Aplicación de la técnica LIBS en estudio de la composición de la córnea de un ojo de bovino

Application of the LIBS technique to study the corneal composition of the bovine eye

L. M. Sierra, L. Rosellón, P. Pacheco, J. Álvarez, R. Sarmiento(*)

Grupo de Espectroscopia Óptica de Emisión y Laser, GEOEL, Universidad del Atlántico, A.A 1890, Colombia.

(*) Email: rafaelsarmiento@mail.uniatlantico.edu.co

Recibido / Received: 15/05/2012. Revisado / Revised: 18/07/2012. Aceptado / Accepted: 19/07/2012.

DOI: <http://dx.doi.org/10.7149/OPA.45.3.263>

RESUMEN:

En este trabajo se aplicó la técnica de Espectroscopia de Plasma Inducido por Láser (LIBS) para estudiar y caracterizar el plasma producido por un pulso láser de Nd:YAG cuando es enfocado sobre la córnea de una especie bovina. Previo a la toma de los datos se realizó una caracterización de la energía del haz láser variando diferentes parámetros: la distancia respecto a la cabeza del láser, la frecuencia de pulsos, y el ángulo de incidencia. Para enfocar la radiación del láser sobre la superficie de la muestra se utilizó una lente de vidrio de 12 cm de distancia focal, la energía por pulso fue de 85 mJ, humedad relativa del ambiente fue de 55% y una temperatura de 24°C. Los espectros del plasma laser sobre la muestra fueron registrados en la región espectral de 300-850 nm. Se realizó una asignación espectral con el fin de identificar los elementos presentes en la muestra y se compararon con los espectros tomados de fuentes conocidas como: Lámpara de sodio de baja presión, plasma-laser en aire, plasma de carbón mineral y una fuente de calibración espectral de Hg/Ar.

Palabras clave: LIBS, Córnea de Bovino.

ABSTRACT:

In this paper we applied Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) to study and characterize the plasma produced by a Nd: YAG laser beam when it is focused on corneal tissue from a bovine specie. Before taking the data, a characterization of the laser beam energy was performed by varying different parameters: the distance from the laser head, frequency pulses, and incidence angle. To focus the laser radiation we use a focal length lens of 12 cm, the energy per pulse was 85 mJ, the relative humidity was 55% and the environment temperature was 24°C. The plasmas spectra on the sample was registered at the spectral region of 300-850 nm; spectral assignment was performed to identify the elements present in the sample and compared with spectra taken from known sources such as low pressure sodium, plasma-laser in air, coal and spectral calibration source Hg /Ar.

Key words: LIBS, Bovine Cornea.

REFERENCIAS Y ENLACES / REFERENCES AND LINKS

- [1]. A. Miziolek, V. Palleschi, V. Schechter, *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS). Fundamentals and Applications*, Cambridge University Press, New York (2006).
- [2]. A. Kumar, F. Yueh, J. Singh, S. Burguess, "Characterization of malignant tissue cells by laser-induced breakdown spectroscopy", *Appl. Opt.* **43**, 5399-5403 (2004).
- [3]. Q. Sun, M. Tran, B. Smith, W. Winefordner, D. James, "Zinc analysis in human skin by laser induced-breakdown spectroscopy", *Talanta* **52**, 293-300 (2000).
- [4]. X. Liu, W. Zhang, "Recent developments in biomedicine fields for laser induced breakdown spectroscopy", *J. Biomed. Sci. Eng.* **1**, 147-15 (2008).

- [5]. B. Fisher, *Investigation of Interactions between the 193-nm Argon-Fluoride Excimer Laser and Corneal Tissue*, PhD Thesis, University of Florida (2004).
- [6]. Y. Shen, *The Principles of Nonlinear Optics*, Wiley, New York (1984).
- [7]. P. K. Kennedy, "A first-order model for computation of laser-induced breakdown thresholds in ocular and aqueous media: Part I - Theory", *IEEE J. Quant. Electron.* **31**, 2241-2249 (1995).
- [8]. A. Vogel, K. Nahen, D. Theisen, J. Noack, "Plasma formation in water by picosecond and nanosecond Nd:YAG laser pulses - Part I: Optical breakdown at threshold and superthreshold irradiance", *IEEE J. Sel. Top. Quant. Electron.* **2**, 847-860 (1996).
- [9]. <http://physics.nist.gov/asd3>

