

# DISEÑO, ENSAMBLAJE Y PUESTA EN MARCHA DE UN MONTAJE EXPERIMENTAL PARA CARACTERIZACIÓN ÓPTICA EN TEJIDOS BIOLÓGICOS

*Data de aceite: 02/08/2023*

### **Danielle Viviana Ochoa Arbeláez**

Universidad del Valle, Cali, Colombia.  
Orcid: 0000-0001-9730-8965

### **Efraín Solarte Rodríguez**

Universidad del Valle, Cali, Colombia.  
Orcid: 0000-0003-4606-0925

### **José Oscar Gutiérrez Montes**

Universidad del Valle, Cali, Colombia.  
<https://scholar.google.es/citations?user=b8MK474AAAAJ&hl=es>

**RESUMEN:** La espectroscopía y la irradiación en los rangos del Ultravioleta visible (UVvis) al Infrarrojo cercano (NIR), son herramientas importantes en las investigaciones más recientes, sobre de tejidos biológicos (Banavath, H.N., et al., 2018, pp. 35-40). Por una parte, las propiedades ópticas de los tejidos dependen de la energía de los fotones y de acuerdo con el rango espectral y de la dosis de irradiación, la aplicación de energía luminosa sobre tejidos biológicos puede conducir a diferentes aplicaciones tanto en las ciencias biológicas como en las de la salud (Hopkins, S.L., et al., 2016, pp. 644-653). Para llevar a cabo experimentos

que permitan estudiar la interacción luz-materia, se realizó un montaje experimental flexible para caracterizar las fuentes de luz utilizables y también realizar mediciones de *Reflectancia* (colimadas) así como estudios de *Fluorescencia* en tejidos biológicos utilizando fuentes de luz halógenas, LASER (405nm, 532nm y 650nm) y diodos emisores de luz LED (380nm, 395nm, 518nm, 590nm y 640nm). El montaje experimental utiliza láseres de fácil consecución y un sistema óptico que permite preparar el haz de luz y enfocarlo sobre la muestra en estudio. La respuesta fenomenológica se mide con un fotómetro de celda de Silicio y las medidas espectrales se realizan con mini espectrómetros en montajes de fibra óptica.

**PALABRAS-CLAVE:** Biofotónica, LASER, LED, Espectroscopía, Tejidos biológicos.

## INTRODUCCIÓN

La espectroscopía es una rama de la óptica que nos permite estudiar la interacción entre la radiación y la materia. Entre los métodos espectroscópicos que más se usan está la radiación electromagnética de la cual hace parte el espectro visible en el rango de 380nm a

780nm. (Wallace, M.B., et al., 2009, pp. 233–242).

Estos espectros permiten determinar la composición atómica y molecular de un material y en este caso de un tejido biológico y, en función de las características de la luz empleada, podemos generar aplicaciones terapéuticas sobre células anormales irradiadas. (Dominguez, A., et al., 2009, pp. 21-28).

Los efectos biológicos y fisiológicos se estudian controlando la irradiación sobre el crecimiento de tejidos biológicos usando métodos estándar de reflectancia, fluorescencia y mediante la observación microscópica de los cambios morfológicos de las células. (Gheewala, T., Skwor, T., & Munirathinam, G. 2018, pp. 130–137).

La luz reflejada por un material es un tipo de interacción de la radiación con la materia que se define como el retorno de la radiación electromagnética por el material sobre el que incide, ocurre en el mismo medio que el haz incidente y depende del cociente entre la intensidad de la luz reflejada y la incidente. (Abebe T., 2010, pp. 8-9).

La fluorescencia es un tipo de emisión de la radiación electromagnética que se produce cuando partículas excitadas (átomos, iones, moléculas) se relajan y pasan a niveles de energía inferiores cediendo el exceso de energía en forma de fotones. Esta radiación emitida tiene longitud de onda más larga que la radiación que originó la fluorescencia. (Pérez, A., et.al. (2006). pp. 487–508).

