

## Evaluación de densitómetro automático con diodo láser

Pedro J. Larrea Cox, Lorenzo Hernández Tabares, Cirilo E. Suárez San Pedro<sup>a</sup>, Aradys Vázquez Cano<sup>b</sup>, Marlén de los Reyes Rodríguez<sup>b</sup>

Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear (CEADEN). La Habana, Cuba. plarrea@ceaden.edu.cu<sup>†</sup>

a) Laboratorio de Ensayos, Instituto Nacional de Investigaciones en Metrología (INIMET), Oficina Nacional de Normalización (ONN). La Habana, Cuba.

b) Área de Control de Procesos, Empresa de Sueros y Productos Hemoderivados “Adalberto Pesant”, La Habana, Cuba.

<sup>†</sup>autor para la correspondencia

Recibido el 15/04/2009. Aprobado en versión final el 29/04/2010.

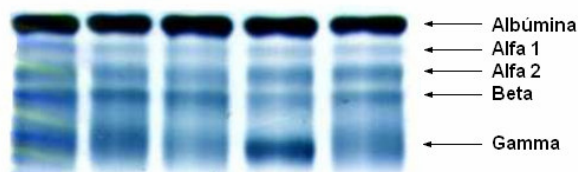
**Sumario.** Se presenta la evaluación de un prototipo de densitómetro automático de barrido, por transmisión, que posee un diodo láser semiconductor como fuente de luz, y está destinado fundamentalmente al análisis de electroforesis de proteínas, el cual fue desarrollado en el Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear (CEADEN). Sus características técnicas fueron determinadas y certificadas en el Instituto Nacional de Investigaciones en Metrología (INIMET), y fue sometido a pruebas en el laboratorio de Control de Procesos de la Empresa de Sueros y Productos Hemoderivados “Adalberto Pesant”, en Ciudad de La Habana, donde se utilizó para el control intermedio de la calidad de los productos que allí se elaboran, obteniéndose resultados satisfactorios.

**Abstract.** The evaluation of a prototype of an automatic scanning densitometer, transmission mode, is presented. It contains a semiconductor diode laser as light source, is primarily intended for analysis of protein electrophoresis, and was developed at the Center for Technological Applications and Nuclear Development (CEADEN). Its technical specifications were determined and certified in the National Institute of Researches on Metrology (INIMET), and also the equipment was tested at the Laboratory of Process Control on Company of Sera and Blood Products “Adalberto Pesant”, in Havana, where it was used to control the quality of intermediate products that are produced there, obtaining satisfactory results.

**Palabras clave.** Absorción óptica 42.25.Bs, diodos láseres semiconductores 42.55.Px.

### 1 Introducción

El ojo humano es bueno distinguiendo bandas, pero no intensidades. Es por eso que se necesita recurrir a técnicas para medir la intensidad, en este caso la densidad óptica, y es aquí donde los densitómetros juegan un importante papel. Los densitómetros ópticos son instrumentos analíticos, destinados a medir la absorción óptica (OD) de una muestra.



**Figura 1.** Electroforesis de proteínas de suero sanguíneo.

Estos pueden ser fijos o de barrido, en una o dos dimensiones, y trabajan por métodos de transmisión, reflexión o fluorescencia.

Los densitómetros ópticos tienen amplios y diversos usos en la investigación y el control de la calidad de medicamentos, sueros y vacunas, y de otros productos biotecnológicos. En bioquímica, sirven para la determinación de la actividad enzimática, aceleradora de los procesos biológicos. En ciencias médicas, facilitan a los especialistas el diagnóstico de diversas enfermedades, como por ejemplo, en hematología, las provocadas por excesos o defectos de proteínas componentes del suero sanguíneo, y posibilita la determinación exacta de diferentes problemas metabólicos en endocrinología. Se utilizan en el análisis de placas fotográficas y diapositivas, así como en el control del proceso de impresión e inspección de imágenes realizadas por impresoras láseres y *deskjets*, entre otros. En criminalística, permiten la diferenciación de sustancias reveladoras en las investigaciones policiales. Son muy utilizados en el control de procesos industriales y en dosimetría.

En este caso se trabaja específicamente sobre un densitómetro láser de barrido 1-D, para el análisis de muestras de electroforesis.

