

Universidad de Guanajuato



División de Ciencias e Ingenierías Campus León

Emisión de luz en sistemas orgánicos  
nanoestructurados y funcionalizados

por

Itzel Isunza Manrique

Tesis para obtener el título de:

Licenciada en Física

Asesor:

Dr. Gabriel Ramos Ortiz

Julio 2014

## RESUMEN

---

En este trabajo se presenta un estudio de las propiedades ópticas más relevantes de nuevos sistemas moleculares orgánicos para el desarrollo de marcadores biocompatibles en microscopía de fluorescencia.

Se realizó una comparación entre la actividad óptica de estos materiales en solución y en suspensiones acuosas de nanopartículas, fabricadas mediante el método de reprecipitación. Para ello se obtuvieron espectros de absorción en el rango UV-visible y espectros de emisión lineal utilizando una fuente de excitación de 370 nm. Se determinaron además los valores de eficiencia cuántica de fluorescencia utilizando una esfera integradora.

Adicionalmente se obtuvieron los valores de sección transversal de absorción de dos fotones en el rango de interés biomédico (740- 840nm y 650- 760nm) mediante la técnica de emisión inducida por absorción de dos fotones, TPEF por sus siglas en inglés. En el rango de 740 a 840 nm se utilizó un láser de Ti: Za con pulsos de 100 *fs* y frecuencia de repetición de 80 *MHz*; para longitudes de onda de 650 a 760 nm se utilizó un amplificador ultrarrápido con emisión de pulsos de 50 *fs* y frecuencia de 1 *kHz*.

Por otra parte, se realizaron estudios para desarrollar y optimizar una transferencia de energía de resonancia Förster en suspensiones acuosas de nanopartículas, realizando posteriormente una caracterización óptica.

Se desarrolló una metodología para la fabricación de nanopartículas orgánicas funcionalizadas con dos tipos de Polietilenglicol (PEG) y se estudiaron efectos en las propiedades ópticas. Las nanopartículas funcionalizadas que presentaron propiedades fluorescentes y que resultaron de mayor interés se sometieron a un estudio de fotoestabilidad para finalmente ser internalizadas en células epiteliales L929 y obtener imágenes (micro- imágenes) con un microscopio de epifluorescencia.

---

## AGRADECIMIENTOS

---

Agradezco al Centro de Investigaciones en Óptica por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo. En particular, agradezco al Grupo de Propiedades Ópticas de la Materia (GPOM) y a sus integrantes por el apoyo y retroalimentación.

También agradezco a las personas que proporcionaron los materiales de estudio que aquí se presentan: a la M.C. Mariana Flores y al Dr. Alejandro Alvarez de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, al Dr. Ullrich Scherf de Bergische Universität Wuppertal, a la Dra. Rosa Santillán y Dr. Arturo Jiménez del Cinvestav-IPN; en especial agradezco a Arturo por su ayuda y apoyo constante.

Agradezco a la Dra. Myrna Sabanero y a sus estudiantes del Laboratorio de Biología Celular y Molecular de las Interacciones de la UG por el apoyo para llevar a cabo la internalización de nanopartículas en las células. Agradezco su paciencia y sobre todo sus enseñanzas.

Al Dr. Leonardo Perez por su amistad y en particular por el apoyo para la adquisición de imágenes con el microscopio de epifluorescencia del CIO.

También agradezco al Ing. físico Manuel De Anda por su ayuda y capacitación brindada para trabajar con el amplificador ultrarrápido y otros equipos, agradezco la paciencia mostrada y amistad.

Agradezco a mis compañeros y amigos por la ayuda brindada durante todo este tiempo, en especial a Álvaro Romero, Enrique Alba, Daniel López, Jonathan Perez, Martín Olmos, Misael Barba, Arián Roa y Luis Lozano. También agradezco a Sean Anderson por su amistad y por el invaluable apoyo mostrado durante la elaboración de este trabajo.

A mi tutor Teodoro Cordova por la disposición tan entusiasta que siempre tuvo por ayudarme y el interés mostrado durante mi formación académica.

Agradezco de una manera muy especial, a Laura Aparicio por sus enseñanzas dentro del laboratorio y fuera de él, por su paciencia y disposición que siempre tuvo para ayudarme en todo momento.

Mis más grandes agradecimientos son para mi asesor de tesis Gabiel Ramos, por haberme otorgado esta gran oportunidad de aprender, por el invaluable apoyo y atención que siempre me mostró, por sus correcciones y sobre todo sus enseñanzas.

Finalmente agradezco a mi familia, por ser un soporte incondicional en mi vida, en especial agradezco a mi madre y a mi abuela por todo su apoyo y comprensión durante todos estos años.

---

# ÍNDICE GENERAL

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	<b>1</b>
1.1	Biofotónica y nuevos métodos de adquisición de imágenes . . . . .	1
1.2	Antecedentes: Marcadores en microscopía de fluorescencia . . . . .	3
1.3	Diferentes tipos de marcadores fluorescentes . . . . .	4
1.4	Nanopartículas orgánicas funcionalizadas con PEG . . . . .	6
1.5	Objetivos de este trabajo . . . . .	7
<b>2</b>	<b>Marco teórico</b>	<b>8</b>
2.1	Microscopía de Fluorescencia . . . . .	8
2.1.1	Fundamentos de la microscopía . . . . .	8
2.1.2	Microscopio de epifluorescencia . . . . .	11
2.1.3	Microscopía confocal de barrido láser . . . . .	12
2.1.4	Microscopía multifotón . . . . .	14
2.2	Propiedades ópticas de marcadores en microscopia de fluorescencia . . . . .	16
2.2.1	Eficiencia cuántica de fluorescencia . . . . .	16
2.2.2	Procesos no lineales: Absorción de dos fotones . . . . .	19
2.2.3	Medición de $\sigma^{TPA}$ mediante la técnica de TPEF . . . . .	25
2.2.4	Transferencia de Energía de Resonancia Förster (FRET) . . . . .	28
<b>3</b>	<b>Desarrollo Experimental</b>	<b>32</b>
3.1	Metodología: Descripción de caracterización óptica . . . . .	32
3.2	Materiales y reactivos . . . . .	33
3.3	Fabricación de nanopartículas por el método de reprecipitación . . . . .	37
3.3.1	Recubrimiento de nanopartículas con PEG . . . . .	38
3.4	Espectros de absorción y emisión lineal . . . . .	39
3.5	Medición de eficiencia cuántica de fluorescencia . . . . .	40
3.6	Medición de $\sigma^{TPA}$ de 740 a 840 nm . . . . .	42
3.7	Medición de $\sigma^{TPA}$ de 650 a 760 nm . . . . .	44
3.8	Fotoestabilidad de las nanopartículas . . . . .	45
3.9	Internalización de nanopartículas en líneas celulares epiteliales (L929) . . . . .	46

<b>4 Resultados</b>	<b>48</b>
4.1 Propiedades ópticas de algunos sistemas moleculares arileno-tinilenos . . . . .	48
4.2 Copolímero PF2/6-b-P3TMAHT . . . . .	54
4.3 Nanopartículas del polímero PMC300 . . . . .	59
4.3.1 Internalización de nanopartículas . . . . .	71
4.4 Comparación de propiedades ópticas entre los sistemas . . . . .	77
4.4.1 Internalización de nanopartículas 3NOS . . . . .	85
<b>5 Conclusiones</b>	<b>89</b>
<b>A Cálculo del factor de corrección para <math>\Phi_f</math></b>	<b>91</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>93</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

1.1	Alcance multidisciplinario de la Biofotónica en el cuidado de la salud . . . . .	2
1.2	Células endoteliales bajo microscopio de fluorescencia. En azul, el núcleo teñido con el colorante DAPI, en verde y rojo, los microtúbulos y filamentos de actina teñidos por la adhesión de los colorantes FITC y TRITC en anticuerpos. <i>Imagen obtenida de <a href="http://rsb.info.nih.gov/ij/images/">http://rsb.info.nih.gov/ij/images/</a>, sin datos de autor.</i> . . . . .	4
1.3	Puntos cuánticos. <i>Imagen de Benoit Dubertret, 2004</i> . . . . .	5
2.1	Distribución de intensidad de un haz de luz y patrón de difracción conocido como <i>Airy Disk</i> . . . . .	9
2.2	Principio básico de microscopio de epifluorescencia. <i>Imagen obtenida de <a href="http://www.nobelprize.org/educational/physics/microscopes/fluorescence/">http://www.nobelprize.org/educational/physics/microscopes/fluorescence/</a>, sin datos de autor.</i> . . . . .	12
2.3	Trayectoria de la luz en un microscopio confocal de fluorescencia. La luz fuera del plano focal no es detectada debido a la apertura confocal. . . . .	13
2.4	Haz de excitación para microscopía de barrido láser de uno y dos fotones. <i>Imagen de Steve Ruzin y Holly Aaron, UC Berkeley.</i> . . . . .	14
2.5	Diagrama de energía para la transición de uno y dos fotones. <i>Imagen de D. Nowak</i> . . . . .	15
2.6	Esquema de penetración del tejido a diferentes longitudes de onda. <i>Imagen tomada del artículo "The Impact of Near-infrared in Plastic Surgery", Ibima Publishing.</i> . . . . .	16
2.7	Geometría del efecto de la polarización no lineal de tercer orden . . . . .	21
2.8	Absorción de dos fotones . . . . .	24
2.9	Esquema de la Transferencia de Energía de Resonancia Förster . .	29
2.10	Espectros de emisión y absorción de intensidad vs frecuencia, $\Omega'$ representa el ancho de la superposición . . . . .	30
3.1	15 sustituyentes $R$ en la estructura principal de la molécula .	34
3.2	Copolímero de dos bloques . . . . .	34

3.3	Moléculas orgánicas dipolar, cuadrupolar y octopolar . . . . .	35
3.4	Polímero PMC300 . . . . .	36
3.5	Rodamina 6G . . . . .	36
3.6	Estructuras de a) PEG 5000 y b) PEG 2000 . . . . .	37
3.7	Método de reprecipitación . . . . .	38
3.8	Arreglo experimental para medir emisión lineal . . . . .	40
3.9	Arreglo experimental para obtener la eficiencia cuántica de fluorescencia . . . . .	41
3.10	Arreglo experimental para medir $\sigma^{TPA}$ (Rango 740– 840 nm)	43
3.11	Arreglo experimental para medir $\sigma^{TPA}$ (Rango 650– 760 nm)	44
4.1	Espectros de absorción molar de las moléculas 3, 6, 7, 10, 13 y 15 (Notación de acuerdo a la fig. 3.1). Las etiquetas <i>Sol</i> y <i>Susp</i> se refieren a las moléculas en solución y suspensión respectivamente. . . . .	49
4.2	Espectros de emisión lineal . . . . .	51
4.3	De izquierda a derecha, fluorescencia de las suspensiones acuosas de nanopartículas 10, 7, 13 y 3 bajo una lámpara UV ( $c=5.84 \times 10^{-5} M$ , $5.68 \times 10^{-5} M$ , $6.35 \times 10^{-5} M$ y $5.68 \times 10^{-5} M$ respectivamente). . . . .	52
4.4	Espectros de emisión inducida por absorción de dos fotones con una fuente de excitación de 750 nm para las moléculas 10 y 13 en solución ( $c=5.84 \times 10^{-5} M$ ) y 7 en solución y suspensión ( $c=5.68 \times 10^{-5} M$ ). . . . .	53
4.5	Espectros de absorción no lineal de las moléculas 10 y 13 en solución y 7 en solución y suspensión . . . . .	54
4.6	Espectros de absorción molar de <i>Sol 1</i> ( $c = 9.25 \times 10^{-6} M$ ), <i>Sol 2</i> ( $6.66 \times 10^{-8} M$ ) y <i>Susp</i> ( $6.66 \times 10^{-8} M$ ). . . . .	56
4.7	Espectros de absorción molar normalizados de <i>Sol 1</i> , <i>Sol 2</i> y <i>Susp</i> . . . . .	57
4.8	Espectros de a)Emisión lineal y b)Emisión lineal normalizada, para las soluciones del copolímero. <i>Sol 1</i> con una concentración de $c = 9.25 \times 10^{-6} M$ y <i>Sol 2</i> con una concentración $c = 6.66 \times 10^{-8} M$ . . . . .	57
4.9	Espectros de emisión no lineal para la Solución 1 ( $c=9.25 \times 10^{-6} M$ ). Longitudes de excitación: 760, 790 y 810 nm. . . . .	58
4.10	Espectro de absorción no lineal de la Solución 1, $c=9.25 \times 10^{-6} M$ . . . . .	59
4.11	Absorción de Rodamina 6G y emisión de PMC300 . . . . .	61

4.12	Espectros de absorción molar de soluciones y suspensiones acuosas de PMC300 y PMC300 dopado con Rodamina 6G . . . . .	62
4.13	Emisión lineal de suspensiones acuosas de nanopartículas funcionalizadas con PEG 2000 (Excitación: 370 nm). . . . .	63
4.14	Espectros de emisión lineal normalizados de suspensiones y Rodamina 6G . . . . .	63
4.15	Espectros de excitación de PMC300 ( $c = 3.68 \times 10^{-7} M$ ) y Rodamina 6G ( $c = 1 \times 10^{-5} M$ ), ambos en solución de THF . . . . .	64
4.16	a) Espectros de emisión lineal de <i>Susp PMC/R6G177-PEG</i> (Exc. 280 y 375 nm) y b) Emisión lineal normalizada de <i>Susp PMC/R6G177-PEG</i> (Exc. 280 y 375nm) y Rodamina 6G y PMC300 (Exc. 380nm) . . . . .	65
4.17	Espectros de absorción no lineal para muestras de PMC300 y PMC300 dopado con Rodamina 6G al 177 % molar. . . . .	67
4.18	Espectros de absorción no lineal para <i>Susp PMC/R6G50-PEG</i> y <i>Susp PMC/R6G177-PEG</i> . . . . .	68
4.19	Espectro de absorción no lineal de <i>Sol PMC300</i> (Rango: 650-760 nm y 800nm). . . . .	69
4.20	Imágenes TEM de <i>Susp PMC/R6G50-PEG</i> . Escala de 100 nm (Izq.) y 500 nm . . . . .	70
4.21	Fotoestabilidad de <i>Sol PMC/R6G50</i> y <i>Susp PMC/R6G50-PEG</i> . . . . .	71
4.22	Microscopio de epifluorescencia modelo IX81 de Olympus. . . . .	72
4.23	Absorción y emisión del colorante DAPI. <i>Espectros adquiridos por Scott Prahl, Oregon Medical Laser Center.</i> . . . . .	73
4.24	a) Campo claro, b)Exc: 420-450 nm, Emisión: 570-590 nm, c) Exc: 330-385 nm, Emisión: 420-500 nm, d) Superposición b) y c). Objetivo de microscopio: 100 $\times$ , escala 20 $\mu\text{m}$ . . . . .	74
4.25	a) Campo claro, b)Exc: 545-580 nm, Emisión: 600-610 nm, c) Exc: 330-385 nm, Emisión: 420-500 nm, d) Superposición b) y c). Objetivo de microscopio: 60 $\times$ , escala 20 $\mu\text{m}$ . . . . .	75
4.26	a) Campo claro, b)Exc: 420-450 nm, Emisión: 570-590 nm, c) Exc: 330-385 nm, Emisión: 420-500 nm, d) Superposición b) y c). Objetivo de microscopio: 20 $\times$ , escala 100 $\mu\text{m}$ . . . . .	76
4.27	Espectros de absorción molar de 1NDS, 2NQS, 3NOS. Las etiquetas <i>Sol</i> y <i>Susp</i> se refieren a los sistemas moleculares en solución y suspensión respectivamente . . . . .	77
4.28	Espectros de emisión lineal de 1NDS, 2NQS y 3NOS en solución y suspensión de nanopartículas . . . . .	79

4.29 Espectros normalizados y fluorescencia visible de <i>Sol 3NOS</i> (azul) y <i>Susp 3NOS</i> (amarilla) . . . . .	80
4.30 Espectros de emisión no lineal de a)1NDS, 2NQS y 3NOS en solución con un haz de excitación a 760 nm y b) 3NOS en solución y suspensión con excitación a 750 y 800 nm. . . . .	80
4.31 Espectro de absorción no lineal de 3NOS en solución y suspensión . . . . .	81
4.32 Espectros de a)Absorción molar y b)Emisión lineal de <i>Sol 3NOS</i> , <i>Susp 3NOS</i> y <i>Susp 3NOS PEG 5000</i> . . . . .	82
4.33 Espectro de absorción no lineal de <i>Susp 3NOS PEG 5000</i> . . . . .	82
4.34 Espectros de absorción no lineal de <i>Sol 3NOS</i> en rangos de 650–760 nm y de 740 – 840nm. . . . .	84
4.35 Imágenes TEM de 3NOS en suspensión de nanopartículas funcionalizadas con PEG 2000. Escala de 20 y 500 nm . . . . .	84
4.36 a) Campo claro, b)Exc: 420-450 nm, Emisión: 570-590 nm, c) Exc: 330-385 nm, Emisión: 420-500 nm, d) Superposición b) y c). Objetivo de microscopio: 40×, escala 50 $\mu\text{m}$ . . . . .	86
4.37 a) Campo claro, b)Exc: 420-450 nm, Emisión: 570-590 nm, c) Exc: 330-385 nm, Emisión: 420-500 nm, d) Superposición b) y c). Objetivo de microscopio: 60×, escala 20 $\mu\text{m}$ . . . . .	88
A.1 Sensibilidad de respuesta del PMT. <i>Imagen adquirida de la hoja de especificaciones del PMT marca HAMAMATSU modelo R7400U-01.</i> . . . . .	92



## CAPÍTULO 1

# INTRODUCCIÓN

### Contenido

---

1.1	Biofotónica y nuevos métodos de adquisición de imágenes . . . . .	1
1.2	Antecedentes: Marcadores en microscopía de fluorescencia . . . . .	3
1.3	Diferentes tipos de marcadores fluorescentes . . . . .	4
1.4	Nanopartículas orgánicas funcionalizadas con PEG . . . . .	6
1.5	Objetivos de este trabajo . . . . .	7

---

### 1.1 Biofotónica y nuevos métodos de adquisición de imágenes

Uno de los avances científicos más importantes del siglo XXI es la biofotónica, estudio multidisciplinario que integra cuatro tecnologías: láseres, fotónica, nanotecnología y biotecnología.

La biofotónica fusiona ciencias biomédicas con la fotónica y estudia interacciones entre la luz y sistemas biológicos. Cuando esta definición se toma en el sentido en el que la fotónica se aplica en ciencias biomédicas, la biofotónica busca resolver problemas de salud en áreas de oncología, dermatología, oftalmología, cirugía y cardiología; presentando nuevas modalidades de terapias basadas en luz guiada y activadas por luz, y alternativas para la detección temprana de enfermedades.

En la figura 1.1 se muestra un panorama general de las aplicaciones en biofotónica para el cuidado de la salud. Se han desarrollado tratamientos que simplifican la entrega de medicamentos en sitios de interés y terapias capaces de destruir células cancerígenas, así como el desarrollo de diagnósticos

confiables basados en diversas técnicas y dispositivos que realizan un estudio estructural de células y tejidos.

Un área fundamental de la biofotónica está enfocada en la adquisición de imágenes *in vivo* e *in vitro* de especímenes o muestras biológicas utilizando métodos ópticos. Las técnicas que se encargan de monitorear propiedades ópticas para formar una imagen, se basan principalmente en el análisis de fluorescencia, transmisión y reflexión de la luz, como la tomografía de coherencia óptica, espectroscopía y microscopía.

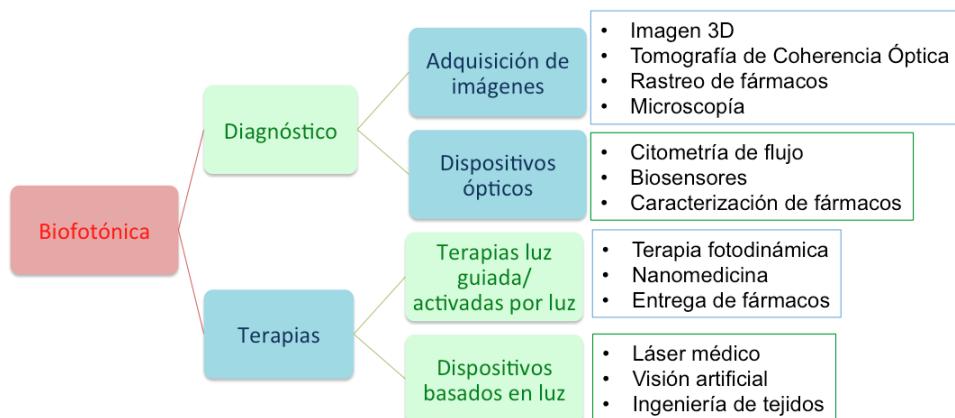


Figura 1.1: Alcance multidisciplinario de la Biofotónica en el cuidado de la salud

En la actualidad la microscopía ha sido ampliamente utilizada debido a las imágenes de mayor resolución y contraste que se pueden adquirir en comparación con otras técnicas convencionales. La microscopía combina e implementa técnicas como la microscopía confocal, microscopía de barrido y microscopía de fluorescencia; además se han desarrollado microscopios basados en procesos de óptica no lineal como la microscopía de segundo o tercer armónico y multifotón.

El desarrollo de nuevos materiales biocompatibles ha contribuido con el avance de algunas aplicaciones en biofotónica. Ha impulsado tratamientos, terapias y métodos de diagnóstico, con el uso de fotosensibilizadores, portadores de fármacos y agentes químicos. Particularmente ha sido fundamental en técnicas de microscopía que involucran el análisis de fluorescencia por el uso de compuestos químicos exógenos como marcadores en especies biológicas.

## 1.2 Antecedentes: Marcadores en microscopía de fluorescencia

Durante el siglo XVII se llevó a cabo la primera observación de células con un microscopio óptico, desde entonces el desarrollo de nuevas técnicas y dispositivos para la obtención de imágenes con mayor resolución no se hizo esperar. En 1911 el físico Oskar Heimstädt (tras el desarrollo del primer microscopio UV por August Köhler) construyó el primer microscopio de fluorescencia con el cual se visualizó una bacteria [1]. A pesar de ello, este microscopio tenía una fuerte limitante: la obtención de imágenes dependía de la autofluorescencia o fluorescencia endógena de los objetos.

Para ampliar los alcances de este microscopio, el austriaco Max Haidinger desarrolló una técnica de fluorescencia secundaria o exógena la cual implicaba el uso de químicos que inducían fluorescencia en las muestras. En 1934 Haidinger acuñó el término *fluorocromo* para referirse a estos colorantes fluorescentes [2], aunque hoy en día se conocen también como fluoróforos.

Sin embargo, el descubrimiento más importante en el campo de microscopía de fluorescencia se llevó a cabo en 1941 por Albert Coons: la inmunofluorescencia [2]. Esta técnica permite localizar biomoléculas específicas en células o tejidos, adhiriendo un colorante fluorescente a un anticuerpo (Ver Figura 1.2). Coons localizó diversos tipos de proteínas en células, adhiriendo una sustancia orgánica hidrosoluble conocida como fluoresceína a un anticuerpo.

Aunque algunas moléculas orgánicas como la flavina, lipofuscina, proteínas y coenzimas, presentan autofluorescencia y pueden ser útiles para monitorear procesos celulares; la microscopía de fluorescencia se basa en visualizar, rastrear y/o monitorear la ubicación o patrón de fluorescencia en células y tejidos que han sido marcados con fluoróforos exógenos [3].

La microscopía de fluorescencia se ha desarrollado en las últimas décadas con la implementación de diversos componentes ópticos y marcadores biocompatibles para obtener imágenes de especies biológicas con resolución de hasta nanómetros. Actualmente hay varios métodos ampliamente utilizados que se basan o pueden basarse en la microscopía de fluorescencia, tales como microscopía de reflexión total interna, confocal, invertida y microscopía de barrido láser de uno y dos fotones entre otras [4].

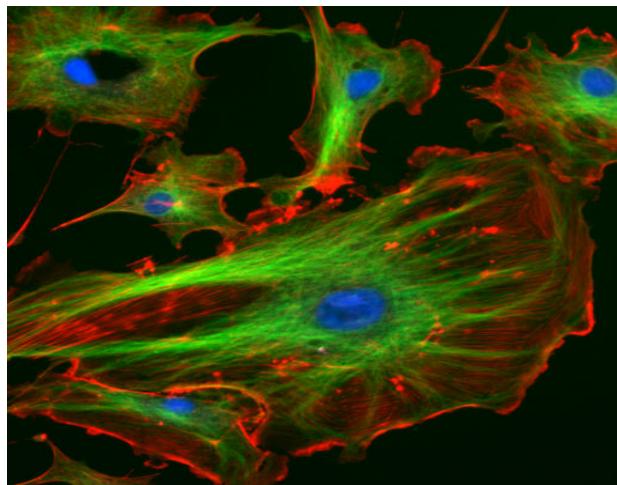


Figura 1.2: Células endoteliales bajo microscopio de fluorescencia. En azul, el núcleo teñido con el colorante DAPI, en verde y rojo, los microtúbulos y filamentos de actina teñidos por la adhesión de los colorantes FITC y TRITC en anticuerpos.  
*Imagen obtenida de <http://rsb.info.nih.gov/ij/images/>, sin datos de autor.*

### 1.3 Diferentes tipos de marcadores fluorescentes: ¿por qué utilizar nanopartículas orgánicas?

Hay diversos colorantes comerciales que se pueden utilizar como marcadores biocompatibles, sin embargo, estos tienen limitantes como baja eficiencia cuántica de fluorescencia, una tendencia a sufrir rápidamente una destrucción fotoquímica conocida como fotoblanqueado (photobleaching en inglés) y principalmente una baja absorción no lineal que dificultan la adquisición de imágenes *in vivo* e *in vitro*. Esta última limitante ha sido la principal motivación de una de las líneas de investigación del Grupo de Propiedades Ópticas de la Materia (GPOM) del Centro de Investigaciones en Óptica (CIO), la cual ha estado encaminada a desarrollar nuevos materiales con absorción no lineal grande.

Uno de los principales objetivos de la nanotecnología aplicada en biofotónica es el uso de nanopartículas como marcadores en sistemas vivos. La nanoquímica es una nueva área que se encarga del confinamiento de reacciones químicas a una escala nanométrica (1 a 100nm). La nanoquímica utiliza un amplio rango de metales, semiconductores, sílice y moléculas y polímeros con sistemas  $\pi$  conjugados para la fabricación de nanopartículas; y puede

modificar y funcionalizar la superficie de las mismas.

Un ejemplo son los puntos cuánticos, nanopartículas hechas de semiconductores inorgánicos cuya ventaja principal es la emisión de luz en un amplio rango de longitudes de onda dependiendo de su tamaño (Fig.1.3). Los puntos cuánticos presentan una destrucción fotoquímica casi nula, la fluorescencia presenta un tiempo de vida prolongado y tienen altos valores de eficiencia cuántica de fluorescencia.

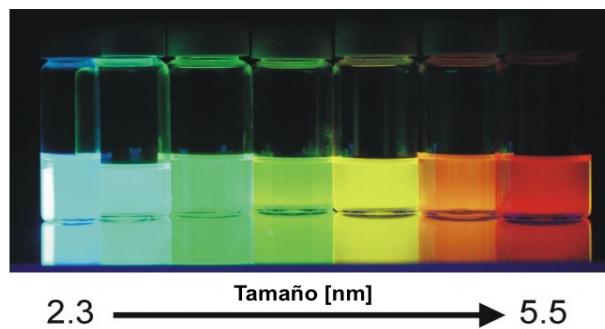


Figura 1.3: Puntos cuánticos. *Imagen de Benoit Dubertret, 2004*

A pesar de ser considerados prominentes marcadores para la obtención de imágenes *in vivo* e *in vitro*, las dudas sobre su potencial toxicidad en células o *citotoxicidad* aún siguen sin resolverse.

Los puntos cuánticos pueden estar limitados por la presencia de metales pesados en su núcleo y bajo ciertas circunstancias pueden ser tóxicos para las células [5]. Aunque la superficie de estas nanopartículas se puede modificar para aumentar su biocompatibilidad o su eficiencia de emisión, es difícil que el diámetro de los puntos cuánticos esté por debajo del límite de excreción renal (5.5 nm) y la toxicidad a largo plazo sería preocupante [6].

Otras nanopartículas inorgánicas fluorescentes tales como los puntos de carbono, nanopartículas metálicas y nanoparículas encapsuladas con sílice, normalmente no son degradables y tienen una potencial toxicidad debido a la acumulación de estos materiales en el sistema reticuloendotelial [7].

Una alternativa de marcadores fluorescentes que se presenta como solución a los problemas de citotoxicidad son las nanopartículas basadas en nuevos materiales orgánicos o con sistemas  $\pi$  conjugados: materiales que presentan emisión de luz inducida por agregación, polímeros conjugados y moléculas

orgánicas de diversos tamaños, como dendrímeros (macromoléculas).

El desarrollo de estas nanopartículas ha tenido un fuerte impacto en la microscopía de fluorescencia debido a sus características fotofísicas: presentan grandes coeficientes de extinción y de eficiencia cuántica de fluorescencia. Además nanopartículas de polímeros conjugados presentan propiedades altamente eficientes de encapsulación y transferencia de energía, mientras que las nanopartículas de moléculas orgánicas pequeñas presentan mayor eficiencia cuántica, mayor intensidad de fluorescencia y estabilidad.

Estudios sobre efectos ópticos no lineales, en particular absorción no lineal de dos fotones de estos sistemas  $\pi$  conjugados, han provocado un fuerte interés debido a la flexibilidad que estos materiales poseen para modificar sus estructuras a nivel molecular y optimizar su respuesta no lineal. Pueden ser utilizados como marcadores en técnicas de microscopía multifotón, como en microscopía de barrido láser de dos fotones, en la cual el fluoróforo es excitado con la absorción no lineal de dos fotones. Esta técnica presenta ventajas ante la microscopía de fluorescencia inducida por la absorción de un fotón, como mayor profundidad de penetración en tejidos por la relativa transparencia que éstos presentan ante radiación infrarroja y la confinación de la destrucción fotoquímica al volumen focal, entre otras.

