



CENTRO DE INVESTIGACIONES
EN OPTICA, A.C.

**“ESTUDIO ESPECTROSCÓPICO PARA LA
TRANSFERENCIA DE ENERGÍA ENTRE UN
POLÍMERO FLUORESCENTE NO LINEAL Y UN
FOTOSENSIBILIZADOR”**



Versión definitiva. Incluye cambios sugeridos por los revisores.

Tesis que para obtener el grado de Maestra en Ciencias (Óptica)

Presenta: Stephany Samayrani Camarena López

Director de Tesis: Dr. Gabriel Ramos Ortiz

Vo. Bo.

León · Guanajuato · México

26 de febrero de 2025

Agradecimientos

Agradezco a CONAHCYT por el apoyo financiero que me sostuvo durante todo mi programa de posgrado.

Agradezco al Dr. Gabriel Ramos Ortiz por su invaluable guía, apoyo constante, su disposición para compartir su conocimiento y su compromiso por fomentar mi crecimiento académico y profesional. Su confianza en mi capacidad y su acompañamiento en cada etapa de esta investigación me motivaron a esforzarme y alcanzar mis objetivos.

Agradezco a la Dra. Reyna y a la Dra. Alma Camacho por el préstamo de material de los Laboratorios de Posgrado de Óptica que fue indispensable para la implementación de los arreglos ópticos en los experimentos de esta tesis.

Agradezco a Martín Olmos y al Dr. Mario Rodríguez por su invaluable apoyo al facilitarme el acceso al Laboratorio de Materiales. Asimismo, expreso mi gratitud al Dr. Haggeo Desirena por brindarme acceso al Laboratorio de Nanofotónica, lo cual fue fundamental para la preparación de diversas muestras utilizadas en este trabajo.

Agradezco a la Dra. Lérica Liss Flores Villavicencio por su valiosa enseñanza en el método de tinción celular y por facilitar el cultivo de células SH-SY5Y, contribuyendo de manera significativa al desarrollo de este trabajo.

Agradezco al Dr. Mikhail G. Zolotukhin por su generosidad al proporcionar el polímero orgánico fluorescente con respuesta óptica no lineal (PFNL), el cual fue esencial para la realización de los experimentos ópticos principales de esta tesis.

Agradezco mi compañero de grupo Anderson Álvarez Quesada, por su valiosa ayuda y disposición al compartir sus conocimientos, los cuales fueron esenciales para la fabricación de las películas estudiadas en esta tesis.

Resumen

El proceso físico de transferencia de energía (TE) de un donador molecular (D) hacia un aceptor molecular (A) mediante excitación óptica encuentra muchas aplicaciones en el área de optoelectrónica y biofotónica [1, 2]. La TE puede ocurrir a distancias de interacción de largo y corto alcance [2]. Por ejemplo, a corta distancia una interacción dipolo-dipolo puede conducir al fenómeno conocido transferencia de energía de resonancia de Förster, FRET por sus siglas en inglés, de D a A, mientras que a larga distancia se presenta transferencia de energía radiativa ya que A puede absorber la fluorescencia emitida por D. Tanto la TE no radiativa (FRET) como la radiativa tienen lugar cuando D se excita inicialmente y después es capaz de excitar indirectamente con su energía al A, siempre que exista una superposición entre su espectro de emisión y el espectro de absorción del aceptor. Dependiendo de las aplicaciones, D y A se seleccionan cuidadosamente para producir la TE más eficiente. Por tanto, la determinación del tipo de TE y su eficiencia es de suma importancia.

Para el presente estudio, un polímero orgánico fluorescente y de respuesta óptica no lineal (PFNL), el cual tiene 95 % de rendimiento cuántico de fluorescencia en THF [3], es usado para transferir energía al fotosensibilizador rosa de bengala (RB). Este fotosensibilizador es una molécula modelo para estudios de terapia fotodinámica del tejido canceroso, ya que ofrece generación eficiente de especies reactivas de oxígeno, ROS por sus siglas en inglés, del 82 % [4], sin embargo, sufre la limitación de ser fotoactivo en longitudes de onda fuera de la ventana de interés biomédico (700 - 900nm). Para evitar esta limitación, aquí se demuestra que PFNL, caracterizado por una sección transversal de absorción no lineal del orden de 10^3 GM, puede excitarse en longitudes de onda dentro de la ventana de interés biomédico y producir TE en RB para la subsecuente generación de ROS.

Se presenta una investigación detallada de la generación de ROS en RB y de la fotofísica de la interacción D (PFNL) -A (RB), tanto en el régimen de excitación lineal utilizando un láser de onda continua con emisión en el visible, como en el régimen de excitación no lineal con un láser pulsado de femtosegundos en el infrarrojo. Se determina la eficiencia de TE radiativa y no radiativa cuando D y A interactúan en tres plataformas diferentes: 1) en fase líquida con soluciones orgánicas de diferentes concentraciones; 2) en fase sólida con diferentes proporciones de D y A y; 3) en nanopartículas suspendidas en un medio acuoso.

Una vez determinada experimentalmente la vida media de estados excitados de D y A, se encuentra que la eficiencia de TE radiativa en soluciones de concentración molecular en proporción 1:2, para el caso de excitación lineal y no lineal, es del 74 % y 90 %, respectivamente. Por otra parte, la eficiencia de FRET en fase sólida y en nanopartículas a la misma proporción es de 19 % y 75 % respectivamente. Una vez demostrada la TE del tipo no radiativa (FRET), los compósitos PFNL-RB son internalizados en la línea celular de neuroblastoma (SH-SY5Y) para realizar estudios *in vitro* del proceso mediante microscopia multifotónica.

Considerando estos resultados y que el sistema molecular D-A presentado es completamente orgánico, se concluye que este nanocompósito tiene potencial para estudios *in vivo* de terapia fotodinámica a través de la excitación en la ventana de interés biomédico (NIR) con bajos niveles de intensidad óptica y ofrece profundidad de penetración en tejido celular.

Índice general

Agradecimientos	I
Resumen	III
1. Introducción	1
1.1. Fotobiología	1
1.2. Fototerapia, fotoquimioterapia y terapia fotodinámica	1
1.2.1. Fototerapia	2
1.2.2. Fotoquimioterapia	2
1.2.3. Terapia Fotodinámica	2
1.3. Ventana óptica de interés biológico	2
1.4. Transferencia de energía resonante tipo Förster	4
1.5. Nanopartículas en la terapia fotodinámica	5
2. Generación de especies reactivas de oxígeno en la terapia fotodinámica	7
2.1. Terapia fotodinámica	7
2.2. Fotosensibilizador	8
2.3. Especies reactivas de oxígeno	9
2.3.1. Oxígeno molecular	9
2.3.2. Oxígeno singlete	9
2.3.3. Mecanismos para la generación de ROS	11
2.4. Moléculas como fotosensibilizadores prototipo	11
Rosa de bengala	11
Rodamina 6G	12
2.4.1. Moléculas detectoras de oxígeno singlete (trampa) prototipo	13
Ácido úrico	13
Difenilsobenzofurano	14
Ácido 9,10 - antracendiil-bis (metilen) dimalónico	15
3. Desarrollo experimental y análisis espectroscópico	17
3.1. Generación de especies reactivas de oxígeno con excitación lineal utilizando RB como PS	17
3.1.1. Medición de transmitancia	17
3.1.2. Excitación láser de un fotosensibilizador para la generación de especies reactivas de oxígeno	19
3.1.3. Ácido úrico como detector de oxígeno singlete generado por RB en un medio acuoso.	19
3.1.4. DPBF como detector de oxígeno singlete generado por RB en THF.	20
3.2. Polímero fluorescente no lineal como donador para transferencia de energía.	21

3.2.1.	Excitación lineal de donador : aceptor en disolución.	22
3.2.2.	Excitación lineal de PFNL:R6G en disolución	22
3.2.3.	Excitación lineal de PFNL:RB en disolución	25
3.2.4.	Detección de ROS en disolución de PFNL:RB:DPBF con excitación lineal	26
3.2.5.	Excitación no lineal de PFNL:RB en disolución	28
3.2.6.	Detección de ROS en disolución de PFNL:RB con excitación no lineal .	30
3.3.	Polímero fluorescente no lineal como donador para FRET en películas	32
3.3.1.	Películas de PFNL:RB	32
3.3.2.	Películas de PFNL:RB:PS	32
3.4.	Polímero fluorescente no lineal como donador para FRET en nanopartículas .	35
3.5.	Internalización celular con nanopartículas de PFNL-RB	37
4.	Resultados	39
4.1.	Generación de especies reactivas de oxígeno con excitación lineal	39
4.1.1.	Análisis de detección de ROS en disolución PFNL:RB:DPBF con exci- tación lineal	39
4.1.2.	Degradación relativa con excitación lineal	40
4.2.	Generación de especies reactivas de oxígeno con excitación no lineal	43
4.2.1.	Análisis de detección de ROS en disolución PFNL:RB:DPBF con exci- tación no lineal	43
4.2.2.	Degradación relativa con excitación no lineal	44
4.3.	Transferencia de energía de PFNL:R6G en disolución	46
4.4.	Transferencia de energía de PFNL:RB en disolución	49
4.5.	Transferencia de energía de PFNL:RB en película	52
4.6.	Transferencia de energía de PFNL:RB:PS en película	54
4.7.	Transferencia de energía de PFNL:RB en nanopartículas	55
4.8.	Microscopía electrónica de barrido	58
4.9.	Microscopía óptica	59
4.9.1.	Microscopía de fluorescencia	60
4.9.2.	Microscopía de excitación multifotónica	62
4.9.3.	Imágenes espectrales	65
5.	Conclusiones	69
	Bibliografía	71

Índice de figuras

1.1. Profundidad de penetración de varios láseres.	3
1.2. Superposición de los espectros de emisión del donador y absorción del aceptor y dependencia de la eficiencia de transferencia de energía respecto a la distancia	5
1.3. Proceso FRET en terapia fotodinámica	6
2.1. Terapia fotodinámica.	7
2.2. Diagrama de Jablonsky adaptado al PS	9
2.3. Muerte celular	10
2.4. Estructura molecular del rosa de bengala	12
2.5. Espectro de absorción y emisión de rosa de bengala en THF.	12
2.6. Estructura molecular de rodamina 6G	12
2.7. Espectro de absorción y emisión de rodamina 6G en THF.	13
2.8. Estructura molecular del ácido Úrico	13
2.9. Espectro de absorción del ácido úrico en un medio acuoso.	14
2.10. Estructura molecular del DPBF	15
2.11. Espectro de absorción del DPBF en THF	15
2.12. Estructura molecular del ABDA	15
3.1. Arreglo óptico 1. Medidor de absorbancia en tiempo real utilizado para la detección indirecta de generación de ROS	18
3.2. Espectro de emisión de lámpara de halógeno	18
3.3. Arreglo óptico 2. Excitación de un fotosensibilizador para la generación de ROS.	19
3.4. Degradación molecular del UA por RB con excitación lineal	20
3.5. Degradación molecular del DPBF por RB con excitación lineal	21
3.6. Estructura molecular del PFNL	22
3.7. Superposición espectral entre PFNL-RB y PFNL-R6G	22
3.8. Arreglo óptico 3. Excitación de donador para transferencia de energía	23
3.9. Emisión de mezclas de PFNL:R6G con excitación lineal	24
3.10. Emisión de mezclas de PFNL:RB con excitación lineal	25
3.11. Superposición de los espectros de absorción de PFNL y DPBF	27
3.12. Degradación molecular del DPBF por RB y PFNL con excitación lineal	27
3.13. Arreglo óptico 4. Excitación no lineal de donador para transferencia de energía	28
3.14. Espectros de emisión de mezclas de PFNL:RB con excitación no lineal	29
3.15. Degradación molecular del DPBF por RB con excitación no lineal	30
3.16. Degradación molecular del DPBF por RB y PFNL con excitación no lineal	31
3.17. Emisión de películas PFNL:RB con excitación lineal	33
3.18. Emisión normalizada de películas PFNL:RB con excitación lineal	33
3.19. Emisión de películas PFNL:RB:PS con excitación lineal	34

3.20. Emisión normalizada de películas PFNL:RB:PS con excitación lineal	35
3.21. Emisión de nanopartículas de PFNL:RB con excitación lineal	37
3.22. Absorción de nanopartículas de PFNL:RB	37
3.23. Superposición espectral entre PFNL, RB y DAPI	38
4.1. Procesamiento de Degradación de DPBF por RB y PFNL con excitación lineal	40
4.2. Degradación relativa con excitación lineal	41
4.3. Procesamiento de Degradación de DPBF por RB y PFNL con excitación no lineal	43
4.4. Degradación relativa con excitación no lineal	44
4.5. Tiempos de decaimiento de disoluciones de PFNL:R6G detectando a 480 nm .	46
4.6. Tiempos de decaimiento de disoluciones de PFNL:R6G detectando a 535 nm .	48
4.7. Tiempos de decaimiento de disoluciones de PFNL:RB detectando a 535 nm . .	50
4.8. Tiempos de decaimiento de disoluciones de PFNL:RB detectando a 577 nm . .	52
4.9. Tiempos de decaimiento de películas de PFNL:RB detectando a 550 nm	53
4.10. Tiempos de decaimiento de películas de PFNL:RB:PS detectando a 550 nm . .	54
4.11. Tiempos de decaimiento de nanopartículas PFNL:RB detectando a 550 nm . .	57
4.12. Tiempos de decaimiento de nanopartículas PFNL:RB detectando a 577 nm . .	58
4.13. Nanopartículas	59
4.14. Rangos de detección de fluorescencia	61
4.15. Micrografías de fluorescencia de NPs PFNL:RB en células, con excitación lineal	61
4.16. Colocalización de NPs en células, con excitación lineal	63
4.17. Micrografías de excitación multifotónica de NPs en células, con excitación no lineal	64
4.18. Imágenes espectrales de NPs en células, con excitación no lineal	66

