

**DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN SISTEMA ÓPTICO AUTOMATIZADO
PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE HEMOGLOBINA “S” EN
MUESTRAS “IN VITRO” DE SANGRE**



**OSCAR GABRIEL GARZÓN OBANDO
BERLAYDER LÓPEZ**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
INGENIERÍA FÍSICA
POPAYÁN
2008**

**DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN SISTEMA ÓPTICO AUTOMATIZADO
PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE HEMOGLOBINA “S” EN
MUESTRAS “IN VITRO” DE SANGRE**

**OSCAR GABRIEL GARZÓN OBANDO
BERLAYDER LÓPEZ**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
Ingeniero Físico**

**Director
Ing. Rubiel Vargas**

**Co-Directora
Dra. Sonia Gaona Jurado**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
INGENIERÍA FÍSICA
POPAYÁN
2008**

DEDICATORIA

Este trabajo esta dedicado a nuestros padres y familiares que en todo momento nos apoyaron, creyeron en nosotros, esforzándose por sacarnos adelante en el transcurso de toda nuestra carrera, por su paciencia, por su amor y su dedicación.

A los profesores de la Universidad del Cauca, que directa o indirectamente nos dejaron conocimientos y aportaron enseñanzas para afrontar los retos de un ingeniero en la sociedad.

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo del trabajo de grado no hubiese sido posible sin la colaboración de: Dra. Julieta Montero, Dr. Franklin Correa Dra. Vicky López pertenecientes a la Unidad de Hematología de la Universidad del Cauca que nos ofrecieron asesoría, su apoyo y respaldo, a la Profesora Sonia Gaona J. que nos guió incondicionalmente en el proceso investigativo, a los profesores Rubiel Vargas, Mario Patiño por su asesoría en la parte de óptica y al profesor Carlos Rincón, a la Dra. Patricia Vélez, Dr. Nelson Rojas del departamento de biología y al estudiante Adrián Rodríguez del programa de biología por su aporte a la investigación y a todos nuestros compañeros del grupo GIOPAD.

CONTENIDO

	Pag.
RESUMEN	
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	13
CAPÍTULO 2: BASES TEÓRICAS I - HEMOGLOBINA	
19	
2.1 HEMOGLOBINA S	21
2.2 HEMOGLOBINA AS O FORMA HETEROCIGOTA	23
2.3 MÉTODOS PARA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE HBS	23
2.3.1 Electroforesis de hemoglobina	24
2.3.2 Prueba de solubilidad de la desoxihemoglobina	26
REFERENCIAS	28
CAPÍTULO 3: BASES TEÓRICAS II - ESPECTROFOTOMETRÍA	30
3.1 LEY DE LAMBERT-BEER	33
3.1.1 Ley de Lambert	33
3.1.2 Ley de Beer	34
3.2. ESPECTROSCOPIA LÁSER	35
• Direccionalidad	36
• Monocromaticidad	36
• Luminosidad	37
• Coherencia	37
3.2.1 Tipos de láser	38
• Láser de estado sólido	38
• Láser de gas	38
• Láser de semiconductor	38

• Láser de colorante	39
3.2.2 Detectores de luz	39
• Fotomultiplicadores	40
• Fotodiodos	40
REFERENCIAS	42
CAPÍTULO 4: DISEÑO DEL ESPECTROFOTÓMETRO DE DOBLE HAZ	43
4.1. CURVAS DE ABSORBANCIA	44
4.2. ELECCIÓN DE LA FUENTE DE RADIACIÓN	46
4.3 ESPECTROFOTÓMETRO DE DOBLE HAZ	47
4.3.1 selección de los componentes del espectrofotómetro	47
• Fuente de radiación	48
• Divisor de haz	49
• Fotodetector	50
• Cubeta	51
• Soportes	52
4.3.2 Pruebas de caracterización, estabilidad y/o comportamiento de los elementos	54
4.3.3 Análisis del diseño propuesto	58
REFERENCIAS	61
CAPÍTULO 5: CONSTRUCCIÓN DEL ESPECTROFOTÓMETRO DE DOBLE HAZ	62
5.1 FUENTE DE VOLTAJE	63
• Etapa de rectificación	63
• Regulación para la alimentación del láser	65
• Regulación de +12.0V y de -12.0V	65
• Regulación de 5V	66
5.2. FILTRADO DE LA SEÑAL	67
5.3. AMPLIFICACIÓN DE LA SEÑAL	68

5.4. ADQUISICIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA SEÑAL	69
5.5. TOMA DE DATOS	70
• Medidas con el divisor de haz EBS05	71
• Medidas con el divisor BS1	72
CAPÍTULO 6: ESPECTROFOTÓMETRO LS-532: DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN	74
6.1 DISEÑO DEL ESPECTROFOTÓMETRO LS-532	75
6.2 CONSTRUCCIÓN DEL ESPECTROFOTÓMETRO LS-532	76
6.2.1 Diseño e implementación del control automático	80
CAPÍTULO 7: RESULTADOS Y ANÁLISIS	85
7.1 PRUEBA PRELIMINAR PARA OBSERVAR EL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE Hbs DE LA MUESTRA EN LA ABSORBANCIA	86
• Cuantificación de hemoglobina por electroforesis	86
7.2. CALIBRACIÓN	90
7.3 RESULTADOS DE VERIFICACIÓN	
94	
CONCLUSIONES	95
ANEXOS	98

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 2.1. Electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa a pH alcalino.	25
Tabla 4.1. Datos de absorbancia obtenidos de la figura 4.1.	46
Tabla 4.2. Especificaciones físicas y eléctricas del modulo diodo láser.	49
Tabla 4.3. Características eléctricas del Fotodiodo PIN FDS100.	51
Tabla 4.4. Características generales de la cubeta.	52
Tabla 7.1. Resultados de electroforesis de hemoglobina en medio alcalino para el paciente A y para el paciente Y (laboratorio Asoclinic Inmunología Ltda).	87
Tabla 7.2. Datos de concentración de HbS y de absorbancia para cada dilución de la muestra A.	88
Tabla 7.3. Datos de concentración de HbS y de absorbancia para cada dilución de la muestra Y.	88
Tabla 7.4. Valores de hemoglobina total y porcentajes de hemoglobina para las muestras CN y SS.	90
Tabla 7.5. Disoluciones de SS en CN.	91
Tabla 7.6. Disoluciones de SS en CN con la respectiva concentración de HbS en la disolución.	92

Tabla 7.7. Valores de absorbancia para cada disolución obtenidos por el LS-532.	92
Tabla 7.8. Resultados obtenidos mediante electroforesis y con el espectrofotómetro LS-532.	94

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 2.1. Glóbulos rojos falciformes o en forma de hoz.	20
Figura 2.2. Esquema de la hemoglobina ilustrando sus dos componentes: grupo hemo y globina.	21
Figura 2.3. Cambio de aminoácido en la posición 6 de beta globina normal, cambiando ácido glutámico por valina.	22
Figura 2.4. Prueba de solubilidad. Tomada en el laboratorio de hematología del hospital universitario San José.	27
Figura 3.1. Espectro electromagnético.	32
Figura 3.2. Esquema básico de un espectrofotómetro.	32
Figura 3.3. Direccionalidad de un láser y una lámpara ordinaria.	36
Figura 3.4. Monocromaticidad del láser.	37
Figura 3.5. Luminosidad del láser y una luz convencional.	37
Figura 3.6. Coherencia de un láser y una luz convencional.	38
Figura 3.7. Fotomultiplicador.	38
Figura 3.8. Diferentes modelos de fotodetectores.	41

Figura 4.1. Curvas de absorbancia. a) Control Normal, b) paciente homocigoto, Y c) paciente heterocigoto, A.	45
Figura 4.2. Diseño de un espectrofotómetro de doble haz.	48
Figura 4.3. Módulo diodo láser de 532nm a 5mw.	48
Figura 4.4. a) Divisor de haz EBS05, b) Haz reflejado y haz Transmitido a un ángulo de 45°.	50
Figura 4.5. Comportamiento del divisor de haz de 400-700nm.	50
Figura 4.6. Fotodiodo PIN FDS100. a) esquemático. b) Imagen.	50
Figura 4.7. Curva típica de respuesta del Fotodiodo PIN FDS100.	51
Figura 4.8. Cubeta desechable semimicro de 1.5ml.	52
Figura 4.9. Soporte para el láser.	53
Figura 4.10. Soporte para el divisor de haz.	53
Figura 4.11. Soporte para el sensor.	54
Figura 4.12. Montaje para medir la estabilidad del Láser.	54
Figura 4.13. Datos obtenidos de iluminancia provenientes del láser durante un periodo de 25 minutos.	55
Figura 4.14. Montaje para la caracterización del sensor FFDS100 con un polarizador.	56

Figura 4.15. Datos obtenidos de iluminancia y de voltaje provenientes del láser con un polarizador.	56
Figura 4.16. Montaje para caracterizar el divisor de haz.	57
Figura 4.17. Datos obtenidos de iluminancia provenientes de los dos haces durante un periodo de 50 minutos.	58
Figura 4.18. Montaje para observar el comportamiento del haz láser con un polarizador.	59
Figura 4.19. Datos obtenidos de iluminancia provenientes de los dos haces durante un periodo de 30 minutos con polarizador.	59
Figura 5.1. Imagen fotográfica del espectrofotómetro de doble haz construido.	63
Figura 5.2. Fuente de voltaje para voltajes regulados de +12V,-12V, 5V y 3.3V a) Circuito Esquemático b) Imagen Fotográfica.	64
Figura 5.3. Rectificación de onda completa y filtrado de la fuente bipolar.	65
Figura 5.4. Conexión del regulador LM1086.	65
Figura 5.5. Conexión de los reguladores LT1086CT y LM2990T.	66
Figura 5.6. Conexión del regulador LM1117T.	67
Figura 5.7. a) Acople de impedancias, b) esquema general de un filtro pasabajas de segundo orden de tipo Butterworth.	68

Figura 5.8. Sistema de amplificación.	68
Figura 5.9. Tarjeta de adquisición de datos a) Circuito esquemático, b) Imagen fotográfica.	69
Figura 5.10. Panel frontal del programa de Labview.	70
Figura 5.11. Montaje para medir la estabilidad del láser.	70
Figura 5.12. Datos obtenidos de voltaje provenientes del láser durante un periodo de 22 minutos.	71
Figura 5.13. Datos obtenidos provenientes de los dos haces durante un periodo de 10 minutos con la tarjeta de adquisición de datos.	72
Figura 5.14. Datos obtenidos provenientes de los dos haces durante un periodo de 10 minutos con el divisor de haz.	73
Figura 6.1. Diagrama esquemático del montaje del espectrofotómetro LS-532.	76
Figura 6.2. Riel dentado.	77
Figura 6.3. Motor paso a paso.	77
Figura 6.4. Compartimiento de las muestras.	77
Figura 6.5. Optoacoplador.	78
Figura 6.6. Teclado.	78
Figura 6.7. Pantalla LCD.	78

Figura 6.8. Espectrofotómetro LS-532, a) vista superior, b) vista lateral.	79
Figura 6.9. Diagrama de bloques implementado en el PIC.	83
Figura 6.10. Diseño del control automático.	84
Figura 7.1. Gráficas para observar el efecto de la concentración de la muestra a diluciones a proporciones de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 a) Datos para la muestra A b) Datos para la muestra Y.	89
Figura 7.2. Recta de calibración del espectrofotómetro LS-532.	93

RESUMEN

Existen varias enfermedades hereditarias debido a hemoglobinas anormales que afectan a millones de personas en todo el mundo. Entre estas, las más importantes son aquellas que están relacionadas con alteraciones en la cadena beta de la hemoglobina, siendo la más importante la drepanocitosis o anemia de células falciformes (HbS), que es una enfermedad que se encuentra con frecuencia en personas de raza negra y su mestizaje. La información acerca de la concentración de hemoglobina S en un paciente es de suma importancia para la toma de decisiones a nivel clínico ya que de esta depende la realización de cirugías y tratamientos del paciente.

En este trabajo se presenta el diseño y construcción de un sistema óptico, que permite la detección y cuantificación de hemoglobina S en sangre, utilizando los principios básicos de la espectrofotometría. El propósito es cuantificar la cantidad de hemoglobina S de una muestra, usando una fuente de luz láser de 532 nm a 5 mW de potencia. La luz es fijada para que pase por el centro de la cubeta. El sistema de detección está dotado de un fotodetector, a partir del cual, mediante una etapa de acople de impedancias, filtrado, amplificación y procesamiento de los datos se realiza el registro en una pantalla LCD.

El equipo está basado en los principios de la óptica, espectrofotometría, electrónica, parte de medicina y biología. Para fines prácticos el equipo se divide en una etapa óptica, una etapa electrónica y una etapa de procesamiento de datos la cual se realiza mediante un software implementado en un microcontrolador.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La Hemoglobina es una heteroproteína de la sangre que se encuentra en los glóbulos rojos y es la encargada de transportar el oxígeno desde los órganos respiratorios hasta los tejidos; existen algunas variaciones de la hemoglobina normal en cuanto a su forma y estos están marcados por sus variantes alélicas.

Debido a las alteraciones en la forma de la hemoglobina, pueden presentarse algunas enfermedades hereditarias por hemoglobinas anormales que afectan a millones de personas en todo el mundo [1]. Entre estas, las más importantes son aquellas que están relacionadas con alteraciones en la cadena beta de la hemoglobina, siendo la más importante la drepanocitosis o anemia falciforme, que es una enfermedad que se encuentra con frecuencia en personas de raza negra y su mestizaje, dado que ellas la generaron como mecanismo de resistencia a la malaria. Este tipo de hemoglobina es llamada hemoglobina S, "HbS". La detección y cuantificación de hemoglobina S en pacientes es una información que contribuye al diagnóstico de enfermedades asociadas y para la toma de decisiones en procedimientos y/o tratamientos de pacientes hospitalizados y ambulatorios, ya que la presencia de hemoglobina S interfiere con el flujo sanguíneo normal obstruyendo los vasos sanguíneos pequeños Información más detallada sobre hemoglobina S y sus implicaciones en la salud, así como las técnicas usuales para su detección y cuantificación, se encuentra en el **capítulo II** del presente documento.

En muchas regiones de Colombia los laboratorios clínicos carecen de equipos automáticos para la detección y/o cuantificación de hemoglobina S, siendo que la mayoría de las pruebas de laboratorio se realizan en forma cualitativa, con base en los sentidos y en la experiencia. Un ejemplo de esta situación es el caso de la unidad de Hematología de la universidad del Cauca ubicada en el hospital universitario San José de la ciudad de Popayán, en donde por falta de equipo para la cuantificación de hemoglobina S, las pruebas para el diagnóstico se llevan a cabo en forma manual y cualitativa utilizando entre otras la *Prueba de solubilidad de la Desoxihemoglobina* [2], prueba que no da información

acerca de la concentración de hemoglobina S en un paciente, información que es de suma importancia para la toma de decisiones a nivel quirúrgico de estos pacientes ya que de esta concentración depende la realización de cirugías y tratamientos de los mismos.

Con este proyecto se apropió una técnica óptica de análisis no destructivo para diseñar un equipo que permita la detección y cuantificación de hemoglobina S en pacientes de forma rápida y a bajo costo. La base teórica que sustenta la propuesta del diseño del equipo se encuentra en el **capítulo III** de este documento.

La técnica desarrollada permite la toma de un examen de laboratorio de una manera mas económica que otras técnicas utilizadas como la Electroforesis de hemoglobina S que utiliza tiras de acetato de celulosa como soporte, en las cuales se deben correr varias muestras de diferentes pacientes para solventar el gran costo del acetato haciendo que el paciente deba esperar a que se tengan las otras muestras o de otro modo pagar el costo total de la tira de acetato. Así, con el equipo construido en este proyecto se espera contribuir al mejoramiento del servicio de atención a la comunidad a través de la Unidad de Hematología del Hospital Universitario San José de la ciudad de Popayán.

El desarrollo del trabajo incluyó varios aspectos tecnológicos, entre ellos, principios de óptica, mecanismos automatizados, electrónica y software, unificando diferentes campos de la física y la ingeniería. El equipo construido presenta una mayor rapidez en la detección y cuantificación de hemoglobina S en comparación con los equipos convencionales de electroforesis y cromatografía ya que utiliza la técnica de espectrofotometría acompañada de dispositivos electrónicos de censado y procesamiento de datos que permiten la obtención de resultados de manera inmediata desplegados en un display.

Por lo anterior, el objetivo general del proyecto fue el diseño y construcción de un sistema óptico automatizado para la detección y cuantificación de

hemoglobina S en muestras in vitro de sangre, mediante la medida del espectro de absorbancia de luz láser de baja potencia. Para la consecución de este objetivo fue necesario alcanzar objetivos específicos tales como diseñar el prototipo automatizado útil para la detección, análisis y cuantificación de hemoglobina S.

De acuerdo con los requerimientos del uso, manipulación y eficiencia del equipo se hizo un primer diseño basado en un espectrofotómetro de doble haz que permitiría la toma de datos de la muestra en estudio y de una muestra patrón de forma simultánea de modo que se posibilitara una comparación directa de los datos. Los detalles de este diseño se encuentran en el **capítulo IV**. Este diseño se llevó a la etapa de construcción, que fue interrumpida por presentar fallas en uno de sus componentes, no obstante tanto el diseño como los pasos que se siguieron dentro de la fase de construcción fueron la guía para el diseño y la construcción del equipo final, es decir, el espectrofotómetro LS-532. La fase de construcción del espectrofotómetro de doble haz se registra en el **capítulo V** y lo correspondiente al diseño y construcción del espectrofotómetro LS-532 se encuentra en el **capítulo VI**.

Con la construcción del espectrofotómetro LS-532 se pasó a realizar el proceso de calibración correspondiente construyendo una recta de calibración haciendo uso de resultados obtenidos con la técnica de electroforesis. Como paso siguiente se probó la funcionalidad del equipo haciendo pruebas a una muestra y comparando los resultados con los obtenidos a partir de electroforesis para la misma muestra. Los resultados de calibración y de prueba de funcionalidad así como su análisis se encuentran en el **capítulo VII**.

Finalmente se consignan las **conclusiones** emanadas del trabajo. En el Anexo 1 se consigna el manual de funcionamiento del espectrofotómetro LS-532. A pesar del buen funcionamiento del equipo construido, es posible hacerle mejoras, en el anexo C se incluyen algunas de ellas como también algunas recomendaciones.

REFERENCIAS

[1] Revista Panamericana de Salud Pública v. 3. 1 Washington Jan. 1998. [En línea]. [Consultado 31 de enero de 2008]. Disponible en: <<http://www.scielosp.org/scielo.php?lng=pt>>

[2] Itano, H.A.:Solubilities of naturally occurring mixtures of human hemoglobin, Arch, Biochen. Biophys. 47: 148, 1995

CAPÍTULO II
BASES TEÓRICAS I
HEMOGLOBINA

La **hemoglobina** (Hb) es una heteroproteína de la sangre, de color rojo característico, que transporta el oxígeno desde los órganos respiratorios hasta los tejidos, en mamíferos, ovíparos y otros animales. La **hemoglobina A (HbA)** es un tipo de hemoglobina, llamada también hemoglobina del adulto o hemoglobina normal, que representa aproximadamente el 98% de la hemoglobina sintetizada en el adulto.

Cuando la concentración de hemoglobina en sangre es baja o cuando la cantidad de glóbulos rojos es menor que lo normal se produce un trastorno de la sangre conocido como anemia. La *anemia de células falciformes* o *anemia drepanocítica* es una hemoglobinopatía (enfermedad que afecta la hemoglobina), es de origen genético y se da por la sustitución de un aminoácido en su conformación, esto provoca que a baja tensión de oxígeno la hemoglobina se deforme y el eritrocito adquiera apariencia de una hoz (ver figura 1.1); la nueva forma provoca dificultad para la circulación de los glóbulos rojos, por ello se obstruyen los vasos sanguíneos y causan síntomas como dolor en las extremidades..

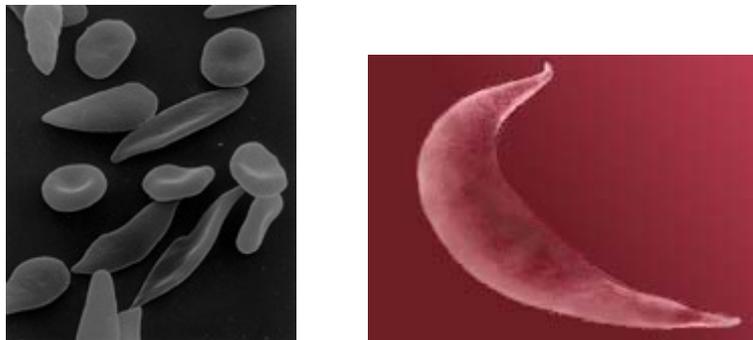


Figura 2.1. Glóbulos rojos falciformes o en forma de hoz.

