiente di scattering totale μ_s :

$$\mu_s = \int_{4\pi} d\mu_s(s, s') ds' \quad (1.6)$$

Da questo integrale si può notare che il coefficiente di scattering è indipendente dalla direzione primaria s dei fotoni, ma varia solo al variare dell'angolo compreso tra le direzioni dei fotoni incidenti e deviati [2].

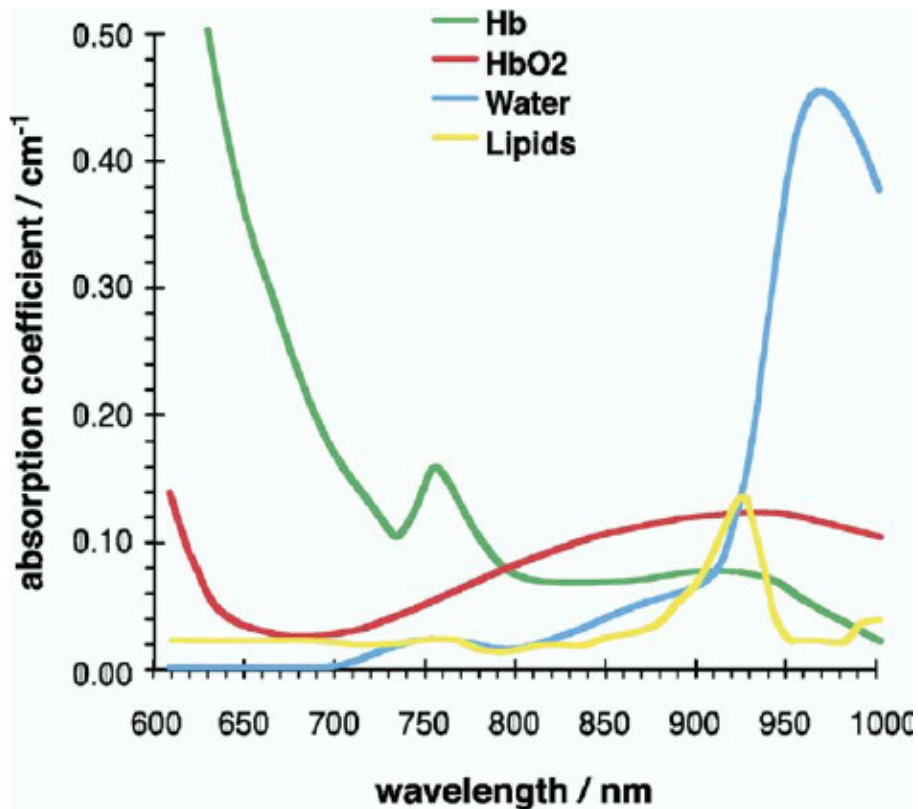


Fig. 4: Grafico relativo all'assorbimento di luce da parte di una soluzione lipidica, di acqua pura, emoglobina ed emoglobina ossigenata con relative curve di assorbimento tra gli assi x e y che rispettivamente indicano la lunghezza d'onda in nanometri e coefficiente di assorbimento espresso in cm^{-1} .

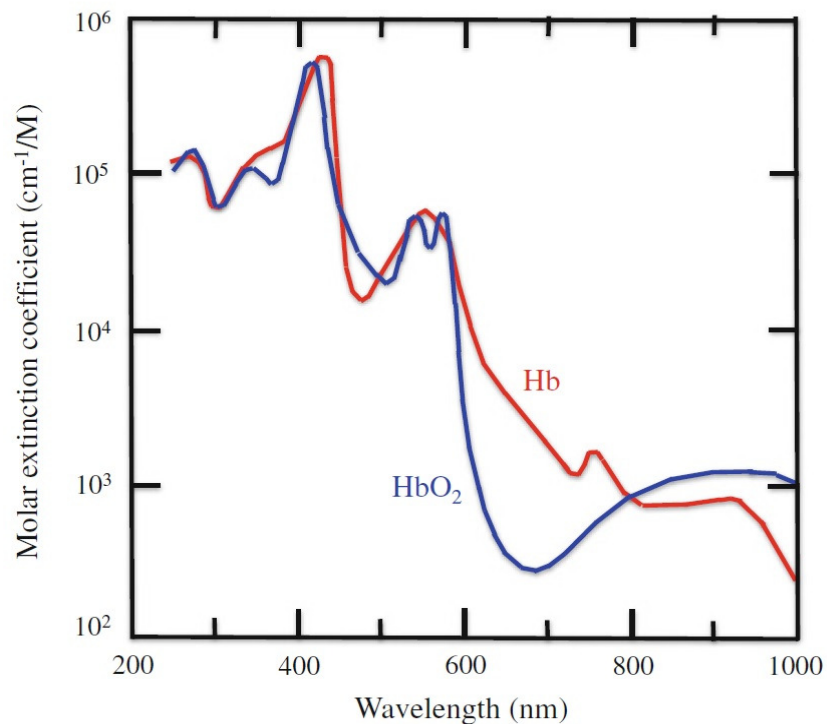


Fig.5: Spettro di assorbimento dell'emoglobina ossigenata e deossigenata in relazione alla lunghezza d'onda della sorgente.

