

LIBRO DE ACTAS

INGENIERIA BIOMEDICA *avanzando hacia el futuro*

Ciudad Real, 21 - 23 noviembre de 2018



CASEIB

2018

XXXVI

Congreso Anual
de la Sociedad
Española de
Ingeniería
Biomédica



Libro de Actas del XXXVI Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica
Libro de Actas CASEIB 2018

Los contenidos de esta publicación han sido evaluados por el Comité Científico que en ella se relaciona y según el procedimiento que se recoge en caseib.es/2018/

Editores técnicos:

Jesús Salido Tercero
Óscar Déniz Suárez

Editores científicos:

M^a del Milagro Fernández Carrobles
M^a Gloria Bueno García

Diseño gráfico:

Dora Isabel Sierra Palacio

Editorial:

Ediciones VISILAB
Avda. Camilo José Cela 3, 13005-Ciudad Real, España.
19 de noviembre de 2018
visilab.etsii.uclm.es

ISBN: 978-84-09-06253-9



CASEIB 2018

XXXVI Congreso Anual de la Sociedad Española de Ingeniería Biomédica

Se distribuye bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-No Comercial-Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.

Análisis de propiedades espectroscópicas de fluoróforos utilizados en el diagnóstico clínico

A. Expósito Monar, F. Fanjul Vélez, J. L. Arce Diego

Grupo de Técnicas Ópticas Aplicadas, Departamento TEISA, Universidad de Cantabria, Av. de los Castros s/n, 39005 Santander (Cantabria), España, fanjulf@unican.es, arcedj@unican.es

Resumen

Las técnicas ópticas se emplean habitualmente en la práctica médica para el tratamiento y diagnóstico de patologías, incluyendo aplicaciones de cirugía. Entre sus ventajas frente a técnicas que emplean radiaciones en otras bandas del espectro electromagnético u ondas acústicas, se encuentran su carácter no ionizante, no invasivo o mínimamente invasivo, la capacidad de localización precisa y la ausencia de contacto. Una de las técnicas diagnósticas más relevantes utiliza el fenómeno de la fluorescencia aplicada al ámbito biomédico. La fluorescencia es un fenómeno producido por la interacción entre un material y la radiación óptica, de tal forma que es capaz de reemitir radiación a longitudes de onda distintas, habitualmente superiores. Las características diagnósticas dependen fuertemente del tipo de fluoróforo empleado, que debe también cumplir restricciones de biocompatibilidad para su aplicabilidad biomédica. Este trabajo se focaliza en dos fluoróforos aprobados para uso clínico: azul de metileno y verde de indocianina. El objetivo consiste en analizar experimentalmente las características espectrales, fundamentalmente de excitación, lo que resulta imprescindible para su uso eficiente en la práctica clínica. Se analiza esta dependencia espectral con diferentes disolventes y a diferentes concentraciones. De esta forma es posible conocer los rangos de longitudes de onda óptimos para su aplicación clínica diagnóstica.

1. Introducción

La óptica aplicada a la biomedicina requiere del estudio de la interacción luz-tejido biológico. Desde el punto de vista óptico, los tejidos se pueden definir como medios turbios multicapa, es decir, presentan, además de absorción, un alto esparcimiento. Cuando un haz de luz incide en un tejido biológico ocurren cuatro fenómenos físicos básicos de manera mesoscópica: reflexión, transmisión, esparcimiento y absorción. Estos fenómenos condicionan la propagación de la radiación óptica en medios biológicos. Para estimar su influencia, y caracterizar adecuadamente un tejido, se pueden definir propiedades ópticas como el índice de refracción, el coeficiente de absorción, el coeficiente de esparcimiento y la anisotropía de esparcimiento [1].

La absorción es una interacción cuántica de gran importancia, ya que condiciona la capacidad de penetración de la radiación incidente. En consecuencia, se puede utilizar esta propiedad para aplicaciones de diagnóstico o tratamiento, según convenga. Resulta especialmente interesante la llamada ventana terapéutica, que comprende un rango aproximado de longitudes de onda entre los 600 y los 1300 nm. En esta ventana terapéutica los componentes básicos de la mayor parte de los tejidos biológicos presentan

una baja absorción, con lo que la profundidad de penetración de la radiación óptica aumenta.