Índice de tablas

3.1. Proporciones molares de la disolución RB:UA	20
3.2. Proporciones molares de la disolución RB:DPBF	21
3.3. Emisión de PFNL absorbida por R6G en disolución $\lambda_{exc} = 402 \text{ nm}$, $\lambda_{exc} = 529 \text{ nm}$	24
3.4. Emisión de PFNL absorbida por RB en disolución. $\lambda_{exc} = 402 \text{ nm}$, $\lambda_{det} = 556 \text{ nm}$	26
3.5. Proporciones molares de la disolución PFNL:RB:DPBF 1	27
3.6. Emisión de PFNL absorbida por RB en disolución. $\lambda_{exc} = 800 \text{ nm}$, $\lambda_{det} = 556 \text{ nm}$	29
3.7. Proporciones molares de la disolución RB:DPBF 2	30
3.8. Proporciones molares de la disolución PFNL:RB:DPBF 2	31
3.9. Proporciones molares de películas PFNL:RB	33
3.10. Proporciones molares de película PFNL:RB:PS	34
3.11. Proporciones molares de nanopartículas PFNL:RB	36
4.1. Disoluciones utilizadas para cuantificar la degradación de DPBF debido a ROS producidas con excitación lineal	40
4.2. Disoluciones utilizadas para cuantificar la degradación de DPBF debido a ROS producidas con excitación no lineal	43
4.3. Tiempos de vida de disoluciones de PFNL:R6G. $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{det} = 480 \text{ nm}$	47
4.4. Tiempos de vida de disoluciones de PFNL:R6G. $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{det} = 535 \text{ nm}$	49
4.5. Tiempos de Vida de Disolución de PFNL:RB. $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{det} = 535 \text{ nm}$	51
4.6. Tiempos de Vida de Disolución de PFNL:RB. $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{det} = 577 \text{ nm}$	52
4.7. Tiempos de vida de películas de PFNL:RB. $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{det} = 550 \text{ nm}$	54
4.8. Tiempos de vida de películas de PFNL:RB:PS. $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{det} = 550 \text{ nm}$	55
4.9. Tiempos de vida de nanopartículas de PFNL:RB. $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{det} = 535 \text{ nm}$	56
4.10. Tiempos de vida de nanopartículas de PFNL:RB. $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{det} = 577 \text{ nm}$	58

A mi eterna madre...

*Gracias por ser mi mayor creyente y soñadora incansable a mi lado.
Desde el inicio de mi carrera profesional hasta este momento, tu
apoyo incondicional ha sido el pilar que me sostiene.*

*Tu fé en mi potencial ha sido el motor que me impulsa a seguir
adelante, y tu orgullo por cada pequeño logro que he alcanzado me
llena de fuerzas para superar cualquier desafío.*

*Cada paso dado en este camino lleva consigo la confianza que
siempre has depositado en mí y el amor infinito que me has
brindado.*

*Por ser mi guía, mi fortaleza y mi inspiración, siempre te estaré
agradecida.*

*Esta aventura comenzó con la fascinación de explorar una ciencia multidisciplinaria, una que une la física, la química, la biología y la medicina para desentrañar los misterios de cómo la luz interactúa con la vida. Y hoy, esa luz, que al principio era solo curiosidad, ha tomado forma y brilla intensamente en mis brazos...
para ti, mi amado Magnus Gabriel.*

Capítulo 1

Introducción

1.1. Fotobiología

La interacción entre la radiación y la materia en el ámbito de la medicina es fundamental para aplicaciones diagnósticas y terapéuticas. Estas interacciones permiten identificar enfermedades, tratar patologías y hasta comprender procesos biológicos. La radiación incluye tanto radiaciones ionizantes (rayos X, rayos gamma, partículas) como no ionizantes (luz visible, ultravioleta, infrarrojo, microondas). Estas aplicaciones han permitido desarrollar tecnología altamente especializada para realizar procedimientos de mínima invasión con tasas de éxito muy satisfactorias.

La rama de la ciencia que estudia específicamente las interacciones entre la luz y los sistemas biológicos es la fotobiología y la biofotónica, las cuales se encargan de investigar cómo los organismos vivos detectan, responden y se adaptan a la luz, así como los efectos positivos y/o dañinos de la radiación electromagnética sobre las células, tejidos y organismos en general. Algunas de las áreas de estudio de la fotobiología son:

- Fotorreceptores biológicos: Moléculas que absorben luz, como clorofila (en plantas) y rodopsina (en los ojos humanos).
- Fotoprotección: Mecanismos biológicos para evitar daños por luz, como la producción de melanina o antioxidantes.
- Fotomedicina: Uso terapéutico de la luz, como en la fototerapia, la fotoquimioterapia y la terapia fotodinámica.
- Efectos ecológicos: Impacto de la luz en ecosistemas, como el crecimiento de plantas y la bioluminiscencia en organismos marinos.

1.2. Fototerapia, fotoquimioterapia y terapia fotodinámica

La fototerapia, la fotoquimioterapia y la terapia fotodinámica (PDT) son tratamientos médicos que utilizan la luz, pero tienen mecanismos, aplicaciones y objetivos distintos. En las tres técnicas de tratamiento es indispensable la luz y en algunos casos se puede utilizar una molécula cromófora o fotosensibilizador (PS). A continuación, se describen las definiciones de cada una de estas técnicas.

1.2.1. Fototerapia

La fototerapia es una tecnología que utiliza longitudes de onda específicas para inducir cambios fisiológicos o químicos en los tejidos sin necesidad de un PS. Esta técnica emplea luz ultravioleta A (320 – 400 *nm*), luz visible (380 – 750 *nm*) y luz infrarroja cercana (750 – 1100 *nm*) para tratar diversas enfermedades. La exposición directa de un cromóforo presente en el tejido a la luz puede impactar significativamente en procesos biológicos clave.

Un ejemplo destacado es la fototerapia aplicada a neonatos con hiperbilirrubinemia (un exceso de bilirrubina en la piel), que provoca ictericia. En este caso, la bilirrubina actúa como cromóforo en el organismo (endógeno) y, al exponerse a la luz azul del espectro visible, su estructura se modifica, transformándose en formas más solubles en agua. Esto facilita su excreción a través del hígado y los riñones.

1.2.2. Fotoquimioterapia

La fotoquimioterapia utiliza la misma luz que en la fototerapia, pero la luz incide en un cromóforo exógeno, que puede ser administrado a los pacientes de forma oral o tópica. Un ejemplo es la terapia PUVA (Psoraleno + UVA) para el tratamiento de psoriasis (sarpullido con manchas rojas), donde se administra psoraleno para sensibilizar las células a la radiación UVA, generando un efecto terapéutico inhibiendo la proliferación celular.

1.2.3. Terapia Fotodinámica

La terapia fotodinámica (PDT) es una tecnología médica de mínima invasividad, que utiliza fuentes de luz, comúnmente láseres, en el espectro visible y en el infrarrojo cercano, que son capaces de activar fármacos fotosensibles para el tratamiento y diagnóstico de procesos precancerosos y cancerosos por un medio no quirúrgico [5].

La PDT implica la administración de un fotosensibilizador (PS) que, tras acumularse selectivamente en el tejido afectado mediante vías sistémicas o tópicas, es irradiado con una fuente de luz con una longitud de onda específica, coincidente con el espectro de absorción del PS, para su fotoactivación. Una vez activado, el PS inicia un proceso no radiativo en presencia del oxígeno molecular (1O_2) disponible en el tejido. Como resultado de esta interacción energética entre luz, PS y oxígeno, tres elementos imprescindibles en la PDT, se obtiene la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres cito-tóxicos que disminuyen la viabilidad celular.

1.3. Ventana óptica de interés biológico

La terapia fotodinámica (PDT) emplea luz en los espectros visible e infrarrojo cercano, en combinación con la administración de un PS. Sin embargo, la luz visible presenta una limitada capacidad de penetración en los tejidos debido a la absorción y dispersión de la luz, lo que restringe su efectividad en tumores de gran tamaño, ver Figura 1.1.

Existe una ventana óptica en los tejidos biológicos dentro del rango de 700 – 1 300 y es considerada para superar las limitaciones de la absorción de luz en el tejido biológico. La

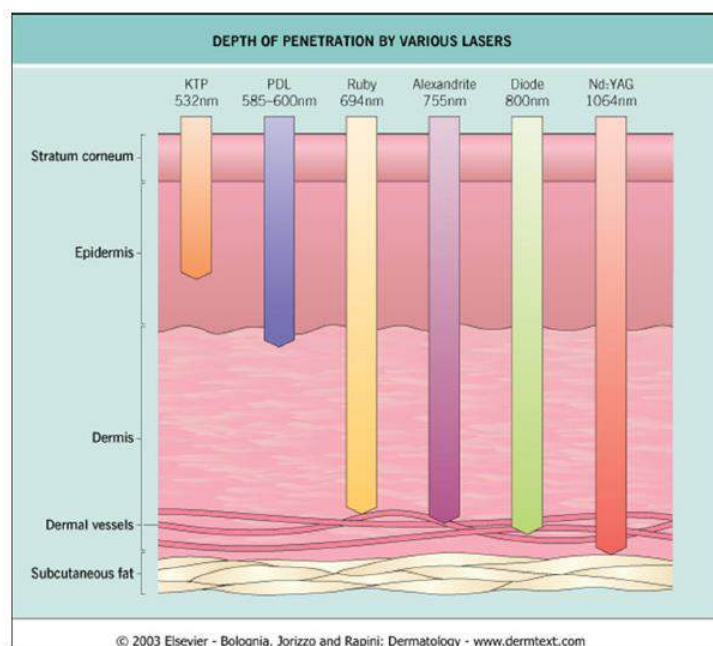


FIGURA 1.1: Profundidad de penetración de varios láseres.
(Esta figura fue publicada en Dermatología, Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, p. 2148, Copyright Mosby Elsevier, 2003 [6]).

investigaciones actuales sobre PDT buscar utilizar luz en el espectro del infrarrojo cercano, en un rango de $600 - 1\,200\text{ nm}$, ya que estas longitudes de onda permiten una mayor profundidad de penetración óptica, alcanzando tejidos más profundos y órganos internos. En 1994, esta propiedad impulsó el desarrollo de la excitación de los PS por medio de dos fotones, implementando láseres pulsados con emisión de luz infrarroja [7].

A pesar de estas ventajas, la absorción de luz en la región NIR es relativamente baja en los PS, lo que implica que altas intensidades de luz requeridas para fotoactivarlos, mediante absorción de dos fotones (TPA), puedan causar daño en los tejidos sanos. Dado que la mayoría de los PS absorben entre $630 - 690\text{ nm}$, y la sección transversal de absorción de dos fotones (σ_{TPA}) no es significativa en muchos casos ($< 100\text{ GM}$) [8], en la actualidad se realizan muchos esfuerzos de investigación en el área de biofotónica para busca mejorar la eficiencia del proceso.

Para mitigar este problema, en 1996 se propuso el uso de una molécula colorante que, al ser excitada por pulsos ultracortos emitidos por un láser en la región NIR, es capaz de transferir su energía de forma no radiativa al PS [9]. Para que este mecanismo funcione eficientemente, el colorante y el PS deben cumplir dos condiciones clave:

1. Una **superposición espectral** adecuada entre los espectros de absorción del PS y la emisión del colorante.
2. Una **proximidad intermolecular** suficiente para facilitar la transferencia de energía.

Este proceso no radiativo, conocido como transferencia de energía resonante de fluorescencia o transferencia de energía resonante tipo Förster (FRET), permite al PS generar especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de una fotoexcitación eficiente de su donador energético, logrando el objetivo terapéutico de la PDT.

1.4. Transferencia de energía resonante tipo Förster

El proceso no radiativo FRET consiste de un acoplamiento dipolo-dipolo desde un fluoróforo donador (D) en estado excitado hacia un aceptor (A) en su estado fundamental que puede ser también un fluoróforo [10]. Para el caso de la PDT, mencionado anteriormente, el colorante actúa como donador y el PS como aceptor. Estos materiales compuestos de dos moléculas ya sean por proximidad o enlazados de forma covalente, son conocidos como compósitos.

Los materiales propuestos como D deben cumplir con el requisito de que su espectro de emisión se superponga con el espectro de absorción del A, con el objetivo de proporcionar la resonancia energética necesaria para el proceso de FRET. La Figura 1.2 a) muestra la superposición espectral entre la emisión del donante y la absorción del aceptor. El grado de esta superposición puede ser cuantificado por medio de la integral de superposición $J(\lambda)$, como se muestra en la Ecuación (1.1).

$$J(\lambda) = \int I_D \varepsilon_A \lambda^4 d\lambda, \quad (1.1)$$

donde I_D es la intensidad de la emisión del D normalizada, exclusiva del rango de la superposición espectral, ε_A es el coeficiente de extinción molar del A y λ^4 es la longitud de onda de emisión a la cuarta potencia [11].