1.2: Equazione del calore ed effetto foto acustico

La tecnica fotoacustica è basata sull'analisi delle onde acustiche generate dai fotoni che sono stati assorbiti dal campione. Tale assorbimento di fotoni aumenta l'energia del campione, da cui ne consegue un'espansione volumetrica e la creazione di onde di pressione.

Nel corso degli anni sono stati pubblicati svariati articoli scientifici su tale fenomeno. L'ampiezza del segnale fotoacustico è proporzionale alla densità di energia della sorgente. La forma della sorgente acustica è dipendente dalla distribuzione nello spazio dei fotoni nel campione e dalle proprietà di assorbimento e scattering dei materiali.

Per descrivere la formazione di onde fotoacustiche si enuncia la seguente equazione [3]:

$$\nabla^2 p - \frac{1}{v^2} \cdot \frac{\partial^2 p}{\partial t^2} = -\frac{\beta}{C_p} \cdot \frac{\partial H}{\partial t} \quad (1.7)$$

Dove:

- H è funzione del calore depositato nel mezzo per unità di volume e tempo
- p è la pressione acustica
- β è il coefficiente di espansione volumetrica
- C_p è il calore specifico a pressione costante
- v è la velocità delle onde acustiche all'interno del mezzo
- t indica la costante di tempo

L'ampiezza dell'onda può essere scritta come equazione:

$$P = k \cdot \frac{E \cdot \mu_a \cdot \beta \cdot v^n}{C_p \cdot r^m \cdot R^l} \quad (1.8)$$

Dove:

- E indica l'impulso energetico della sorgente irradiante
- μ_a è il coefficiente di assorbimento ottico
- R è una misura del raggio della sorgente acustica
- r è la distanza del rilevatore
- k è una costante di proporzionalità

- n è un termine legato alla durata dell'impulso laser
- m e l sono termini legati alla forma della sorgente acustica

Importante per l'effetto fotoacustico è l'evoluzione spazio-temporale della temperatura. Per esempio, l'evoluzione della temperatura lungo la sola direzione x è data dalla soluzione dell'equazione unidimensionale del calore [1], riportata di seguito (1.9) per un materiale omogeneo ed isotropo:

$$\frac{\partial T}{\partial t} = k \cdot T \cdot \rho \cdot c_p \cdot \frac{\partial^2 T}{\partial x^2} \quad (1.9)$$

dove kT è la conduttività termica, ρ la massa volumetrica e c_p il calore specifico a pressione costante del mezzo in cui ha luogo la conduzione termica.

Il rilevamento fotoacustico è sensibile infatti ai cambiamenti della temperatura del campione da studiare poiché i parametri termici e acustici sono funzione della temperatura.

Capitolo 2: Set-up e aspetti tecnici

In questo lavoro di tesi è stata effettuata una ricerca sulle pubblicazioni scientifiche riguardanti l'utilizzo dell'effetto fotoacustico per la stima della concentrazione di glucosio nel sangue. In particolar modo si è voluto cercare pubblicazioni recenti, quindi sono stati presi in considerazione articoli risalenti agli ultimi 5 anni per avere una maggiore avanguardia tecnologica. Sono comunque state incluse nella ricerca due pubblicazioni risalenti al decennio scorso, per via della loro importanza.

2.1 Meccanismi di funzionamento

Il fenomeno fotoacustico viene generato da una sorgente ottica, che genera un fascio di luce che andrà poi a colpire il campione sotto esame.

Quello appena descritto è il metodo fotoacustico classico, che ha però anche un'altra variante nota come OPBS, la cui sigla è l'acronimo di *Optical Power Balance Shift* [15]. Nel presente lavoro di tesi verrà trattato principalmente il metodo fotoacustico di tipo classico, con solo brevi riferimenti alla variante OPBS.

Sono stati presi in considerazione numerosi esperimenti all'interno dei più importanti lavori di ricerca riguardo l'utilizzo dei sistemi fotoacustici riguardanti la stima del livello di glucosio. Nei lavori studiati è emerso che come sorgente ottica sono utilizzati fondamentalmente due possibili apparecchi: laser da laboratorio e diodi laser. Nella scelta del tipo di laser sono da compiere valutazioni relative principalmente alla compattezza e al costo. La caratteristica fondamentale che viene richiesta al laser è quella di inviare una serie d'impulsi di una certa durata (*pulseduration*) ad una determinata frequenza.