El fenómeno de la fluorescencia se emplea en biomedicina fundamentalmente para diagnóstico de tejidos biológicos [2]. Algunas sustancias intrínsecas de los tejidos biológicos son capaces de producir el efecto de la fluorescencia, que en este caso se denomina auto-fluorescencia. Para marcar aquellos tejidos que no contienen materiales fluorescentes, o al menos no con alta eficiencia cuántica, se utilizan fluoróforos extrínsecos. Este segundo escenario es el más habitual en las aplicaciones médicas de la fluorescencia.

En este trabajo se pretenden caracterizar dos fluoróforos extrínsecos aprobados para uso clínico: azul de metileno y verde de indocianina. Ambos poseen la aprobación de la FDA (Food and Drug Administration) americana, y son utilizados habitualmente en la práctica médica, especialmente para la detección de tejidos tumorales. En la caracterización de fluoróforos es fundamental conocer su respuesta espectral, pues es esta respuesta la que se emplea posteriormente como elemento diferenciador en el diagnóstico. Además, esta respuesta espectral determina la eficiencia cuántica, y por lo tanto la irradiancia de la radiación emitida, lo que constituye un aspecto clave del diseño de equipamiento destinado a medidas de fluorescencia. De esta forma se puede facilitar la localización de puntos concretos de la anatomía que de otra forma sería mucho más difícil, o incluso imposible, localizar.

Estos fluoróforos bajo análisis son sólidos en estado puro, lo que hace necesario el uso de disolventes para su uso clínico. La administración clínica de los mismos suele ser sistémica, intravenosa, o en algunas ocasiones particulares tópica. En cualquier caso, el medio de administración suele ser líquido o en forma de aerosol. La concentración de fluoróforo y el tipo de disolvente generan diferentes interacciones, que dan lugar a variaciones significativas en el espectro de excitación. Estas variaciones modifican en gran medida las características de la radiación absorbida y emitida, lo que hace cambiar por completo tanto la eficiencia como la configuración espectral del sistema diagnóstico de detección. En este trabajo se presenta la caracterización espectral de los fluoróforos azul de metileno y verde de indocianina con diferentes concentraciones y disolventes, incluyendo entre estos últimos distintas polaridades para analizar su efecto.

El trabajo se organiza la siguiente forma. En la siguiente sección aparecen los principios fundamentales del fenómeno de la fluorescencia y de los fluoróforos empleados. La

sección tercera contiene una descripción de la metodología y equipamiento empleados. En la sección cuarta se presentan los resultados experimentales y la correspondiente discusión. Las conclusiones están incluidas en la sección quinta.

2. Fluorescencia y fluoróforos

La absorción de la luz, responsable primera de la fluorescencia, se produce principalmente a través de tres procesos básicos: transiciones electrónicas (entre átomos y moléculas, típicamente entre el ultravioleta y el infrarrojo), transiciones vibracionales (solo entre moléculas, región infrarroja) y transiciones rotacionales (solo entre moléculas, infrarrojo y longitudes de onda submilimétricas). La eficiencia de la absorción de la luz a una longitud de onda (λ) por un medio absorbente está caracterizada por la absorbancia $A(\lambda)$ o por la transmitancia $T(\lambda)$ definidas en las ecuaciones 1 y 2 respectivamente [3].

$$A(\lambda) = \log \left(\frac{I_{\lambda}^0}{I_{\lambda}} \right) = -\log T(\lambda) \quad (1)$$

$$T(\lambda) = \frac{I_{\lambda}}{I_{\lambda}^0} \quad (2)$$

Donde I_{λ}^0 y I_{λ} representan la intensidad luminosa media de los haces incidente y transmitido, respectivamente. En muchos casos, la absorbancia sigue la ley de Beer-Lambert:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot l \cdot c \quad (3)$$

Donde $\varepsilon(\lambda)$ es el coeficiente de absorción molar expresado en L/(mol cm), c es la concentración de la especie absorbida en mol/L y l es la longitud del camino óptico expresado en cm.

Una vez que la molécula ha sido excitada mediante la absorción de un fotón puede volver al estado inicial mediante la emisión de fluorescencia. El diagrama de Perrin-Jablonski (Figura 1) muestra los procesos posibles: absorción de un fotón, conversión interna (IC), relajación vibracional (VR), fluorescencia, cruce intersistémico (ISC), fosforescencia, fluorescencia retardada y transición triplete (T)-tripleto.