Otro factor para obtener una transferencia de energía eficiente es la distancia de Förster, R_0 , que depende de la emisión del D y la absorción del A (integral de superposición $J(\lambda)$), la orientación de sus respectivos momentos dipolares de transición (factor de orientación, κ^2 , el rendimiento cuántico del D, Φ_D , y el índice de refracción del medio, n). Con $J(\lambda)$ en las unidades espectroscópicas comunes $M^{-1} cm^{-1} nm^4$, R_0 se puede calcular mediante la ecuación (1.2); en nm^6 .

$$R_0 = 0.021 J(\lambda) \kappa^2 \Phi_D n^{-4} \quad (1.2)$$

La eficiencia del proceso FRET (E_{FRET}) se calcula a partir del tiempo de vida del donador (τ_D) y del donador en presencia del aceptor (τ_{DA}), como se muestra en la Ecuación 1.3.

$$E_{FRET} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}, \quad (1.3)$$

Así mismo, esta eficiencia puede determinarse mediante la intensidad de fluorescencia relativa del donador, tanto en ausencia (I_D) como en presencia (I_{DA}) del aceptor, tal como lo describe la Ecuación 1.4.

$$E_{FRET} = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D}, \quad (1.4)$$

La E_{FRET} depende fuertemente de la distancia de separación intermolecular entre D y A (R) como se muestra en la Figura 1.2 b). Según la literatura, cuando se obtiene una E_{FRET} del 50% la distancia R es igual a la distancia de Förster, es decir, $R = R_0$. Si R es el doble de la distancia de Förster ($R = 2R_0$), entonces la eficiencia de transferencia es del 1.54%, y si $R = 0.5R_0$, entonces la eficiencia es del 98.5%. No es recomendable usar la E_{FRET} para medir distancias fuera del rango de $R = 0.5R_0$ a $R = 2R_0$ [11, 12].

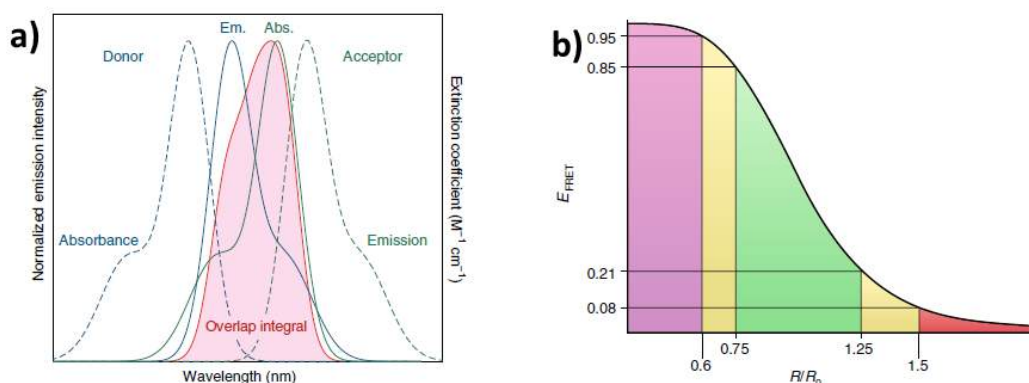


FIGURA 1.2: a) Superposición de los espectros de emisión del donador y absorción del aceptor normalizados, denotados como **Em.** y **Abs.** respectivamente. La integral de superposición espectral resultante es representada por la curva roja. b) Dependencia de la eficiencia de transferencia de energía (E_{FRET}) respecto a la distancia. R_0 es la distancia de Förster.

Figura extraída de la referencia [11].

1.5. Nanopartículas en la terapia fotodinámica

En la PDT se ha implementado el uso de nanopartículas (NPs) como una herramienta innovadora para la activación de los PS. Para ser consideradas como NPs, estas partículas deben tener un diámetro físico comprendido entre 10 – 100 nm.

Las NPs de PS dopadas con polímeros conjugados han demostrado ventajas significativas en aplicaciones fotodinámicas. Para ser consideradas fotosensibilizadores ideales, estas NPs deben cumplir con ciertas características clave, como baja citotoxicidad en ausencia de luz y una alta eficiencia fotodinámica bajo radiación láser. Un estudio publicado en *Nanoscale* por Shen *et al.* [13] describe estrategias innovadoras para optimizar estas propiedades. En dicho trabajo, se desarrollaron NPs de Ps dopadas con polímeros conjugados, logrando avances importantes en el diseño de materiales con características ópticas y funcionales sobresalientes.

Uno de los objetivos de este trabajo de tesis es utilizar NPs en la fotoactivación del PS y optimizar la transferencia de energía entre el D y el A mediante su distancia intermolecular (R), logrando un aumento en la E_{FRET} . Esto potencia la capacidad terapéutica de la PDT al

maximizar la producción de ROS.

Como se mencionó anteriormente, el objetivo de aplicar FRET en la PDT es para poder implementar TPA obteniendo así una mayor penetración óptica en tejido, y poder dar un tratamiento a órganos más internos y/o con mayor longitud de interfase. El objetivo de este proceso de absorción no lineal, es excitar al material, en este caso al donador, con dos o más fotones, que pueden oscilar a la misma frecuencia, para alcanzar un estado de excitación real debido a la absorción simultánea de los fotones de excitación, este fenómeno óptico no lineal es descrito por la susceptibilidad no lineal de tercer orden χ^3 [14].

Los procesos ópticos, físicos, químicos y biológicos involucrados en el sistema dinámico molecular al implementar NPs en la PDT se ilustran en la Figura 1.3. Al excitar el D con luz NIR, ver Figura 1.3 a), este puede absorber la energía de dos fotones debido a la excitación no lineal (TPA). La Figura 1.3 b) muestra la interacción dipolo-dipolo entre las moléculas D y A, las cuales están separadas por una distancia intermolecular en el orden de la distancia de Förster (R_0). Esta proximidad facilita el proceso FRET, permitiendo la generación de ROS, como se detalla en la Figura 1.3 c). La acumulación de oxígeno singulete (1O_2) en una célula, producido a partir del oxígeno molecular (3O_2), genera un estrés oxidativo que finalmente conduce a la muerte celular, ver Figura 1.3 d).

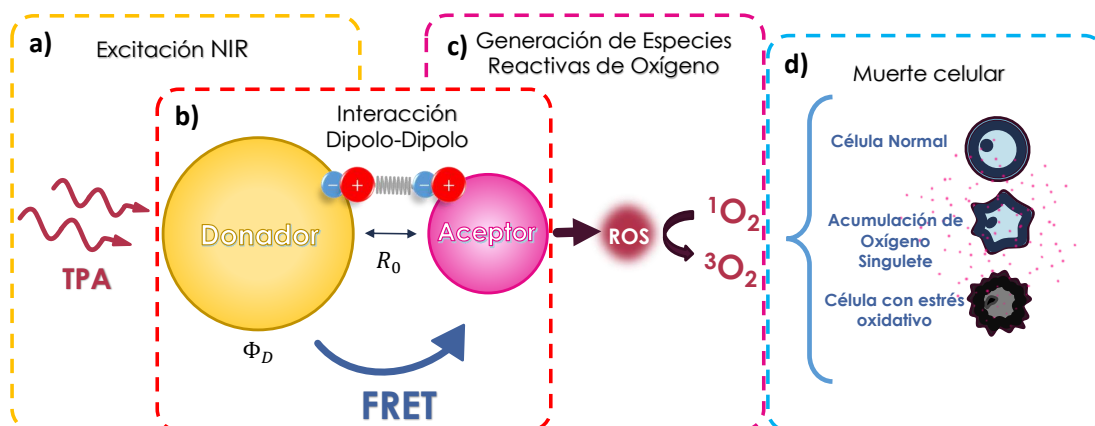


FIGURA 1.3: Proceso FRET en terapia fotodinámica: a) Excitación óptica no lineal, b) Interacción dipolo-dipolo entre las moléculas de donador y aceptor, c) Generación de ROS, d) Muerte celular.

Capítulo 2

Generación de especies reactivas de oxígeno en la terapia fotodinámica

2.1. Terapia fotodinámica

La terapia fotodinámica o PDT, por sus siglas en inglés, es una tecnología multidisciplinaria de utilidad médica para el tratamiento en tejidos precancerosos y cancerosos a través de un procedimiento no quirúrgico. Esta tecnología está basada en el desarrollo de fármacos que son activados con fuentes de luz (láser, lámpara, LEDs, entre otras) con emisión espectral en el visible y en el infrarrojo cercano. La PDT es una tecnología de mínima invasividad en donde intervienen fotones, un fotosensibilizador y oxígeno molecular ($^3\text{O}_2$) capaz de disminuir la viabilidad celular. [5]. La Figura 2.1 muestra el proceso físico-químico en el que está basado la PDT. Como se observa en la figura, la luz genera especies reactivas de oxígeno (ROS), mediante la excitación de un fotosensibilizador, proceso que se describe a detalle en la siguiente sección. La producción de ROS en la PDT pueden clasificarse en peróxidos, superóxidos y oxígenos singuletes.

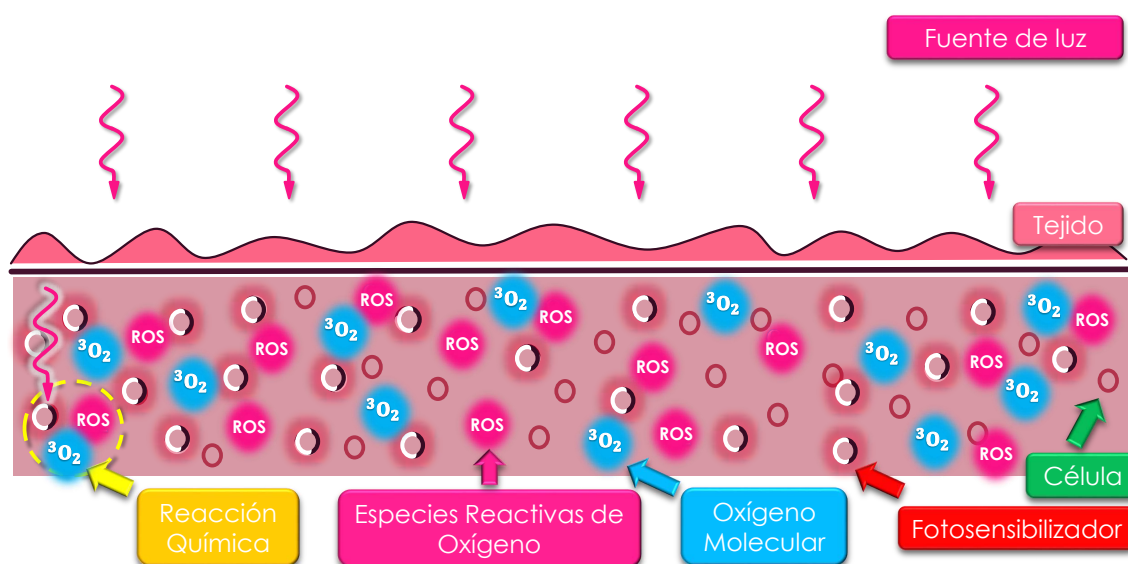


FIGURA 2.1: Terapia fotodinámica. Activación de fármacos fotosensibles a través de luz para generar ROS en tejido canceroso y precanceroso.

2.2. Fotosensibilizador

El sistema molecular dinámico que interviene en la PDT puede ser considerado como la interacción energética entre la luz, un fotosensibilizador o PS, por sus siglas en inglés, y oxígeno molecular intracelular (3O_2). Esta interacción energética y los productos a los que da lugar se muestran en el diagrama de Jablonsky adaptado para detallar el proceso foto-físico de un PS, Figura 2.2.

Dependiendo del PS, la luz incidente en el mismo puede generar estados excitados del tipo singuletes $S_{1,2,3...n}$ por medio de la absorción de un fotón (Figura 2.2 b)), o absorción de dos fotones (TPA) (Figura 2.2 c)). En esta tesis es de particular interés el proceso de la generación de ROS en un PS por medio del proceso óptico no lineal de TPA el cual puede cuantificarse por medio del parámetro sección transversal de dos fotones (σ_{TPA}) y, su unidad de medida es GM que es equivalente a $10^{-50} cm^4 / \text{fotón} / \text{molecula}$ [15]. Algunos ejemplos de moléculas que han sido usadas como PS en PDT son rosa de bengala (RB), Eosina, Eritrosina, Fluoresceína y Rhodamina B que al ser excitadas a $800 nm$ se obtiene σ_{TPA} del orden de $10 GM$ para las cuatro moléculas primeramente mencionadas, y de aproximadamente $200 GM$ para el caso de la rodamina B así como un rendimiento cuántico de fluorescencia de $\Phi_F = 0.01, 0.20, 0.02, 0.80$ y 0.5 , respectivamente [16, 17].

Una vez que se genera un estado excitado $S_{1,2,3...n}$ en el PS, se puede presentar un proceso de decaimiento radiativo, es decir el PS pasa al estado de energía más bajo S_0 (basal o fundamental) y cumpliendo el principio de conservación de la energía resulta en la emisión espontánea de un fotón de menor energía que el fotón de excitación. En este caso, como el decaimiento radiativo se da a través de un proceso cuántico entre dos estados singuletes, al fenómeno físico se le conoce como fluorescencia (Figura 2.2 f)) y, su tiempo de vida es típicamente de algunos nanosegundos [18].

La Figura 2.2 e) muestra que después de la excitación del PS sucede un proceso de relajamiento no radiativo (calor) lo que involucra procesos de conversión interna (transición de un estado S_n a un estado S_{n-1}) así como de relajaciones vibracionales que se aprecian en la Figura 2.2 d), hasta llegar al nivel energético más bajo del primer estado excitado S_1 . Una vez que la molécula PS esta en S_1 puede suceder el fenómeno de fluorescencia mencionado anteriormente o bien el PS puede pasar por un cruzamiento intersistema como se muestra en la Figura 2.2 g). En donde la dirección de giro de un electrón en estado excitado es invertida, llevando al electrón a un estado de excitación de menor energía conocido como un estado de excitación triplete T_1 [19].

El nivel de energía de un estado T_1 es menor que el de S_1 pero mayor que el de S_0 y como estado electrónico excitado tiene un tiempo de vida media relativamente largo (microsegundos o milisegundos). La larga vida media del estado de triplete del PS se explica por el hecho de que el electrón debe permanecer en ese estado hasta que su dirección giratoria sea revertida y así la energía sea liberada en forma de un fotón por lo que, el PS regresará a su estado S_0 . A los fotones emitidos por electrones en estados tripletes son conocidos como fosforescencia, como se observa en la Figura 2.2 i) [20, 21].

