

EL DENSITOMETRO CON DIODO LASER: SOLUCION TECNOLOGICA

Pedro J. Larrea Cox, Rolando Miranda Veitia, Danny Rodríguez Mederos, René Y. Díaz Martínez, Margarita Cobas Aranda, Humberto Fernández Lechuga y Aurora C. Escobar Uña
Centro de Desarrollo de Equipos e Instrumentos Científicos (CEDEIC), Cuba

RESUMEN

Luego de analizar varios modelos de densitómetros existentes en Cuba, convencionales o no (láseres), se presenta una nueva versión del equipo que incluye un diodo láser visible como fuente de luz, así como un sistema microcontrolador integrado para automatizar las operaciones y garantizar un correcto funcionamiento. Ello permitió optimizar el diseño, en aras de lograr una mejor solución tecnológica, reduciéndose las dimensiones y el costo total, comparándolo con equipos similares.

ABSTRACT

After the analysis of several models of densitometers that there are in Cuba, conventional or not, a new version of the equipment, which includes as light source a visible diode laser, as well as an integrated microcontroller system for automatization of the operations and to assure an adequate performance, is presented. This let to improve the design, in order to achieve a better technological solution, minimizing the total cost and dimensions, compared with similar instruments.

1. INTRODUCCION

Los densitómetros se emplean para realizar determinaciones cualitativas y cuantitativas de diferentes sustancias (ADN, proteínas, ácidos grasos, colorantes, etc.), basados en mediciones de absorción óptica (OD) en substratos que transmitan parte de la radiación luminosa que sobre ellos incide. Entre estos medios se encuentran: separaciones electroforéticas (geles de agarosa, almidón y poliácridamida, láminas de acetato de celulosa), placas de rayos X, difractogramas, fotografías, diapositivas y placas de cromatografía de capa delgada (TLC).

Los densitómetros existentes en el país son insuficientes. Muchos están obsoletos y discontinuados, además de ser comercializados por firmas de países desarrollados. Los modelos actuales tienen un precio elevado, siendo realmente imposible renovar los equipos instalados.

El láser de He-Ne ha sido una fuente de luz adecuada en densitometría por transmisión. Debido a la posibilidad de emplear diodos láseres que emiten en la región visible del espectro, junto a la racionalización de componentes ópticas, electrónicas y mecánicas, se logró diseñar un nuevo modelo de densitómetro, con mejores características técnicas, y menores dimensiones y costo que los precedentes, sin comprometer los parámetros logrados con la tecnología existente.

2. DENSITOMETROS CONVENCIONALES

Los primeros aparatos de este tipo fueron contruidos con lámparas halógenas o de tungsteno, y diferentes filtros para seleccionar la longitud de onda (λ) necesaria para los análisis.

Por lo general, las firmas productoras conservan esas líneas de equipos, debido fundamentalmente a:

- La posibilidad de seleccionar la λ adecuada, aún cuando no se alcanza mayor sensibilidad que 3,0 OD; ni mejor resolución que 100 μm .
- La estabilidad del producto y su prestigio dificultan el cambio a una nueva variante.

Los modelos existentes en la mayoría de los laboratorios del país (ver Tabla I-A) están obsoletos, por lo que no tienen garantizada la reparación ni el mantenimiento, o simplemente están fuera de servicio.

Tabla I-A. Algunos densitómetros convencionales existentes en el país.

Marca	País	Intervalo de OD	Resolución [μm]
Digiscreen-M Scanner, Gelman Sc.	USA	0 - 1	-
Desaga Quick Scan, Helena Labs.	USA	0 - 3	150
Hoefer GS 300	USA	0 - 2.5	-
Kayagaki ADC-20EX	Japón	0 - 2	300
CAMAG TLC Scanner II	Suiza	0 - 3	100

Su precio oscila entre 10 000 y 40 000 USD, por lo que la introducción está muy limitada.

3. DENSITOMETROS LASERES

El láser produce un haz de luz adecuado para obtener elevada resolución. Por su gran intensidad, puede penetrar muestras densamente coloreadas, con suficiente luz como para hacer mediciones precisas [1]. La incorporación del láser permitió mejorar significativamente las características de los equipos, fundamentalmente: sensibilidad y resolución.

El precio de esos equipos oscila entre 40 000 y 80 000 USD. Aunque en el país existen varios modelos suecos (ver Tabla I-B), estos se encuentran en laboratorios de los principales centros de investigación de perfil biomédico. Su elevado precio limita la extensión a otros laboratorios.

Tabla I-B. Densitómetros láseres existentes en el país.