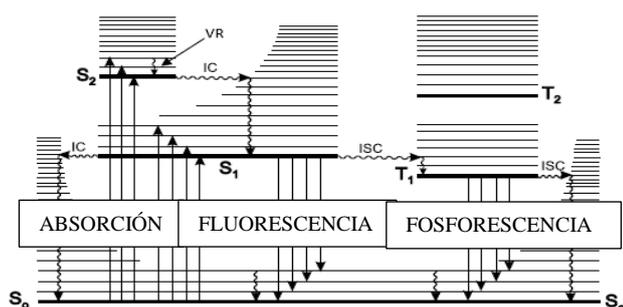


Figura 1. Diagrama de Perrin-Jablonski.

La fluorescencia es la emisión de fotones que acompaña la relajación singlete $S_1 \rightarrow S_0$. El espectro de fluorescencia se localiza a una longitud de onda mayor (menor energía) que el espectro de absorción, causada por la pérdida de energía en el estado excitado debido a la relajación vibracional, lo que se conoce como regla de Stokes. La diferencia entre el máximo de la primera banda de absorción y el máximo de fluorescencia se denomina desplazamiento de Stokes. Desde

un punto de vista práctico, la detección de un fluoróforo es más fácil cuando mayor sea el desplazamiento de Stokes.

La respuesta espectral de un fluoróforo se obtiene mediante un espectrofotómetro o espectrómetro. Se excita la muestra mediante una lámpara que emite un flujo de fotones prácticamente constante. A la cantidad de fotones contantes incidentes en la muestra se la denota como N_0 , y la concentración de fluoróforo con $[A]$, ambos en mol/L. El proceso descrito se puede expresar mediante la ecuación química:



Al producirse una iluminación continua, $[A^*]$ permanece constante, lo que significa que $[A^*]$ es un estado estable. Si se producen mediciones bajo estas condiciones se dice que son mediciones de estado estable. Consecuentemente el cambio de ratio $[A^*]$ es igual a cero [4]:

$$\frac{d[A^*]}{dt} = 0 = k_a \alpha N_0 - (k_r^s + k_{nr}^s)[A^*] \quad (5)$$

Donde $k_a \alpha N_0$ representa la cantidad de fotones absorbidos por unidad de volumen y por unidad de tiempo. La cantidad de fotones emitidos por unidad de tiempo y de volumen se puede calcular como:

$$i_F = k_r^s [A^*] = \alpha I_0 \frac{k_r^s}{(k_r^s + k_{nr}^s)} = \alpha I_0 \Phi_F \quad (6)$$

Es necesario seleccionar el marcador de fluorescencia (fluoróforo extrínseco) dependiendo de su finalidad. Algunos ejemplos son: la protoporfirina IX (utilizada en terapia fotodinámica) [5], la fluoresceína, el azul de metileno y el verde de indocianina. Se han seleccionado los dos últimos para su caracterización durante el presente trabajo. Los fluoróforos extrínsecos tienen una amplia aplicación en el ámbito biomédico. Una aplicación concreta es en la detección de tejidos tumorales. Al captar estas sustancias los tejidos tumorales presentan el fenómeno de fluorescencia, al contrario que los tejidos sanos.

El azul de metileno (MB), con número CAS 61-73-4, es un compuesto químico heterocíclico aromático, orgánico y soluble en agua (40 g/L) y en etanol (15 g/L). Además, posee un peso molecular de 319,85 g/mol y a temperatura superior a 180°C se descompone [6]. Para su caracterización como fluoróforo es importante determinar sus longitudes de onda de excitación y de emisión que están en torno a los 665 nm y los 692 nm, respectivamente, ambas dentro del rango de luz visible (400-780 nm), sabiendo que el rango de absorbancia se encuentra entre 500 y 700 nm y el de emisión entre 650 y 850 nm. Dependiendo del disolvente utilizado se generará distinta respuesta de excitación y de emisión. El disolvente más básico para utilizar es el agua destilada. Durante este trabajo se va a realizar también la caracterización del azul de metileno utilizando etanol para analizar la influencia de los disolventes en los espectros de excitación de fluoróforos.