La Figura 2.2 h) muestra el cambio de giro (*spin*) del electrón en una molécula en estado triplete, estado que implica una transición prohibida (*spin forbidden*), por lo que las transiciones de S_1 a T_1 o de T_1 a S_1 son poco probables. No obstante, ciertas estructuras moleculares favorecen estas transiciones como en el caso de los PS. Un buen PS alcanza un alto rendimiento del estado triplete lo cual puede dar lugar a reacciones químicas al interactuar con el oxígeno molecular 3O_2 como se aprecia en la Figura 2.2 j). La Figura 2.2 k) denota la interacción de otras biomoléculas independientes al oxígeno con el PS.

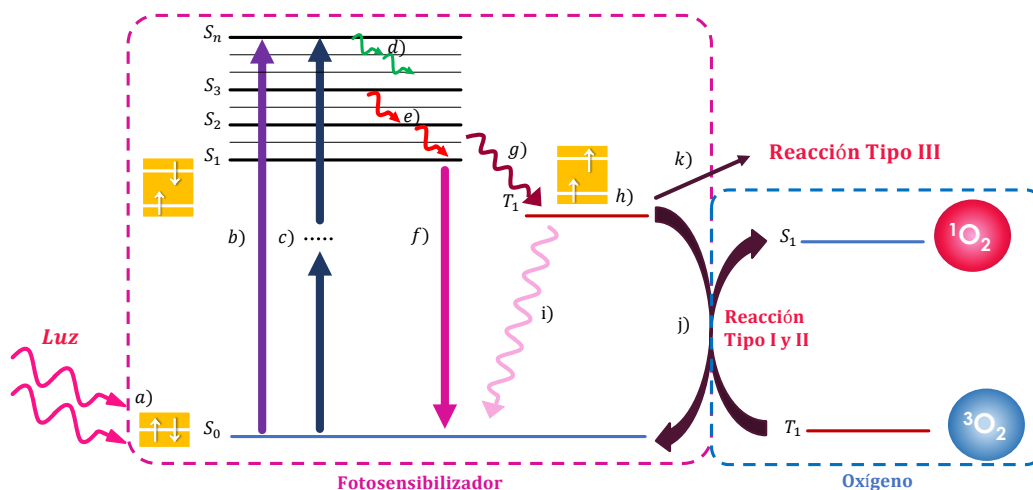


FIGURA 2.2: Diagrama de Jablonsky adaptado al PS [5]. Niveles energéticos y procesos fotofísicos: a) Estado singulete, b) Absorción lineal, c) TPA, d) Relajamiento vibracional, e) Conversión interna, f) Fluorescencia, g) Cruzamiento intersistema, h) Estado triplete, i) Fosforescencia, j) Formación de especies reactivas de oxígeno, k) Reacción del PS independiente del oxígeno con biomoléculas.

2.3. Especies reactivas de oxígeno

2.3.1. Oxígeno molecular

El estado fundamental electrónico del oxígeno molecular es un estado triplete y por eso es representado con súper índice 3 de la siguiente manera: 3O_2 . La salud del tejido biológico depende del oxígeno, su disminución puede provocar hipoxia o bien anoxia en la falta total de oxigenación, produciendo así la muerte de un organismo [22]. Existen otras formas de oxígeno cuya presencia puede ser dañina para las células que constituyen el tejido biológico.

2.3.2. Oxígeno singulete

Las especies reactivas de oxígeno, como lo es el oxígeno singulete (1O_2), causan daño oxidativo a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, provocando la muerte celular por necrosis y/o apoptosis, como se muestra en la Figura 2.3 [23]. El 1O_2 es aquel oxígeno que pasa de un estado fundamental a un estado excitado, como se muestra en la Figura 2.2 j). Este proceso

desempeña un papel esencial en la PDT, ya que el oxígeno singlete (1O_2), conocido por su efecto citotóxico, se utiliza específicamente como agente clave en esta terapia.

Para poder cuantificar la eficiencia de generación de 1O_2 es necesario introducir algunas definiciones. El rendimiento en estado triplete, Φ_T , es la probabilidad de que un PS realice una transición al estado triplete, después de absorber un fotón. Por otra parte, la probabilidad de que un PS realice una transición al estado triplete, después de absorber un fotón, y efectúe una transferencia de energía hacia el oxígeno molecular, 3O_2 , formando un oxígeno singlete, 1O_2 , se le conoce como rendimiento cuántico de oxígeno singlete, Φ_Δ , [24]. Se considera que un PS puede presentar efecto fotodinámico apreciable cuando $\Phi_\Delta > 0.30$, [5].

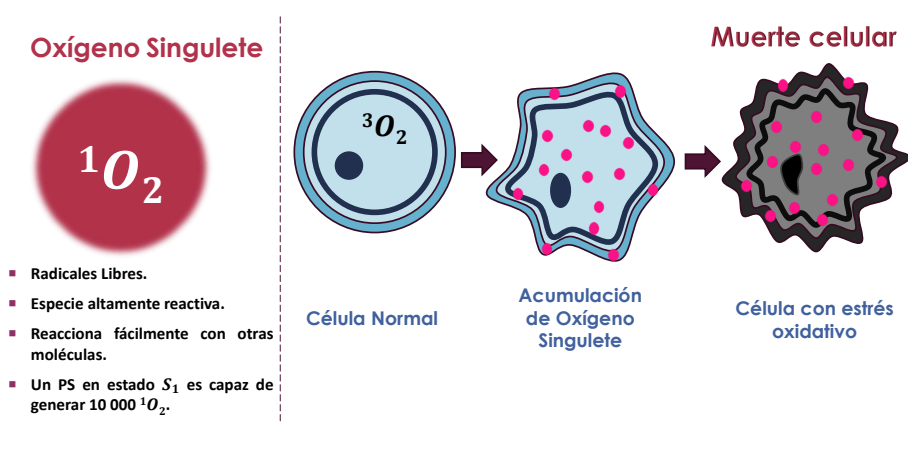


FIGURA 2.3: Muerte celular por estrés oxidativo inducido por acumulación de 1O_2 . [19]

Existen moléculas sensibles al oxígeno singlete como el ácido úrico (UA), 1, 3- difenil-sobenzofurano (DPBF) y ácido 9,10 - antracendiil-bis (metileno) dimalónico (ABDA) entre otras, las cuales sufren una oxidación química en la presencia de ROS y, se les conoce en la literatura como trampas químicas o indicador de oxígeno, [25], [26], [27]. Estas trampas químicas al interactuar con el 1O_2 generado por un PS, su población disminuye gradualmente a través del tiempo, por esta razón hay un decremento en la intensidad de absorción de la trampa química. Debido a esta degradación de población se puede determinar la eficiencia de generación de oxígeno singlete.

La implementación de este método de degradación de trampas químicas ante PS permite calcular indirectamente, mediante comparación con un PS de referencia, el rendimiento cuántico de oxígeno singlete Φ_Δ como se muestra en la Ecuación (2.1) [28].

$$\frac{\Phi_\Delta I_{Abs}}{k} = \frac{\Phi_\Delta^{ref} I_{Abs}^{ref}}{k^{ref}}, \quad (2.1)$$

donde k es la tasa de degradación de la trampa química inducida principalmente por la reacción con oxígeno singlete; I_{Abs} es el valor de absorción en la longitud de onda de excitación del PS; el superíndice *ref* representa el PS de referencia.

2.3.3. Mecanismos para la generación de ROS

Existen tres mecanismos para la generación de ROS y, son clasificadas según el tipo de reacción fotoquímica que se presente:

- **Reacción Tipo I.**
La generación de radicales libres peróxidos y superóxidos pueden producirse ya sea por la transferencia de un electrón del PS, en estado triplete, hacia una molécula de agua o cuando el PS, en estado triplete, sustrae un átomo de hidrógeno de un sustrato AH_2 (donante de hidrógeno específico). Es decir, por presencia de agua se generan ROS (peróxidos y superóxidos) [29].
- **Reacción Tipo II.**
En este mecanismo el PS en estado triplete, T_1 , transfiere su energía hacia una molécula de oxígeno molecular que se encuentra en estado triplete, 3O_2 , realizando una transición electrónica del PS hacia su estado basal S_0 y generando así, oxígeno singulete 1O_2 , [29], [30]. Es decir, por presencia de oxígeno molecular, 3O_2 , se produce oxígeno singulete, 1O_2 , altamente reactivo.

Un PS es capaz de generar hasta 10,000 moléculas de oxígeno singulete por cada transición del estado triplete a estado fundamental, [19]. El mecanismo tipo II es generalmente aceptado en la PDT como la vía principal para la destrucción de las células malignas, [30]. De las tres reacciones este tipo de reacción es la más probable que se presente.

- **Reacción Tipo III.**
Es la toxicidad directa entre el PS en estado triplete y las biomoléculas, las cuales son dañadas. Este mecanismo no depende del oxígeno y es el menos estudiado, [31].

La relación entre estas tres reacciones depende del tipo de PS ya que pueden ocurrir de forma simultánea [32].

2.4. Moléculas como fotosensibilizadores prototipo

Rosa de bengala

Existen diversas moléculas orgánicas para generar ROS y que se les considera moléculas PS prototipo; una de las más estudiadas es el rosa de bengala (RB), Figura 2.4, molécula que como PS es ampliamente usada en la PDT por su alto rendimiento cuántico de oxígeno singulete $\Phi_\Delta = 0.82$ [5], [26], [33], [34]. También se ha estudiado el cambio de las propiedades ópticas del RB en distintos disolventes orgánicos, como agua, etanol (EtOH), tetrahidrofurano (THF), entre otros [35]. El espectro de absorción y de emisión del RB usando THF como disolvente se muestran en la Figura 2.5.

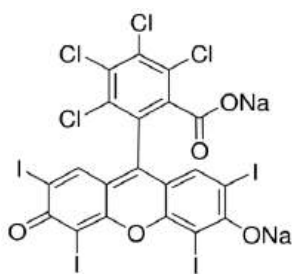


FIGURA 2.4: Estructura molecular del rosa de bengala (RB).

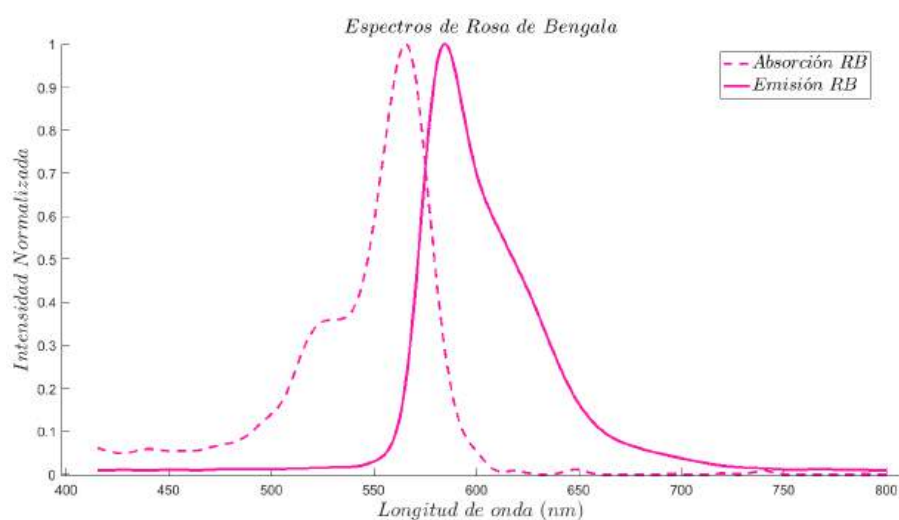


FIGURA 2.5: Espectro de absorción y emisión de rosa de bengala en THF.

Rodamina 6G

Se ha demostrado que el rendimiento cuántico de oxígeno singlete de la molécula rodamina 6G (R6G), Figura 2.6, es de $\Phi_{\Delta} = 0.42$ [36]. Las moléculas como las rodaminas que son altamente fluorescentes (ver espectro de absorción y emisión en Figura 2.7) rara vez se utilizan como PS ya que su rendimiento de estado triplete es muy bajo.

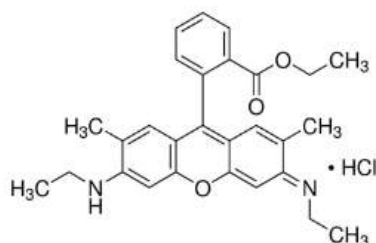


FIGURA 2.6: Estructura molecular de rodamina 6G (R6G).

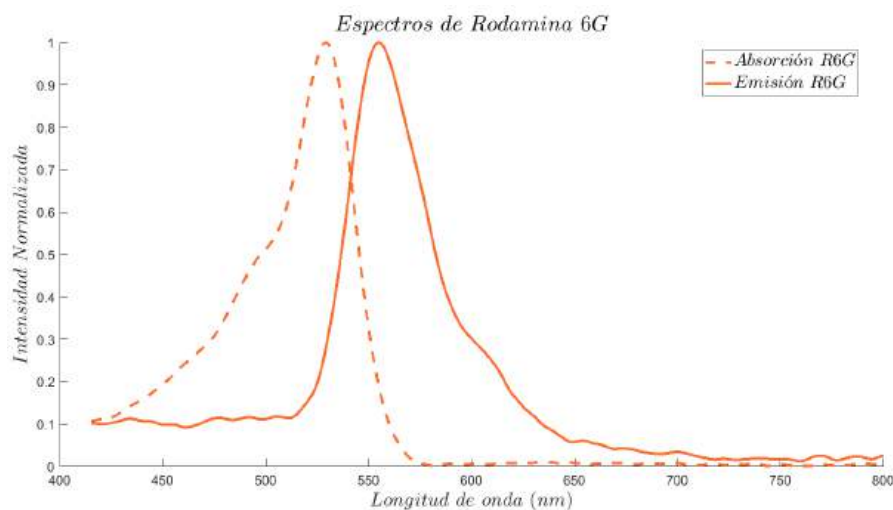


FIGURA 2.7: Espectro de absorción y emisión de rodamina 6G en THF.