Marca	País	Intervalo de OD	Resolución [μm]
LKB 2202 UltraScan	Suecia	0 - 4	50
UltraScan XL, Pharmacia	Suecia	0 - 4	40
DENSYSTEM LD-01, CEDEIC	Cuba	0 - 4	50
DENSYSTEM LD-02, CEDEIC	Cuba	0 - 4	50

Ahora los diodos láseres son rivales de los láseres gaseosos, pues son mucho más pequeños, consumen menos potencia, son extremadamente confiables y capaces de operar cientos de miles de horas sin problemas, acoplándose correctamente con otros dispositivos electrónicos.

Hasta el momento no se conoce ningún densitómetro comercial con diodo láser. Debido a la aparición de diodos láseres con λ dentro de la región visible del espectro, se propone su empleo como fuentes de luz en densitometría por transmisión. Combinándolo con componentes electro-ópticas de avanzada, se dará el mejor funcionamiento a un equipo.

4. FUENTE DE LUZ

Al surgir diodos láseres comerciales [2] con λ próximas a los 632,8 nm del He-Ne (Tabla II), y perfiles de intensidad pseudo-Gaussianos, análogos al modo TEM₀₀ de muchos láseres gaseosos, se vio la posibilidad de utilizarlos en la densitometría por transmisión.

Tabla II. Características comparativas entre un láser de He-Ne y un diodo láser análogo.

Características	Láser de He-Ne	Diodo Láser visible
Longitud de onda (λ) [nm]	632.8	≈ 670
Ancho de banda del espectro de emisión [kHz]	1	$\approx 20\ 000^{(a)}$
Astigmatismo típico [μm]	-	5-15 ^(b)
Divergencia (mrad)	≈ 1	$\approx 10^2^{(c)}$
Consumo [W]	≈ 10	≤ 1
Eficiencia total [%]	≈ 0.1	> 20
Tiempo de vida [h]	20 000	$> 50\ 000^{(d)}$

- (a) El ancho de banda corresponde a un intervalo de $\pm 10\ \text{nm}$, similar a la mayoría de los filtros en los densitómetros convencionales de luz blanca
- (b) El astigmatismo se corrige con un montaje óptico adecuado [3], usando ventanas ópticas delgadas o, como en este caso, lentes cilíndricas tenues.
- (c) Aunque puede variar de un láser a otro, la "gran divergencia" (en lo que a láser concierne) se reduce hasta el orden de 1 mrad, con un sistema óptico simple.
- (d) Son comunes tiempos de vida que excedan las 50 000 h. En general, se duplica por cada reducción de 10 °C, y viceversa, por lo que se emplea disipador de calor.

5. PRINCIPIO DE MEDICION

La luz emitida por el módulo del diodo láser (Figura 1) es enfocada con una lente cilíndrica,

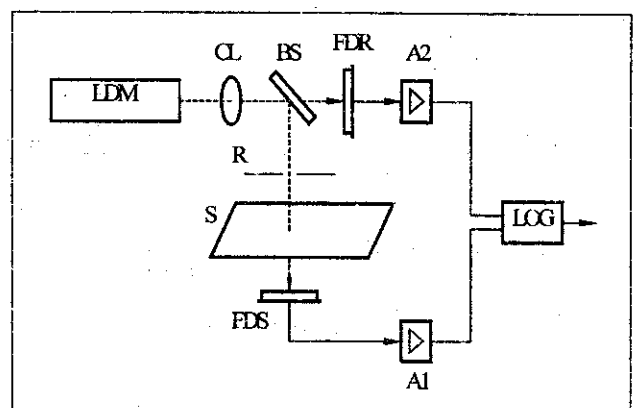


Figura 1. Principio de medición del densitómetro automático con diodo láser.

LDM: módulo del diodo láser,
 CL: lente cilíndrica, BS: semiespejo,
 FDR: fotodiodo de referencia, R: rendija,
 S: portamuestras, FDS: fotodiodo de medición; A1, A2: amplificadores;
 LOG: amplificador logarítmico.

generándose un haz en forma de línea. Este haz incide sobre un semiespejo, transmitiéndose una parte hacia un fotodiodo de referencia (FDR), cuya función es monitorear continuamente la salida del láser y producir una señal que compense las variaciones en la intensidad de la luz.

La otra parte del haz es reflejada hacia la muestra (S), después de atravesar una rendija que evita el paso de luz indeseada. La porción de luz que atraviesa S incide sobre el fotodiodo de medición (FDS).

Las fotocorrientes de FDS y FDR se suministran, respectivamente, a los amplificadores A1 y A2, que las convierten en voltajes y alimentan a un amplificador logarítmico diferencial, cuya señal es linealmente proporcional a la absorción de la muestra.

En el módulo del diodo láser se incluyen: su fuente de alimentación, el diodo y la óptica asociada. Además, el FDR garantiza la obtención de fondos de absorción muy estables.