Aunque la mayoría de este tipo de materiales orgánicos son hidrofóbicos y los marcadres biocompatibles deben ser solubles en agua, hay métodos que desarrollan suspensiones acuosas de nanopartículas, mediante la modificación de su superficie o funcionalización. El recubrimiento de las nanopartículas es crucial para determinar sus propiedades, puede regular la estabilidad, solubilidad y orientación; puede aumentar la biocompatibilidad y permitir bioconjugaciones (unión a biomoléculas, que pueden conferir a las nanopartículas selectividad hacia líneas celulares específicas o hacia estructuras específicas dentro de la célula).

#### **1.4 Nanopartículas orgánicas funcionalizadas con PEG utilizadas como marcadores**

Cuando la modificación de superficie en las nanopartículas se realiza mediante la adhesión de grupos funcionales, al proceso se le conoce como *funcionalización*.

El polietilenglicol (PEG) es un poliéster de baja toxicidad que puede ser

sintetizado en una gran variedad de pesos moleculares. El PEG ha sido ampliamente utilizado en aplicaciones clínicas; puede encapsular diversos fluoróforos y medicamentos, facilitando la entrega de fármacos en sistemas vivos.

La funcionalización de nanopartículas orgánicas con PEG facilita la conjugación con anticuerpos, enzimas y proteínas. De esta manera, las nanopartículas funcionalizadas pueden ser utilizadas como marcadores selectivos y ubicar células específicas como células cancerígenas en la adquisición de imágenes.

Utilizar PEG en nanopartículas orgánicas para desarrollar marcadores biocompatibles tiene diversos beneficios; puede provocar que las nanopartículas tengan una vida media más prolongada en la sangre y menor absorción en el hígado en comparación con las nanopartículas que no tienen este recubrimiento [8], además el PEG promueve la eliminación de nanopartículas del torrente sanguíneo mediante el sistema reticuloendotelial, es decir, no permite su degradación en la sangre.

## 1.5 Objetivos de este trabajo

Los objetivos principales del trabajo fueron:

- 1) Estudiar la emisión de luz inducida por uno y dos fotones en nanopartículas orgánicas funcionalizadas con PEG, utilizando para ello nuevos materiales orgánicos no lineales.
- 2) Comparación de propiedades no lineales entre soluciones y suspensiones acuosas de nanopartículas del material precursor hidrofóbico.
- 2) Estudiar la transferencia de energía de resonancia Förster en suspensiones acuosas de nanopartículas.
- 3) Aplicar las nanopartículas estudiadas como marcadores de líneas celulares y obtener imágenes con un microscopio de epifluorescencia.

En la funcionalización realizada en este trabajo se utilizó un PEG como agente estabilizador en las suspensiones acuosas de nanopartículas.

# CAPÍTULO 2

## MARCO TEÓRICO

### Contenido

---

<b>2.1</b>	<b>Microscopía de Fluorescencia</b>	<b>8</b>
2.1.1	Fundamentos de la microscopía	8
2.1.2	Microscopio de epifluorescencia	11
2.1.3	Microscopía confocal de barrido láser	12
2.1.4	Microscopía multifotón	14
<b>2.2</b>	<b>Propiedades ópticas de marcadores en microscopía de fluorescencia</b>	<b>16</b>
2.2.1	Eficiencia cuántica de fluorescencia	16
2.2.2	Procesos no lineales: Absorción de dos fotones	19
2.2.3	Medición de $\sigma^{TPA}$ mediante la técnica de TPEF	25
2.2.4	Transferencia de Energía de Resonancia Förster (FRET)	28

---

### 2.1 Microscopía de Fluorescencia

#### 2.1.1 Fundamentos de la microscopía

La invención del microscopio alrededor del año 1600 y las implementaciones que se han llevado a cabo en los últimos 400 años han tenido como resultados grandes avances en el entendimiento de sistemas microscópicos y en el desarrollo de biología y medicina.

Los componentes del microscopio óptico incluyen el sistema de iluminación, varios diafragmas, cubreobjetos, objetivo de microscopio, diversas lentes, filtros, detector y otros componentes ópticos. El objetivo de microscopio es un elemento crítico que consiste de un cilindro con un sistema de lentes en su

interior que recolectan la luz proveniente de diversos puntos del espécimen y la dirigen hacia los puntos correspondientes en la imagen.

El microscopio tiene como objetivo magnificar y aumentar la resolución de una imagen que se forma analizando la luz transmitida, reflejada o de fluorescencia proveniente del objeto. La resolución espacial denota la habilidad del microscopio para resolver o separar puntos adyacentes en el objeto y está limitada por la difracción de la luz que forma el objetivo de microscopio.

Es posible comprender este fenómeno analizando el patrón de difracción (de varios órdenes) que se forman cuando un haz de luz atraviesa un *pinhole* o abertura circular como se muestra en la figura 2.1. Para obtener la información completa o detalles de la muestra, las lentes del objetivo colectan la luz proveniente de todos los órdenes de difracción. Entre más grande sea el cono de luz que llega al objetivo de microscopio, más órdenes de difracción pueden colectar las lentes y la resolución del objetivo aumenta.

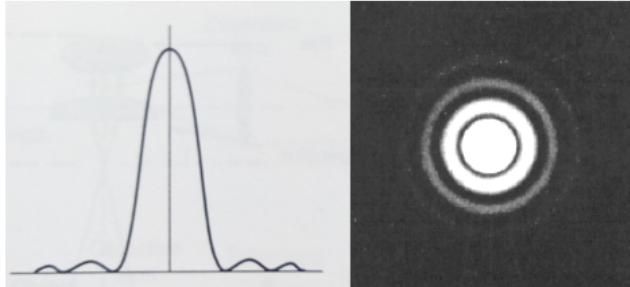


Figura 2.1: Distribución de intensidad de un haz de luz y patrón de difracción conocido como *Airy Disk*

A finales del siglo XIX el físico Ernst Abbe, quien trabajaba en la fabrica de microscopios de Carl Zeiss demostró que la potencia o alcance de la resolución espacial de un microscopio depende de la longitud de onda de la luz utilizada para formar la imagen y del ángulo con que el objetivo colecta la luz o apertura angular; con esto Abbe definió la *apertura numérica* del objetivo como:

$$NA = n \sin(\Theta) \quad (2.1)$$

donde  $\Theta$  es la mitad de la apertura angular del objetivo de microscopio y  $n$  es el índice de refracción del medio entre el objetivo y la muestra [2]. Entre

más grande sea el cono de luz que puede dirigirse a la lente más grande será su apertura numérica. De la ecuación 2.1 se puede ver que el máximo valor que puede tomar la apertura numérica es el índice de refracción; por lo que una manera de aumentar la apertura numérica es utilizar un medio de inmersión con un índice de refracción mayor que el aire, como puede ser el agua o aceite. Nótese que el uso de objetivos de microscopio con apertura numérica grande, implica una disminución de la distancia entre la muestra y el objetivo.

La resolución de un microscopio se define como la distancia  $d$  entre dos partículas adyacentes las cuales pueden ser percibidas como partículas separadas. La resolución está dada por el criterio Rayleigh:

$$d = \frac{1.22\lambda}{2NA} \quad (2.2)$$

donde  $\lambda$  es la longitud de onda de la luz incidente en el vacío [4]. De aquí se deduce que lentes con apertura óptica mayor pueden brindar mejor resolución.

El límite de resolución por difracción para un microscopio óptico convencional, es decir, el detalle más pequeño  $\Delta x$  que puede ser resuelto con un microscopio en función de la longitud de onda  $\lambda$  y apertura numérica  $NA$  del objetivo es:

$$\Delta x = \frac{\lambda}{2NA} \quad (2.3)$$

Esta ecuación se conoce como la ecuación de Abbe [2]. La teoría que desarrollo Abbe sobre el microscopio óptico lo llevo a concluir que la resolución del microscopio está determinada por la apertura numérica y no la magnificación; además concluyó que longitudes de onda más cortas incrementan la resolución.

Otras distorsiones que se presentan en el sistema óptico del microscopio e impiden la formación de una imagen perfecta se conocen como aberraciones. Hay dos tipos principales de aberraciones que desvían la luz a causa de las propiedades de las lentes, o bien, las formas geométricas de las superficies reflejantes y de refracción: aberración cromática y esférica. La primera se debe a la dependencia que tiene el índice de refracción con la longitud de onda, provocando que la luz se refracte con direcciones diferentes; mientras

que la aberración esférica se debe a la forma de las lentes, con distancias focales diferentes dependiendo de la zona de la lente.

El diseño y manufactura de un microscopio buscan minimizar las aberraciones, maximizar la resolución y alcanzar la máxima fidelidad posible entre el objeto y la imagen con el contraste suficiente.

El microscopio de fluorescencia ha emergido como una gran técnica para la adquisición de imágenes de sistemas vivos; la fluorescencia proveniente de la muestra se utiliza para obtener la imagen. Se puede utilizar fluorescencia endógena o se puede marcar el espécimen biológico con un fluoróforo, cuya distribución será evidente después de la iluminación.

La microscopia de fluorescencia es idealmente utilizada para la detección de fluoróforos específicos en células y tejidos. Se han desarrollado algunos microscopios cuyo funcionamiento se basa en la fluorescencia como el microscopio de epifluorescencia, confocal de barrido láser y multifotón.

### 2.1.2 Microscopio de epifluorescencia

El microscopio más utilizado hoy en día sigue el diseño básico de epifluorescencia. En este dispositivo la luz de excitación pasa a través del mismo objetivo de microscopio que posteriormente recolectará la luz emitida por la muestra para formar la imagen; utilizando para ello filtros y un divisor de haz como se muestra en la figura 2.2.

El divisor de haz transmite o refleja la luz dependiendo de su longitud de onda y separa la luz de excitación de la fluorescencia; la longitud de onda de la luz emitida es más grande que la de excitación. En el sistema de iluminación se utilizan fuentes con un amplio rangopectral como lámparas de mercurio o xenón y con ayuda de un filtro se selecciona una longitud de onda específica (comúnmente en el rango UV).

Este tipo de microscopio tiene varias ventajas: el objetivo (utilizado primero para concentrar y enfocar la luz incidente en la muestra y después como colector de la luz emitida para formar la imagen) siempre está en correcta alineación; la mayor parte de la luz de excitación atraviesa el espécimen y se aleja del objetivo; la zona iluminada de la muestra se limita a lo que puede ser observado; se puede utilizar la apertura numérica completa del objetivo de microscopio; es posible combinar o alternar la manera de obtener la imagen, analizando la fluorescencia de la muestra o la luz transmitida [9].

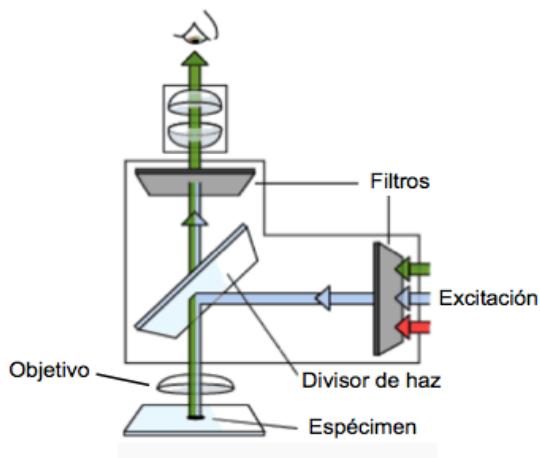


Figura 2.2: Principio básico de microscopio de epifluorescencia. *Imagen obtenida de <http://www.nobelprize.org/educational/physics/microscopes/fluorescence/>, sin datos de autor.*

### 2.1.3 Microscopía confocal de barrido láser

La microscopía confocal es una técnica que puede aumentar la resolución y el contraste de una imagen con el uso de una iluminación puntual y una abertura confocal en el camino del haz que forma la imagen (fluorescencia en el caso del microscopio de fluorescencia). El objetivo de la apertura, que puede ser un pinhole, es eliminar las contribuciones de la luz fuera de foco como se explica en el esquema de la figura 2.3.

La técnica que combina la microscopía confocal y de fluorescencia es la microscopía confocal de barrido láser, en donde la fuente de excitación es un haz láser enfocado por un objetivo a la muestra. La extensión espacial del láser enfocado en la muestra es determinado por la longitud de onda, la apertura numérica de las lentes y la calidad de formación de la imagen.

La principal característica de esta técnica es la capacidad de adquirir imágenes a profundidades específicas del tejido (de hasta 100 micrometros) permitiendo reconstrucciones en 3D. Otra ventaja de este dispositivo es que la magnificación puede ajustarse variando el área de barrido del láser en la muestra sin necesidad de cambiar los objetivos, esta característica se conoce como *zoom factor* [10].

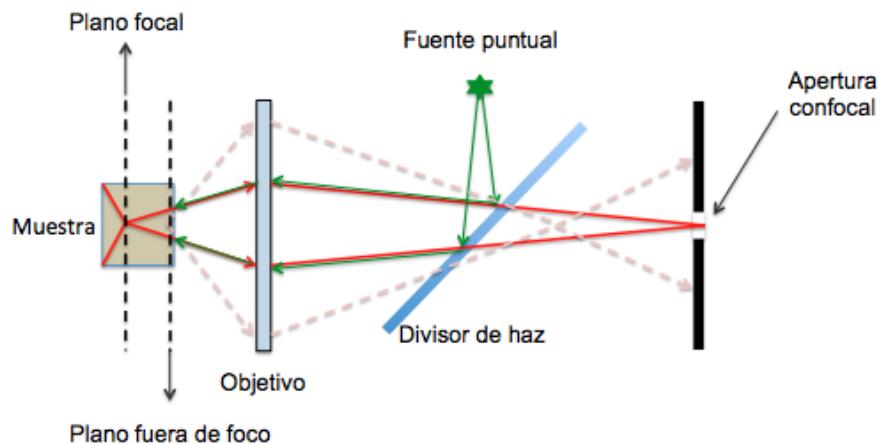


Figura 2.3: Trayectoria de la luz en un microscopio confocal de fluorescencia. La luz fuera del plano focal no es detectada debido a la apertura confocal.

La fluorescencia utilizada para formar la imagen en este microscopio es inducida por la absorción de un fotón y es un proceso lineal, por ello la fluorescencia se manifiesta a lo largo de un cono de luz como se observa en la imagen izquierda de la figura 2.4; esto puede provocar daño fotoquímico en un área grande de la muestra.

La mayoría de fluoróforos utilizados en esta técnica, como marcadores en sistemas vivos son excitados por la absorción de un fotón en la región UV o azul de la luz. A esta longitud de onda la luz es altamente atenuada por el tejido y limita la adquisición de imágenes con gran profundidad de penetración [4].

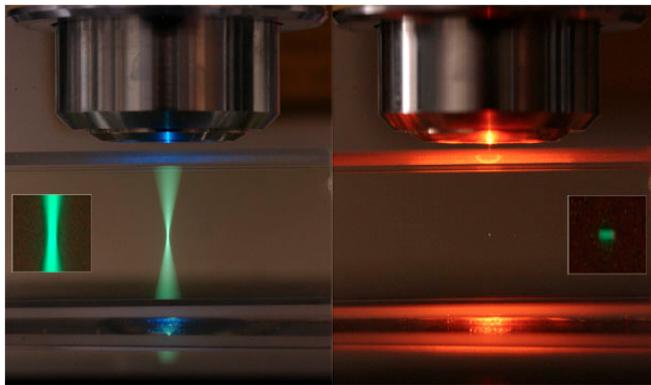


Figura 2.4: Haz de excitación para microscopía de barrido láser de uno y dos fotones. *Imagen de Steve Ruzin y Holly Aaron, UC Berkeley.*

#### 2.1.4 Microscopía multifotón

En la microscopía multifotón un fluoróforo es excitado mediante la absorción de dos o mas fotones y la fluorescencia emitida se usa para formar una imagen. La fluorescencia inducida por la absorción de dos o tres fotones se ha utilizado en este tipo de microscopía no lineal. Sin embargo, por razones prácticas (luz de excitación de gran intensidad) que requiere el proceso de absorción de tres fotones, solo la microscopía de dos fotones ha emergido como una de las técnicas más utilizadas para adquisición de imágenes de sistemas vivos.

La absorción de dos fotones es un fenómeno no lineal que fue propuesto teóricamente por Maria Göppert- Mayer. En este proceso un átomo tiene una transición del estado base  $S_0$  al estado excitado  $S_n$  por la absorción "simultánea"de dos fotones (Ver Figura 2.5); el primer fotón induce la trasición del estado base a un estado virtual y el segundo fotón induce la transición del estado virtual al estado excitado.

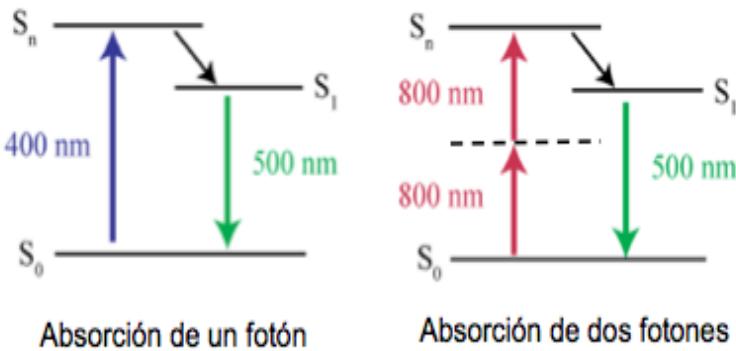


Figura 2.5: Diagrama de energía para la transición de uno y dos fotones.  
Imagen de D. Nowak

La probabilidad del proceso de absorción de dos fotones depende de la intensidad de la luz de excitación elevada al cuadrado, por eso es necesario el uso de un láser con pulsos intensos. La microscopía de barrido láser de dos fotones puede utilizar un láser enfocado de pulsos cortos (del orden de picosegundos y femtosegundos) con longitud de onda en el rojo o cercano infrarrojo como fuente de excitación y puede producir fluorescencia en el rango visible.

El uso de un haz de excitación enfocado en esta técnica de microscopía presenta ventajas como la implementación de resolución espacial sin el uso de *pinholes* o rendijas como filtros espaciales, la obtención de imágenes 3D y la confinación de la destrucción fotoquímica al volumen focal como se muestra en el lado derecho de la figura 2.4). Además como las células y tejidos presentan relativa transparencia ante la radiación infrarroja (Ver Figura 2.6), la microscopía de barrido láser de dos fotones aumenta la profundidad de penetración en especímenes vivos; mientras más grande sea la longitud de onda de la luz de excitación, el daño a las células y tejidos es menor.

Esta técnica es ideal para adquirir imágenes de diversas profundidades en tejidos, con una resolución de submicrómetros:  $0.3\mu m$  de resolución lateral,  $0.8\mu m$  de resolución axial y una profundidad de penetración que puede ir de 500 a  $1000\mu m$  [2].

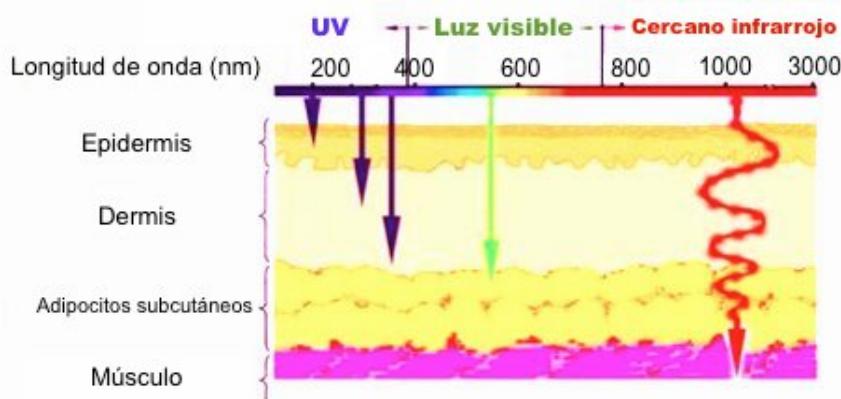


Figura 2.6: Esquema de penetración del tejido a diferentes longitudes de onda. *Imagen tomada del artículo "The Impact of Near-infrared in Plastic Surgery", Ibima Publishing.*

## 2.2 Propiedades ópticas de marcadores en microscopía de fluorescencia

Hay diversos materiales orgánicos e inorgánicos que presentan una gran emisión de luz y se utilizan como marcadores biocompatibles en microscopía de fluorescencia. El estudio óptico lineal y no lineal de estos materiales, desde colorantes comerciales hasta nanopartículas de nuevos compuestos, incluye por ejemplo el análisis de propiedades como la eficiencia cuántica de fluorescencia o la sección transversal de absorción de dos fotones, la cual es relevante para los marcadores en microscopía de barrido láser de dos fotones.

Por otra parte, un fenómeno que ha sido útil en la microscopía de fluorescencia, es la Transferencia de Energía de Resonancia Förster ó FRET por sus siglas en inglés. Esta transferencia de energía permite modificar algunas propiedades ópticas de un fluoróforo utilizando otro compuesto o colorante bajo ciertas condiciones mostradas más adelante.

### 2.2.1 Eficiencia cuántica de fluorescencia

Los procesos de decaimiento que llevan a una molécula del estado excitado al estado base pueden ser radiativos y no radiativos. Como decaimientos

no radiativos se pueden citar la conversión interna y transiciones entre dos estados electrónicos (que pueden llevar a la emisión de fosforescencia) entre otros; sin embargo, el proceso de decaimiento predominante en el tipo de materiales que se estudiaron en este trabajo es radiativo: la fluorescencia; que es un tipo de luminiscencia con una tasa de emisión de  $10^8 s^{-1}$  y un tiempo de vida de varios nanosegundos.

La eficiencia cuántica de fluorescencia  $\Phi_f$  es la razón que hay entre los fotones absorbidos por un compuesto y los emitidos mediante fluorescencia como se muestra en la ecuación 2.4. La eficiencia cuántica de fluorescencia, determina la probabilidad de que una molécula en estado excitado tenga un decaimiento radiativo por fluorescencia, en lugar de cualquier otro mecanismo no radiativo [11].

$$\Phi_f = \frac{\# \text{fotones emitidos}}{\# \text{fotones absorbidos}} \quad (2.4)$$

Desde hace algunas décadas, se han realizado esfuerzos para desarrollar métodos confiables que determinen la eficiencia cuántica de fluorescencia, la mayoría de los cuales utilizan el compuesto de interés en solución o suspensión.

Los métodos que buscan determinar directamente la eficiencia cuántica de fluorescencia, se conocen como métodos absolutos. Por ejemplo el método Vavilov, monitorea la fluorescencia de la muestra en una celda y el esparcimiento de una superficie sólida de óxido de magnesio; en el método de Weber y Teale, a diferencia del anterior, se analiza el esparcimiento de una solución y el método calorímetrico, mide la energía liberada en forma de calor por los decaimientos no radiativos.

Debido a las complejas correcciones que requieren diversos métodos absolutos, en la gran mayoría de laboratorios se utiliza el método relativo para medir  $\Phi_f$ . Este método se basa en comparar la intensidad de fluorescencia de la muestra de interés con la intensidad de fluorescencia de una solución de referencia [12]. En particular, en este trabajo se midió la eficiencia cuántica de fluorescencia con un método relativo utilizando una esfera integradora.

### 2.2.1.1 Método relativo de la esfera integradora para medir eficiencia cuántica de fluorescencia

En este método se mide la eficiencia cuántica de fluorescencia  $\Phi_f$  para un compuesto en solución o suspensión de nanopartículas mediante la detección de emisión de luz de éste en una esfera integradora; para ello se utiliza un sistema de detección, que puede ser constituido por un monocromador, una cámara CCD, un analizador multicanal fotónico, un fotodetector etc... Particularmente, en este trabajo se utilizó un tubo fotomultiplicador o PMT por sus siglas en inglés y un amplificador lock-in.

Las soluciones o suspensiones se colocan en celdas de cuarzo de  $0.1 \times 1 \times 4 \text{ cm}^3$  a concentraciones del orden de  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  M. La emisión de luz de la muestra es reflejada con la misma intensidad en todas direcciones dentro de la esfera integradora y detectada por un PMT colocado en una abertura de la esfera. El PMT, detecta los fotones de emisión y crea una señal eléctrica que es enviada a un amplificador lock-in. Finalmente el amplificador arroja el valor, en volts, de la señal causada por la intensidad de fluorescencia.

El proceso anterior se repite para una solución utilizada como referencia con valor de eficiencia cuántica de fluorescencia conocido. Comparando la emisión de luz de la muestra de interés con la emisión de luz de la referencia se puede conocer  $\Phi_f$  para la muestra, como se explica a continuación.

Cuando el haz de excitación incide en un medio, en este caso la celda, parte de la luz será transmitida, reflejada y absorbida por el medio. La aplicación de la conservación de energía, determina que la suma de la transmisión  $t$ , reflexión  $r$  y absorción  $a$  de la luz incidente es igual a la unidad.

$$t + r + a = 1 \quad (2.5)$$

En el método utilizado en este trabajo, el reflejo del haz de excitación en la celda se dirigió hacia afuera de la esfera integradora para no ser detectado y así suponer que  $r = 0$  en la ecuación 2.5.

La intensidad de la luz emitida por una muestra  $I_m$  es proporcional a la intensidad de luz del haz incidente  $I_{0m}$ , eficiencia cuántica de fluorescencia  $\Phi_{f_m}$  y absorción  $a$ ; esta última se puede expresar como  $a = 1 - t$  para escribir:

$$I_m \propto I_{0m} \Phi_{f_m} (1 - t) \quad (2.6)$$

Nótese que se ha utilizado el subíndice  $m$  para hacer referencia a los parámetros de la muestra de interés. Utilizando la Ley de Lambert- Beer es posible expresar la transmisión como  $t = 10^{-A_m}$ , donde  $A_m$  es la absorbancia de la muestra. La ecuación 2.6 puede escribirse como

$$I_m = kI_{0m}\Phi_m(1 - 10^{-A_m}) \quad (2.7)$$

donde se introdujo la constante instrumental  $k$ . El valor de esta constante de corrección para el sistema completo de medición de eficiencia cuántica no es conocido, pero puede ser eliminado de la ecuación 2.7 utilizando una solución de prueba o referencia con valor de eficiencia cuántica de fluorescencia conocido. Es decir, la intensidad de emisión de la muestra de referencia  $I_{ref}$  es  $I_{ref} = kI_{0ref}\Phi_{f_{ref}}(1 - 10^{-A_{ref}})$ , donde se especifica que se trata de la referencia con el subíndice  $ref$ .

En los experimentos realizados en este trabajo, se midió la intensidad de fluorescencia de la muestra de interés y de la referencia bajo las mismas condiciones y se utilizó la misma intensidad de excitación<sup>1</sup>, es decir,  $I_{0m} = I_{0ref}$ . Bajo estas circunstancias, resolviendo el sistema de ecuaciones para  $\Phi_{f_m}$  se tiene que:

$$\Phi_{f_m} = \Phi_{f_{ref}} \frac{I_m}{I_{ref}} \frac{(1 - 10^{-A_{ref}})}{(1 - 10^{-A_m})} \quad (2.8)$$

$\Phi_{f_{ref}}$  es el valor conocido de la eficiencia cuántica de fluorescencia para la referencia. En este experimento  $I_m$  e  $I_{ref}$  son parámetros referentes a la detección del nivel de intensidad de emisión de la muestra y de la referencia, cuyos valores (al ser detectados con un PMT) están dados en volts; los valores de absorbancia para la muestra y la referencia a la misma longitud de onda que el haz de excitación se conocen con los espectros de absorción, los cuales se adquieren en celdas de cuarzo con la misma longitud de camino óptico y la misma concentración molar que se utilizaron en este método.

### 2.2.2 Procesos no lineales: Absorción de dos fotones

La óptica no lineal estudia los fenómenos que ocurren como consecuencia de la modificación de las propiedades ópticas de un material por la presencia

---

<sup>1</sup>No es una condición necesaria cuando el sistema de detección responde de manera lineal para distintos valores de intensidades incidentes de interés

de luz, típicamente luz láser. Los fenómenos ópticos son no lineales, porque ocurren cuando la respuesta de un material al campo óptico aplicado depende de una manera no lineal de la amplitud de dicho campo óptico [13].

Para comprender lo anterior es importante analizar la dependencia que tiene la polarización de un material con la amplitud del campo eléctrico aplicado. En la óptica convencional o lineal, la polarización inducida depende linealmente de la amplitud del campo eléctrico; sin embargo, en óptica no lineal la respuesta se generaliza expresando la polarización inducida  $P(t)$  como sigue:

$$P(t) = \epsilon_0[\chi^{(1)}E(t) + \chi^{(2)}E^2(t) + \chi^{(3)}E^3(t) + \dots] \quad (2.9)$$

donde  $\epsilon_0$  es la permitividad en el vacío y  $\chi^{(1)}$ ,  $\chi^{(2)}$  y  $\chi^{(3)}$  representan la susceptibilidad eléctrica de primero, segundo y tercer orden respectivamente. Por simplicidad, en la ecuación anterior únicamente se toma en cuenta el carácter escalar tanto de la polarización como del campo eléctrico y se asume una polarización instantánea y por lo tanto una susceptibilidad eléctrica constante (no hay pérdidas ni dispersión).

La polarización juega un papel importante en la descripción de fenómenos no lineales porque cuando varía en el tiempo, puede actuar como fuente de nuevos componentes del campo electromagnético.