Este tipo de equipos se emplea para realizar determinaciones cualitativas y cuantitativas de diferentes sustancias (ADN, proteínas, ácidos grasos, colorantes, etc.), basándose en las mediciones de absorción óptica en substratos cuyo espesor sea aproximadamente homogéneo, y permitan la transmisión de parte de la radiación luminosa que sobre ellos incide. Entre estos medios se encuentran los geles de agarosa, almidón y poliacrilamida (planos y tubulares) y placas de acetato de celulosa.

En la figura 1 se muestra una lámina de electroforesis de proteínas de suero sanguíneo, sobre un soporte de acetato de celulosa y teñida con colorante Negro Amido. En ella se pueden distinguir claramente cinco bandas. Conociendo las intensidades de cada una de las bandas, se pueden diagnosticar diferentes padecimientos<sup>1</sup>.

Con el surgimiento del láser, se obtiene un haz de luz intensa, monocromática, coherente, y de forma muy estrecha, que lo hacen apropiado para obtener mayores valores de OD. Por su gran intensidad, puede penetrar muestras densamente coloreadas, con suficiente luz como para hacer mediciones precisas<sup>2</sup>. La incorporación del láser permitió mejorar significativamente las características de los equipos, fundamentalmente: rango y sensibilidad<sup>3</sup>.

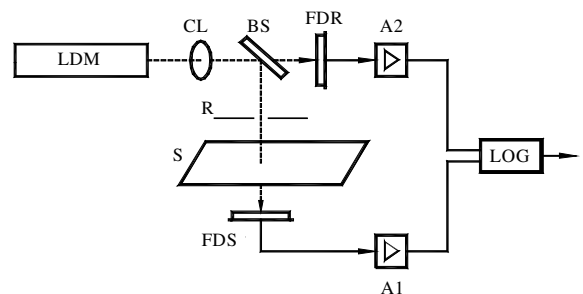
En el país hay varios densitómetros láseres, los que se encuentran principalmente en laboratorios de centros de investigación con perfil biomédico.

Con la aparición de los diodos láseres, o láseres semiconductores, éstos se convierten en rivales de los láseres gaseosos, pues son mucho más pequeños, consumen menos potencia y trabajan a bajo voltaje, son extremadamente confiables y capaces de operar cientos de miles de horas sin problemas, acoplándose correctamente con otros dispositivos electrónicos. Con diodos láseres comerciales<sup>4</sup> con longitudes de onda cercanas a los 632,8 nm del HeNe, y perfiles de intensidad análogos al modo

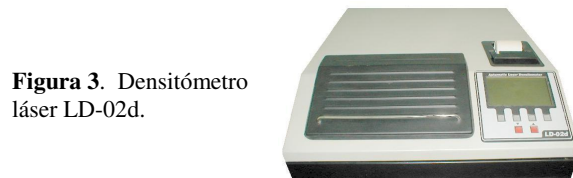
TEM<sub>00</sub> de muchos láseres gaseosos, se vio la posibilidad de utilizarlos como fuentes de luz en la densitometría por transmisión<sup>3</sup>.

**Tabla I**  
Algunos densitómetros existentes en Cuba<sup>3</sup>.

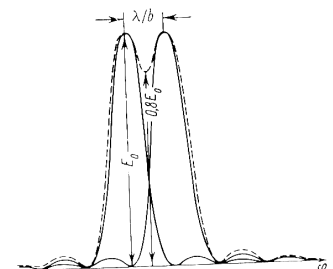
Modelo/Marca	País	Intervalo de OD	Resolución (µm)
Digiscreen-M Scanner/Gelman Sc.	USA	0-1	---
Desaga Quick Scan/Helena Labs.	USA	0-3	150
GS 300/Hoefer Scientific Instruments	USA	0-2.5	---
ADC-20EX/Kayagaki	Japón	0-2	300
TLC Scanner II/CAMAG	Suiza	0-3	100
2202 UltraScan/LKB	Suecia	0-4	50
UltraScan XL/Pharmacia	Suecia	0-4	40
DENSYSTEM LD-01/CEDEIC	Cuba	0-4	50
DENSYSTEM LD-02/CEDEIC	Cuba	0-4	50
CD60/Desaga	Alemania	---	---



**Figura 2.** Esquema del principio de funcionamiento. LDM: módulo de diodo láser, CL: lente cilíndrica, BS: *beamsplitter* o divisor de haz, FDR: fotodiodo de referencia, R: rendija, S: muestra, FDS: fotodiodo de medición, A1 y A2: amplificadores operacionales, LOG: amplificador logarítmico.