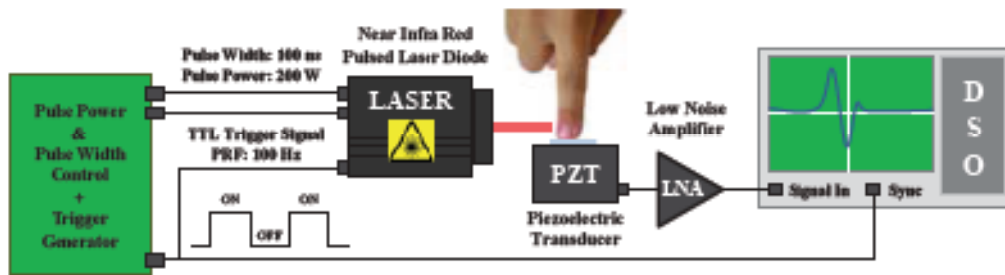


Fig. 6: Diagramma a blocchi illustrante l'apparato tecnico utilizzato per la misura fotoacustica. Si tratta di uno schema che mostra in maniera semplificata qual è il sistema di funzionamento generale di un set-up fotoacustico. Quello proposto è uno schema piuttosto generico, ma esistono diverse alternative di progetto.

Si è voluto classificare i vari lavori sperimentali presi in considerazione a seconda dei parametri ingegneristici più importanti per quanto riguarda il funzionamento della sorgente luminosa, che permette di poter dare inizio al procedimento fotoacustico. I tre parametri scelti sono la lunghezza d'onda della sorgente, la frequenza degli impulsi e la durata dei loro impulsi. Nella tabella seguente (Tab. 1) sono stati riportati i valori di tali parametri per gli articoli presi in considerazione. Alcune caselle sono state lasciate vuote per via di parametri non riportati dai relativi articoli. Gli articoli sono catalogati in base al nome del primo autore e all'anno, con l'aggiunta dei nomi di ulteriori autori in caso di ambiguità sul primo autore. La sezione Bibliografia fornisce i dettagli relativi ad ogni pubblicazione.

TABELLA 1 – PARAMETRI DI FUNZIONAMENTO DEI SISTEMI FOTOACUSTICI UTILIZZATI IN LETTERATURA PER LA STIMA DEL LIVELLO DI GLUCOSIO			
	LUNGHEZZA D'ONDA	FREQUENZA	PULSE DURATION
Kinnunen/Myllyla 2005	1064nm e 532nm	200Hz	10ns
Kinnunen/Zhao 2006	1064nm,532nm,906nm	200Hz	50ps e 50ns
Kulkarni 2010	905nm	90Hz	100ns
Kottmann 2012	9090-9900 nm	137Hz	3ms
Pleitez 2012	x	52khz	500ns
Pai 2015	905 e 1550nm	100Hz	100ns
Pai 2015b	905nm entrambe	100Hz	100ns
Sanki 2015	x	100Hz	X
Tanaka 2015	1382 fixed e 1610 swept	380kHz	X
Wadamori 2015	1550nm	5050Hz	X
Kottmann 2016	9090-9900 nm	100kHz	500ns
Tachibana 2016	1600nm	1000/1500Hz	X

2.2 Lunghezza d'onda

Gli esperimenti analizzati sono stati condotti tramite utilizzo di laser a varie lunghezze d'onda, il cui valore è espresso in nanometri (nm). Si osserva dalla tabella 1 che tale valore è all'interno di un *range* di valori individuato tra 532 e 1610 nm, ovvero appartenenti a quella fascia di valori circa corrispondente alla lunghezza d'onda dei NIR (*Near InfraRed*). Fanno eccezione solo i lavori di Kottman poiché si utilizza una lunghezza d'onda molto più grande, compresa tra i 9090nm e i 9900nm, corrispondente quindi alla banda MIR (*Middle InfraRed*). Entrando nello specifico, Kulkarni [4] e Pai[9-10] hanno utilizzato un laser alla frequenza di 905nm. Tachibana [5] e Wadamori [14] utilizzano una lunghezza d'onda tra le più alte tra quelle delle ricerche effettuate, rispettivamente a 1600 e 1610 nm.