La absorción de dos fotones es una consecuencia de la polarización no lineal de tercer orden, dicha polarización se puede identificar de la ecuación 2.9 como  $P^{(3)}(t) = \epsilon_0\chi^{(3)}E^3(t)$ . Si se considera un campo eléctrico monocromático de la forma  $E(t) = \xi \cos(wt)$ , incidiendo en un material tal que  $\chi^{(3)} \neq 0$ <sup>2</sup>, la polarización no lineal de tercer orden se expresa como:

$$P^{(3)}(t) = \frac{1}{4}\epsilon_0\chi^{(3)}\xi^3 \cos(3wt) + \frac{3}{4}\epsilon_0\chi^{(3)}\xi^3 \cos(wt) \quad (2.10)$$

donde se utilizó la identidad trigonométrica  $\cos^3(w) = \frac{1}{4}\cos(3wt) + \frac{3}{4}\cos(wt)$ . El primer término de la ecuación 2.10 describe una respuesta de frecuencia  $3w$  creada por un campo incidente de frecuencia  $w$ , este proceso se conoce como generación de tercer armónico o THG por sus siglas en inglés.

---

<sup>2</sup>La susceptibilidad eléctrica de tercer orden es diferente de cero sin importar el material, puede ser un medio centrosimétrico o no centrosimétrico.

El segundo término de la ecuación 2.10 describe la contribución no lineal de la polarización a la misma frecuencia que el campo incidente; este término, como se explica más adelante, es la contribución no lineal al índice de refracción que experimenta una onda de frecuencia  $w$ . En la figura 2.7 se muestra un medio no lineal en el que incide un campo de frecuencia  $w$ , la polarización no lineal de tercer orden creada en este medio tiene contribuciones de frecuencias  $w$  y  $3w$ .

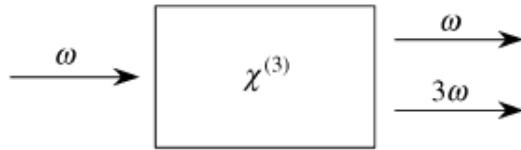


Figura 2.7: Geometría del efecto de la polarización no lineal de tercer orden

De manera general, el estudio de la polarización no lineal de tercer orden se desarrolla considerando un campo eléctrico incidente compuesto por tres frecuencias no necesariamente iguales, por lo que habrá diversas contribuciones a la polarización no lineal correspondientes a las frecuencias resultantes de la combinación de las frecuencias incidentes (Generación de terceros armónicos, diferencia y suma de frecuencias y las mismas frecuencias incidentes).

Para visualizar lo anterior, considérese un campo eléctrico polarizado en la dirección  $i$  incidiendo en un material no lineal; si se toma en cuenta que la polarización no es instantánea, la polzarización no lineal de tercer orden en el dominio de la frecuencia se escribe como:

$$P_i^{(3)}(\vec{r}, w_4) = \Delta \epsilon_0 \chi_{ijkl}^{(3)}(-w_4; w_1, w_2, w_3) E_j(\vec{r}, w_1) E_k(\vec{r}, w_2) E_l(\vec{r}, w_3) \quad (2.11)$$

donde  $\chi_{ijkl}^{(3)}$  es el tensor de susceptibilidad de tercer orden<sup>3</sup> y se cumple la relación  $w_4 = w_1 + w_2 + w_3$ . El símbolo  $\Delta$  toma los valores de 1 cuando  $w_1 = w_2 = w_3$ ,  $\Delta = 3$  cuando dos de las frecuencias son iguales y  $\Delta = 6$  si todas las frecuencias son diferentes.

---

<sup>3</sup>Nótese que el tensor de susceptibilidad eléctrica de tercer orden es un tensor de cuarto grado (En tres dimensiones tiene 81 componentes)

Si se considera un campo incidente de frecuencia  $w$  y se analiza la contribución a la polarización no lineal de tercer orden correspondiente a la misma frecuencia incidente  $w$ , la ecuación 2.11 se expresa de la siguiente manera:

$$P_i^{(3)}(\vec{r}, w) = 3\epsilon_0 \chi_{ijkl}^{(3)}(-w; w, w, -w) E_j(\vec{r}, w) E_k(\vec{r}, w) E_l^*(\vec{r}, w) \quad (2.12)$$

donde  $E_l^*(\vec{r}, w) = E_l(\vec{r}, -w)$ . Si el material es isotrópico, es decir, sus propiedades son las mismas en todas direcciones y asumimos que  $i = j = k$ , entonces debe observarse que  $i = j = k = l$  y la expresión anterior se escribe como  $P^{(3)}(\vec{r}, w) = 3\epsilon_0 \chi^{(3)}(-w; w, w, -w) |E(\vec{r}, w)|^2 E(\vec{r}, w)$ . Así la polarización total  $P_T(\vec{r}, w)$  para este caso en el que hay un campo incidente de frecuencia  $w$  se escribe como:

$$P_T(\vec{r}, w) = \epsilon_0 [\chi^{(1)} + 3\chi^{(3)} |E(\vec{r}, w)|^2] E(\vec{r}, w) \quad (2.13)$$

La polarización de segundo orden es cero porque  $\chi^{(2)} \neq 0$  únicamente en medios no centrosimétricos.

Por otro lado, la ecuación de onda en el dominio de la frecuencia  $\Omega$  se expresa como  $\nabla^2 \vec{E}(\vec{r}, \Omega) + \frac{\Omega^2}{c^2} \vec{E}(\vec{r}, \Omega) = -\mu_0 \Omega^2 \vec{P}(\vec{r}, \Omega)$ , donde  $\mu_0 = \frac{1}{c^2 \epsilon_0}$  es la constante magnética en el vacío.

Si en la polarización total de la ecuación 2.13 se considera un campo eléctrico polarizado en dirección  $i$ , cuya dirección de propagación está en la dirección  $z$  ( $\vec{r} = z\hat{k}$ ), entonces la ecuación de onda en el dominio de la frecuencia se escribe como:

$$\frac{\partial^2}{\partial z^2} E_i(z, w) + \left[ \frac{w}{c} \right]^2 E_i(z, w) = -\frac{w^2}{c^2} [\chi_{ii}^{(1)} E_i(z, w) + \chi_{iiii}^{(3)} |E(z, w)|^2 E_i(z, w)] \quad (2.14)$$

Proponiendo la solución  $E_i(z, w) = \xi(z) e^{ikz}$  y utilizando la Aproximación de Envolvente de Variación Lenta<sup>4</sup> (SVEA) se tiene que:

---

<sup>4</sup>En esta aproximación la amplitud  $\xi(z)$  varía muy lentamente por lo que  $\frac{d\xi_i(z)}{dz} \gg \frac{d^2\xi_i(z)}{dz^2}$

$$\frac{d\xi(z)}{\xi(z)} = \frac{3i}{2k} \left[ \frac{w}{c} \right]^2 \chi_{iiii}^{(3)} |\xi(z)|^2 dz \quad (2.15)$$

en donde  $(1 + \chi_{ii}^{(1)})(w^2/c^2) = k^2$ .

Si se asume que  $\chi_{iiii}^{(3)}$  es real y se integra la ecuación 2.15 se obtiene como solución  $E(z, w) = \xi_0 e^{i\{\frac{w}{c}n + \frac{3}{2}\frac{w}{c}\frac{1}{n}\chi_{iiii}^{(3)}|\xi_0|^2\}z}$  donde se utilizó que  $k = \frac{w}{c}n$ . En analogía con el régimen lineal se puede apreciar que el índice de refracción total  $n_T$ , ahora tiene la contribución no lineal  $\frac{3}{2}\frac{1}{n}\chi_{iiii}^{(3)}|\xi_0|^2$ ; por lo que en términos de intensidad se tiene que el índice de refracción total  $n_T$  es:

$$n_T = n + n_2 I \quad (2.16)$$

donde  $n_2 = \frac{3\chi_{iiii}^{(3)}}{\epsilon_0 n^2 c}$  es el índice de refracción no lineal de intensidad conocido como coeficiente Kerr y la intensidad es  $I = \frac{1}{2}n\epsilon_0 c|\xi(z)|^2$ .

Sin embargo, el tensor de susceptibilidad eléctrica de tercer orden tiene también una parte imaginaria. Para conocer el efecto de absorción se asume ahora que  $\chi_{real}^{(3)} = 0$ , por lo que sustituyendo  $\chi^{(3)} = i\chi_{im}^{(3)}$  en la ecuación 2.15 se obtiene  $\frac{d|\xi(z)|^2}{dz} = -\beta_E |\xi(z)|^4$ , donde se ha definido  $\beta_E = \frac{3w\chi_{im}^{(3)}}{cn}$  como el coeficiente de absorción no lineal referente al capo eléctrico. Y en términos de la intensidad:

$$\frac{dI}{dz} = -\beta I^2 \quad (2.17)$$

donde  $\beta = \frac{6w\chi_{im}^{(3)}}{c^2 n_f^2 \epsilon_0}$  es el coeficiente de absorción no lineal referente a la intensidad. Así, tanto el coeficiente de refracción  $n_2$  como el coeficiente de absorción  $\beta$  no lineales dependen de la intensidad.

Tomando en cuenta la absorción lineal mediante la Ley de Lambert- Beer la ecuación 2.17 se escribe como:

$$\frac{dI}{dz} = -\alpha I - \beta I^2 = -\alpha_T I \quad (2.18)$$

donde  $\alpha$  es el coeficiente de absorción lineal y  $\alpha_T(I) = \alpha + \beta I$  es el coeficiente de absorción efectivo del material. La solución de esta ecuación diferencial es:  $I(z) = \frac{\alpha e^{-\alpha z}}{1 - \beta e^{-\alpha z}}$ , lo cual da lugar a dos tipos de absorción dependiendo del signo de  $\beta$ .

Si  $\beta < 0$  el coeficiente de absorción efectivo disminuye cuando la intensidad crece, esto se conoce como absorción saturable. Esta absorción vuelve a los materiales transparentes a medida que la intensidad del campo eléctrico incidente aumenta.

Sin embargo, cuando  $\beta > 0$  el coeficiente de absorción efectivo aumenta con la intensidad como se muestra en la figura 2.8. Este proceso se conoce como absorción de dos fotones; fue descrito por primera vez, de forma teórica por Maria Goppert- Mayer en 1931 [14] y observado experimentalmente por Kaiser y Garret en 1961 [13].

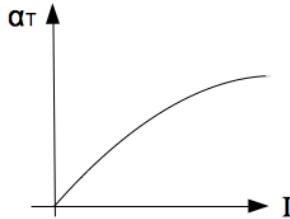


Figura 2.8: Absorción de dos fotones

En este proceso, un átomo hace una transición del estado base a un estado excitado mediante la absorción *simultánea* de dos fotones como se muestra en la figura 2.5. Se dice que este proceso es simultáneo porque dos fotones deben interactuar en un estado virtual en un tiempo  $\tau$  de  $10^{-15}$  o  $10^{-16}s$  para que se dé la absorción y el átomo sea promovido al estado excitado [15]. La probabilidad de absorción de dos fotones es proporcional al cuadrado de la intensidad de excitación.

El efecto de absorción de dos fotones se puede cuantificar introduciendo un parámetro conocido como sección transversal de absorción de dos fotones  $\sigma^{TPA}$ , el cual determina la magnitud del mismo proceso de absorción.

De la misma manera que la sección transversal de absorción lineal está relacionada con el coeficiente de absorción lineal, la relación entre  $\beta$  y  $\sigma^{TPA}$  es:

$$\beta = N_g \frac{\sigma^{TPA}}{\hbar w} \quad (2.19)$$

donde  $N_g$  es el número de moléculas por volumen en el estado base. Así la ecuación 2.17 se puede escribir de la siguiente manera:

$$\frac{dI}{dz} = -N_g \sigma^{*TPA} I^2 = -N_g \frac{\sigma^{TPA}}{\hbar w} I^2 \quad (2.20)$$

donde  $\sigma^{*TPA}$  es un coeficiente relacionado con la absorción de dos fotones [16]. Las unidades de la sección transversal de absorción de dos fotones  $\sigma^{TPA}$  son los Göppert- Mayer o [GM] ( $1\text{GM}=10^{-50}\text{cm}^4\text{s}(\text{fotón})^{-1}(\text{molécula})^{-1}$ ) mientras que las unidades de  $\sigma^{*TPA}$  son [ $(\text{longitud})^4(\text{molécula})^{-1}(\text{potencia})^{-1}$ ].

En términos del flujo de fotones  $f$  teniendo en cuenta que  $f = I/\hbar w$  la ecuación anterior se expresa como:  $\frac{df}{dz} = -N_g \sigma^{TPA} f^2$ . Sin embargo, el término  $df/dz$  representa la velocidad de atenuación por la absorción de dos fotones a lo largo de la dirección de propagación; esto significa que el número de fotones absorbidos  $N(t)$  por unidad de tiempo y volumen es:

$$N(t) = -\frac{df}{dz} = N_g \frac{\sigma^{TPA}}{(\hbar w)^2} I^2 = \frac{\beta I^2}{\hbar w} \quad (2.21)$$

Hay diversas técnicas experimentales para determinar  $\sigma^{TPA}$  o bien  $\beta$ , pueden ser técnicas directas, indirectas y de mezcla de ondas.

Los métodos directos se basan en medir la atenuación de un haz láser al atravesar el medio absorbedor; en los métodos indirectos se mide uno de los efectos inducidos por la absorción de dos fotones y en el mezclado de ondas se utiliza más de un haz, comúnmente incidiendo en direcciones diferentes en el medio.

### 2.2.3 Medición de $\sigma^{TPA}$ mediante la técnica de TPEF

Un material que presenta una absorción de dos fotones pasa del estado base al estado electrónico excitado. Después de un relajamiento inicial no

radiativo, la energía de excitación restante se libera mediante uno o más procesos físicos; los métodos indirectos que determinan  $\sigma^{TPA}$  monitorean uno de los posibles procesos de de-excitación que llevan al átomo al estado base.

La técnica indirecta más común, utilizada en este trabajo, se denomina técnica de emisión inducida por absorción de dos fotones (TPEF por sus siglas en inglés). En esta técnica se utiliza un haz láser de gran intensidad, generalmente pulsado y enfocado para concentrar la energía en la muestra, y se mide la señal de fluorescencia generada por la absorción de dos fotones; de esta señal de fluorescencia se puede determinar la sección transversal de excitación de dos fotones  $\sigma^{TPE}$ , la cual es linealmente proporcional a la sección transversal de absorción de dos fotones  $\sigma^{TPA}$  [17], o bien:

$$\sigma^{TPE} = \Phi_f \sigma^{TPA} \quad (2.22)$$

Como se vio en la sección anterior el número de fotones absorbidos  $N(t)$  por molécula, por unidad de tiempo es proporcional a la sección transversal de absorción de dos fotones y del cuadrado de la intensidad incidente. Sin embargo en un experimento particular, el número total de fotones absorbidos  $N_{abs}(t)$  está en función también de la concentración  $c$  de la muestra y del volumen  $V$  iluminado en la misma [18]:

$$N_{abs}(t) = \int_V \sigma^{TPA} c I^2(\vec{r}, t) dV \quad (2.23)$$

Además se suele separar la dependencia temporal y espacial de la intensidad de excitación, es decir,  $I^2(\vec{r}, t) = S(\vec{r})I_0(t)$ . Por lo que lo anterior se escribe como:

$$N_{abs}(t) = \sigma^{TPA} c I_0^2(t) \int_V S^2(\vec{r}) dV \quad (2.24)$$

Por otra parte, el número total de fotones absorbidos por unidad de tiempo  $N_{abs}(t)$  en un proceso de absorción de dos fotones, está relacionado con el número de fotones de fluorescencia  $F(t)$  detectados en el experimento de la siguiente manera:  $F(t) = \frac{1}{2}\eta\Phi_f N_{abs}(t)$ , donde  $\eta$  es la eficiencia de colección

de fluorescencia del sistema experimental. Nótese que el factor de 1/2 refleja el hecho de que dos fotones son necesarios en cada evento de excitación.

Sin embargo, en la práctica solo el promedio temporal del flujo de fotones emitidos  $\langle F(t) \rangle$  es medido, es decir:

$$\langle F(t) \rangle = \frac{1}{2} \eta \Phi_f c \sigma^{TPA} \langle I_0^2(t) \rangle \int_V dV S^2(\vec{r}) \quad (2.25)$$

donde se utilizó el valor de  $N_{abs}(t)$  de la ecuación 2.24. Como la mayoría de los detectores entregan solo la señal proporcional a  $\langle I_0(t) \rangle$  se introduce el parámetro  $g = \langle I_0^2(t) \rangle / \langle I_0(t) \rangle^2$  o grado de coherencia temporal de segundo orden<sup>5</sup>, de tal manera que la ecuación anterior se escribe como.

$$\langle F(t) \rangle = \frac{1}{2} g \eta \Phi_f c \sigma^{TPA} \langle I_0(t) \rangle^2 \int_V dV S^2(\vec{r}) \quad (2.26)$$

De lo anterior es posible notar que la determinación experimental de  $\sigma^{TPA}$  implica la caracterización de cuatro parámetros: la distribución espacial de la luz incidente, el grado de coherencia temporal de segundo orden  $g$ , la eficiencia de colección de luz  $\eta$  y la eficiencia cuántica de fluorescencia de la muestra  $\Phi_f$  [18].

La dependencia espacial de la ecuación 2.26 se resuelve considerando una distribución de intensidad en el volumen focal limitado por la difracción de una apertura, en este caso una lente; definiendo las intensidades de los pulsos como intensidades instantáneas promediadas con respecto a la duración del pulso y utilizando métodos numéricos para encontrar la solución de la integral. Para la dependencia temporal se considera un láser pulsado como haz de excitación siendo  $I_0(t)$  una función periódica en el tiempo; se considera una excitación pulsada porque en este trabajo se determinó experimentalmente  $\sigma^{TPA}$  utilizando un láser de femtosegundos.

Por la naturaleza periódica del tren de pulsos es necesario calcular  $g$  solo para un ciclo, para eso se introduce la cantidad adimensional  $g_p$  que cumple la relación  $g = g_p / (f\tau)$ ; donde  $f$  es la frecuencia de repetición del haz y  $\tau$  es el ancho temporal a media altura del pulso o FWHM por sus siglas en inglés

---

<sup>5</sup>El grado de coherencia temporal de segundo orden se refiere a las fluctuaciones temporales del flujo de fotones incidentes

[18]. Asumiendo entonces una fuente de excitación pulsada, el promedio temporal de la fluorescencia detectada se puede escribir como:

$$\langle F(t) \rangle \approx \frac{1}{2} \eta \Phi_f c \sigma^{TPA} \frac{g_p}{f\tau} \frac{8n \langle P(t) \rangle^2}{\pi \lambda} \quad (2.27)$$

donde  $n$  es el índice de refracción,  $\langle P(t) \rangle$  es el promedio temporal de la potencia incidente y  $\lambda$  es la longitud de onda del haz de excitación.

La fluorescencia depende fuertemente de la coherencia temporal del pulso de excitación, por lo que la determinación precisa de  $\sigma^{TPA}$  requiere el conocimiento de  $g$  en la región focal, lo cual no es trivial [19]. Sin embargo en el método descrito por Albota, Xu y Webb [17], utilizado en este trabajo, las complicaciones de medir  $g$  dentro de la muestra se evitaron utilizando una muestra de referencia con valor conocido de sección transversal de absorción de dos fotones. Por lo que la razón entre la señal de fluorescencia de la muestra de referencia  $\langle F(t) \rangle_{ref}$  y la muestra de interés  $\langle F(t) \rangle$  determinará  $\sigma^{TPA}$  para la nueva muestra:

$$\frac{\langle F(t) \rangle_{ref}}{\langle F(t) \rangle} = \frac{\eta_{ref} \Phi_{f_{ref}} c_{ref} \sigma_{ref}^{TPA} \langle P(t) \rangle_{ref}^2 n_{ref}}{\eta \Phi_f c \sigma^{TPA} \langle P(t) \rangle^2 n} \quad (2.28)$$

donde los subíndices  $ref$  indican los parámetros de la muestra de referencia mientras que los parámetros sin subíndice pertenecen a la muestra de interés. Despejando  $\sigma^{TPA}$  de la igualdad anterior se obtiene finalmente:

$$\sigma^{TPA} = \frac{\eta_{ref} \Phi_{f_{ref}} c_{ref} \sigma_{ref}^{TPA} \langle P(t) \rangle_{ref}^2 n_{ref} \langle F(t) \rangle}{\eta \Phi_f c \langle P(t) \rangle^2 n \langle F(t) \rangle_{ref}} \quad (2.29)$$

#### 2.2.4 Transferencia de Energía de Resonancia Förster (FRET)

En esta modalidad, la energía es transferida mediante un proceso no radiativo entre una molécula donadora y una molécula aceptora en resonancia. La molécula donadora es excitada por un haz de luz y la energía de excitación es transferida a la molécula aceptora; simultáneamente la molécula donadora vuelve a su estado base. El mecanismo de esta transferencia de energía

## 2.2. Propiedades ópticas de marcadores en microscopia de fluorescencia 29

de resonancia involucra interacciones débiles de tipo diolo-dipolo, las cuales se dan cuando la distancia entre la molécula donadora y aceptora es mucho mayor que sus dimensiones.

Para dos moléculas poliatómicas en solución, una molécula donadora y otra aceptora, el espectro de absorción de la molécula aceptora debe traslaparse con el espectro de emisión de la molécula donadora (Ver Figura 2.9).

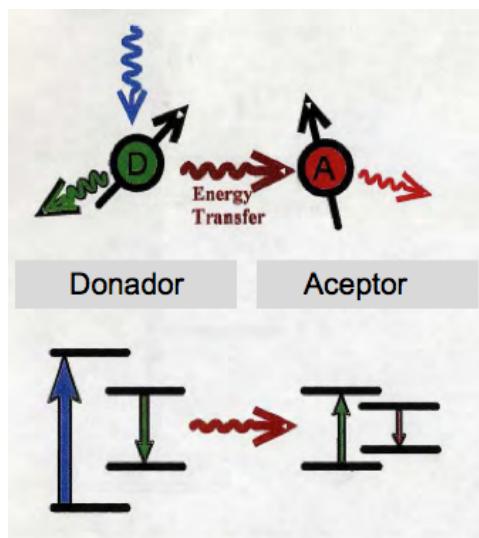


Figura 2.9: Esquema de la Transferencia de Energía de Resonancia Förster

Los antecedentes de la técnica FRET comenzaron en 1922 con el trabajo experimental de Cario sobre lo que denominó *fluorescencia sensibilizada*. Cario introdujo vapor de mercurio y talio en un tubo de cuarzo, lo iluminó utilizando una lámpara de mercurio a  $253.5\text{ nm}$  y lo observó fue la emisión de los átomos de talio; en ausencia del mercurio, los átomos de talio no fueron excitados a dicha longitud de onda.

Las primeras observaciones de fluorescencia sensibilizada en solución fueron realizadas por Jean Perrin y C. R. Choucroun en 1929. J. Perrin explicó la transferencia de energía por resonancia utilizando física clásica y realizó experimentos para analizar la polarización de luz emitida por moléculas en solución en función de la concentración.

En 1929 Kallmann y London presentaron una teoría para explicar la transferencia de energía de resonancia desde el punto de vista de la mecánica cuántica. Esta teoría consideró una interacción de tipo dipolo-dipolo e in-

trodujo el parámetro  $R_0$  para referirse a la distancia entre el sistema donador y acceptor en la cual, la transferencia de energía y el decaimiento radiativo del sistema donador en estado excitado son igualmente probables. Kallmann y London calcularon que la probabilidad  $P$  de que se presente una transferencia de energía es  $P \propto \frac{1}{1+(\frac{R}{R_0})^6}$ , donde  $R$  es la distancia de separación que hay entre los dos sistemas en que se da la transferencia de energía. En 1932–1933 Francis Perrin expandió la teoría de Kallmann y London considerando las interacciones vibracionales de las moléculas en solución, y fue en los años 40's cuando Förster publicó una nueva versión de la teoría de transferencia de energía de resonancia con consideraciones semicásicas y posteriormente con un tratamiento cuántico.

Förster concluyó, a diferencia de F. y J. Perrin, que no es posible asumir resonancia exacta entre dos átomos o moléculas idénticas, ya que esto resultaría en valores muy grandes de  $R_0$  comparados con las mediciones experimentales; y realizó correcciones utilizando la *integral de traslape*, la cual se define como la superposición del espectro de emisión de la molécula donadora con el espectro de absorción de la molécula aceptora (Ver Figura 2.10). Con lo anterior se volvió a definir la constante  $R_0$  como la distancia Förster, siendo la separación molecular crítica por debajo de la cual, hay transferencia de energía durante el tiempo de vida del estado excitado.

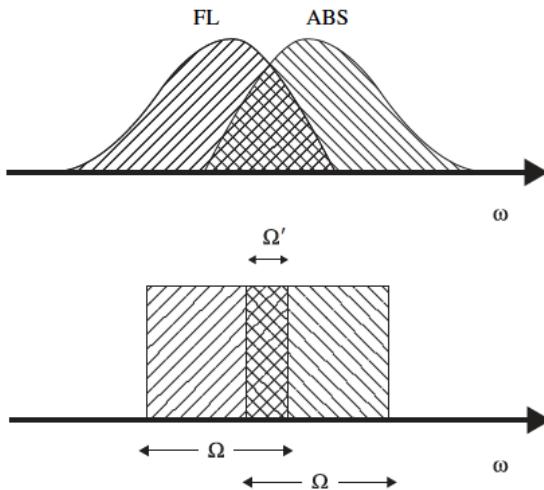


Figura 2.10: Espectros de emisión y absorción de intensidad vs frecuencia,  $\Omega'$  representa el ancho de la superposición

## *2.2. Propiedades ópticas de marcadores en microscopia de fluorescencia 31*

La eficiencia de transferencia de energía de resonanacia Förster  $E$  se define como la fracción de fotones que son absorbidos por la molécula donadora y son transferidos a la molécula aceptora, o bien:

$$E = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6} \quad (2.30)$$

Förster asumió que el proceso de transferencia de energía no radiativa es mucho más lento que la relajación vibracional entre los modos vibracionales del estado excitado debido a interacciones con el disolvente y determinó que la razón de la transferencia de energía de resonancia  $k_{D-A}$  puede expresarse como  $k_{D-A} = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R}\right)^6$ , donde  $\tau_D$  es el tiempo de vida medio de la molécula donadora en el estado excitado.

La consideración de un acoplamiento débil entre dos osciladores: la molécula donadora y aceptora; o bien, de una interacción débil de tipo dipolo-dipolo en la transferencia de energía de resonancia Förster, es lo que induce una transferencia de energía no radiativa e implica que las propiedades espectrales de la molécula donadora o aceptora no se vean afectadas [14].

La técnica FRET se ha vuelto muy popular en estudios de biología y química, principalmente aplicada a microscopía óptica utilizando fluoróforos, ya que permite estudiar interacciones moleculares e interacciones entre pares de proteínas en células vivas determinando las distancias que hay entre los sistemas donador y aceptor. En la mayoría de aplicaciones la transferencia de energía de resonancia Förster se manifiesta en la disminución tanto del tiempo de vida como de la intensidad de fluorescencia del sistema donador acompañada de un incremento en la emisión de fluorescencia del sistema aceptor.

## CAPÍTULO 3

# DESARROLLO EXPERIMENTAL

### Contenido

---

<b>3.1</b>	<b>Metodología: Descripción de caracterización óptica</b>	<b>32</b>
<b>3.2</b>	<b>Materiales y reactivos</b>	<b>33</b>
<b>3.3</b>	<b>Fabricación de nanopartículas por el método de reprecipitación</b>	<b>37</b>
3.3.1	Recubrimiento de nanopartículas con PEG	38
<b>3.4</b>	<b>Espectros de absorción y emisión lineal</b>	<b>39</b>
<b>3.5</b>	<b>Medición de eficiencia cuántica de fluorescencia</b>	<b>40</b>
<b>3.6</b>	<b>Medición de <math>\sigma^{TPA}</math> de 740 a 840 nm</b>	<b>42</b>
<b>3.7</b>	<b>Medición de <math>\sigma^{TPA}</math> de 650 a 760 nm</b>	<b>44</b>
<b>3.8</b>	<b>Fotoestabilidad de las nanopartículas</b>	<b>45</b>
<b>3.9</b>	<b>Internalización de nanopartículas en líneas celulares epiteliales (L929)</b>	<b>46</b>

---

### 3.1 Metodología: Descripción de caracterización óptica

**Fabricación de nanopartículas.** Un conjunto de materiales orgánicos, que de acuerdo a su diseño, podrían presentar propiedades ópticas de interés para desarrollar marcadores biocompatibles, se utilizaron para fabricar suspensiones acuosas de nanopartículas mediante el método de reprecipitación. Se utilizaron principalmente semiconductores orgánicos y moléculas de tamaños variables.

**Caracterización lineal.** Esta caracterización óptica de los materiales se realizó en soluciones y en suspensiones acuosas de nanopartículas; se

adquirieron espectros de absorción con un espectrofotómetro y espectros de emisión lineal utilizando como excitación un diodo láser de  $370\text{nm}$ . Se midió la eficiencia cuántica de fluorescencia utilizando el método de la esfera integradora.

**Caracterización no lineal.** Se determinó la sección transversal de absorción de dos fotones  $\sigma^{TPA}$  para soluciones y suspensiones de nanopartículas del material precursor, utilizando la técnica de emisión inducida por absorción de dos fotones: se adquirieron espectros de emisión no lineal utilizando láseres de pulsos de femtosegundos en el rango espectral de interés biomédico ( $730\text{-}840\text{nm}$  y/o  $600\text{-}900\text{nm}$ ).

**Funcionalización.** Las nanopartículas que presentaron los valores más grandes de eficiencia cuántica de fluorescencia y de sección transversal de absorción de dos fotones se funcionalizaron utilizando polietilenglicol PEG. Este PEG (con múltiples grupos funcionales) se utilizó como agente surfactante y estabilizador y para recubrir y modificar la superficie de las nanopartículas de los materiales precursores.

