

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL BASADO EN LA
TÉCNICA LIBS (*LASER INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY*) EN
TEJIDO CERVICAL NORMAL Y TUMORAL MALIGNO**

NELSON ACEVEDO SARMIENTO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE FÍSICA
BUCARAMANGA
2010**

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL BASADO EN LA
TÉCNICA LIBS (*LASER INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY*) EN
TEJIDO CERVICAL NORMAL Y TUMORAL MALIGNO**

NELSON ACEVEDO SARMIENTO

Trabajo de grado como requisito para optar al título de Físico

Director:

Msc. Rafael Cabanzo Hernández

Codirector:

Dr. Ernesto García Ayala



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE FÍSICA
BUCARAMANGA
2010**

*A mis padres:
Hugo e Isabel*

*A mi hermano:
Jaime*

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por ofrecerme su luz en los momentos de penumbra y oscuridad, por brindarme la oportunidad de culminar mis estudios a pesar de los problemas de salud.

A mis padres por darme la vida, su amor y por la formación humana y académica de calidad que me han brindado. A mi padre **Hugo Acevedo** por su esfuerzo, entrega y sacrificio, y especialmente por sus consejos y enseñanzas. A mi madre **Isabel** por su infinita paciencia, apoyo y comprensión. A mi hermano **Jaime** por su amistad, por apoyar y patrocinar todas mis locuras.

Al profesor **Rafael Cabanzo Hernández**, director de este proyecto, maestro e investigador admirable, por su valiosa e incondicional colaboración.

Al doctor **Ernesto García Ayala**, codirector de proyecto, por su colaboración y aporte intelectual.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	14
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	17
1. CONCEPTOS GENERALES	
1.1 ESPECTROSCOPIA ATÓMICA DE EMISIÓN	18
1.2 SISTEMA ESPECTROSCÓPICO	19
1.3 ESPECTROSCOPIA DE PLASMA INDUCIDO POR LÁSER (LIBS)	
1.3.1 Generalidades	20
1.3.2 Fenomenología	22
1.3.3 Físicoquímica del Plasma Inducido por Láser (LIBS)	24
1.3.4 Análisis Cualitativo	27
1.4 CÁNCER DE CUELLO UTERINO	
1.4.1 El cérvix	28
1.4.2 Generalidades y fenomenología	29
2. IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA LIBS EN TEJIDO CERVICAL	

2.1 DISEÑO DEL SISTEMA EXPERIMENTAL	31
2.1.1 Diseño de la Celda de Ablación	33
2.3 OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS EXPERIMENTALES	35
2.4 MUESTRAS BIOLÓGICAS	36
3. RESULTADOS	
3.1 ANÁLISIS CUALITATIVO	38
3.2 ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO	45
4. CONCLUSIONES	50
5. RECOMENDACIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	52
ANEXOS	
Anexo A. Experiencia de trabajo con muestras en formol	55
Anexo B. Gráficas del área promedio para algunas líneas	57

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Líneas analíticas de los elementos y ventanas espectrales.	39
Tabla 2. Coeficiente de variación de la desviación estándar.	42
Tabla 3. Promedio total del área bajo la curva y relación de intensidad para cada línea.	46
Tabla 4. Relación de intensidad N 744.229nm/Na 589.5924nm para cada muestra.	48

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Evolución temporal de la radiación emitida por el plasma	26
Figura 2.	Esquema del sistema experimental	31
Figura 3.	Fotografía de la celda de ablación	34
Figura 4.	Diseño del porta-muestras	34
Figura 5.	Espectros de tejido cervical (C280,C390)	38
Figura 6.	Espectros de tejido Cervical (C470, C770)	39
Figura 7.	Área promedio para Ca 373.69nm	43
Figura 8.	Área promedio para Mg 285.213nm	43
Figura 9.	Área promedio para N 744.229nm	44
Figura 10.	Relación de intensidad para cada línea	47
Figura 11.	Relación N/Na para cada una de las secciones analizadas	49

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Experiencia de trabajo con muestras en formol	55
Anexo B. Gráficas del área promedio para algunas líneas	57

RESUMEN

TÍTULO: IMPLEMENTACIÓN DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL BASADO EN LA TÉCNICA LIBS (*LASER INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY*) EN TEJIDO CERVICAL NORMAL Y TUMORAL MALIGNO*

AUTOR:

NELSON ACEVEDO SARMIENTO**

PALABRAS CLAVES:

LIBS, ESPECTROSCOPIA, ANÁLISIS CUALITATIVO, CÁNCER DE CERVIX.

DESCRIPCIÓN:

En la técnica LIBS, un láser de alta potencia es enfocado sobre la muestra mediante un sistema óptico para originar un conjunto complejo de procesos cuyos modelos extremos corresponden a ablación y vaporización, y consecuentemente la formación de un plasma en expansión. La radiación emitida por las especies excitadas en la pluma del plasma es recolectada para hacer análisis cualitativo y cuantitativo. Esta técnica se ha convertido en una herramienta muy versátil para el análisis multielemental de muestras en cualquiera de sus estados de agregación, es prácticamente no destructiva, no requiere preparación de la muestra y alcanza límites de detección muy bajos para algunos elementos.

En este trabajo se presentan los primeros resultados sobre la implementación de la técnica LIBS en tejido epitelial de cuello uterino, normal y tumoral maligno. Se diseñó un montaje experimental que permite analizar muestras de tejidos biológicos provenientes de procedimientos quirúrgicos como biopsias e hysterectomías. La celda de ablación construida permite irradiar la muestra en diferentes puntos. De esta forma es posible hacer análisis local; ahora bien, si se tiene información de diferentes puntos de la muestra, es posible hacer un análisis global mediante una estadística básica.

Se logró identificar líneas analíticas de elementos como C, Mg, Ca, Al, Fe, Na, H, Si, N, O y K. Mediante el análisis de la distribución de intensidad en el espectro para algunas líneas de emisión, se logró establecer parámetros que permiten diferenciar claramente muestras normales y cancerígenas de cérvix.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de física. Director: Rafael Cabanzo Hernández. Codirector: Ernesto García Ayala.

SUMMARY

TITLE: IMPLEMENTATION OF AN EXPERIMENTAL ASSEMBLY BASED IN THE TECNIQUE LIBS (LASER INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY) IN NORMAL AND MALIGNANT CERVICAL TISSUE*

AUTHOR:

NELSON ACEVEDO SARMIENTO**

KEYWORDS:

LIBS, SPECTROSCOPY, QUALITATIVE ANALISIS, CANCER OF CERVIX.

DESCRIPTION:

In the LIBS technique, a high power laser is focused onto the sample through an optical system to trigger a complex set of processes whose extreme models correspond to ablation and vaporization, and consequently the formation of an expanding plasma. The radiation emitted by the excited species in the plasma plume is collected for qualitative and quantitative analysis. This technique has become a versatile tool for mutilementary analysis of samples in any state of aggregation, is practically non-destructive, requires no sample preparation and achieves very low detection limits for some elements.

In this paper we present the first results on the implementation of the LIBS technique in cervical epithelial tissue, normal and malignant tumor. An experimental setup was designed to analyze biological tissue samples from biopsies and surgical procedures such as hysterectomies. The ablation cell Built allows irradiating the sample at different points. Thus it is possible to do local analysis; however, if you have information from different points of the sample, it is possible to make a global analysis using a basic statistics.

We identified analytical lines of elements such as C, Mg, Ca, Al, Fe, Na, H, Si, N, O and K. By analyzing the intensity distribution in the spectrum for some emission lines, were able to establish clear parameters for distinguishing normal samples and cervical cancer.

* Work Degree

** Faculty of sciences, School of Physics, Directress: Rafael Cabanzo Hernández. Codirectress: Ernesto García Ayala.

INTRODUCCIÓN

La técnica espectroscópica LIBS (*Laser Induced Breakdown Spectroscopy*) utiliza como fuente emisora un plasma generado a partir de la interacción explosiva láser-materia que se produce al focalizar un pulso láser de alta potencia sobre una muestra, bajo ciertas condiciones experimentales que garantizan la formación del plasma y la reproducibilidad del experimento¹. El espectro emitido por las especies excitadas en el plasma es utilizado para realizar análisis cualitativo y cuantitativo, con límites de detección muy bajos en el rango de algunos cientos de partes por millón para la mayoría de los elementos².

Desde sus inicios, se ha convertido en una herramienta muy versátil para el análisis multielemental de muestras como metales, plásticos, minerales³, tejidos biológicos⁴, aerosoles y líquidos entre otros⁵; ofreciendo resultados en tiempo “real”, con una mínima manipulación de la muestra y prácticamente sin destrucción de la misma⁶.

¹ RUSSO, R. E. *Laser ablation*. Appl. Spectrosc. Vol. 49, 1995. p.14A – 28A

² MIZIOLEK, A. W.; Palleschi, V. and Schechter, I. *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Cambridge: University Press, 2006. Cap. 1

³ ORTIZ, Harry y BLANCO, Freddy. *Análisis de elementos en carbones colombianos por LIBS y LA-ICP-AES*. Bucaramanga, 2005. Trabajo de grado (Físico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Física.

⁴ KUMAR, A. et al. *Characterization of malignant tissue cells by laser-induced breakdown spectroscopy*. En: Appl. Opt. Vol. 43, 2004. p. 5399-5404

⁵ YUEH, F. Y.; Singh, J. P. and Zhang, H. *Elemental analysis with laser-induced breakdown spectroscopy*. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. UK: Wiley, 2000.

⁶ SONG, K.; Lee, Y. I. and Sneddon, J. *Applications of laser induced breakdown spectrometry*. En: Appl. Spectrosc. Vol. 23, 1997. p. 183–235

Alrededor de esta técnica se han desarrollado innumerables aplicaciones prácticas como las utilizadas para el seguimiento de procesos y control industrial, monitoreo ambiental⁷, diagnóstico médico⁸, equipos militares y análisis en el espacio de material extraterrestre⁹.

En los últimos años, el Laboratorio de Espectroscopía Atómica y Molecular (LEAM) y el grupo Ciencia de Materiales Biológicos y Semiconductores (CIMBIOS) de la UIS, dentro de sus programas de investigación han demostrado gran interés en la implementación de nuevas técnicas que permitan estudiar y caracterizar muestras biológicas, especialmente tejido tumoral maligno. Existen muchas hipótesis sobre lo que realmente puede ser el cáncer, el grupo CIMBIOS propone y maneja una muy importante y muchos de sus estudios se encaminan en una sola causa, demostrar su validez¹⁰.

El objetivo de esta investigación es implementar un montaje experimental para la técnica LIBS que permita estudiar muestras de tejido epitelial de cuello uterino normal y tumoral maligno. Parte importante de este trabajo comprende el diseño y construcción del sistema experimental que permite la adquisición de espectros LIBS de tejido cervical. Con la información extraída de los espectros se pretende comprobar si mediante esta técnica es posible diferenciar un tejido normal de un tejido tumoral maligno.

⁷ MOREL, S. et al. *Detection of bacteria by time-resolved laser-induced breakdown spectroscopy*. En: Appl. Opt. Vol. 42, 2003. p. 6184–6191

⁸ SAMEK, O. et al. *Clinical application of laser-induced breakdown spectroscopy to the analysis of teeth and dental materials*. En: Laser Med. Surg. Vol. 18, 2000. p. 281–289

⁹ THOMPSON, J. et al. *The suitability of Laser Induced Breakdown Spectroscopy for determining the compositions of extraterrestrial material*. En: Lunar and Planetary Science XXXV (2004). 1912. Pdf.

¹⁰ MIRANDA, D. A.; BARRERO, J. G. y, ECHEVERRI, J. H. Estudio piloto de detección temprana de cáncer de cuello uterino basado en espectroscopía de impedancia eléctrica. En: SaludUIS . 2006.

En el primer capítulo se presentan algunos aspectos fundamentales sobre la espectroscopía atómica de emisión y la técnica espectroscópica LIBS, sus ventajas, fenomenología, análisis fisicoquímico del plasma y algunas bases teóricas para el análisis espectroscópico; además se realiza una pequeña revisión sobre el cuello uterino y las afecciones cancerígenas que puede presentar.

En el segundo capítulo se presentan y describen los equipos utilizados para el diseño y posterior ensamble del sistema experimental, como también los parámetros del montaje que fueron sometidos a variaciones en el proceso de optimización de la adquisición de datos.