Las **hemoglobinas anormales S y C** (HbS y HbC), que prevalecen en el África y partes de Europa y las Américas, y la hemoglobina E (HbE), que es más común en Asia Sur oriental, son responsables de diversos trastornos y de tasas de mortalidad elevadas, ya que constituyen variantes funcionalmente anormales de la hemoglobina A [1].

2.1 HEMOGLOBINA S (HbS)

La *globina* es una proteína, que forma parte de la Hemoglobina (heteroproteína) siendo la globina la parte proteica. Existen varios tipos de "cadenas" de globina, que se designan mediante letras griegas (alfa, beta, gamma, delta, epsilon y zeta) [2]. La globina es la parte proteica de la hemoglobina (apoproteína). El hemo es el grupo prostético (grupo o molécula no proteica de una proteína, como por ejemplo un enzima) de la hemoglobina (ver figura 2.2). La hemoglobina S es una variante de la hemoglobina resultado de una alteración de la estructura de la globina beta. Es la variante de la hemoglobina más común clínicamente y la mas estudiada [3].

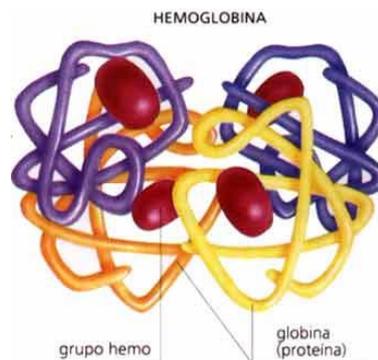


Figura 2.2. Esquema de la hemoglobina ilustrando sus dos componentes: grupo hemo y globina.

La anemia falciforme [4] es una enfermedad hereditaria, producida por la presencia de la hemoglobina S en su forma homocigoto (SS), que produce un cambio de aminoácido en la posición 6 de beta globina normal, cambiando ácido glutámico por valina (ver figura 2.3), lo que disminuye la solubilidad de la proteína, de tal manera que la hemoglobina S forma polímeros produciendo un glóbulo rojo en forma de hoz como se muestra en la figura 2.1. Esta característica produce la liberación del grupo hemo, que interactúa con la membrana de los glóbulos rojos, causando hemólisis con la consecuente anemia [5]. La herencia de esta hemoglobina sigue las leyes Mendelianas[4], de tal manera que si un progenitor es portador de la hemoglobina S y el otro no, lo más probable es que la mitad de los hijos sean portadores de la HbS y la

otra mitad sanos, en cambio si los 2 progenitores son portadores de la HbS, en cada gestación hay una probabilidad del 25% de que el niño sea normal, una probabilidad de un 50% de que sea portador de HbS (lo que se denomina paciente con rasgos falciformes) y un 25% de probabilidad de que el niño tenga enfermedad (anemia falciforme) por HbS.

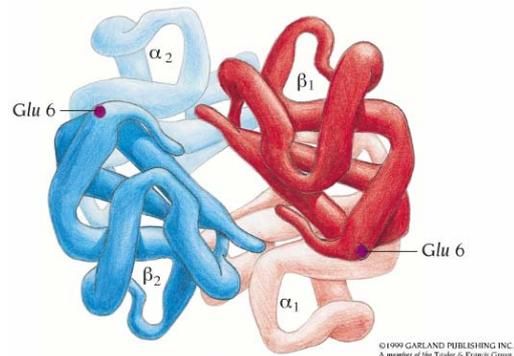
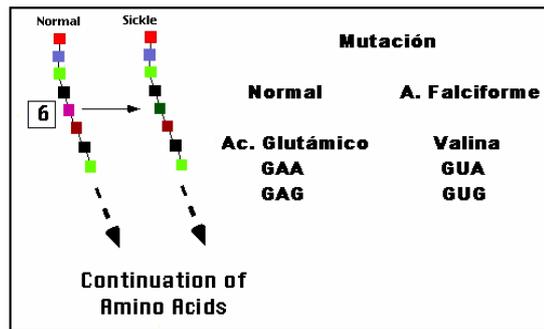


Figura 2.3. Cambio de aminoácido en la posición 6 de beta globina normal, cambiando ácido glutámico por valina.

Por medio de electroforesis se determinó que los pacientes con anemia falciforme tienen hemoglobina S pero no hemoglobina A (homocigotos) y los pacientes con rasgos falciformes tienen ambos tipos de hemoglobina en cantidades aproximadamente iguales (heterocigotos) [6].

Las manifestaciones clínicas más frecuentes de esta enfermedad son: [7] Anemia; Crisis aplásica; Dactilitis o síndrome mano pie (los niños pequeños pueden tener dolor e hinchazón en manos o pies); Episodio o crisis dolorosa (se dan con mayor frecuencia en los brazos, manos piernas, o abdomen y se producen por la vaso oclusión); Infecciones graves (las personas afectadas, sobre todo niños, tienen un riesgo grande de padecer sepsis, meningitis y neumonías); Crisis de secuestro esplénico, (el bazo crece por secuestro de glóbulos rojos en su interior); Accidente cerebrovascular (se da cuando la circulación cerebral se bloquea por glóbulos rojos falciformes); Complicaciones pulmonares; Infartos óseos (que afectan a huesos largos y vértebras y con la evolución de la enfermedad, se puede presentar necrosis de la cabeza

femoral); Complicaciones visuales, cardiaca, de riñón, del hígado y vías biliares.

2.2 HEMOGLOBINA AS O FORMA HETEROCIGOTA (RASGO FALCIFORME)

Las personas con rasgo falciforme son portadoras de la hemoglobina AS [8], son asintomáticas, las cifras y la morfología sanguínea son normales así como lo son su desarrollo físico, actividad y longevidad. En estas personas la concentración de la HbS es menor del 50%, no obstante, en algunas circunstancias de anoxia (falta casi total de oxígeno en un tejido), puede ocasionalmente presentar complicaciones. El diagnóstico de enfermedad de células falciformes se establece con base en la identificación de la hemoglobina S. Hay varias pruebas de laboratorio para poner en evidencia la presencia de HbS:

- *El test de falciformación:* se basa en la desoxigenación de la sangre in Vitro cuando se pone en contacto con un agente reductor.
- *Prueba de solubilidad:* consiste en la observación de que la hemoglobina S en estado reducido es muy insoluble en tampón fosfato concentrado.

Electroforesis de Hb: Se verá una banda de desplazamiento lento con relación a la HbA. En los heterocigotos la proporción de HbS oscila entre un 35% y un 45% del total de hemoglobina.

2.3 MÉTODOS PARA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE HbS

Desde que se conoció que existía una enfermedad relacionada con células falciformes se comenzaron a hacer pruebas para determinar anomalías en la hemoglobina. Entre las pruebas más usadas se encuentra la prueba de electroforesis de hemoglobina en medio alcalino y ácido[9] y la prueba de desoxihemoglobina [10].

La enfermedad falciforme es el prototipo de hemoglobinopatía heredada más frecuente en el Continente Americano. Estadísticas estadounidenses muestran una prevalencia de hemoglobina AS del 5 al 14% en afroamericanos [11] y otros la ubican cerca del 8% [12] con una incidencia aproximada de un homocigoto por cada 500 afroamericanos mientras que en los negros africanos, en áreas endémicas de malaria, se ha podido encontrar hasta un 30% de portadores de hemoglobina AS [13].

En Colombia los procesos para detección y cuantificación de HbS se realizan a través de pruebas de laboratorio, siendo una de las más utilizadas la *prueba de electroforesis de hemoglobina*, con la cual se puede cuantificar hemoglobina S llevándola previamente a un fotodensitómetro.

En el Departamento del Cauca hay una alta incidencia de pacientes con anemia de células falciformes ya que aproximadamente el 33% de la población es afrocolombiana [15], lo cual implica un número significativo de pacientes que requieren tratamiento especializado. En la Unidad de Hematología del hospital Universitario San José de la ciudad de Popayán se cuenta con un equipo de electroforesis que permite hacer un análisis cualitativo de HbS mas no cuantitativo ya que no cuenta con el fotodensitómetro. La prueba consiste en utilizar tiras de acetato de celulosa como soporte, en las cuales se deben correr varias muestras de diferentes pacientes para solventar el costo del acetato, lo que hace la prueba lenta y costosa. Como alternativa se realiza otra prueba de tipo cualitativo conocida como *prueba de solubilidad de la desoxihemoglobina* que se basa en la observación, dando certeza solo de la presencia de HbS en la muestra mas no de su concentración.

2.3.1 Electroforesis de hemoglobina

La electroforesis es el movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico. Dependiendo del pH varias hemoglobinas pueden separarse entre sí con facilidad debido a diferencias en su carga eléctrica neta causadas por las

variaciones estructurales. Todo escrutinio electroforético debe iniciarse a pH alcalino (8.4 - 9.1), pues es el sistema que mejor permite la identificación preliminar de hemoglobinas tanto rápidas como lentas. Es muy importante que la concentración de hemoglobina se encuentre en niveles de 3 a 6 g/dl, así como que el sistema de aplicación de la muestra se estandarice adecuadamente. Se deben tener en cuenta algunas consideraciones respecto a la electroforesis, entre ellas están: la fuerza iónica, pues a mayor fuerza iónica mayor es la migración de las proteínas; el voltaje, pues a mayor voltaje las proteínas se mueven más rápidamente; los medios de corrida de la electroforesis, que pueden variar en el tamaño del poro, su distribución y el volumen y, finalmente, la cuantificación, que se puede hacer por varios métodos, el más popular es teñir la proteína con un colorante visible y luego medir la intensidad del colorante y correlacionarlo con la concentración de la proteína, las fracciones se eluyen y miden en un espectrofotómetro, o las cintas son aclaradas y leídas luego en un densitómetro. Se requiere de materiales y equipos sofisticados que no están al alcance de laboratorios de baja complejidad y generalmente se requiere un número mínimo de muestras para ser procesadas, pues el costo de la prueba no permite que se realice en caso de urgencia. En la tabla 2.1 se muestra un resultado típico a una prueba de electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa a pH alcalino [9].

Tabla 2.1 Electroforesis de hemoglobina en acetato de celulosa a pH alcalino

Hemoglobinopatía	Origen	A ₂	C	S	F	A
Normal		■				■
Anemia drepanocítica		■		■	■	
Rasgo de drepanocitemia		■		■		■
Hemoglobina S/C		■	■	■		
Hemoglobina S/talasemia B ⁺				■		■
Hemoglobina S/talasemia B ⁰				■		
Rasgo de talasemia B ⁰		■				■
Rasgo de hemoglobina C		■	■			■
Hemoglobina C/C		■	■			

Cuando el análisis se realiza sobre pH alcalino, la hemoglobina S migra de modo más lento que la A y la F (ver tabla 2.1). Más aún, la hemoglobina C se desplaza todavía con mayor lentitud, lo que permite la distinción de las hemoglobinopatías más frecuentes, entre ellas las secundarias a las hemoglobinas S y C y las combinaciones de estas con la talasemia beta.

2.3.2. Prueba de solubilidad de la desoxihemoglobina

Prueba de gran ayuda diagnóstica en la Hemoglobinopatía S pero desafortunadamente poco divulgada por lo cual no se utiliza de rutina en los laboratorios, a pesar de ser una prueba de fácil implementación a bajo costo.

En 1953 Itano [14] encontró que la HbS en el estado reducido (desoxigenada), era muy insoluble en una solución tampón de fosfatos de alta molaridad. En estas condiciones se forman tactoides, los cuales refractan y reflejan la luz y producen una solución turbia (líquido nemático). En las mismas condiciones de la prueba, las hemoglobinas A, D, F, C y muchas otras no muestran ningún cambio en la solubilidad. Además de la HbS, se comportan como insolubles las hemoglobinas C-Harlem, C-Ziguinchor, S-Travis y F-Alexandra. Los tubos de reacción se ubican a 3 cm de una tarjeta blanca que lleva impresas unas 10 líneas horizontales, con una separación de 5 mm entre líneas (ver figura 2.4); una solución turbia indica presuntivamente la presencia de HbS o de cualquiera de las otras hemoglobinas con la mutación 6 glu val. En este caso, las líneas negras no se observan a través de la solución (prueba positiva). Esta prueba también se puede realizar usando hemolizados que tengan una concentración de hemoglobina entre 9 y 11 g/dl, en lugar de sangre total, se recomienda hacerlo cuando se sospecha que un resultado positivo de esta prueba en sangre total es el producto de la presencia de proteínas anormales (falsa positiva). Sin embargo para la prueba con sangre total se puede utilizar eritrocitos lavados, lo que evita falsos positivos debido a la presencia de proteínas anormales [10].

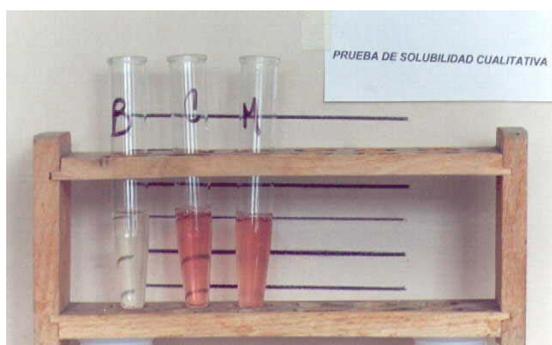


Figura 2.4. Prueba de solubilidad, en el tubo M no se alcanza a notar las líneas negras lo que indica presencia de Hb no solubles. Tomada en el laboratorio de hematología del hospital universitario San José.

En la prueba mostrada en la figura 2. 4 el tubo B, llamado “blanco” contiene el buffer de fosfato al que se adiciona la muestra de sangre. Como se observa, el blanco no presenta turbidez, permitiendo observar claramente las líneas negras. El tubo C, llamado “control normal” contiene el buffer más la muestra de sangre sin presencia de hemoglobina S. Nuevamente, no se observa turbidez y se pueden ver las líneas negras. El tubo M, llamado “muestra” contiene el blanco más una muestra con presencia de HbS. En este caso el grado de turbidez es tal que no permite observar las líneas.

La **turbidez** es la expresión de la propiedad óptica de una muestra que causa que los rayos de luz sean dispersados y absorbidos. Contar con soluciones turbias permite la implementación de leyes de la física óptica, como la ley de Lambert-Beer, para relacionar la atenuación de luz a través de la muestra en estudio con características propias de la muestra. En el siguiente capítulo se expondrá la teoría óptica que permite desarrollar instrumentación para relacionar la concentración de una muestra con su grado de atenuación de luz incidente.

REFERENCIAS

[1] Revista Panamericana de Salud Pública v. 3. 1 Washington Jan. 1998. [En línea]. [Consultado 31 de enero de 2008]. Disponible en: <<http://www.scielosp.org/scielo.php?lng=pt>>

[2] Telen M. Eritrocitos maduros. En: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens J, Lukens J (eds.). Wintrobe Hematología clínica. Buenos Aires: Intermédica; 1994. p. 80-105.

[3] Evaluación clínica de las Hemoglobinopatías. [En línea]. Disponible en: <<http://www.wardelab.com/>>.

[4] Espejo, R. Enfermedad falciforme. [En línea]. Disponible en: <<http://orbita.starmedia.com/-forobioq/art/enfalciforme.html>>.

[5] Rodriguez, J.M. Medicina al día. Avances sobre Anemia Falciforme. Acta Medica Dominicana. Vol 20. N. 6. [En línea]. Disponible en: <<http://www.bvs.org.do/avance.htm>>.

[6] Stryer, L. (1985). Bioquímica. Editorial Reverte. España. Pag 79-85.

[7] Hemoglobina S. Artículo de la Enciclopedia Libre Universal en Español. [En línea]. Disponible en <http://enciclopedia.us.es/index.php/Hemoglobina_S>

[8] J.J. Malcorra, hemoglobinopatías y talasemias. Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario Materno-Infantil. Las Palmas de Gran Canaria. [En línea] Disponible en: <www.comtf.es/pediatria/Bol-2001-2/Hemoglobinopatías>

[9] William, J. W. Manual de hematología. Mcgraw-Hill, 5ª ed. Mexico 1997.

[10] MAILE, J.B. Hematología. Medicina de laboratorio. s.l. : Reverté, 1985. p. 674, 696, 699 – 704.

[11] Ravel. Clinical laboratory medicine. 6th ed. Mosby-Year Book, 1995; 43.

[12] Cotran. Robbins pathologic basis of disease. 6th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1999; 611-615

[13] Johns Hopkins. The Harriet Lane Handbook. A Manual for pediatric house officers. 16th ed, St Louis, Missouri: Mosby, 2002; 289-291.

[14] Itano, H.A.:Solubilities of naturally occurring mixtures of human hemoglobin, Arch, Biochen. Biophys. 47: 148, 1995.

[15] Senso 2005 Cauca Dane. [En línea]. Disponible en: <<http://www.dane.gov.co/files/censo2005/etnia/sys/etnias.pdf>>.

CAPÍTULO III
BASES TEÓRICAS II
ESPECTROFOTOMETRÍA

Como se expresó en el capítulo anterior, una prueba simple y eficaz para detectar presencia de hemoglobina S en muestras de sangre consiste en observar el grado de turbidez de la muestra cuando ha pasado por un proceso de solubilidad. Para efectos de diagnóstico no es suficiente con comprobar la presencia de hemoglobina S en la sangre, también es necesario contar con su cuantificación. Tomando en cuenta que la turbidez es la expresión de la propiedad óptica de la muestra, los métodos espectroscópicos son una adecuada opción para este tipo de medidas.

Los métodos espectroscópicos están basados en la interacción radiación electromagnética- materia donde la materia puede estar en forma de átomos libres o moléculas [1]. La espectroscopía se divide en *espectrografía*, cuando el espectro se recoge en una placa fotográfica y *espectrofotometría*, cuando se miden variaciones de intensidad [1].

La espectrofotometría se refiere a la medida de cantidades relativas de luz absorbida por una muestra, en función de la longitud de onda. Se usa para diversas aplicaciones como análisis cuantitativo y cualitativo de soluciones desconocidas en un laboratorio de investigación, estandarización de colores de diversos materiales como plásticos y pinturas, detección de niveles de contaminación en aire y agua, y determinación de trazas de impurezas en alimentos y en reactivos.

Cada componente de una solución tiene su patrón de absorción de luz característico dentro de lo que se conoce como espectro electromagnético. En la figura 3.1 se muestran las regiones del espectro electromagnético según la longitud de onda y la frecuencia. Comparando la longitud de onda y la intensidad del máximo de absorción de luz de una muestra versus soluciones estándar, es posible determinar la identidad y la concentración de componentes disueltos en la solución.

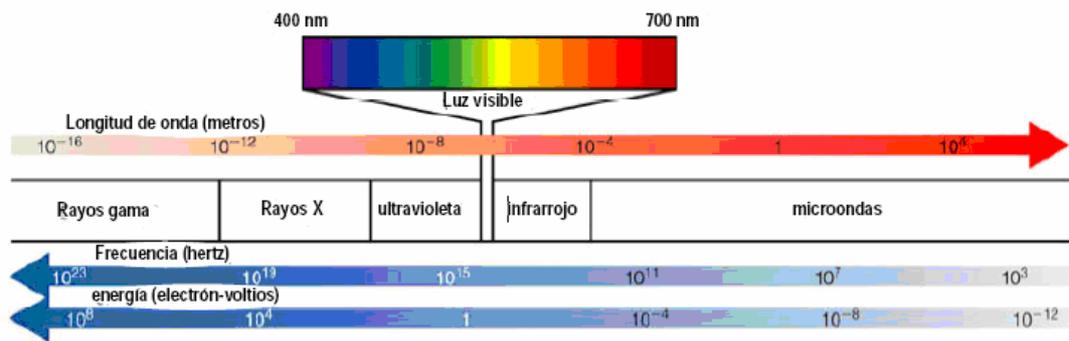


Figura 3.1. Espectro electromagnético

Las ventajas de la espectrofotometría sobre otros métodos analíticos de laboratorio son varias: es rápida, precisa, versátil, fácil de usar y eficiente en costo, por ejemplo, un espectrofotómetro de UV- VIS funciona de un modo muy simple (ver figura 3.2). Se sitúa la muestra en una cubeta donde va a ser excitada por un haz de luz monocromática a una determinada longitud de onda (λ) seleccionada previamente, que incide sobre ésta. El espectrofotómetro permite la medición tanto de la luz incidente como de la luz transmitida y de ese modo se puede calcular la luz absorbida. Cuando el espectrofotómetro utiliza como fuente de radiación un láser se tiene lo que se conoce como **espectroscopía láser** que no requiere de un monocromador.