1. Introducción

El láser es un generador de radiación electromagnética de alta intensidad, gran monocromaticidad, coherencia y poca divergencia del haz. La radiación de un laser pulsado puede ser enfocada en una pequeña región en el que se acumula una alta densidad de energía. Su aplicación en aire, gases y vapores, sólidos y medios acuosos genera los plasmas inducidos por laser, cuyo análisis apropiado de la luz emitida constituye el métodos de caracterización espectroscópica conocido como LIBS (*Laser Induced Breakdown Spectroscopy*) [1]. Esta técnica laser de gran potencial práctico, ha sido aplicada exitosamente en biociencia, en donde en los últimos años se ha incrementado el interés en su aplicación en materiales biológicos. Diferentes autores han utilizado esta técnica para el diagnóstico y clasificación de canceres en tejidos in vivo determinando las intensidades relativas de líneas espectrales y la cantidad de elementos presentes en las muestras [2]. Otras investigaciones han llegado a la conclusión que la técnica LIBS es una herramienta muy útil para el análisis de la traza de elementos y minerales presentes en la piel humana [3], la detección e identificación de bio-aerosoles y análisis de tejidos [4].

En este trabajo se implementó la técnica LIBS como método de caracterización de tejido ocular, utilizando como material la córnea de un ojo de bovino. Se asignaron e identificaron las líneas espectrales correspondientes a elementos típicos de mayor concentración en los tejidos, basados en los reportados por la literatura y otras investigaciones [2-5].

2. Consideración teórica del *breakdown* por inducción laser en un medio acuoso

El material de un tejido corneal se puede asimilar a un medio acuoso. En este trabajo se tomaron como modelos para interpretar el *breakdown* en medios acuosos por acción de la radiación laser el modelo de Shen para el *breakdown* en cascada en sólidos y el modelo de Keldysh para la ionización multifotónica en cristales para darle una interpretación al estudio del plasma [6-8]. En éstos se asume una densidad de carga inicial libre ρ_0 debida a las colisiones térmicas o la ionización multifotónica. El proceso de *breakdown* ocurrirá cuando la densidad de electrones libres ρ alcanza un valor crítico $\rho_{cr} \approx 10^{18}/\text{cm}^3$.

De manera general la ecuación de la variación de la densidad de electrones como función del tiempo se puede expresar como

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = (\eta - g)\rho + \left(\frac{\partial \rho}{\partial t}\right)_m, \quad (1)$$

donde el primer término del lado derecho representa la multiplicación en cascada (η es la relación de ionización en cascada correspondiente a la ecuación de Shen, y g corresponde a la pérdida de electrones libres debido a la recombinación, captura, y la difusión del haz en el volumen focal). El último término representa la generación de portadores de carga por ionización multifotónica durante el proceso de cascada.

Para resolver la ecuación de la relación es necesario tomar en cuenta que

$$\left(\frac{\partial \rho}{\partial t}\right)_m = \eta' - \rho_b, \quad (2)$$

donde $\rho_b(t)$ es la densidad de electrones ligados con energía ligada E_{ion} en un tiempo t , y η' es la

relación de ionización multifotónica para estados de energía ligados E_{ion} .

Se obtiene como resultado:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} - (\eta - g)\rho = \eta' \rho_b, \quad (3)$$

cuya solución viene dada por

$$\rho(t) = \rho_0 e^{at} + \frac{b}{a} e^{at-1}, \quad (4)$$

donde a y b son constantes. A través de esta ecuación se puede hallar el valor de la densidad de electrones en un tiempo t , ancho de pulso τ_p , frecuencia ω y la irradiancia pico I_0 .