En el tercer capítulo se exhiben los resultados del análisis cualitativo y semicuantitativo al que fueron sometidas las muestras seleccionadas. En el cuarto y último capítulo se muestran las conclusiones y recomendaciones del trabajo.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

OBJETIVO GENERAL

Implementar un montaje experimental basado en la técnica LIBS que permita estudiar muestras de tejido epitelial de cuello uterino normal y tumoral maligno.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar y ensamblar un montaje experimental para la obtención de espectros de emisión atómica inducido por radiación láser de alta energía y corta duración (LIBS).
- Mejorar el montaje hasta un estado óptimo recomendable.
- Obtener espectros LIBS de tejido normal y tumoral maligno de cérvix.
- Comparar la lectura histopatológica con el análisis cualitativo y semicuantitativo de las muestras, realizado mediante la técnica LIBS.

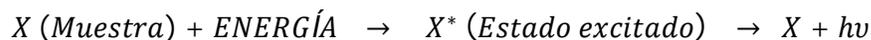
1. CONCEPTOS GENERALES

1.1 ESPECTROSCOPIA ATÓMICA DE EMISIÓN

Según la teoría atómica, un átomo se concibe como un sistema compuesto por un núcleo con uno o más electrones ocupando ciertos orbitales que representan la probabilidad de encontrar el electrón en una posición relativa al núcleo. Los átomos sólo pueden existir en determinados niveles energéticos y el de menor energía es conocido como el estado fundamental. Los estados de energía superiores se denominan estados excitados. La transición entre estados de energía se produce por absorción o emisión de un fotón, de manera que la frecuencia característica de esta transición (ν) viene determinada por la relación:

$$\nu = \Delta E/h; \quad \Delta E = E_f - E_i$$

Donde h es la constante de Planck y ΔE la diferencia de energía entre los estados inicial (E_i) y final (E_f). La medición e interpretación de la radiación electromagnética emitida, dispersada o absorbida por átomos, moléculas u otras especies químicas, se puede utilizar para obtener información cualitativa y cuantitativa acerca de la composición química y estructural de la muestra. Los métodos atómicos de emisión se basan en la medida de la radiación emitida por los átomos de una muestra principalmente en las regiones ultravioleta y visible del espectro electromagnético, mediante un proceso de tipo excitación-relajación:



La energía utilizada en el proceso de excitación puede proceder de diversas fuentes, dando lugar a la implementación de varias técnicas espectroscópicas como lo son fluorescencia de rayos X, espectrometría de emisión por chispa,

plasma generado por acoplamiento inductivo de radiofrecuencia (ICP) y la espectroscopía de plasma inducido por láser (LIBS) entre otros¹¹.

1.2 SISTEMA ESPECTROSCÓPICO

Un espectro puede definirse como una representación gráfica de la distribución de la intensidad de la radiación electromagnética, absorbida o emitida por una muestra, en función de una magnitud característica como la longitud de onda o energía¹². El espectro obtenido está determinado por las propiedades y composición química de la muestra, además del mecanismo que sea implementado como fuente de excitación.

Es común denominar como espectroscopio a cualquier instrumento que permita producir y estudiar un espectro en cualquier región espectral. Si este sistema permite registrar el espectro sobre una placa fotográfica se denomina espectrógrafo, si brinda una lectura de la longitud de onda recibe el nombre de espectrómetro y si además permite medir la intensidad de la radiación se conoce como espectrofotómetro.

Un espectrómetro está compuesto principalmente por una hendidura de entrada, un sistema dispersor, un sistema óptico de enfoque y un detector¹³. El tamaño de la hendidura regula la cantidad de luz que entra al sistema óptico, que se compone de una combinación de lentes o espejos, permitiendo la formación de imágenes de la hendidura en el plano focal del sistema dispersor; este último se encarga de separar la radiación incidente en sus diferentes componentes espectrales. Otro sistema óptico se utiliza para recoger la radiación proveniente del elemento dispersor y enfocarla hacia el sistema de detección. Inicialmente

¹¹ MORCILLO, J. y ORZA, J. M. *Espectroscopia: estructura y espectros atómicos*. Madrid: Editorial Alhambra, 1972. Cap.1

¹² *Ibíd.*, Cap. 2

¹³ LÓPEZ, E. K.; MEJÍA, E. y CABANZO, R. *Implementación de un montaje experimental para la técnica LIBS (Laser Induced breakdown spectroscopy) basado en el espectrómetro HR4000 de Ocean Optics*. En: *Rev. Col. Fis.* Vol. 39, 2007. p. 240-243

fueron utilizados algunos prismas como sistemas dispersores, aunque en la actualidad son empleadas más frecuentemente las rejillas de difracción¹⁴.

Anteriormente se realizaban registros espectrales en películas fotográficas, pero el tiempo promedio para revelar un espectro es muy elevado. Esto indujo el desarrollo de detectores de tipo electrónico. Hoy en día podemos encontrar detectores desde los más sencillos como los fotodiodos (PD) y los tubos fotomultiplicadores (PMT), hasta arreglos bidimensionales de estos como los PDA (*Photodiode Arrays*), CCD (*Charge-Coupled Devices*) e ICCD (*Intensified CCD*). Estos arreglos bidimensionales son integradores de luz, recogen la radiación por un periodo de tiempo (generalmente microsegundos) secuencialmente pixel por pixel, lo cual limita su velocidad de respuesta, entre tanto, los tubos fotomultiplicadores y los fotodiodos tienen mayor velocidad de respuesta y pueden ser utilizados para realizar análisis temporal.

1.3 ESPECTROSCOPIA DE PLASMA INDUCIDO POR LÁSER (LIBS)

1.3.1 Generalidades. En 1963, pocos años después del descubrimiento del láser, aparece el primer láser pulsado (*Q-Switched*) y con éste las primeras demostraciones hechas por F. Brech y L. Cross de plasmas inducidos por láser en una superficie¹⁵. Estos hechos evidenciaron el nacimiento de la técnica *LIBS* (*Laser Induced Breakdown Spectroscopy*) y los subsecuentes años de significativos descubrimientos.

En la técnica LIBS, un láser de alta potencia es enfocado sobre la muestra mediante un sistema óptico para originar un conjunto complejo de procesos cuyos modelos extremos corresponden a ablación y vaporización, y que

¹⁴ YUEH, Op. Cit. p.14

¹⁵ BRECH, F. and CROSS, L. *Optical microemission stimulated by a ruby laser*. En: *Appl. Spectrosc.* Vol.16, 1962. 59p.

consecuentemente conducen a la formación de un plasma en expansión¹⁶. La radiación emitida por el plasma generado es recolectada, por ejemplo por lentes y una fibra óptica, y transmitida hasta la hendidura del espectrómetro¹⁷.

En las últimas décadas, la técnica LIBS se ha convertido en una herramienta muy versátil para el análisis multielemental de muestras. Ha sido implementada para analizar varios tipos de materiales como metales, gases y algunas muestras biológicas¹⁸, obteniendo resultados en tiempo “real” con una mínima preparación de la muestra, razón por la cual en los últimos años ha venido incursionando rápidamente en sectores como industria, astronomía, arqueología y medicina¹⁹.

Algunas ventajas de la técnica LIBS frente a otras técnicas espectroscópicas de emisión son:

- Puede trabajar con muestras muy pequeñas y en cualquiera de sus estados de agregación ya sean sólidos, líquidos o gases.
- Requiere una mínima manipulación de la muestra en contraste con los otros métodos convencionales, pues la ablación y excitación ocurren directamente sobre la región focalizada. De esta forma se eliminan los procesos químicos y el riesgo de que la muestra se contamine.
- Brinda un análisis multielemental rápido con resultados en tiempo “real”. Cuenta con la posibilidad de detectar casi todos los elementos y tiene buena sensibilidad para elementos como el cloro y el flúor difíciles de monitorear con otras técnicas.

¹⁶ RUSSO, Op. Cit. p. 14

¹⁷ LÓPEZ, Op. Cit. p. 19

¹⁸ KUMAR, Op. Cit. p. 14

¹⁹ PALLESCHI, V. et al. *Application of laser-induced breakdown spectroscopy technique to hair tissue mineral analysis*. En: Appl. Opt. Vol. 42, 2003. p. 6133–6137

- Muchas veces se puede realizar análisis *in situ* pues requiere solo de acceso óptico sobre la muestra²⁰.
- Es prácticamente no destructiva. La cantidad de material retirado de la muestra es del orden de 10^{-9} gramos y el cráter que se forma en la superficie de los sólidos es tan solo de algunas micras de diámetro.
- Adaptabilidad a los diferentes escenarios²¹, gracias al uso de la fibra óptica con la que se puede transportar luz a largas distancias para trabajar en ambientes hostiles o con materiales peligrosos. Recientemente se han descubierto nuevos materiales para la construcción de fibras ópticas que permiten transportar y enfocar grandes densidades de energía, además del diseño y construcción de espectrómetros más pequeños y láser miniaturas con los que ha sido posible acoplar todo un montaje en un dispositivo portátil²².

1.3.2 Fenomenología. Cuando un pulso láser de alta potencia es enfocado sobre una muestra sólida, se originan, por diferentes mecanismos, una serie de fenómenos muy complejos, los cuales dependen de las propiedades físicas y químicas del material, de los diferentes parámetros del haz láser, como: intensidad, longitud de onda, coherencia espacial y temporal, ángulo de incidencia y tiempo de duración del pulso entre otros. Las propiedades ópticas y térmicas de la muestra juegan un papel muy importante, pues finalmente son las encargadas de regular la cantidad de radiación absorbida y de energía disipada hacia el medio²³.

²⁰ MIZIOLEK, Op. Cit. p. 14

²¹ SONG, Op. Cit. p. 14

²² YAMAMOTO, K. Y. et al. *Detection of metals in the environment using a portable Laser- Induced Breakdown Spectroscopy Instrument*. En: Appl. Spectrosc. Vol. 50,1996. p. 222-233

²³ RUSSO, Op. Cit. p. 14

A partir de la irradiancia (W/cm^2), se pueden establecer dos modelos límites que son simplificaciones de la fenomenología originada por la interacción láser-material. Los dos modelos son: *vaporización y ablación*²⁴.

Si la duración del pulso es de microsegundos y la irradiancia menor que $10^6 W/cm^2$ es más probable que ocurran procesos de vaporización y una pequeña parte del material instantáneamente se convierta en vapor. La interacción predominante es de carácter térmico, siendo común observar material fundido y evaporación fraccional. Este fenómeno también es utilizado para remover material de la muestra, con diferentes aplicaciones en la medicina, arqueología e industria. Un problema propio de este modelo es que el vapor no es estequiométricamente representativo de la muestra, pues tendrá mayor concentración de elementos que son fáciles de evaporar.

Cuando la irradiancia es del orden de $10^9 W/cm^2$ y la duración del pulso es de nanosegundos, se produce una explosión en la superficie del material, dando como resultado la expulsión de especies atómicas, moleculares, formación de agregados (*clusters*), generación de ondas de choque y la iniciación de un plasma en expansión. El concepto de ablación láser es utilizado para describir la interacción explosiva láser-material, que deja como resultado un cráter de algunas micras de diámetro en la superficie de la muestra. Para irradiancias intermedias, puede ocurrir evaporación, ablación o los dos simultáneamente, además de otros mecanismos que aún no han sido identificados pero que son motivo fuerte de estudio²⁵.

El mecanismo por el que se produce la ablación depende de la competencia entre la velocidad con la que se deposita la energía del pulso y los tiempos característicos de relajación del material. Si la absorción de energía se lleva a cabo en un tiempo mucho menor al necesario para que el material y el entorno disipen la energía entregada, pueden ocurrir varios mecanismos como el aumento de temperatura, excitación térmica y no térmica, rompimiento directo

²⁴ RUSSO, Op. Cit. p. 14

²⁵ *Ibíd.*, p. 5

de la estructura y otros no identificados. Un híbrido de estos sucesos provoca cambios de volumen, stress (degradación del material), temperatura y presión entre otros, que finalmente combinados conducen a que se produzca el proceso de ablación, provocando que el material explote. Las partículas expulsadas del material cuentan con la suficiente energía para generar procesos de disociación, excitación e ionización que posteriormente conducirán a la formación del plasma.

No ha sido posible desarrollar un modelo que brinde una descripción general de todos los fenómenos que ocurren en esta interacción, aunque existen algunos modelos que logran explicar ciertos mecanismos. Algunos modelos fotoquímicos, fotofísicos, mecánicos y térmicos, intentan describir cada fenómeno como un evento, en el cual un mecanismo es dominante, siendo aplicables solo a ciertos materiales en un estrecho rango de condiciones experimentales²⁶.

La técnica *LIBS* combina la generación de un plasma, mediante el proceso de ablación, con la espectroscopía de emisión atómica. Gracias a la observación y análisis de la radiación emitida por las especies excitadas en la pluma del plasma. Estas emisiones, se dan por transiciones particulares entre niveles de energía de los átomos que constituyen la muestra; después de un corto tiempo, la temperatura del plasma decrece y los átomos ionizados decaen emitiendo radiación, siendo posible observar las líneas de emisión características de los elementos que constituyen la muestra²⁷.