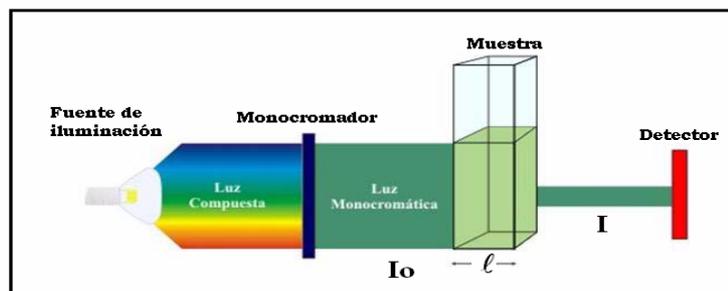


Figura 3.2. Esquema básico de un espectrofotómetro

La espectrofotometría se fundamenta en la ley que relaciona la absorbancia de una muestra con su concentración.

3.1 LEY DE LAMBERT-BEER

Al interactuar la radiación electromagnética con la materia tiene lugar un proceso absorción si la frecuencia de la radiación incidente coincide con la energía necesaria para que el sistema pase a un nivel de energía superior permitido.

Existen dos leyes fundamentales que rigen el comportamiento de la fracción de la radiación incidente absorbida al pasar a través de una muestra dada. La primera de estas leyes, formulada por Bourguer en 1729 y restablecida por Lambert en 1768, se conoce como la ley de Lambert [2] y predice el efecto que produce el espesor del medio-muestra sobre la fracción de radiación que se absorbe. La segunda ley, establecida en 1852 y llamada ley de Beer [2] establece el efecto de la concentración. La ley de Lambert-Beer es la forma combinada de estas dos leyes pero se conoce como la ley de Beer ya que la concentración de la especie absorbente es el factor más importante en la aplicación de estas leyes. Aunque la ley de Beer se utiliza generalmente en la zona central del espectro electromagnético, de ultravioleta al infrarrojo, se cumple para los procesos de absorción en cualquier zona del espectro y de hecho es la base de las aplicaciones cuantitativas de la absorción.

3.1.1 Ley de Lambert

Johann Heinrich Lambert en 1760 llegó a la conclusión intuitiva y razonable de que cada unidad de longitud de material a través del cual pasa la radiación absorbe la misma fracción de radiación. Así, dado un haz monocromático y paralelo de intensidad I que pasa a través de un espesor db de material absorbente, la disminución de la intensidad puede establecerse matemáticamente como

$$dI = -KIdb \quad (3.1)$$

Donde dI es la variación de intensidad y K es una constante de proporcionalidad; el signo menos significa que I disminuye al aumentar b . La

ecuación (2) es la forma definitiva de la ley de Lambert que es una ley exacta y aplicable a cualquier medio homogéneo y no dispersivo, con independencia de si se trata de un gas, un sólido o una disolución, aunque en la mayor parte de los casos de interés analítico se trata de disoluciones.

$$\log \frac{I_o}{I} = \frac{K}{2,303} b \quad (3.2)$$

3.1.2 Ley de Beer

August Beer en 1852 encontró que un aumento de la concentración del soluto absorbente produce el mismo efecto que un aumento proporcional en la distancia que recorre la radiación. Esto es obvio ya que un aumento de soluto de un volumen dado de disolución producirá un aumento del mismo orden del espesor efectivo de la capa que absorbe la radiación. Así, la constante de proporcionalidad K de la ecuación (3.2) es a su vez proporcional a la concentración C de soluto absorbente, lo cual se puede expresar como:

$$\frac{K}{2,303} = aC \quad (3.3)$$

Donde a es la nueva constante de proporcionalidad. La sustitución de la ecuación (3.3) en (3.2) permite obtener la forma logarítmica de la ecuación de Beer.

$$\log \frac{I_o}{I} = abC \quad (3.4)$$

La ley de Beer es fundamental en los métodos ópticos de análisis, ya que permite calcular la concentración de una sustancia a partir de la radiación absorbida por una disolución de la misma.

La ecuación (3.4) se utiliza con tanta frecuencia que es conveniente hablar de sus términos desde un punto de vista práctico, así, la relación de I/I_0 se conoce como *transmitancia* y no tiene dimensiones. El producto abC también es adimensional ya que es un logaritmo, ahora, b que es la longitud de la cubeta se expresa generalmente en cm y es constante en la mayoría de los casos. a es la absorptividad (o coeficiente de extinción): si C se expresa en gramos por litro la absorptividad tendrá unidades de litro por gramo-cm; si C se expresa en moles por litro a se denominará absorptividad molar (o coeficiente de extinción molar) y se expresa con la letra ϵ . La absorptividad es una constante característica de la sustancia absorbente y de la longitud de onda particular de la radiación utilizada.

Frecuentemente, en el trabajo experimental se utilizan los términos:

- *Porcentaje de transmitancia, (%T)*

$$\%T = \frac{I}{I_0} \times 100 \quad (3.5)$$

- *Absorbancia, (A)*

$$A = \log \frac{I_0}{I} = 2 - \log \%T \quad (3.6)$$

La absorbancia también recibe el nombre de *densidad óptica* (DO). La sustitución de A en la ecuación (3.4) da ley de Beer en la forma:

$$A = abC \quad (\text{Si } C \text{ se expresa en gramos por litro}) \quad (3.7)$$

O bien

$$A = \epsilon bC \quad (\text{Si } C \text{ se expresa en moles por litro}) \quad (3.8)$$

3.2 ESPECTROSCOPIA LÁSER

La espectroscopia láser, por la cual John L. Hall y Theodor W. Hänsch recibieron el Premio Nóbel de Física 2005 [3], tiene como característica que su fuente de radiación es un láser. Puede distinguir células cancerígenas de

células sanas, medir los niveles de glucosa en la sangre, o detectar la presencia de polución en la atmósfera. También ayuda a entender procesos fundamentales de la naturaleza, como por ejemplo cómo dos átomos forman una molécula, o si las leyes de la física cambian con el tiempo.

La palabra "láser" es un acrónimo derivado de *Light Amplification by the Stimulated Emission of Radiation* (Amplificación de luz por medio de emisión estimulada de radiación). Si la luz se encuentra en la región de microondas se denomina 'Máser'.

La radiación láser tiene cuatro importantes propiedades:

- **Direccionalidad:** la luz láser es emitida como un rayo bastante estrecho y de haces paralelos. Esta propiedad hace posible el enviar un rayo láser a diferentes distancias con una divergencia muy pequeña. En la figura 3.3 se muestra la diferencia en direccionalidad de un láser y la de una lámpara ordinaria.

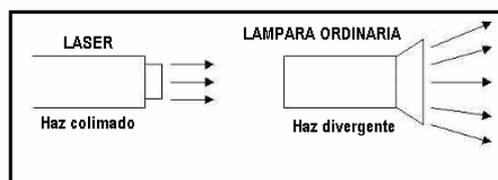


Figura 3.3. Direccionalidad de un láser y una lámpara ordinaria

- **Monocromaticidad:** Un láser emite un "color" (una longitud de onda) o más exactamente una banda muy estrecha de longitudes de onda [4]. Aunque la luz de una lámpara, o la luz del sol, que pase a través de un filtro de vidrio coloreado produce "un color", este color corresponde a una relativamente amplia banda de longitudes de onda, en este sentido es mucho menos "puro" que la luz láser. El filtro absorbe mucha de la energía y por tanto la potencia transmitida por el filtro es baja. Por contraste, un láser emite luz monocromática solamente, con toda la potencia concentrada en una longitud de onda única. La estrechez del

pico mostrado en la figura 3.4 muestra que el ancho de banda de la radiación láser es muy estrecho comparado con cualquier otra fuente de luz.

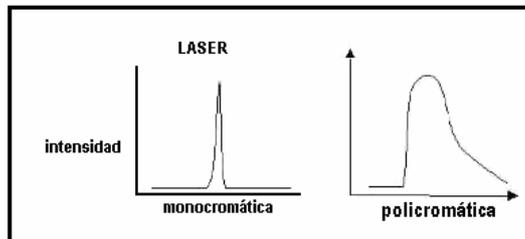


Figura 3.4. Monocromaticidad del láser

- **Luminosidad** (resplandor): La luz de un láser puede ser recogida en su totalidad por una lente, y ser enfocada a un punto lejano más pequeño que el que se obtiene con una fuente convencional [4]. Este punto de enfoque más pequeño del láser contiene mayor cantidad de luz concentrada (una irradiación más alta) que el punto focal de una fuente de luz convencional. En la figura 3.5 se puede evidenciar este hecho.

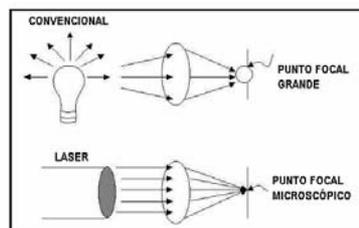


Figura 3.5. luminosidad del láser y una luz convencional

- **Coherencia:** Las fuentes convencionales de radiación son incoherentes, lo que significa que las ondas electromagnéticas asociadas a cualquier par de fotones de la misma longitud de onda están, en general, fuera de fase [4]. La coherencia de la radiación láser es a la vez temporal y espacial: dura un tiempo relativamente largo y se extiende sobre una distancia relativamente grande. La figura 3.6 muestra gráficamente la propiedad de coherencia de un láser vs una fuente de luz convencional.



Figura 3.6. Coherencia de un láser y una luz convencional

3.2.1 Tipos de láser

Los medios activos más utilizados para la generación de emisión láser pueden ser de **estado sólido**, **gas**, **semiconductor** y **colorante** [5].

- *Láser de estado sólido*

Los láseres de estado sólido están contruidos con cristales sólidos como el neodimio, rubí o titanio-zafiro que se excitan con luz intensa. Un láser de titanio-zafiro emite luz sintonizable desde 690 nm a 1.100 nm. Láseres de este tipo se utilizan en la industria, medicina y aplicaciones científicas.

- *Láser de gas*

En los láseres de este tipo el haz es producido en un gas o una mezcla de gases, como argón o helio-neón, que se excitan con una corriente eléctrica. El láser He-Ne es de helio y neón que en su versión más corriente, emite una luz roja de longitud de onda igual a 632,8 nm. Este tipo de láser es de baja potencia y se utiliza con frecuencia en centros de enseñanza. El láser de argón, es de media potencia y se emplea mucho en medicina y aplicaciones científicas.

- *Láser de semiconductor*

Son láseres diminutos contruidos con materiales semiconductores. Emiten un haz fino cuando se excitan por una corriente eléctrica. Un ejemplo es el láser de Arseniuro de Galio, que emite luz IR de longitud de onda entorno a 800 nm.

Este tipo de láseres se emplea sobre todo en equipos e instrumentos electrónicos y en sistemas de telecomunicaciones.

- *Láser de colorante*

El medio activo en este tipo de láser es un colorante líquido, por ejemplo Rodamina. Se excitan normalmente con un láser de argón o lámparas de flash. El colorante absorbe la luz láser de excitación produciendo fluorescencia en un abanico de luz muy amplio cuya emisión láser se selecciona mediante la utilización de prismas u otros elementos ópticos. El rango de longitudes de onda es desde 400 nm hasta 1.000 nm. Se emplea en aplicaciones médicas y científicas.

Dependiendo del tiempo de funcionamiento se distinguen dos clases de láser: Láser continuo y Láser pulsado. Desde el punto de vista de los efectos, tanto físicos como biológicos, es imposible trazar una línea de separación precisa entre ambas clases. La diferencia entre ambos es el tiempo de duración de la emisión láser. De acuerdo con la Norma Europea EN 60825, la duración mínima de la emisión, para ser considerado continuo, es de 0,25 s, que es la duración del reflejo palpebral (característica del ojo humano consistente en el cubrimiento del ojo por el párpado en 0,25 s como consecuencia de un estímulo luminoso suficientemente intenso.).

La potencia de pico de un láser continuo es igual a su potencia media, mientras que en un láser pulsado, su potencia de pico es igual al cociente entre su potencia media y el producto de la anchura de pulso por la frecuencia de repetición. La potencia de pico, así como la energía del pulso (Potencia de pico en vatios por anchura de pulso en segundos), son los parámetros más importantes desde el punto de vista de seguridad láser.

3.2.2 Detectores de luz

Existen varios tipos de detectores pero los más utilizados son los tubos fotomultiplicadores y los fotodetectores.

➤ Fotomultiplicadores

Se llama fotomultiplicador [2] a un tipo de detector óptico de vacío que aprovecha el efecto de emisión secundaria de electrones para responder a niveles muy bajos de iluminación, manteniendo un nivel de ruido aceptable.

Un fotomultiplicador está compuesto de un fotocátodo, que emite electrones cuando sobre él inciden fotones de energía adecuada. Un campo eléctrico acelera estos electrones y los dirige hacia un ánodo, que en estos tubos recibe el nombre de dinodo. La energía de los electrones incidentes provoca la emisión un número mayor de electrones secundarios que son dirigidos hacia un segundo dinodo. El número de dinodos y su disposición varía con el modelo de fotomultiplicador. Un fotomultiplicador convencional se muestra en la figura 3.7.



Figura 3.7. Fotomultiplicador

➤ Fotodiodos

El fotodiodo es un diodo semiconductor, construido con una unión PN, como muchos otros diodos que se utilizan en diversas aplicaciones, pero en este caso el semiconductor está expuesto a la luz a través de una cobertura cristalina y a veces en forma de lente, y por su diseño y construcción será especialmente sensible a la incidencia de la luz visible o infrarroja. Todos los semiconductores tienen esta sensibilidad a la luz, aunque en el caso de los fotodiodos, diseñados específicamente para esto, la construcción está orientada a lograr que esta sensibilidad sea máxima. La figura 3.8 muestra diferentes modelos de fotodetectores que se encuentran en el mercado.



Figura 3.8. Diferentes modelos de fotodetectores

Los diodos tienen un sentido normal de circulación de corriente, que se llama polarización directa. En ese sentido el diodo deja pasar la corriente eléctrica y prácticamente no lo permite en el inverso: es la base del funcionamiento de un diodo. Pero en el fotodiodo la corriente que está en juego (y que varía con los cambios de la luz) es la que circula en sentido inverso al permitido por la juntura del diodo. Es decir, para su funcionamiento el fotodiodo es polarizado de manera inversa. Se producirá un aumento de la circulación de corriente cuando el diodo es excitado por la luz.

Lo que define las propiedades de sensibilidad de un fotodiodo es el material semiconductor que se emplea en la construcción, así:

Silicio: 190–1100 nm

Germanio: 800–1700 nm

Indio galio arsénico (InGaAs): 800–2600 nm

Sulfuro de plomo: 1000-3500 nm

REFERENCIAS

[1] Rocha Castro E.; principios básicos de espectroscopía, Editorial UACH, México 2000.

[2] Olsen D, Eugene. Métodos ópticos de análisis, edición en español. Editorial Reverté S.A. Barcelona (1986).

[3] Nobelprize [en línea]. [Consultado 4 de marzo de 2007]. Disponible en: <http://nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/2005>.

[4] Laser Laboratory [en línea]. [Consultado 4 de marzo de 2007]. Disponible en: < <http://www.elergonomista.com/tecnicas/espectroscopia.htm>>.

[5] Hollas, J Michael, Modern spectroscopy. Editorial Wiley, England 2004

CAPÍTULO IV
DISEÑO DEL ESPECTROFOTÓMETRO
DE DOBLE HAZ

Como se mostró en el capítulo anterior, en el laboratorio de hematología del Hospital Universitario San José utilizan la prueba cualitativa conocida como *prueba de solubilidad de la desoxihemoglobina* para determinar la presencia de hemoglobina S en muestras de sangre. El punto central de la prueba reside en que muestras con contenido de HbS dan como resultados una solución turbia.

La **turbidez** es la expresión de la propiedad óptica de una muestra que causa que los rayos de luz sean dispersados y absorbidos [1], por tanto, contar con soluciones turbias permite la implementación de leyes de la física óptica, como la ley de Lambert-Beer, para relacionar la atenuación de luz a través de la muestra en estudio con características propias de la muestra. Por lo anterior, se trabajó con la hipótesis de que es posible tener una medida de la concentración de la hemoglobina S en muestras de sangre in vitro a partir de medidas de absorbancia.

Dentro del trabajo desarrollado el primer paso consistió en la validación de la hipótesis anterior realizando **curvas de absorbancia** a tres tipos de muestras. Validada la hipótesis, el segundo paso fue **seleccionar la fuente de luz** a utilizar. El tercer paso fue **diseñar el instrumento óptico** que permitiera hacer medidas de absorbancia de muestras de sangre in vitro. Esto requirió de la selección de cada uno de los elementos que lo conforman, así como de las pruebas de caracterización y estabilidad de los mismos, las cuales brindaron información que conllevan a proponer modificaciones al diseño. Con la información recolectada en cada paso, se optó por diseñar un espectrofotómetro de haz sencillo. A continuación se presentan los detalles de cada uno de estos pasos.

4.1 CURVAS DE ABSORBANCIA

Inicialmente se eligieron tres pacientes con características diferentes: un paciente homocigoto HbS-HbS, muestra denominada **Y**, un paciente heterocigoto HbS-HbA, muestra denominada **A**, y un paciente exento de HbS,

muestra denominada **control normal**. Las 3 muestras fueron sometidas a la prueba de solubilidad de la desoxihemoglobina, tal como se describe en el capítulo 1, obteniéndose una respuesta positiva para las muestras Y y A, esto es, turbidez. Posteriormente las muestras fueron llevadas a un espectrofotómetro y se midió su absorbancia haciendo un barrido alrededor de los 540nm, longitud de onda utilizada para medición en el laboratorio del hospital. Los resultados se muestran en la figura 4.1.

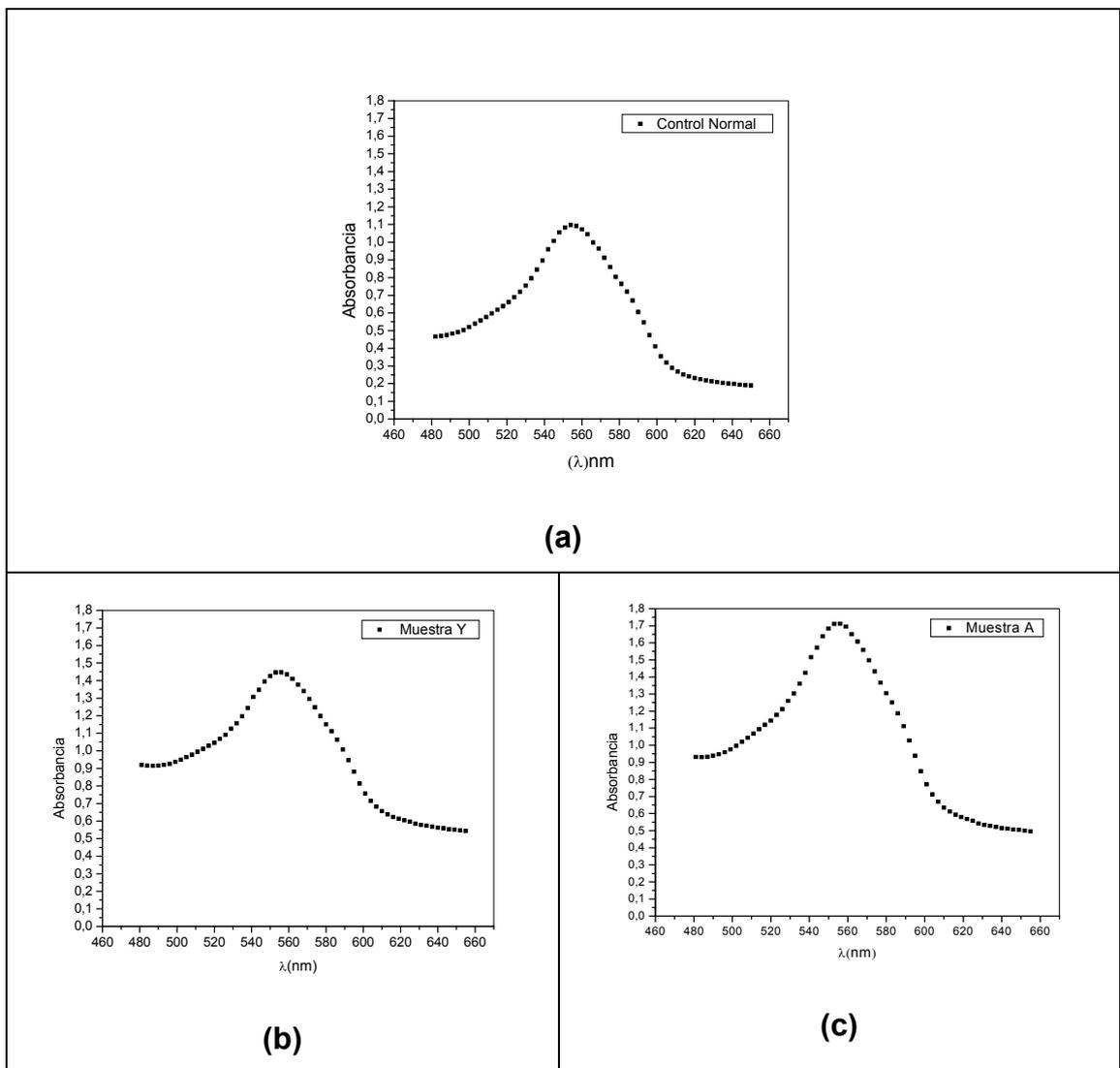


Figura 4.1. Curvas de absorbancia. a) Control Normal, b) paciente homocigoto, Y c) paciente heterocigoto, A.