Andando a leggere la tabella si può notare che alcuni esperimenti sono stati effettuati prima con una determinata lunghezza d'onda e successivamente con una diversa per verificare il diverso grado di assorbimento da parte delle molecole di glucosio colpite dai raggi luminosi dello stesso laser. A utilizzare questo metodo di cambio di lunghezza d'onda del raggio laser per vedere una differenza nella risposta del glucosio sono stati Kinnunen, Pai e Tanaka, il quale usa la particolare tecnica OPBS cioè un laser a una lunghezza d'onda fissa pari 1382nm e un altro oscillante tra i 1382nm e i 1610nm.

2.3 Frequenza

La serie di grandezze che sono elencate in tabella nella colonna riservata alla frequenza fa riferimento alla frequenza usata dal generatore di impulsi, ovvero è l'indice di ripetizione degli impulsi laser che sono inviati verso il campione da studiare. Questa grandezza che stiamo esaminando non ha nulla a che fare con la durata degli impulsi: in altre parole, il reciproco della frequenza $\frac{1}{f}$ è da considerarsi come intervallo temporale che intercorre fra un impulso e il successivo e chiaramente non come durata degli impulsi, che invece indica la durata del singolo impulso.

Per quanto riguarda i documenti presi in considerazione, coloro che hanno condotto questi esperimenti hanno usato frequenze d'onda parecchio differenti fra loro, anche di circa 3 ordini di grandezza. Infatti Pai[9-10] nel suo lavoro utilizza una frequenza di modulazione di 100 Hz mentre Kottmann [12] una pari a 100 KHz e questa varianza tra una prova e un'altra non è dovuta al fatto che c'è stata un'evoluzione nel tempo poiché il lavoro di Kottmann è addirittura antecedente. Questa differenza che si può facilmente notare anche dai risultati della tabella è dovuta quindi alla complessità e all'affidabilità del circuito responsabile per l'attuazione degli impulsi laser da indirizzare verso il campione.

2.4 Durata dell'impulso

Un componente fondamentale dell'impianto tecnico è il generatore d'impulsi (*pulse generator*) che è costituito da un circuito elettronico utilizzato, come indicato proprio dal

suo nome, per generare stimoli brevi e periodici. Tale circuito viene collegato in ingresso al laser, in modo da pilotare l'emissione di potenza ottica in maniera pulsata.

Dire semplicemente che il campione sotto esame viene colpito da un generico laser non è sufficiente poiché oltre che a specificare la lunghezza d'onda e la frequenza di lavoro è utile e indice di maggiore informazione indicare anche la durata dell'impulso. Questa si esprime chiaramente in unità di tempo, per cui in un sottomultiplo del secondo (solitamente nanosecondi o millisecondi).

Come spiega Kinnunen [6] è importantissimo che la durata del singolo impulso laser sia di brevissima durata, quantificato nell'ordine dei millisecondi o nanosecondi, infatti se la durata degli impulsi non è sufficientemente rapida, il rilascio di calore si verifica prima del termine dell'impulso e l'ampiezza delle onde di pressione indotte dal laser diminuirà rispetto al valore dato dall'equazione (1.8).

Per quanto riguarda gli esperimenti svolti nella ricerca di concentrazione di glucosio ematico tramite metodo fotoacustico, Kottmann [8] nel 2012 utilizza un laser con un impulso dalla durata pari a 3ms, egli stesso 4 anni più tardi in una successiva pubblicazione riduce la durata degli impulsi a 500 ns, la stessa che utilizza Pleitez [11] per le sue prove.

Kulkarni e Pai [4,9,10] utilizzano i loro impulsi laser a una durata di 100ns, mentre Kinnunen [6] riduce ancora di più questa durata facendo diventare il fascio dell'impulso laser ancora più preciso: infatti nel suo lavoro del 2005, essa è di 10 ns, un ordine di grandezza in meno. Sempre Kinnunen, nel suo lavoro del 2006, investiga la differenza tra le *performance* di un impulso laser dell'ordine del nano o pico secondo nell'indagare i cambiamenti nelle proprietà ottiche del campione sott'osservazione. In tale lavoro è stato settato prima un sistema di misurazione con impulsi laser della durata di 10 ns e in seguito altri risultati sono stati ottenuti passando ad una durata dell'impulso di 50 ps.

Una volta prodotto, il segnale fotoacustico viene ricevuto da un trasduttore ultrasonico. Possono essere utilizzati vari tipi di rilevatori acustici per la rivelazione del segnale fotoacustico, ma in ambito di *sensing* biomedicale i più indicati e comuni sono i trasduttori piezoelettrici e i rilevatori ottici *non-contact*. La scelta del rilevatore si basa fondamentalmente su fattori come la sensibilità (più è alta, migliori saranno le prestazioni), il tempo di risposta (il più veloce possibile, per acquisire i dati quasi in tempo reale), larghezza

di banda, rapporto segnale-rumore e dimensioni. Tali parametri vanno valutati in base all'applicazione, da laboratorio o portatile, per cui il sistema è utilizzato.