La caracterización óptica en tejidos biológicos hace parte de los estudios previos para la aplicación en este caso de la terapia óptica que, promete una nueva revolución en el campo investigativo, de acuerdo con las propiedades de las fuentes empleadas con buena resolución espacio temporal, selectividad de acuerdo con su longitud de onda, especificidad y direccionalidad. (Glicksman, M. A. (2018), 1060–1065).

Los efectos ópticos de reflectancia y fluorescencia producidos o inducidos por irradiación con LÁSER se miden de los espectros de las muestras irradiadas (Darío, H., 2008, pp. 2-5). Por ejemplo, se realizó el estudio de los efectos de la radiación óptica de diferentes longitudes de onda, y de luz casi monocromática producida por LÁSER sobre Alas de mariposa de la especie *Heliconius Sara* para comprobar el diseño, ensamblaje y puesta en marcha del montaje experimental construido para medición en tejido biológico. (Sedano, RE., Calero, H., 2021, pp. 374-384).

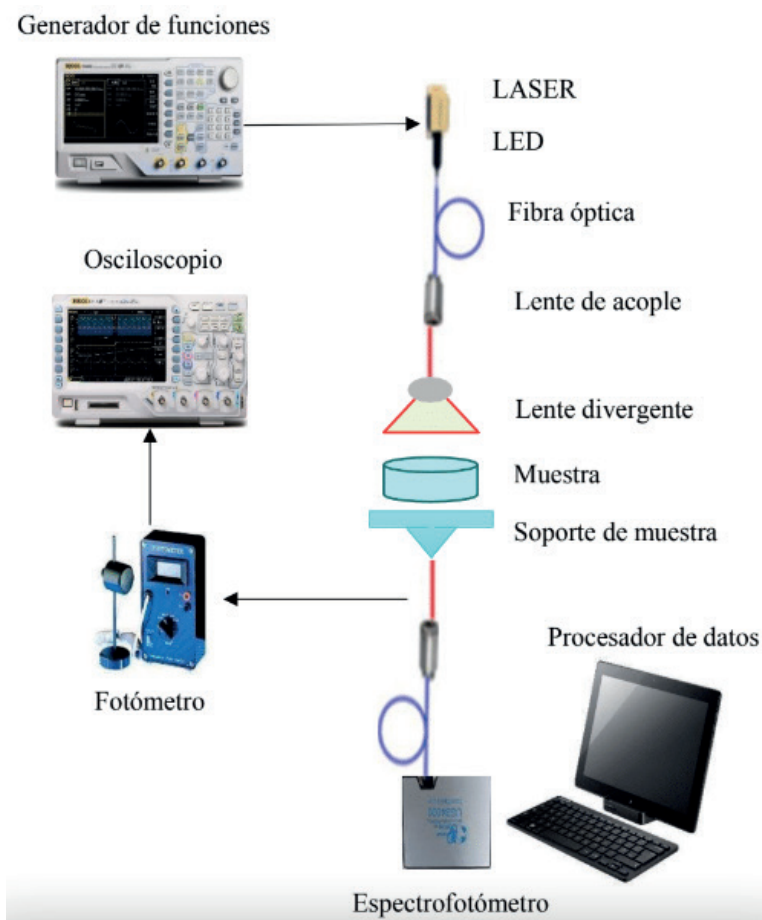
Este montaje experimental, construido, ensamblado y caracterizado para medición espectroscópica en tejidos biológicos, se usará sobre cultivos de células leucémicas.

## MÉTODO

La metodología implementada para el diseño, caracterización óptica y puesta en marcha del montaje experimental, controla ciertos factores como la potencia óptica, la longitud de onda de las fuentes de luz LÁSER Y LED empleadas, la intensidad de luz que recibe el tejido y el tiempo de exposición al que será expuesto. Es decir, la dosis de luz que

incidirá sobre el tejido biológico (Neira, R., et al., 2006, pp. 117–127).