6. BLOQUES ELECTRONICOS

Funcionalmente, el sistema electrónico [4] se divide en los siguientes bloques (Figura 2):

Control y procesamiento. Dirige el trabajo de los demás bloques y realiza el procesamiento de datos y señales. El microcontrolador 8751 [5] tiene 4 puertos bidireccionales y un puerto serie "full-duplex". No posee EPROM interna y su espacio de RAM interna disponible (128 bytes) es insuficiente, por lo que trabaja como microprocesador. Es una computadora

de propósito específico, con gran cantidad de periféricos y facilidades para conectar otros, además de posibilitar la comunicación eficiente con una computadora personal.

Interfase con el usuario. Teclado matricial (4x4) y módulo LCD alfanumérico, LM105L [6].

Adquisición de datos. Mide la OD de las muestras y entrega su valor al microprocesador. Se compone de un circuito analógico y un AD574 [7]. El circuito analógico está formado por un amplificador logarítmico (LOG), al que se conectan dos amplificadores, uno para el FDS y otro para el FDR. A la salida del LOG se obtiene un voltaje igual a la OD medida.

Impresión de la curva y Reporte de los resultados. Mini-impresora de 40 columnas [8], con gran flexibilidad gráfica. Reproduce la curva de OD vs. posición y el reporte con: los picos, su posición, altura, porcentaje de área respecto al total, y concentración de cada fracción si se introduce por teclado el total de proteínas.

Comunicación en serie. Interfase RS232, hacia computadora o videoterminal.

Alimentación. Todos los voltajes para el sistema electrónico.

SISTEMA XY DE "BARRIDO" (Figura 3). Gracias a relaciones de engranajes, dos motores de paso [9] facilitan el desplazamiento del sistema óptico a lo largo y ancho del portamuestras, en un área de **150 x 100 mm²**, lográndose precisiones de **80 μm** en la localización de las muestras (eje X) y de **10 μm** en el eje Y ("barrido", para la medición).

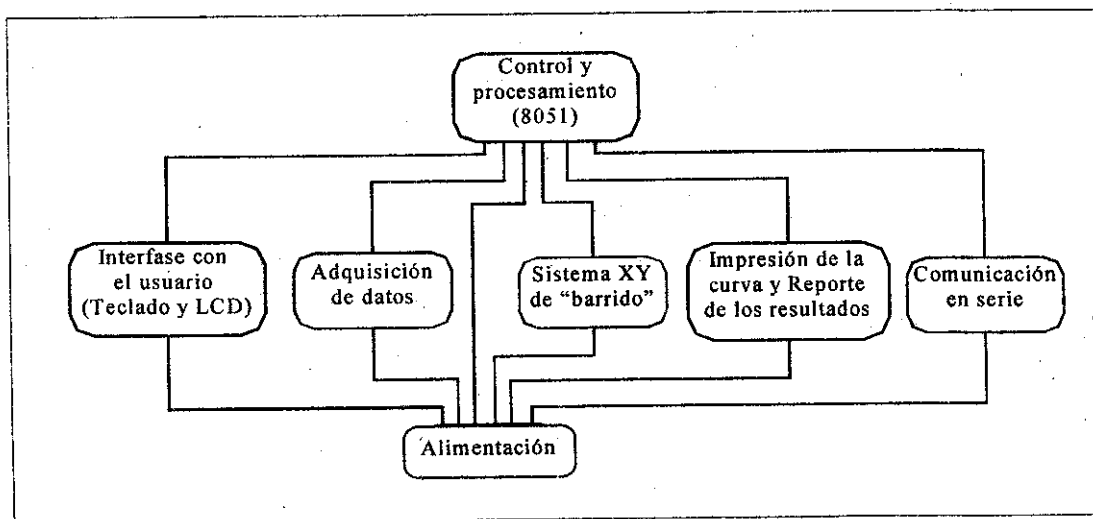


Figura 2. Diagrama en bloques del sistema electrónico.

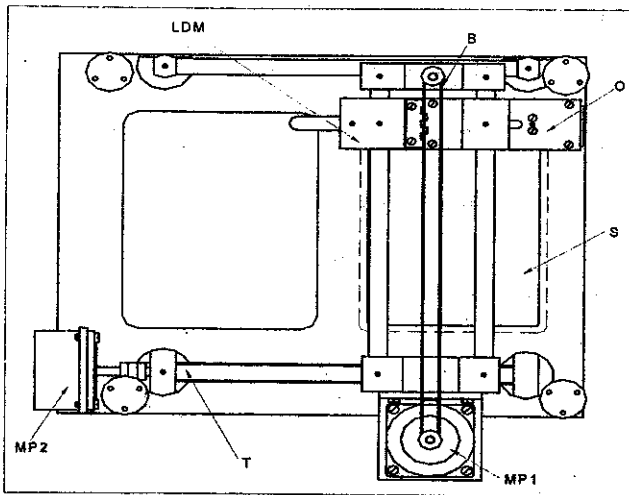


Figura 3. Vista superior del subconjunto del sistema XY.
 LDM: módulo del diodo láser,
 O: caja óptica, S: portamuestras;
 B: correa dentada, T: tornillo micrométrico;
 MP1, MP2: motores de paso.