2.5 Materiale biologico: in-vivo, in-vitro ed ex-vivo

Negli articoli analizzati, l'investigazione sulla concentrazione di glucosio nel sangue viene eseguita sia direttamente sul paziente (in-vivo), sia su un campione contenente sangue (in-vitro) o soluzione Intralipid, che consiste in un'emulsione difosfolipidi miscelati ad acqua con caratteristiche ottiche che permettono di simulare lo scattering che nel sangue viene causato dai globuli rossi.

L'impedenza acustica della soluzione Intralipid basse concentrazioni è circa uguale a quella dell'acqua; le micelle di fosfolipidi hanno una forma sferica e la loro grandezza varia tra i 25 e i 675 nm [6].

Il sangue è un mezzo biologico molto complicato per l'indagine foto acustica in quanto le sue proprietà ottiche dipendono anche dalla saturazione dell'ossigeno e dall'ematocrito ($\frac{\text{parte corpuscolata}}{\text{volume totale}}$) oltre che dalla concentrazione di glucosio.

In alcune pubblicazioni l'elemento d'indagine è un pezzo di tessuto biologico estrapolato e mantenuto in condizioni di vita dentro una camera speciale (indagine ex-vivo). Le pubblicazioni analizzate in questa tesi non riportano però esperimenti ex-vivo, ma solo in-vivo, in-vitro e con fluido sostitutivo del sangue.

Capitolo 3: Revisione della letteratura: risultati

NOME	RISULTATI	FORMATO DI PRESENTAZIONE RISULTATI
Kinnunen/Myllyla 2005	1.35%/500mg/dL	Sensibilità
Kinnunen/Zhao 2006	21,34%/5000mg/dL	Sensibilità
Kottmann2012	100mg/dL	Sensibilità
Pleitez 2012	7mg/dL	Accuratezza
Pai 2015	13,90mg/dL	Differenza media in valore assoluto
Pai 2015b	23,75mg/dL	Differenza media in valore assoluto
Kottmann 2016	30mg/dL	Sensibilità
Tachibana 2016	1%	Limite di rilevazione

Nella tabella sono stati collocati dati nella modalità in cui sono stati riportata da ogni articolo come risultato finale, cioè come dato conclusivo sulla *performance* del sistema.

Il risultato ottenuto dalla misurazione, qualsiasi sia lo strumento o le apparecchiature utilizzate, non è mai un valore numerico di precisione e accuratezza infinita. Ogni strumento infatti è caratterizzato da un'incertezza sulla misura, per cui non in grado di fornire informazioni su variazioni della grandezza presa in esame inferiori a Δx . Per convenzione, la misura di una grandezza fisica viene generalmente espressa nella forma:

$$X = X_0 + \delta X$$

Dove X_0 è un valore centrale che individua la posizione dell'intervallo di valori sull'asse X e δX è l'incertezza.

L'ingegnere dopo aver portato a termine un esperimento o un progetto riguardante uno strumento di misurazione non deve dunque dimenticare di fare la stima dell'errore, calcolabile come differenza fra il valore medio campionario e il valore reale, e noto come accuratezza.

Negli esperimenti che abbiamo preso in considerazione, i risultati vengono espressi in modi diversi fra di loro. L'accuratezza in alcuni casi è espressa in mg/dL, per quanto riguarda la differenza tra il valore rilevato sperimentalmente sul campione e il valore di riferimento

misurato tramite gold standard. In alcuni casi oltre al valore di accuratezza assoluto vi è anche quello relativo espresso in percentuale.

Il caso di Pai [10] è esplicativo in questo caso poiché viene espresso sia il valore assoluto corrispondente a 23,75 mg/dL e quello relativo pari a 18,03%.

Tachibana [5] si distingue per quanto riguarda la maniera di esplicitare l'accuratezza poiché esprime il risultato del suo esperimento in termini di soglia limite di rilevamento per la cella fotoacustica sviluppata, che corrisponde all'1%, assumendo che il limite di rilevamento corrisponda in generale ad un SNR (*signal-noise-ratio*) uguale a 1.

Confrontando tra loro le accuratezze estrapolate dai contenuti dei vari articoli presi sotto esame, essi risultano essere nell'ordine delle decine di mg/dL: Pleitez [11] nel 2012 otteneva un ottimo risultato avendo un margine di errore di soli 7mg/dL, mentre quello ad avere un'accuratezza più bassa è l'esperimento del 2012 di Kottmann [8], con un'incertezza pari a 100mg/dL.