El verde de indocianina (ICG, IR 125), con número CAS 3599-32-4, contiene menos del 5% de yoduro de sodio, es un colorante de tricarbocianina hidrofílico. Su peso molecular es de 774,967 g/mol. Para su caracterización como fluoróforo es importante determinar sus longitudes de onda

de excitación y de emisión que están en torno a los 790 nm y los 812 nm, respectivamente, ambas dentro del rango del infrarrojo cercano, sabiendo que el rango de absorción se encuentra entre 600 y 825 nm y el de emisión entre 750 y 900 nm [7]. El ICG no tiene un aumento lineal de la absorción al aumentar su concentración en dilución. Además, tiende a degradarse con la exposición a la luz, esta fotodegradación depende también de la concentración de ICG en la muestra. La absorción del ICG disuelto en agua destilada está caracterizada por la contribución de monómeros y dímeros. La absorción es dependiente de la concentración, en tanto en cuanto el comportamiento del marcador se ve determinado por la formación de dímeros. Se va a realizar un estudio empleando etanol en vez de agua destilada, viendo la variación en los patrones de absorción, comprobando que con el uso de este disolvente la absorción no es tan fuertemente dependiente de la creación de dímeros y monómeros.

3. Metodología y equipo experimental

Para analizar el efecto de la concentración se han realizado diluciones de azul de metileno y verde de indocianina en agua destilada. Para el azul de metileno se ha estudiado el rango de concentraciones desde 5 a 200 μM y el verde de indocianina entre las concentraciones 6,5 y 100 μM . Preparadas las diluciones se obtiene experimentalmente el espectro de excitación de todas ellas, con objeto de observar las posibles limitaciones que presenta utilizar agua destilada como disolvente. Después, se han realizado experimentos con el azul de metileno y verde de indocianina disuelto en 50% etanol, viendo la influencia de la polaridad del disolvente en el espectro de excitación. Además, el azul de metileno se ha disuelto también en etanol puro para completar el estudio. Para estos disolventes se han preparado diluciones del azul de metileno a concentraciones 5, 25 y 50 μM . Para el verde de indocianina las concentraciones de fluoróforo han sido de 6,5, 40 y 65 μM . Aunque podría ser también de interés, en este trabajo y con el presente montaje no es posible la medida del tiempo de vida de las sustancias.

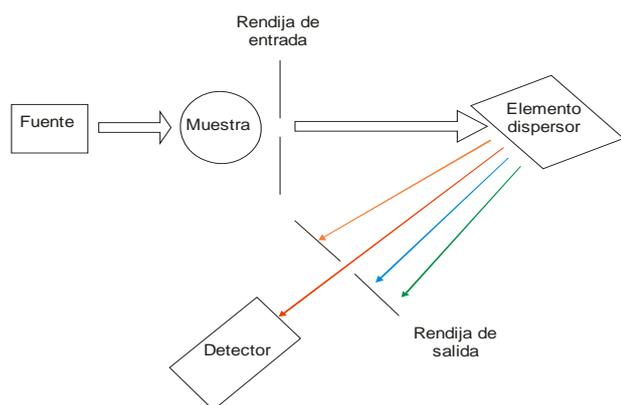


Figura 2. Elementos básicos del montaje espectrométrico.

Para obtener el espectro de excitación de los diferentes solventes se ha utilizado un sistema espectrométrico basado en el espectrómetro *Ocean Optics 650*. Este espectrómetro consta de una fuente de luz que se aplica sobre la muestra dispuesta en una cubeta, una sonda hueca y un detector, ver Figura 2. Este último es de tipo CCD lineal, es decir, mide simultáneamente todas las longitudes de onda sin parte

móvil, para prevenir el desgaste o la rotura de esta última. El rango de medida abarca desde una longitud de onda de 350 a 1000 nm, es decir, contiene los rangos de la mayor parte de la ventana terapéutica antes citada, con lo que resulta suficiente para la realización de los experimentos que tienen como finalidad caracterizar los fluoróforos.

4. Resultados y discusión

Experimentalmente, en primer lugar, se han obtenidos los espectros de excitación del azul de metileno y verde de indocianina disueltos en agua destilada a diferentes concentraciones observando cómo varía la absorción en función de la concentración. Los resultados demuestran una dependencia que puede tener una gran influencia en el diseño del equipamiento clínico. En el espectro de excitación de todas las diluciones de los dos fluoróforos aparecen dos picos en el espectro. El pico que aparece a longitudes de onda menores se corresponde con la absorción de fotones de agregados y el otro a la absorción de fotones por el propio fluoróforo. En la figura 3 se muestran algunos experimentos realizados con el azul de metileno. En ella aparecen claramente los dos picos mencionados.