A partir de las figuras se tienen las curvas características para las diferentes muestras. Como se observa, para las tres muestras el rango de absorción de HbS está entre 480nm y 640nm, siendo que se presenta un pico máximo a 554 nm.

4.2 ELECCIÓN DEL LA FUENTE DE RADIACIÓN

El rango de absorción mostrado por las muestras estudiadas permite utilizar la espectroscopía láser (longitud de onda específica) para medir el grado de absorbancia y, por tanto, la concentración de HbS en cada muestra. Por otro lado, la espectroscopía láser permite diseñar un moteje económico y portable, características deseables para la instrumentación en los centros de salud de la región de incumbencia.

La tabla 4.1 muestra datos obtenidos de absorbancia para las tres muestras a tres longitudes de onda: 554 nm que es el pico de máxima absorción, 540 nm que es la longitud de onda a la cual hacen la lectura en el laboratorio de hematología del Hospital San José y 532 nm que es la longitud de onda de un láser comercial.

Tabla 4.1 Datos de absorbancia obtenidos de la figura 4.1

Muestras	Longitud de onda de Absorción (nm)		
	$\lambda=554$	$\lambda=540$	$\lambda =532$
Control Normal	1,097	0,896	0,796
Y	1,447	1,307	1,156
A	1,712	1,516	1,303

Como muestran los resultados, a pesar de que la absorción presentada por las muestras a 532 nm es la más baja entre las tres longitudes de onda, los resultados obtenidos (0,796; 1,156; 1,303) presentan diferencias significativas,

lo que permite diferenciar entre las tres muestras. Por tanto, la fuente de luz elegida fue un láser de 532 nm.

4.3 ESPECTROFOTÓMETRO DE DOBLE HAZ

Un espectrofotómetro es un sistema que permite determinar la cantidad de luz que absorbe, transmite o refleja un sistema en función de la longitud de onda de la misma [1].

Lo usual es utilizar como fuente de luz una lámpara que tenga una emisión intensa en todo el intervalo de longitudes de onda que se quiere analizar. La emisión de la lámpara pasa a través de un monocromador que selecciona la luz a una determinada longitud de onda, por lo cual si se conoce la longitud de onda a la que se desea trabajar, la lámpara puede ser sustituida por un láser. La luz monocromada se divide mediante un divisor de haz que la separa en dos haces de luz de igual intensidad. Uno de los haces pasa directamente al detector, mientras que el otro atraviesa la muestra antes de llegar al mismo. Posteriormente el detector compara la luz que le llega en los dos sensores y calcula la cantidad de luz que ha transmitido (o absorbido) la muestra.

En este trabajo se planteó el diseño de un espectrofotómetro de doble haz ya que es un instrumento que permite tomar datos simultáneamente del haz que pasa por el blanco y del haz que pasa por la muestra, lo cual garantiza buenos resultados ya que minimiza el efecto de fluctuaciones de la intensidad de la fuente luminosa, usando un circuito de doble haz con dos fotosensores haciendo que las fluctuaciones afecten por igual a ambas medidas. El diseño se presenta en la figura 4.2.

4.3.1 Selección de componentes del espectrofotómetro

Para la elección de cada uno de los componentes del espectrofotómetro de doble haz se consideraron aspectos tales como calidad y precio. Como primer

elemento se analizó la fuente de radiación y posteriormente el divisor de haz y los fotodetectores. Otro componente importante que requiere de un análisis especial es la cubeta o “portamuestras”, que debe cumplir con requerimientos específicos. Finalmente, los soportes de cada uno de los elementos deben ser diseñados de tal forma que aporten estabilidad al instrumento, minimizando a su vez el peso. A continuación se describe cada uno de estos elementos.

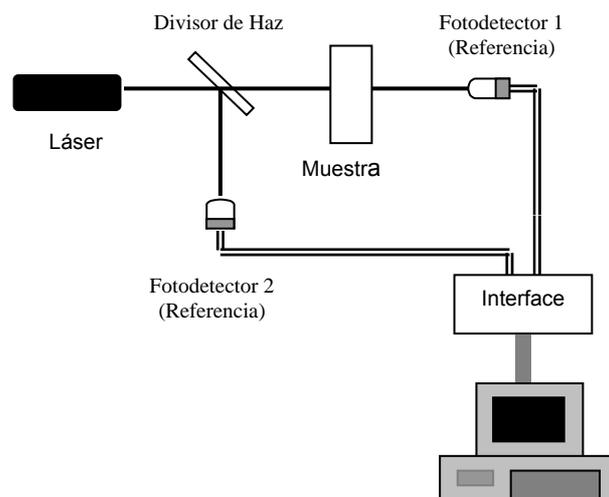


Figura 4.2. Diseño de un espectrofotómetro de doble haz

➤ Fuente de radiación

En el mercado se encuentran varios tipos de láser, en un amplio rango de calidad y precio. El tipo de láser seleccionado fue un módulo diodo láser de 532nm y 5mW de potencia (ver Figura 4.3), con buenas características ópticas y eléctricas y con un precio que se ajustó a las condiciones del proyecto.



Figura 4.3. Módulo diodo láser de 532nm a 5mw

La tabla 4.2 muestra las especificaciones físicas y eléctricas de la fuente de radiación utilizada.

Tabla 4.2. Especificaciones físicas y eléctricas del modulo diodo láser [2]

Propiedades físicas			
	Típico	Mínimo	Máximo
Longitud	35mm		
Diámetro	12mm		
Temperatura de operación	+25°C	+10°C	+30°C
MTBF	5000 horas		>10,000 horas
Salida del LASER			
Longitud de onda	532 nm		
Potencia de salida	4.00mW	2.50mW	4.99mW
Diámetro del haz	1.2 mm		
Divergencia del haz	<2.0mrad		
Modo	CW, Single/TEM00		
Warm up	1 minuto		
Requerimientos eléctricos			
Voltaje de alimentación	3.0VDC	2.4VDC	3.5VDC
Corriente	190mA	150mA	350mA

➤ **Divisor de haz**

El divisor de haz seleccionado fue el EBS05 de la empresa Thorlabs (figura 4.4 a), el cual tiene una relación 50:50 de Reflexión y Transmisión del espectro visible (450-650nm) lo que permite un mejor tratamiento de los datos ya que los dos haces son iguales en intensidad (figura 4.4 b). No obstante, esta relación no se da para todas las longitudes de onda, ya que, como se observa en la figura 4.5, para la longitud de 532nm esta relación se aleja un poco de 50:50 (Transmisión – Reflexión). Además, este divisor de haz es el más barato del mercado, lo que está reflejado en su nombre: Economy Visible Beamsplitter.

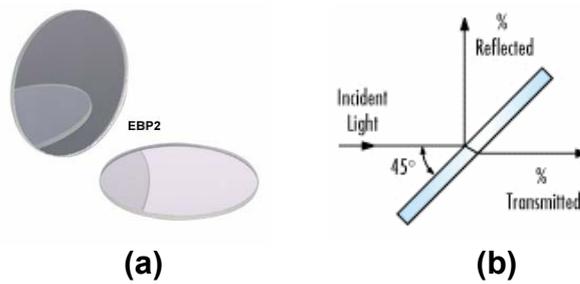


Figura 4.4. a) Divisor de haz EBS05, b) Haz reflejado y haz Transmitido a un ángulo de 45°

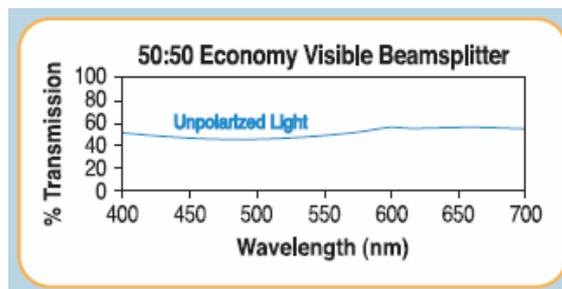


Figura 4.5. Comportamiento del divisor de haz de 400-700nm

➤ **Fotodetectores**

Para la adquisición de datos es importante la clase de sensor que transforma la señal de luz en señal eléctrica, ya que de la sensibilidad del detector depende la calidad y precisión de los resultados. Las propiedades ideales de un detector son: alta sensibilidad, respuesta constante, corto tiempo de respuesta, mínima señal en ausencia de radiación y respuesta lineal respecto a la señal de entrada. Por lo anterior, el detector elegido fue un fotodiodo PIN FDS100, que se presenta en la figura 4.6.

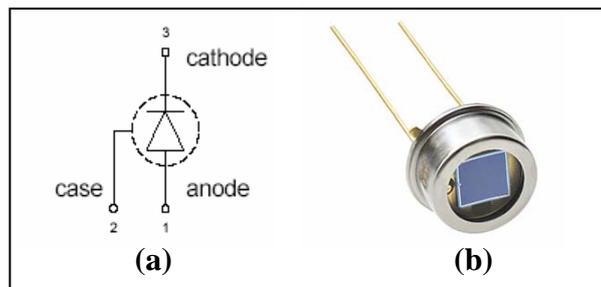


Figura 4.6. Fotodiodo PIN FDS100. a) esquemático. b) Imagen

El fotodiodo PIN FDS100 fue seleccionado por sus características (tabla 4.3), una amplia área activa que permite recoger la mayor cantidad de luz, su alta rapidez de respuesta, su alta ganancia y una respuesta espectral muy eficiente a 532nm (ver figura 4.7)

Tabla 4.3. Características eléctricas del Fotodiodo PIN FDS100 [3]

Características eléctricas	
Respuesta espectral	350-1100nm
Área activa	13.0mm ²
Rise time (RL=50)	10ns (20V bias)
Fall time (RL=50)	10ns (20V bias)
Corriente oscura	20nA max (20V)

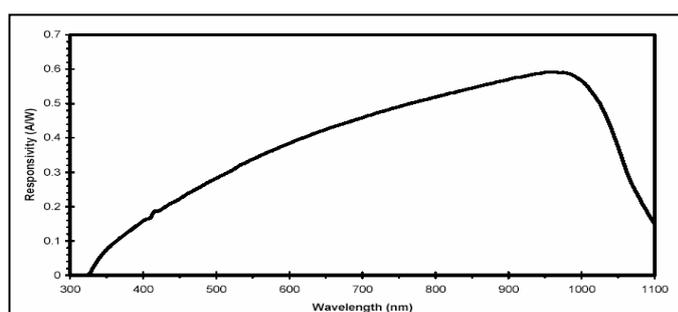


Figura 4.7. Curva típica de respuesta del Fotodiodo PIN FDS100

➤ **Cubeta**

Para la medida de absorbancia de una muestra de sangre con fines de diagnóstico médico, el montaje experimental debe posibilitar la reproducibilidad de la medida. El portamuestras es quizá el componente instrumental con el que mas contacto tendrá el operario. Para la selección de la cubeta se tuvieron en cuenta características físicas tales como: caras planoparalelas - lo que brinda menor dispersión- y separadas a la misma distancia -lo que garantiza longitud de camino óptico constante-; que tengan mínima absorción en la región del visible; que garantice una ventana óptica ópticamente perfecta para tener mínimas aberraciones ópticas. Todas estas características las reúne las cubetas desechables semimicro de 1.5ml de la empresa PLASTIBRAND®, figura 4.8.



Figura 4.8. Cubeta desechable semimicro de 1.5ml

Tabla 4.4. Características generales de la cubeta [4]

Características	
❖	Clasificadas según número de cavidad - bajas desviaciones de los valores de absorción.
❖	Ventana óptica ópticamente perfecta
❖	Ventanas ópticas hundidas para protección contra rayado
❖	Flecha indicadora de la dirección del haz de luz
❖	A pesar de aplicar la técnica más moderna no se pueden evitar unas mínimas tolerancias en las dimensiones entre cavidad y cavidad. Esto conlleva una mayor dispersión de los valores de absorción. Por este motivo se clasifican y embalan juntas sólo cubetas con el mismo número de cavidad, de forma completamente automática, siempre 100, 500 ó bien 1000 cubetas por unidad de embalaje.

Para obtener datos reproducibles es necesario utilizar siempre cubetas del mismo embalaje.

➤ **Soportes**

Los soportes ópticos requieren de soportes firmes, sujetos a una superficie igualmente estable y que estén alineados con el eje óptico del sistema. Teniendo en cuenta lo anterior se diseñaron soportes para cada uno de los

elementos requeridos y se mandan a fabricar en la empresa SISGAR en Popayán. Los soportes son los siguientes:

Soporte para el láser

El material utilizado fue el aluminio por su fácil moldeabilidad, costo y porque permite una buena disipación de calor. En la figura 4.9 se esquematiza el soporte para el láser



Figura 4.9. Soporte para el láser

Soporte para el divisor de haz

El soporte para el divisor de haz EBS05 es el LMR05 de Thorlabs. La base para sujetar este soporte se diseñó en acrílico, que permite fijar el soporte con la superficie a la altura adecuada para la alineación con el eje óptico, y de color negro mate para minimizar reflexión de la luz.



Figura 4.10. Soporte para el divisor de haz

- **Soporte para el sensor**

Para eliminar la mayor cantidad de luz que no provenga de la fuente se diseñó para el sensor un soporte en acrílico color negro mate.



Figura 4.11. Soporte para el sensor

4.3.2 pruebas de caracterización, estabilidad y/o comportamiento de los elementos

➤ **El láser**

Para medir la estabilidad del láser se alimentó con una fuente regulada y se alineó frente al sensor del luxómetro (LUTRON Modelo LX-102 Light meter), figura 4.12. El láser se ubico a una distancia de 10 cm del sensor del luxómetro. Para eliminar el ruido de la luz externa ambos dispositivos dentro de una caja de color negro. Se tomaron datos continuos durante 25 minutos, los que se muestran en la figura 4.13.

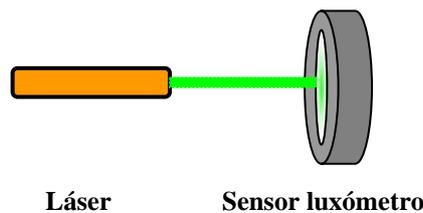


Figura 4.12. Montaje para medir la estabilidad del Láser.

De los datos de iluminancia obtenidos se calculó la variabilidad respecto al valor medio. El valor estadístico de varianza fue de 6,71575 respecto del valor medio que fue de 1076,315 lo cual indica que el láser tiene una buena estabilidad. Teniendo en cuenta que en las especificaciones del láser dice que es estable a partir de los 5 minutos, se obtuvo la varianza de los datos después de los 5 minutos, obteniéndose un valor de 4,44547. Este valor es menor que la anterior, corroborando lo especificado.

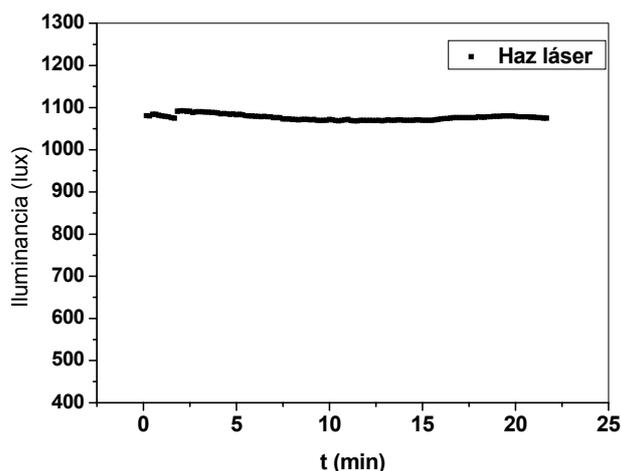


Figura 4.13. Datos obtenidos de iluminancia provenientes del láser durante un periodo de 25 minutos

➤ **El sensor fds100**

Para la caracterización del sensor FDS100 se montó el diseño mostrado en la figura 4.14. El láser se alimentó con una fuente regulada, se alineó frente a un polarizador sujeto a un soporte giratorio y al sensor. El láser se dejó calentar durante un periodo de 5 minutos, después del cual se giró el polarizador cambiando el ángulo de polarización cada 10 grados durante un tiempo de 2 minutos (para asegurar la estabilidad del láser) tomándose datos continuamente, alternando el luxómetro y el sensor. Como se observa en la figura 4.15 el sensor tiene una respuesta lineal con respecto a la respuesta del luxómetro, comportamiento requerido para la toma de datos.

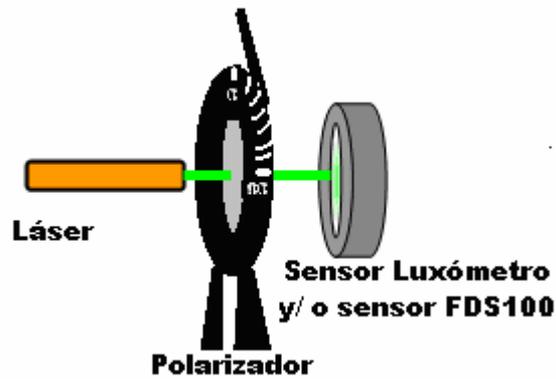


Figura 4.14. Montaje para la caracterización del sensor FFDS100 con un polarizador

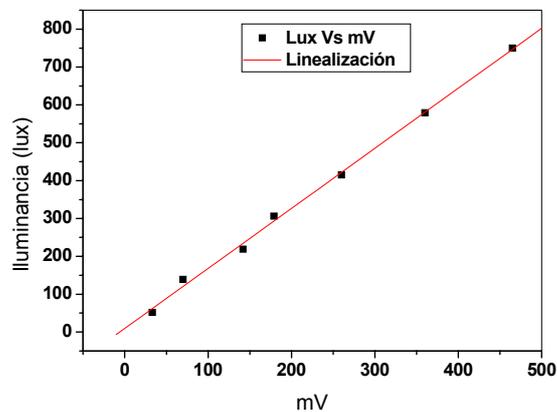


Figura 4.15. Datos obtenidos de iluminancia y de voltaje provenientes del láser con un polarizador

➤ **El divisor de haz**

Para observar el comportamiento del divisor de haz, el láser se alimentó con una fuente regulada, se alineó el sensor del luxómetro No1 a 10cm del láser. El divisor de haz se colocó a 3cm del láser en un ángulo de 45° con respecto al haz incidente. El sensor del luxómetro No2 se alineó frente al haz reflejado a 7cm del divisor de haz, tal como lo muestra la figura 4.16. Todos los elementos se colocaron dentro de una caja cerrada de color negro para evitar el ruido proveniente de la luz externa.

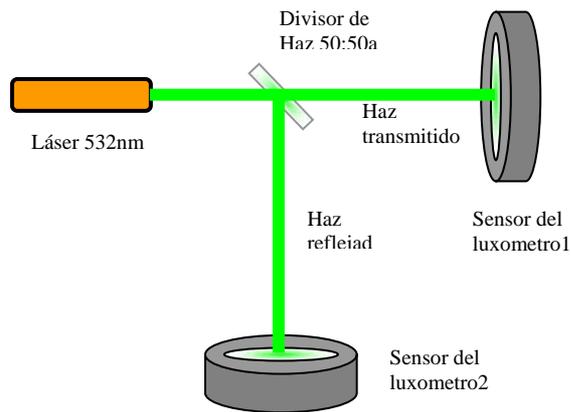


Figura 4.16. Montaje para caracterizar el divisor de haz

Se tomaron datos de iluminancia del haz reflejado y del haz transmitido durante un periodo de 50 minutos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.17.