Kottmann [8] nel suo esperimento del 2012 ha effettuato prove con un campione di epidermide posto a contatto con soluzioni acquose (diffusione passiva) aventi una concentrazione di glucosio prima pari a 0,1 g/dL e poi a 10 g/dL. Nel suo caso si ha un rapporto segnale-rumore (SNR) pari a un'unità e l'accuratezza è di 100 mg/dL.

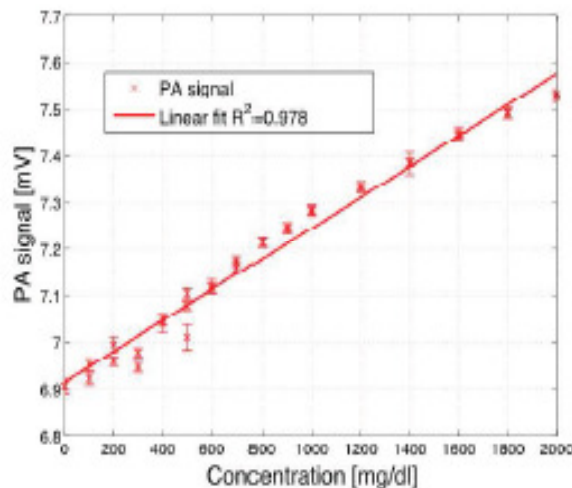


Fig. 7: Il grafico spiega la dipendenza del segnale fotoacustico dalla concentrazione di glucosio in un campione di epidermide umana per basse concentrazioni comprese tra 0 e 2000 mg/dL.

Si può notare dal grafico che è presente uno scostamento dell'effettivo segnale fotoacustico ricevuto (indicato in figura con una "x") dalla regressione lineare indicata con la linea rossa. L'autore specifica che l'errore non è causato solo dalla scarsa accuratezza del dispositivo fotoacustico, ma è dovuto principalmente all'instabilità meccanica dell'epidermide. Pai [9] conduce il suo esperimento esaminando il livello di glicemia in-vivo simultaneamente su un gruppo di 30 pazienti con un totale di 196 misurazioni: è stata ottenuta una differenza assoluta principale pari a 13.90mg/dL. In tale pubblicazione è riportata una crescita non lineare del segnale fotoacustico con una zona di saturazione in prossimità di alte concentrazioni di glucosio, a partire da 400 mg/dL.

Analizzando sempre un esperimento di Pai [10], ma focalizzato sul monitoraggio continuo non invasivo di glucosio, si osserva un risultato diverso da quello visto precedentemente poiché l'accuratezza in questa seconda presentazione è pari al 23,75mg/dL.

Nel caso di analisi su campione contenente esclusivamente sangue un esempio è dato da Miguel Plaitez [11], il quale esalta il risultato del proprio metodo spettroscopico in seguito all'ottenimento di una precisione pari a 7 mg/dL [11].

Kinnunen [6] compie la stessa tipologia di esperimento su campione di soluzione diversi misurando il segnale foto acustico a 1064 nm: aggiungendo in un campione contenente sangue di maiale una quantità di glucosio di 500 mg/dL, si nota un aumento dell'ampiezza del segnale picco a picco di almeno 11,4% mentre utilizzando soluzione all'1% di Intralipid aggiungendo la stessa quantità di glucosio la variazione equivale all'1,35%. Impostando la lunghezza d'onda del laser a 532 nm, ma mantenendo la stessa aggiunta di 500 mg/dL i dati finali sono diversi da quelli appena descritti infatti nel campione di sangue come risposta si ha un aumento del 6,0% dell'ampiezza del segnale picco a picco [6].

In un altro lavoro Kinnunen[3] si basa sul monitoraggio della glicemia in due campioni di soluzione Intralipid al 1% e al 2%. Lavorando con un laser a una lunghezza d'onda di 1064 nm aggiungendo una quantità di 5000mg/dL nella soluzione al 1% si è ottenuta una variazione del valore dell'ampiezza picco a picco del segnale fotoacustico pari al 21,34% mentre la variazione nella soluzione al 2% risultava pari al 15,77%.

Kottmann [12] nel 2016 conduce un test di rilevamento della concentrazione di glucosio assunto oralmente sempre valutando dei campioni prima costituiti da una soluzione acquosa

di glucosio e poi un piccolo campione di pelle. I limiti di sensibilità variano a causa della natura del campione trattato: per quanto riguarda la soluzione acquosa di glucosio hanno ottenuto come risultato 30 mg/dL mentre per il campione di epidermide il limite aumenta a 100 mg/dL principalmente a causa dell'instabilità meccanica degli strati di pelle.