3. Descripción experimental

Previo a la formación de los plasmas laser sobre un ojo de bovino y su análisis por técnicas de diagnóstico de plasma por espectroscopía óptica de emisión, se realizaron mediciones para observar el comportamiento de la energía promedio por pulsos del haz de un laser de Nd:YAG operando en el segundo armónico (532 nm) en función de: i) la distancia del detector a la cabeza del láser, ii) la frecuencia de pulsos laser entre 2 y 10 Hz, a una distancia fija de 50 cm. Se utilizó el láser a una frecuencia de 6 Hz para observar las reflexiones del haz laser, iii) el ángulo de incidencia respecto a la normal al plano perpendicular del sensor, manteniendo una frecuencia fija de 5 Hz y una distancia fija de 50 cm y variando la posición angular cada 10°. Se utilizó un medidor de potencia y un sensor piroeléctrico con el fin de obtener valores apropiados en los análisis espectroscópicos (ver Fig. 1).

La Fig. 2 muestra un esquema de la disposición del montaje utilizado para generar los plasmas laser sobre la córnea de un ojo de bovino y la recolección de la luz emitida por los plasmas para su posterior análisis aplicando métodos de la técnica LIBS. Los ojos de bovino sacrificado fueron obtenidos en frigorífico certificado y los experimentos fueron realizados el mismo día del procedimiento. La radiación del láser con una energía promedio de 85 mJ fue desviada por un espejo plano hacia una lente de enfoque de 12 cm de distancia focal para producir los plasmas sobre la córnea del ojo de bovino contenido en un recipiente de vidrio (ver

Fig. 2). La radiación del plasma fue conducida por una fibra óptica de 400 μm de diámetro a la rendija de entrada de un espectrógrafo óptico Czerny-Turner equipado con una red de difracción 1200 líneas/mm y un arreglo lineal CCD de 2048 pixeles para la detección y procesamiento de los espectros. Los espectros de los plasmas fueron adquiridos con un tiempo de integración de 200 ms. Para la comparación de las mediciones espectrales se utilizó la base de datos espectrales del NIST [9].

Fig. 1. Montaje experimental para la caracterización del láser de Nd: YAG.

Fig. 2. Esquema del montaje experimental para el análisis de espectros LIBS de córnea de ojo de bovino.

4. Resultados y análisis

4.a. Análisis cualitativo de la caracterización del láser de Nd:YAG (532 nm)

De acuerdo con las mediciones realizadas para cada uno de los experimentos descritos en la sección 3: variación de la distancia del sensor a la cabeza del láser, variación de la frecuencia del láser respecto a una misma distancia (50 cm) de la cabeza del láser, y finalmente variación del ángulo de incidencia cada 10 grados respecto a la normal del plano perpendicular del sensor, se estimó un valor promedio por cada tres valores

medidos de la energía por pulso emitida por el laser. Igualmente se calculó el valor para la desviación estándar y el coeficiente de variación.

La Tabla I muestra el comportamiento de la variación de la energía promedio por pulso con respecto a la distancia, para una frecuencia de repetición de 6 Hz e incidencia perpendicular. En el análisis estadístico de datos se considera que la repetibilidad es buena si el coeficiente de variación es menor al 5%. En este caso la repetibilidad de la energía de los puntos en su mayoría está por encima del 5%, excepto los puntos 0,83 y 3,80. Lo cual indica que la energía promedio por pulso del sistema láser no es lo suficientemente estable, pero sí es independiente de la distancia entre 10 y 250 cm.

En la Tabla II se reportan los valores observados de la energía promedio por pulso en función de la frecuencia de pulsos laser entre 2 y 10 Hz.

La gráfica de la Fig. 3 muestra el comportamiento de la variación de la energía promedio por pulso con respecto a la frecuencia. Se observa que la energía promedio por pulso varía levemente, incrementándose con el aumento de la frecuencia. Este incremento registrado por el medidor de energía es atribuido al principio de funcionamiento del sensor piroeléctrico, el cual está basado en el cambio de temperatura del material piroeléctrico ubicado dentro del sensor, debido a la absorción de la radiación, la cual conduce a un cambio de polarización del material. Al aumentar la frecuencia del sistema laser el material piroeléctrico no tiene un tiempo suficiente de relajación lo cual conlleva a un constante aumento en la temperatura, arrojando valores mayores de la energía.

Finalmente, la Tabla III muestra el comportamiento de la variación de la energía promedio por pulso variando el ángulo de incidencia del haz laser respecto a la normal a la superficie del sensor, para una frecuencia fija de 5 Hz y a una distancia constante de 50 cm. Se observa que la energía promedio por pulso se mantiene constante para el rango de valores entre 0 y 60°, teniendo en cuenta que el coeficiente de variación es menor al 5%.