1.3.3 Físicoquímica del Plasma Inducido por Láser (LIBS). El plasma es un gas de iones, átomos, moléculas y otras especies coexistiendo a una temperatura muy elevada. Está suficientemente ionizado como para que sus propiedades dependan significativamente de la ionización.

²⁶ MIZIOLEK, Op. Cit. p. 14

²⁷ LÓPEZ, Op. Cit. p. 19

La iniciación del plasma inducido por láser y sus características (densidad electrónica, temperatura y evolución temporal) son gobernadas por las características del láser, por la composición del material y por su entorno (atmósfera de gas). El plasma que se inicia en la muestra tiene una temperatura que excede los 10^4 °K, su duración es relativamente corta, tan solo de algunos microsegundos, en los que se extiende hacia todas las direcciones del volumen focal, sin embargo, la velocidad de expansión en la dirección del láser es mucho más alta, del orden de 10^5 m/s, porque la energía óptica entra al sistema en esta orientación. Este plasma se puede formar por el choque de electrones libres de alta energía cinética (debida a la absorción de radiación láser) con átomos en el estado fundamental o excitado, iones y otras especies presentes en la muestra, este mecanismo es llamado Bremsstrahlung inverso; otro mecanismo es la fotoionización de especies excitadas y si la intensidad del láser es suficientemente alta puede aparecer ionización multifotónica²⁸.

El plasma es considerado como un sistema heterogéneo en el que no hay condiciones de equilibrio total, no obstante, es posible asumir que en ciertas regiones del plasma las distribuciones de las propiedades se encuentran en equilibrio. Esta condición permite modelar plasmas asumiendo condiciones de equilibrio termodinámico local (LTE) donde se deben cumplir las siguientes condiciones²⁹:

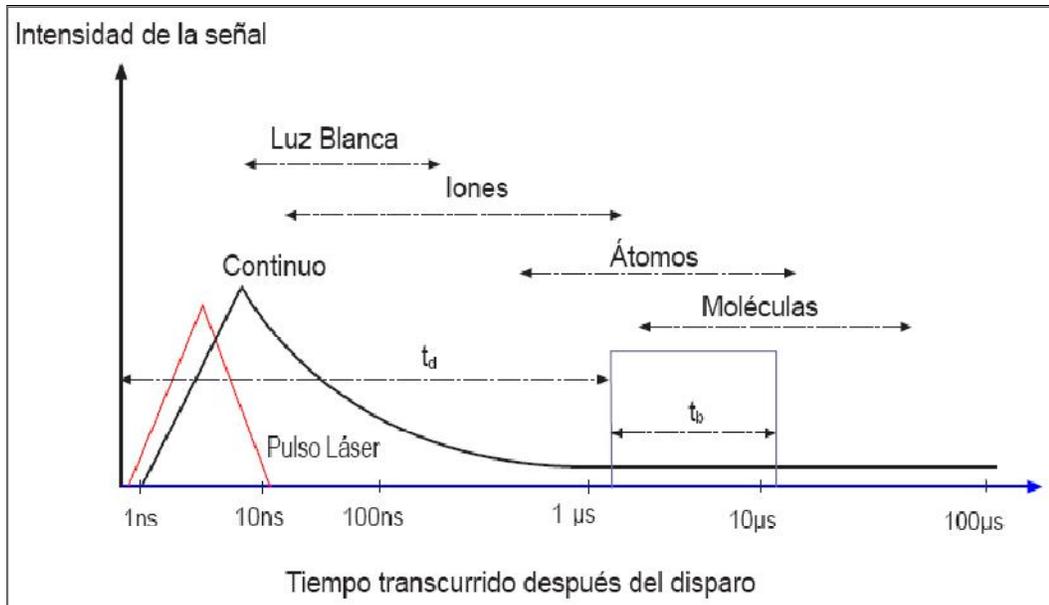
- Las temperaturas de ionización, excitación y disociación deben ser iguales para todas las especies.
- Las velocidades de excitación-relajación e ionización-recombinación deben ser aproximadamente iguales, las diferencias entre dichas velocidades representan procesos radiativos y calentamiento de Joule.

²⁸ RUSSO, Op. Cit. p. 14

²⁹ ORTÍZ, Op. Cit. p. 14

- La energía cinética de todas las especies con una temperatura en común, debe ser descrita por distribuciones de Maxwell sin importar la masa o la carga neta.

Figura 1. Evolución temporal de la radiación emitida por el plasma



* Fuente: A. Miziolek, V. Palleschi, I. Schechter, "Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: Fundamentals and Applications", pag. 7.

Como el plasma es producido por una fuente pulsada el espectro resultante evoluciona rápidamente en el tiempo, como se muestra en la figura 1. Inicialmente las emisiones están gobernadas por luz blanca, un espectro continuo que presenta pequeñas variaciones en la intensidad respecto de la longitud de onda y no contiene información útil acerca de las especies presentes, esta luz es producida por Bremsstrahlung inverso y recombinación de la radiación, así como por electrones e iones libres recombinados en el plasma mientras disminuye su temperatura³⁰.

³⁰ MIZIOLEK, Op. Cit. p. 14

En la práctica se deben tener en cuenta parámetros importantes como el tiempo de retardo (t_d), que es el tiempo entre el inicio de la formación del plasma y el inicio de la observación de la luz emitida, y el periodo sobre el cual se recoge la radiación o tiempo de integración (t_b), ambos del orden de microsegundos. Después del tiempo t_d y durante el periodo t_b las emisiones provenientes de especies atómicas son mucho más fuertes, siendo posible remover de los espectros el continuo que interfiere en la detección de la traza de los elementos presentes en la muestra.

1.3.4 Análisis Cualitativo. Cada átomo o molécula posee un espectro único, debido a que las líneas de emisión de cada uno son diferentes a las de otro. Existe un criterio sencillo para determinar si un elemento se encuentra presente en una muestra y se basa en que la probabilidad de que dos analitos coincidan en tres o más líneas de emisión es muy baja, entonces, un elemento puede ser identificado a través de la observación de tres o más de sus líneas analíticas³¹. Para dicha identificación, es necesario comparar la longitud de onda observada con los valores de las líneas de emisión de los diferentes elementos registrados en las bases de datos existentes³²; cuando no se cuenta con un espectrómetro la tarea es mucho más ardua, para llevar a cabo el proceso anterior es necesario precedentemente realizar una calibración de los espectros.

Cuando se hace análisis cualitativo, aparecen problemas como el ruido de fondo, la presencia de interferencias espectrales cuando no se cuenta con la resolución adecuada, a veces, suelen aparecer interferencias por bandas moleculares originadas por la acción del medio circundante en los procesos que conforman la adquisición de los espectros y muchos otros que solo con la práctica se pueden observar. Estos problemas pueden quedar a un lado en el proceso de optimización de la toma de datos, utilizando un espectrómetro de

³¹ MORCILLO, Op. Cit. p. 19

³² ZAIDEL. *Table of spectral lines*. Moscú:Editorial Mir, 1976. p. 752-782

mayor resolución, variando algunos parámetros del sistema, o simplemente observando otra región espectral.

Existen materiales no homogéneos como algunas rocas que presentan irregularidades en la distribución de los materiales que la componen tanto en su superficie como en las capas internas, en este caso, la composición de la superficie no es estequiométricamente representativa del material. Estas no uniformidades pueden ser estudiadas con un número mayor de pulsos para irrumpir en las capas internas de la muestra o variar la posición del disparo sobre la muestra; típicamente las señales de varios disparos láser son sumados y promediados para aumentar la exactitud y precisión³³.

1.4 CÁNCER DE CUELLO UTERINO

1.4.1 El Cérvix. El cérvix (o cuello uterino) es parte del sistema reproductor femenino, está ubicado en la parte inferior del útero y permite comunicarlo con la vagina a través de un canal muy estrecho. Durante la relación sexual produce mucosidad que ayuda a los espermatozoides para ascender por dicho canal hacia el interior del útero. En el embarazo se encuentra fuertemente cerrado para mantener al bebé dentro del útero, pero durante el parto se abre para permitir el paso del bebé hacia la vagina. Está formado por tejido colagenoso, elástico y por fibras musculares, además de una capa de mucosa protectora.

En el cérvix se distinguen dos partes, el exocérvix o parte externa del cuello que se encuentra revestido por tejido epitelial plano estratificado, y el endocérvix, tapizado por una mucosa rica en glándulas y revestido por tejido

³³ MIZIOLEK, Op: Cit. p. 14

epitelial cilíndrico³⁴. Existe una zona de transformación o de unión escamocolumnar que es la zona de transición entre el epitelio cilíndrico y el estratificado, allí es donde frecuentemente se inician las diferentes neoplasias del cérvix³⁵.

1.4.2 Generalidades y Fenomenología. Se cree que algunos agentes carcinógenos como sustancias químicas, radiaciones ionizantes provenientes de reactores y explosiones nucleares, y la misma radiación ultravioleta procedente del sol, tienen la propiedad de activar algún mecanismo dentro de la célula que genera mutaciones y alteraciones en la información genética que controla el crecimiento y reproducción de las células. Muchas veces algunas de estas células se siguen multiplicando y creciendo sin control, de forma autónoma e irreversible, causando un tejido anormal con rasgos funcionales y morfológicos diferentes a los de sus precursoras, dicho tejido recibe el nombre de tumor; algunos de estos tumores tienen la propiedad de aparecer nuevamente, aún mucho después de eliminar la causa que los produjo*.

Si el tumor no invade los tejidos cercanos y otras partes del cuerpo se llama tumor benigno o no canceroso, muy pocas veces amenaza la salud. Ahora bien, si el tumor invade o destruye las células cercanas, recibe el nombre de tumor maligno o cáncer, estos tumores representan una nueva amenaza para la vida y un nuevo problema para la salud. Los cánceres tienen la capacidad de producir invasión a distancia o metástasis, que es la aparición de implantes secundarios lejanos al tumor primario; a todos los tumores se les asigna un nombre dependiendo del lugar donde se formaron, por ejemplo, un tumor

³⁴ NATIONAL CANCER INSTITUTE of EE. UU. Lo Que Usted Necesita Saber Sobre: El Cáncer de Cérvix. <http://www.cancer.gov/publications>.

³⁵ COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD. Dirección general de promoción y prevención. Norma técnica para la detección temprana de cáncer de cuello uterino y guía de atención de lesiones preneoplásicas de cuello uterino.

* Para más información se recomienda visitar la página web <http://www.cancer.org>

maligno que se origine en las células epiteliales del cérvix recibe el nombre de cáncer de cérvix o cáncer de cuello uterino.

El cáncer de cuello uterino es el segundo tipo de cáncer más común en el mundo en mujeres, y cobra más de 231.000 muertes por año. La detección temprana de cáncer de cuello uterino puede ayudar a salvar vidas cuando se somete a la paciente a un tratamiento adecuado³⁶. La evidencia epidemiológica parece revelar que el cáncer de cuello uterino se comporta como una enfermedad de transmisión sexual. Actualmente se tienen identificados muchos factores de riesgo y se han desarrollado numerosos programas preventivos, pero controvercialmente las tasas de incidencia continúan creciendo y se hacen alarmantes³⁷.

Existen varias técnicas para identificar células malignas en tejido epitelial, tales como la citología o prueba de Papanicolaou, el uso de un colposcopio y las biopsias, que pueden ser biopsias con sacabocados, escisión electroquirúrgica con asa, legrado y conización cervical³⁸. Si las pruebas demuestran que hay presencia de células malignas, es necesario saber el estadio de desarrollo o extensión del cáncer para determinar y planear el mejor tratamiento, para esto se han unificado diferentes sistemas de clasificación de acuerdo a los conceptos citológicos³⁹.

³⁶ AMAYA, Jairo y RESTREPO, Sonia. Tamizaje para cáncer de cuello uterino: cómo, desde y hasta cuándo. En: Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología. Vol. 56, 2005. p. 59-67

³⁷ ARROSSI, S.; SANKARANARAYANAN, R. and MAXWELL, D. Incidence and mortality of cervical cancer in Latin America. En: Salud Pública de México. Vol. 45, 2003, suplemento 3.