**Fotoestabilidad.** Se estudió la fotoestabilidad degradando las nanopartículas funcionalizadas en celdas de cuarzo de  $1\text{mm}$  con una lámpara de xenón de  $150\text{W}$  y monitoreando los espectros de absorción a diferentes tiempos.

**Tinción de células con nanoparticulas.** Las suspensiones acuosas de nanopartículas funcionalizadas con PEG se internalizaron en líneas celulares epiteliales y se obtuvieron imágenes de su distribución en la célula con un microscopio de epifluorescencia.

## 3.2 Materiales y reactivos

Se estudió un grupo de 15 moléculas fluorescentes sintetizados por la M.C. Mariana Flores y el Dr. Alejandro Alvarez Hernández del Centro de Investigaciones en Química, de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; éstas se basan en una molécula poliinsaturada con un grupo funcional amida y dos sustituyentes  $R$ . La estructura molecular y los 15 diferentes sustituyentes se muestran en la figura 3.1.

Se trabajó también con un copolímero de dos bloques conocido como PF2/6-b-P3TMAHT, compuesto por el politiofeno poli(9,9-dialquilfluoreno)-b-pol[3-(6-amoniohexil)tiofeno] (P3TMAHT) y el homopolifluoreno 2-(etil)hexil (PF2/6).

Este copolímero, mostrado en la figura 3.2, fue proporcionado por el Dr. Ullrich Scherf de Bergische Universität Wuppertal, Macromolecular Chemistry Group and Institute for Polymer Technology.

#	R
01	H
02	Me
03	CN
04	COMe
05	NO <sub>2</sub>
06	OMe
07	NME <sub>2</sub>
08	3-Piridil
09	3-Tiofenil
10	OMe/ CN
11	OMe/ COMe
12	OMe/ NO <sub>2</sub>
13	NME <sub>2</sub> / CN
14	NME <sub>2</sub> / COMe
15	NME <sub>2</sub> / NO <sub>2</sub>

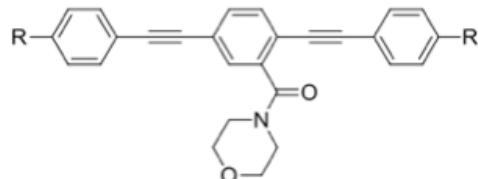


Figura 3.1: 15 sustituyentes *R* en la estructura principal de la molécula

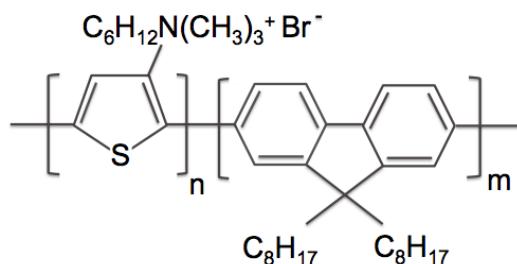


Figura 3.2: Copolímero de dos bloques

Por otra parte se estudiaron tres sistemas  $\pi$  conjugados con diferente distribución de carga: etinilfluoreno-nitrilo (sistema dipolar) al que se hará referencia como 1NDS, etinilfluoreno-piridazina (sistema cuadrupolar) ó 2NQS y etinilfluoreno-triazina (sistema octopolar) ó 3NOS; en la figura 3.3 se mue-

tran las estructuras de estos sistemas basados en unidades de fluoreno. Los pesos moleculares  $M_w$  son 515.771g/mol, 905.387g/mol y 1547.312g/mol para la molécula dipolar, cuadrupolar y octopolar respectivamente. Las moléculas fueron diseñadas y sintetizadas por el Dr. Arturo Jiménez y la Dra. Rosa Santillán del Departamento de Química Cinvestav- IPN.

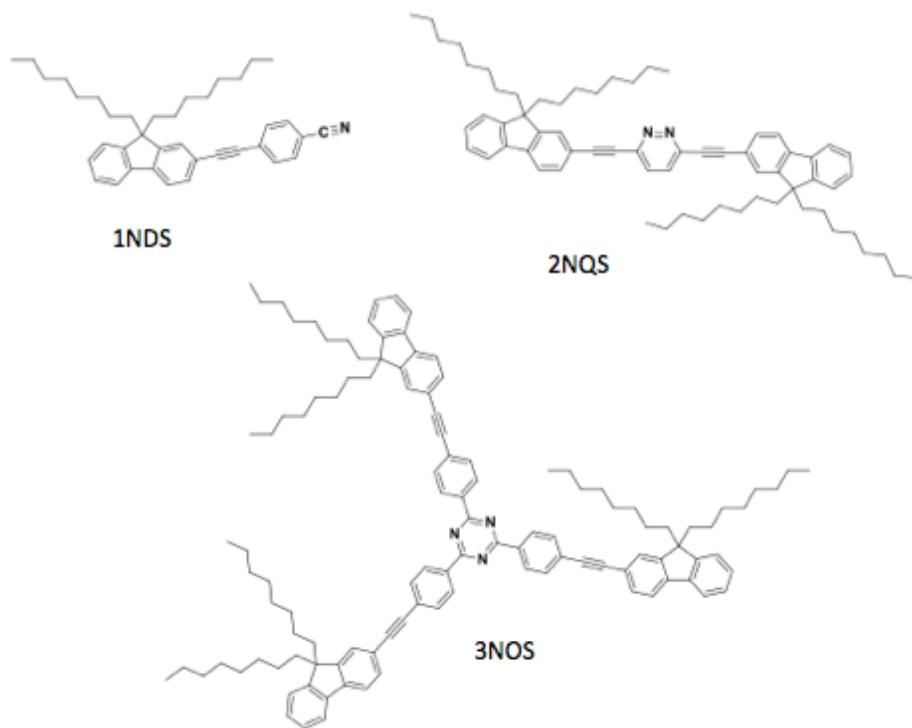


Figura 3.3: Moléculas orgánicas dipolar, cuadrupolar y octopolar

Finalmente se estudio también el polímero derivado de fluoreno PMC300 (Ver Figura 3.4), el cual está basado en el monómero 4,7-bis[2-(9,9-dimetil)fluorenil]benzo[1,2,5]tiadiazol; la síntesis se ha reportado por G. Ramos-Ortíz et al. [20].

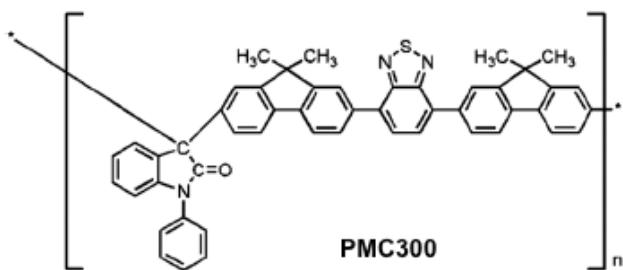


Figura 3.4: Polímero PMC300

En este trabajo se utilizó el colorante comercial Rodamina 6G de Sigma-Aldrich, principalmente como referencia (Ver estructura química en figura 3.5). La Rodamina 6G es una molécula fluorescente cuyas propiedades ópticas lineales y no lineales han sido ampliamente estudiadas, tiene una eficiencia cuántica de fluorescencia de 0.95 y presenta una alta fotoestabilidad, además es un material que puede conseguirse fácilmente a un costo relativamente bajo.

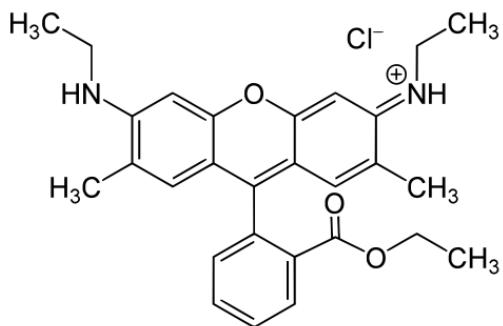


Figura 3.5: Rodamina 6G

Para recubrir las nanopartículas se utilizaron dos tipos de polietilenglicol, PEG 5000 adquirido de Sigma-Aldrich y PEG 2000 de Avanti Polar Lipids Inc., el peso molecular promedio  $M_n$  es de  $5000\text{g/mol}$  y  $2000\text{g/mol}$  respectivamente. Sus estructuras químicas se muestran en la figura 3.6.

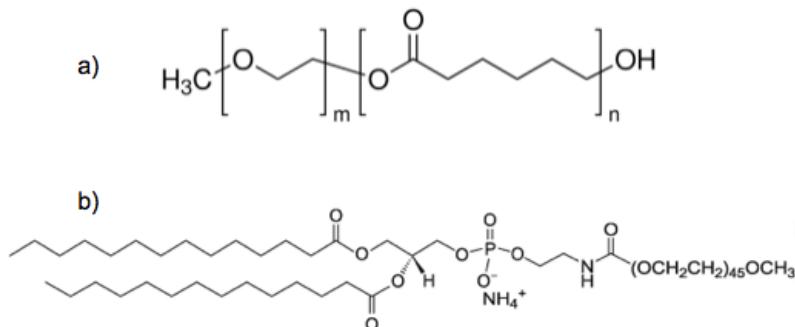


Figura 3.6: Estructuras de a) PEG 5000 y b) PEG 2000

### 3.3 Fabricación de nanopartículas por el método de reprecipitación

El método de reprecipitación se basa en la diferencia de solubilidad que tiene el material precursor en una mezcla compuesta por un buen disolvente y un mal disolvente para dicho precursor, ambos miscibles [21]. La creación de este sistema mediante una mezcla rápida provoca una precipitación local y la nucleación de nanopartículas en lugar de una precipitación en bulto [22].

El proceso de reprecipitación para la fabricación de suspensiones acuosas de nanopartículas de los sistemas orgánicos a estudiar (Ver Figura 3.7), es el siguiente:

- Preparación de una solución madre en THF a una concentración de  $1 \times 10^{-3}$  ó  $1 \times 10^{-4} M$  dependiendo del peso molecular del material precursor.
- Se realizó una solución de un surfactante en agua a una concentración de  $0.8 mM$ . El surfactante más utilizado fue el CTAB aunque también se realizaron pruebas con Tritón- X 100
- Utilizando jeringas de insulina se inyectaron rápidamente  $0.5ml$  de la solución madre en  $8ml$  de la solución acuosa bajo sonicación para causar la nucleación de nanopartículas a una concentración de  $1 \times 10^{-5}$  a  $1 \times 10^{-7} M$  dependiendo del material.
- Como se buscó desarrollar marcadores biocompatibles, se evaporó el disol-

vente tóxico de la suspensión acuosa de nanopartículas<sup>1</sup>. La suspensión se introdujo en un matraz de Kitasato haciendo vacío con una bomba de extracción.



Figura 3.7: Método de reprecipitación

El surfactante actúa como un agente estabilizador en la suspensión acuosa de nanopartículas. El tamaño de éstas se puede controlar modificando la concentración de la solución madre y el disolvente.

### 3.3.1 Recubrimiento de nanopartículas con PEG

Los dos tipos de PEG que se utilizaron en este trabajo son anfifílicos y tienen los grupos funcionales: éter, éster y alcohol en el caso del PEG 5000 y éster, varios grupos éter, fosfato, amonio y amida en el PEG 2000 (Grupos funcionales mencionados de izquierda a derecha en las estructuras de la figura 3.6). Así, al utilizarlos para recubrir las nanopartículas, se modificó la superficie de las mismas y se llevó a cabo una funcionalización.

Para realizar la funcionalización de nanopartículas se utilizó el método de reprecipitación (Ver Figura 3.7), reemplazando al surfactante por PEG. Con el PEG 5000 se preparó una solución acuosa a una concentración de  $4 \times 10^{-6} M$ , debido a que éste se precipitaba en soluciones acuosas a concentraciones

---

<sup>1</sup>De acuerdo con la literatura, éste tipo de método de fabricación de nanopartículas puede desarrollar marcadores o portadores de fármacos biocompatibles al evaporar el disolvente, ya que el surfactante recubre las nanopartículas del material precursor y cambia la solubilidad de éste último, en agua. Ver por ejemplo referencia [7].

mayores o iguales a  $1 \times 10^{-5} M$ . Y nuevamente a 8ml de ésta solución se inyectaron 0.5ml de la solución madre del material precursor de interés, para formar una suspensión acuosa de nanopartículas funcionalizadas con este PEG a concentraciones del orden de  $10^{-6} M$ . Posteriormente el disolvente fue evaporado.

El PEG 2000 presentó más estabilidad, para este caso la solución acuosa pudo prepararse a una concentración de  $6 \times 10^{-4} M$  (Concentración del orden de magnitud más reportado en la literatura). Las suspensiones acuosas de nanopartículas tuvieron concentraciones entre  $10^{-6}$  y  $10^{-7} M$ , inyectando 0.5ml de la solución madre en 8 ml de la solución acuosa y después de evaporar el disolvente.

### 3.4 Espectros de absorción y emisión lineal

Los espectros de absorción de las soluciones y suspensiones acuosas de nanopartículas se obtuvieron con el espectrofotómetro Perkin Elmer modelo Lambda 900 en un rango de 250 a 900 nm. Las soluciones y suspensiones se colocaron en celdas de cuarzo de  $0.1 \times 1 \times 4 cm^3$  ó  $1 \times 1 \times 4 cm^3$  dependiendo de la concentración y la absorbancia de cada muestra.

Los espectros de emisión lineal se obtuvieron con un espectrómetro portátil Ocean Optics USB4000, excitando las muestras con un diodo láser emitiendo a 370nm como se muestra en la figura 3.8. El haz de excitación enfocado con la lente L1 incide en la muestra contenida en la celda, la luz emitida es recolectada con un sistema de lentes perpendicular al haz de excitación; la lente L2 colecta la fluorescencia y la colima; la lente L3 forma la imagen del volumen excitado en la abertura del espectrometro. El espectrometro está sobre una montura XY que permite su alineación para detectar mayor fluorescencia y utilizando el programa Spectra Suite, se pueden visualizar y guardar los espectros de emisión.

Es necesario guardar un espectro de emisión con el diodo láser apagado para detectar la señal de fondo y restarla de los espectros de emisión obtenidos para cada muestra.

El diodo láser se moduló con un generador de funciones: amplitud de 0 Vpp y un Offset de 1V. Para evitar la saturación del espectrometro se utilizaron filtros neutros de densidad óptica variable entre la fuente de excitación y la muestra o bien, se redujo el valor del offset.

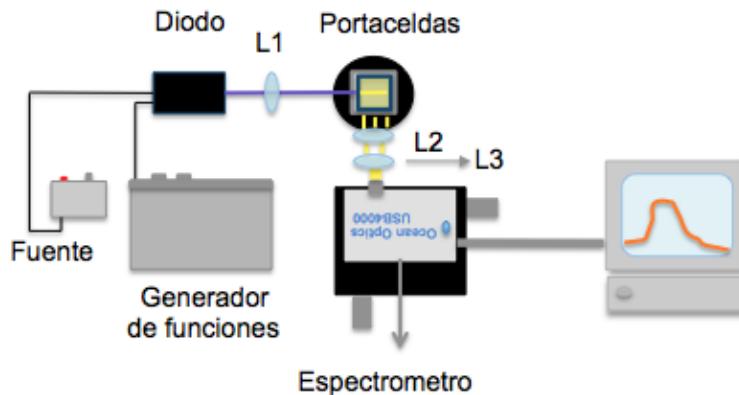


Figura 3.8: Arreglo experimental para medir emisión lineal

### 3.5 Medición de eficiencia cuántica de fluorescencia

La eficiencia cuántica de fluorescencia de los materiales estudiados se midió en soluciones y/o suspensiones de nanopartículas, colocando éstas en una celda de cuarzo de  $0.1 \times 1 \times 4\text{cm}^3$ . En el arreglo experimental se utilizó un diodo láser a  $370\text{nm}$  como fuente de excitación, un diafragma  $D1$ , dos lentes  $L1$  y  $L2$ , una esfera integradora de  $25.4\text{cm}$  de diámetro interno, modelo INS250 de International Light Technologies; un tubo fotomultiplicador o PMT por sus siglas en inglés (serie R7400U de Hamamatsu) colocado a  $90^\circ$  del haz de excitación y un amplificador lock-in modelo SR830 de Stanford Research Systems, como se muestra en la figura 3.9.

El diodo láser de  $370\text{nm}$  se moduló con el generador de funciones utilizando regularmente una señal cuadrada con frecuencia de  $60\text{Hz}$ , amplitud de  $1\text{Vpp}$  y offset de  $0.5\text{V}$ ; ésta señal se utilizó como referencia en el amplificador lock-in. Con el diafragma  $D1$  se realizó un filtrado espacial de la luz, la lente  $L1$  enfocó el haz y la lente  $L2$  se utilizó para colimar la luz. La celda se colocó en bases fijas fuera y dentro de la esfera (Ver Figura 3.9) en las posiciones 1 y 2 respectivamente.

En la esfera, a pesar de los filtros, la luz reflejada internamente proviene del

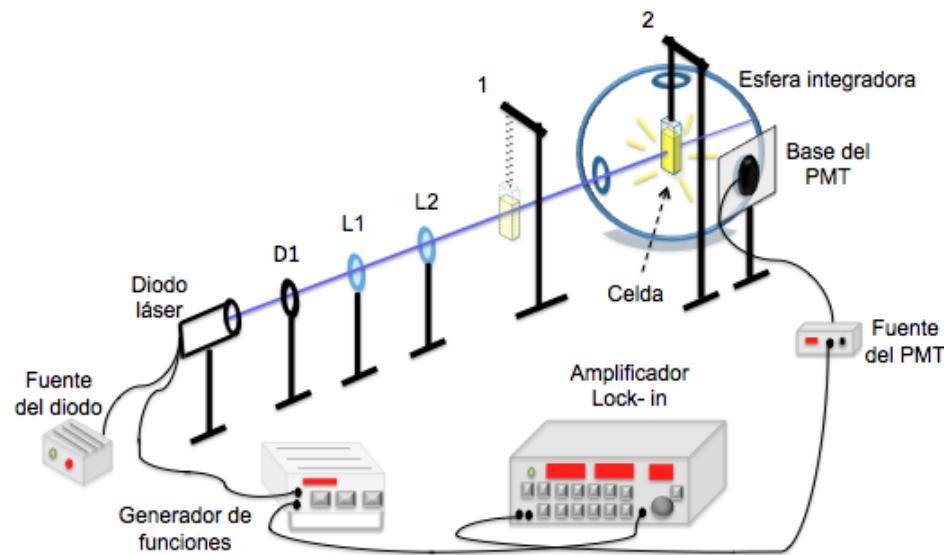


Figura 3.9: Arreglo experimental para obtener la eficiencia cuántica de fluorescencia

haz de excitación residual, fluorescencia de la muestra y ruido; y es detectada por el PMT<sup>2</sup>. Sin embargo, en el amplificador lock- in se utilizó la frecuencia del generador de funciones como referencia para discriminar el ruido y luz proveniente de otras fuentes. Los valores entregados por el lock- in se dieron en volts  $V$ .

Se utilizó Rodamina 6G (Ver Figura 3.5) como colorante de referencia para calcular las eficiencias cuánticas de los compuestos de interés. La celda se colocó en las posiciones 1 y 2 mostradas en la figura 3.9 para detectar solamente la fluorescencia: en la posición 2, la luz de excitación transmitida por la celda, fluorescencia del compuesto y ruido se detectaron; mientras que en la posición 1 solo la luz de excitación transmitida y el ruido. Entonces para cada muestra (incluida la referencia) se restó el valor arrojado por el amplificador en la posición 1 al valor obtenido en la posición 2 y obtener idealmente luz emitida por el compuesto en solución o suspensión.

La superficie de mayor área en la celda se alineó perpendicular a la dirección de propagación de la luz de excitación para evitar que el haz reflejado se quedara en el interior de la esfera integradora.

<sup>2</sup>El PMT se encendió utilizando 200 V en todas las mediciones

Debido a la sensibilidad del PMT, este sólo se encendía hasta que la celda era colocada en las posiciones preestablecidas y después de ser alineadas con el haz de excitación. Para evitar dañar este fotomultiplicador solo se dejaba encendido el instante en el que se registraban los valores arrojados por el amplificador. Se intentaba aislar de cualquier tipo de luz externa el sitio en el que se montó el arreglo experimental mientras el PMT se encontraba encendido. Además la pantalla dentro de la esfera, entre la muestra y el sistema de detección, se utilizó para proteger el PMT de la detección directa de la luz de excitación y/o fluorescencia; también se colocaron filtros UV entre la salida de la esfera y el PMT, para atenuar la luz de excitación.

Las soluciones y suspensiones acuosas de nanopartículas con las que se trabajó, tenían concentraciones bajas de  $1 \times 10^{-5}$  a  $1 \times 10^{-7} M$  para evitar interacciones y procesos, que por la proximidad de las moléculas, pudieran llevar a la disminución de fluorescencia. En las muestras que aun a bajas concentraciones presentaban una gran emisión de luz se utilizaron filtros neutros de densidad óptica variable o se modificaban los parámetros del generador de funciones (para así disminuir el nivel de excitación).

### 3.6 Medición de $\sigma^{TPA}$ de 740 a 840 nm

La sección transversal de absorción de dos fotones de las suspensiones acuosas de nanopartículas y soluciones del material de interés se midieron mediante la técnica de TPEF, adquiriendo los espectros de emisión inducida por absorción de dos fotones. Para ello se utilizó un láser de Titanio: Zafiro con pulsos de  $100 \text{ fs}$  de duración y frecuencia de repetición de  $80 \text{ MHz}$  en un rango de  $725\text{--}860 \text{ nm}$  (modelo *Tsunami-3955* de Spectra-Physics); este láser fue bombeado por un láser de onda continua *Millennia Pro s-Series* a  $532 \text{ nm}$  con una potencia de 5 Watts.

En la figura 3.10 se aprecia el arreglo experimental; a la salida del láser de Ti:Za se colocó un retardador de media longitud de onda y un aislador de Faraday (componente *A*) para controlar la intensidad de excitación, se desvió el haz utilizando cuatro espejos *M1-M4* para no interferir con otros arreglos colocados sobre la mesa óptica de trabajo, el diafragma *D1* se utilizó como referencia para alinear los componentes ópticos, la lente *L1* enfocó el haz en una celda de cuarzo de  $1 \times 1 \times 4 \text{ cm}^3$  con la solución o suspensión de interés y con el sistema de lentes *L2* y *L3*, colocadas de manera perpendicular al haz incidente, se colectó y dirigió la fluorescencia inducida por absorción de dos

fotones a la abertura del espectrómetro portátil Ocean Optics USB4000.

Idealmente la lente  $L_2$  colima la luz mientras que la lente  $L_3$  la enfoca en la abertura del espectrómetro, éste se encontraba sobre una montura XY para detectar la mayor cantidad de fluorescencia, y para visualizar y guardar los espectros de emisión se utilizó el programa Spectra Suite. El haz de excitación se enfocó en un extremo de la celda de cuarzo, muy cercano a una de sus paredes para reducir la distancia entre el volumen excitado y las lentes colectoras de luz, disminuyendo así la atenuación de fluorescencia debida a efectos de absorción.

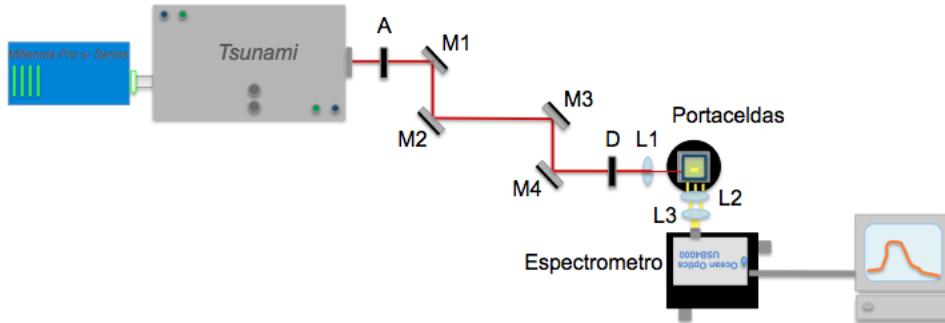


Figura 3.10: Arreglo experimental para medir  $\sigma^{TPA}$  (Rango 740– 840 nm)

Como muestra de referencia se utilizó Rodamina 6G a una concentración de  $1 \times 10^{-4} M$ . Los espectros de emisión no lineal de las nanopartículas o soluciones y de la referencia, fueron obtenidos bajo las mismas condiciones con una potencia incidente de 410 mW<sup>3</sup> y para 11 diferentes longitudes de onda de excitación: de 740 a 840 nm cada 10 nm. Además, para cada longitud de onda se guardó la señal detectada por el espectrómetro al bloquear el haz de excitación para restar esta señal de fondo a los espectros de cada muestra incluida la referencia.

El láser de Ti:Za se sintonizó girando dos tornillos de movimiento micrométrico ubicados en la parte superior del láser. Uno de ellos cambia la posición de una rendija que modifica la longitud de onda y el otro tornillo mueve un compensador de dispersión, formado por cuatro prismas.

<sup>3</sup>Esta potencia se midió a la salida del aislador de Faraday

### 3.7 Medición de $\sigma^{TPA}$ de 650 a 760 nm

Para medir  $\sigma^{TPA}$  en este rango mediante la técnica TPEF se utilizó un amplificador ultrarrápido (basado en un láser de Ti:Za) modelo Libra- HE de Coherent, con emisión de pulsos de 50  $fs$  de duración, frecuencia de repetición de 1  $kHz$  y longitud de onda central de 800nm; adicionalmente se utilizó un amplificador óptico paramétrico modelo TOPAS- C de Light Conversion capaz de sintonizar la longitud de onda en un rango continuo de 290 a 2600  $nm$ . Como sistema de detección se utilizó un monocromador/espectrómetro de la serie Acton SP-2500i de Princeton Instruments y un tubo fotomultiplicador o PMT por sus siglas en inglés de la serie R7400U de Hamamatsu.

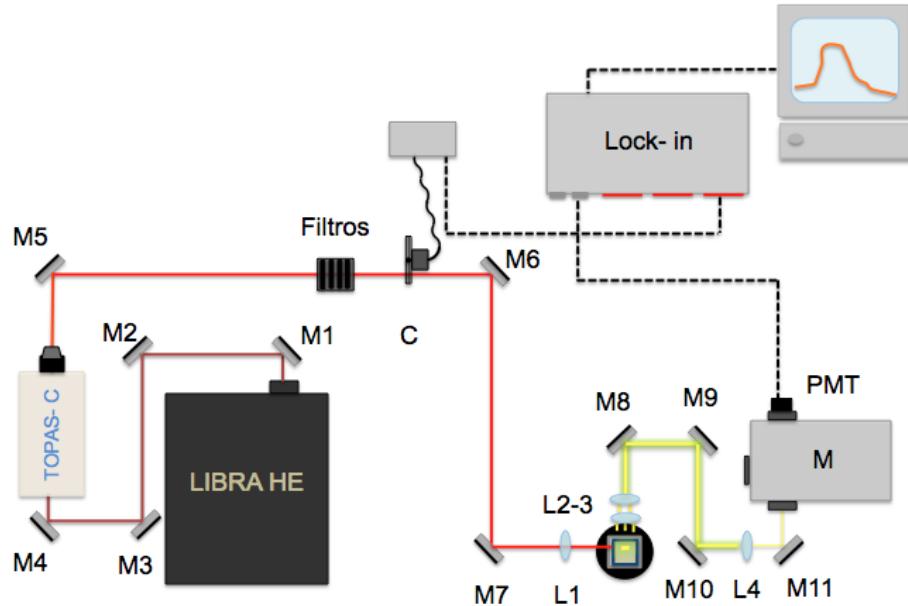


Figura 3.11: Arreglo experimental para medir  $\sigma^{TPA}$  (Rango 650– 760 nm)

Como se aprecia en la figura 3.11 el amplificador óptico paramétrico TOPAS-C fue bombeado por el láser Libra- HE utilizando los espejos  $M1-M4$ , el TOPAS- C se sintoniza y controla utilizando un programa computacional del equipo y a la salida de éste, se coloca el filtro correspondiente para permitir la salida de la longitud de onda seleccionada. Utilizando el espejo  $M5$ , el haz de excitación se envió a una serie de filtros de densidad óptica variable para

controlar la intensidad del haz y posteriormente el haz se moduló utilizando un chopper  $C$  a una frecuencia de  $39\ Hz$ . Con los espejos  $M6$  y  $M7$  el haz se hizo incidir en la lente  $L1$  para ser enfocado en una celda de cuarzo de  $1 \times 1 \times 4 cm^3$ ; con las lentes  $L2$ -  $L3$  se colectó la luz emitida por la muestra de interés de manera perpendicular al haz incidente en la celda; utilizando los espejos  $M8-M10$  la luz emitida se dirigió a la lente  $L4$  para enfocarla en la rendija de entrada del monocromador/ espectrómetro  $M$  utilizando el espejo  $M11$ .

A la salida del monocromador/ espectrómetro se colocó un PMT, encendido con  $900\ V$  en todas las mediciones, y se amplificó la señal detectada con un amplificador lock- in modelo SR830 de Stanford Research Systems, utilizando como referencia la señal del chopper. Para poder visualizar y guardar los espectros de emisión en base a los datos del amplificador lock- in, se utilizó un software desarrollado por un miembro del GPOM<sup>4</sup>. El haz de excitación se enfocó muy cerca a una de las paredes de la celda de cuarzo para reducir la distancia entre el volumen excitado y las lentes colectoras de luz, disminuyendo así la atenuación de fluorescencia.

Se utilizó nuevamente Rodamina 6G como referencia a una concentración de  $1 \times 10^{-4} M$ . Los espectros de emisión no lineal de la muestra de referencia, suspensiones acuosas de nanopartículas y soluciones fueron obtenidos bajo las mismas condiciones con una potencia incidente de entre  $250$  y  $270\ \mu W$  para 12 diferentes longitudes de onda de excitación: de  $650$  a  $760\ nm$  cada  $10\ nm$ . Y nuevamente para cada longitud de onda se guardó un espectro de la señal detectada al bloquear el haz de excitación, para restar éste fondo a los espectros de cada muestra de interés incluida la referencia.