Tabla I
Comportamiento de la energía promedio por pulso en función de la distancia.

Distancia (cm)	Energía promedio por pulso (mJ)	Desviación Estándar (mJ)	Coeficiente de variación (%)
10	0,360	0,0210	5,833
30	0,346	0,0029	0,838
50	0,369	0,0210	5,691
70	0,431	0,0164	3,805
100	0,409	0,0258	6,308
150	0,348	0,0236	6,781
200	0,340	0,0213	6,264

Tabla II
Valores observados de la energía promedio por pulso en función de la frecuencia de pulsos laser.

Frecuencia (Hz)	Energía promedio por pulso (mJ)	Desviación Estándar (mJ)	Coeficiente de variación (%)
2	0,195	0,0170	8,717
4	0,302	0,0124	4,105
6	0,369	0,0210	5,691
8	0,445	0,0096	2,157

Tabla III
Comportamiento de la energía promedio por pulso en función del ángulo incidente.

Angulo (grados)	Energía promedio por pulso (mJ)	Desviación estándar (mJ)	Coeficiente de variación (mJ)
0	0,341	0,046	0,13
10	0,336	0,046	0,13
20	0,351	0,049	0,13
30	0,344	0,035	0,10
45	0,327	0,039	0,11
55	0,293	0,041	0,14

Fig. 3. Comportamiento de la energía promedio por pulso en función de la frecuencia.

4.b. Análisis cualitativo de plasma-láser sobre un ojo de bovino

La Fig. 4 muestra espectros de plasmas láser de la córnea de un ojo de bovino tomados en varios sectores del rango espectral durante el proceso. Los espectros fueron registrados en la región espectral de 300-850 nm, en los que se identificaron longitudes de onda correspondientes a elementos como Na, N, Ca, K y O, indicando la presencia de los elementos sodio, potasio, calcio, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno, como constituyentes del colágeno tipo II. El colágeno es una molécula proteica que forma fibras colágenas, las cuales son producidas por células del tejido conjuntivo. Esta molécula es rica en prolina y glicina e hidroxiprolina; sus fórmulas moleculares son $C_2H_5NO_2$, $C_5H_9NO_2$ y $C_5H_9NO_3$, respectivamente. Estos son aminoácidos que forman las proteínas de los seres vivos [3,5].

Fig. 4. Espectros de plasmas-láser en ojo de bovino, para diferentes centros de cámara: a) 404,659 nm b) 570,002 nm c) 807,989 nm, d) 849,994 nm.

5. Conclusión

Se realizaron medidas para analizar la estabilidad de la energía promedio de un laser pulsado de Nd: YAG operando en 532 nm, con valor nominal de la duración del pulso de 3-5 ns. Los valores de la energía promedio medidos muestran una buena estabilidad con la distancia por lo menos hasta unos tres metros. Igualmente, la energía promedio se mantuvo estable al variar el ángulo de incidencia con respecto a la normal al sensor. Por otra parte, se observó una leve variación respecto al valor medio de la energía promedio con la frecuencia. Todos estos datos fueron tomados a máxima escala de la energía entregada al laser atenuándola con un atenuador óptico. Al respecto, las observaciones realizadas permiten concluir que es conveniente trabajar con el laser a máxima potencia y atenuar el haz externamente, debido a que se han observado fluctuaciones en la energía del haz cuando no se trabaja a máxima potencia. En este sentido, es pertinente profundizar en el estudio del comportamiento de la energía o potencia del haz laser así como en su perfil ya que es de vital importancia para los procedimientos laser en oftalmología, los cuales utilizan diferentes tipos de láseres para corrección de defectos visuales en humanos.

Adicionalmente, empleando la técnica de diagnóstico de espectroscopía óptica de plasmas aplicada a los plasmas inducidos por el laser de Nd:YAG en muestras de córnea de ojos de bovino, se pudo determinar elementos característicos como sodio, potasio, calcio, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno, como constituyentes del colágeno tipo II. Estos resultados son también de interés para investigaciones en prácticas forenses, en particular para analizar el comportamiento alimenticio o genético de comunidades en una determinada región.