2.4.1. Moléculas detectoras de oxígeno singlete (trampa) prototipo

Ácido úrico

La molécula de ácido úrico (UA), Figura 2.8, se ha utilizado como trampa química para realizar estudios para la detección de la generación de oxígeno singlete en un medio acuoso, ya que el UA es una molécula sensible a la presencia de oxígeno singlete y se degrada linealmente con el tiempo de exposición del $^1\text{O}_2$ [26]. El espectro de absorción del UA se muestra en la Figura 2.9, el cual se encuentra disuelto en una solución amortiguadora (buffer de fosfatos) con un pH de 7.4 preparado en un medio acuoso, donde se aprecia el pico máximo de absorción en 294 nm.

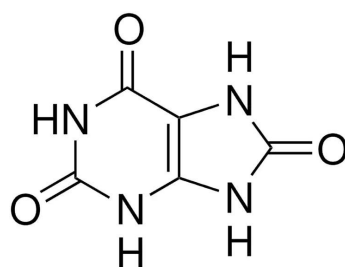


FIGURA 2.8: Estructura molecular del ácido Úrico (UA).

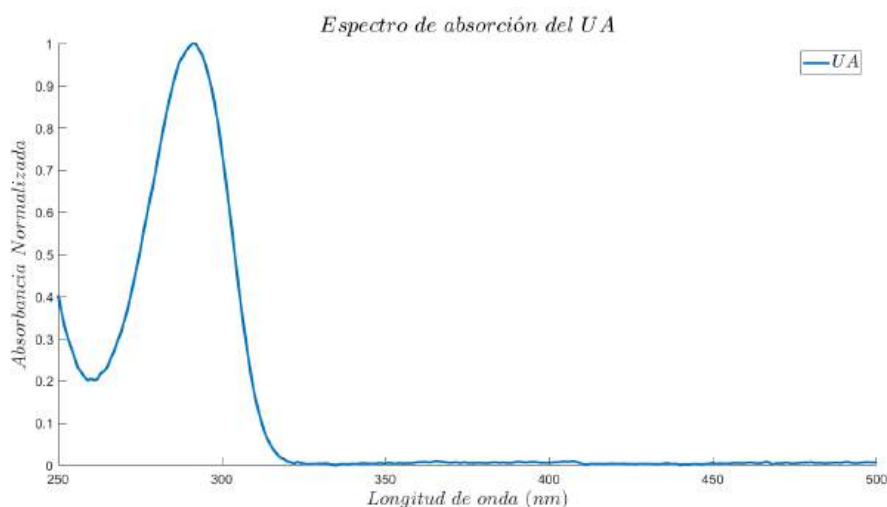


FIGURA 2.9: Espectro de absorción del ácido úrico en un medio acuoso a una concentración de 100 μM .

Difenilsobenzofurano

La molécula 1,3-difenilsobenzofurano (DPBF), Figura 2.10, es sensible a la presencia de oxígeno singlete $^1\text{O}_2$; en general, las moléculas de DPBF sufren una degradación al estar en contacto con ROS. Por ejemplo, se han evidenciado resultados al mezclar DPBF con RB y excitar exclusivamente al RB con un láser a una longitud de onda de 532nm, obteniendo una degradación molecular del DPBF por la presencia de $^1\text{O}_2$. Esta degradación se puede apreciar a partir del cambio en la intensidad de la banda de absorción, mientras que el RB se mantiene estable [27].

A grandes rasgos, el DPBF puede utilizarse como "trampa química" para medir indirectamente la producción de ROS generadas por un PS. También debe considerarse que el DPBF reacciona por difusión y, por lo tanto, esta molécula tiene una alta sensibilidad del 50 % al $^1\text{O}_2$ producido por alcohol/agua. Por esta razón, se recomienda emplear soluciones que generen pequeñas cantidades de $^1\text{O}_2$ para lograr una mejor discriminación.

Es importante mencionar que el DPBF también es sensible a la exposición de luz, cuyo contenido espectral coincide con sus bandas de absorción (Ver Figura 2.11), lo que compromete su fotoestabilidad. Por lo que se recomienda un control total de iluminación para obtener resultados confiables, asegurándose de que la degradación es debida a la presencia de ROS y no por fotodegradación. El DPBF tiene un rendimiento cuántico de fluorescencia $\Phi_F = 0.99$ usando como solvente tetrahidrofurano (THF) [25].

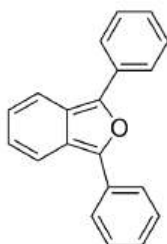


FIGURA 2.10: Estructura molecular del 1,3-difenilsobenzofurano (DPBF).

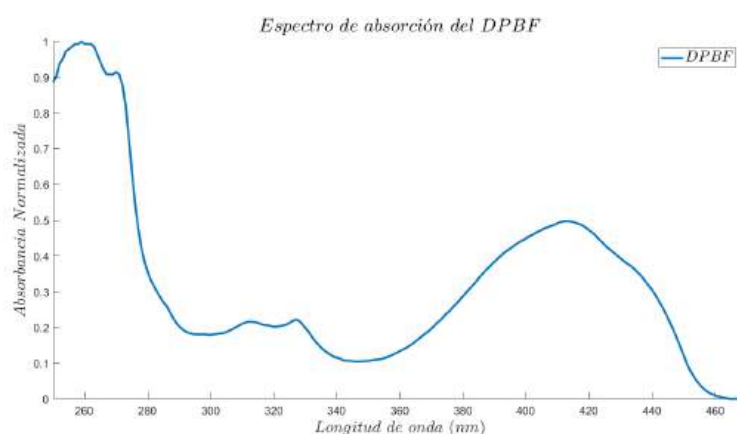


FIGURA 2.11: Espectro de absorción del DPBF usando THF como disolvente.

Ácido 9,10 - antracendiil-bis (metilen) dimalónico

La molécula ácido 9,10 - antracendiil-bis (metilen) dimalónico, ver Figura 2.12, puede disolverse en agua y tiene una banda de absorción entre los 300 y 410 nm. Esta molécula es ampliamente utilizada en la PDT como trampa química para la detección de ROS, específicamente monitorea la presencia de 1O_2 , por lo que su reactividad es menor que el DPBF al interactuar con algún PS. Esto permite una mejor discriminación de otras ROS, ya que solo reacciona con el 2 % del 1O_2 del agua. Así que gracias a esta sensibilidad selectiva se pueden realizar análisis más prolongados en el tiempo [27].

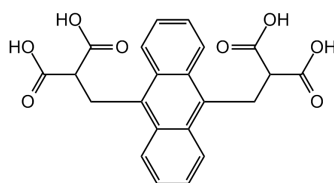


FIGURA 2.12: Estructura molecular del ácido 9,10-antracendiil-bis(metilen) dimalónico (ABDA).

Capítulo 3

Desarrollo experimental y análisis espectroscópico

En este capítulo se describen las distintas configuraciones experimentales y la preparación de las muestras utilizadas en las investigaciones de esta tesis. Los resultados y su discusión, presentados en el capítulo 4, se fundamentan en la notación de muestras introducida en el presente capítulo. Cabe destacar que este capítulo incluye los resultados experimentales básicos y las metodologías empleadas para formular la hipótesis de transferencia de energía entre un polímero fluorescente y un PS, hipótesis que se valida a partir de los resultados presentados en el capítulo 4.

3.1. Generación de especies reactivas de oxígeno con excitación lineal utilizando RB como PS

Inicialmente se utilizó un espectrofluorómetro modelo FS5 de la marca "Edinburgh Instruments" para la obtención de espectros de absorción, fluorescencia y excitación, el cual tiene como fuente de excitación una lámpara de arco de xenón permitiendo un amplio rango de excitación desde 230 *nm* hasta 1,000 *nm*.

Sin embargo, durante la realización de esta tesis el equipo tuvo problemas con la fuente de alimentación de la lámpara de xenón, lo que impidió su uso para los análisis ya mencionados. Por lo tanto, se diseñaron algunos arreglos ópticos para la excitación lineal de las moléculas que fueron utilizadas en esta tesis, así como la adquisición de sus espectros de absorción.

3.1.1. Medición de transmitancia

Para obtener el espectro de absorción de una muestra en disolución se utilizó el arreglo óptico que se muestra en la Figura 3.1. En este arreglo la muestra se irradia con la luz de una lámpara de halógeno modelo HL-2000 de la marca "Ocean Optics", esta lámpara tiene un espectro amplio de emisión que va desde los 300 *nm* hasta los 2 400 *nm*. Utilizando un espectrómetro de mano (modelo FLAME-S-XR1-ES de la marca "Ocean Optics"), se detecta el espectro de emisión de la lámpara de halógeno, el cual se presenta en la Figura 3.2.

Para obtener la transmitancia de una muestra dada, con ayuda de una fibra óptica, denotada como Fibra 1 (modelo P600-2-VIS-NIR de la marca "Ocean Optics", que transmite más

eficientemente de los $400\text{ nm} - 2100\text{ nm}$ y con un núcleo de $600\text{ }\mu\text{m}$) se guía la luz de la lámpara hasta incidir en la muestra en un ángulo de 0° . En seguida, la luz transmitida que pasa a través de la muestra se recolecta por medio de una lente colimadora y, posteriormente la luz viaja por medio de la Fibra 2 (mismo modelo que la Fibra 1) hasta llegar al espectrómetro que tiene un detector de luz con un rango de $200\text{ nm} - 1025\text{ nm}$.

Para la adquisición de los datos se utiliza el Software Ocean View 1.6.7 Lite, que permite realizar el cálculo de la absorbancia, A , como una función logarítmica de la transmitancia, T , a partir de la Ley de Lambert-Beer [12], como se muestra en la ecuación (3.1).

$$A = \log_{10}\left(\frac{1}{T}\right) = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right), \quad (3.1)$$

donde I_0 es luz incidente e I luz transmitida por la muestra.

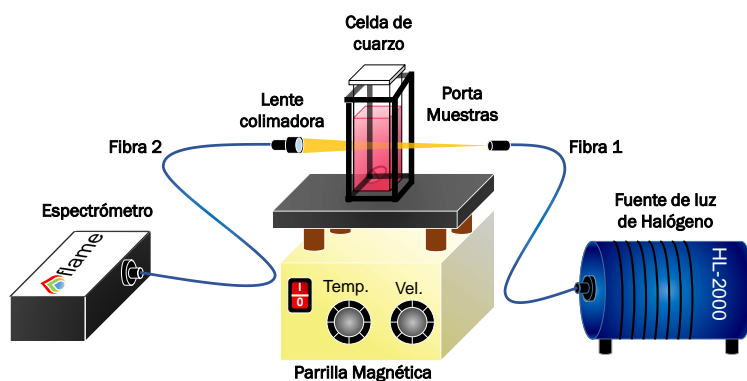


FIGURA 3.1: Arreglo óptico 1. Medidor de absorbancia en tiempo real utilizado para la detección indirecta de generación de ROS.

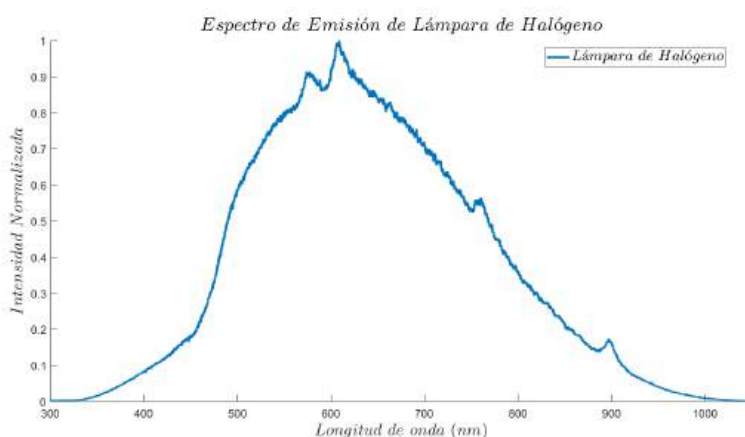


FIGURA 3.2: Espectro de emisión de lámpara de halógeno modelo HL-2000 registrado por el espectrómetro portátil FLALME-S-XR1-ES.

3.1.2. Excitación láser de un fotosensibilizador para la generación de especies reactivas de oxígeno

Para la generación de ROS se utilizó como fuente de excitación un diodo láser, denotado como Diodo Láser 1 en la Figura 3.3, con emisión a 532 nm y una potencia de $P_{DL1} = 5\text{ mW}$. El haz del láser incide sobre un espejo plano que lo dirige hacia la celda de cuarzo de cuatro caras pulidas de 10 mm de espesor, referida como celda de cuarzo, que contiene al PS en una disolución. En esta configuración, el haz láser de excitación queda a un ángulo de 90° respecto al haz de luz blanca usado para medir la transmisión de la muestra.

Esta configuración también permite obtener espectros de emisión. Para obtener el espectro de emisión de la muestra, se bloquea la salida de la lámpara de halógeno mientras el láser incide sobre la muestra; para obtener el espectro de absorción se bloquea el Diodo Láser 1.