La medición de  $\sigma^{TPA}$  en este rango no se realizó para todos los materiales estudiados, únicamente para los materiales de mayor interés que presentaron los valores más altos de  $\sigma^{TPA}$  para el rango de  $740$  a  $840\ nm$ .

### 3.8 Fotoestabilidad de las nanopartículas

Las soluciones y suspensiones acuosas de nanopartículas de mayor interés fueron sometidas a un estudio de fotoestabilidad; las muestras fueron expuestas a una lámpara UV durante 165 minutos, monitoreando los espectros de absorción a diferentes tiempos. Las muestras se colocaron a  $15\ cm$

<sup>4</sup>El software fue desarrollado por el Ing. físico Manuel De Anda Villa para automatizar la detección y guardado de datos arrojados por el Lock-in de forma gráfica

de la lámpara para evitar que se calentaran demasiado y el disolvente se evaporara.

El objetivo de este estudio fue comprobar que las soluciones sufren de un fotoblanqueado en un tiempo menor de exposición a la luz comparadas con las suspensiones acuosas de nanopartículas del mismo material.

### **3.9 Internalización de nanopartículas en líneas celulares epiteliales (L929)**

Las células epiteliales L929 (Fibroblastos de ratón) son cultivadas<sup>5</sup> en un medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), el cual contiene aminoácidos, sal, vitaminas, glucosa, hierro y rojo de fenol, suplementado con 10 % de suero fetal bovino y 0.1 % de antibióticos y antimicóticos. Los cultivos se incubaron a una temperatura de 37°C, con una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub> y humedad constante.

Las nanopartículas orgánicas de mayor interés por sus propiedades ópticas, se internalizaron en las líneas celulares siguiendo el protocolo siguiente:

- 1.-** Las células se fijaron en cubreobjetos de 20×20 mm utilizando paraformaldehido 4 % y glutaraldehido 0.05 % en una solución salina de fosfato (PBS) durante 20 minutos.
- 2.-** Las células fueron permeabilizadas utilizando Tritón 0.05 % durante tres minutos.
- 3.-** Se preparó una sonda compuesta por suero fetal bovino y suspensión acuosa de nanopartículas en diferentes proporciones.
- 4.-** Las células fueron expuestas a la sonda por un tiempo de 30 minutos.
- 5.-** El cubreobjetos con las células y la sonda fue montado y sellado en un portaobjetos, adicionando DAPI (4 ',6-diamino-2-fenilindol) entre las laminillas. El DAPI es un marcador fluorescente que se une fuertemente al ADN o bien al núcleo de las células.

---

<sup>5</sup>Se contó con el apoyo de la Dra. Myrna Sabanero López del Laboratorio de Biología Celular y Molecular de las Interacciones, de la Universidad de Guanajuato; la Dra. Sabanero proporcionó las líneas celulares y desarrolló el protocolo y proceso de la tinción celular.

### 3.9. Internalización de nanopartículas en líneas celulares epiteliales (L929)

**6.-** Finalmente el portaobjetos, con las nanopartículas en las células, se observó con el microscopio de epifluorescencia modelo IX81 de Olympus.

Cabe mencionar que posterior al paso número 1, 2 y 4 las células del cuadroobjetos fueron lavadas suavemente utilizando PBS, ello para remover las células que no se fijaron, para retirar el surfactante no absorbido y limpiar las células de las nanopartículas que no se internalizaron.

## CAPÍTULO 4

# RESULTADOS

### Contenido

---

<b>4.1</b>	<b>Propiedades ópticas de algunos sistemas moleculares arilenetinilenos . . . . .</b>	<b>48</b>
<b>4.2</b>	<b>Copolímero PF2/6-b-P3TMAHT . . . . .</b>	<b>54</b>
<b>4.3</b>	<b>Nanopartículas del polímero PMC300 . . . . .</b>	<b>59</b>
4.3.1	Internalización de nanopartículas . . . . .	71
<b>4.4</b>	<b>Comparación de propiedades ópticas entre los sistemas . . . . .</b>	<b>77</b>
4.4.1	Internalización de nanopartículas 3NOS . . . . .	85

---

### **4.1 Propiedades ópticas de algunos sistemas moleculares arilenetinilenos**

En la figura 3.1 se muestra una estructura de bajo peso molecular con un grupo de 15 sustituyentes *R*, los cuales representan diferentes grupos electrodonadores. Se buscó estudiar las propiedades ópticas de este conjunto de moléculas, en solución y suspensión, al variar los grupos *R*. La concentración de todas las soluciones y suspensiones acuosas, cuyos resultados se presentan, fue del orden de  $10^{-5} M$  y en la fabricación de las mismas se utilizó Tritón X- 100 como surfactante, debido a que se observaron mejores resultados que utilizando CTAB (Suspensiones más transparentes y estables).

No todas las moléculas fueron solubles en THF, tampoco se pudieron fabricar suspensiones acuosas de nanopartículas en todos los casos porque se formaban grandes aglomerados que se precipitaban y en algunos casos la emisión lineal fue débil. En la figura 4.1 se muestran los espectros de absorción lineal molar  $\epsilon$  de las soluciones con la etiqueta *Sol* y suspensiones ó

#### 4.1. Propiedades ópticas de algunos sistemas moleculares arilenetinileno 49

*Susp* más estables; la numeración corresponde a los distintos grupos *R* de cada molécula mostrados en la figura 3.1.

En los espectros de las suspensiones se puede observar un desplazamiento positivo de la línea base (con respecto al origen), evidente en las longitudes de onda más grandes debido al esparcimiento. La absorción disminuyó notoriamente para la molécula 7 en suspensión comparada con la solución, mientras que para la molécula 3 sucedió lo opuesto, la absorción de la suspensión fue más grande; también se aprecia en el espectro de la suspensión un corrimiento hacia el rojo y ensanchamiento (debido a la torsión y/o flexión que sufre la molécula) en comparación con el espectro de la solución.

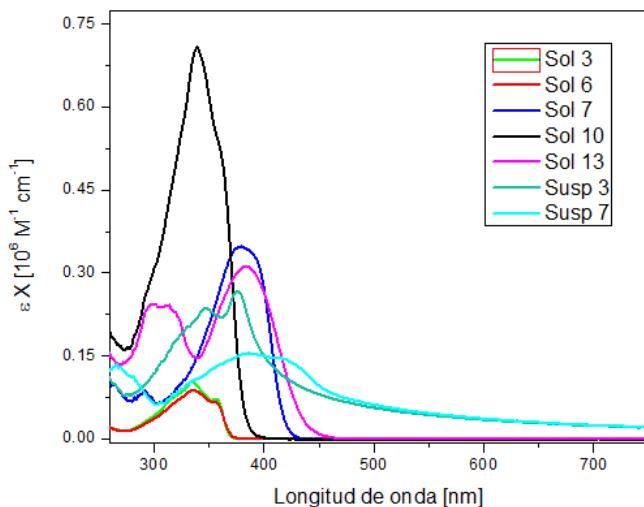
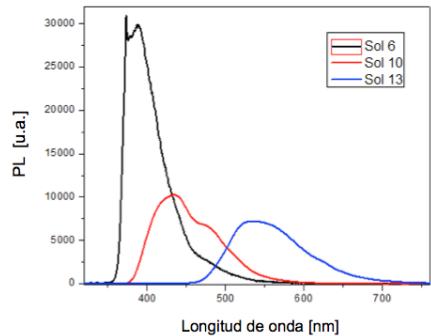


Figura 4.1: Espectros de absorción molar de las moléculas 3, 6, 7, 10, 13 y 15 (Notación de acuerdo a la fig. 3.1). Las etiquetas *Sol* y *Susp* se refieren a las moléculas en solución y suspensión respectivamente.

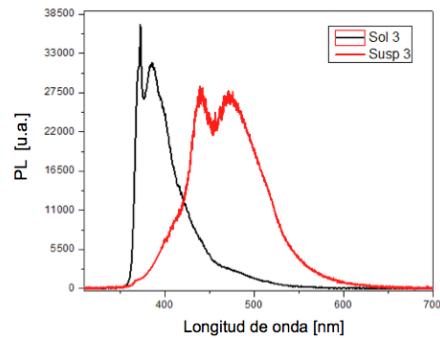
En la figura 4.2 se muestran los espectros de emisión lineal. El espectro de la solución 6 presentó una intensidad mayor que las soluciones 10 y 13, sin embargo, se traslapó con la emisión del diodo láser de 370 nm y como se utilizó un filtro UV para no detectar la fuente de excitación, el espectro de la solución 6 no se pudo visualizar por completo. Lo mismo sucedió para el espectro de la molécula 3 en solución, mientras que en suspensión tuvo un corrimiento hacia el rojo por las interacciones que sufre la molécula al confinarse para formar las nanopartículas. La molécula 7 en suspensión también sufrió un corrimiento hacia el rojo comparado con el espectro en solución.

Las moléculas que se lograron disolver fácilmente en THF, que presentaron la mayor intensidad de emisión lineal y las moléculas de las cuales se fabricaron las suspensiones acuosas más transparentes y estables (Ver Figura 4.3), fueron las moléculas 3, 6, 7, 10 y 13 en solución y las moléculas 3 y 7 en suspensión. Únicamente se obtuvieron los valores de eficiencia cuántica de fluorescencia de estas muestras, los resultados se muestran en la tabla 4.1.

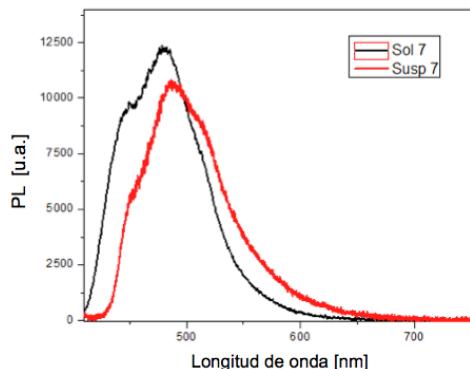
#### 4.1. Propiedades ópticas de algunos sistemas moleculares arilenetinileno§1



(a) Soluciones de las moléculas 6, 10 y 13 ( $c=5.84 \times 10^{-5} M$ ).



(b) Muestra 3 en solución y suspensión ( $c=5.68 \times 10^{-5} M$ ).



(c) Muestra 7 en solución y suspensión ( $c=5.68 \times 10^{-5} M$ ).

Figura 4.2: Espectros de emisión lineal

La cuarta columna de la tabla 4.1 es el promedio de los valores de eficiencia, obtenidos experimentalmente, de las columnas dos y tres; la última columna hace referencia al valor de  $\Phi_f$  promedio tomado en cuenta un factor de

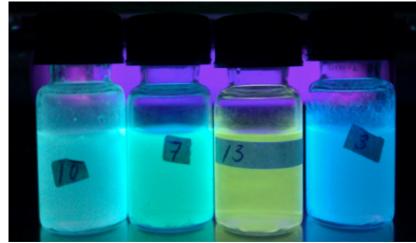


Figura 4.3: De izquierda a derecha, fluorescencia de las suspensiones acuosas de nanopartículas 10, 7, 13 y 3 bajo una lámpara UV ( $c=5.84 \times 10^{-5} M$ ,  $5.68 \times 10^{-5} M$ ,  $6.35 \times 10^{-5} M$  y  $5.68 \times 10^{-5} M$  respectivamente).)

corrección proveniente de la sensibilidad de respuesta que el PMT tiene para distintas longitudes de onda. En el Apéndice A se muestra cómo se calculó este factor.

Muestra	$\Phi_{f1}$	$\Phi_{f2}$	$\Phi_f$ Promedio	$\Phi_f$ Promedio / corrección PMT
Sol 3	0.154	0.141	0.148	0.09
Sol 6	0.120	0.105	0.113	0.07
Sol 7	0.430	0.236	0.333	0.20
Sol 10	0.266	0.255	0.260	0.16
Sol 13	0.237	0.297	0.267	0.27
Susp 3	0.279	0.148	0.213	0.13
Susp 7	0.357	0.311	0.335	0.22

Tabla 4.1: Valores obtenidos de eficiencia cuántica de fluorescencia  $\Phi_f$  de las soluciones 3, 6, 7, 10 y 13 y las suspensiones 3 y 7.

Posteriormente se realizaron mediciones de  $\sigma^{TPA}$  en un rango de 750 a 810 nm, para determinar éste parámetro mediante la técnica de TPEF se utilizó la ecuación 2.29, sin embargo, como los espectros de emisión no lineal de la muestra de interés y de referencia se adquirieron bajo las mismas condiciones, utilizando el mismo sistema de detección, entonces  $\eta_{ref} = \eta$ ; de igual manera, la potencia incidente fue la misma para todas las muestras  $\langle P(t) \rangle_{ref} = \langle P(t) \rangle$ . Los valores de  $\sigma_{ref}^{TPA}$  para la Rodamina 6G, a diferentes longitudes de onda, ya se encuentran reportados en la literatura (Ver referencia [23]). Si se asume que  $n_{ref}/n \approx 1$  para el caso de Rodamina 6G, el parámetro a calcular para conocer  $\sigma^{TPA}$  es el valor de la integral del espectro de emisión no lineal de la referencia y de la muestra de interés  $\langle F(t) \rangle_{ref}$  y  $\langle F(t) \rangle$ .

La intensidad de fluorescencia inducida por absorción de dos fotones de las

#### 4.1. Propiedades ópticas de algunos sistemas moleculares arilenetinileno§3

soluciones 3, 6,13 y la suspensión 3 fue tenue y estuvo por debajo del nivel de detección del sistema experimental; sin embargo, los espectros de emisión no lineal de las soluciones 7, 10, 13 y la suspensión 7 (a las mismas concentraciones mencionadas anteriormente) se detectaron a todas las longitudes de onda de excitación.

En la figura 4.4 se muestran los espectros adquiridos con una longitud de onda de excitación de  $750\text{ nm}$ . A esta longitud de onda se aprecia una disminución de intensidad mayor de la molécula 7 en suspensión comparada con la solución en THF y aunque de manera similar a la emisión lineal, se observa un corrimiento hacia el rojo de la suspensión, también se puede apreciar una ligera disminución del ancho de banda de la misma.

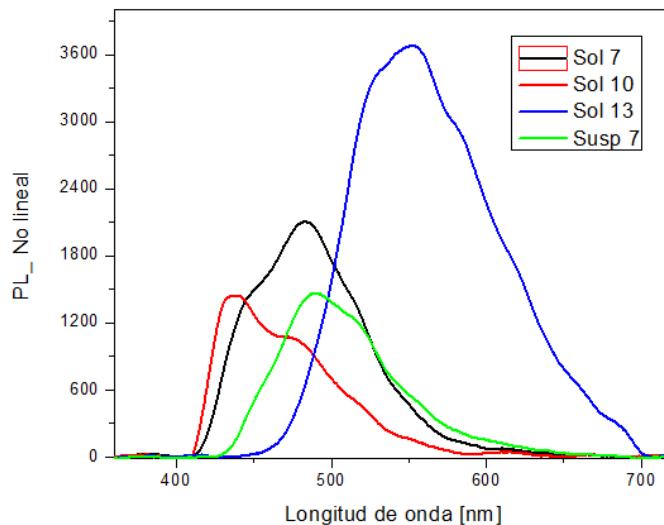


Figura 4.4: Espectros de emisión inducida por absorción de dos fotones con una fuente de excitación de  $750\text{ nm}$  para las moléculas 10 y 13 en solución ( $c=5.84 \times 10^{-5} M$ ) y 7 en solución y suspensión ( $c=5.68 \times 10^{-5} M$ ).

Los valores obtenidos de sección transversal de absorción de dos fotones se muestran graficados en la figura 4.5. Nótese que este valor es prácticamente constante en el rango de longitudes de onda en que fue medido para las moléculas 7, 10 y 13; no se aprecian las bandas características de un espectro de absorción no lineal y ello probablemente se deba a que los valores de  $\sigma^{TPA}$  resultaron tan bajos, que el error de las mediciones afectó notablemente los resultados.

A pesar de lo anterior, la solución 13 presentó los valores más altos de  $\sigma^{TPA}$  en todas las longitudes de onda de excitación (menores a 600  $GM$ ) y el resto de las muestras presentaron valores menores de 300  $GM$ . De los materiales orgánicos con los que se trabajaron en este proyecto, este conjunto de moléculas presentó algunos de los valores más bajos de eficiencias cuánticas de fluorescencia y  $\sigma^{TPA}$ , además la mayoría de suspensiones acuosas de nanopartículas se precipitaban inmediatamente después de ser fabricadas, volviendo las suspensiones más turbias e inestables. Por ello no fue de interés continuar con los estudios de absorción no lineal y utilizar estos materiales como posibles marcadores celulares.

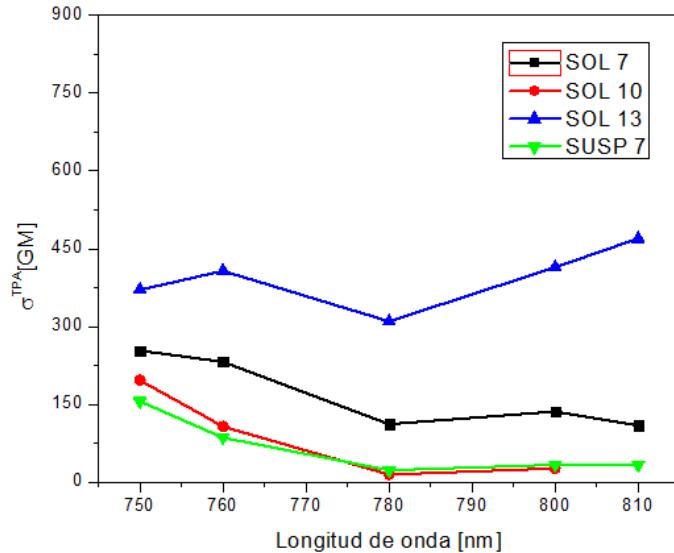


Figura 4.5: Espectros de absorción no lineal de las moléculas 10 y 13 en solución y 7 en suspensión

## 4.2 Copolímero PF2/6-b-P3TMAHT

El interés de estudiar el copolímero de dos bloques PF2/6-b-P3TMAHT, radicó en su estructura molecular compuesta por politiofenos y polifluorenos (Ver Figura 3.2). Ambas estructuras presentan altas propiedades fluorescentes, pero los fluorenos tienen una gran versatilidad de síntesis que permite modular sus propiedades ópticas; se esperaba que este copolímero tuviera altas propiedades no lineales. Por otra parte, este material, también fue de

interés porque formaba estructuras lamelares y vesiculares dependiendo de las concentraciones utilizadas.

Se estudiaron las propiedades ópticas de este copolímero en solución, utilizando como disolvente una mezcla de agua y THF (el material no es soluble en THF) y en suspensión acuosa de nanopartículas.

Se realizaron dos soluciones a diferentes concentraciones, disolviendo el copolímero en un volumen de agua-THF en proporción 1:1. La concentración de la solución 1, a la que se hará referencia como *Sol 1* fue  $c = 9.25 \times 10^{-6} M$  y para la solución 2 ó *Sol 2* se manejó una concentración  $c = 6.66 \times 10^{-8} M$ . Nótese que ambas soluciones son del mismo copolímero, la diferencia solamente radica en la concentración.

Para elaborar la suspensión acuosa ó *Susp*, a una concentración de  $6.66 \times 10^{-8} M$ , se utilizó dodecilsulfato sódico (SDS) como surfactante. Se manejaron bajas concentraciones para formar nanoagregados vesiculares y evitar las estructuras de tipo lamelar[24].

En la figura 4.6 se observan los espectros de absorción molar del copolímero en soluciones y en suspensión acuosa. En éstos se aprecian dos máximos alrededor de 383 y 460 nm correspondientes a los dos bloques o dos distintos monómeros polimerizados que constituyen este copolímero; el máximo ubicado a 383 nm (mayor energía) corresponde al bloque PF2/6 mientras que el segundo máximo se origina por el bloque P3TMAHT [24].

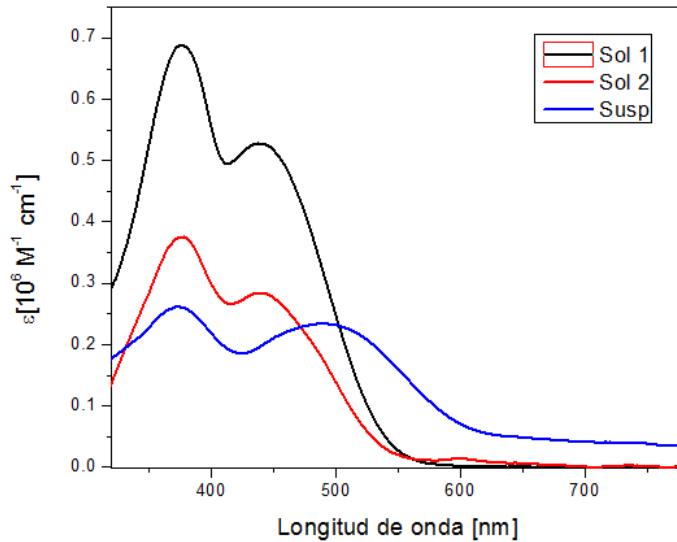


Figura 4.6: Espectros de absorción molar de *Sol 1* ( $c = 9.25 \times 10^{-6} M$ ), *Sol 2* ( $6.66 \times 10^{-8} M$ ) y *Susp* ( $6.66 \times 10^{-8} M$ ).

La diferencia entre los espectros de absorción de las soluciones 1 y 2 (*Sol 1* y *Sol 2*) radica primordialmente en la intensidad de absorción (Ver Figura 4.7), lo cual indica que a ambas concentraciones se forman el mismo tipo de estructuras vesiculares; además no presentaron esparcimiento. El espectro de la suspensión presentó una disminución de la absorción, además de esparcimiento y un ensanchamiento y corrimiento hacia el rojo únicamente del máximo correspondiente al bloque P3TMAHT; esto probablemente se debió a la creciente algomeración o agregación que sufrió dicho bloque en agua/SDS.

Posteriormente se adquirieron los espectros de emisión lineal utilizando un diodo láser como fuente de excitación, emitiendo a  $370\text{ nm}$ . La emisión de la suspensión fue muy débil y no pudo detectarse; en la figura 4.8 se muestran los espectros de emisión de las soluciones a concentraciones de  $9.25 \times 10^{-6} M$  (*Sol 1*) y  $6.66 \times 10^{-8} M$  (*Sol 2*). La baja concentración de la solución 2 dificultó la detección de emisión, como se muestra en la figura 4.8b, en donde se puede apreciar el ruido o luz de fondo.

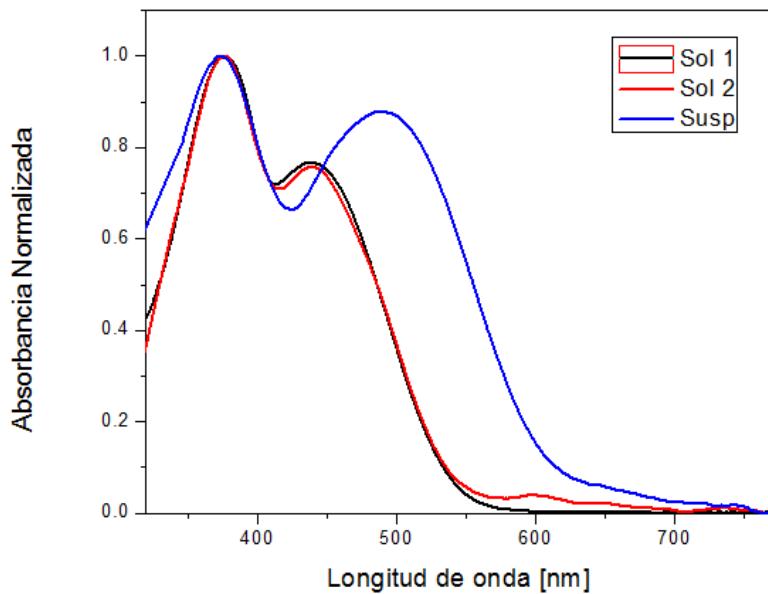


Figura 4.7: Espectros de absorción molar normalizados de *Sol 1*, *Sol 2* y *Susp*.

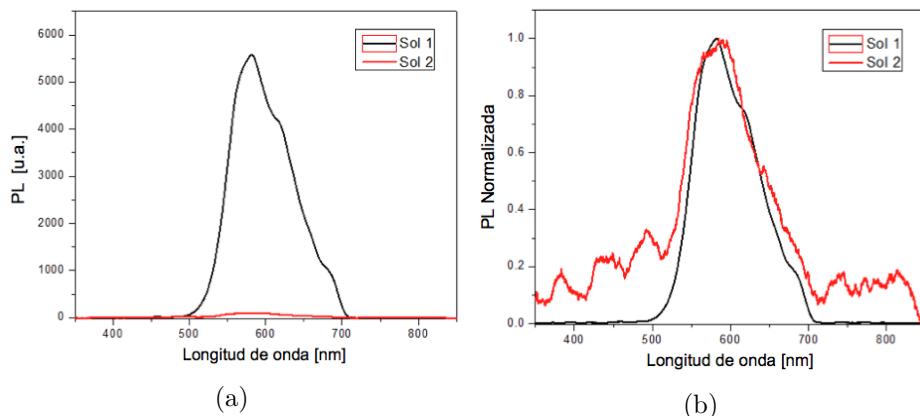


Figura 4.8: Espectros de a)Emisión lineal y b)Emisión lineal normalizada, para las soluciones del copolímero. *Sol 1* con una concentración de  $c = 9.25 \times 10^{-6} M$  y *Sol 2* con una concentración  $c = 6.66 \times 10^{-8} M$ .

El valor de la eficiencia cuántica de fluorescencia del copolímero PF2/6-b-

P3TMAHT en agua-THF proporción 1:1, a una concentración del orden de  $10^{-8} M$  se reporta en la referencia [24] y es  $\Phi_f = 0.16$ . Tomando en cuenta lo anterior, finalmente se obtuvieron los espectros de emisión no lineal para determinar la sección transversal de absorción de dos fotones en un rango de excitación de 760 a 810 nm. Únicamente se detectó la emisión no lineal de la solución 1 a una concentración de  $9.25 \times 10^{-6} M$ ; en la figura 4.9 se muestran algunos espectros de emisión utilizando longitudes de onda de excitación de 760, 790 y 810 nm. Los valores obtenidos de  $\sigma^{TPA}$  de 760 a 810 nm se muestran en la figura 4.10.

Como se aprecia en la figura 4.10 hay un valor mínimo de  $\sigma^{TPA}$  en 780 nm; ésto probablemente indique la separación entre los máximos de absorción de los dos bloques.

Los valores de  $\sigma^{TPA}$  para éste copolímero en agua-THF 1:1, a una concentración de  $9.25 \times 10^{-6} M$  (*Sol 1*), son muy bajos comparados con otros polímeros derivados de politiofenos y polifluorenos; por ello no se estudió la emisión inducida por absorción de dos fotones en otro rango de excitación.

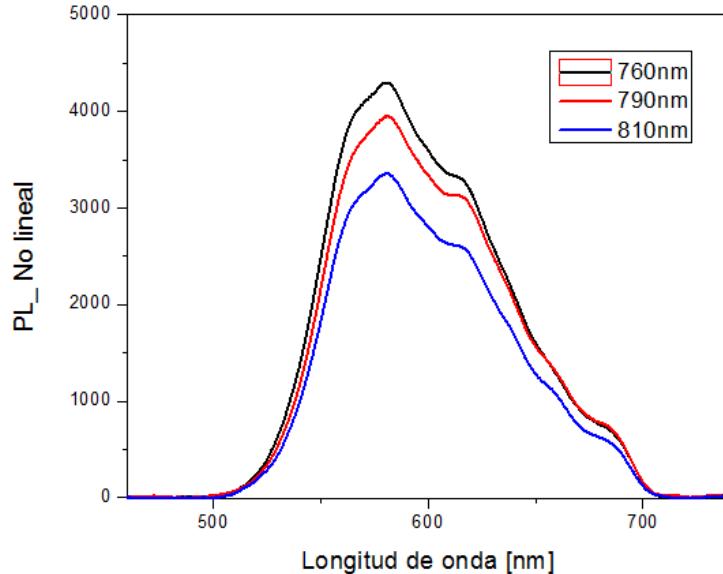


Figura 4.9: Espectros de emisión no lineal para la Solución 1 ( $c=9.25 \times 10^{-6} M$ ). Longitudes de excitación: 760, 790 y 810 nm.

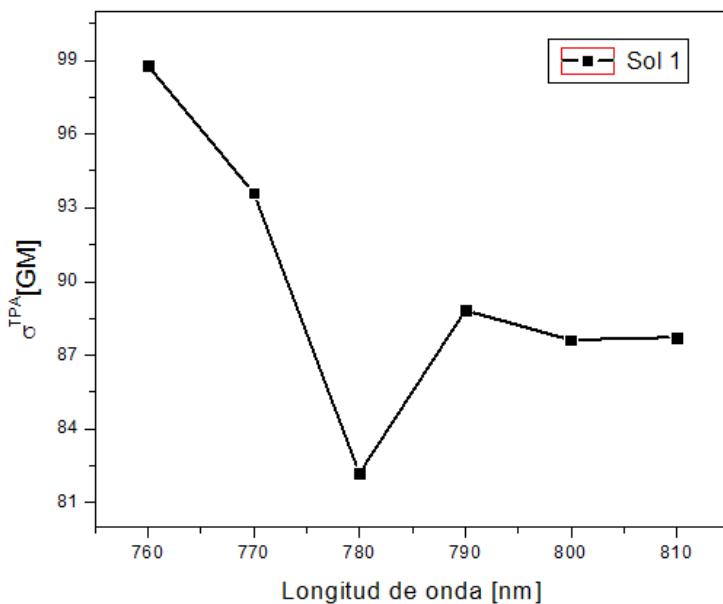


Figura 4.10: Espectro de absorción no lineal de la Solución 1,  $c=9.25 \times 10^{-6} M$ .