**Figura 3.** Densitómetro láser LD-02d.



**Figura 4.** Esquema del criterio de Rayleigh.

Combinándolo con componentes electro-ópticas de avanzada, se puede dar mejor funcionamiento a un equipo. Algunos densitómetros utilizan LEDs<sup>5-9</sup> como fuente de luz.

Los densitómetros existentes en la mayoría de los laboratorios clínicos de los hospitales, tienen lámparas halógenas o de tungsteno, y poseen características según se muestra en la tabla I.

Teniendo en cuenta las recomendaciones hechas en las evaluaciones de las versiones anteriores de densitómetros, con el fin de disponer de un equipo más universal para todo tipo de aplicaciones, se acometió el diseño y la construcción de otro, empleando un diodo láser como fuente de luz y un microprocesador para controlar todas las operaciones, automatizándose el proceso de medición y disminuyendo, por tanto, el tiempo requerido en la obtención de resultados.

El principio básico<sup>10</sup> del funcionamiento del equipo está representado en la figura 2.

Fue obtenido un prototipo de densitómetro láser (LD-02d, figura 3) que vino a eliminar las deficiencias de los modelos cubanos anteriores<sup>10</sup>. Este nuevo prototipo trabaja también por transmisión, y utiliza como fuente de luz un láser semiconductor de 660 nm, permitiéndole analizar muestras de elevada densidad óptica. El equipo posee circuitos de mayor integración, como es el caso del microcontrolador SAB-C515-LN y de los *drivers* de motores de paso, que reducen y simplifican el diseño electrónico. Se implementó correctamente el amplificador logarítmico, con su compensación de temperatura, y se adicionó una pantalla gráfica de 240x128 *pixels* lo que mejoró la interfaz con el usuario. Se eliminó el sistema modular de tarjetas (más de 5 en el diseño precedente) por dos tarjetas fundamentales. Se mantuvieron las opciones de mini-impresora e interfaz RS-232 del las versiones anteriores (LD-01, LD-02).

El equipo es una solución válida a las necesidades que sobre este tipo de equipamiento se tienen en el país.

**Tendencias actuales.** La tendencia a aumentar el nivel de densidad óptica a medir nos conduce a utilizar el método de transmisión, utilizando como fuentes de luz láseres gaseosos o semiconductores.

Varios resultados se tienen, desde hace algunos años, en cuanto al uso de láseres semiconductores en densitometría<sup>3, 11-13</sup> los cuales tienden a mantener la longitud de onda cercana a la del láser de HeNe, por el desarrollo de nuevos materiales para ser utilizados en dosimetría filmica, que buscan la mayor respuesta en esa longitud de onda<sup>14</sup>, y en algunos casos se observa mejor respuesta de los materiales ya existentes a longitudes de onda cercanas, como 675.2 nm<sup>11</sup>.

Con el avance de las tecnologías de la información han comenzado a utilizarse escáneres, cámaras digitales u otros dispositivos de digitalización de imágenes comerciales, que conjuntamente con un programa de *software* realizan el análisis de láminas de electroforesis. Los escáneres y las cámaras digitales trabajan por reflexión por lo que tienen su limitación en cuanto al

máximo de densidad óptica que pueden medir. Por otra parte, estos dispositivos tienen características técnicas que varían de uno a otro, y no son instrumentos de medición profesionales, aunque en algunas aplicaciones se han obtenido resultados favorables en comparación con densitómetros reales<sup>15</sup>, y se ha usado esta variante<sup>16-18</sup>.

De forma general los densitómetros actuales utilizan el láser como fuente de luz y se componen de dos partes fundamentales: escáner y unidad de procesamiento. Ambas partes pueden estar separadas o integradas en un solo dispositivo. Los escáneres que se utilizan son especiales y trabajan por transmisión. En cuanto a la unidad de procesamiento puede ser un sistema empotrado con una pantalla gráfica, y su correspondiente *firmware* o una PC comercial con un *software* de aplicación.