Para estudiar experimentalmente la interacción luz – materia, se realizó el diseño de un montaje como se puede apreciar en el Esquema 1, caracterizando las fuentes de emisión de luz, midiendo la Reflectancia y Fluorescencia en tejidos biológicos. (Solarte, E., et al. 2006, pp. 29- 37).



Esquema 1. Montaje experimental para caracterización óptica en tejidos biológicos

Se ensambló el montaje experimental con fuentes de luz tales como: LASER de 405nm (azul), 532nm (verde) y 650nm (rojo), y un conjunto de LEDs de 380nm, 395nm, 518nm, 590nm y 640nm. (Solarte, E., et al., pp. 5–10).

Además, se incluyó un generador de funciones que envía una señal de onda a la fuente de luz para activarla durante ciertos periodos de tiempo, también un sistema óptico comprendido por una lente acopladora entre la fuente y la fibra o sonda de reflectancia, en dependencia del estudio; lo que permitió guiar el haz de luz, divergir este haz con ayuda de

una lente y que interactuara con la muestra. (Solarte, E., et al., 2010, pp. 1-6)

La respuesta se midió con un fotómetro de celda de Si, que permitió traducir la señal de respuesta óptica en una señal eléctrica, con lo cual, se pudo cuantificar la energía que absorbió el tejido. (Solarte E., et al., 2009, pp. 138-141). Se observó por medio del osciloscopio la señal en Voltios del fotómetro en función del tiempo y se registró el tiempo en que el pulso estuvo prendido y apagado. (Wallace, M.B., et al., 2009, pp. 233–242).

Para comprobar la puesta en marcha del montaje experimental se caracterizaron las fuentes de emisión de luz del sistema y se realizó la caracterización óptica del modelo tejido biológico *Heliconius Sara* (Sedano, RE., Calero, H., 2021, pp. 374-384). Para lo cual, se empleó una sonda de reflectancia que por medio de una fibra óptica bifurcada condujo el haz de luz de la fuente y recogió la reflectancia/fluorescencia de la muestra, la cual fue analizada por un espectrofotómetro.

La aplicación está en fase preliminar de un trabajo de investigación titulado “*Caracterización óptica de poblaciones Insulares y Continentales del Lepidóptero diurno Heliconius Sara para examinar el potencia de fraccionamiento evolutivo*”, que comprende la unión de dos grupos de investigación: Grupo de Eco-fisiología, Biogeografía y Evolución, y de Óptica Cuántica de la Universidad del Valle, con el objetivo de comprobar la naturaleza del color y el potencial de fraccionamiento evolutivo de alas de poblaciones de *H. Sara* a partir de espectroscopía óptica bajo la dirección de los profesores: Raúl Sedano y Efraín Solarte y la participación de dos estudiantes de pregrado Isabella Aguilera y Laura Gil. *Por lo cual, se reservan los derechos de autor.* (Sedano, R., et al., 2023).

El objetivo directo, por el cual se llevó a cabo el diseño, ensamblaje y puesta en marcha de un montaje experimental que permitiera la caracterización espectroscópica sobre tejido biológico, es la aplicación directa para lo cual fue diseñado el montaje experimental; con el cual se llevará a cabo la irradiación óptica sobre cultivos celulares. *(La aplicación del montaje experimental hace parte del proyecto doctoral “Efectos de la irradiación óptica con fuentes de luz láser y led en cultivos celulares de leucemia”)*, por lo cual, se reservan los derechos de autor. (Ochoa, D.V, et al., 2023).

## RESULTADOS

Para caracterizar el montaje experimental; se midieron los espectros de emisión de las fuentes de luz LED y LASER, como se puede apreciar en las figuras 1 y 2.

En la figura 1 se aprecia el espectro de longitudes de onda de los LED: luz blanca representado por una curva de color negro que abarca el espectro visible, longitud de onda a 380nm para el color violeta, 395nm que corresponde al morado, 405nm a la curva azul, 518nm al verde, 590nm al amarillo y 640nm al LED rojo; con un ancho de banda representativa de los mismos.