³⁸ MORADEL, M. A.; CRESPIAN, M. and AGUILAR, O. *Conización del cuello uterino en patología cervical*. En: Rev. Med. Hondureña. Vol. 60, 1992. p. 163-166

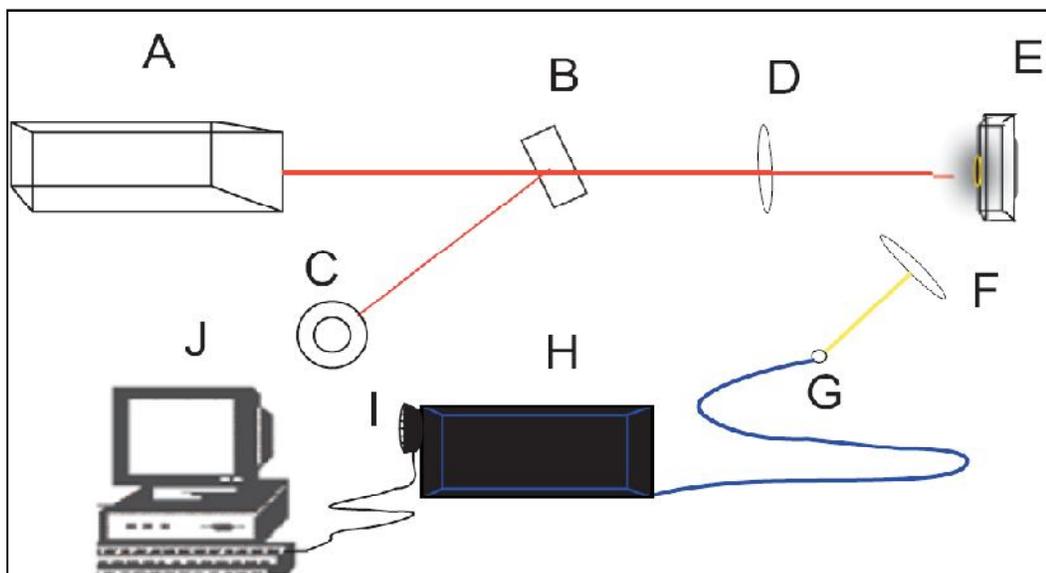
³⁹ MANTILLA, R.; VEGA, A. y INSUASTY, E. Registro de cáncer, unidad oncológica, Hospital Universitario de Santander Ramón Gonzales Valencia, Bucaramanga, Colombia (1966-1999)". En: Med. UNAB. p. 14-19

2. IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA LIBS EN TEJIDO CERVICAL

2.1 DISEÑO DEL SISTEMA EXPERIMENTAL

El montaje que se ha diseñado para estudiar células malignas en tejido epitelial de cuello uterino está basado en la técnica LIBS, un esquema de este se muestra en la figura 2. Consta de un láser pulsado [A] Nd:YAG (*Quanta Ray Spectra Physics*) que puede trabajar a longitudes de onda de 1064, 532, 355 y 266nm, con un ancho temporal del pulso de aproximadamente 8ns, energía por pulso de 150mJ y puede ser operado a una frecuencia de 10Hz en modo repetitivo. En esta investigación se trabajó con el primer y segundo armónico, es decir, con longitudes de onda de 1064 y 532nm respectivamente. Para registrar el valor de la energía del haz, se utilizó opcionalmente un separador de haz [B] (*beam splitter*) que desvía parte de la radiación (aproximadamente 50%) a un medidor de energía [C] (*NOVA, OPHIR*) con detector piroeléctrico PE50-BB-DIF-SH.

Figura 2. Esquema del sistema experimental



Para focalizar la radiación láser sobre una pequeña región de la muestra se utilizó una lente biconvexa de cuarzo [D] de 20cm de distancia focal, que junto con el porta-lente diseñado, constituyen el sistema óptico de enfoque*. El porta-lente permite ajustar la posición de la lente en la dirección de incidencia del haz láser. El proceso de ablación y la formación del plasma tienen lugar en la celda de ablación [E], cuya atmósfera de trabajo puede ser aire o argón. En el numeral siguiente se tratará con más detalle el diseño y funcionalidad de la celda construida.

Un Sistema óptico de recolección [F], se encarga de recoger parte de la radiación emitida por el plasma y enfocarla sobre una fibra óptica [G]. Durante la fase exploratoria se trabajó con el espectrómetro HR4000 de *Ocean Optics* y el espectrógrafo *DK480*⁴⁰ y en este caso se utilizó para la recolección una lente de cuarzo de 22cm de distancia focal. La fibra óptica se utiliza para transmitir la radiación recolectada hasta la hendidura del espectrógrafo [H].

En la etapa final, en lo referido a la adquisición de datos, se utilizó un espectrógrafo *Shamrock SR 500i* de *Andor Technology*, tipo *Czerny-Turner* de 0.5m de distancia focal, con hendidura de entrada variable. Este espectrógrafo está dotado con un sistema de recolección con especificaciones de fábrica y tres rejillas de difracción de 300, 1200 y 2400 líneas por milímetro, las dos primeras con *blaze* en 500nm y la tercera con *blaze* en 300nm como sistema dispersor; logrando una dispersión lineal recíproca de aproximadamente 1.7nm/mm. Aquí la radiación recogida es separada en sus diferentes componentes espectrales y es dirigida hacia el sistema de detención.

Como sistema de detección se utilizó una cámara ICCD [I] (*Intensified CCD*) *iSart 720 Gen II* de *Andor Technology*, de 1024x256 píxeles y con detectores de 26x26µm, previamente acoplada al espectrógrafo *Shamrock SR 500i*^{**}. En

* El sistema óptico de enfoque se puede apreciar en la fotografía presentada en la figura 3.

⁴⁰ LÓPEZ, Op. Cit. p. 19

^{**} Mayor información sobre el espectrógrafo y la cámara ICCD en la página web: www.andor.com

algunas pruebas preliminares se adquirieron espectros con la cámara CCD de *Princeton Instruments, Roper Scientific*, RTE/CCD 128-H de 1024x128 pixeles, con detectores de 25x25µm, acoplada al espectrógrafo DK 480 de *Spectral Products*. Un equipo de cómputo [J] con software apropiado es utilizado para controlar las cámaras y el espectrómetro HR400. Los espectros se guardaron para su posterior análisis.

2.1.1 Diseño de la Celda de Ablación. Para generar, controlar y monitorear el proceso de ablación se diseñó y construyó una celda que incorpora un sistema de traslación perpendicular al eje de irradiación y un sistema de rotación, logrando de esta forma irradiar diferentes puntos de la muestra. Esta celda es producto del acople de un dispositivo *single axes traslation* de *Edmund Optics* de 25mm de desplazamiento, con un motor paso a paso controlado por computador que gira un paso después de cada disparo, y un porta-muestras circular elaborado en aluminio. Opcionalmente puede ser introducida una corriente de argón que fluye paralelamente a una de las caras de la muestra, de esta forma es posible variar la atmósfera de trabajo, en la figura 3 se puede apreciar una fotografía de la celda de ablación.

Para situar la muestra en el lugar donde se genera el proceso de ablación, se fabricó un porta-muestras, ver figura 4, que se puede sujetar directamente al eje del motor. El diseño de este porta-muestras permite albergar muestras de diferentes materiales que posean dos de sus caras planas y bordes irregulares, un ejemplo de este tipo de muestras son los tejidos provenientes de biopsias⁴¹. Inicialmente se presenta una vista lateral del porta-muestras, con cuatro piezas principales para el ensamble. Una extensión al eje del motor (1) se conecta mediante un labrado de rosca fina a uno de los extremos de la pieza principal (2), esta pieza está perforada cilíndricamente en el otro de sus extremos y permite la introducción de algunas calzas de ajuste (3) y del anillo frontal (4).

⁴¹ ROSAI, J. and ACKERMAN'S. *Surgical pathology vol. 2. Ninth edition*. New York: Mosby, 2004. Appendix E.

Figura 3. Fotografía de la celda de ablación

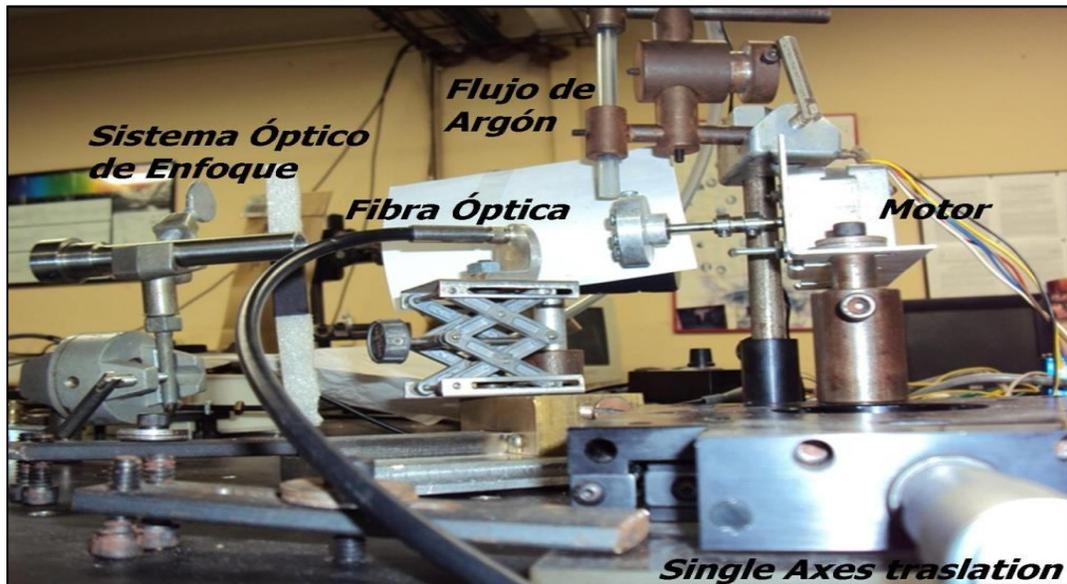
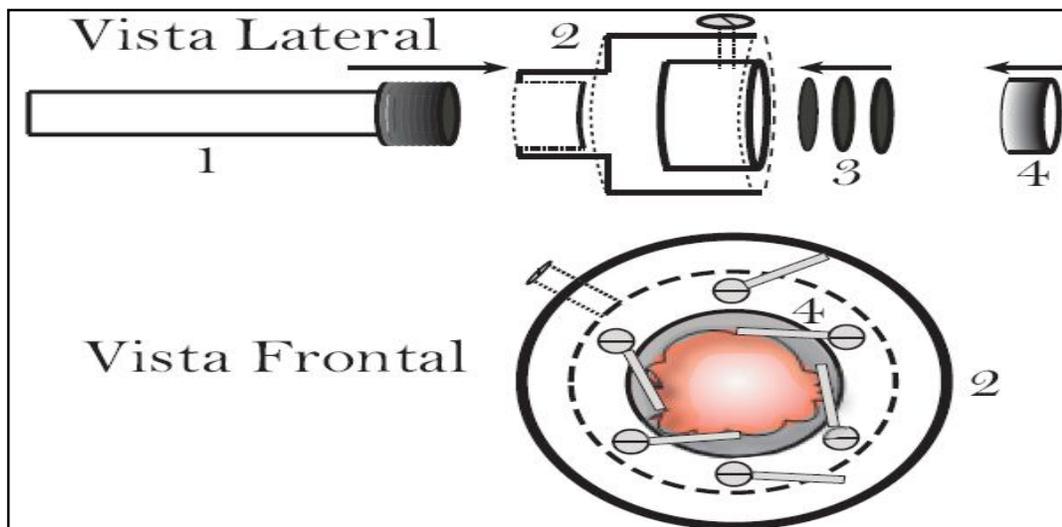


Figura 4. Diseño del porta-muestras



Un tornillo de rosca fina permite sujetar el anillo dentro de la pieza principal, el anillo tiene 6 tornillos externos que mantienen fijos unos alambres perfectamente rectos, de esta manera es posible mantener la muestra en el interior de ésta pieza. Las calzas fueron elaboradas con diferentes grosores,

así es posible garantizar que la cara expuesta de la muestra siempre se encuentre en la misma posición.

2.2 OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS EXPERIMENTALES

Terminado el acoplamiento de los equipos, se inició la fase exploratoria, buscando conocer el espectro LIBS de algunas muestras de tejido epitelial. En el proceso de optimización del montaje para la toma de espectros es posible variar algunos parámetros dentro del sistema, como son: Longitud de onda del láser, energía del pulso, distancia lente objeto, posición del sistema óptico de recolección, tipo de espectrómetro, parámetros del espectrómetro y número de disparos del láser entre otros. Algunas experiencias preliminares con piel y otros tejidos, demostraron que la longitud de onda más adecuada del láser Nd:YAG para trabajar con muestras biológicas es 1064nm, irradiando con una energía del láser de 110mJ.

Para hacer un barrido espectral desde 200nm a 900nm, que es el intervalo espectral de interés, es necesario fragmentar dicho intervalo en varias ventanas. Estas ventanas espectrales son las regiones de tamaño limitado que se pueden observar en una adquisición con el espectrómetro y son características del espectrógrafo y del detector. Se realizaron tomas con las tres rejillas del espectrógrafo *Shamrock SR 500i*, barriendo toda la región espectral de interés en diferentes ventanas. Esta experiencia demostró que trabajar con resolución media es lo más adecuado para la investigación, es decir, se puede trabajar con la rejilla de 1200 líneas por milímetro, pues la calibración de los espectros es más exacta y el espectrómetro permite hacer tomas desde 200nm hasta 900nm. Para alta resolución solo es posible trabajar en la región 200 a 700nm, dejando por fuera líneas características de elementos importantes para la investigación como N, O y K⁴². Trabajar con baja resolución resulta poco conveniente, pues la calibración no es muy precisa, hay solapamiento entre líneas y no es posible observar todas las líneas de interés.