**Tabla II**  
Determinación del error de la medición fotométrica.

Combinaciones de patrones	Absorbencia certificada <sup>a</sup> (OD)	Absorbencia medida promedio <sup>b</sup> (OD)	Error absoluto <sup>c</sup> (OD)	Error relativo <sup>d</sup>
B	0,7476	0,747	0,0006	0,00
C	1,2924	1,345	0,0526	0,04
B+E	1,4826	1,533	0,0504	0,03
C+B	2,0400	2,128	0,0880	0,04
C+F	2,5221	2,629	0,1069	0,04
C+F+B	3,2697	3,353	0,0833	0,03
C+F+B+E	4,0047	3,896	0,1087	0,03

<sup>a)</sup> Valor de la absorbencia según el certificado de calibración para cada uno de los filtros.

<sup>b)</sup> Promedio de los resultados de las mediciones de absorbencia con el densitómetro, para n = 10

<sup>c)</sup> Absorbencia certificada - Absorbencia medida promedio

<sup>d)</sup> Error absoluto / Absorbencia certificada

**Tabla III**  
Reproducibilidad de la medición fotométrica.

Combinaciones de filtros patrones	Absorbencia certificada <sup>a</sup> (OD)	Absorbencia medida promedio <sup>b</sup> (OD)	Desv. típica n = 10	Reproducibilidad
B	0,7476	0,747	0,004	0,011
C	1,2924	1,345	0,003	0,008
BE	1,4826	1,533	0,004	0,011
CB	2,0400	2,128	0,010	0,028
CF	2,5221	2,629	0,008	0,022
CFB	3,2697	3,353	0,010	0,028
CFBE	4,0047	3,896	0,009	0,025

<sup>a)</sup> Valor de la absorbencia según el certificado de calibración para cada uno de los filtros.

<sup>b)</sup> Promedio de los resultados de las mediciones de absorbencia con el densitómetro, para n = 10

## 2 Desarrollo

El equipo a evaluar ha sido diseñado como un “escáner” láser, es decir, la muestra es “barrida” por un haz de luz emitido desde un diodo láser semiconductor. El movimiento de la muestra se realiza en dos direcciones, mediante sendos motores de paso de 5 fases. El equipo es gobernado por un sistema microcontrolador de la familia C500 de SIEMENS.

**Determinación de características.** El prototipo de densitómetro láser se sometió a pruebas de determinación de características en el INIMET, según lo establecido en el procedimiento PP 01-173: 19-99, elaborado sobre la base del documento PP 01-2-20-93/036:08 “Programa de certificación metrológica a: densitómetro láser DENSYSYSTEM LD -02”, y teniendo en cuenta normas nacionales e internacionales<sup>19-22</sup>. Todas las pruebas realizadas obtuvieron el criterio de conformidad.

**Comprobación de la resolución.** Para determinar la resolución espacial del equipo se utilizaron patrones rayados, con anchos de rayas de 100 y 200  $\mu\text{m}$  y separaciones entre rayas de 50, 100, 150, 200, 250 y 300  $\mu\text{m}$ . Se siguió el criterio de Rayleigh, según el esquema de la figura 4.

El equipo resolvió ampliamente el grupo de líneas del patrón rayado con resolución nominal hasta de 50  $\mu\text{m}$  (véase muestra impresa en la figura 5). La altura promedio de los mínimos representó menos del 80 % de la altura de los máximos, que es una condición satisfactoria.

**Determinación del error de la medición.** Para la determinación del error de la medición se utilizaron combinaciones de filtros patrones de vidrio neutro, modelo HC-8 (ver tabla II).

En el peor de los casos, el error relativo es de 0,04 por lo que el equipo mide de 0,00 – 4,00, con  $\pm 1\%$  de error relativo porcentual.

**Comprobación de la linealidad de la respuesta del densitómetro en el intervalo de medición.** Se comprobó la linealidad de la respuesta del LD-02d utilizando los filtros neutros mencionados. El gráfico (figura 6) muestra los valores de densidad óptica medidos por el LD-02d, correspondiente a cada valor de absorbancia certificada de los filtros, vistos en la tabla II.