Capitolo 4: Discussione e Conclusioni

La varietà di esperimenti studiati ha messo in evidenza una molteplicità di varianti nell'utilizzo della tecnica del fotoacustico per la stima dei livelli di concentrazione di glucosio nel sangue. Si è inoltre notato, studiando nel dettaglio i vari parametri tecnici come la durata dell'impulso, frequenza e soprattutto lunghezza d'onda del diodo laser, che i risultati dell'applicazione cambiano notevolmente in termini di sensibilità e precisione. Come già citato in precedenza nei risultati un buon accorgimento può essere quello di condurre lo stesso esperimento sul medesimo campione di riferimento variando la lunghezza d'onda: i valori che ricorrono più spesso sono quelli di 1064 nm e 532 nm. Nell'esperimento di Kinnunen [3] la lunghezza d'onda posta a 1064 nm permette di osservare in maniera chiara il segnale foto acustico anche in soluzione acquosa, cosa che non può avvenire invece a 532 nm, lunghezza d'onda alla quale il segnale è più debole. Si può quindi scartare 532nm come lunghezza d'onda di interesse.

Questo tipo di scelta non può essere generalizzata a ogni tipo di sostanza costituente il campione, infatti se si prende in esame una soluzione all'1% Intralipid il segnale foto acustico prodotto è molto più debole a causa dell'assorbanza ottica rispetto ad altri tessuti, come ad esempio il sangue. Quindi possiamo trarre una conclusione: che la soluzione Intralipid ha come aspetto molto positivo la presenza di agenti scatteranti, il che la rende utile per alcuni tipi di esperimenti ottici con fluidi sostitutivi del sangue, ma poiché presenta rispetto al sangue una diversa assorbanza, può non essere ottimale per prove di tipo fotoacustico. È inoltre fondamentale conoscere la concentrazione della soluzione Intralipid poiché essa implica una variazione dell'ampiezza picco a picco del segnale fotoacustico rilevato. Nell'esperimento di Kinnunen e Zhao [3] è risultato che in seguito alla medesima aggiunta di 5000 mg/dL la soluzione al 2% Intralipid riportava una variazione di glicemia solo del 15,77% mentre quella all'1% risulta essere addirittura al 21,34%, una variazione ben più corposa.

Con un campione contenente esclusivamente sangue si sono ottenuti ottimi risultati in termini di precisione nella stima del livello di glucosio, per esempio nell'esperimento di Kinnunen e Myllyla [6] alla lunghezza d'onda di 1064 nm con aggiunta di 880 mg/dL si otteneva una variazione percentuale pari al 16,7%.

La novità principale e l'ottima funzionalità della tecnica fotoacustica consistono nell'assoluta non invasività e altissima tempestività dell'analisi in-vivo per la stima della glicemia, di speciale importanza per alcune categorie di soggetti, come i malati di diabete. La rilevazione del segnale fotoacustico permette di ottenere informazioni in maniera quasi istantanea, di conseguenza ha importanti implicazioni per il monitoraggio continuo della glicemia di pazienti diabetici durante la loro vita quotidiana. Questa tecnica è assolutamente non invasiva e per niente dolorosa, non si ha a che fare con nessun tipo di ago o di prelievo, quindi può risultare anche molto conveniente.

Come in ogni genere di tecnologia bisogna far fronte a degli svantaggi, che in questo caso sono legati almeno in parte al rilevamento del segnale fotoacustico da parte del piezoelettrico. I cambiamenti nell'accoppiamento tra il campione sotto analisi e il trasduttore possono causare dei disturbi che portano all'alterazione dei risultati, i quali purtroppo possono essere anche modificati dal rumore elettromagnetico generato durante il processo di rilevazione. Per far fronte a questo tipo di problematiche è stato aumentato di recente l'utilizzo di rilevatori ultrasonici di tipo ottico.

La ricerca e lo sviluppo dell'effetto fotoacustico hanno svolto un vero passo in avanti dal punto di vista tecnologico, ma prima di poterla trasformare in una tecnologia commerciale sarà necessario ottimizzare le prestazioni soprattutto in termini di accuratezza, specificità e ripetibilità affinché questo tipo di sistema possa trovare applicazione pratica ed essere infine commercializzato.