⁴² KUMAR, Op. Cit. p.14

La literatura⁴³ reporta que una optimización del retardo y del *gate width* de la ICCD⁴⁴ y la variación de la atmósfera de aire por una de argón, ayudan a mejorar la sensibilidad y la intensidad de la señal. Se almacenaron espectros LIBS de tejido cervical sano en atmósferas de aire y argón, con diferentes tiempos de retardo y *gate widths*; un análisis posterior determinó que para un tiempo de retardo de 2 μ s y un *gate width* de 15 μ s se obtuvo la mejor señal en todas las ventanas analizadas, también se pudo determinar que la atmósfera de argón contribuye sustancialmente para mejorar la señal. Con los ajustes correspondientes descritos al inicio de este numeral, y encontrándose el sistema en un estado óptimo recomendable, se da inicio al proceso de adquisición de datos.

2.3 MUESTRAS BIOLÓGICAS

Se trabajó con muestras fijadas en formol de tejido cervical normal y tumoral maligno, extraído mediante un procedimiento quirúrgico conocido como histerectomía y fijado en formol durante varios años. Todas las muestras cancerígenas provienen de un mismo tumor, una de ellas se analizó en la sección de histopatología del Hospital Universitario de Santander, con ello se determinó que esta muestra corresponde a una lesión escamosa intraepitelial de cérvix de alto grado (NIC III). El tumor fue cortado en nueve secciones, cada sección posee dos de sus caras planas y bordes irregulares. De este mismo tejido fue posible diferenciar 3 muestras normales de cérvix, las cuales al igual que las cancerígenas fueron cortadas con dos de sus caras planas y bordes irregulares. La forma en la que fueron cortadas las secciones de tumor, se acopla sistemáticamente con el porta-muestras diseñado para albergar la muestra durante el experimento, esta tarea de corte y selección de la muestra fue llevada a cabo cautelosamente por personal especializado.

⁴³ MIZIOLEK, Op. Cit. p. 14

⁴⁴ KUMAR, Op. Cit. p. 14

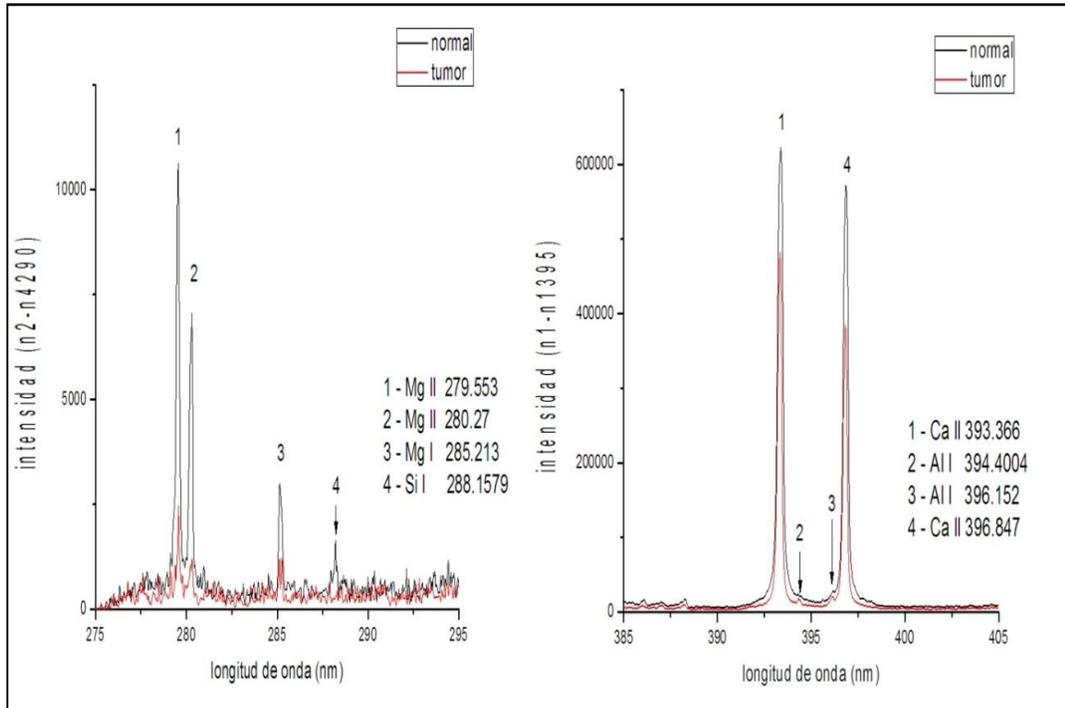
En total se pudo contar con doce muestras de tejido cervical de un mismo paciente, nueve de ellas se relacionan con tejido tumoral maligno y las tres restantes corresponden a muestras normales de cérvix. Las muestras se mantuvieron inmersas en formol hasta el momento de la adquisición de datos en el laboratorio.

3. RESULTADOS

3.1 ANÁLISIS CUALITATIVO

La señal obtenida para cada una de las ventanas es el resultado de la suma acumulativa de 10 espectros. Para cada ventana se realizaron cinco tomas y se almacenaron los espectros en un computador personal; en las figura 5 y 6 se presentan espectros LIBS de muestras normales y de tumor en algunas de las ventanas analizadas.

Figura 5. Espectros de tejido cervical (C280, C390)



Se hizo una exploración exhaustiva en cada una de las ventanas de los diferentes espectros, y se logró identificar líneas analíticas de elementos como C, Mg, Ca, Al, Fe, Na, H, Si, N, O y K. En la tabla 1 se muestra la ventana y la longitud de onda en la que fueron identificados.

Figura 6. Espectros de tejido cervical (C740, C770)

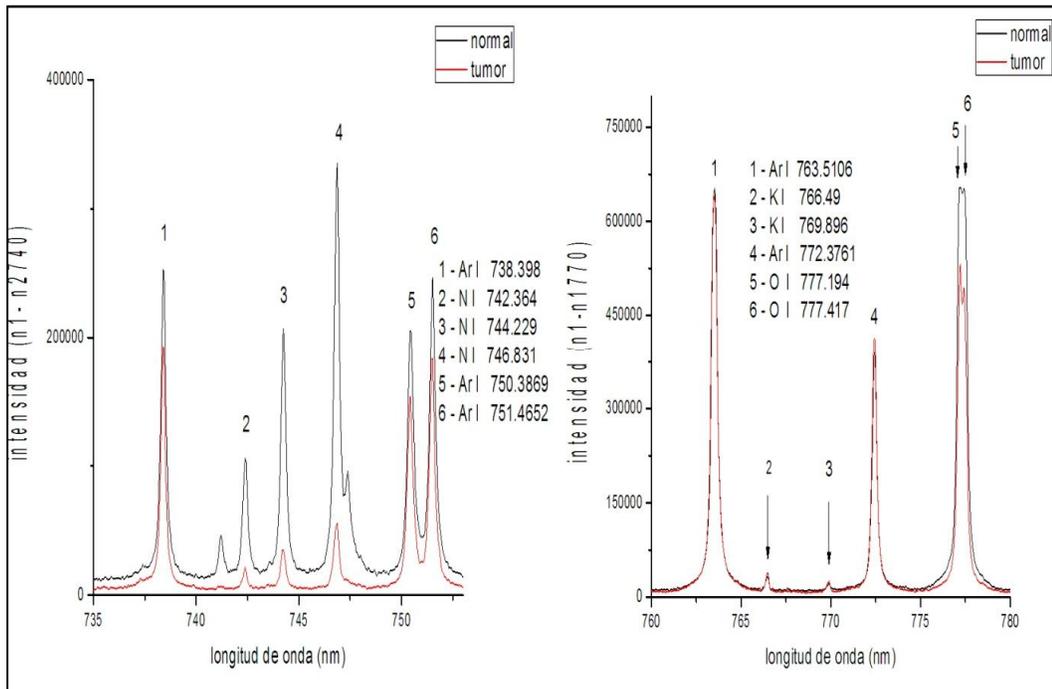


Tabla 1. Líneas analíticas de los elementos y ventanas espectrales

Elemento	Longitud de onda (nm)	Ventana espectral
C I	247.856	C 255
Mg II	279.553; 280.27	C 290
Mg I	285.213	C 290
Si	288.1579	C 290
Ca II	315.887; 317.933; 318.128	C 320
Ca II	370.603; 373.69	C 370
Ca II	393.366; 396.847	C 390
Ca I	422.673	C 425
Al I	308.2153; 309.271	C 320
Al I	394.006; 396.156	C395
Fe I	373.7131; 374.5571; 248.3271	C 370
Fe II	259.94; 259.837	C 255
Na I	588.995; 589.924	C 580
H I	656.28	C 660
O	777.194; 777.417; 777.539	C 770
K I	766.49; 769.896	C 770
NI	742.364; 744.229; 746.831	C740

Es necesario tener en cuenta que las muestras analizadas estuvieron inmersas (o fijadas) en formol durante mucho tiempo, aunque la fijación se hizo de forma correcta pues las muestras se encontraban en perfecto estado, esto fue lo que reveló el estudio histopatológico inicial. Lo que se pudo observar en la fase exploratoria cuando se trabajó con tejidos fijados en formol, es una notable variación en la intensidad de las líneas de los elementos C, H y O, respecto de las muestras que no tenían formol. Entonces, para estos elementos envueltos en la fórmula química del formol HCHO, no es posible establecer en forma precisa la variación de concentración dentro del tejido y por este motivo no se tuvieron en cuenta para el análisis, en el anexo se agrega el soporte correspondiente.

Para este análisis se tienen en cuenta las líneas de mayor intensidad observadas con regularidad en todos los espectros⁴⁵, es necesario seleccionar aquellas líneas que en lo posible, no sean resonantes. Este fenómeno de resonancia se presenta cuando la concentración de un elemento de la muestra es muy alta y la radiación emitida por un átomo excitado es absorbida por uno de sus átomos vecinos, de esta forma, no se puede asegurar linealidad entre la intensidad de una línea de emisión y la concentración del analito. Según la exploración realizada en los espectros normales y de tumor, las líneas a tener en cuenta para el análisis son Ca 315.837, 317.933, 373.69, 422.673; Mg 280.27, 285.213; N 742.464, 744.229; K 766.49, 769.896; Na 588.995, 589.92(nm).

El tejido es un sistema muy complejo y no es posible construir curvas de calibración de la técnica LIBS para cada uno de los elementos dentro del mismo (no existen patrones cuantificados)⁴⁶. La Intensidad de las líneas espectrales es directamente proporcional a la concentración de la especie

⁴⁵ KUMAR, Op. Cit. p. 14

⁴⁶ *Ibíd.*, p. 5402

emisora. Dicha intensidad se puede definir como el área bajo la curva que forma cada pico.

Inicialmente las muestras se han clasificado histológicamente, pues es de aclarar que todas las muestras provienen de un único útero. Las muestras identificadas como n_1, n_2, n_3 corresponden a tejido normal y las muestras de tejido tumoral se identifican como t_1, t_2, \dots, t_9 . Como se adquirieron cinco espectros por ventana, para cada línea se hizo un promedio del área computada por muestra* y se calculó la desviación estándar (SD) y el error estándar del promedio (SE of mean) de los cinco registros.

Se cuenta con varias líneas de emisión por elemento, por ende, es necesario escoger una de ellas para el análisis final. Para esto, se calcula el coeficiente de variación de la desviación estándar, computada en el paso inmediatamente anterior**. Las líneas seleccionadas son aquellas que presentan los coeficientes de variación más pequeños. Para el Calcio se encuentra que las líneas de emisión 422.673 y 373.69nm tienen coeficientes parecidos, por lo que se puede trabajar con cualquiera de ellas; en la tabla 2 se presenta el cálculo de dichos coeficientes, en color rojo se aprecia el coeficiente de variación de la desviación estándar, de las líneas que finalmente fueron seleccionadas.

Es de esperar, por muchas razones, que la concentración de los elementos en tejido normal y cancerígeno sea diferente, aunque no exista tendencia definida⁴⁷. Físicamente los dos tipos de tejido poseen características muy diferentes y pueden ser distinguidos por un observador a través de un

* Cada línea de emisión fue identificada en una sola ventana espectral, entonces, para cada muestra se tienen cinco registros del área bajo la curva de cada pico.