Los dos haces obtenidos a través del divisor de haz no son iguales en intensidad, como se esperaría teóricamente y por el contrario presentan un comportamiento complementario: En el minuto cero el haz reflejado tiene una intensidad mayor que el transmitido. A medida que el tiempo transcurre la intensidad del haz reflejado disminuye mientras que la del transmitido aumenta en la misma proporción hasta el minuto 17 aproximadamente, cuando los dos haces se cruzan siguiendo el mismo comportamiento complementario. Por otro lado según lo presentado en la figura 4.5, para una longitud de onda de 532nm el divisor de haz no divide el haz exactamente en la relación 50:50 (Transmisión-Reflexión), lo que se refleja en la separación que presentan los dos haces (ver figura 4.17)

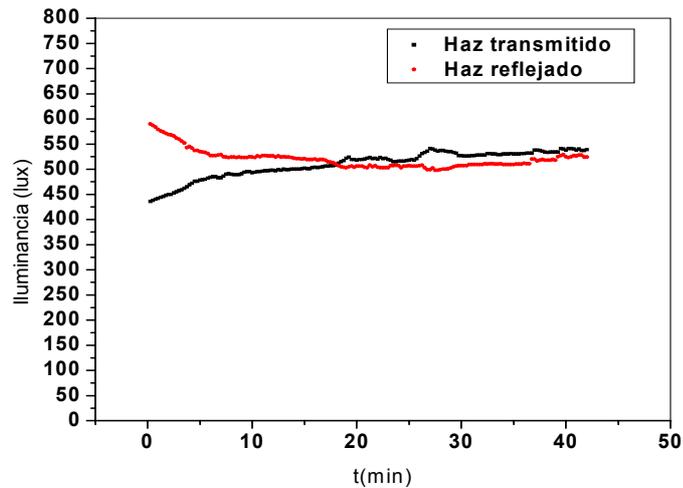


Figura 4.17. Datos obtenidos de iluminancia provenientes de los dos haces durante un periodo de 50 minutos.

4.3.3 Análisis del diseño propuesto

En la figura 4.17 se tiene el comportamiento del divisor de haz. Como se analizó, el divisor no divide el haz en la relación requerida, en ningún instante. En el diseño propuesto en la figura 4.2 se juega con dos señales, la de referencia y la que incide sobre la muestra. Como es de suponer, para el buen funcionamiento del equipo es necesario que la intensidad de ambas señales esté en la relación 50:50. Por lo tanto el diseño propuesto requiere de modificaciones.

Antes de proponer una modificación es deseable encontrar la causa del comportamiento del divisor de haz, que puede ser el divisor, el láser o ambos, llevando cada posibilidad a un tipo de modificación diferente. Como primer paso se analizó el estado de polarización del láser como posible fuente de error. Para ello se utilizó un polarizador.

Para observar el comportamiento del haz láser con un polarizador se repitió el montaje de la figura 4.16 adicionando el polarizador entre el láser y el divisor de haz, como se observa en la figura 4.18.

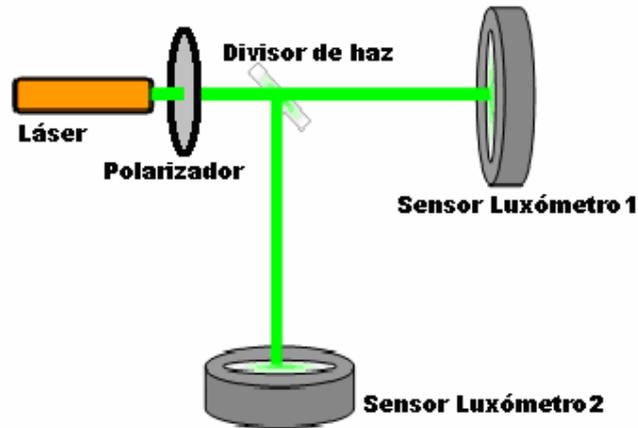


Figura 4.18. Montaje para observar el comportamiento del haz láser con un polarizador.

Se tomaron datos de iluminancia de los haces reflejado y transmitido durante un periodo de 30 minutos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.19.

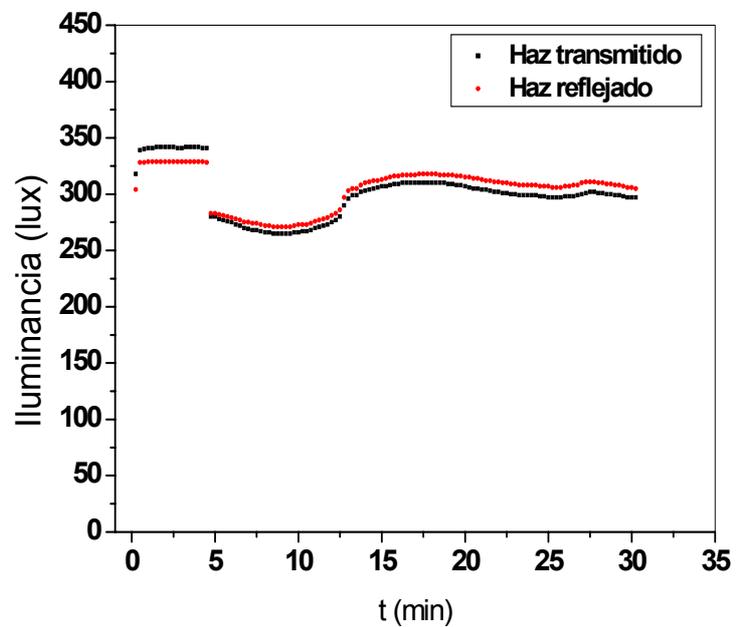


Figura 4.19. Datos obtenidos de iluminancia provenientes de los dos haces durante un periodo de 30 minutos con polarizador.

Como se puede observar en la figura 4.19, los haces reflejado y transmitido ya no presentan un comportamiento complementario como el de la figura 4.17. Esto permite concluir que ya que el divisor de haz es sensible a la polarización, da como resultado la división de la intensidad del haz en diferentes proporciones dependiendo del ángulo de polarización del láser y además este divisor de haz es para luz no polarizada.

REFERENCIAS

[1]. Olsen D, Eugene. Métodos ópticos de análisis, edición en español. Editorial Reverté S.A. Barcelona (1986).

[2]. Lasersale, [en línea]. [Consultado Agosto 2006]. Disponible en:
<http://www.lasersale.com/catalog/display_item.asp?id=3232>

[3]. Thorlabs, [en línea]. [Consultado Agosto 2006]. Disponible en:
<<http://thorlabs.com/thorProduct.cfm?partNumber=FDS100>>

[4]. Plastibrand, [en línea]. [Consultado Agosto 2006]. Disponible en:
<[http://www.brand.de/es/productos/productos-life-science/cubetas-cubetas-uv/cubetas-estandar-macro-y-semimicro/.](http://www.brand.de/es/productos/productos-life-science/cubetas-cubetas-uv/cubetas-estandar-macro-y-semimicro/)>

CAPÍTULO V
CONSTRUCCIÓN DEL
ESPECTROFOTÓMETRO DE DOBLE
HAZ

El diseño propuesto para el espectrofotómetro de doble haz se muestra en la figura 4.2, el cual se construyó utilizando los elementos descritos en el capítulo anterior. En la figura 5.1 se exhibe una fotografía del montaje constitutivo para el espectrofotómetro de doble haz.

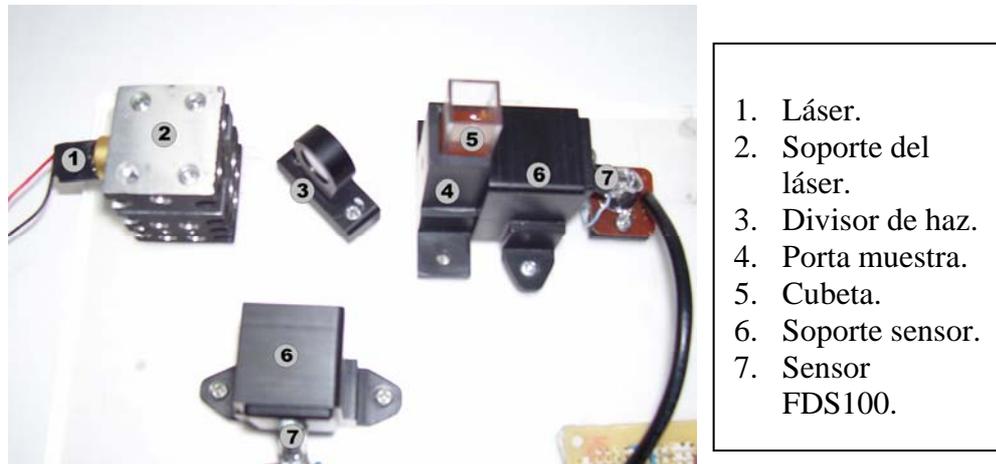


Figura 5.1. Imagen fotográfica del espectrofotómetro de doble haz construido.

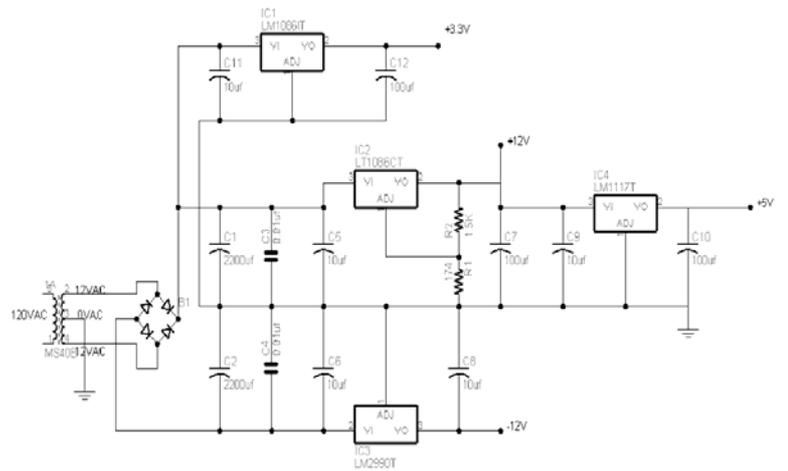
Para la construcción de un espectrofotómetro es necesario implementar un sistema electrónico que tenga módulos tales como: fuente de alimentación de voltaje, filtrado de la señal, amplificación de la señal, adquisición y el procesamiento de la señal. Cada una de estas etapas fue probada para asegurar que se ha eliminado la mayor cantidad de ruido.

5.1 FUENTE DE VOLTAJE

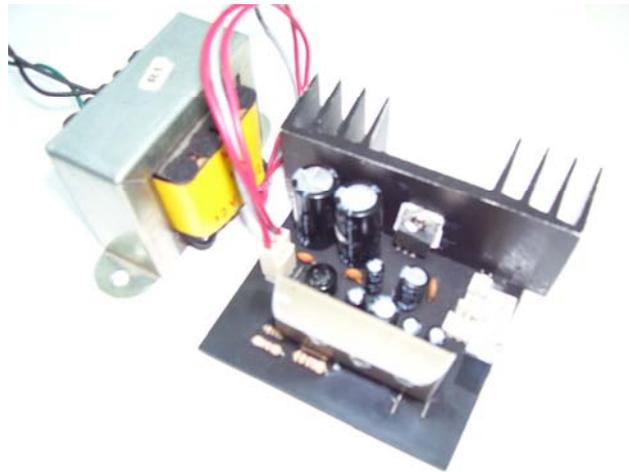
Se hizo una fuente de alimentación para el sistema con el objetivo de obtener el voltaje de salida estable requerido por los dispositivos utilizados. Para ello se realizaron etapas de rectificación y tres etapas de regulación. En la figura 5.2 se muestra el circuito esquemático completo implementado de la fuente.

Etapas de rectificación. Se utiliza un transformador de un amperio (1A) con salidas de 12-0-12VAC conectadas a un puente rectificador de onda

completa de 1A, seguido de un juego de condensadores electrolíticos y cerámicos conectados en paralelo y en serie que proporcionan un rizado bajo y permiten construir una fuente bipolar lista para la conexión de las etapas de regulación para los diferentes voltajes como se muestra en la figura 5.2.



(a)



(b)

Figura 5.2. Fuente de voltaje para voltajes regulados de +12V,-12V, 5V y 3.3V

a) Circuito Esquemático b) Imagen Fotográfica.

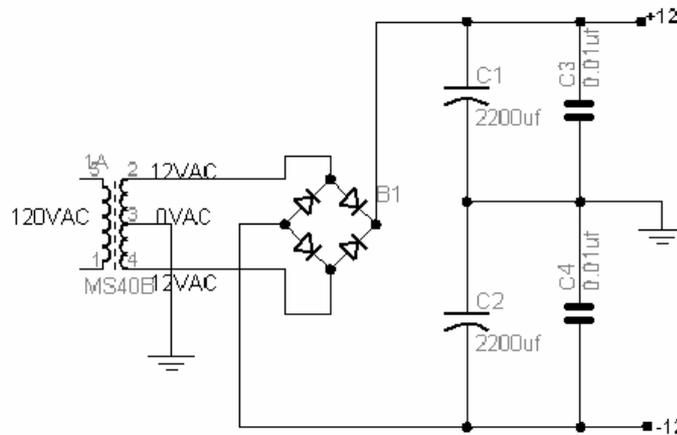


Figura 5.3. Rectificación de onda completa y filtrado de la fuente bipolar

Regulación para alimentación del láser. Teniendo en cuenta los requerimientos eléctricos del láser, es decir, que el rango de voltaje para su alimentación está entre 2.4V y 3.5V y que la corriente típica de consumo es de 190mA, se utilizó el regulador de voltaje LM1086IT de 1.5A que proporciona una salida con muy bajo rizado de 3.3V y requiere de dos condensadores para garantizar la estabilidad del regulador. En esta etapa el voltaje no regulado de +12V proveniente de la etapa de rectificación es utilizado como voltaje de entrada y la salida es un voltaje regulado de +3.3V (figura 5.4)

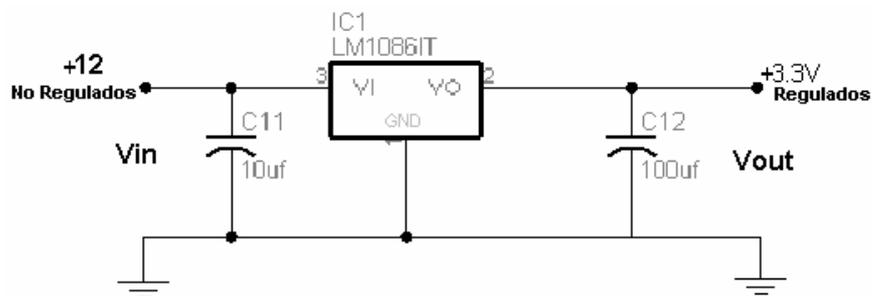


Figura 5.4. Conexión del regulador LM1086

Regulación de +12.0V y de -12.0V: para ello se utilizó un regulador LT1086CT de 1.5A y un regulador LM2990T de 1A respectivamente. Esta

salida es utilizada como fuente de alimentación para los fotodiodos FDS100 y los amplificadores TL082. En esta etapa se utiliza el voltaje bipolar no regulado de +12V y -12V como voltaje de entrada para los reguladores, los cuales requieren de dos condensadores de acople: uno en sus entradas y otro en sus salidas para mejorar la estabilidad. Para obtener lo 12V el regulador LM1086CT en su versión ajustable de 0-15V es necesario conectar dos resistencias entre su salida y GND, como lo muestra la figura 5.5, teniendo en cuenta que se debe cumplir que:

$$V_{out} = 1.25 \left(1 + \frac{R2}{R1} \right) \quad (5.1)$$

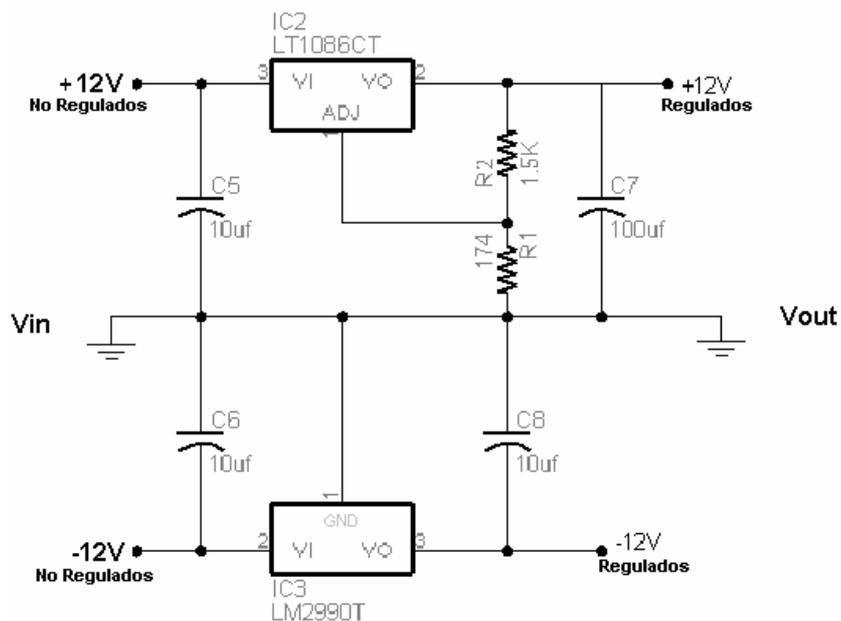


Figura 5.5. Conexión de los reguladores LT1086CT y LM2990T

Regulación de 5V: para ello se utilizó un regulador LM111T de 800mA, este voltaje es utilizado como fuente de alimentación para el PIC de la Tarjeta de adquisición de datos - DAQ. En esta etapa se utilizaron los +12V regulados de la anterior etapa como entrada y se conectaron los condensadores recomendados en su datasheet como se muestra en la figura 5.6.

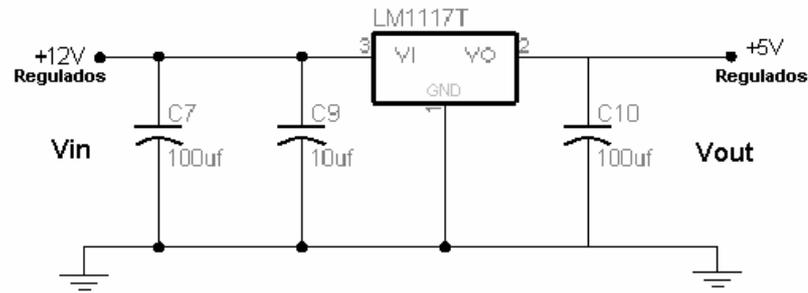


Figura 5.6. Conexión del regulador LM1117T

5.2 FILTRADO DE LA SEÑAL

Antes de la etapa de filtrado se realizó un acople de impedancias con un amplificador operacional TL082 que proporciona toda la potencia requerida por la etapa de filtrado sin perturbar la señal proveniente del fotodetector (figura 5.7a).

Para esta etapa de filtrado se escogió el filtro activo pasabajas de segundo orden de tipo Butterworth figura 5.7b. Para este filtro se hicieron pruebas en el osciloscopio con diferentes frecuencias de corte, obteniendo diferentes resultados. El mejor diseño a implementar fue el que correspondió a las siguientes características:

Máxima atenuación en la banda pasante: $A_{max} = 1\text{db}$.

Frecuencia de corteL: $W_p = 3.2\pi$.

Ganancia del filtro, $K = 1$.

Suponiendo valores para condensadores $C1=0.1\mu\text{F}$ y $C2=0.01\mu\text{F}$ se obtuvieron valores para las resistencias $R1=9.5\text{M}\Omega$ y $R2=529\text{K}\Omega$, obteniendo así el filtro pasabajas requerido, como lo muestra la figura 5.7b.

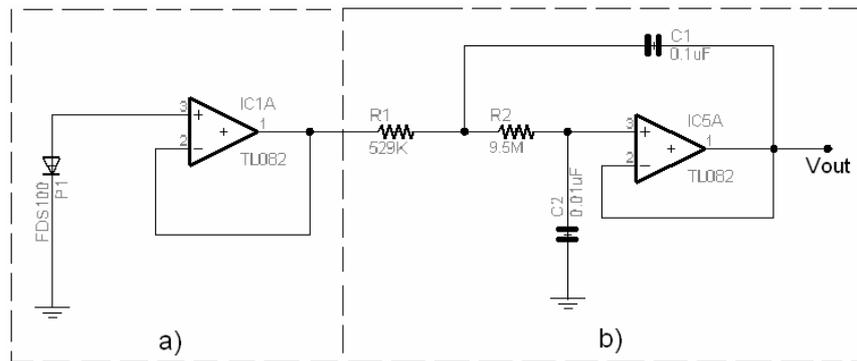


Figura 5.7. a) Acople de impedancias, b) esquema general de un filtro pasabajas de segundo orden de tipo Butterworth

5.3 AMPLIFICACIÓN DE LA SEÑAL

Para el análisis de las señales se requiere de su amplificación ya que son pequeñas. Para el sistema de amplificación se utilizó el amplificador operacional TL082, al cual le llegan las señales filtradas provenientes del fotodiodo PIN FDS100. La implementación del amplificador no inversor se muestra en la figura 5.8.