### 4.3 Nanopartículas del polímero PMC300

La caracterización óptica de este polímero, cuya estructura se muestra en la figura 3.4, fue una de las más amplias de este trabajo porque ya ha sido estudiado por el Grupo de Propiedades Ópticas de la Materia (GPOM)<sup>1</sup> y se sabe que tiene una eficiencia cuántica de fluorescencia  $\Phi_f \sim 1$  y una no linealidad bastante grande, además se ha utilizado antes como marcador en líneas celulares (Ver ref. [25]).

Se fabricaron soluciones en THF, suspensiones acusas de nanopartículas de PMC300 utilizando CTAB y suspensiones acuosas de nanopartículas funcionalizadas con PEG 2000 (sin utilizar CTAB).

También se realizaron suspensiones de nanopartículas de PMC300 dopadas con Rodamina 6G a diferentes concentraciones para estudiar y optimizar una transferencia de energía tipo Förster. Esto es posible porque, como se

<sup>1</sup>En particular el PMC300 fue estudiado por la Dra. Laura Aparicio Ixta, ver referencia [25]

vio en la sección 2.2.4, el espectro de emisión de un material (PMC300) se traslapa con el espectro de absorción del segundo material (Rodamina 6G) como se aprecia en la figura 4.11. Nótese que en este caso el polímero PMC300 es el sistema donador y la rodamina el sistema aceptor.

En la figura 4.12 se muestran algunos espectros de absorción molar de las muestras estudiadas. La etiqueta *Sol PMC300* hace referencia a la solución del polímero en THF, *Susp PMC300-PEG* indica que se trata de la suspensión acuosa de PMC300 funcionalizada con PEG 2000, *Sol PMC/R6G177* se refiere a la solución en THF de PMC300 dopada con Rodamina 6G al 177% molar (con respecto al PMC300) y *Susp PMC/R6G177* señala el espectro de la suspensión acuosa de nanopartículas de PMC300 dopadas con Rodamina 6G y funcionalizadas con PEG 2000; se manejaron concentraciones bajas de PMC300, del orden de  $10^{-7} M$ .

El estudio de este polímero y del polímero dopado con Rodamina 6G se basó en la caracterización de suspensiones acuosas de nanopartículas funcionalizadas con PEG 2000 (sin utilizar CTAB).

En estos espectros de absorción molar se pueden apreciar dos máximos alrededor de 330 y 435 nm correspondientes al polímero PMC300; en el caso de las muestras que se prepararon solo con PMC300, la suspensión presentó tanto espaciamiento como un ligero corrimiento hacia el rojo de uno de los máximos en comparación con la solución. Para la solución y suspensión de nanopartículas de PMC300 dopadas con Rodamina 6G al 177% molar, se presentó una disminución en la intensidad de absorción y nuevamente un corrimiento hacia el rojo de uno de los máximos en la suspensión; alrededor de 520 nm se aprecia la absorción correspondiente a la Rodamina 6G.

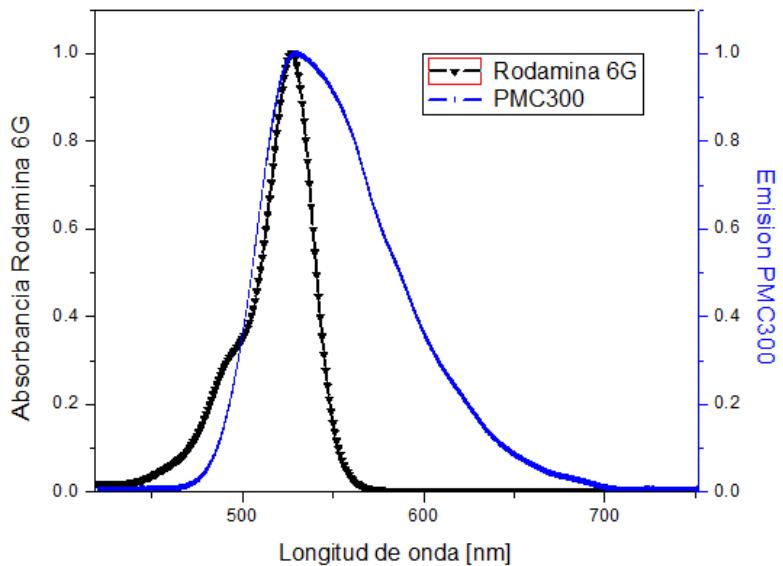


Figura 4.11: Absorción de Rodamina 6G y emisión de PMC300

Inicialmente la transferencia de energía se estudió analizando los espectros de emisión lineal para las siguientes suspensiones: *Susp PMC300-PEG*, *Susp PMC/R6G50-PEG* y *Susp PMC/R6G177-PEG* (Ver Figura 4.13); todas las suspensiones tuvieron la misma concentración de PMC300. La suspensión que presentó mayor emisión fue la de PMC300 dopada con Rodamina 6G al 177 % molar, posteriormente la suspensión dopada al 50 % molar y finalmente la suspensión de PMC300; nótese que las suspensiones que tienen Rodamina, además del aumento de intensidad de emisión, presentaron un corrimiento hacia el rojo en comparación con la suspensión de PMC300.

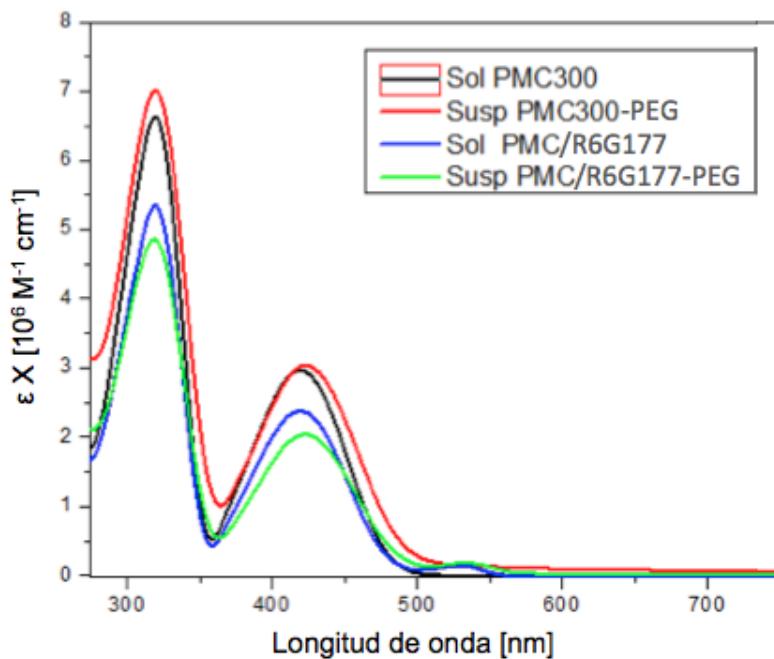


Figura 4.12: Espectros de absorción molar de soluciones y suspensiones acuosas de PMC300 y PMC300 dopado con Rodamina 6G

Para visualizar mejor lo anterior, en la figura 4.14 se presentan los espectros de emisión anteriores y el espectro de emisión de la Rodamina 6G normalizados. Los valores máximos de emisión en las suspensiones de nanopartículas de PMC300 dopadas con rodamina coinciden con el máximo de la rodamina, sobre todo la suspensión al 177 % molar, la cual presentó un corrimiento hacia el rojo mayor que la suspensión al 50 % molar. La emisión predominante en estas suspensiones corresponde a la emisión de la Rodamina 6G, esto podría ser indicio de dos hechos: que se llevó a cabo una transferencia de energía y que las nanopartículas de PMC300 se han dopado con rodamina, porque de no ser así, se observaría la emisión correspondiente al PMC300 y a la rodamina, en una superposición.

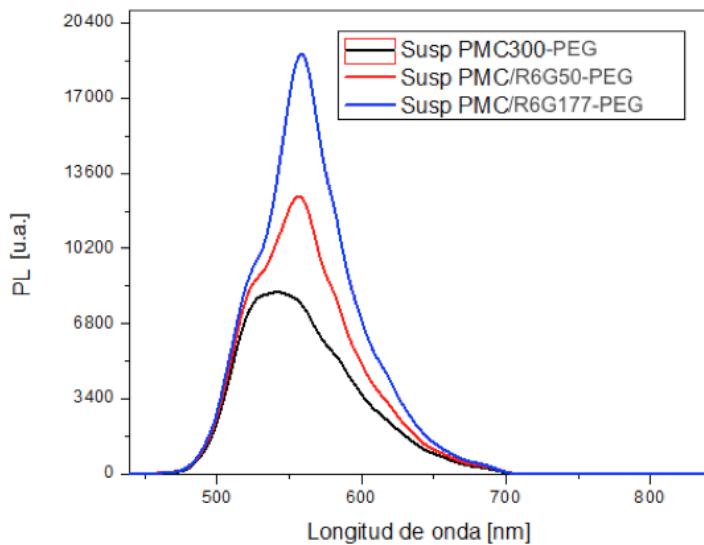


Figura 4.13: Emisión lineal de suspensiones acuosas de nanopartículas functionalizadas con PEG 2000 (Excitación: 370 nm).

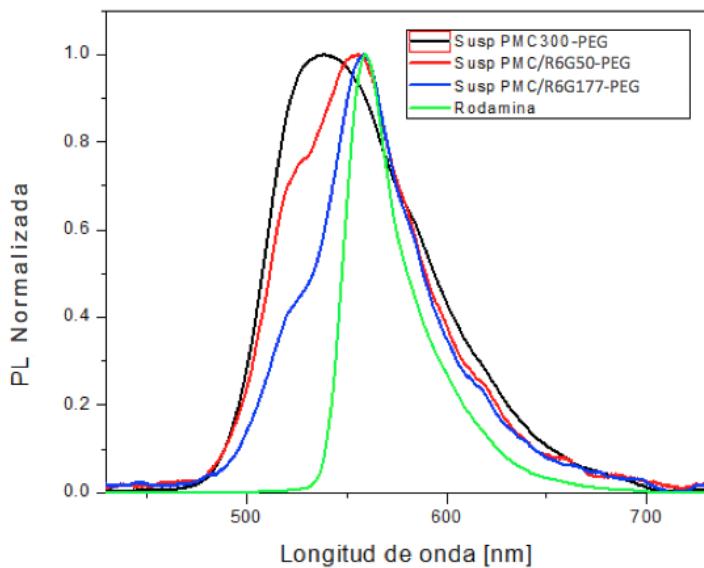


Figura 4.14: Espectros de emisión lineal normalizados de suspensiones y Rodamina 6G

Otro de los estudios que se realizó para verificar la presencia de una transferencia de energía, fue excitar las suspensiones de nanopartículas de PMC300 dopadas con rodamina, a longitudes de onda selectivas; para determinar estas longitudes se adquirieron los espectros de excitación del PMC300 y de la Rodamina 6G en solución, utilizando un fluorómetro con detección en  $539\text{ nm}$  y  $554\text{ nm}$  para el polímero y la rodamina respectivamente. Nótese que la máxima emisión lineal del PMC300 se presentó en  $539\text{ nm}$  y de la Rodamina 6G, en  $554\text{ nm}$ .

Los espectros de excitación se muestran en la figura 4.15. Alrededor de  $280\text{ nm}$  se aprecia un valor de máxima excitación para la Rodamina 6G y un mínimo para el PMC300, mientras que a  $375\text{ nm}$  se presenta el valor de máxima excitación para el PMC300 y mínima excitación para la Rodamina 6G. Lo anterior indica que, de no haber transferencia de energía, si se excita una suspensión de PMC300/Rodamina 6G a  $280\text{ nm}$  se apreciaría predominantemente la emisión de la Rodamina 6G y si la suspensión se excita a  $375\text{ nm}$ , sería predominante la emisión del PMC300 (considerando la misma concentración que se indica en la figura 4.15 y que para ambos sistemas moleculares  $\Phi_f = 1$ ).

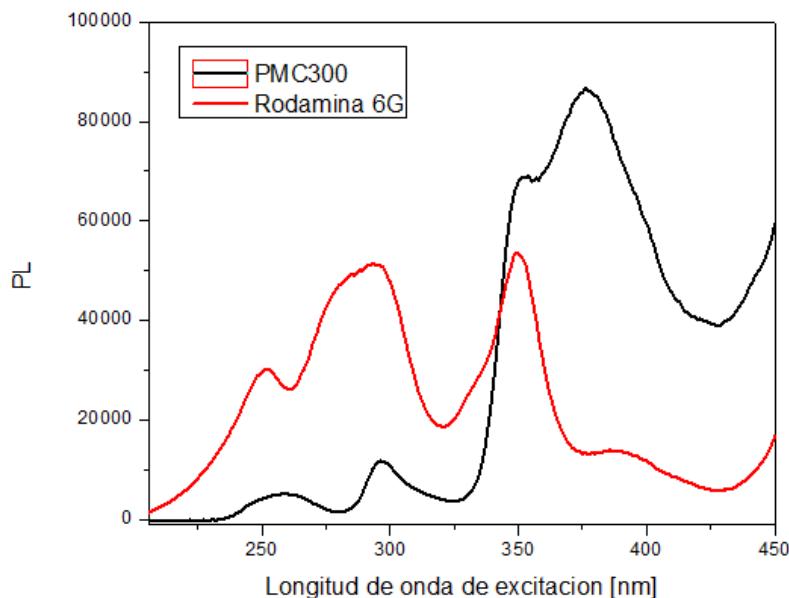


Figura 4.15: Espectros de exitación de PMC300 ( $c = 3.68 \times 10^{-7}\text{M}$ ) y Rodamina 6G ( $c = 1 \times 10^{-5}\text{M}$ ), ambos en solución de THF.

Se obtuvieron los espectros de emisión lineal de la suspensión de PMC300 dopada con Rodamina 6G al 177 % molar, excitando a 280 y 375 nm como se muestra en la figura 4.16a. Como el fluorómetro está calibrado para excitar y detectar con la misma intensidad a diferentes longitudes de onda, la suspensión presentó una mayor emisión a 375 nm que a 280 nm; sin embargo, ambos espectros son más similares al espectro de la rodamina que al del polímero. Para visualizar lo anterior, en la figura 4.16b se muestran los espectros normalizados de esta suspensión bajo excitaciones de 280 y 375 nm junto con los espectros normalizados de la Rodamina 6G y del PMC300 en solución, con una longitud de onda de excitación de 380 nm.

A pesar de que con una longitud de onda de excitación de 375 nm la excitación del PMC300 (Ver Fig. 4.15) es mucho mayor que la excitación de la rodamina, cuando la suspensión de nanopartículas de PMC300 dopadas con rodamina al 177 % molar es excitada a esta longitud de onda, el espectro de emisión predominante es el correspondiente a la rodamina. Como se aprecia en la figura 4.16b la suspensión sufre un corrimiento hacia el rojo, de tal manera que el punto de máxima emisión coincide con el máximo de la rodamina y no con el del PMC300; esto indica que se está dando una transferencia de energía, en la que el polímero dona energía a la Rodamina 6G y por lo tanto, se aprecia la emisión de este colorante.

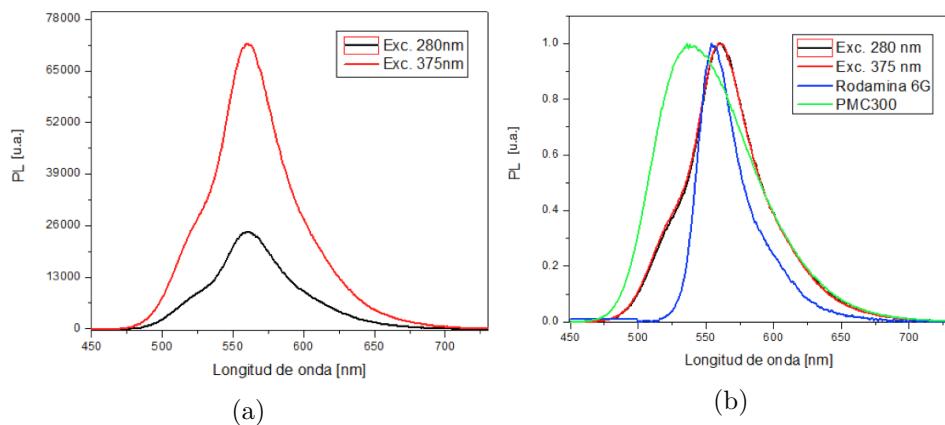


Figura 4.16: a) Espectros de emisión lineal de *Susp PMC/R6G177-PEG* (Exc. 280 y 375 nm) y b) Emisión lineal normalizada de *Susp PMC/R6G177-PEG* (Exc. 280 y 375 nm) y Rodamina 6G y PMC300 (Exc. 380 nm)

La eficiencia cuántica de fluorescencia es una de las propiedades de este

polímero que ya ha sido determinada, en solución se reporta que  $\Phi_f \sim 1$  y en suspensión utilizando CTAB  $\Phi_f = 0.95$  (Ver referencia [25]); esto fue de utilidad para calcular los valores de sección transversal de absorción de dos fotones de las muestras de interés<sup>2</sup>.

Posteriormente se adquirieron los espectros de emisión no lineal para calcular  $\sigma^{TPA}$  (en el rango de 770 a 820 nm) para las siguientes muestras: *Sol PMC300*, *Susp PMC300-PEG*, *Sol PMC/R6G177* y *Susp PMC/R6G177-PEG*; los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.17. Los valores mas altos de  $\sigma^{TPA}$  se presentaron para la suspensión de nanopartículas de PMC300 dopadas con rodamina al 177% molar, obteniendo 6652.5 GM a 770 nm; sin embargo, son muy similares a los de la suspensión de PMC300 con PEG 2000.

Se volvieron a realizar mediciones de  $\sigma^{TPA}$  para la muestra de *Susp PMC/R6G177-PEG* y se midió también la suspensión *Susp PMC/R6G50-PEG* para realizar una comparación, los resultados se muestran en la figura 4.18. La suspensión al 50 % molar presentó valores ligeramente más altos, obteniendo 5810.9 GM a 770 nm. Los valores mostrados en la figura 4.17 para la *Susp PMC/R6G177-PEG* son ligeramente mayores que los obtenidos posteriormente, sobre todo en el rango de 770 a 790 nm, ello probablemente se deba a una calibración distinta del arreglo experimental.

---

<sup>2</sup>Se asumió que para las muestras de PMC300 dopado con Rodamina 6G,  $\Phi_f \sim 1$  en solución y  $\Phi_f \sim 0.95$  en suspensión de nanopartículas funcionalizadas.

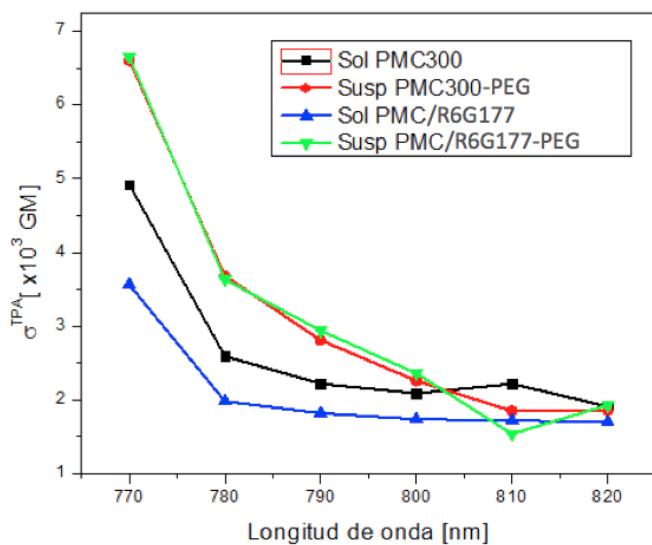


Figura 4.17: Espectros de absorción no lineal para muestras de PMC300 y PMC300 dopado con Rodamina 6G al 177 % molar.

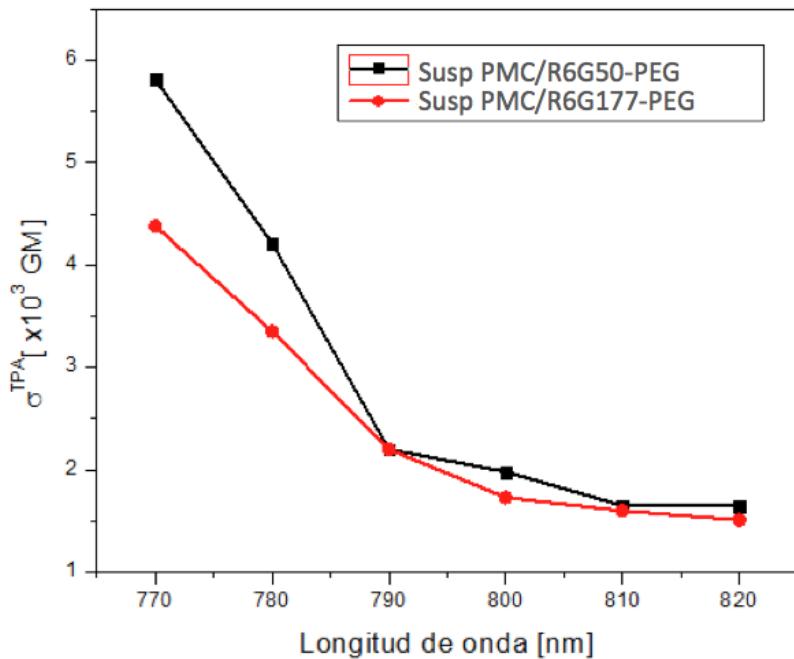


Figura 4.18: Espectros de absorción no lineal para *Susp PMC/R6G50-PEG* y *Susp PMC/R6G177-PEG*.

Debido a la alta respuesta no lineal que presentó el polímero PMC300, se continuó estudiando en solución de THF utilizando longitudes de onda más cortas, en un rango de 650 a 760 nm. En la caracterización anterior de este polímero (ver ref. [25]) no se pudo medir  $\sigma^{TPA}$  a longitudes de onda tan cortas porque el oscilador disponible no era capaz de sintonizar un rango tan amplio.

Se determinaron los valores de  $\sigma^{TPA}$  utilizando el arreglo experimental mostrado en la sección 3.7, y a 800 nm para comparar con los resultados anteriores; los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.19. Estas mediciones resultaron de gran utilidad porque se encontró que a 700 nm el PMC300 presenta la máxima absorción no lineal con  $\sigma^{TPA} = 39791.75 GM$ ; sin embargo, nótese que en la figura 4.17 a 800 nm el valor de  $\sigma^{TPA}$  es aproximadamente 2000 GM mientras que en los resultados posteriores se obtuvo un valor de 7000 GM. Esta diferencia probablemente se debe a los errores de medición por la sensibilidad del arreglo experimental, fue muy difícil alinear las lentes de recolección de fluorescencia para enviar esta luz al monocromator.

dor/espectrómetro, tampoco fue trivial obtener la misma potencia incidente para cada longitud de onda; finalmente, los cambios de posición de la celda (girar la celda dentro del mismo portaceldas) también afectaban las mediciones.

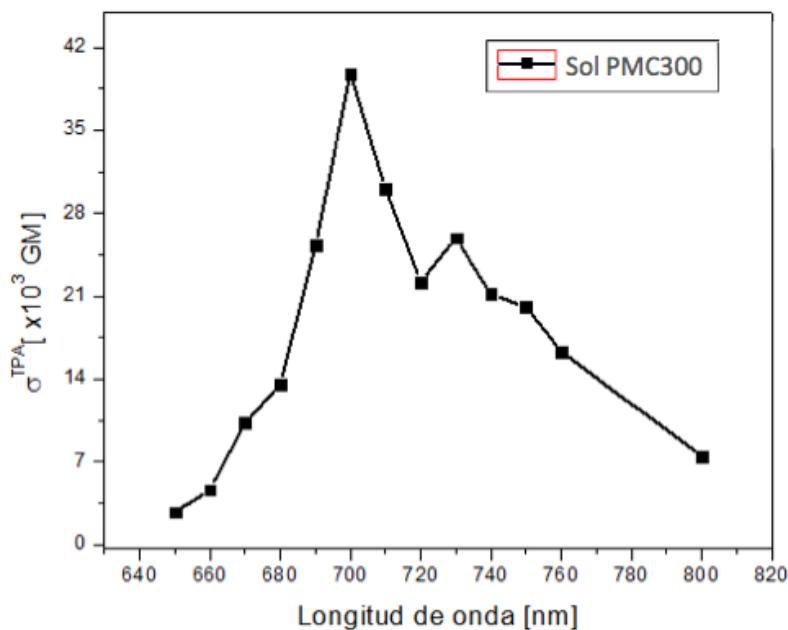


Figura 4.19: Espectro de absorción no lineal de *Sol PMC300* (Rango: 650-760 nm y 800nm).

Las suspensiones acuosas de nanopartículas de PMC300 dopadas con rodamina y funcionalizadas, presentaron características ópticas deseables en un marcador de líneas celulares: alta eficiencia cuántica de fluorescencia, una respuesta no lineal grande y estabilidad, después de 8 meses de haber sido fabricadas no se precipitaron y continuaron transparentes.

Para obtener más información sobre estas suspensiones, se adquirieron imágenes con un microscopio electrónico de transmisión<sup>3</sup> (TEM por sus siglas en inglés), de la suspensión de nanopartículas de PMC300 dopadas con rodamina al 50 % molar y funcionalizadas con PEG 2000. Cabe mencionar que en este trabajo, originalmente se planeó adquirir imágenes con un microscopio

<sup>3</sup>Se utilizó un microscopio electrónico Philips XL del Instituto de Metalurgia de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí

pio multifotón y por diversos factores, no pudo llevarse a cabo; sin embargo, tomando en cuenta lo anterior se eligió la muestra *Susp PMC/R6G50-PEG*, la cual presentó valores de  $\sigma^{TPA}$  mayores que la suspensión *Susp PMC/R6G177-PEG*.

En la figura 4.20 se puede apreciar la abundante cantidad de aglomerados de nanopartículas de la suspensión *Susp PMC/R6G50-PEG*. En las zonas con menor cantidad de material el diámetro promedio de los aglomerados fue de  $63.62\text{ nm}$ , pero se presentaron algunos más grandes de forma irregular con un diámetro promedio de  $683.89\text{ nm}$ <sup>4</sup>.

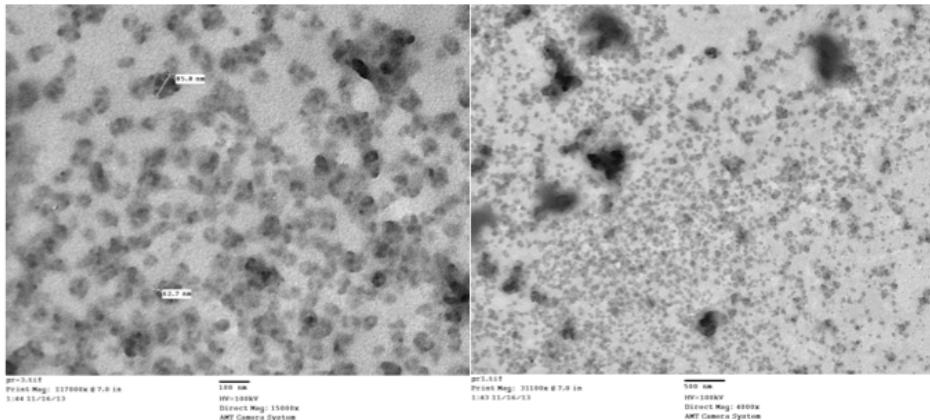


Figura 4.20: Imágenes TEM de *Susp PMC/R6G50-PEG*. Escala de  $100\text{ nm}$  (Izq.) y  $500\text{ nm}$

Los fluoróforos orgánicos usualmente sufren de un fotoblanqueado irreversible (photobleaching en inglés) bajo radiación de luz intensa, debido a reacciones fotoquímicas [25]. Por ello se estudió la fotoestabilidad de la solución *Sol PMC/R6G50* y cómo se modifica la misma en suspensión de nanopartículas *Susp PMC/R6G50-PEG*; ambas muestras a la misma concentración para realizar las comparaciones correspondientes.

Para estudiar la fotoestabilidad de las muestras se siguió el protocolo de la sección 3.8, se monitoreó el valor de absorbancia a  $320\text{ nm}$  para distintos tiempos de exposición a la lámpara de UV. En la figura 4.21 se muestran los resultados obtenidos.

---

<sup>4</sup>Para obtener los valores promedio del tamaño de nanopartículas y aglomerados se utilizó el software libre ImageJ.

Tras 165 minutos de exposición a la luz, la absorbancia de la suspensión de nanopartículas funcionalizadas con PEG 2000 permanece constante (no hubo un fotoblanqueado evidente en este tiempo) mientras que la absorbancia de la solución en THF disminuye aproximadamente un 20 %. La degradación del material orgánico en solución, se debe principalmente a una reducción de la longitud de conjugación del mismo por la exposición a la luz UV en presencia de oxígeno [26]. Entonces, la muestra es más estable en suspensión acuosa de nanopartículas por el confinamiento que presenta el material precursor hidrofóbico y por el recubrimiento de PEG. El PEG actúa como un protector estérico, impide interacciones entre el material precursor y el disolvente o agentes químicos externos.