** Existe un valor de SD para cada muestra, por línea seleccionada. El coeficiente de variación se calcula con el valor de SD de todas las doce muestras.

⁴⁷ KUBALA-KUKUŚ, A. et al. *Trace element load in cancer and normal lung tissue*. En: Phys. Res. Vol. 150, 1999. p. 193-199

microscopio; aspectos como la resistividad a altas frecuencias⁴⁸, debido a las alteraciones en la membrana celular de las células cancerígenas, que no permite el bombeo efectivo de algunos electrolitos al interior de las células, también hace suponer este tipo de ideas.

Tabla 2. Coeficiente de variación de la desviación estándar

Línea [nm]	Coeficiente de variación de la desviación estándar	Línea seleccionada [nm]
Ca 315.887	1,16279	
Ca 317.933	1,13511	
Ca 422.673	0,98612	Ca 422.673
Ca 373.69	1,0014	Ca 373.69
K766.49	1,7765	--
K769.896	1,6388	K769.896
Mg 280.27	1,45548	--
Mg 285.213	1,36201	Mg 285.213
N 742.364	0,66554	--
N 744.229	0,64861	N 744.229
Na 588.995	0,44743	--
Na 589.5924	0,4474	Na 589.5924

La hipótesis generada al inicio de la investigación plantea la posibilidad de encontrar alguna diferencia en la distribución de concentración para algunos elementos en los dos tipos de tejido. Para observar este comportamiento, se hace necesario graficar el área promedio de cada línea, que se tiene por muestra, como función de la misma. Se realizaron gráficas del área promedio bajo la curva para las líneas que presentaron coeficientes de variación más pequeños, colocando el tipo de muestra en el eje X, y añadiendo como barra de error el correspondiente error estándar del promedio (SE of mean), las figuras 7, 8 y 9 muestran algunas de las gráficas obtenidas.

⁴⁸ MIRANDA, Op. Cit. p. 15

Figura 7. Área promedio para Ca 373.69nm

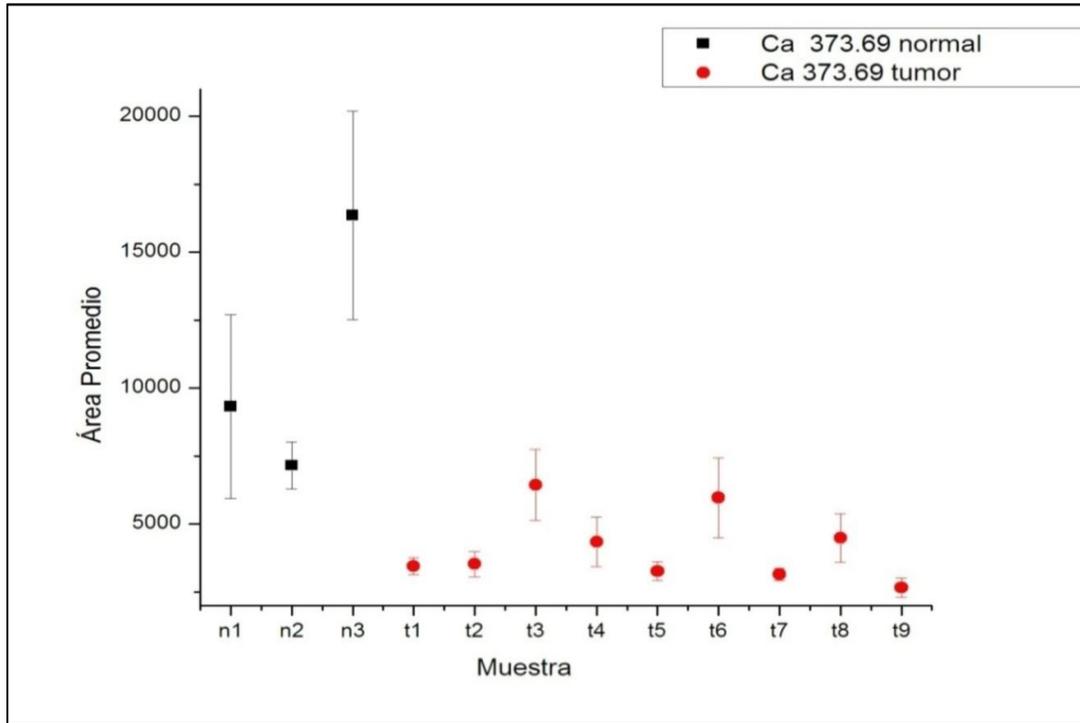


Figura 8. Área promedio para Mg 285.213nm

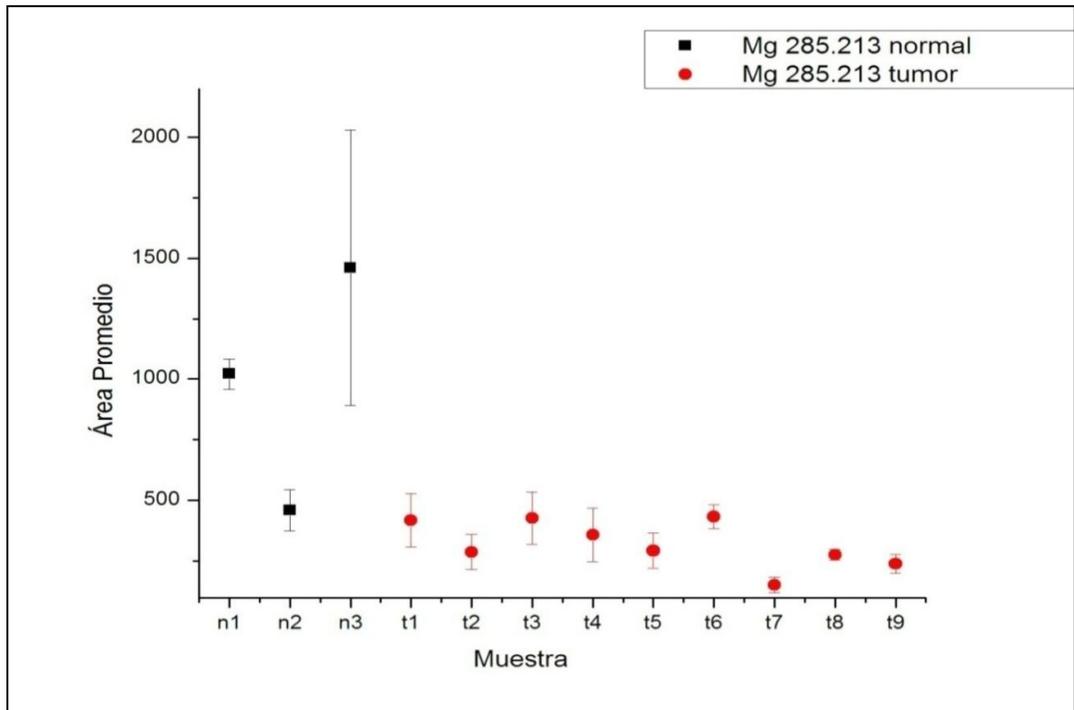
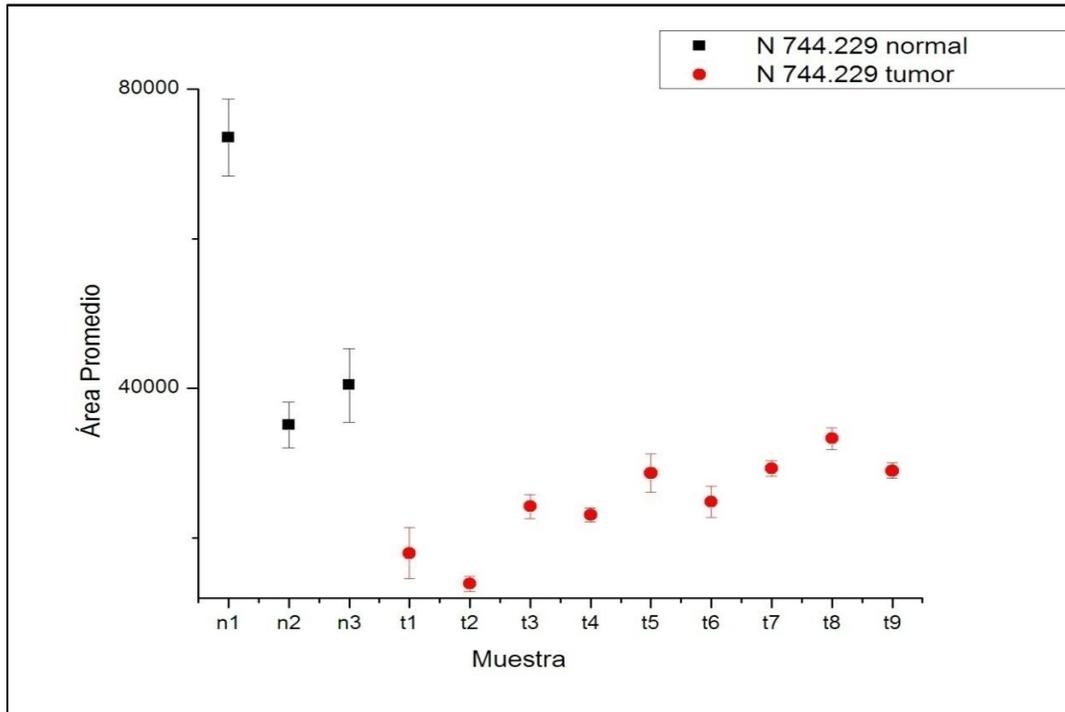


Figura 9. Área promedio para N 744.229nm



Es posible observar una notable diferencia para los espectros de tejido normal y cancerígeno. El promedio del área bajo la curva (intensidad) de la línea Ca 373.49nm para tejido normal, en todos los casos es mucho mayor que el promedio del área para las muestras de tumor, esto mismo sucede con las líneas N 744.229 y Mg 285.213 (nm). Para las líneas K 769.896 y Na 589.5924 (nm), se observa una fluctuación en los valores del área bajo la curva para las diferentes muestras. Se puede concluir que para estas líneas, no es posible determinar con certeza una tendencia entre las áreas computadas para tejido normal y cancerígeno*.

Es evidente que en los espectros de muestras normales y tumor, la distribución de intensidad para algunas líneas de emisión es diferente. Para las líneas de Ca, Mg y N existe una tendencia definida entre los valores de intensidad, que

* Estas gráficas se presentan como un anexo al final del trabajo

arroja una banda de diferencia entre la intensidad que presenta cada tipo de muestra.

Este análisis demuestra la veracidad de la hipótesis planteada inicialmente en la que se estima que existe una diferencia significativa en la concentración de algunos elementos dentro del tejido, en este caso, se puede estimar que la concentración de elementos como Ca, Mg y N en tejido cancerígeno es mucho más baja que en tejido normal. Del mismo modo, es posible afirmar que en las diferentes regiones estudiadas no hay una homogeneidad en la concentración de algunos de los elementos analizados, con lo que se puede demostrar la complejidad del tejido analizado.

3.2 ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO

Inicialmente se hizo un análisis que involucraba por separado a cada una de las muestras, pero si se tiene en cuenta que cada muestra proviene de un mismo tumor, lo que se tiene es un muestreo aleatorio de un tumor en diferentes regiones. Ahora se realizará una nueva clasificación con solo dos tipos de muestra, normal y cancerígena; finalmente se cuenta con quince valores del área bajo la curva de cada línea para tejido normal, y cuarenta y cinco valores del área bajo la curva de cada línea para tejido cancerígeno, dichos valores corresponden a las tres secciones de tejido normal y a las nueve secciones de tumor analizadas en el numeral anterior. Nuevamente se calcula el promedio total del área bajo la curva de las líneas seleccionadas por tener un coeficiente de variación de la desviación estándar mucho más bajo que las demás.

La línea más intensa observada es Na 589.5924nm para los dos tipos de muestra, pues el área promedio total es mayor en todos los casos*. Cuando se descartan fenómenos de autoabsorción, la intensidad de una línea es

* Ver tabla 3

directamente proporcional a la concentración, entonces, si se calculan relaciones de intensidad, estas relaciones son comparables con las relaciones de concentración para algunos elementos en el tejido estudiado⁴⁹.

La relación de intensidad se calcula dividiendo el área de las líneas seleccionadas por el valor del área de la línea más intensa, que en este caso corresponde al Sodio. Los valores calculados se presentan en la tabla 3 y están graficados en un diagrama de barras en la figura 10, donde es posible estimar la variación en la concentración para los tejidos normal y cancerígeno.