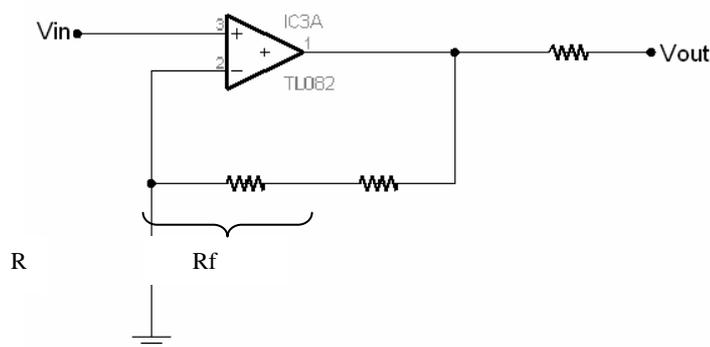


Figura 5.8. Sistema de amplificación

La ganancia del sistema de amplificación fue calculada de acuerdo con la siguiente formula:

$$V_{out} = V_{in} \left(1 + \frac{R_f}{R} \right) \quad (5.2)$$

5.4 ADQUISICIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA SEÑAL

La adquisición de datos se realizó mediante la implementación de una tarjeta de adquisición, DAQ, en la cual los datos son recibidos por alguno de los canales analógicos del PIC18f452, programado para recibir una orden del PC que le indica el inicio de la conversión análogo-digital y enviar la nueva información al PC por comunicación RS232. En la figura 5.9 se muestra los elementos utilizados en la tarjeta de adquisición de datos y la imagen fotográfica.

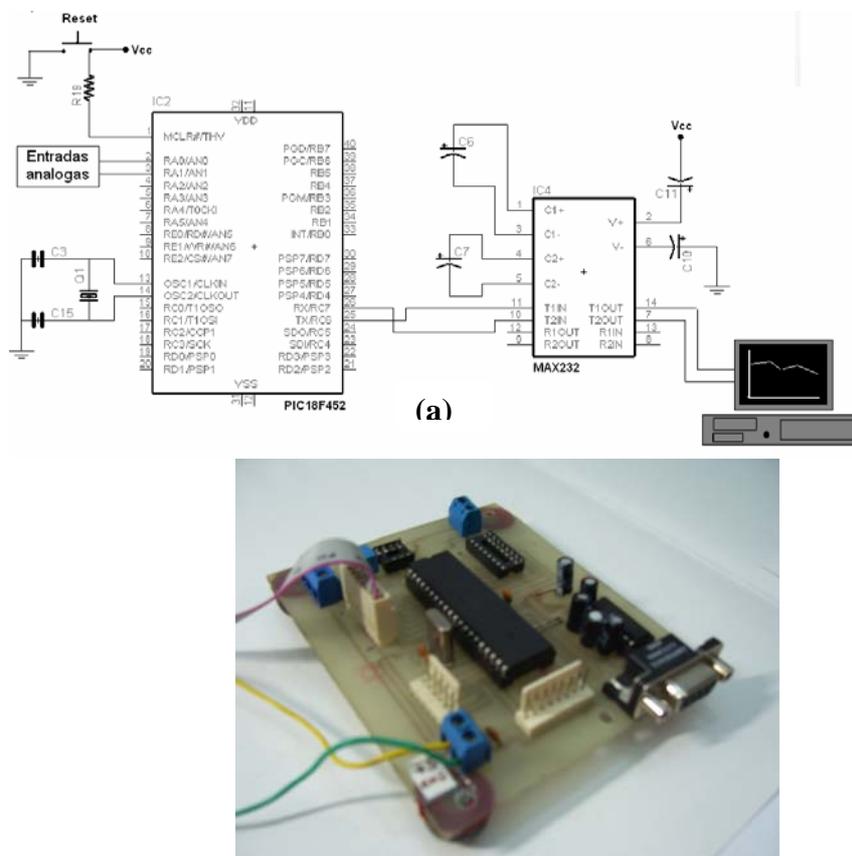


Figura 5.9. Tarjeta de adquisición de datos **a)** Circuito esquemático, **b)** Imagen fotográfica.

En el PC los datos son analizados mediante un programa de adquisición de datos en la plataforma Labview6i. En el panel frontal mostrado en la figura 5.10

se muestra cómo es la adquisición de los datos, se identifican los controles de modo de trabajo (A significa modo de conversión análogo-digital), los controles de elección del canal análogo del PIC a utilizar y las dos waveform chart muestran el avance de las dos señales en el tiempo.



Figura 5.10. Panel frontal del programa en Labview

5.5 TOMA DE DATOS

Las mediciones del láser con el luxómetro (figura 4.13) arrojaron una buena estabilidad del láser, ahora es necesario ratificar esto con el montaje de la figura 5.11 (sin cubeta y sin divisor de haz), donde después de filtrar y amplificar la señal, esta es adquirida con la tarjeta de adquisición de datos y transmitida a través del puerto serial al PC. Se adquirieron 15 veces datos durante un periodo de 15 minutos, que se muestran en la figura 5.12a y 5.12b.

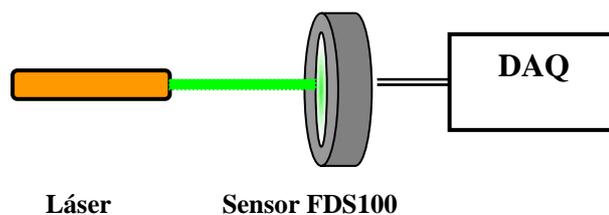


Figura 5.11. Montaje para medir la estabilidad del láser

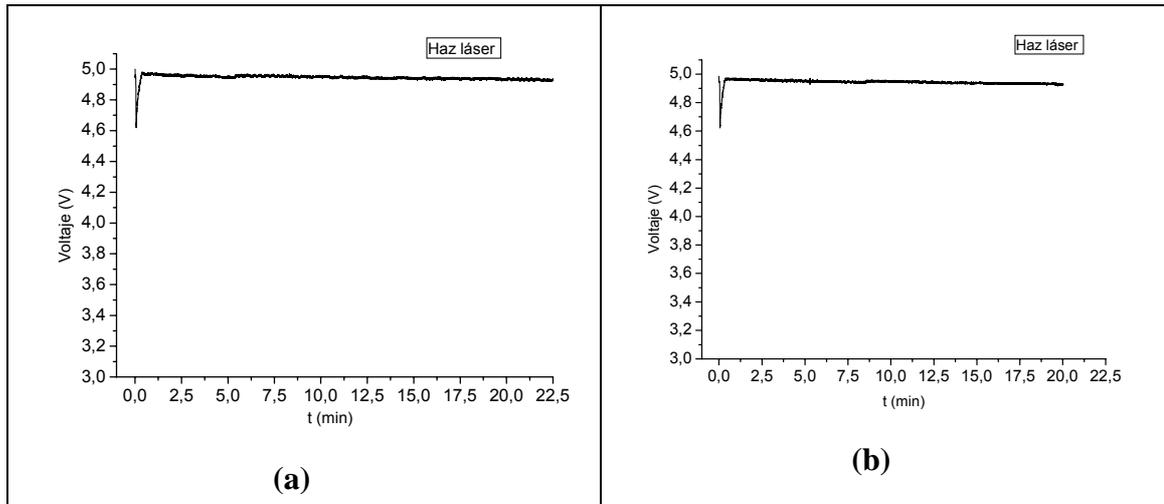


Figura 5.12. Datos obtenidos de voltaje provenientes del láser durante un periodo de 22 minutos.

➤ **Medidas con divisor de haz EBS05**

Utilizando el montaje mostrado en la figura 5.1, se procedió a adquirir datos a través de la DAQ, información que es utilizada para analizar en el PC el comportamiento del divisor de haz. Se adquirieron datos durante un periodo de 10 minutos. La adquisición de datos se realizó 20 veces (dejando enfriar el láser después de cada adquisición de datos). De las 20 gráficas obtenidas se seleccionaron dos, los resultados se muestran en la figura 5.12a y 5.12b. Nuevamente se observa el comportamiento complementario de los dos haces tal y como se dio con las pruebas hechas con los luxómetros (ver figura 4.17).

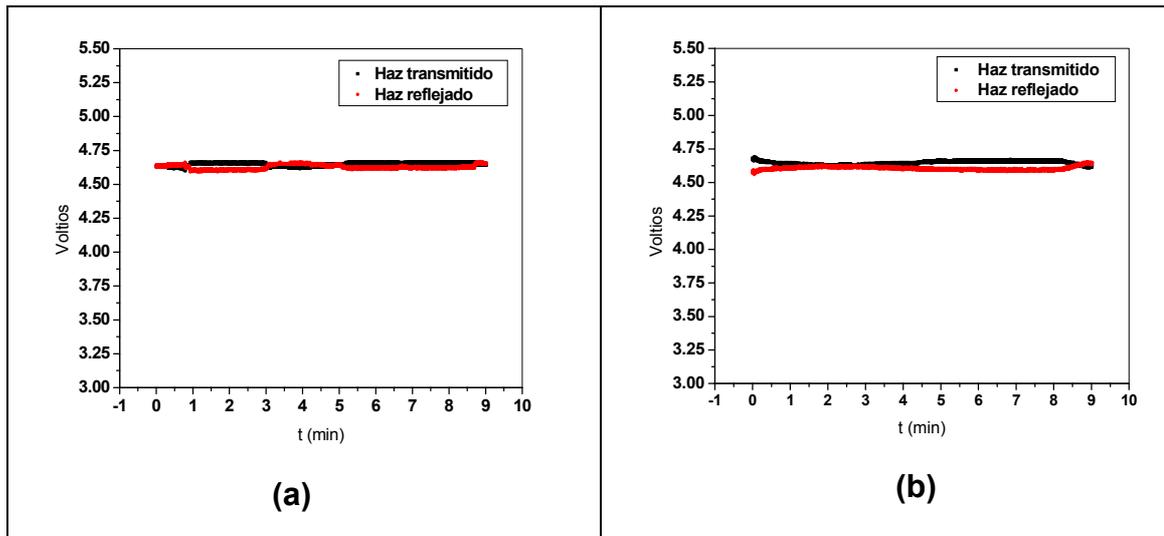


Figura 5.13. Datos obtenidos provenientes de los dos haces durante un periodo de 10 minutos con la tarjeta de adquisición de datos

Como consecuencia del comportamiento complementario nuevamente observado, se optó por probar con un nuevo divisor de haz. Para ello se contó con el apoyo del profesor Mario Patiño que prestó para la prueba un divisor de haz insensible a la polarización (BS1)

➤ **Medidas con divisor insensible a la polarización (BS1)**

El nuevo divisor se ubicó en la posición del divisor EBS05 en el montaje de la figura 5.1, posteriormente se procedió a adquirir datos durante un periodo de diez minutos después de los cinco minutos de estabilidad del láser (dejando después de cada adquisición de datos enfriar el láser). Los datos obtenidos se muestran en la figura 5.14a y 5.14b.

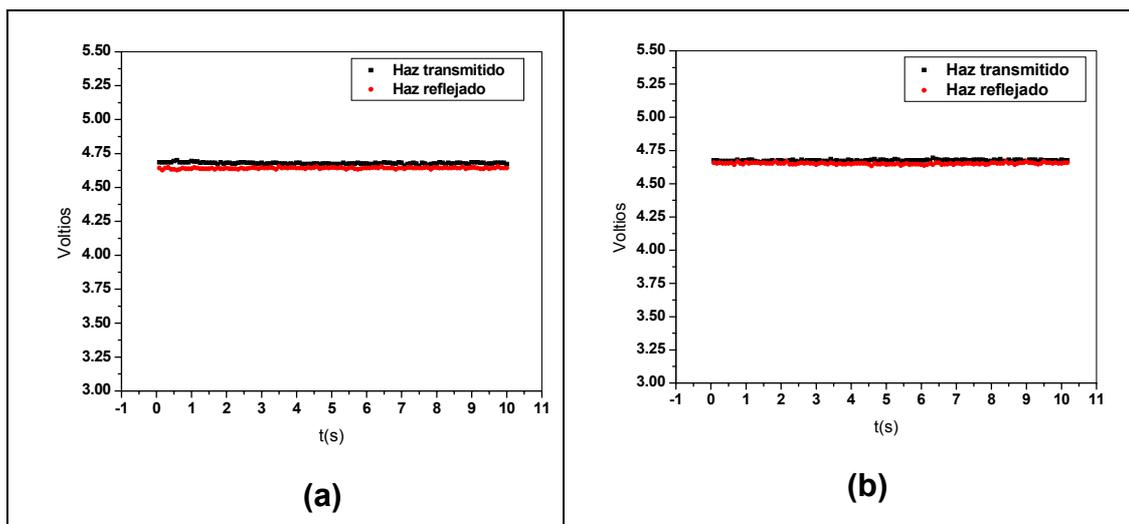


Figura 5.14. Datos obtenidos provenientes de los dos haces durante un periodo de 10 minutos con el divisor de haz.

Como se observa en las figuras anteriores, el comportamiento de los dos haces se mantiene estable y con separación constante entre ellos a medida que pasa el tiempo, de lo que se puede deducir que el uso del nuevo divisor de haz mejora considerablemente el montaje.

Por lo anterior, lo más recomendado sería utilizar el divisor de haz BS1 para la medida de absorbancia y cuantificación de HbS. No obstante, este dispositivo es costoso y no estaba presupuestado en el proyecto inicial. Por lo anterior, para el instrumento final se optó por un cambio en el diseño de la figura 4.2, con buenos resultados según lo que se expone en el capítulo VI. Sin embargo, si se desea mejorar el instrumento, los autores recomiendan la implementación del diseño de doble haz con el divisor BS1.

Ya que no se contaba con la posibilidad de modificar el divisor de haz ni se podía contar con la inclusión de un polarizador (opción que, como se comprobó en las figuras 4.19 también soluciona el problema de la complementariedad entre los haces), se optó por diseñar, construir y probar un espectrofotómetro de un solo haz, con lo que se obvia el uso del divisor de haz.

CAPÍTULO VI

ESPECTROFOTÓMETRO LS-532:

DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN

Los resultados obtenidos a partir de lo desarrollado en los capítulos 4 y 5 (diseño y construcción de un espectrofotómetro de doble haz) son aceptables, así como el comportamiento de cada uno de sus componentes. No obstante, como se concluyó en las pruebas de funcionamiento, este instrumento presenta un problema en el divisor de haz, que es sensible a la polarización de la luz.

Teniendo en cuenta lo anterior, en el diseño y construcción del espectrofotómetro LS-532 se hará uso de lo diseñado, probado y construido en el espectrofotómetro de doble haz, se eliminará el divisor de haz. Por otro lado, ya que con un espectrofotómetro de un solo haz el usuario debería abrir dos veces el compartimiento, una para ubicar el blanco y otra para ubicar la muestra, se decidió incluir en el montaje un sistema mecánico para el desplazamiento de cubetas en los porta muestras. El usuario abrirá el equipo, ubicará el blanco y la muestra en sus respectivos porta muestras, lo cerrará y la interacción de las muestras con el haz se hará haciendo uso del movimiento propio del sistema.

El espectrofotómetro LS-532 ofrece las siguientes ventajas:

1. Respecto al diseño de doble haz se prescindió de dos elementos: el divisor de haz y un fotodetector con su respectivo soporte, lo que hace que el diseño disminuya significativamente en costo.
2. Se eliminó el problema de inestabilidad debido al divisor de haz. El láser es aceptablemente estable y permite mayor reproducibilidad de los datos.

6.1 DISEÑO DEL ESPECTROFOTÓMETRO LS-532

Para la obtención de medidas de absorbancia de una muestra es necesario medir la absorbancia del blanco para descontarlo. En el diseño del espectrofotómetro de doble haz se hace de manera simultánea la medida del

blanco y de la muestra. Por facilidad y confiabilidad el procedimiento se debe realizar automáticamente con tiempos exactos de adquisición. Por esta razón se propuso diseñar el espectrofotómetro LS-532 de haz sencillo como un diseño óptico-mecánico que consiste en una fuente de luz láser, tres portamuestras, un fotodetector, y un motor paso a paso conectado a un riel como aparece en la figura 6.1.

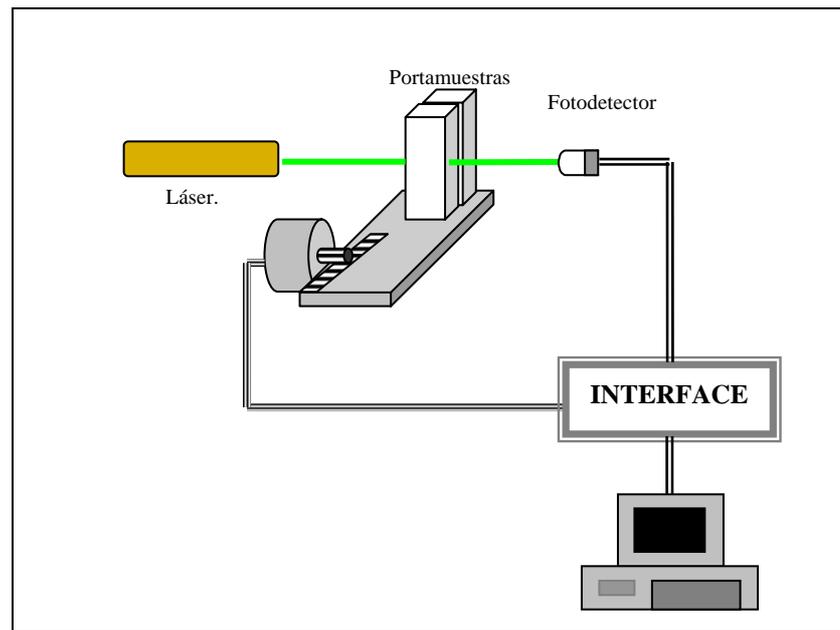


Figura 6.1. Diagrama esquemático del montaje del espectrofotómetro LS-532

6.2 CONSTRUCCIÓN DEL ESPECTROFOTÓMETRO LS-532

Según el diseño planteado en la figura 6.1, para la construcción de este espectrofotómetro se emplearán los siguientes elementos y/o etapas:

- ✓ Fuente de alimentación (ver figura 5.2)
- ✓ Etapas de filtrado y amplificación de la señal (ver figuras 5.7 y 5.8)
- ✓ Tarjeta de adquisición de datos (ver figura 5.9).
- ✓ Láser (ver figura 4.3)
- ✓ Sensor FDS100 (ver figura 4.6)
- ✓ Cubetas (ver figura 4.8)
- ✓ Riel dentado (figura 6.2)

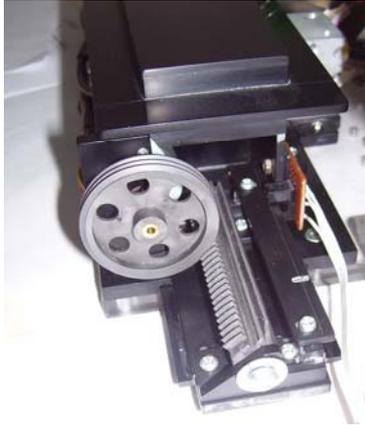


Figura 6.2. Riel dentado

✓ Motor paso a paso (figura 6.3)



Figura 6.3. Motor paso a paso

✓ Compartimiento formado por tres portamuestras (figura 6.4)



Figura 6.4. Compartimiento de las muestras

✓ Optoacoplador (figura 6.5)

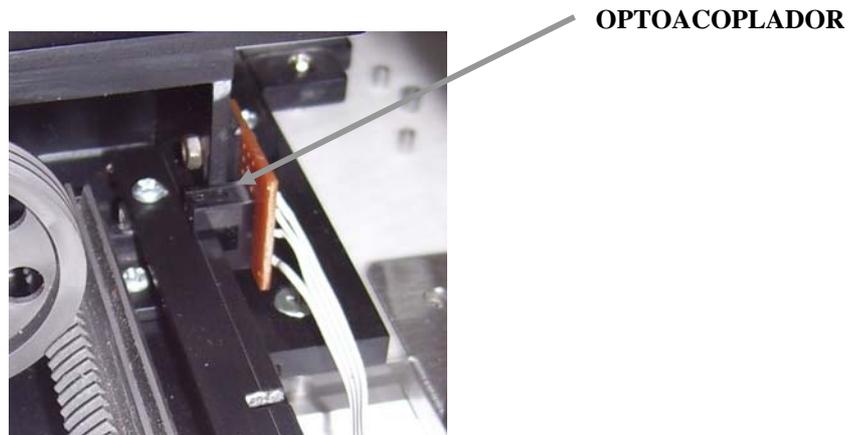


Figura 6.5. Optoacoplador

✓ Teclado (figura 6.6)



Figura 6.6. Teclado

✓ Pantalla LCD (figura 6.7)



Figura 6.7. Pantalla LCD

La figura 6.8 muestra una fotografía del espectrofotómetro LS-532 según lo representando en el diagrama esquemático de la figura (6.1).