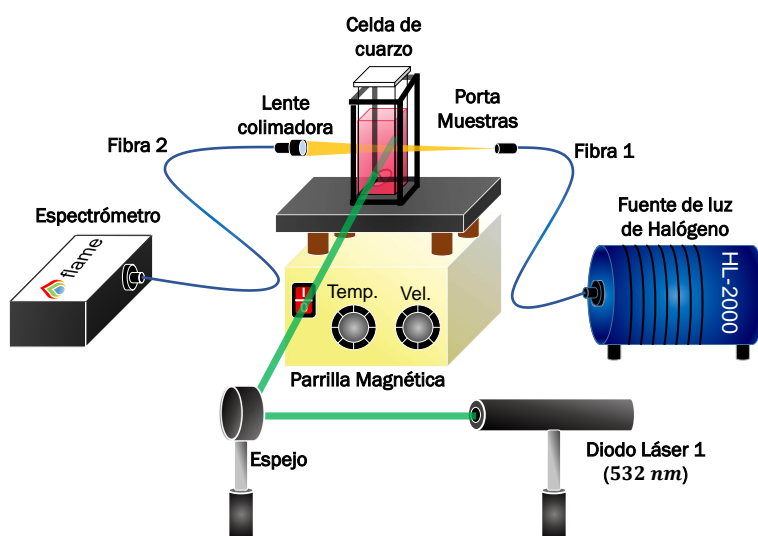


FIGURA 3.3: Arreglo óptico 2. Excitación de un fotosensibilizador para la generación de ROS.

3.1.3. Ácido úrico como detector de oxígeno singulete generado por RB en un medio acuoso.

La suspensión amortiguadora o Buffer de fosfatos es preparada inicialmente en un volumen de 100 mL de agua destilada mezclada con 70 mg de fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) y 100 mg de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4). Independientemente se prepararon 200 mg de KH_2PO_4 mezclados en 10 mL de agua destilada y de igual manera para el Na_2HPO_4 , obteniendo así, dos líquidos correctores al 2% para ajustar el $\text{PH} = 7.4$ de la solución amortiguadora, [26]. Una vez que el buffer es preparado se utiliza como solvente para obtener una disolución de UA.

Posteriormente, se preparó una disolución utilizando UA a una concentración de $500 \mu\text{M}$ y RB a una concentración de $6 \mu\text{M}$, disueltos en agua destilada, esta muestra se denota como **Dis RB:UA** y su proporción molar se muestra en la Tabla 3.1. La mezcla **Dis RB:UA** contiene la misma proporción en volumen de las soluciones de RB y UA, la cual se colocó sobre la celda de cuarzo. Esta mezcla es utilizada para la generación de ROS excitando al RB con el Diodo Láser 1 a 532 nm y se toman los espectros de absorción de la mezcla cada tres minutos, como se muestra en la Figura 3.4; se puede observar la reducción de la banda de absorción de la molécula de UA denotada por la disminución de la intensidad de la absorbancia.

TABLA 3.1: Proporciones molares de la disolución RB:UA

Etiqueta	RB (μM)	UA (μM)	Proporción Molar
Dis RB:UA	6	500	1 : 83.33

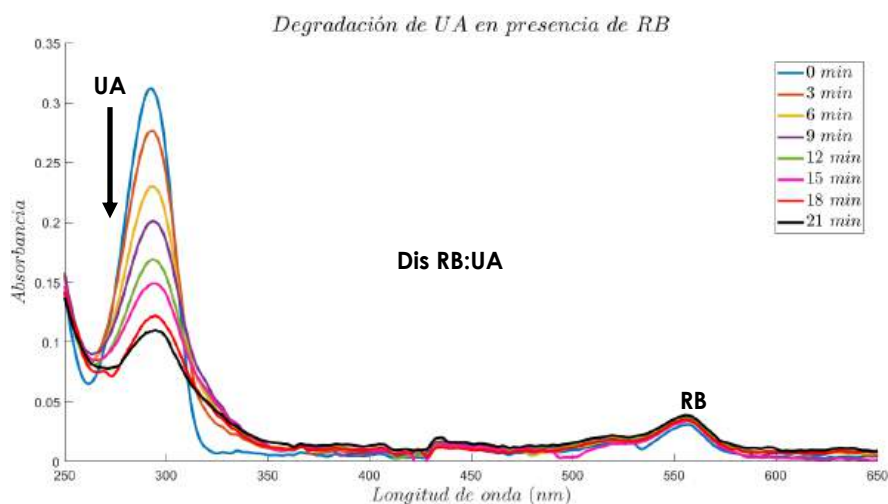


FIGURA 3.4: Degradación molecular del UA ($500 \mu\text{M}$) en presencia de oxígeno singlete generado por RB ($6 \mu\text{M}$) en agua, excitando a 532 nm .

3.1.4. DPBF como detector de oxígeno singlete generado por RB en THF.

Esta sección describe la generación y detección de ROS en THF. Para la generación de oxígeno singlete se usó una disolución de RB a una concentración de $2 \mu\text{M}$, mientras que para la detección indirecta del oxígeno singlete se usó una disolución de DPBF a una concentración de $30 \mu\text{M}$. Ambas disoluciones se mezclan y su proporción molar se muestra en la Tabla 3.2.

La mezcla (**Dis RB:DPBF 1**) contiene la misma proporción de volumen de RB y DPBF y se colocó sobre una celda de cuarzo de 10 mm . Para optimizar la generación de ROS, la disolución es oxigenada y se excita al RB con el Diodo Láser 1 a 532 nm , se toman los espectros de absorción de la mezcla cada minuto, como se muestra en la Figura 3.5; se puede observar

la degradación de la molécula de DPBF denotada como una disminución de su absorbancia.

Para estos experimentos, se cubrió en su totalidad la puerta de entrada del laboratorio con cartón delgado en color negro para aislar el interior del laboratorio de la luz externa ambiental y así evitar la fotodegradación del DPBF, adicional a esto, se instaló al interior del laboratorio iluminación roja, cuya intensidad podía ser modulada con un con un atenuador de intensidad.

TABLA 3.2: Proporciones molares de la disolución RB:DPBF

Etiqueta	RB (μM)	DPBF (μM)	Proporción Molar
Dis RB:DPBF 1	2	30	1 : 15

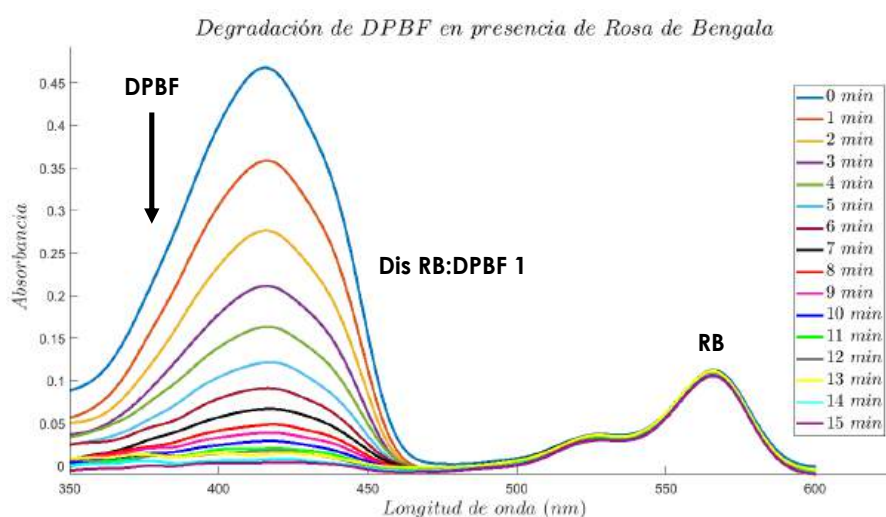


FIGURA 3.5: Degradación molecular del DPBF ($30 \mu M$) en presencia de oxígeno singlete generado por RB ($2 \mu M$) en THF, excitando a 532 nm .

3.2. Polímero fluorescente no lineal como donador para transferencia de energía.

El grupo de investigación Óptica No Lineal y Fotofísica (NOPG) del Centro de Investigaciones en Óptica A.C. ha reportado un Polímero Fluorescente de respuesta óptica no lineal (PFNL) con la estructura química mostrada en la Figura 3.6 que, además de ser orgánico, tiene un rendimiento cuántico de fluorescencia de $\Phi_F = 0.95$ utilizando THF como solvente y como nanopartícula $\Phi_F \approx 1$ [3]. Además, el PFNL en suspensiones acuosas de NPs demuestra una fotoestabilidad adecuada para los estudios desarrollados en esta tesis, además de una viabilidad celular superior al 50 % en células A549 y HeLa tras diluciones de 1 : 4 y 1 : 32, respectivamente. Gracias a estas propiedades, el PFNL se considera un donador molecular (D) prometedor para un proceso de transferencia de energía (TE) hacia un aceptor

molecular (A). Una condición para la selección de A es que debe existir una superposición espectral entre la emisión de D y la absorción de A [11].

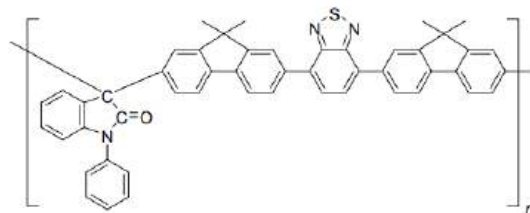


FIGURA 3.6: Estructura molecular del polímero fluorescente de respuesta óptica no lineal (PFNL).

3.2.1. Excitación lineal de donador : aceptor en disolución.

Se propone RB y R6G como dos moléculasceptoras ya que cumplen con la condición de superposición espectral de su absorción y la emisión del PFNL, como se muestran en la Figura 3.7. Se observa que existe una superposición espectral parcial entre el espectro de emisión tanto del donador (PFNL) como de RB, mientras que existe una superposición total en los espectros de emisión entre el D y R6G. Estas observaciones son importantes para los análisis de TE que se realizan posteriormente.

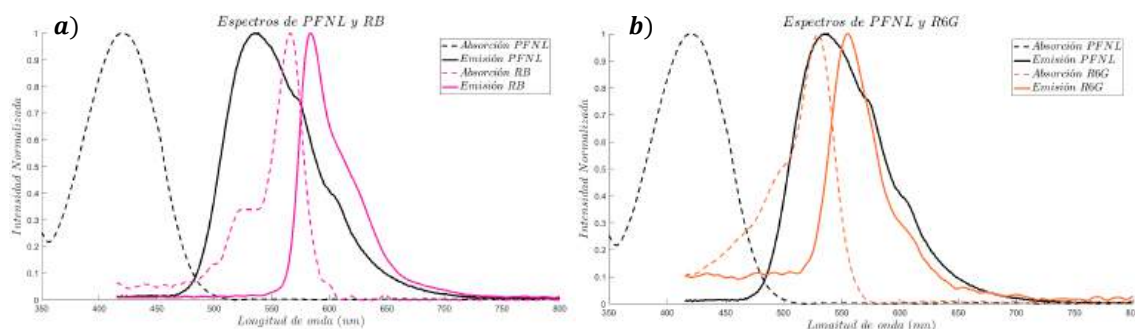


FIGURA 3.7: Superposición espectral entre PFNL-RB y PFNL-R6G

3.2.2. Excitación lineal de PFNL:R6G en disolución

La molécula R6G es seleccionada como A de referencia debido a su alto Φ_F que varía entre 0.91 y 0.98 en disolventes orgánicos. Esta propiedad óptica facilita la detección de su emisión. Se prepararon diferentes disoluciones en THF con PFNL a una concentración fija de $6 \mu\text{M}$ mezcladas con diversas proporciones molares de R6G. Estas disoluciones, denominadas como **Dis PFNL:R6G 1-5**, se describen en la Tabla 3.3.

Para obtener los espectros de emisión de las disoluciones mostradas en la Figura 3.9, se utilizó como fuente de excitación un diodo láser de 402 nm con una potencia de 3 mW , denotado como Diodo Láser 2, tal como se ilustra en la Figura 3.8. El haz del láser fue enfocado en la celda de cuarzo mediante la Lente 2, que tenía una distancia focal de $f = 15\text{ cm}$.

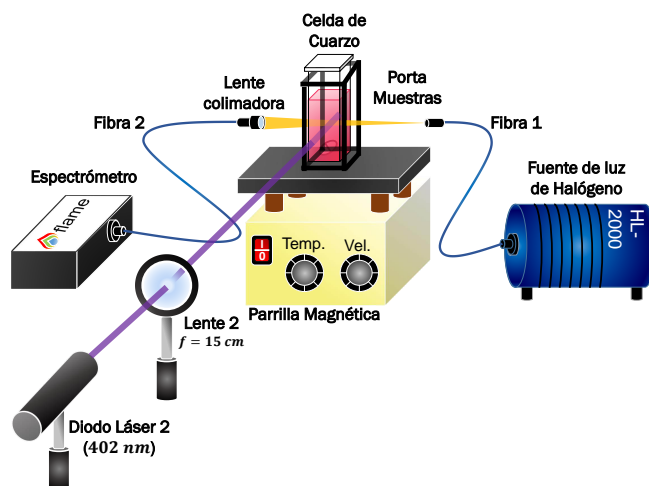


FIGURA 3.8: Arreglo Óptico 3. Excitación de donador para TE.

La **Adición PFNL + R6G** (curva punteada color gris) de la Figura 3.9 representa la suma aritmética de la emisión de **Dis PFNL $6\ \mu\text{M}$** más la emisión de **Dis R6G $6\ \mu\text{M}$** . Ambas disoluciones tienen la misma concentración, y este cálculo se realizó con el propósito de predecir el espectro de emisión de la mezcla **Dis PFNL:R6G 5**. No obstante, los espectros de emisión de estas disoluciones muestran que la intensidad de la emisión de PFNL disminuye conforme aumenta la proporción molar de R6G y, particularmente en el pico de absorción de R6G, ubicado en $\lambda = 529\text{ nm}$. Este comportamiento sugiere una hipótesis inicial de que la reducción en la intensidad de emisión de PFNL se debe a que esta es absorbida por R6G, como resultado de un proceso de TE radiativa entre las moléculas.