Tabla 3. Promedio total del área bajo la curva y relación de intensidad para cada línea

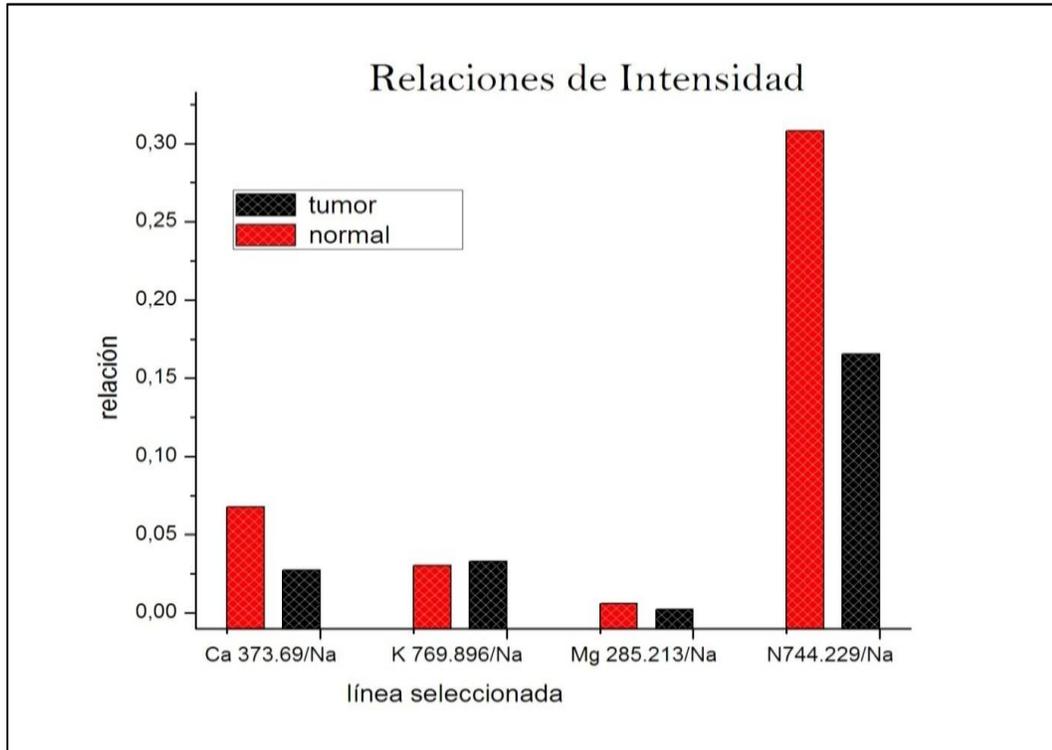
Línea seleccionada [nm]	Área promedio		Relación	Relaciones de intensidad	
	Tumor	Normal		tumor	Normal
Ca 373.69	4139,43107	10941,47245	Ca 373.69/Na	0,02753	0,06785
K 769.896	4971,29291	4868,83303	K 769.896/Na	0,03306	0,03019
Mg 285.213	320,53812	980,54984	Mg 285.213/Na	0,00213	0,00608
N 744.229	24906,6317	49675,60536	N744.229/Na	0,16564	0,30804
Na 589.5924	150364,8701	161263,6987			

Está claro que las relaciones Ca/Na, N/Na y Mg/Na son mucho mayores en tejido normal. Si se observa el promedio de intensidad para estas líneas en los dos tipos de tejido, se podría afirmar, que en tejido cancerígeno la concentración de los mismos es aproximadamente la mitad del valor registrado para tejido normal. La relación K/Na es comparable para tejido normal y tumor.

⁴⁹ KUMAR, Op. Cit. p. 14

Nuevamente es posible establecer una clara diferencia entre los espectros de tejido normal y cancerígeno. La relación de intensidad entre las líneas analizadas puede convertirse en un parámetro que permita distinguir tejido cervical normal de tejido tumoral maligno, si se cuenta con un número considerable de espectros.

Figura 10. Relación de intensidad para cada línea



Por otro lado, si se realiza un análisis local, en el que se distingue cada una de las secciones de tejido estudiadas en el numeral anterior, se tienen sólo cinco valores de intensidad por línea para cada sección de tumor. Se hizo el cálculo del área promedio por muestra para las líneas N 744.229 y Na 589.5924nm, y se calcularon las respectivas relaciones de intensidad; en la tabla 4 se presentan los valores calculados.

Éste estudio en el que se considera cada una de las muestras de tumor por separado, arroja un comportamiento similar, en el que mantiene una diferencia para la relación de intensidad de los espectros normales y de tumor; en la figura 11 es posible observar esta discrepancia para la relación entre las líneas N 744.229nm/Na 589.5924nm.

Tabla 4. Relación de intensidad N 744.229nm/Na 589.5924nm para cada muestra

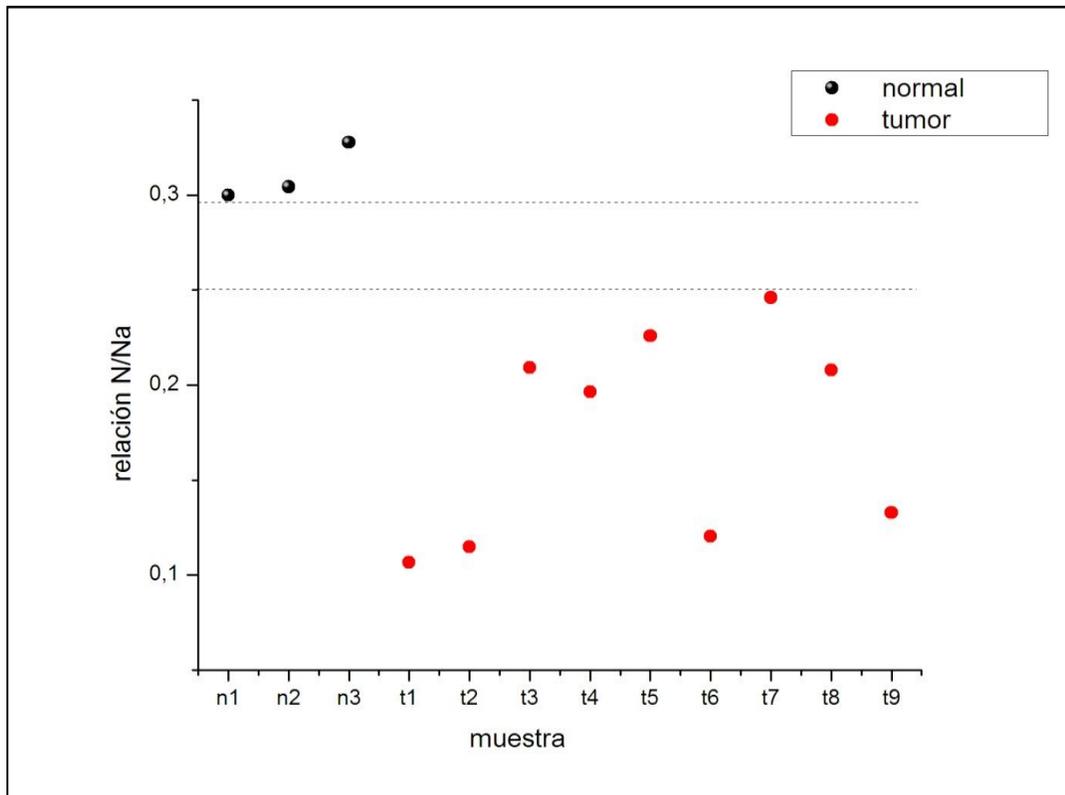
Muestra	Área promedio		Relación N/Na	
	N 744.229nm	Na 589.5924nm	Normal	Tumor
n1	73535,99728	245237,3445	0,29986	
n2	35060,12476	115185,80562	0,30438	
n3	40430,69404	123367,94598	0,32772	
t1	17962,0074	168470,83832		0,10662
t2	13906,25252	121268,5838		0,11467
t3	24211,28596	115719,93132		0,20922
t4	23077,56464	117477,51786		0,19644
t5	28657,4594	126929,48832		0,22577
t6	24835,65132	206265,0415		0,12041
t7	29290,0618	119056,51762		0,24602
t8	33267,00028	159995,73122		0,20792
t9	28952,40195	218100,1815		0,13275

Reiteradamente aparece una banda de diferencia entre las relaciones de intensidad para las muestras de tejido normal y cancerígeno, pero esta banda posee un rango mucho más estrecho que aquel obtenido con un mayor número de espectros por muestra*. Las relaciones de intensidad para las muestras de tumor oscilan entre diferentes valores, los cuales se ubican por debajo de un valor umbral computado para la muestra n₇.

* Ver en las figuras 10 y 11 la relación de intensidad entre las líneas de N y Na, y comparar las relaciones obtenidas para tejido normal y tumor.

El resultado final sigue siendo bastante bueno, pues nuevamente es posible distinguir satisfactoriamente en el total de muestras, aquellas que corresponden a tejido normal y tumor, mediante la respectiva relación de intensidad analizada.

Figura 11. Relación N/Na para cada una de las secciones analizadas



4. CONCLUSIONES

- Fue posible ensamblar y mejorar considerablemente un sistema experimental basado en la técnica LIBS (Laser Induced Breakdown Spectroscopy), para la obtención de espectros de tejido epitelial de cuello uterino normal y tumoral maligno. Se logró identificar líneas analíticas de elementos como C, Mg, Ca, Al, Fe, Na, H, Si, N, O y K.
- Este estudio reveló una diferencia significativa en la distribución de la intensidad para algunos elementos dentro del espectro LIBS de tejido normal y cancerígeno de cérvix. Se puede afirmar que la concentración de algunos elementos como N, Ca y Mg dentro de un tejido de cérvix normal es mucho mayor que para un tejido cancerígeno (NIC III).
- Se puede señalar la complejidad del tejido estudiado, pues se ha demostrado la no homogeneidad a nivel local en la concentración de algunos elementos dentro de los dos tipos de tejido estudiados.
- Es posible diferenciar claramente un tejido normal de cérvix de un tejido cancerígeno (NIC III), mediante la implementación de un montaje experimental basado en la técnica LIBS. Se encontró una marcada diferencia para las relaciones de intensidad entre algunas líneas de emisión, en los espectros de tejido normal y tumor. Con estos resultados, se evidencia la posibilidad de continuar hacia el desarrollo de la técnica en diferentes aplicaciones de tipo diagnóstico, con muestras provenientes de biopsias (material ex-vivo), o por qué no, realizar algún análisis *in-situ*, referente a algún tipo de lesión como cáncer de piel o de cérvix.
- El uso de formol en la conservación de los tejidos biológicos analizados, no altera significativamente los resultados del estudio.

5. RECOMENDACIONES

- Trabajar con un número mayor de muestras normales y cancerígenas, además, analizar muestras de diferentes tipos de tumor y estadios de desarrollo que ostenten estudios histopatológicos previos, y que tengan superficies totalmente planas para mejorar la reproducibilidad del experimento.
- Trabajar con muestras que no hayan sido conservadas en formol, de esta forma sería posible analizar la variación en la concentración de carbono de las muestras, la concentración de hidrógeno y oxígeno no es muy relevante por el alto contenido de agua de la muestra. Si la muestra ha sido fijada en formol, estimar que el tiempo de fijación sea prudente.
- Mejorar la resolución espectral del sistema, de esta forma es posible evitar el solapamiento de algunas líneas y la observación de otras que no se pueden resolver con la rejilla de 1200 líneas por milímetro.
- Establecer una amplia base de datos que contenga los promedios estimados de la intensidad de algunas líneas dentro del tejido o neoplasia estudiada. Ahora bien, sería necesario entrenar una red neuronal o utilizar cualquier otro tipo de método, para que mediante el cálculo de relaciones de intensidad pueda compararse con la base de datos y logre establecer un diagnóstico sin intervención de personal calificado.

BIBLIOGRAFÍA

AMAYA, Jairo y RESTREPO, Sonia. Tamizaje para cáncer de cuello uterino: cómo, desde y hasta cuándo. En: Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología. Vol. 56, 2005. p.59-67

ARROSSI, S.; SANKARANARAYANAN, R. and MAXWELL, D. Incidence and mortality of cervical cancer in Latin America. En: Salud Pública de México. Vol. 45, 2003, suplemento 3.

BRECH, F. and CROSS, L. *Optical microemission stimulated by a ruby laser.* En: Appl. Spectrosc. Vol.16, 1962, 59p.

CASTEL, Ricardo. *Ablación láser. Estudio fundamental y aplicaciones de los plasmas generados.* En: Rev. Col. Fis. Vol. 33, 2001. p. 451-455

COLOMBIA. MINISTERIO DE SALUD. Dirección general de promoción y prevención. Norma técnica para la detección temprana de cáncer de cuello uterino y guía de atención de lesiones preneoplásicas de cuello uterino.