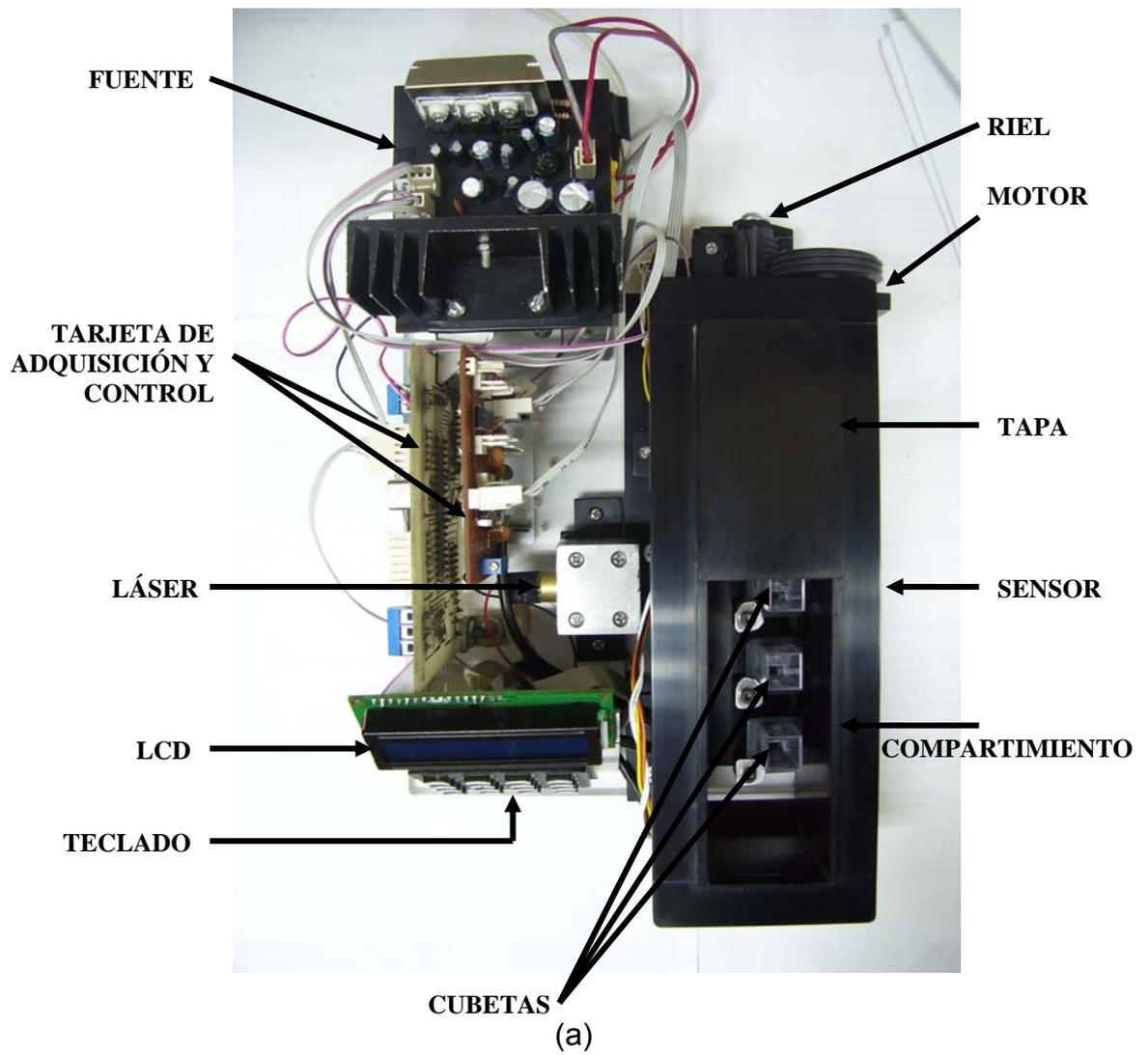


Figura 6.8. Espectrofotómetro LS-532 a) vista superior b) vista lateral.

6.2.1 Diseño e implementación del control automático

Además de las funciones para las que fue programada la tarjeta DAQ según lo reportado en el ítem 5.4 del capítulo 5, se programada para realizar la acción de control del motor paso a paso utilizando las órdenes del PIC para accionar las secuencias del motor a través del puerto C (PORTC) de salidas digitales conectado al circuito integrado ULN2003, que proporciona la potencia requerida del motor.

Lo primero que se hace en esta etapa es ubicar el riel dentado en una posición, establecida como inicio, accionando el motor hacia la izquierda hasta que el optoacoplador (sensor de posición) indique que está en la posición de inicio. Posteriormente se prende el láser alimentando con 5V la base del TIP122 (a través de la pin RA1 del puerto A, como se observa en la figura 6.10) que acciona el láser y lo alimenta con 3.3V, y se deja estabilizar el láser durante 8 minutos de acuerdo con lo obtenido de la figura 5.12 de estabilización del láser.

Posteriormente se despliega en la pantalla LCD un mensaje que le indica al usuario que puede introducir las cubetas, cerrar el compartimiento e indicar con el teclado el número de muestras a medir. El sistema solicita a través de la pantalla LCD que introduzca con el teclado el valor de la concentración de hemoglobina total del paciente correspondiente a cada muestra a medir en el LS-532.

Como ya se mencionó, el posicionamiento de los portamuestras en el lugar exacto de incidencia del haz láser sobre la muestra se hará usando un motor paso a paso. Con un cierto número de giros en el sentido de las manecillas del reloj el motor hará desplazar el riel que contiene los portamuestras. Este desplazamiento (así como el número de giros) depende de la distancia entre la cubeta respectiva y el haz láser. Ubicada la muestra se tomarán 100 datos para un tiempo de 1 segundo, suficientes para la recolección del número de datos

necesarios para obtener un valor promedio aceptable. A continuación se describe el proceso de toma de datos:

- Se posiciona el haz del láser en medio del portamuestra para el blanco y el portamuestras para muestra1 (ver anexo A) haciendo mover el sistema mecánico con 135 giros del motor. es esta posición el haz pasa libremente hasta el sensor y se toman datos cuyo promedio corresponderá a I_0 para el blanco.
- Se posiciona el primer portamuestra, que contiene la cubeta con el blanco, por medio de 60 giros del motor. Se toman datos a través del fotodetector, cuyo promedio corresponderá a I para el blanco.
- Se posiciona el haz del láser en medio del portamuestra para el blanco y el portamuestras para muestra1 (ver anexo A) haciendo mover el sistema mecánico con 65 giros del motor. En esta posición el haz pasa libremente hasta el sensor y se toman datos cuyo promedio corresponderá a I_0 para la muestra 1.
- Se ubica al segundo portamuestra (que contiene la primera muestra a medir) realizando 60 giros del motor y se toman datos cuyo promedio corresponderá a I para la muestra 1.
- El sistema identifica si el usuario ha introducido una o dos muestras. Si se da el segundo caso, procederá a ubicar el haz láser en medio del portamuestra 2 y el portamuestra 3 con 130 giros del motor y se adquieren los datos correspondiente a I_0 de la muestra 2. Posteriormente se ubica el tercer portamuestra (que contiene la segunda muestra a medir) realizando 65 giros del motor y adquiriendo los respectivos datos correspondiente a I de la muestra 2.
- El procedimiento anterior se repite 3 veces para obtener medidas para disminuir el error.
- El valor del promedio de cada toma de datos es guardado en un archivo. Posteriormente se realizan los cálculos de absorbancia

mediante la relación de Beer $A = \log \frac{I_0}{I}$ con los I y I_0 correspondientes al blanco, muestra1 y muestra2 si es el caso.

- Finalmente, la cuantificación de cada muestra se hace mediante la ecuación que se obtiene de la recta de calibración del equipo.

Terminado el proceso de medida el sistema ubica el riel en la posición inicial realizando giros hacia en el sentido contrario a las manecillas del reloj hasta que el optoacoplador lo indique. En esta posición ya se muestra en la pantalla de la LCD el valor obtenido de porcentaje de concentración de HbS de cada muestra. En la figura 6.9 se muestra el diagrama de bloques del programa implementado en el PIC para la realización de las funciones detalladas.

En la figura 6.10 se presenta el diseño del control automático que garantiza el funcionamiento del instrumento según lo detallado. Se basa en el uso de un microcontrolador PIC18F452 encargado de adquirir los datos provenientes del sensor FDS100, procesarlos, accionar el motor paso a paso para mover el sistema mecánico, y conectar los periféricos para la interacción del sistema con el usuario (teclado y pantalla LCD).

La correcta calibración de los equipos proporciona la seguridad de que los productos o servicios que se ofrecen reúnen las especificaciones requeridas, por tanto se requiere que el espectrofotómetro LS-532 sea calibrado adecuadamente, este proceso de calibración se muestra en el siguiente capítulo (capítulo 7).

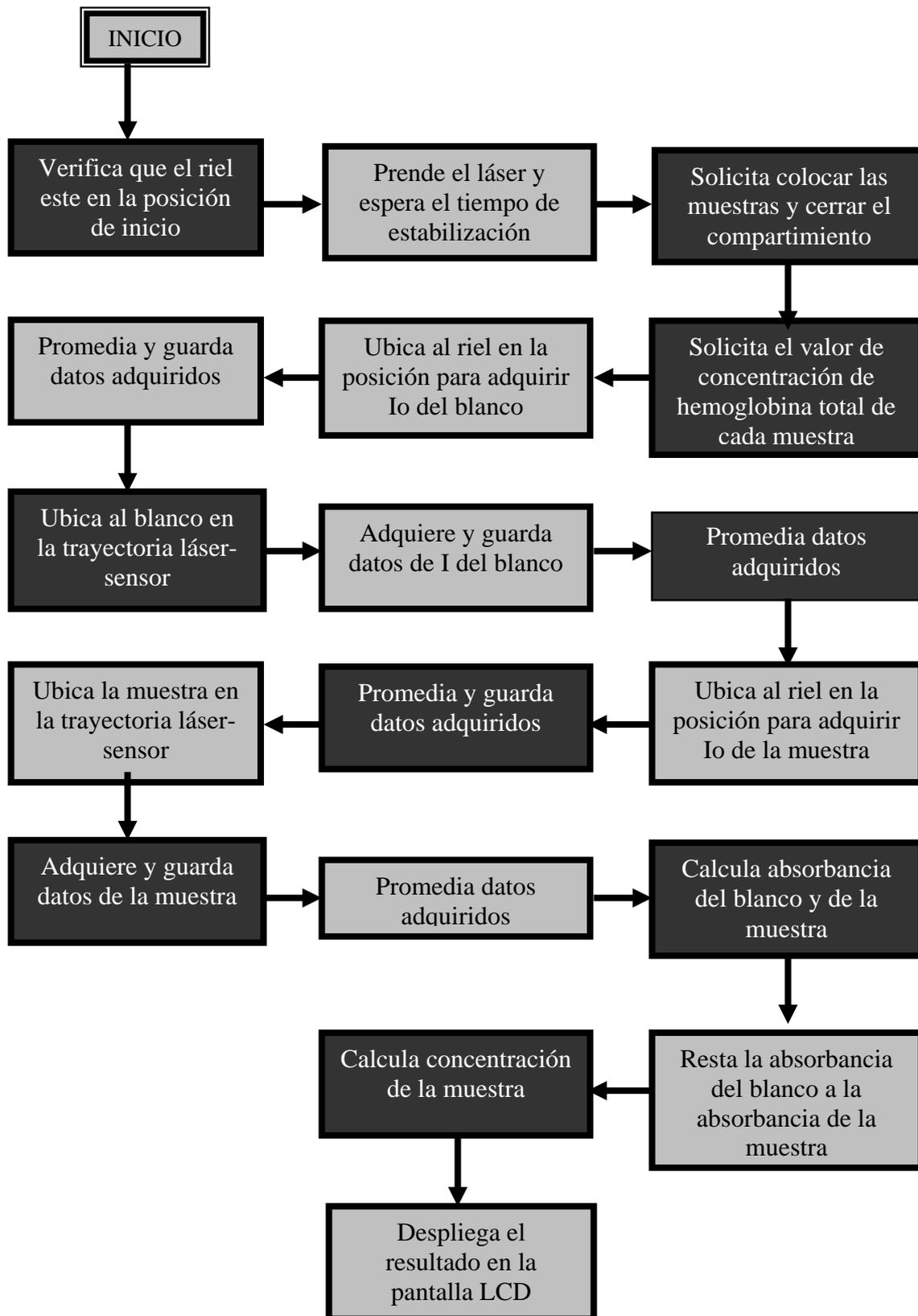


Figura 6.9. Diagrama de bloques implementado en el PIC

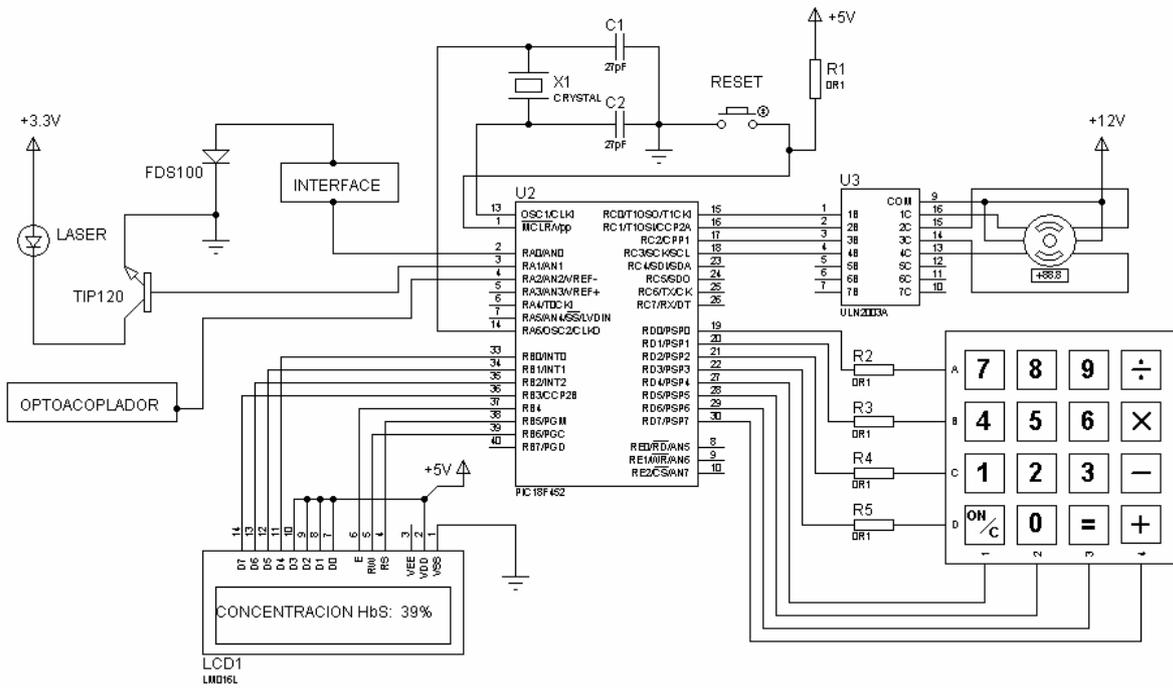


Figura 6.10. Diseño del control automático

CAPÍTULO VII

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Calibración es el procedimiento de comparación entre lo que indica un instrumento y lo que "debiera indicar" de acuerdo a un **patrón de referencia** con valor conocido. Es el procedimiento metrológico que permite determinar con suficiente precisión cuál es el valor de los errores de los instrumentos de medición, siendo de vital importancia que dichos errores sean lo suficientemente pequeños y que hayan sido determinados con la mayor exactitud posible.

Para esta prueba se usaron muestras correspondientes a un control normal y a un paciente homocigoto. De ambas muestras se conoce tanto la hemoglobina total como la hemoglobina S por medio de resultados obtenidos en el laboratorio de hematología de la Universidad del Cauca y electroforesis de hemoglobina en el laboratorio Ángel de Cali, respectivamente.

Se realizó una prueba preliminar para observar el efecto de la concentración de la muestra sobre la absorbancia, tanto para altas como bajas concentraciones. Para obtener la curva de absorbancia en función de la concentración de HbS se contó con los datos correspondientes a la cuantificación de HbS mediante electroforesis. Posteriormente se tomaron datos de concentración y de absorbancia para el proceso de calibración del equipo LS-532 y se construyó una gráfica de concentración en función de absorbancia y posteriormente se validó la calibración comparando los resultados obtenidos con el LS-532 con los obtenidos de laboratorios especializados.

7.1 PRUEBA PRELIMINAR PARA OBSERVAR EL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE HbS DE LA MUESTRA EN LA ABSORBANCIA.

- **Cuantificación de hemoglobina por electroforesis**

Se realizó una prueba de electroforesis de hemoglobina en medio alcalino a una muestra de sangre de un paciente heterocigoto y aun paciente homocigoto, prueba realizada por el laboratorio Asoclinic Inmunología Ltda en la ciudad de Cali. Los resultados de este tipo de pruebas expresan el porcentaje de

concentración de hemoglobina S con respecto a la concentración de hemoglobina total de los pacientes, tal como se presenta en la tabla 7.1.

Tabla 7.1. Resultados de electroforesis de hemoglobina en medio alcalino para el paciente A y para el paciente Y (laboratorio Asoclinic Inmunología Ltda).

Paciente	Porcentaje (%) (laboratorio Asoclinic Inmunología Ltda.)			
	Hb A	Hb S	Hb A2	Hb F
A (Heterocigoto)	58.0	39.2	2.8	0.0
Y (Homocigoto)	0.0	67.2	1.1	31.2

La muestra A, correspondiente a un paciente heterocigoto, tiene mayor concentración de hemoglobina A y por lo tanto un porcentaje menor de hemoglobina S, el porcentaje de HbF es cero porque es la hemoglobina normal del feto que en su mayor parte se degrada en los primeros días de vida del niño, siendo sustituida por la hemoglobina A. La muestra Y tiene un porcentaje HbA de cero por ser de un paciente homocigoto en el que generalmente el 98% de su hemoglobina total es HbS, sin embargo el paciente esta siguiendo un tratamiento a base de medicina que aumenta la concentración de hemoglobina F a valores significativos y disminuye de manera considerable el valor de HbS.

Es importante determinar la dilución necesaria de la muestra que se va a medir con el objetivo que los resultados estén de acuerdo con la ley de Beer (comportamiento lineal entre absorbancia y concentración, mayor concentración mayor absorbancia). Para esto se realizaron diluciones de sangre en buffer para las muestras A y Y. A cada dilución se le asignó la concentración que debe tener según los resultados reportados en la tabla 7.1, así, la muestra A en la relación 1:1 (2 ml buffer : 0.02 ml sangre) tendrá una concentración de 39.2 % de HbS de acuerdo con lo medido por electroforesis. A partir de este dato, esta misma muestra diluida en una proporción 1:2 (2ml buffer:0.01ml sangre) tendrá una concentración de HbS igual a la mitad de su

valor al 1:1, es decir, 19.6% así para las otras diluciones. A cada dilución se le hizo la prueba de absorbancia con el espectrofotómetro del laboratorio de biología celular y molecular de la Universidad del Cauca, como se muestra en la tabla 7.2 y 7.3.

Tabla 7.2. Datos de concentración de HbS y de absorbancia para cada dilución de la muestra A

Muestra A		
Factor de dilución	%Concentración (%HbS)	Absorbancia (Espectrofotómetro Lab. Biología celular y molecular)
1:1	39,2	1,234
1:2	19,6	0,352
1:4	9,8	0,236
1:8	4,9	0,168

Tabla 7.3. Datos de concentración de HbS y de absorbancia para cada dilución de la muestra Y

Muestra Y		
Factor de dilución	%Concentración (%HbS)	Absorbancia (Espectrofotómetro Lab. Biología celular y molecular)
Muestra sin diluir	67,2	1,153
1:2	33,6	0,454
1:4	16,8	0,278
1:8	8,4	0,197

La figura 7.1a muestra datos de absorbancia en función del porcentaje de concentración de HbS de la muestra A y la figura 7.1b muestra datos de absorbancia en función del porcentaje de concentración de HbS para cada dilución de la muestra Y.