Per quanto riguarda l'accuratezza bisogna tenere presente che in una persona in condizioni normali a digiuno il livello di glicemia oscilla intorno ai 70-100 mg/dL e si porta fino a circa un massimo di 150 mg/dL dopo un pasto (maggiore per i diabetici), quindi il range delle variazioni da rilevare è minore 100 mg/dL. Considerando che molti degli esperimenti riportati in letteratura hanno un valore di accuratezza vicino ai 20-30 mg/dL, ancora molto basso, si deve intervenire per ridurre questo parametro, per esempio ad un valore prossimo al 5% del *range* di massima variazione. Dai vari esperimenti studiati evince che in seguito all'assunzione di glucosio il segnale fotoacustico ha dei cambiamenti, ma purtroppo non si conosce per certo quale meccanismo fisiologico funge da tramite per questo processo, per cui si potrebbero avere delle variazioni del segnale fotoacustico anche in seguito, ad esempio, all'ingerimento di cibi salati, che causano un incremento nella concentrazione di sodio nel soggetto, oppure come conseguenza del diverso livello d'idratazione. Si potrebbero

quindi osservare dei cambiamenti che non sono esclusivamente associabili alla variazione di glucosio. Un possibile esperimento per la verifica della specificità potrebbe essere per esempio il contemporaneo aumento di glucosio e di altre sostanze nell'organismo con successiva valutazione del segnale fotoacustico e confronto tra quello rilevato in seguito ad aumento esclusivo di glucosio e quello rilevato in seguito a diverse variazioni. Un altro fattore d'incertezza da quantificare, attinente al caso di analisi in-vivo, riguarda il grado di ripetibilità delle misure effettuate su paziente.

BIBLIOGRAFIA

- [1]: Massimo Marinelli e Ugo Zammit, Enciclopedia delle Scienze fisiche, Treccani
- [2]: V. Hollis, M. Sci, Non-Invasive Monitoring of Brain Tissue Temperature by Near-Infrared Spectroscopy, Thesis, Chapter 2, Department of Medical Physics and Bioengineering, University College London
- [3]: M. Kinnunen, Z. Zhao, and R. Myllylä, Glucose-Induced Changes in the Optical Properties of Intralipid, *Optics and Spectroscopy*, 2006, Vol. 101, No. 1, pp. 54–59
- [4]: O. Kulkarni, A Feasibility Study on Noninvasive Blood Glucose Measurement Using Photoacoustic Method, Department of Electronics and Electrical Communication Engineering, Indian Institute of Technology, IEEE, 2010
- [5]: Tachibana, Development of a High-Sensitivity and Portable Cell Using Helmholtz Resonance for Noninvasive Blood Glucose Level Measurement Based on Photoacoustic Spectroscopy, IEEE, 2016
- [6]: M. Kinnunen, R. Myllylä, Effect of glucose on photoacoustic signals at the wavelengths of 1064 and 532 nm in pig blood and intralipid, IOP Publishing, 2005
- [7]: Y. Tanaka, Noninvasive Measurement of Aqueous Glucose Solution at Physiologically Relevant Blood Concentration Levels with Differential Continuous-Wave Laser Photoacoustic Technique, IEEE, 2015
- [8]: J. Kottman, Glucose sensing in human epidermis using mid-infrared photoacoustic detection, *Biomedical optic express*, vol.3, num. 4, 2012
- [9]: P. Pai, NIR Photoacoustic Spectroscopy for Non-Invasive Glucose Measurement, IEEE, 2015
- [10]: P. Pai, A photoacoustics based continuous non-invasive blood glucose monitoring system, IEEE, 2015
- [11]: M. Pleitez, In vivo noninvasive monitoring of glucose concentration in human epidermis by Mid-Infrared pulsed photoacoustic spectroscopy, American Chemical Society, 2013
- [12]: J. Kottmann, Mid-Infrared photoacoustic detection of glucose in human skin: towards Non-Invasive diagnostics, *Sensors*, 2016
- [13]: P. Sanki, VLSI implementation of embedded back-end for photo-acoustic based continuous noninvasive blood glucose monitoring system, IEEE, 2015
- [14]: Wadamori, Behavior of long-period measurements using a small-sized photoacoustic cell for aqueous glucose monitoring, IEEE, 2015

[15]: S. Camou, Phase Difference Optimization of Dual-Wavelength Excitation for the CW-Photoacoustic-Based Noninvasive and Selective Investigation of Aqueous Solutions of Glucose, ISSN, 2015

FONTI DELLE IMMAGINI

Fig. 1: Immagine propria

Fig. 2: Biophotonics - Concepts to Applications - Gerd Keiser - Springer, 2016 - ISBN 978-981-10-0943-3

Fig. 3: Immagine propria

Fig. 4: Sito Web ResearchGate: https://www.researchgate.net/figure/23797391_fig7

Fig. 5: Biophotonics - Concepts to Applications - Gerd Keiser - Springer, 2016- ISBN 978-981-10-0943-3

Fig. 6: P. Pai, NIR Photoacoustic Spectroscopy for Non-Invasive Glucose Measurement, IEEE, 2015

Fig. 7: J. Kottman, Glucose sensing in human epidermis using mid-infrared photoacoustic detection, Biomedical optic express, vol.3, num. 4, 2012