KIM, B. et al. *Optical feedback signal for ultrashort laser pulse ablation on tissue.* En: Applied Surface Science. Vol. 127, 1998. p. 857-862

KUBALA-KUKUŚ, A. et al. *Trace element load in cancer and normal lung tissue.* En: Phys. Res. Vol. 150, 1999. p. 193-199

----- . *Log-stable concentration distributions of trace elements in biomedical samples.* En: Espectrochimica Acta Parte B. Vol. 59, 2004. p.1711-1716

KUMAR, A. et al. *Characterization of malignant tissue cells by laser-induced breakdown spectroscopy.* En: Appl. Opt. Vol. 43, 2004. p. 5399-5404

LÓPEZ, E. K.; MEJÍA, E. y CABANZO, R. *Implementación de un montaje experimental para la técnica LIBS (Laser Induced breakdown spectroscopy) basado en el espectrómetro HR4000 de Ocean Optics*. En: Rev. Col. Fis. Vol. 39, 2007. p. 240-243

LÓPEZ, José A. *Cérvix normal: Colposcopia, citología, histología*. XVIII Congreso de la AEPCC–Granada. 22-24 de noviembre de 2006. Curso de colposcopia- Resúmenes.

MANTILLA, R.; VEGA, A. y INSUASTY, E. Registro de cáncer, unidad oncológica, Hospital Universitario de Santander Ramón Gonzales Valencia, Bucaramanga, Colombia (1966-1999)". En: *Med. UNAB*. p. 14-19

MIRANDA, D. A.; BARRERO, J. G. y, ECHEVERRI, J. H. Estudio piloto de detección temprana de cáncer de cuello uterino basado en espectroscopía de impedancia eléctrica. En: *SaludUIS* . 2006.

MIZIOLEK, A. W.; Palleschi, V. and Schechter, I. *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Cambridge: University Press, 2006.

MORADEL, M. A.; CRESPIAN, M. and AGUILAR, O. *Conización del cuello uterino en patología cervical*. En: *Rev. Med. Hondureña*. Vol. 60, 1992. p.163-166

MORCILLO, J. y ORZA, J. M. *Espectroscopia: estructura y espectros atómicos*. Madrid: Editorial Alhambra, 1972.

MOREL, S. et al. *Detection of bacteria by time-resolved laser-induced breakdown spectroscopy*. En: *Appl. Opt.* Vol. 42, 2003. p. 6184–6191

NATIONAL CANCER INSTITUTE of EE. UU. Lo Que Usted Necesita Saber Sobre: El Cáncer de Cérvix. <http://www.cancer.gov/publications>.

ORTIZ, Harry y BLANCO, Freddy. Análisis de elementos en carbones colombianos por LIBS y LA-ICP-AES. Bucaramanga, 2005. Trabajo de grado (Físico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Física.

PALLESCHI, V. et al. *Application of laser-induced breakdown spectroscopy technique to hair tissue mineral analysis*. En: Appl. Opt. Vol. 42, 2003. p. 6133–6137

ROSAI, J. and ACKERMAN S. *Surgical pathology vol. 2. Ninth edition*. New York: Mosby, 2004.

RUSSO, R. E. *Laser ablation*. En: Appl. Spectrosc. Vol. 49, 1995. p.14A – 28A

SAMEK, O. et al. *Clinical application of laser-induced breakdown spectroscopy to the analysis of teeth and dental materials*. En: Laser Med. Surg. Vol. 18, 2000. p. 281–289

SONG, K.; Lee, Y. I. and Sneddon, J. *Applications of laser induced breakdown spectrometry*. En: Appl. Spectrosc. Vol. 23, 1997. p. 183–235

THOMPSON, J. et al. *The suitability of Laser Induced Breakdown Spectroscopy for determining the compositions of extraterrestrial material*. En: Lunar and Planetary Science XXXV (2004). 1912. Pdf.

WILLIAM, H. et al. *Surgical pathology dissection*. New York: Springer-Verlag, 2003. p. 124 -129

YAMAMOTO, K. Y. et al. *Detection of metals in the environment using a portable Laser- Induced Breakdown Spectroscopy Istrument*. En: Appl. Spectrosc. Vol. 50,1996. p. 222-233.

YUEH, F. Y.; Singh, J. P. and Zhang, H. *Elemental analysis with laser-induced breakdown spectroscopy*. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. UK: Wiley, 2000.

ZAIDEL. *Table of spectral lines*. Moscú:Editorial Mir, 1976. 752p.

ANEXO A. Experiencia de trabajo con muestras en formol

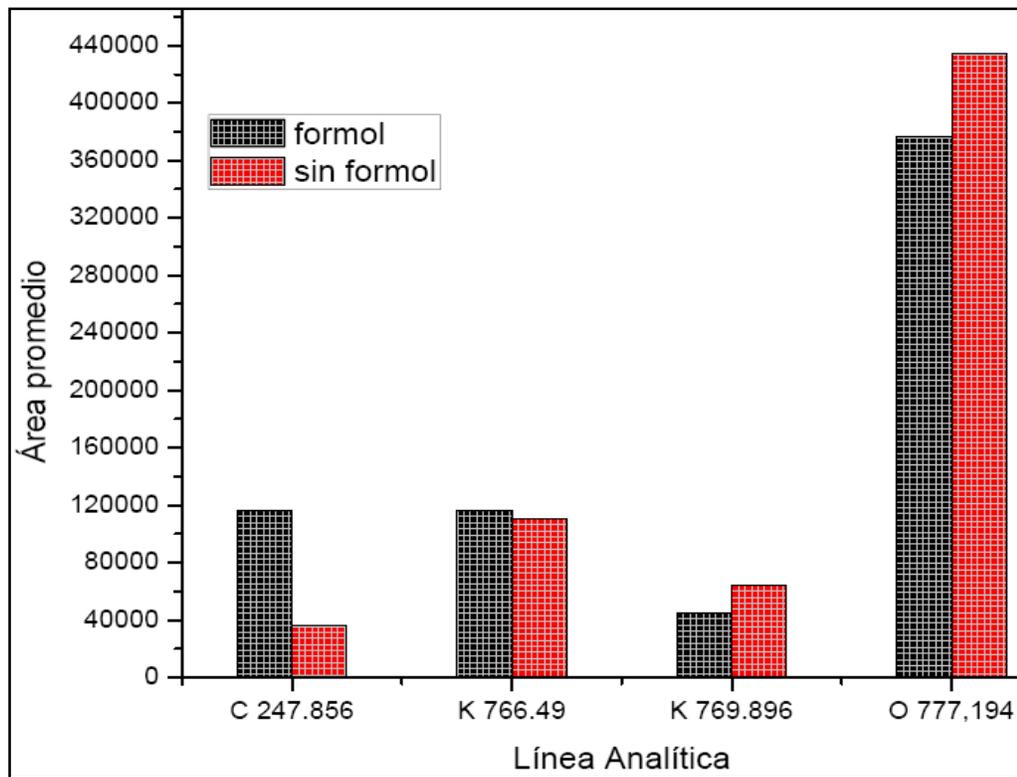
Ante la dificultad para obtener muestras sin formol por la baja periodicidad de pacientes con patologías asociadas al tipo de muestra requerida, fue necesario plantear una exploración para trabajar con muestras de tejido epitelial fijadas en formol. Se tomaron dos muestras de tejido epitelial de piel del mismo paciente, una de ellas fue dejada durante aproximadamente treinta y seis horas en formol y la otra se mantuvo refrigerada en un recipiente cerrado.

Esta prueba se llevó a cabo con el mismo montaje presentado en la figura 2, como sistema óptico de recolección se utilizó una lente de cuarzo de 20cm de distancia focal. Se utilizó un espectrógrafo *CVI Digikröm DK 480 de Spectral Producs*, tipo *Czerny-Turner* de 0.5m de distancia focal, con hendidura de entrada de 50 μ m. Este espectrógrafo está dotado con dos rejillas de difracción de 1200 planos/mm con blaze en 300nm y 500nm, respectivamente, las tomas se hicieron con la rejilla número 2. Como sistema de detección se utilizó una cámara CCD (arreglo matricial de fotodiodos) de *Princeton Instruments, Roper Scientific*, RTE/CCD 128-H de 1024x128 pixeles, con detectores de 25x25 μ m. Para controlar la CCD y analizar los espectros mediante un computador (PC) se utilizó el software *WinSpec*. El láser fue operado a una longitud de onda de 1064 nm y energía por pulso de 110mJ.

Se observaron las ventanas C240 y C770, pues allí se observan las líneas más intensas de dos elementos envueltos en la fórmula química del formol HCHO. En total se trabajó con cuatro muestras de tejido epitelial en formol y dos muestras del mismo tejido sin formol. Para cada muestra se almacenaron cinco señales por ventana, estas señales son el resultado de la suma acumulada de cinco disparos. Finalmente se identificaron las líneas C 247.856, K 766.49, K769.896 y O 777.194, luego se hizo el cálculo de la intensidad a través del cómputo del área bajo la curva de cada pico y se realizó un promedio del área registrada, tal como se observa en el siguiente cuadro:

Línea analítica	Área promedio	
	Formol	Sin formol
C 247.856	116535,4956	35951,25126
K 766.49	116535,4956	110821,26917
K 769.896	45347,66018	64674,68552
O 777,194	376217,45603	434317,63624

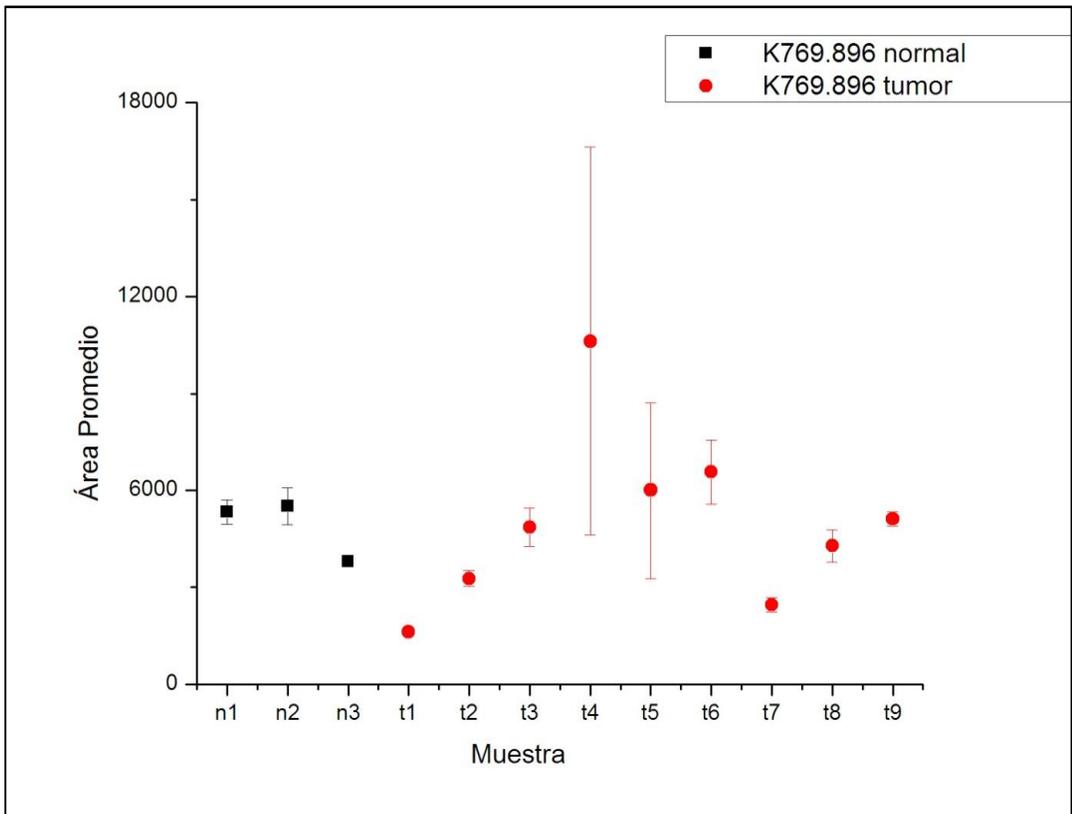
Cuando se grafican los valores obtenidos en un diagrama de barras se obtiene la siguiente gráfica:



Es posible observar variaciones significativas en la intensidad de las líneas de Carbono y Oxígeno con, y sin formol; para las líneas de Potasio no se observa una mayor variación. Ahora bien, si se tiene en cuenta que la concentración de un elemento es linealmente proporcional a la intensidad de sus líneas de emisión, se podría concluir, que para las líneas analíticas de los elementos envueltos en la fórmula química del formol, no se cumple esta relación, porque existe una variación irregular en la concentración de los mismos, inducida por el efecto del formol. También se puede afirmar que el efecto del formol en la intensidad de las demás líneas no parece significativo, si se tiene en cuenta que el tejido es un sistema no homogéneo.

ANEXO B. Gráficas del área promedio para algunas líneas

Área promedio para K769.896nm



Área promedio para Na 589.5924nm