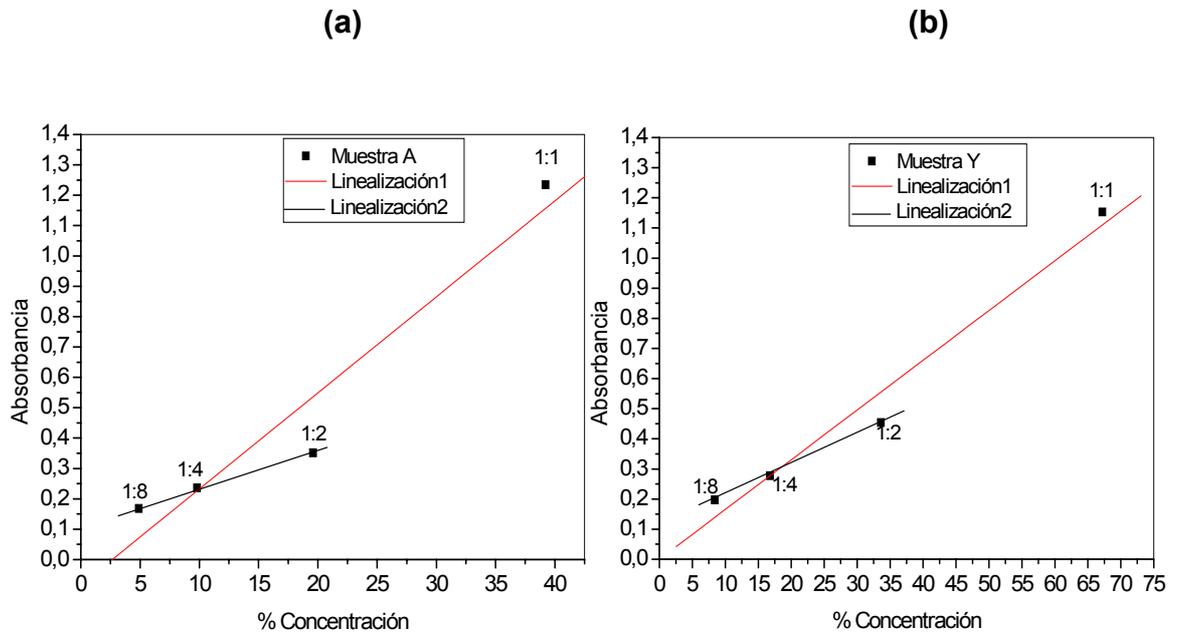


Figura 7.1. Gráficas para observar el efecto de la concentración de la muestra a diluciones a proporciones de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 **a)** Datos para la muestra A **b)** Datos para la muestra Y.

La ley de Beer predice un comportamiento lineal para bajas concentraciones, esto se puede observar en las anteriores figuras, en donde la linealización 1 indica que al considerar la muestra en la proporción 1:1 se modifica el comportamiento lineal esperado. Por el contrario al realizar diluciones a 1:2, 1:4 y 1:8 se obtiene un comportamiento lineal de acuerdo con lo esperado por la ley de Beer. Esto indica que para la correcta aplicación de la ley es necesario trabajar con muestras diluidas en la proporción 1:2, concretamente, utilizar 4ml de buffer y 0.02ml de sangre.

7.2 CALIBRACIÓN

De acuerdo con las curvas de absorbancia mostradas en la figura 4.1 de paciente normal, paciente heterocigoto y paciente homocigoto, se tiene que tanto la hemoglobina S como la hemoglobina A absorben de manera considerable a los 532nm. Así que en una prueba de absorbancia es posible que se tengan datos que correspondan tanto a la presencia de hemoglobina A como de hemoglobina S, por lo que se hace importante tener en cuenta el aporte en la absorbancia de la hemoglobina A en un paciente heterocigoto. Por lo anterior, en la curva de calibración se requiere tener la posibilidad de hacer un barrido de concentración que vaya desde la correspondiente a un paciente normal (0% hemoglobina S) hasta la correspondiente a un paciente totalmente homocigoto (100% de HbS). Se partió de una muestra de un paciente normal, a la que se denominó CN, y una muestra de un paciente homocigoto, a la que se denominó SS. Para ambas muestras se midió la concentración de hemoglobina total (el laboratorio de hematología de la Universidad del Cauca) y el porcentaje de HbS (prueba de electroforesis cuantitativa de hemoglobina realizada por el laboratorio Angel de la ciudad de Cali).

Tabla 7.4. Valores de hemoglobina total y porcentajes de hemoglobina para las muestras CN y SS.

Muestras	Concentración de hemoglobina total (g/dl)	Porcentaje de Hemoglobinas (%)	
		HbA	HbS
CN	16,8	100	0
SS	8,3	0	100

Posteriormente se hicieron diluciones de la muestra SS en la muestra CN (proporciones), lo que garantiza que cada vez se tenga menos hemoglobina A y más hemoglobina S en la muestra a estudio, todo ello manteniendo constante

el volumen total de sangre de 0.02ml (20 λ) en la disolución. Cada muestra representa un porcentaje en la disolución, como se muestra en la tabla 7.5.

Tabla 7.5. Disoluciones de SS en CN

Número De disolución	Volumen de la disolución en las muestras			
	λ		%	
	CN	SS	CN	SS
1	20	0	100	0
2	15	5	75	25
3	10	10	50	50
4	5	15	25	75
5	0	20	0	100

El valor de concentración de HbA y HbS (en g/dl) para cada disolución está dado de acuerdo con la relación del porcentaje de la muestra CN y la muestra SS presente en cada disolución (tabla 7.5) a partir del valor de concentración de hemoglobina total de la muestras CN y SS en g/dl (tabla 7.4). Así: la disolución numero 1 tiene 100% de la muestra CN y 0% de la muestra SS por tanto la muestra CN aporta 16.8g/dl de HbA y la muestra SS aporta 0g/dl de HbS, mientras que la disolución 2 tiene 75% de la muestra CN y 25% de la muestra SS que representa un aporte 12,6g/dl de HbA por la muestra CN y un aporte 2,075 g/dl de HbS por la muestra SS y de la misma manera para las demás disoluciones, como se observa en la tabla 7.6.

Se montaron 5 tubos de ensayo con 4ml de buffer de fosfato y a cada uno de ellos se les agregó una disolución diferente. Posteriormente se depositaron en las cubetas utilizadas por el LS-532 junto con una sexta muestra que representa la referencia, para su respectiva medición de absorbancia. Los resultados de absorbancia obtenidos por el equipo se muestran en la tabla 7.7.

Tabla 7.6. Disoluciones de SS en CN con la respectiva concentración de HbS en la disolución.

Número De disolución	Volumen de la disolución en las muestras		
	%		g/dl
	CN	SS	HBS
1	100	0	0
2	75	25	2,075
3	50	50	4,150
4	25	75	6,225
5	0	100	8,300

Tabla 7.7. Valores de absorbancia para cada disolución obtenidos por el LS-532.

Numero de disolución	Absorbancia (LS-532)
1	0,047
2	0,045
3	0,040
4	0,036
5	0,029

Como se reporta en el capítulo 3, para la aplicación de la ley de Beer es necesario calcular el valor del coeficiente de extinción que relaciona la absorbancia de una muestra con su concentración. Para ello se grafican los valores de concentración de HbS en g/dl reportados en la tabla 7.6 para cada disolución en función de la absorbancia, datos reportados en la tabla 7.7. El resultado es una línea recta donde la pendiente de la línea ($\Delta C/\Delta A$) es el coeficiente de extinción específico (figura 7.2).

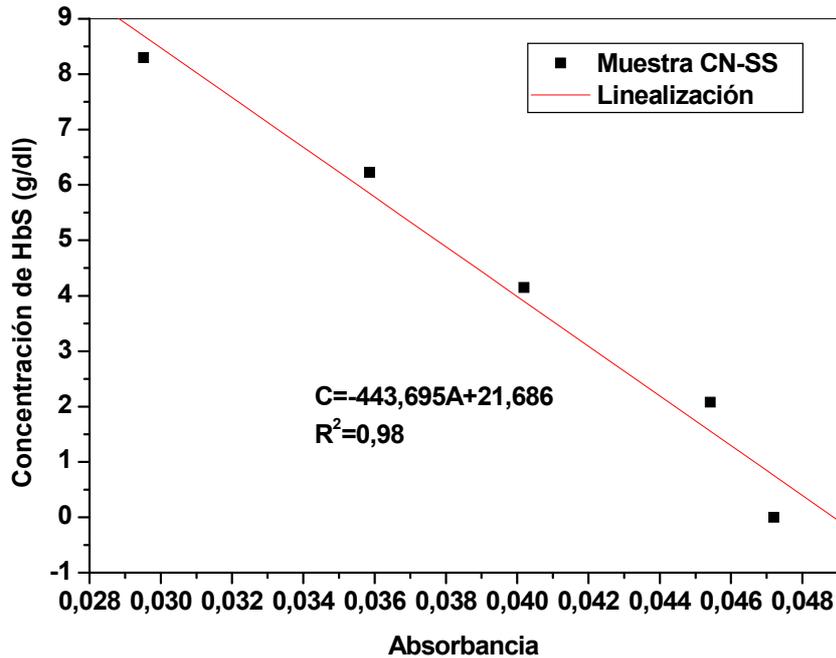


Figura 7.2. Recta de calibración del espectrofotómetro LS-532

Por tanto el valor del coeficiente de extinción específico para la HbS a una longitud de onda de 532nm es: $\epsilon l = -443,69 \frac{g}{dl}$. El valor del intercepto 21,686 es utilizado para fijar la recta a cero (puesta a cero). Así, se tiene que

$$C = -443,695A - 21,686 \quad (7.1)$$

Con esta ecuación se obtiene la concentración de HbS en g/dl para cada medida de absorbancia registrada para una muestra en estudio. Por otro lado, los médicos de la unidad de hematología de la Universidad del Cauca manejan datos de concentración en unidades de porcentaje respecto a la hemoglobina total de la muestra del paciente. Esto permite comparar los resultados obtenidos por el LS-532 directamente con los resultados de electroforesis de hemoglobina y así verificar la concordancia de los resultados y, por ende, del funcionamiento del espectrofotómetro LS-532.

7.3 RESULTADOS DE VERIFICACIÓN

Para la verificación del espectrofotómetro LS-532 se cuenta en el laboratorio de hematología con dos muestras de pacientes a las que se denominarán muestra AR y muestra YL. La muestra AR fue medida por el laboratorio Asoclinic Ltda y para la muestra YL por el Laboratorio Angel de la ciudad de Cali (ver Anexo C). Los resultados obtenidos por los laboratorios y por el espectrofotómetro LS-532 se muestran en la tabla 7.8.

Tabla 7.8. Resultados obtenidos mediante electroforesis y con el espectrofotómetro LS-532.

Muestra	% Concentración de HbS (Electroforesis)	% Concentración de HbS (Espectrofotómetro LS-532) $\pm 0,14 \%$	% Error
AR	39,2	39,1	0,25
YL	56,1	56,3	0,35

Como se puede observar en la tabla 7.8 los resultados obtenidos con el espectrofotómetro LS-532 están muy próximos a los obtenidos por los laboratorios especializados, con un margen de error que se encuentra entre lo esperado de acuerdo con el error de medida del equipo. Con estos datos se verifica el buen funcionamiento del LS-532.

CONCLUSIONES

Se alcanzó el objetivo general del proyecto, es decir, se diseñó y construyó un sistema automatizado para la detección y cuantificación de HbS, al que se denominó espectrofotómetro LS-532. La ejecución del proyecto permitió obtener conclusiones que reforzaron el aprendizaje, tales como:

- La fuente de radiación utilizada, el modulo diodo láser de 532nm a 5mW, se escogió por su buena funcionalidad y bajo costo, logrando obtener buena estabilidad del haz, requiriéndose un determinado tiempo de estabilización.
- Es posible eliminar en buena cantidad el ruido eléctrico proveniente de la fuente conectando en modo fotovoltaico al fotodiodo, acompañado de un acople de impedancias y un filtro activo pasa bajas.
- Se optimizó el proceso de tratamiento a la muestra al identificar la dilución adecuada mediante la realización de una gráfica que permitió observar el comportamiento de la ley de Beer a diferentes concentraciones.
- Para conocer el valor de porcentaje de concentración de HbS en la muestra es necesario tener en cuenta el valor de concentración de hemoglobina total.
- Se consiguió una buena calibración del espectrofotómetro LS-532 combinando proporciones de volumen de sangre de una muestra CN y una muestra SS manteniendo constante el volumen total de la sangre, esto permite hacer un barrido de porcentaje de hemoglobina S contenido en un paciente normal hasta un paciente homocigoto (100% de HbS).
- La comparación de los resultados obtenidos con el LS-532 y los obtenidos por laboratorios especializados da confiabilidad al equipo y

proceso de medida de cuantificación de HbS, lo que será de gran ayuda al laboratorio de Hematología de la universidad del Cauca ubicado en el Hospital Universitario San José.

ANEXO A

MANUAL DE FUNCIONAMIENTO DEL ESPECTROFOTÓMETRO LS-532

- Cerciórese de que el lugar de instalación propuesto cumpla con condiciones normales ambientales para un funcionamiento seguro.
- El instrumento debe colocarse sobre un estante o mesa plana, que proporcione estabilidad al equipo.
- El equipo debe conectarse a un voltaje de 120 VAC.
- Las cubetas a utilizar deben ser del mismo embalaje para garantizar reproducibilidad de los datos.
- Las cubetas deben estar en buen estado y adecuadamente limpias.
- En la pantalla LCD aparecerán las indicaciones que le ayudarán a utilizar el equipo, de la siguiente manera:

**INICIALIZANDO...
CALENTANDO LASER**

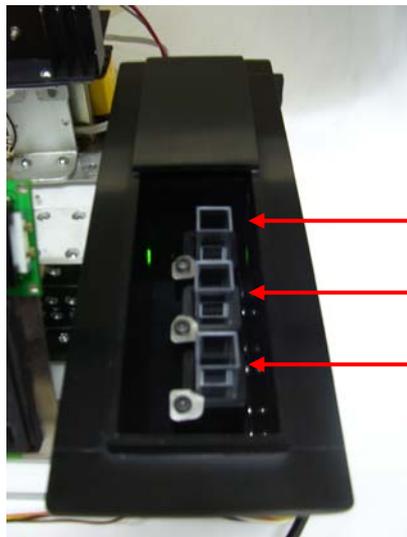
El equipo esta inicializando el sistema y espera 7 minutos necesarios para estabilizar el láser

LASER ESTABLE

El láser está estable y presiones A para continuar.

**COLOQUE MUESTRAS
A. OK**

Introduzca las muestras en el portamuestra indicado, de acuerdo a la siguiente figura y pulse A para aceptar



Portamuestra para el blanco

Portamuestra para la muestra1

Portamuestra para la muestra2

CERRAR A. OK
COMPARTIMIENTO

Cierre el compartimiento y pulse A para aceptar.

MUESTRAS A MEDIR
1 o 2 A.OK

Indique el número de muestras a medir, si es una presione 1 y A y si es dos presione 2 y A.

INGRESE Hb TOTAL
[a/dl] A.OK

Solicita el valor de concentración de hemoglobina total de la muestra y A para aceptar.

RESULTADO
[1] % [2] %

Despliega el resultado del porcentaje de HbS en cada muestra

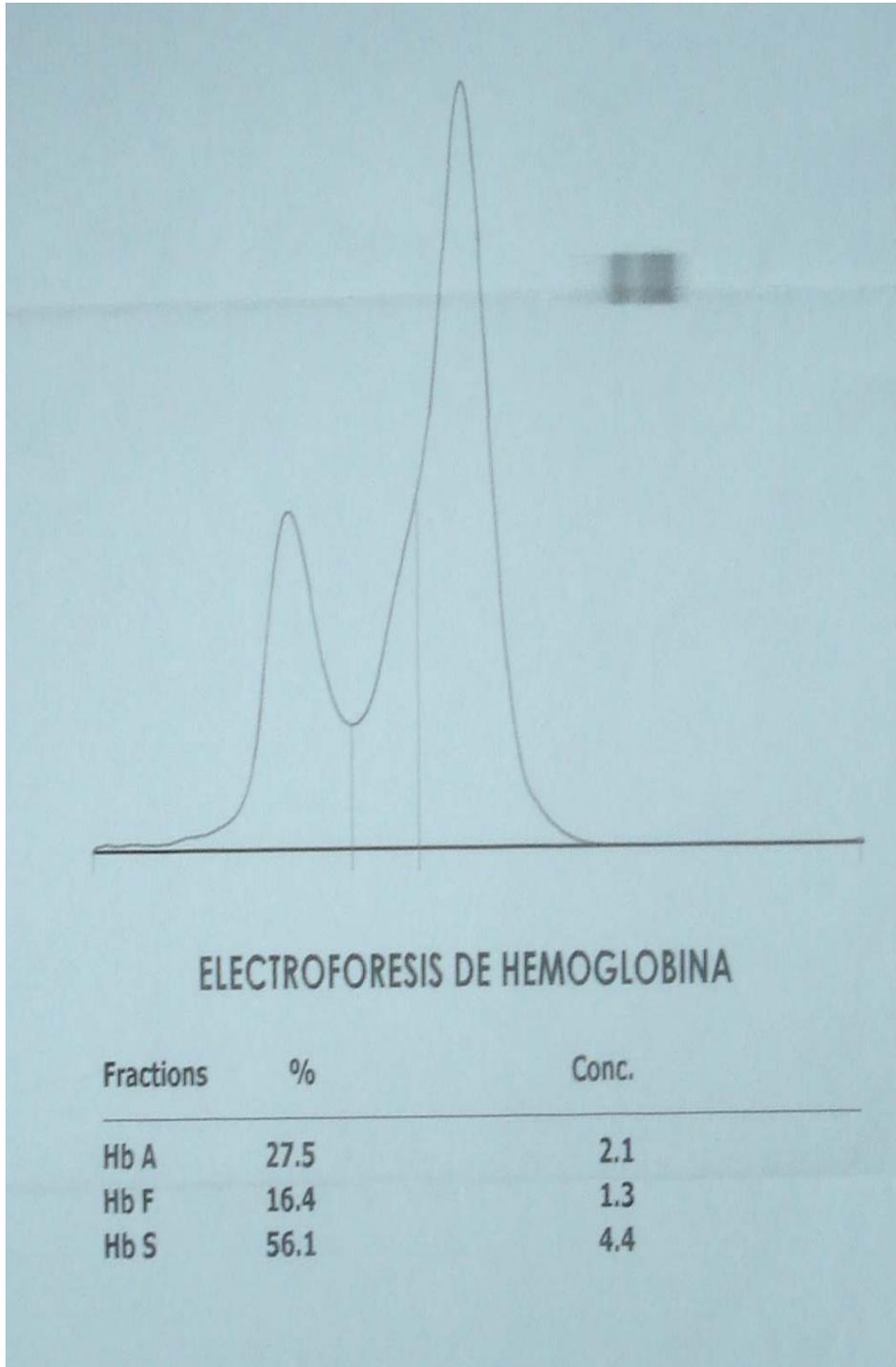
ANEXO B

RECOMENDACIONES

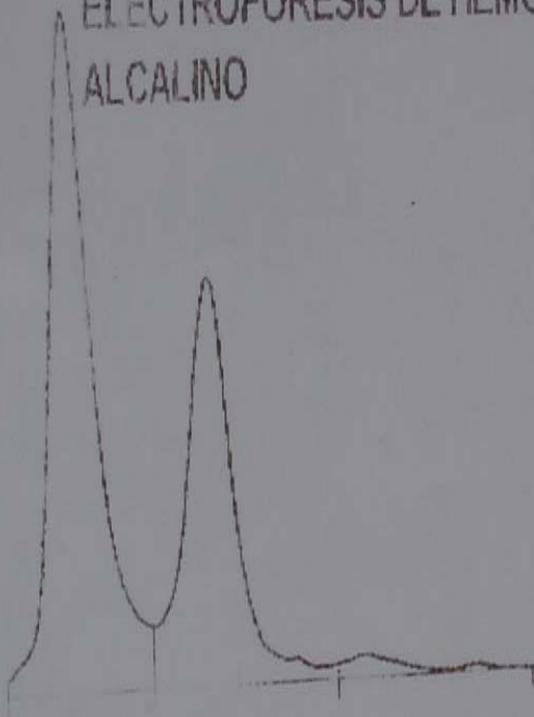
1. Para el mejoramiento del espectrofotómetro LS-532 en cuanto a funcionalidad se recomienda hacer uso de un láser con mejores características el cual sea estable en un menor tiempo.
2. Si se desea seguir con la implementación del diseño del espectrofotómetro de doble haz es necesario hacerle algunos cambios en dispositivos ópticos tales como el divisor de haz y el láser, ya que en el mercado se encuentran estos mismos elementos con mejores características que no presenten el comportamiento mostrado en el capítulo IV.
3. Mediante la implementación de un software tanto en el PIC como en el PC el equipo está en la capacidad de enviar los datos hacia este último mediante el puerto serial ubicado en la DAQ.

ANEXO C

PRUEBAS DE VERIFICACIÓN DE RESULTADOS



ELECTROFORESIS DE HEMOGLOBINA EN MEDIO
ALCALINO



Fractions	%	Ref. %
Hb A	58,0	
Hb S	39,2	
Hb A2	2,8	