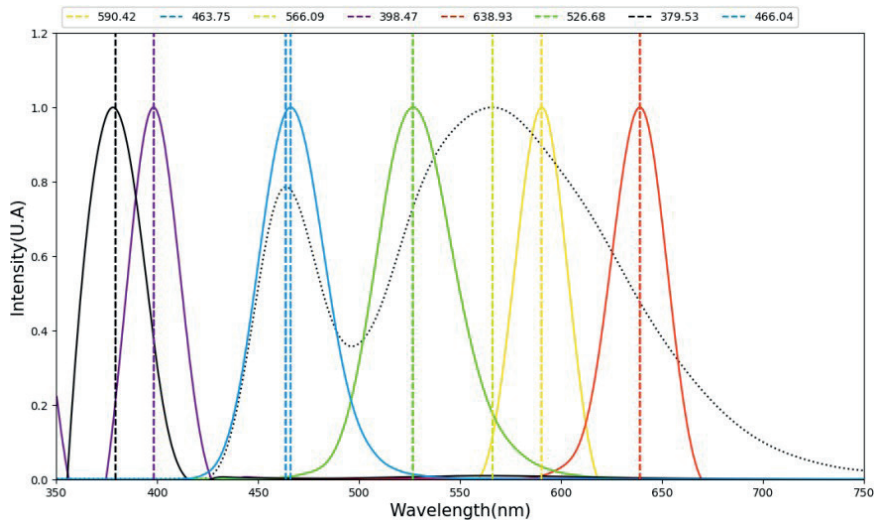


Figura 1. Espectros de emisión de LED a diferentes longitudes de onda.

Así mismo, en la figura 2 se presentan los espectros de emisión característicos de láseres a 405nm el azul, 532nm para el verde y 650nm el LÁSER rojo.

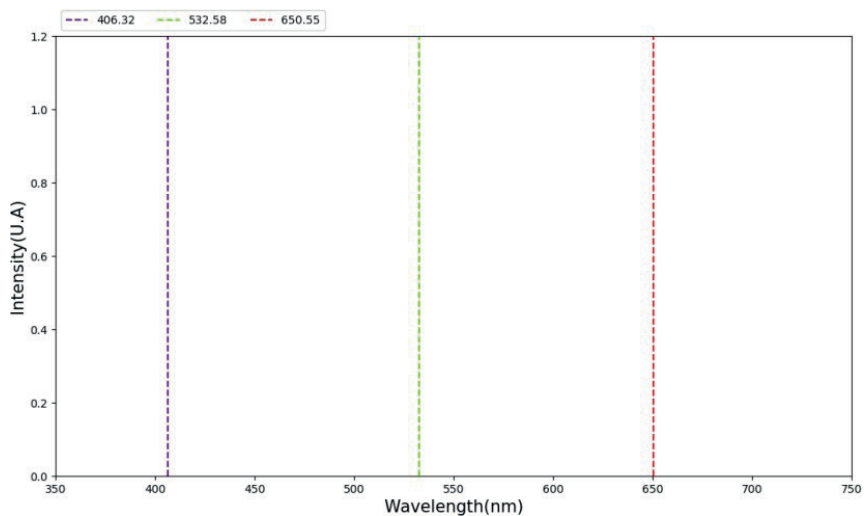


Figura 2. Espectro de emisión de luz LÁSER a diferentes longitudes de onda.

Con lo anterior, se evidenció que el montaje experimental permitió realizar la medición de los espectros de emisión de las diferentes fuentes de luz LED y LÁSER empleadas.

Por otro lado, para comprobar la puesta en marcha del montaje experimental construido para medición en tejido biológico, se realizó la caracterización óptica sobre el modelo biológico Alas de mariposa de la especie *Heliconius Sara*.

En la figura 3 resultante de reflectancia en el rango UV - NIR, permite observar las bandas de absorción de las alas de la especie *Heliconius Sara*.