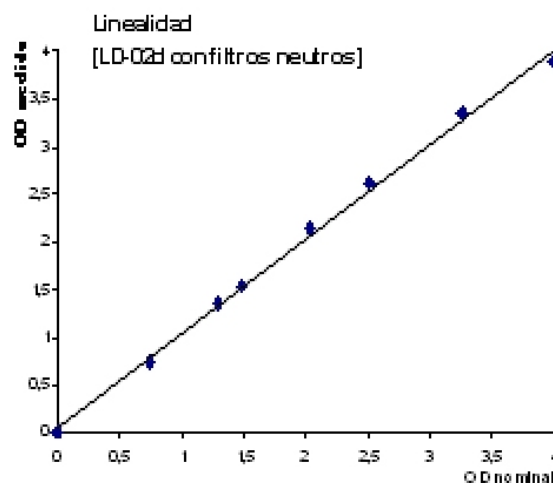
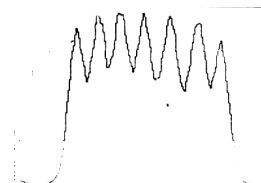
**Comprobación de la reproducibilidad de la medición**

La reproducibilidad es la variabilidad de las mediciones bajo diferentes condiciones, en períodos dilatados de tiempo, utilizando varios operarios (véase tabla III).

Para la albúmina (tabla V) se observaron los picos bien definidos, pudiendo leerse correctamente todas las bandas presentes en los respectivos acetatos. En las tablas IV y V se observa que la mayoría de los valores quedan en los rangos admisibles, siendo generalmente muy similares los promedios, sus desviaciones estándares y los coeficientes de variación. Se comprobó la similitud de las mediciones entre un equipo y otro, y que se cumplía con los valores reportados en los patrones.

**Comparación con equipo similar.** Se compararon las mediciones del LD-02d con las de un densitómetro DESAGA, en la determinación de la pureza de muestras patrones de electroforesis de proteínas en suero sanguíneo. En el caso de las inmunoglobulinas (tabla IV), la mayor dificultad radica en discernir bien cuales bandas deben incluirse o no en los porcentos correspondientes.

**Figura 5.** Muestra impresa de la respuesta del LD-02d al patrón rayado (ancho de rayas: 200  $\mu\text{m}$ , separación entre rayas: 50  $\mu\text{m}$ ).



**Figura 6.** Respuesta lineal del densitómetro LD-02d en el intervalo de 0 a 4,00 OD.

**Tabla IV**

Determinación de pureza en patrones de gammaglobulinas. Rango aceptable: 75,7 – 80,9 %

Equipo	Promedio (%)	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
DESAGA	78,40	1,73	2,21
LD-02d	78,42	2,02	2,57

**Tabla V**

Determinación de pureza en patrones de albúmina. Rango aceptable: 96,7 – 98,7 %

Equipo	Promedio (%)	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
DESAGA	96,83	0,86	0,89
LD-02d	98,26	0,56	0,57

## 3 Conclusiones

Durante las pruebas realizadas, el prototipo de densitómetro automático con diodo láser tuvo un funcionamiento estable. A partir de los resultados obtenidos, puede concluirse que dicho equipo evaluado ha presentado un comportamiento satisfactorio.