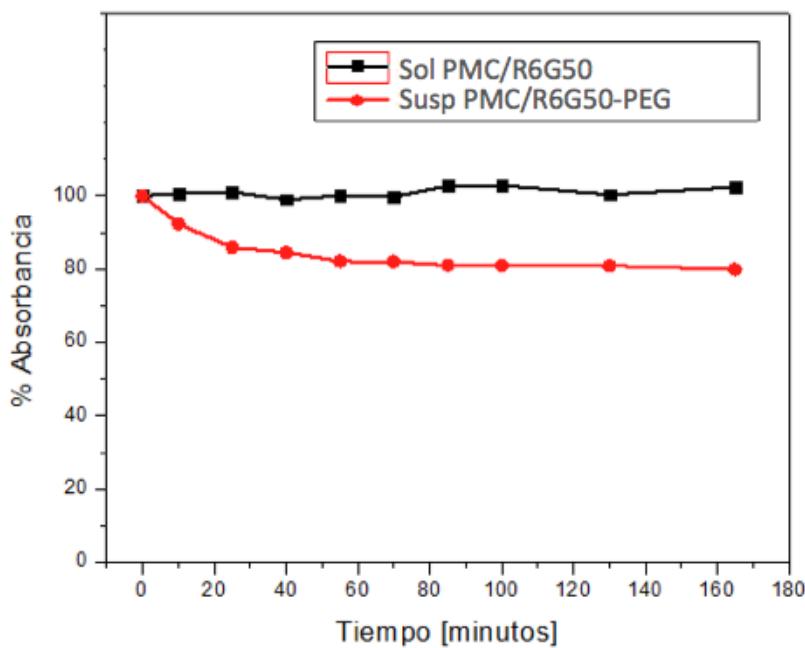


Figura 4.21: Fotoestabilidad de *Sol PMC/R6G50* y *Susp PMC/R6G50-PEG*.

#### 4.3.1 Internalización de nanopartículas

Se decidió internalizar la suspensión *Susp PMC/R6G50-PEG* en las líneas celulares epiteliales L292 porque esta suspensión presentó los valores más altos de  $\sigma^{TPA}$  en comparación con las otras muestras de nanopartículas

dopadas con rodamina<sup>5</sup>. Para ello se utilizó una sonda compuesta por 100  $\mu l$  de suero fetal bovino y 100  $\mu l$  de suspensión acuosa de nanopartículas, siguiendo el protocolo de la sección 3.9.

El microscopio de epifluorescencia con el que se obtuvieron las imágenes se muestra en la figura 4.22. Las imágenes se adquirieron utilizando algunos filtros dicroicos que permitieron tener distintos rangos de excitación y distintos rangos de detección de luz, emitida por las muestras (Ver sección 2.1.2). Los filtros se eligieron entonces, de acuerdo a las longitudes de onda de absorción y emisión de las nanopartículas de *Susp PMC/R6G50-PEG* y del DAPI dependiendo de las imágenes deseadas; los espectros de absorción y emisión de la primera muestra se presentan en las figuras 4.12 y 4.14 respectivamente. En la figura 4.23 se muestran los espectros de absorción molar y emisión del colorante comercial DAPI en agua; el DAPI presenta un valor máximo de absorción en 344 nm y un máximo de emisión en 487 nm.



Figura 4.22: Microscopio de epifluorescencia modelo IX81 de Olympus.

<sup>5</sup> Como se mencionó con anterioridad, una parte de los objetivos originales de este trabajo era la adquisición de imágenes de nanopartículas en las células utilizando un microscopio de absorción de dos fotones; por eso los materiales más estudiados fueron aquellos que presentaron los valores más altos de  $\sigma^{TPA}$ .

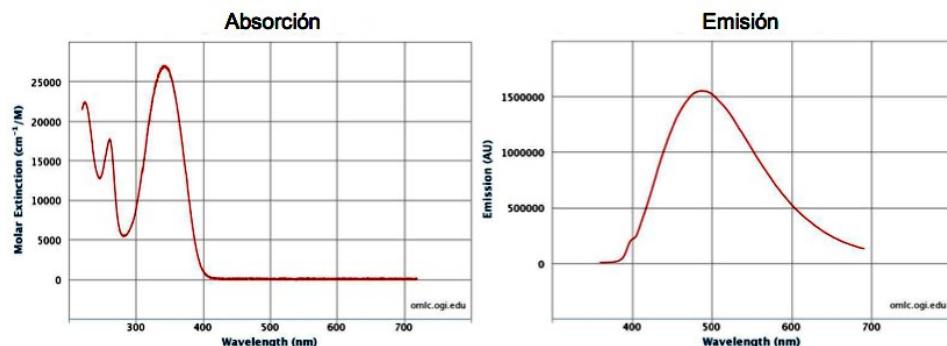


Figura 4.23: Absorción y emisión del colorante DAPI. *Espectros adquiridos por Scott Prahla, Oregon Medical Laser Center.*

En la figura 4.24 se presenta un conjunto de imágenes adquiridas con un objetivo de microscopio de  $100\times$ , los incisos a-d indican lo siguiente: a) Micrografía celular con campo claro, b) Tinción celular con la suspensión de nanopartículas utilizando un filtro de excitación en un rango de 420 a 450 nm y detección de 570 a 590 nm, c) Núcleos celulares teñidos con DAPI, utilizando un filtro de excitación de 330 a 385 nm con detección en un rango de 420 a 500 nm, d) Superposición de las micrografías b) y c).

Nótese que todas las micrografías que se presentan en la figura 4.24 son del mismo campo, con una escala de  $20\mu m$ . En la micrografía a), imagen de campo claro, se cree que las manchas oscuras de forma circular es el aire que quedó atrapado entre el cubreobjetos y portaobjetos al momento de adicionar el DAPI entre ambos; en la micrografía b) se muestra que las nanopartículas de la suspensión *Susp PMC/R6G50-PEG* lograron penetrar y teñir el citoplasma de las células de manera irreversible. Con este objetivo de microscopio, no se obtuvo una resolución muy grande, por lo que en la micrografía b) solo se aprecia la tinción de los núcleos celulares con DAPI.

En la figura 4.25 se presenta otro conjunto de imágenes de las células epiteliales con las nanopartículas de *Susp PMC/R6G50-PEG*, ahora adquiridas con un objetivo de microscopio de  $60\times$ , los incisos a-d representan: a) Micrografía con campo claro, b) Tinción celular con un filtro de excitación en un rango de 545 a 580 nm y detección de 600 a 610 nm, c) Núcleos celulares teñidos con DAPI, utilizando un filtro de excitación de 330 a 385 nm y detección en un rango de 420 a 500 nm, d) Superposición de las micrografías b) y c).

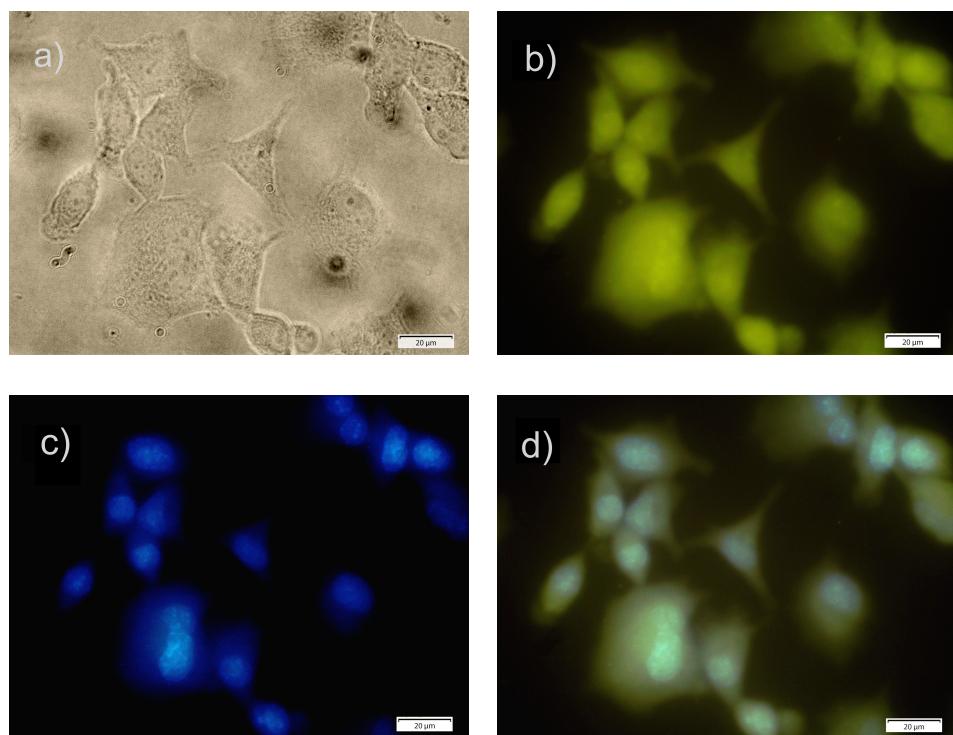


Figura 4.24: a) Campo claro, b)Exc: 420-450 nm, Emisión: 570-590 nm, c) Exc: 330-385 nm, Emisión: 420-500 nm, d) Superposición b) y c). Objutivo de microscopio: 100×, escala 20  $\mu\text{m}$ .

Nótese que en la micrografía b) de la figura anterior, 4.25, se puede observar nuevamente una tinción en el citoplasma de las células pero con una tonalidad rojiza, debido al filtro que se utilizó, el cual detectaba en un rango de 600 a 610 nm. Esta emisión puede corresponder tanto al PMC300 como a la Rodamina 6G, ya que, como se puede observar en la figura 4.14 ambas muestras presentan emisión alrededor de 600 nm; sin embargo, la excitación del filtro abarcó de 545 a 580 nm y en este rango la absorción del PMC300 es muy baja (Ver Figura 4.12) mientras que la Rodamina 6G presenta un valor máximo de absorción alrededor de 530 nm (Ver Figura 4.11). Así que, es muy probable que la emisión de la suspensión de nanopartículas *Susp PMC/R6G50-PEG* que se aprecia en la micrografía b) corresponda a la rodamina.

Se encontraron otros resultados interesantes utilizando un objetivo de mi-

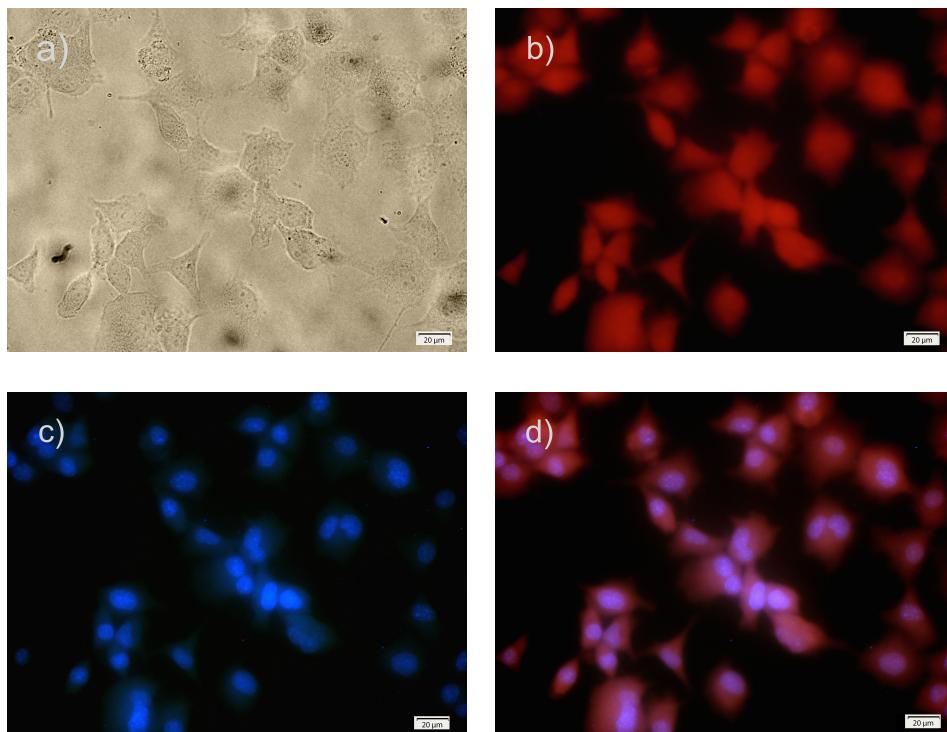


Figura 4.25: a) Campo claro, b) Exc: 545-580 nm, Emisión: 600-610 nm, c) Exc: 330-385 nm, Emisión: 420-500 nm, d) Superposición b) y c). Objetivo de microscopio: 60×, escala 20  $\mu$ m.

croscopio de 20×, el conjunto de imágenes obtenidas con éste, se muestran en la figura 4.26. Nuevamente los incisos a-d indican lo siguiente: a) Micrografía con campo claro, b) Tinción celular con las nanopartículas utilizando un filtro de excitación de 420 a 450 nm y detección de 570 a 590 nm, c) Núcleos celulares teñidos con DAPI, utilizando un filtro de excitación de 330 a 385 nm y detección en un rango de 420 a 500 nm, d) Superposición de las micrografías b) y c). Este conjunto de micrografías tiene el mismo campo y una escala de 100  $\mu$ m.

En la micrografía a) de la figura 4.26 se puede apreciar mejor la monocapa de las células endoteliales; en la micrografía b), se observa no solo la tinción del citoplasma de las células, también se aprecian múltiples aglomerados de nanopartículas que no lograron atravesar la membrana; de manera similar en la micrografía c), donde además de la tinción celular de núcleos con DAPI

se observan algunos aglomerados de nanopartículas. Nótese que se aprecia una cantidad mucho mayor de aglomerados en la micrografía b) que en la c), debido a que el filtro de la primera tiene un rango de detección de emisión de 570 a 590 nm y en este rango, la emisión de las nanopartículas de *Susp PMC/R6G50-PEG* es mayor que en el rango de emisión del filtro usado en la micrografía c) (Ver Figura 4.14).

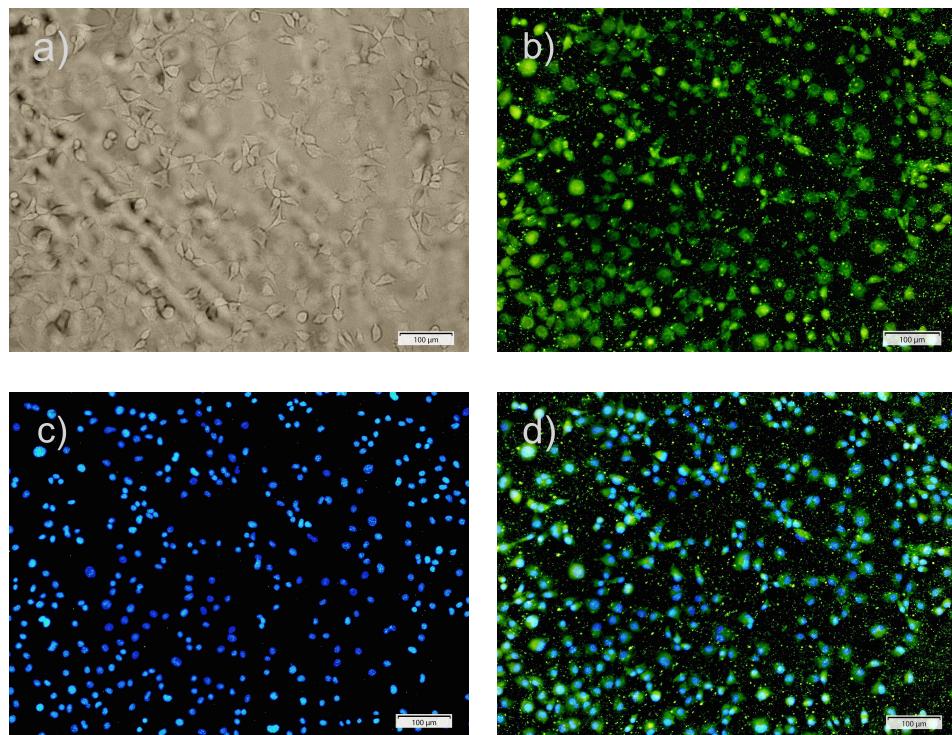


Figura 4.26: a) Campo claro, b)Exc: 420-450 nm, Emisión: 570-590 nm, c) Exc: 330-385 nm, Emisión: 420-500 nm, d) Superposición b) y c). Objetivo de microscopio: 20×, escala 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4 Comparación de propiedades ópticas entre los sistemas etinilfluoreno-nitrilo, etinilfluoreno-piridazina y etinilfluoreno-triazina

Como se vio en la sección 3.2 estos sistemas corresponden al sistema dipolar (al cual se hará referencia como 1NDS), sistema cuadrupolar (2NQS) y sistema octopolar (3NOS) respectivamente; las estructuras químicas se muestran en la figura 3.3.

Inicialmente se prepararon soluciones en THF y suspensiones acuosas de nanopartículas para los tres sistemas, a una concentración de  $6.25 \times 10^{-6} M$  utilizando CTAB. En la figura 4.27 se muestran los espectros de absorción lineal molar  $\epsilon$  de estas soluciones *Sol* y suspensiones *Susp*. La mayor absorción se presenta en el sistema octopolar, luego en el sistema cuadrupolar y finalmente en el sistema dipolar.

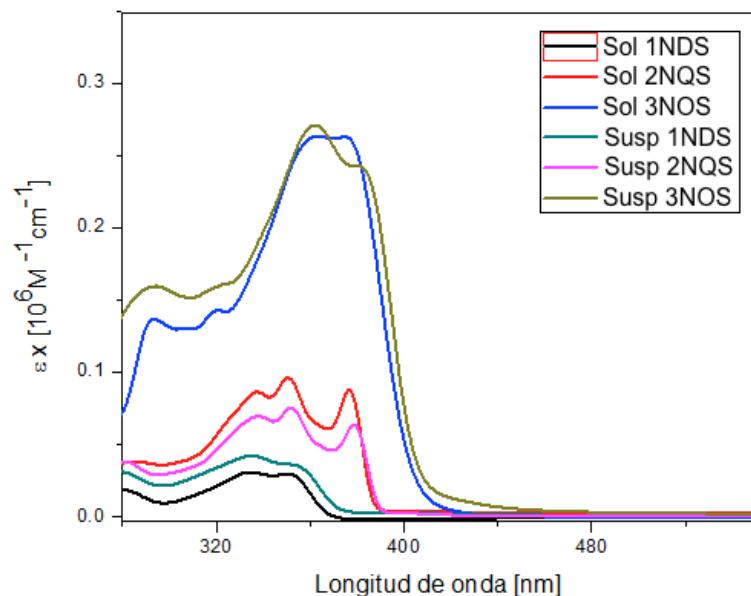


Figura 4.27: Espectros de absorción molar de 1NDS, 2NQS, 3NOS. Las etiquetas *Sol* y *Susp* se refieren a los sistemas moleculares en solución y suspensión respectivamente

Posteriormente se adquirieron los espectros de emisión lineal de las solucio-

nes y suspensiones a la misma concentración, utilizando un diodo láser de  $370\text{ nm}$ . Estos espectros se muestran en la figura 4.28 y se puede apreciar que la mayor emisión se presenta en el sistema octopolar en solución y en suspensión de nanopartículas. En todos los sistemas moleculares la emisión del material en solución fue mayor que en suspensión de nanopartículas y en el caso del sistema octopolar 3NOS, el espectro de emisión en suspensión sufrió un corrimiento hacia el rojo comparado con el espectro en solución (Ver Figura 4.29); esto se atribuye las interacciones moleculares ocasionadas por el confinamiento del material al formar las nanopartículas.

En comparación con el sistema octopolar, la emisión lineal (y no lineal como se verá en seguida) de los sistemas dipolar y cuadrupolar fue muy débil. Por ello únicamente fue de interés medir varias veces la eficiencia cuántica de fluorescencia del sistema octopolar 3NOS, en solución de THF, en suspensión acuosa de nanopartículas utilizando CTAB y en suspensión acuosa de nanoparticulas funcionalizadas con PEG 5000 *Susp PEG 5000* (como se explicará más adelante); todas a una concentración de  $6.25 \times 10^{-6}\text{ M}$ . Los valores obtenidos utilizando la ecuación 2.8 y un factor de corrección de 0.6 para la solución octopolar (por la respuesta del PMT) se muestran en la tabla 4.2.

3NOS	$\Phi_{f1}$	$\Phi_{f2}$	$\Phi_{f3}$	$\Phi_{f4}$	$\Phi_{f5}$	$\Phi_{fPromedio}$	$\Phi_{fPromedio} / \text{corrección PMT}$
Sol	0.457	0.539	0.341	-	-	0.44	0.26
Susp	0.129	0.191	0.094	0.225	0.226	0.17	0.17
Susp PEG 5000	0.078	0.182	0.128	0.116	0.219	0.14	0.14

Tabla 4.2: Valores obtenidos de eficiencia cuántica de fluorescencia  $\Phi$  para el sistema octopolar

Las mediciones de  $\sigma^{TPA}$  en el rango de  $740\text{ nm}$  a  $840\text{ nm}$  para los tres sistemas moleculares se realizaron a una concentración de  $6.25 \times 10^{-6}\text{ M}$ . A esta concentración, la emisión de los sistemas dipolar y cuadrupolar tanto en solución como en suspensión era muy débil y aunque era apenas visible a  $740\text{ nm}$ , no pudo detectarse con el espectrómetro; es decir, los espectros de emisión no lineal de estas muestras estuvieron por debajo del nivel de detección del arreglo experimental (Ver Figura 4.30a). Sin embargo, los espectros del sistema octopolar para algunas longitudes de onda de excitación se muestran en la figura 4.30b y los valores de  $\sigma^{TPA}$  se presentan en la gráfica de la figura 4.31.

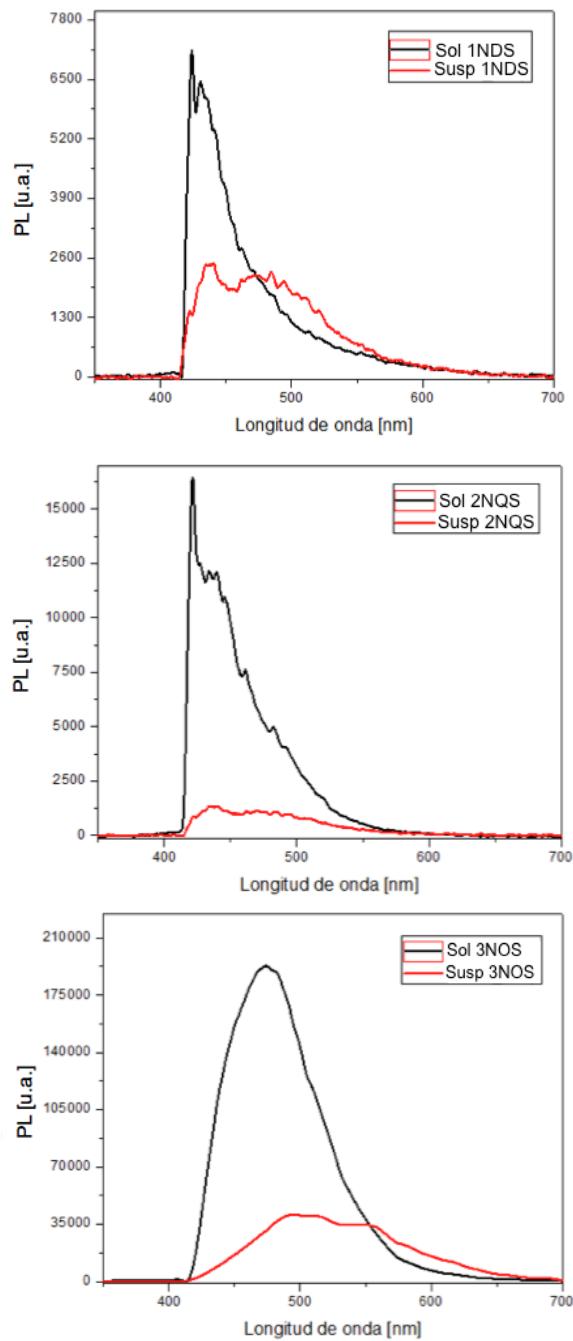


Figura 4.28: Espectros de emisión lineal de 1NDS, 2NQS y 3NOS en solución y suspensión de nanopartículas

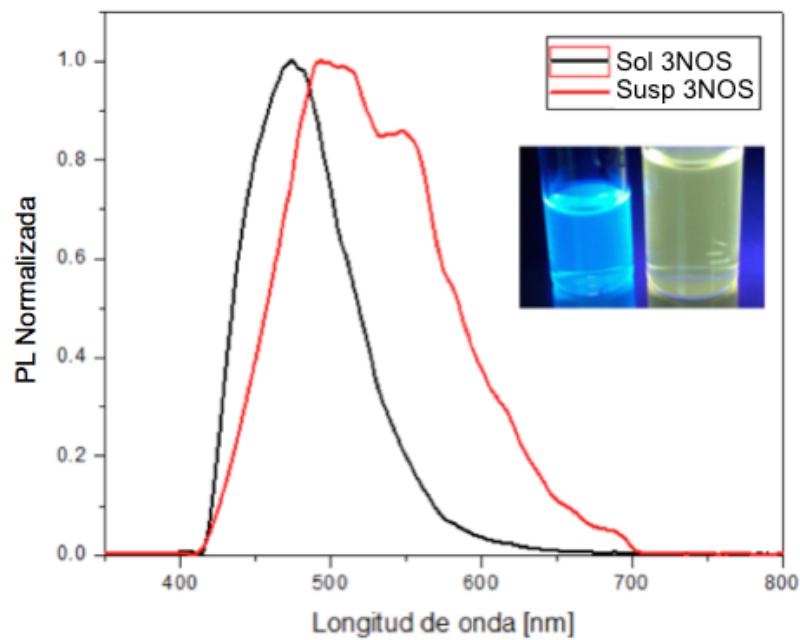
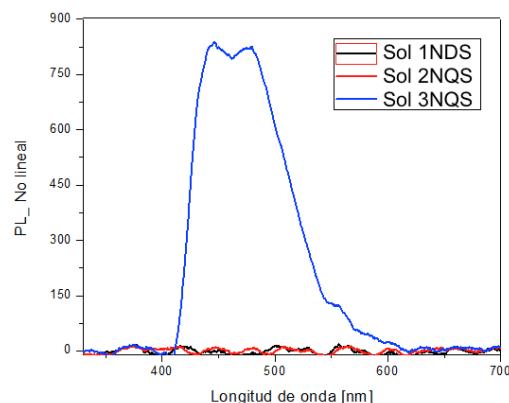
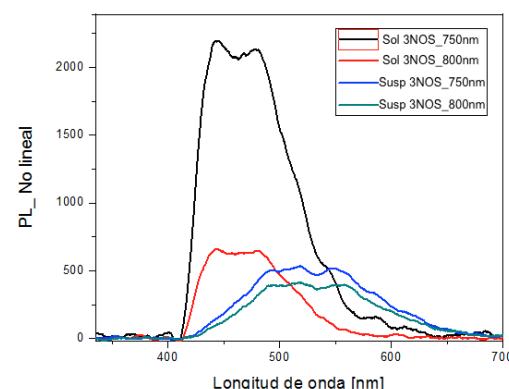


Figura 4.29: Espectros normalizados y fluorescencia visible de *Sol 3NOS* (azul) y *Susp 3NOS* (amarilla)



(a)



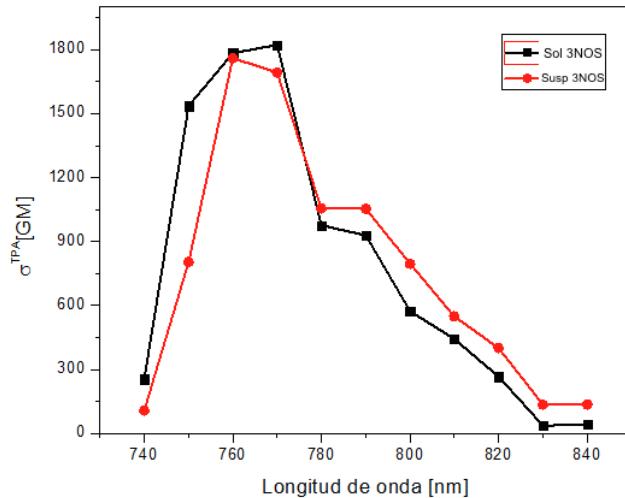


Figura 4.31: Espectro de absorción no lineal de 3NOS en solución y suspensión

Posteriormente se realizaron pruebas para recubrir las nanopartículas de la molécula octopolar con PEG 5000 sin utilizar surfactantes. Se preparó una suspensión acuosa de nanopartículas a una concentración de  $6.43 \times 10^{-6} M$ , utilizando una concentración de PEG 5000 de  $5 \times 10^{-6} M$ ; a esta muestra se hará referencia como *Susp 3NOS PEG 5000*. En la figura 4.32 se muestra una comparación de los espectros de absorción (4.32a) y emisión lineal (4.32b) de la molécula octopolar en solución, suspensión utilizando CTAB y suspensión de nanopartículas funcionalizadas con PEG 5000, todas a la misma concentración  $6.43 \times 10^{-6} M$ .

Se realizaron cinco mediciones de eficiencia cuántica de fluorescencia para la suspensión acuosa de nanopartículas funcionalizadas con PEG 5000 obteniendo una eficiencia promedio  $\Phi_{fPromedio}$  de 0.14, como se mostró en la tabla 4.2. También se midió la sección transversal de absorción de dos fotones de esta suspensión para las siguientes longitudes de onda de excitación: 760, 780, 800 y 815 nm; los valores de  $\sigma^{TPA}$  se muestran en la figura 4.33.

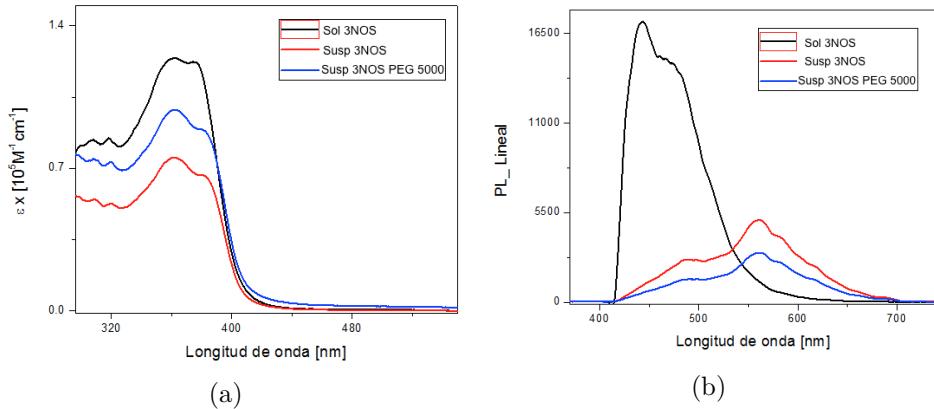


Figura 4.32: Espectros de a)Absorción molar y b)Emisión lineal de *Sol 3NOS*, *Susp 3NOS* y *Susp 3NOS PEG 5000*.