7. ANALISIS SOCIOECONOMICO

Se ha diseñado un equipo de mayores posibilidades y mejores características técnicas, con mayor nivel de integración y considerable reducción de componentes, disminuyendo el costo por concepto de materias primas y materiales.

En este caso, los principales destinos serán: laboratorios clínicos de hospitales, bancos de sangre, laboratorios de control de calidad de la industria médico-farmacéutica y laboratorios de centros de investigación de perfil biológico y biotecnológico.

Los precios de otros equipos son elevados (ver Tabla III), superando significativamente la parte requerida en divisas (< 4 000 USD) para el desarrollo de este prototipo.

Tabla III. Principales firmas que comercializan densitómetros.

Firma	País	Precio [USD]
LKB	Suecia	16 000
Bio-Rad	USA/Bélgica	14 000
Bioimage	USA	80 000
Mol. Dynamics	USA	29 000
SF Soft Laser	USA	14 000
Beckman	USA	26 000
Shimadzu	Japón/USA	26 000
Joyce-Loebl	Inglaterra/RFA	32 000
Hirschman	RFA	26 000
Camag	Suiza	36 000
Sebia	Francia	14 000
Pharmacia LKB	Suecia	40 000
Helena Labs.	USA	22 000
Pharmacia Biotech	Suecia/USA	10 500

Ventajas del nuevo prototipo:

- Menor precio en divisas. En algunos casos representa la tercera y hasta la cuarta parte.
- Garantía de reparación. La carencia de servicios técnicos equivaldría a perder la inversión.
- El láser de He-Ne asegura elevadas monocromaticidad, resolución, sensibilidad y larga vida (20 000 h), superiores a las fuentes halógenas y de tungsteno más comunes. Los diodos láseres visibles son mucho más pequeños, económicos y tienen vida superior a 50 000 h, pudiendo llegar incluso hasta 10^5 h.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El diodo láser es una potente herramienta como fuente de luz para detectores cromatográficos o de electroforesis, incluidos los densitómetros por transmisión. Dadas sus ventajas, permite reducir las dimensiones de los equipos, haciéndolos más portátiles y baratos, sin comprometer los niveles de precisión y sensibilidad obtenidos con la técnica láser. Combinándolo con componentes electro-ópticas de avanzada, se da el mejor funcionamiento a estos instrumentos.

Se diseñó una nueva versión de densitómetro láser, con mejores características técnicas y mayores potencialidades, que emplea el microcontrolador 8751, con un mayor nivel de integración y reducción considerable de componentes, disminuyendo el costo por concepto de materias primas y materiales.

Aprovechando el 8751 se pudieran lograr mejores resultados, si se sustituye la pantalla LCD alfanumérica por una LCD gráfica, en la que se muestre la curva densitométrica, se interactúe directamente con ésta y se obtenga el reporte final de los cálculos realizados.

Utilizando la posibilidad de transmisión de datos hacia una computadora, debe trabajarse en el desarrollo de softwares o programas de aplicación, a través de los que se puedan realizar valoraciones mucho más precisas y útiles de las curvas densitométricas.

Al concluir la etapa productiva, se realizarán ensayos y pruebas para lograr su caracterización (certificación metrológica), registro y posterior comercialización, contribuyendo a mejorar la eficiencia y la calidad del diagnóstico.

Aunque no se satisface la demanda existente, éste constituye el punto de partida para la introducción de los equipos de producción nacional.

REFERENCIAS

- [1] Larrea, P.; M. COBAS et al., (1994): **Revista Colombiana de Física**, 26(2), 1.
- [2] IMASAKA, T., and N. ISHIBASHI (1990): **Anal Chem.**, 62(6), 363A.
- [3] POWER TECHNOLOGY INC. (1995): Laser Diode OEM Systems and Components.
- [4] BUSTO, E. D., y A. CASTIÑEIRAS, A., (1996): Diseño de un Densitómetro Láser Basado en el Microcontrolador 8031, Trabajo de Diploma, ISPJAE, La Habana.
- [5] INTEL (1994): Microcontroller Handbook.
- [6] FARNELL ELECTRONIC COMPONENTS (Mar. 1994): Liquid Crystal Character Display Modules.
- [7] Analog Devices (1981): Data Acquisition, Components and Subsystems.
- [8] Datac 1641SB Printer Controller Board (1989): Users Manual.
- [9] Sanyo Denki Co., Ltd. (1992): Stepping Motors Manual.