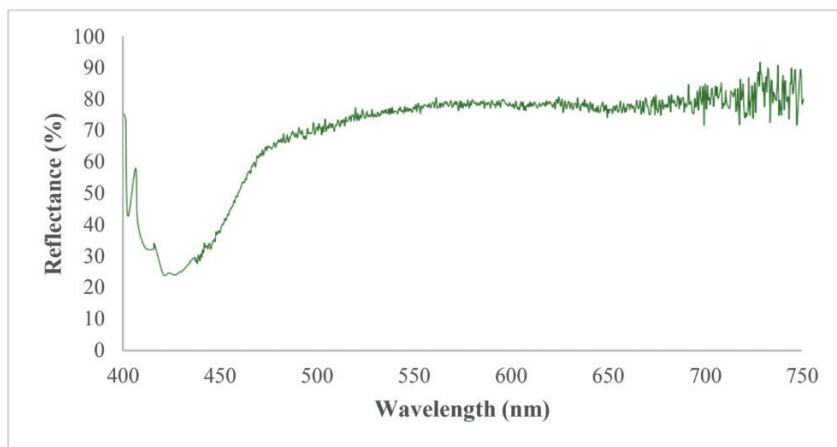


Figura 3. Espectro de reflectancia con fuente de luz halógena sobre modelo biológico alas de mariposa de la especie *Heliconius Sara*.

En la figura 4 se aprecia el espectro de absorción entre 400-500nm y emisión entre 600- 700nm.

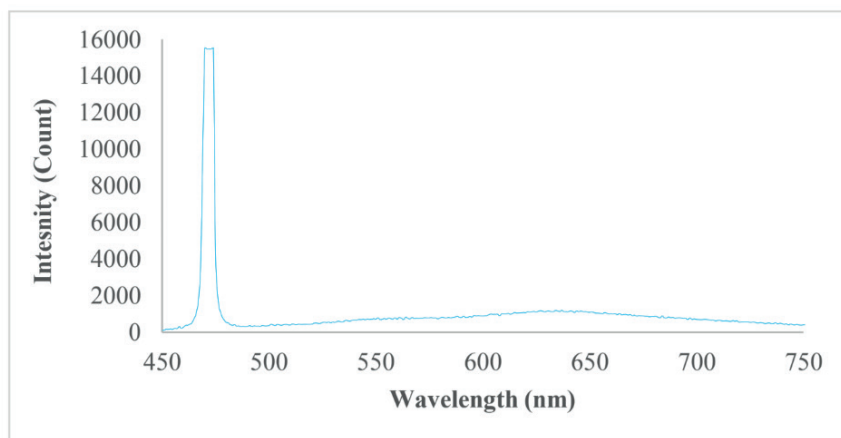


Figura 4. Espectro de Fluorescencia con fuente de luz LÁSER sobre modelo biológico Alas de mariposa de la especie *Heliconius Sara*

## DISCUSIÓN

Una vez se caracterizó espectroscópicamente el montaje experimental a partir de la medición de los espectros de reflectancia de las fuentes de luz halógena, la LED (figura 1) y

el LÁSER (figura 2), fue posible realizar mediciones espectroscópicas sobre tejido biológico (Teixeira, A. F., et al., 2018, 250–255).

Como aplicación directa de la construcción del montaje experimental se realizaron mediciones con fuentes de luz visible continua, LED y LÁSER en tejidos biológicos para la medición de espectros de reflectancia (figura 3) y, bajo cierta modificación del montaje experimental, medir espectros de fluorescencia (figura 4) en el modelo biológico - alas de especímenes de *Heliconius Sara* - (Wilts et al., 2017, pp. 1-12), (Sedano, R., Calero, H., 2021, pp. 374-384).

En la figura 3 se observa el espectro de reflectancia con fuente de luz halógena sobre el ala de mariposa de la especie *Heliconius Sara*, como biomodelo. A partir de los máximos de reflectancia del espectro se elige la longitud de onda que más absorbe el modelo biológico y se mide el espectro de fluorescencia empleando el láser azul (figura 4).