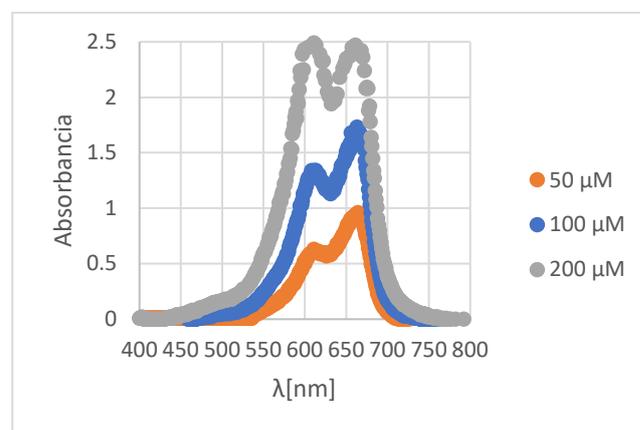


Figura 3. Espectro de excitación del MB en agua destilada.

La formación de agregados se debe a las interacciones (fuerzas hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno) entre el fluoróforo y el agua destilada. Aunque los agregados presentan absorción de fotones, este hecho reduce la eficiencia de fluorescencia, ya que aumentan las fuerzas de interacción. Este hecho provoca, en primer lugar, la transferencia espontánea de electrones de un nivel de excitación elevado a uno inferior (conversión interna), y a continuación un cambio al estado triplete de algunos electrones (cruce intersistémico). Ambas transiciones no radiativas provocan la pérdida de señal de fluorescencia. Un parámetro que trata de caracterizar este efecto es la denominada concentración límite. Ésta se alcanza cuando los dos picos de absorción (dímeros y fluoróforo) toman el mismo valor de absorbancia [8]. Esto ocurre, como se muestra en la figura 3, para el azul de metileno a la concentración de 200 μM , y para el verde de indocianina a entre 40 y 50 μM .

Para solventar la limitación de la formación de agregados se selecciona un disolvente menos polar como es el etanol que genera menos interacciones con los solutos. Para observar experimentalmente la menor formación de agregados se

compara el espectro de excitación de los fluoróforos disueltos en agua destilada y en etanol al 50%. Los resultados muestran cómo el pico de absorción que aparecía a longitudes de ondas menores disminuye en gran medida. En la figura 4 se muestra esta apreciación cuando se disuelve el verde de indocianina en 50% de etanol y agua destilada a la concentración 40 μM . El uso de etanol (un disolvente menos polar) genera la disminución de la formación de agregados y por tanto consigue aumentar el rango de concentraciones a la cual se consigue una excitación eficiente del fluoróforo.

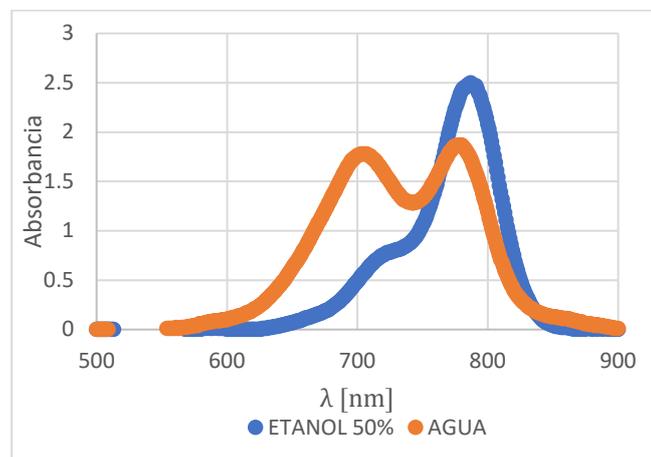


Figura 4. Espectro de excitación del ICG y etanol al 50%.