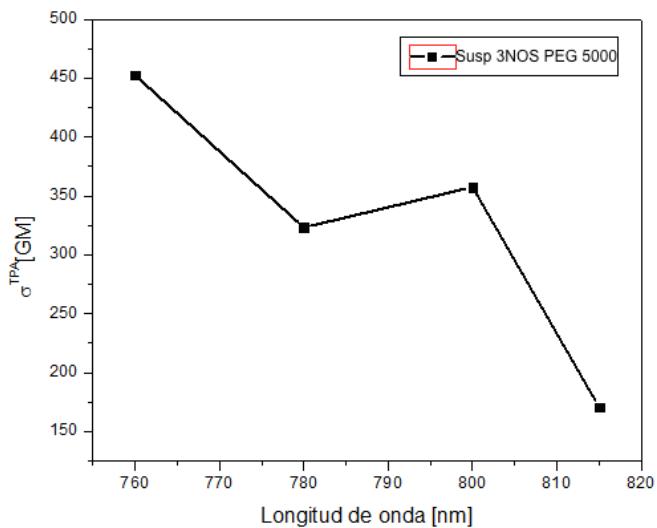


Figura 4.33: Espectro de absorción no lineal de *Susp 3NOS PEG 5000*

En este trabajo la molécula octopolar fue uno de los sistemas moleculares de mayor interés, por ello se determinaron los valores de  $\sigma^{TPA}$  en el rango de longitudes de onda incidentes de 650 a 760 nm implementando el arreglo óptico de TPEF como se explicó en la sección 3.7. En este rango se determinó  $\sigma^{TPA}$  para la molécula 3NOS en solución a una concentración de

$6.43 \times 10^{-6} M$ ; sin embargo, debido a la sensibilidad del arreglo y al nivel de detección, a ciertas longitudes de onda no pudo determinarse  $\sigma^{TPA}$ . Los resultados se muestran en la figura 4.34 junto con los resultados obtenidos anteriormente para la solución en el primer rango, de 740 a 840 nm (Ver Figura 4.31).

Posteriormente se realizó una funcionalización de nanopartículas de la molécula octopolar utilizando ahora PEG 2000, a esta muestra se hará referencia como *Susp 3NOS PEG 2000*. Se preparó una suspensión acuosa de nanopartículas sin CTAB a una concentración de  $6.43 \times 10^{-6} M$  y con una concentración de PEG 2000 de  $6 \times 10^{-4} M$ , dos órdenes de magnitud mayor que al utilizar PEG 5000. Además como se vio en la sección, el PEG 2000 tiene más grupos funcionales que podrían facilitar la unión de las nanopartículas con las células, por ello se decidió enfocar los estudios consecuentes en la suspensión de nanopartículas funcionalizadas con PEG 2000, *Susp 3NOS PEG 2000*.

En la figura 4.35 se muestran un par de imágenes de esta suspensión adquiridas con un microscopio electrónico de transmisión o TEM por sus siglas en inglés, de la marca Philips modelo XL; el diámetro promedio de las nanopartículas que se pudieron apreciar, es de 20.82 nm. Sin embargo, también hay algunos aglomerados más grandes que presentaron un diámetro promedio de 156.25 nm, estos datos se obtuvieron nuevamente utilizando el software libre ImageJ.

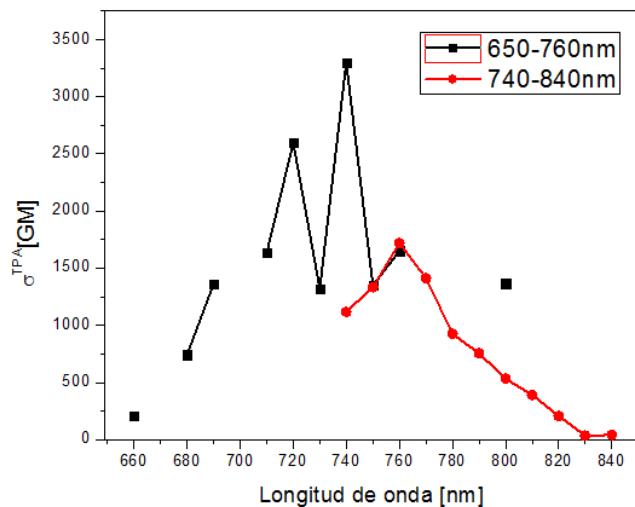


Figura 4.34: Espectros de absorción no lineal de *Sol 3NOS* en rangos de 650–760 nm y de 740 – 840nm.

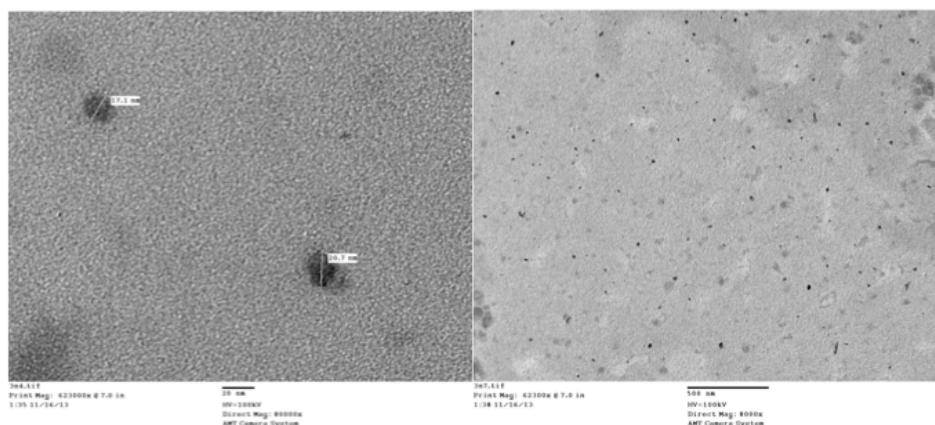


Figura 4.35: Imágenes TEM de 3NOS en suspensión de nanopartículas funcionalizadas con PEG 2000. Escala de 20 y 500 nm

#### 4.4.1 Internalización de nanopartículas 3NOS

En un tiempo de almacenamiento de más de cinco meses a temperatura ambiente la suspensión *Susp 3NOS PEG 2000* no se precipitó. Por ello y por las propiedades ópticas que presentó la molécula octopolar se decidió internalizar esta suspensión en células epiteliales.

Para llevar a cabo la internalización de nanopartículas, siguiendo el protocolo de la sección 3.9, se prepararon diversas sondas con suero fetal bovino y suspensión en diferentes proporciones; sin embargo, se obtuvieron mejores resultados al utilizar únicamente  $50\mu l$  de suspensión de nanopartículas a una concentración de  $6.43 \times 10^{-6} M$ , sin suero.

Las micrografías se obtuvieron nuevamente con el microscopio de epifluorescencia (Ver Fig. 4.22), utilizando distintos objetivos y filtros dicroicos. Para observar de manera específica la tinción con nanopartículas en las células, se utilizó un filtro con excitación de 420 a 450 nm y emisión de 570 a 590 nm; nótese que aunque la absorción de la suspensión *Susp 3NOS PEG 2000* presenta una mínimo valor en este rango (Ver Fig. 4.32a), la absorción del colorante DAPI después de 400 nm es prácticamente nula (Ver Fig. 4.23).

Para apreciar la tinción celular en los núcleos con el colorante DAPI, se utilizó un filtro con excitación de 330 a 385 nm y emisión de 420 a 500 nm; tanto el DAPI como las nanopartículas absorben en el primer rango (330-385nm), como se indica en los espectros de absorción de la figura 4.23 y 4.32a respectivamente. Lo mismo sucede con la emisión, en el rango de 420 a 500 nm el colorante DAPI presenta un valor máximo y las nanopartículas de la suspensión *Susp 3NOS PEG 2000* presentan una mínima emisión pero no nula (Ver Fig. 4.32b). Entonces, utilizar este filtro implica observar la tinción de las células con DAPI y también con las nanopartículas.

En la figura 4.36 se muestra un conjunto de imágenes obtenidas con el microscopio de epifluorescencia, utilizando un objetivo de  $40\times$ . Los incisos del a al d representan lo siguiente: a) Micrografía celular con campo claro, b) Tinción celular con suspensión de nanopartículas utilizando un filtro de excitación en un rango de 420 a 450 nm y detección de 570 a 590 nm, c) Núcleos celulares teñidos con DAPI, utilizando un filtro de excitación de 330 a 385 nm con detección en un rango de 420 a 500 nm, d) Superposición de las micrografías b) y c).

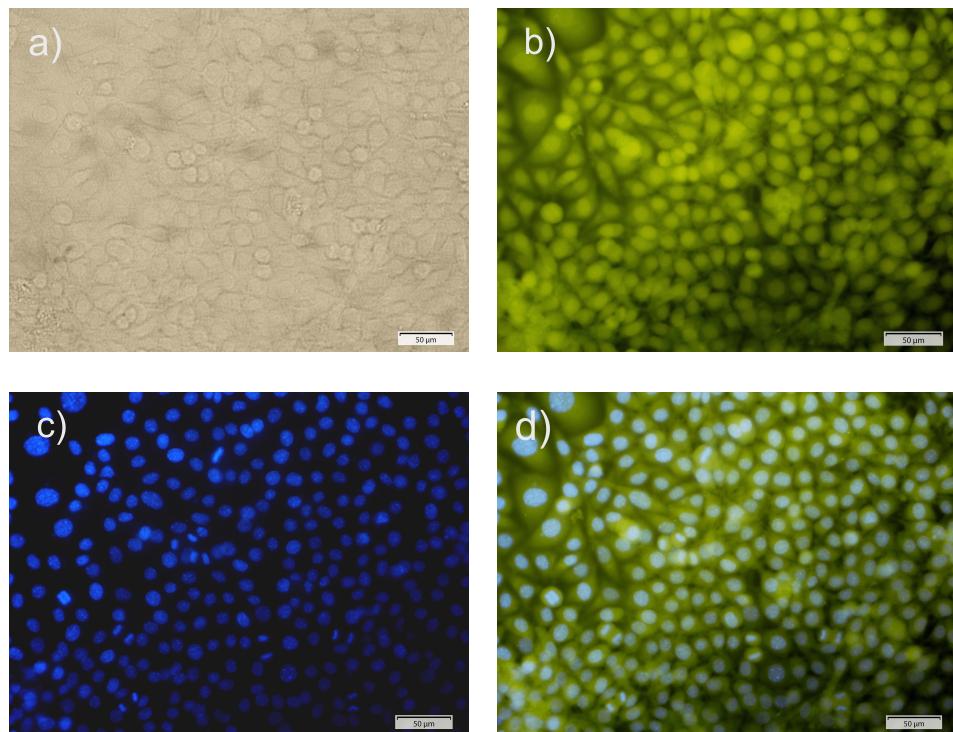


Figura 4.36: a) Campo claro, b)Exc: 420-450 nm, Emisión: 570-590 nm, c) Exc: 330-385 nm, Emisión: 420-500 nm, d) Superposición b) y c). Objutivo de microscopio: 40×, escala 50  $\mu m$ .

Todas las micrografías anteriores son del mismo campo, se adquirieron con un objetivo de microscopio de 40× y la escala que se muestra es de 50 $\mu m$ . En este caso se pensaba que las nanopartículas se quedaron en las membranas celulares, a pesar de estar permeabilizadas; sin embargo, el uso de distintos filtros mostró que esta suspensión tiñó de manera irreversible el citoplasma de las células (nótese que no se aprecian aglomerados de nanopartículas fuera de las células). En la micrografía c) únicamente se aprecia una tinción del núcleo de las células, pero se pueden apreciar algunos elementos dentro del núcleo que presentan una intensidad de fluorescencia mayor que en otras zonas, esto puede deberse a la distinta afinidad que tienen algunas proteínas con el colorante DAPI.

En la figura 4.37 se muestra un conjunto de imágenes obtenidas con un objetivo de 40×. Los incisos del a al d representan lo siguiente: a) Micrografía

con campo claro, *b*) Tinción celular con suspensión de nanopartículas, con filtro de excitación en un rango de 420 a 450 nm y detección de 570 a 590 nm, *c*) Núcleos celulares teñidos con DAPI, utilizando un filtro de excitación de 330 a 385 nm con detección de 420 a 500 nm, *d*) Superposición de las micrografías *b*) y *c*).

A diferencia del conjunto de imágenes anteriores (Ver Fig. 4.36), en la micrografía *c*) de la figura 4.37 se puede apreciar una tinción celular no solo en los núcleos, también en el citoplasma. Lo más probable es que la tinción en el citoplasma corresponda a la suspensión de nanopartículas *Susp 3NOS PEG 2000* porque el filtro utilizado tiene una detección de emisión de 420 a 500 nm y en este rango la emisión de la suspensión es diferente de cero (Ver Fig.4.32b); por otro lado, se sabe que el colorante DAPI es débilmente fluorescente en agua y presenta su máxima emisión solo cuando se une al ADN de los núcleos [27].

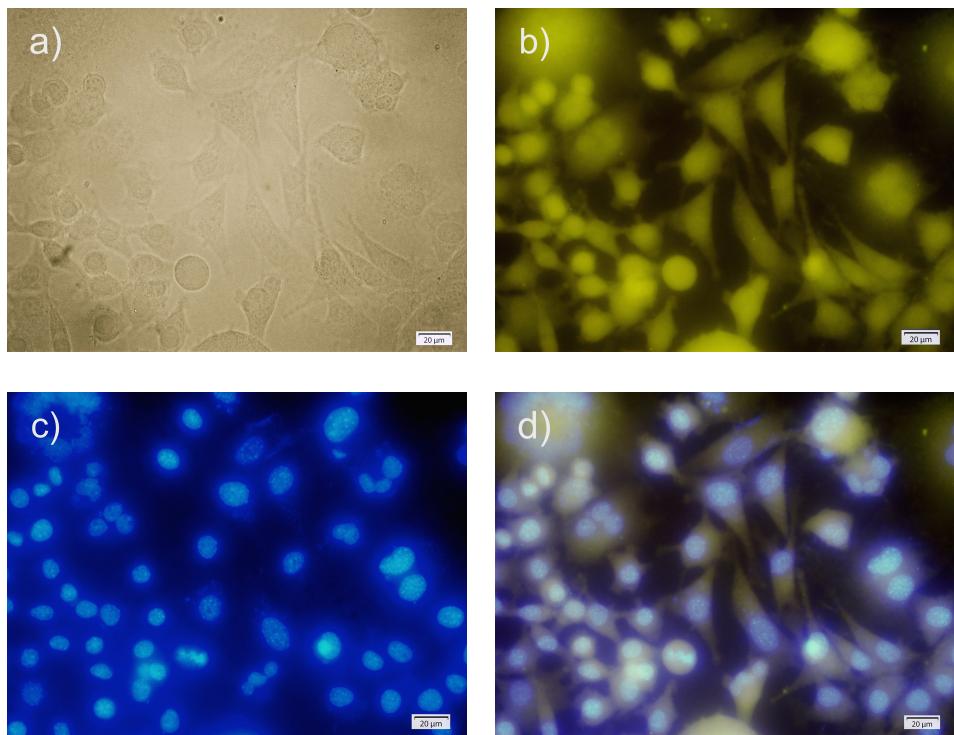


Figura 4.37: a) Campo claro, b)Exc: 420-450 nm, Emisión: 570-590 nm, c) Exc: 330-385 nm, Emisión: 420-500 nm, d) Superposición b) y c). Objutivo de microscopio: 60×, escala 20  $\mu m$ .

## CAPÍTULO 5

# CONCLUSIONES

Se logró realizar una caracterización óptica de diversos sistemas moleculares, polímeros y un dendrímero, sin embargo, la mayoría de éstos, no presentaron las propiedades ópticas deseadas en un marcador celular biocompatible; por ello, los resultados de algunos materiales estudiados no se presentan en este trabajo. Se estudió la emisión de luz inducida por uno y dos fotones, se realizaron comparaciones entre soluciones de THF y suspensiones de nanopartículas utilizando surfactantes; se desarrolló una metodología para funcionalizar nanopartículas. Se determinaron las condiciones para optimizar una transferencia de energía de resonancia Förster. Finalmente se seleccionaron un conjunto de suspensiones acuosas de nanopartículas para ser internalizadas en las células endoteliales y obtener micrografías.

Se sabe que los politiofenos y polifluorenos son estructuras que por separado, tienen propiedades fluorescentes y que pueden modificarse de una manera relativamente sencilla para obtener las propiedades ópticas y propiedades ópticas no lineales que se desean. Sin embargo, los valores de  $\sigma^{TPA}$  que se obtuvieron para copolímero de dos bloques PF2/6-b-P3TMAHT mostraron que lo anterior no necesariamente se cumple en estructuras compuestas por politiofenos y polifluorenos en conjunto.

Los estudios de transferencia de energía que se llevaron a cabo en este trabajo se realizaron utilizando dos materiales cuyas propiedades ópticas ya eran conocidas, ambos tienen una eficiencia cuántica de fluorescencia cercana a uno y se sabe que el polímero presenta una no linealidad alta. Lo que se buscó con esto fue determinar una concentración a la cual es recomendable dopar las nanopartículas de un material con otro distinto para optimizar una transferencia de energía y aprovechar así propiedades de interés específicas de cada material.

Uno de los materiales de mayor interés que se estudiaron en este trabajo fue la molécula octopolar, que a pesar de tener una baja eficiencia cuántica de fluorescencia, presentó una absorción no lineal más grande que las molé-

culas dipolar y cuadrupolar, indicando que la no linealidad aumenta con la complejidad de la distribución de cargas en una molécula.

En cuanto a la funcionalización de nanopartículas que se realizó utilizando dos tipos de PEG, es preciso resaltar un par de aspectos. La concentración de PEG 2000 que se utilizó en las suspensiones fue del orden de  $10^{-4}M$ , ésta concentración se reporta a menudo en la literatura; sin embargo, el PEG 5000 formó suspensiones turbias a esas concentraciones, se tuvieron que utilizar bajas concentraciones del orden de  $10^{-6}$  o menores, y bajo estas circunstancias no es posible asegurar que los efectos que se apreciaron en las propiedades ópticas se deben a la presencia de este PEG o simplemente a la agregación que sufre el material precursor hidrofóbico en agua.

Las suspensiones acuosas de nanopartículas funcionalizadas con PEG 2000 presentaron transparencia y estabilidad; las suspensiones han sido expuestas a la luz y calor del ambiente durante un periodo de ocho meses desde su fabricación y no se ha manifestado una precipitación del material. Como en todas se utilizaron bajas concentraciones de material, lo anterior indica que las concentraciones de PEG 2000 que se manejaron en este trabajo son recomendables para realizar funcionalizaciones.

La permeabilización de las células puede ser una buena opción cuando se desea que las nanopartículas penetren la membrana celular aun cuando se han formado aglomerados de las mismas y a pesar de que por su composición, éstas se unan preferentemente a la membrana. Por otra parte, en este trabajo se observó que las micrografías presentaron un contraste mayor, entre las células y las nanopartículas, utilizando una sonda sin suero fetal bovino; es decir, exponiendo las células únicamente a la suspensión acuosa de nanopartículas.

En las imágenes adquiridas con el microscopio de epifluorescencia logró observarse aparentemente la tinción celular tanto del DAPI en los núcleos como de las nanopartículas en el citoplasma de las células; sin embargo, como trabajo futuro se contempla la obtención de imágenes de las nanopartículas en las líneas celulares utilizando un microscopio multifotón, específicamente de absorción de dos fotones. Con este microscopio, que permite la adquisición de imágenes en planos con distinta profundidad en el mismo campo, se podría verificar que efectivamente las nanopartículas penetraron la membrana y se internalizaron en el citoplasma.

## APÉNDICE A

# FACTOR DE CORRECCIÓN PARA LA EFICIENCIA CUÁNTICA DE FLUORESCENCIA

En la figura A.1 se muestra la curva de sensibilidad de respuesta contra longitud de onda que tiene el PMT modelo R7400U-01.

Cuando la fluorescencia de la muestra de interés y de la referencia (Rodamina 6G) tienen longitudes de onda similares, el PMT responderá de la misma manera en ambas muestras; sin embargo, si la muestra y la referencia emiten en diferentes longitudes de onda es necesario considerar un factor de corrección.

Inicialmente se consideró que para la Rodamina 6G, la longitud de onda en la que se presenta la máxima emisión es de  $600\text{ nm}$ . El factor de corrección se determinó calculando la razón entre el valor de sensibilidad a  $600\text{ nm}$  y el valor de sensibilidad a la longitud de onda de mayor emisión de la muestra de interés. Finalmente para obtener el valor más preciso de  $\Phi_f$  se multiplicó el factor de corrección por el valor de  $\Phi_f$  que se obtiene sin tomar en cuenta la curva de sensibilidad del PMT.

Por ejemplo, para el caso de la molécula octopolar en solución de THF, la cual emitía en azul ( $450\text{ nm}$ ), el factor de corrección fue 0.6 o bien 30/50 que son los valores de sensibilidad a  $600$  y  $450\text{ nm}$  respectivamente. Este valor se multiplicó por  $\Phi_{fPromedio} = 0.44$  para obtener  $\Phi_f = 0.26$  como se indicó en la tabla 4.2.

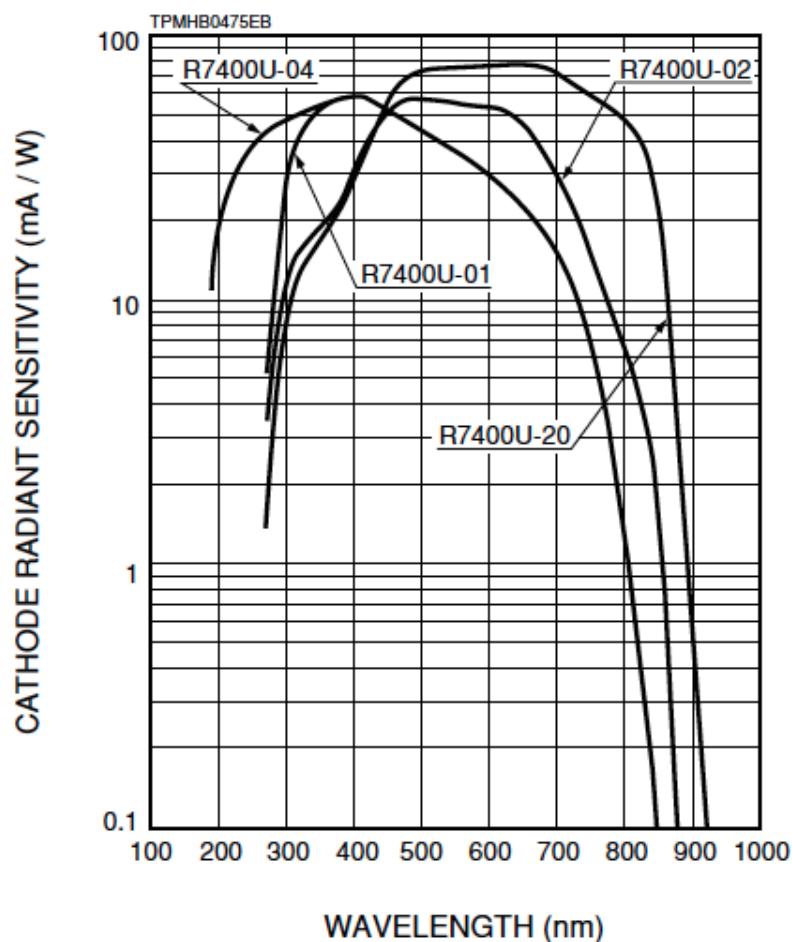


Figura A.1: Sensibilidad de respuesta del PMT. *Imagen adquirida de la hoja de especificaciones del PMT marca HAMAMATSU modelo R7400U-01.*

# BIBLIOGRAFÍA

- [1] N. Rusk. (1911, 1929, 1967) First fluorescence microscope, First epi-fluorescence microscope, The dichroic mirror. *Nature*, 2009.
- [2] B.R. Masters. *Confocal Microscopy and Multiphoton Excitation Microscopy, The Genesis of Live Cell Imaging*. SPIE PRESS, 2006.
- [3] S.M. Wilson and A. Bacic. Preparation of plant cells for transmission electron microscopy to optimize immunogold labeling of carbohydrate and protein epitopes. *Nature Protocols*, 7:1716–1727, 2012.
- [4] P.N. Prasad. *Introduction to Biophotonics*. Wiley- Interscience, 2003.
- [5] A.M. Derfus, W.C.W. Chan, and S.N. Bhatia. Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots. *Nano Letters*, pages 11–18, 2004.
- [6] H.S. Choi, W. Liu, P. Misra, E. Tanaka, J.P. Zimmer, B.I. Ipe, M.G. Bawendi, and J.V. Frangioni. Renal clearance of quantum dots. *Nature Biotechnology*, 25:1165–1170, 2007.
- [7] X. Zhang, X. Zhang, S. Wang, M. Liu, L. Tao, and Y. Wei. Surfactant modification of aggregation-induced emission material as biocompatible nanoparticles: Facile preparation and cell imaging. *Nanoscale*, 5:147–150, 2013.
- [8] R. Gref, A. Domb, P. Quellec, T. Blunk, R.H. Müller, J.M. Verbavatz, and R. Langer. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16:215, 1995.
- [9] K.R. Spring. Fluorescence Microscopy. *Marcel Dekker, Inc.*, 2003.
- [10] N.S. Claxton, T.J. Fellers, and M.W. Davidson. Laser scanning confocal microscopy. *Department of Optical Microscopy and Digital Imaging, National High Magnetic Field Laboratory, Florida State University. Unpublished* (<http://www.olympusfluoview.com/theory/LSCMIntro.pdf>), page 37, 2005.

- [11] J. Yvon. A Guide to Recording Fluorescence Quantum Yields. *Horiba Scientific*.
- [12] A. Kobayashi. *Absolute Measurements of Photoluminescence Quantum Yields of Organic Compounds Using an Integrating Sphere*. PhD thesis, Gunma University, 2010.
- [13] R.W. Boyd. *Nonlinear Optics*. Academic Press, third edition, 2008.
- [14] B.R. Masters and P.T.C. So. *Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy*. Oxford, University Press, 2008.
- [15] M.C. Rumi and J.W. Perry. Two-photon absorption: an overview of measurements and principles. *Advances in Optics and Photonics*, 2:451–518, 2010.
- [16] M. Pawlicki, H.A. Collins, R.G. Denning, and H.L. Anderson. Two-Photon Absorption and the Design of Two-Photon Dyes. *Angewandte Chemie*, 48:3244–3266, 2009.
- [17] M.A. Albota, C. Xu, and W.W. Webb. Two-photon fluorescence excitation cross sections of biomolecular probes from 690 to 960 nm. *Applied Optics*, 37, 1998.
- [18] C. Xu and W.W. Webb. Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. *Optical Society of America*, 13, 1996.
- [19] C. Xu, W. Zipfel, J. Shear, R. Williams, and W.W. Webb. Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological nonlinear microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93:10763–10768, 1996.
- [20] G. Ramos-Ortíz, J.L. Maldonado, M.C.G. Hernández, M.G. Zolotukhin, S. Fomine, N. Fröhlich, U. Scherf, F. Galbrecht, E. Preis, M. Salmon, J. Cárdenas, and M.I. Chávez. Synthesis, characterization and third-order non-linear optical properties of novel fluorene monomers and their cross-conjugated polymers. *Polymer*, 51:2351–2359, 2010.
- [21] K. Ujikiye-Ishii, E. Kwon, H. Kasai, H. Nakanishi, and H. Oikawa. Methodological Features of the Emulsion and Reprecipitation Methods for Organic Nanocrystal Fabrication. *Crystal Growth & Design*, 8:369–371, 2007.

- [22] Y.S. Zhao, H. Fu, A. Peng, Y. Ma, D. Xiao, and J. Yao. Low- Dimensional Nanomaterials Based on Small Organic Molecules: Preparation and Optoelectronic Properties. *Advanced Materials*, 20:2859–2876, 2008.
- [23] N.S. Makarov, M. Drobizhev, and A. Rebane. Two-photon absorption standards in the 550-1600 nm excitation wavelength range. *Optics Express*, 16:4029–4047, 2008.
- [24] A. Gutacker, S. Adamczyk, A. Helfer, L.E. Garner, R.C. Evans, S.M. Fonseca, M. Knaapila, G.C. Bazan, H.D. Burrowsd, and U. Scherf. All-conjugated polyelectrolyte block copolymers. *Journal of Materials Chemistry*, 20:1423–1430, 2010.
- [25] L. Aparicio-Ixta, G. Ramos-Ortiz, J.L. Pichardo-Molina, M. Maldonado, J.L. Rodríguez, V.M. Tellez-Lopez, D. Martinez-Fong, M.G. Zolotukhin, S. Fomine, M.A. Meneses-Navá, and O. Barbosa-García. Two-photon excited fluorescence of silica nanoparticles loaded with a fluorene-based monomer and its cross conjugated polymer: their application to cell imaging. *The Royal Society of Chemistry*, 4:7751–7759, 2012.
- [26] E. T. Kang K. G. Neoh Z. H. Ma K. L . Tan M. Atreya, S. Li and W. Huang. Stability studies of poly(2-methoxy-5-(2'-ethyl hexyloxy)- p-(phenylene vinylene) [MEH-PPV]. *Polymer Degradation and Stability*, 65:287–296, 1999.
- [27] Joseph R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, third edition, 2006.