En la figura 4 se observa la absorbancia del biomodelo entre 400-500nm y a mayor longitud de onda, la emisión de la radiación entre 600nm-700nm. En concordancia, se observa la absorbancia en el violeta azul y la emisión de la radiación en el rango de longitud de onda del naranja-rojo. Lo que evidencia el fenómeno de fluorescencia sobre el modelo biológico.

Los tejidos biológicos con base a su complejidad molecular, química y física, tienen respuesta espectroscópica específica en función a la longitud de onda con la que interactúen. Teniendo esta información espectroscópica a detalle, se podrían precisar aplicaciones clínicas.

Finalmente, con el montaje experimental diseñado y ensamblado, fue posible caracterizar espectroscópicamente con base en medidas de reflectancia y fluorescencia, alas de mariposa como tejido biológico modelo como evidencia de la funcionalidad del montaje experimental para la caracterización óptica en tejidos biológicos.

## CONCLUSIONES

Se diseñó, ensambló, caracterizó y puso en marcha el montaje experimental que permitió realizar mediciones espectroscópicas sobre tejido biológico.

Se midieron los espectros de emisión de las fuentes empleadas halógena, LED y LASER, coincidiendo con los esperados de acuerdo con sus propiedades ópticas.

Se obtuvo el espectro resultante de reflectancia en el rango UV-NIR del modelo biológico, lo que permitió observar las bandas de absorción y a partir de cuyos máximos se encontró que el tejido bajo ciertos parámetros ópticos, tiene características de fluorescencia.

Se comprobó la funcionalidad del montaje experimental realizando mediciones de reflectancia y fluorescencia sobre el modelo biológico - alas del lepidóptero diurno de la especie *Heliconius sara* - con fuente de luz halógena y LASER.

Como perspectivas, se realizarán las respectivas pruebas ópticas para determinar

el efecto de la incidencia de la irradiación óptica sobre cultivos celulares para una posible aplicación clínica.

## AGRADECIMIENTOS

Al Grupo de Investigación de Óptica Cuántica de la Universidad del Valle, al director del grupo Dr. Efraín Solarte y a la estudiante Isabella López con quien hicimos equipo para medir sobre el modelo biológico.

Al Dr. Raul Sedano director del Grupo de Investigación Ecología Animal y Grupo Ecofisiología, Biogeografía y Evolución de la Universidad del Valle, por facilitarnos las alas de mariposa de la especie *Heliconius Sara*.

Al Grupo de Investigación de Farmacología de la Universidad del Valle, al director de grupo Dr. Oscar Gutiérrez y al profesional bacteriólogo Jaime Muñoz, en el cual, se determinó el efecto de la incidencia de la irradiación óptica sobre el tejido biológico.

## REFERENCIAS

- Banavath, H. N., et.al. (2018). Femtosecond laser pulse assisted photoporation for drug delivery in Chronic myelogenous leukemia cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* 187. 35-40. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.07.031>
- Hopkins, S. L., et.al. (2016). An in vitro cell irradiation protocol for testing photopharmaceuticals and the effect of blue, green, and red light on human cancer cell lines. *Photochem. Photobiol. Sci.* 15, 644-653. doi: 10.1039/c5pp00424a
- Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2009 April; 19(2): 233–242. doi: 10.1016/j.giec.2009.02.008.
- Dominguez, A., Castro, P., & Morales, M. (2009). An In Vitro Study of the Reaction of Osteoblasts to Low-level Laser Irradiation. *J Oral Laser Applications*, 9, 21–28.
- Gheewala, T., Skwor, T., & Munirathinam, G. (2018). Photodynamic therapy using pheophorbide and 670 nm LEDs exhibits anti-cancer effects in-vitro in androgen dependent prostate cancer. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 21. 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.10.026>
- Abebe T. (2010). Modelling of scattering and absorption by phantom tissue. 8-9. [Master's thesis, Addis Ababa University].
- Pérez, A., et.al. (2006). Espectroscopía de fluorescencia inducida por láser en células, in *Memoria de El Colegio Nacional*. pp. 487–508.
- Darío, H., Criollo, W., Solarte, E., Cuántica, G. D. Ó., Física, D. De, Farmacología, G. De, & Ciencias, E. De. (2008). Efectos de la Radiación de Baja Potencia Sobre el Crecimiento Celular en Cultivos de Meningioma. [Tesis pregrado en física. Universidad del Valle].
- Glicksman, M. A. (2018). Induced Pluripotent Stem Cells: The Most Versatile Source for Stem Cell Therapy. *Clinical Therapeutics*, 40(7), 1060–1065. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2018.06.004>