Además, con el uso de este disolvente la longitud de onda de excitación se desplaza. Cuando se disuelve en etanol al 50% el verde de indocianina se obtiene en el valor 791 nm (figura 4). A diferencia del MB, que al disolverse en etanol al 50% no presenta ningún desplazamiento. En cambio, al disolverse en etanol puro, el azul de metileno desplaza su pico de excitación a una longitud de onda menor de 656 nm. Los valores de la longitud de onda de máxima excitación del azul de metileno y verde de indocianina son de importancia capital en la aplicación diagnóstica de estos fluoróforos, ya que cuando más cerca de estos valores se encuentren los fotones que inciden sobre los fluoróforos, mayor parte serán absorbidos, consiguiendo una mayor excitación de los átomos y moléculas y, consecuentemente, generando mayor intensidad de fluorescencia. El problema es que el valor de este parámetro solo se puede determinar mediante la experimentación, ya que el espectro de excitación varía según la estructura química del disolvente y del fluoróforo y las interacciones que se generan entre ambos.

5. Conclusiones

La caracterización espectral del azul de metileno y verde de indocianina es fundamental para el adecuado diseño de técnicas diagnósticas fluorescentes. La absorbancia de los fluoróforos en agua destilada está limitada por la formación de agregados y por lo tanto la excitación solo es eficiente en un rango de concentraciones. Este rango para el azul de metileno se encuentra entre 5 y 100 μM . En cambio, para el verde de indocianina está entre 6,5 y 40 μM .

El verde de indocianina en agua destilada consigue obtener mayores valores de absorbancia que el azul de metileno a la misma concentración. Esto repercute en que el verde de indocianina debería mostrar mucha más emisión de fluorescencia. La utilización de otros disolventes menos polares, en este

caso el etanol, consigue reducir la formación de agregados. Además, según el disolvente utilizado la longitud de onda a la cual se produce la máxima excitación varía según el disolvente. Todos estos resultados contribuyen a una mejor comprensión del proceso de emisión de fluorescencia en aplicaciones clínicas, así como a determinar los parámetros de concentración o categoría de disolvente necesarios para el diseño de equipamiento diagnóstico de alta eficiencia, particularmente en lo que se refiere al contraste o a la profundidad de penetración de las técnicas de imagen.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por los proyectos del Plan Nacional de I+D+i “Nuevas fases activas en nano-óxidos de metales de transición y tierras raras estabilizadas a alta presión” (MAT2015-69508-P), y Acción Estratégica en Salud “Electroencefalografía intracortical en pacientes con daño cerebral agudo” (PI17/00156), cofinanciados con fondos FEDER, y por la Fundación San Cándido.

Referencias

- [1] Salas-García I, Fanjul-Vélez F, Arce-Diego JL. Spatial photosensitizer fluorescence emission predictive analysis for photodynamic therapy monitoring applied to a skin disease. *Optics Communications*, vol 285, 2012, pp 1581-1588 (ISSN: 0030-4018).
- [2] Berezin MY et. al. Near infrared dyes as lifetime solvatochromic probes for micropolarity measurements of biological systems. *Biophysical Journal*, vol 93, 2007, pp 2892-2899 (ISSN: 0006-3495).
- [3] Salas-García I, Fanjul-Vélez F, Arce-Diego JL. Superficial radially-resolved fluorescence and three-dimensional photochemical time-dependent model for Photodynamic Therapy. *Optics Letters*, vol 39, 2014, 1845-1848 (ISSN: 1539-4794).
- [4] Valeur B. Molecular fluorescence: Principles and Applications. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001 (ISBN: 978-3-527-32846-8).
- [5] Salas-García I, Fanjul-Vélez F, Arce-Diego JL. Photosensitizer absorption coefficient modelling and necrosis prediction during photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol 114, 2012, pp 79-86 (ISSN: 1011-1344).
- [6] Página web Database of Fluorescent Dyes, Properties and Applications de la Universidad Tecnológica de Austria. <http://www.fluorophores.tugraz.at/substance/292> (Consultada: mayo 2018).
- [7] Página web de ATT Bioquest. <https://www.aatbio.com/products/indocyanine-green-cas-3599-32-4?unit=91> (Consultada: mayo 2018).
- [8] Ekaterina, M. et. al. 2013. Photoacoustic lifetime contrast between methylene blue monomers and self-quenched dimers as a model for dual labeled activatable probes. *Journal of Biomedical Optics*, vol. 18, 2013, 56004 (ISSN: 1560-2281).