La intensidad de emisión de estas mezclas fue detectada a una longitud de onda de $\lambda_{det} = 529\text{ nm}$. A partir de estos datos, se calculó el porcentaje de la emisión del PFNL que fue absorbido por R6G. Este parámetro, denominado como Emisión Absorbida, se presenta en la Tabla 3.3.

Se observa que todas las mezclas absorben un porcentaje significativo de la emisión de PFNL por parte de R6G, y esto es un indicador para confirmar que existe TE radiativa entre estas moléculas en cualquier proporción, por lo que se esperaría que esta TE aumentara directamente con la proporción molar de las mezclas.

Sin embargo, al analizar los datos, se observa que la mezcla con menor emisión en la longitud de onda de detección es **Dis PFNL:R6G 4**, y es también la que muestra un mayor

porcentaje de *Emisión Absorbida*, con un valor de 23.07%. Esto podría interpretarse erróneamente como si la mezcla con mayor TE fuera aquella en las que las moléculas tienen una proporción de 1 : 0.55.

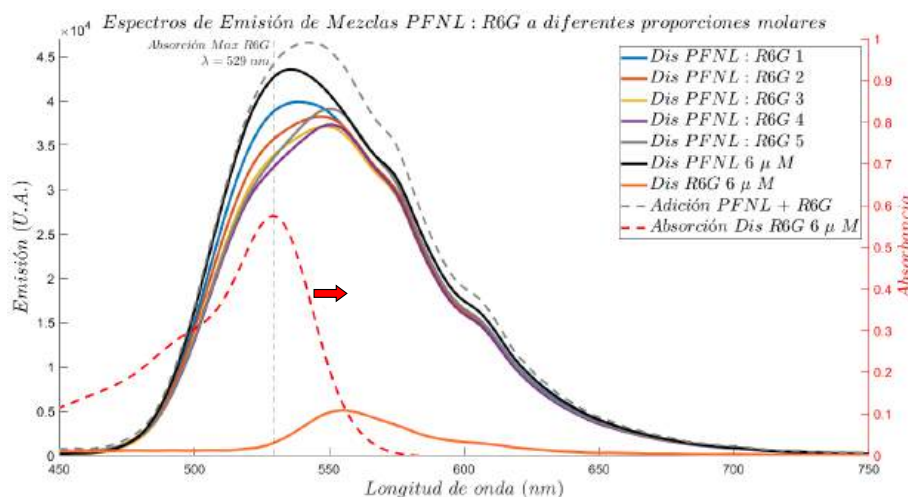


FIGURA 3.9: Emisión de mezclas PFNL:R6G en THF a diferentes proporciones molares, excitando a 402 nm. Adición PFNL + R6G representa la suma aritmética de la emisión de **Dis PFNL 6 μM** y **Dis R6G 6 μM** .

TABLA 3.3: Emisión de PFNL absorbida por R6G en disolución
 $\lambda_{exc} = 402 \text{ nm}$, $\lambda_{exc} = 529 \text{ nm}$

Etiqueta	PFNL (μM)	R6G (μM)	Proporción Molar	Emisión (U.A.)	Emisión Absorbida (%)
Dis PFNL 6 μM	6			42 317.36	
Dis R6G 6 μM		6		1 596.22	
Dis PFNL:R6G 1	6	0.865	1 : 0.14	39 012.61	7.81
Dis PFNL:R6G 2	6	1.6	1 : 0.26	36 101.59	14.69
Dis PFNL:R6G 3	6	2.4	1 : 0.40	34 100.73	19.42
Dis PFNL:R6G 4	6	3.3	1 : 0.55	32 554.85	23.07
Dis PFNL:R6G 5	6	6	1 : 1	33 916.92	19.85
Adición PFNL + R6G	6	6	1 : 1		

En cambio, en la mezcla con mayor proporción de R6G (**Dis PFNL:R6G 5**) se observa un aumento en la intensidad de emisión, lo que resulta en una *Emisión Absorbida* del 19.85%. La forma adecuada de interpretar estos resultados es que la TE es tan efectiva en esta proporción tal que la emisión del R6G aumenta significativamente al ser excitado de forma indirecta por el PFNL. Por lo tanto, este incremento en la emisión de la mezcla es en realidad la contribución adicional de la emisión de R6G, que se suma a la intensidad de la emisión de la mezcla, ya que R6G absorbe y emite en la misma longitud de onda de detección.

3.2.3. Excitación lineal de PFNL:RB en disolución

Se prepararon diferentes disoluciones en THF con PFNL a una concentración de $50 \mu\text{M}$ mezcladas con diversas proporciones molares de RB las cuales son detalladas como **Dis PFNL:RB 1-7** en la Tabla 3.4. La Figura 3.10 muestra los espectros de emisión de estas disoluciones oxigenadas; la máxima absorción de RB que se logró medir fue de $20 \mu\text{M}$ (curva punteada color rojo) ya que la concentración de $100 \mu\text{M}$ se saturaba. Estas mezclas fueron excitadas a 402 nm utilizando el Diodo Láser 2, como se muestra en la Figura 3.8.

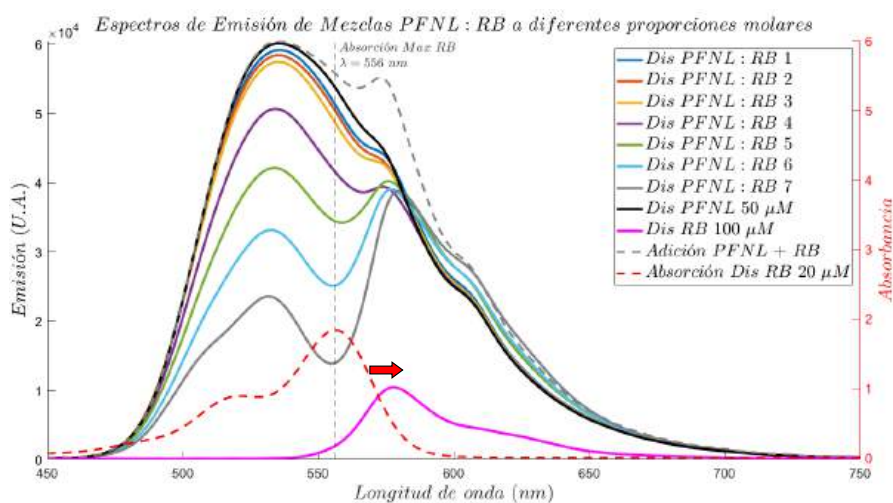


FIGURA 3.10: Emisión de mezclas de PFNL:RB a diferentes proporciones molares, excitando a 402 nm . Adición PFNL y RB representa la suma aritmética de la emisión de **Dis PFNL $50 \mu\text{M}$** y **Dis RB $100 \mu\text{M}$** .

La **Adición PFNL + RB** (curva punteada color gris) de la Figura 3.10 representa la suma aritmética de la emisión de **Dis PFNL $50 \mu\text{M}$** más la emisión de **Dis RB $100 \mu\text{M}$** , que se computó con la intención de predecir el espectro de emisión de la mezcla **Dis PFNL:RB 7**. Sin embargo, los espectros de emisión de estas disoluciones nos muestran que la intensidad de la emisión de PFNL disminuye conforme aumenta la proporción molar de RB y específicamente en el pico máximo de absorción de RB que es $\lambda = 556.331 \text{ nm}$, lo que permite plantear la hipótesis de que existe TE entre PFNL y el RB. Debido a que estos experimentos se realizaron en disolución a concentraciones relativamente bajas, se postula que la TE es por absorción de emisión de PFNL por parte de RB.

La Tabla 3.4 presenta la intensidad de emisión del PFNL en ausencia y presencia del RB, este parámetro se detecta a la longitud de onda de $\lambda_{det} = 556 \text{ nm}$, región donde se encuentra la absorción máxima del RB. Se observa que la emisión de las mezclas disminuye a medida que aumenta la proporción molar de RB. Por lo que se calcula el porcentaje de esta *Emisión Absorbida*.

TABLA 3.4: Emisión de PFNL absorbida por RB en disolución.
 $\lambda_{exc} = 402 \text{ nm}$, $\lambda_{det} = 556 \text{ nm}$

Etiqueta	PFNL (μM)	RB (μM)	Proporción Molar	Emisión (U.A.)	Emisión Absorbida (%)
Dis PFNL 50 μM	50			53 451.81	
Dis RB 100 μM		100		53 451.81	
Dis PFNL:RB 1	50	0.5	1 : 0.01	50 255.11	5.98
Dis PFNL:RB 2	50	1	1 : 0.02	49 853.53	6.73
Dis PFNL:RB 3	50	2	1 : 0.04	47 836.62	10.51
Dis PFNL:RB 4	50	5	1 : 0.1	40 991.8	23.31
Dis PFNL:RB 5	50	20	1 : 0.4	33 939.45	36.50
Dis PFNL:RB 6	50	50	1 : 1	25 082.67	53.07
Dis PFNL:RB 7	50	100	1 : 2	13 865.43	74.06
Adición PFNL + RB	50	100	1 : 2		

En la Tabla 3.4 se destaca que la mezcla **Dis PFNL:RB 7**, la de mayor proporción molar, exhibe el porcentaje más alto de *Emisión Absorbida*, alcanzando un 74.06%. Estos resultados respaldan la hipótesis de que el RB es excitado indirectamente mediante la TE radiativa del PFNL, y que la cantidad de energía que se transfiere aumenta con la proporción molar de RB en la mezcla.

3.2.4. Detección de ROS en disolución de PFNL:RB:DPBF con excitación lineal

Una vez demostrada la TE entre el PFNL y RB se persigue uno de los principales objetivos de esta tesis que es generar ROS con RB utilizando un donador orgánico de energía como fuente de excitación; para monitorear este proceso se utilizó DPBF como trampa química. Se puede apreciar en la Figura 3.11 que el espectro de absorción del PFNL se superpone con el del DPBF. Es importante señalar que PFNL es fotoestable, por lo que su contribución al espectro de absorción en la mezcla **Dis PFNL:RB:DPBF 1** permanece constante, en tanto que la contribución de DPBF cambia ante la presencia de ROS. Esta situación nos lleva hacia un procesamiento de datos espectroscópicos para poder determinar realmente la degradación del DPBF debido a la producción de ROS.

Así que para este experimento se prepara una mezcla de 3 mL de THF con PFNL a una concentración de 12.84 μM , RB a 2 μM y DPBF a 30 μM , denotada como **Dis PFNL:RB:DPBF 1** en la Tabla 3.5. La mezcla fue colocada en una celda de cuarzo de 10 mm y se excita al PFNL con el Diodo Láser 2 a 402 nm con una potencia de 3 mW. La Figura 3.12 presenta el espectro de absorción en espacios temporales de un minuto, este experimento tuvo una duración de 13 minutos, pues el último espectro tomado tuvo la misma forma e intensidad de absorción del PFNL a esa concentración representada por la línea punteada negra, por lo tanto se concluye que una vez transcurrido ese tiempo existe una degradación total del DPBF.

TABLA 3.5: Proporciones molares de la disolución PFNL:RB:DPBF 1

Etiqueta	PFNL (μM)	RB (μM)	DPBF (μM)	Proporción Molar
Dis PFNL:RB:DPBF 1	12.84	2	30	1 : 0.155 : 2.33

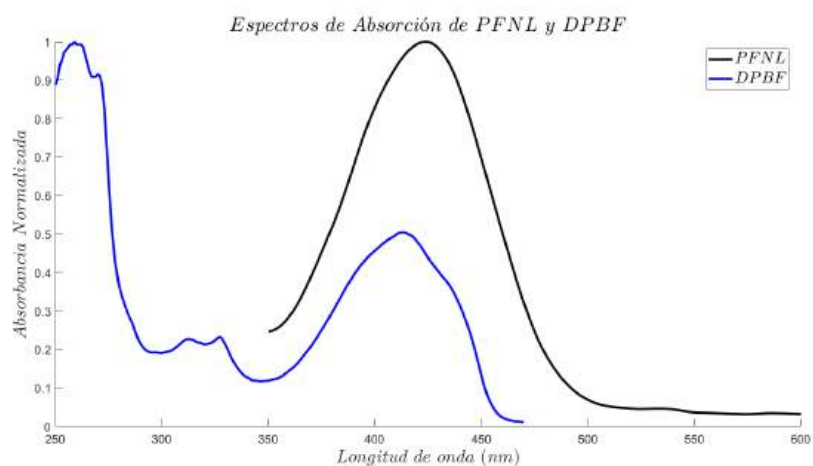


FIGURA 3.11: Superposición de los espectros de absorción de PFNL(12.84 μM) y DPBF (1 mM).

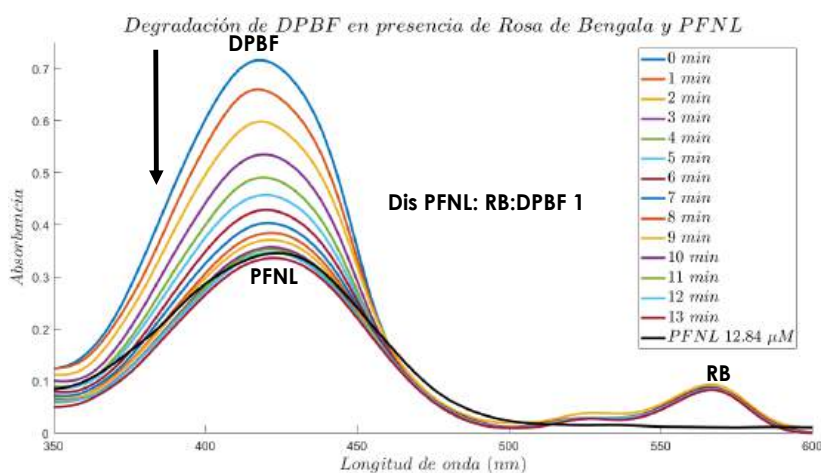


FIGURA 3.12: Degradación molecular del DPBF (30 μM) en presencia de oxígeno singlete generado por TE entre PFNL (12.84 μM) y RB (2 μM), excitando a 402 nm a PFNL.