Hussain, A., Eduardo, J., & Brown, D. (2010). Total body irradiation. In *Quality and Safety in Radiotherapy* (Fourth Ed, pp. 373–379). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1201/b10448>

Ochoa, D. V. (2018). Efecto de las reacciones químicas, en fase gaseosa, sobre la producción de monóxido de carbono, durante la combustión in situ. Cali, Colombia. [Tesis de maestría en ingeniería química, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio institucional de la Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/68705>

Neira, R., Toledo, L., Arroyave, J., Solarte, E., Isaza, C., Gutierrez, O., ... Ortiz-Neira, C.

L. (2006). Lowlevel laser-assisted liposuction: The Neira 4 L technique. *Clinics in Plastic Surgery*, 33(1), 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.cps.2005.09.005>

Solarte, E., et al. (2006). Laser Light Propagation in Adipose Tissue and Laser Effects on Adipose Cell Membranes. *SPIE Vol. 6026*, pp. 29-37. ISBN 0819460575.

Solarte, E., Gutierrez, O., Neira, R., Arroyave, J., Isaza, C., Ramirez, H., ... Ortiz, C. (2004). Laser induced lipolysis on adipose cells. *Proceedings of SPIE*, (October), 5–10. <https://doi.org/10.1117/12.589307>

Solarte, E., Urrea, H., Criollo, W., & Gutierrez, O. (2010). LED illumination effects on proliferation and survival of meningioma cellular cultures. *Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics VII*, Vol. (7563, 756309), 1-6. <https://doi.org/10.1117/12.843060>

Solarte, E., Valdés, C. P., Banguero, Y. (2009). Estudio Experimental y Reconstrucción de la Propagación de un Haz Laser en un Modelo de Tejido Blando. *Revista Colombiana de Física*, ISSN 0120-2650. Ed. Sociedad Colombiana de Física. Vol. 41, No. 1, pp. 138-141.

Teixeira, A. F., Alves, J. R., de Souza da Fonseca, A., & Mencalha, A. L. (2018). Low power blue LED exposure increases effects of doxorubicin on MDA-MB-231 breast cancer cells. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 24(May), 250–255. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.07.016>

Wilts et al. (2017). *BMC Evolutionary Biology*. 17:226, pp. 1-12. doi 10.1186/s12862- 017-1073-1

Valdés, C. P., & Solarte, E. (2010). Estudio experimental de la propagación de luz láser en medios con alto esparcimiento. Cali, Colombia. [Tesis de maestría en ciencias física, Universidad del Valle].

Sedano, R., Aguilera, I., Ochoa, D.V., Gil, L., Solarte, E. (2023). Caracterización óptica empleando fuentes de láser o LED, de poblaciones insulares y continentales del Lepidóptero diurno *Heliconius Sara* para examinar el potencial de fraccionamiento evolutivo. Universidad del Valle, Cali, Colombia.

Sedano, R., Calero, H. (2021). Genetic characterization of the *Heliconius Sara* (Nymphalidae) population in the Gorgona Island, Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 26(3), pp. 374-384. <https://doi.org/10.15446/abc.v26n3.86205>

Ochoa, D.V., Gutiérrez, J.O., Solarte, E. (2023). Efectos de la irradiación óptica con fuentes de luz láser y led en cultivos celulares de leucemia. Cali, Colombia. [Tesis para optar a grado de Doctora en Ciencias Biomédicas, Universidad del Valle]