## Referencias

1. J. Suardíaz, C. Cruz, A. Colina. "Laboratorio Clínico". Ed. Ciencias Médicas, La Habana, pp. 105-113 (2004).
2. P. J. Larrea, M. Cobas, A. García, R. Miranda, A. Korchenko, L. García, O. Morales, R. Neyra, A. Escobar, H. Fernández y F. Dina. "Nuevo Densitómetro Láser Automático". *Rev. Col. Fís.*, Vol. 26, No. 2, pp. 1-8 (1994).
3. P. J. Larrea, R. Miranda, D. Rodríguez, R. Y. Díaz, M. Cobas, H. Fernández y A. C. Escobar. "El densitómetro con diodo láser: solución tecnológica". *Rev. Cub. Fís.*, Vol. 18, No. 1 pp. 16-20 (2001).
4. T. Imasaka and N. Ishibashi. "Diode lasers and practical trace analysis". *Anal. Chem.*, Vol. 62, No. 6 363A (1990).
5. M. D. Borton, F. F. Hubble, J. P. Martin, T. K. Mattioli, and R. A. Shoemaker. "Densitometer of color liquid developer". Pat. JP 03111743 (1991).
6. S. Nardi, S. Intini, and M. Battistoni. "Densitometer for electrophoresis with reading on the whole electrophoretic migration sheet, without moving mechanical scanning parts". Record Separation Srl. Pat. ITRM950147 (1995).
7. L. Avigdor. "Photodensitometer for monitoring safety badges". Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor. Pat. EP 0732581 (1996).
8. M. H. Regelsberger, R. G. Allen, W. A. Hameister, and B. A. Twait. "Densitometer with improved accuracy for use in color image processing apparatus". NEXPRESS Solutions Llc Pat. US 2003007804 (2003).
9. A. Uejima. "Densitometry device". FUJI Photo Film Co Ltd. Pat. US 2003072002 (2003).
10. P. J. Larrea-Cox, L. Hernández-Tabares, N. López-Casado, H. Fernández-Lechuga, J. Arteché-Díaz, and A. M. Combarro-Romero. "Development of an automatic densitometer with diode laser". *Memorias de TECNOLASER*. ISBN-959-7136-48-1 (2007).
11. A. Ertl, P. O. Kellermann, M. Zehetmayer, A. Schöggel, P. Kindl, and A. H. Maitz. "A novel 675. 2 nm diode laser densitometer for use with GafChromic films". *Med. Phys.*, Vol. 26, No. 5, pp. 834-838 (1999).
12. P. J. Larrea, L. Hernández, N. López, H. Fernández, J. Arteché, A. M. Combarro, R. Arteché y L. P. Claro. "El LD-02d: una variante de densitómetro láser automático". *Memorias de TECNOLASER*. ISSN-1607-6281 (2003).
13. P. J. Larrea, A. M. Combarro, H. Fernández, L. Hernández y E. Lizaso. "Desarrollo de un módulo de diodo láser visible". *Memorias de TECNOLASER*. ISSN-1607-6281 (2005).
14. C. G. Soares. "New developments in radiochromic film dosimetry". *Radiation Protection Dosimetry*, Vol. 120, No. 1-4, pp. 100-106 (Oxford University Press, 2006).
15. S. G. Vincent, P. R. Cunningham, N. L. Stephens, A. J. Halayko, and J. T. Fisher. "Quantitative densitometry of proteins stained with Coomassie Blue using a Hewlett Packard scanjet scanner and Scanplot software". *Electrophoresis*, Vol. 18, No. 1, pp. 67-71 (1997).
16. R. W. Mitchell, C. Y. Seow, T. Burdyga, R. Maass-Moreno, V. R. Pratusевич, J. Ragozzino, and L. E. Ford. "Relationship between myosin phosphorylation and contractile capability of canine airway smooth muscle". *J. Appl. Physiol.*, Vol. 90, No. 6, pp. 2460-2465 (2001).
17. M. E. Zacour and J. G. Martin. "Protein kinase C is involved in enhanced airway smooth muscle cell growth in hyperresponsive rats". *AJP - Lung Cellular and Molecular Physiol.*, Vol. 278, pp. L59-L67 (2000).
18. A. J. Halayko, S. Kartha, G. L. Stelmack, J. McConville, J. Tam, B. Camoretti-Mercado, S. M. Forsythe, M. B. Hershenson, and J. Solway. "Phosphatidylinositol-3 kinase/mammalian target of Rapamycin/p70<sup>S6K</sup> regulates contractile protein accumulation in airway myocyte differentiation". *Am. J. Respiratory Cell and Mol. Biol.*, Vol. 31, pp. 266-275 (2004).
19. ISO 5725: 1994 "Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method".
20. ISO P17: 1993 "Guide to the expression of uncertainty in measurement".
21. Cuba, NC OIML V2 (1995) "Vocabulario internacional de términos generales y básicos en metrología".
22. Cuba, NC 90-00-06 (1983) "Aseguramiento metrológico. Sistema Internacional de Unidades".