Este resultado indica que se generó ROS en RB. Los mecanismos de excitación son dos:

- 1) Se excita RB mediante TE a partir de PFNL.
- 2) La excitación directa de RB.

En ambos casos la excitación es a 402 nm , en donde PFNL tiene una absorbancia muy grande, en tanto RB tiene una absorbancia apenas marginal, como se muestra en la Figura 3.7 a). Esta diferencia de absorbancias a la longitud de onda de excitación, además de la alta eficiencia de fluorescencia de PFNL y el traslape de los espectros de emisión de PFNL y absorción de RB, sugieren fuertemente que el mecanismo dominante para la excitación de RB es TE radiativo.

3.2.5. Excitación no lineal de PFNL:RB en disolución

Para el análisis espectroscópico no lineal de estas disoluciones, se utiliza como fuente de excitación el láser Tsunami denotado como Láser Pulsado en la Figura 3.13. Este láser emite a una longitud de onda de $\lambda_p = 800\text{ nm}$ y una potencia de 600 mW aproximadamente. Este Láser Pulsado es bombeado por un láser de emisión continua denominado como Láser de Bombeo (Láser Millennia) con emisión a una longitud de onda de $\lambda_{cw} = 532\text{ nm}$. La salida del Láser Pulsado incide a 45° sobre el espejo 1 y posteriormente incide a 45° sobre el espejo 2; la reflexión del haz del Láser Pulsado en este último espejo tiene una potencia de $P_m = 480\text{ mW}$ y viaja a través de la Lente 2, que tiene una distancia focal de $f = 3\text{ cm}$, lo que permite enfocar la emisión del Láser Pulsado sobre la muestra y así poder excitar de forma no lineal al PFNL.

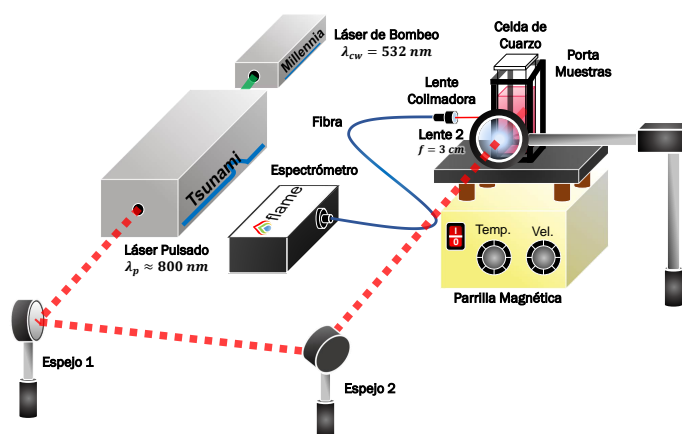


FIGURA 3.13: Arreglo óptico 4. Excitación no lineal de donador para transferencia de energía.

Se tomaron las mismas mezclas de **Dis PFNL:RB 1-7** para este análisis no lineal. En este experimento se excitó directamente a D con el Láser Pulsado a 800 nm a una potencia de $P_m = 480\text{ mW}$. Se pueden apreciar los espectros de emisión de las mezclas en la Figura 3.14. La **Adición NL PFNL + RB** (curva punteada color gris) representa la suma aritmética de la emisión del PFNL a $50\text{ }\mu\text{M}$ (curva color negro) más la emisión del RB a $100\text{ }\mu\text{M}$ (curva color rosa), con la intención de predecir el espectro de emisión de la mezcla **Dis PFNL:RB 7**. El resultado experimental de la emisión de la mezcla es la curva continua gris, donde se observa claramente una disminución de intensidad justo en la región donde está la banda de absorción del RB, lo que da lugar a la hipótesis de que existe TE entre PFNL y RB al excitar a 800 nm .

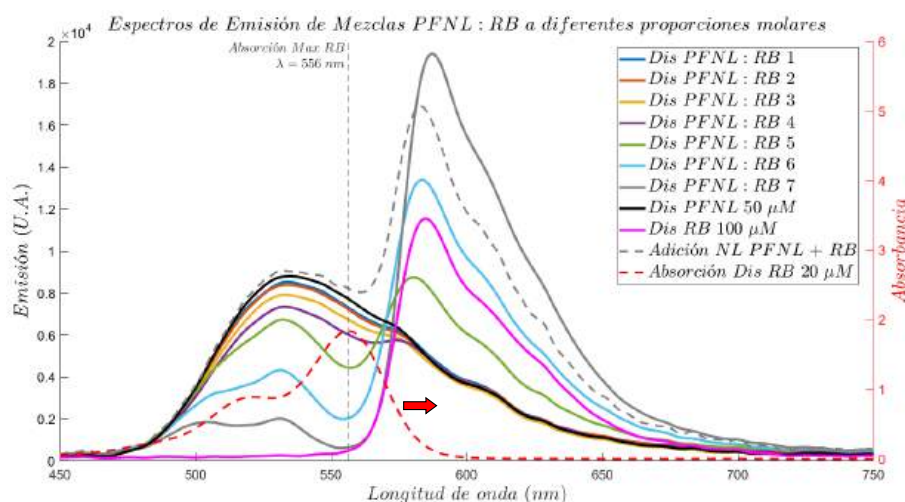


FIGURA 3.14: Emisión de mezclas de PFNL:RB a diferentes proporciones molares, excitando a 800 nm .

Para poder estimar la TE en el compuesto de PFNL:RB en disolución se realiza un cálculo del porcentaje de la emisión del PFNL a $50\ \mu\text{M}$ que fue absorbida por las diferentes proporciones molares de RB.

El objetivo de este cálculo es identificar cuál de las muestras presenta una mayor TE molecular, los resultados para las muestras con excitación lineal (402 nm) de la Figura 3.10 se observan en la Tabla 3.4; mientras que los resultados de las muestras con excitación no lineal (800 nm) de la Figura 3.14 se aprecian en la Tabla 3.6. En ambos casos, se concluye que la mayor cantidad de emisión de PFNL absorbida por RB es en la proporción molar de 1 : 2.

TABLA 3.6: Emisión de PFNL absorbida por RB en disolución.
 $\lambda_{exc} = 800\text{ nm}$, $\lambda_{det} = 556\text{ nm}$

Etiqueta	Proporción Molar	Emisión (U.A.)	Emisión Absorbida (%)
Dis PFNL $50\ \mu\text{M}$		8 140.68	
Dis RB $100\ \mu\text{M}$		8 140.68	
Dis PFNL:RB 1	1 : 0.01	7 670.15	5.78
Dis PFNL:RB 2	1 : 0.02	7 518.43	7.64
Dis PFNL:RB 3	1 : 0.04	6 891.24	15.35
Dis PFNL:RB 4	1 : 0.1	6 338.46	22.14
Dis PFNL:RB 5	1 : 0.4	4 706.23	42.19
Dis PFNL:RB 6	1 : 1	2 142.18	76.69
Dis PFNL:RB 7	1 : 2	827.29	89.83

En este caso nuevamente el tipo de TE es radiativo. Debe resaltarse que de todos los materiales presentes en las mezclas **Dis PFNL:RB 1-7** solo PFNL tiene actividad no lineal significativa. La σ_{TPA} de PFNL a 800 nm es de $1\ 200\text{ GM}$; por otra parte la σ_{TPA} de RB a esta

misma longitud de onda es de 10 GM. De estos datos se concluye que a 800 nm se excita primordialmente PFNL, que transfiere su energía radiativamente a RB, y a su vez genera ROS. Debe observarse que incluso la emisión de RB es mayor en presencia de PFNL, lo cual también denota TE.

3.2.6. Detección de ROS en disolución de PFNL:RB con excitación no lineal

Primeramente se realiza el experimento excitando a 800 nm una disolución en THF de RB a una concentración de 16 μM con DPBF a 20 μM en una celda de cuarzo de 10 mm y es denotada como **Dis RB:DPBF 2** en la Tabla 3.7, utilizando el sistema óptico mostrado en la Figura 3.13. La mezcla fue oxigenada previamente a este experimento, el cual tuvo una duración de 115 minutos, se prolongó el tiempo de excitación de este análisis de degradación debido a que el RB no es tan eficiente produciendo ROS al ser excitado con 800 nm [16], por lo que también se incrementó 8 veces su concentración a comparación de la mezcla **Dis RB:DPBF 1** (ver Tabla 3.2) y se reduce la concentración de DPBF, como se muestra en la Figura 3.15.

TABLA 3.7: Proporciones molares de la disolución RB:DPBF 2

Etiqueta	RB (μM)	DPBF (μM)	Proporción Molar
Dis RB:DPBF 2	16	20	1 : 1.25

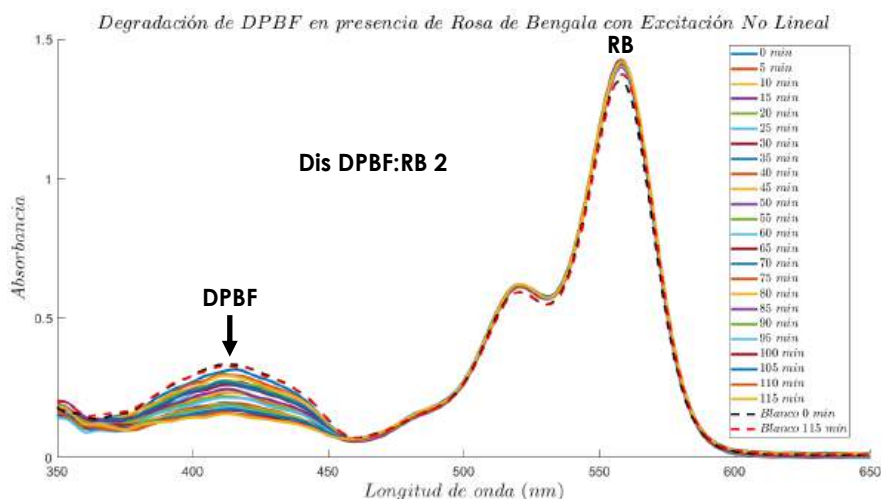


FIGURA 3.15: Degradación molecular del DPBF (20 μM) en presencia de oxígeno singlete generado por RB (16 μM), excitando a 800 nm. Las líneas punteadas representan los espectros de absorción de referencia sin excitación.

Se prepara una mezcla de referencia con la misma concentración de **Dis RB:DPBF 2**, se mide su espectro de absorción al iniciar el experimento denotado como Blanco 0 min (curva punteada color negro) en la Figura 3.15. Posterior a esto, la mezcla es reservada en oscuridad total; cuando el experimento finaliza se mide nuevamente el espectro de absorción denotado

como Blanco 115 *min* (curva punteada color rojo). Al no existir cambios significativos en la intensidad de absorción de la mezcla de referencia queda demostrado que la degradación de DPBF es debido a producción de ROS al excitar RB con 800 *nm*.

Al analizar estos espectros se observa claramente que la producción de ROS es mucho menor que cuando el RB es excitado a 532 *nm* incluso aunque la excitación con 800 *nm* sea a una potencia casi 100 veces mayor motivo por el cual, este PS solo es utilizado para tratamientos superficiales donde se excita en el visible.

Una vez demostrado que, aunque sea ineficiente, existe una degradación de DPBF bajo excitación óptica no lineal de RB, se realiza el siguiente experimento en una mezcla de PFNL a una concentración de 16 μM con RB a 16 μM y DPBF a 20 μM , denotada como **Dis PFNL:RB:DPBF 2** en la Tabla 3.8. La mezcla es colocada en una celda de cuarzo de 10 *mm* y excitada a 800 *nm* con el Láser Pulsado. La Figura 3.16 muestra los espectros de absorción obtenidos a lo largo de 115 minutos de exposición, tomando un espectro cada 5 minutos.

TABLA 3.8: Proporciones molares de la disolución PFNL:RB:DPBF 2

Etiqueta	PFNL (μM)	RB (μM)	DPBF (μM)	Proporción Molar
Dis PFNL:RB:DPBF 2	16	16	20	1 : 1 : 1.25

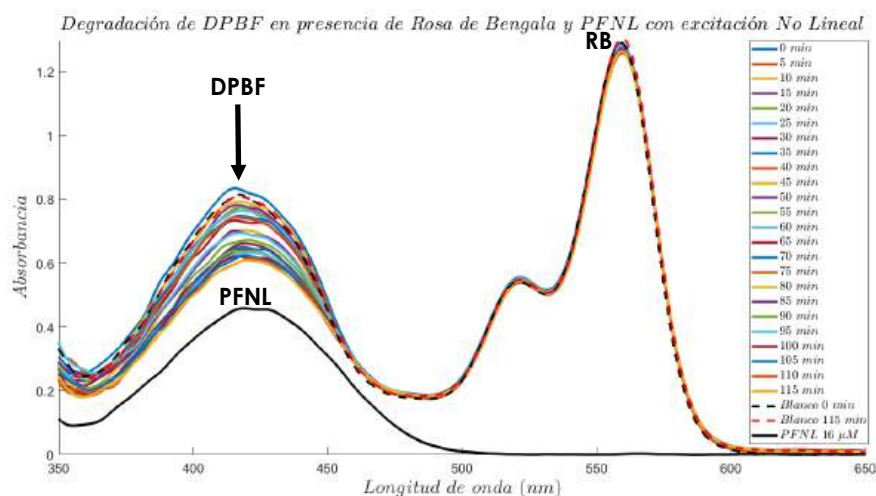


FIGURA 3.16: Degradación molecular del DPBF (20 μM) en presencia de oxígeno singlete generado por TE entre PFNL (16 μM) y RB (16 μM), excitando a 800 *nm*. Las líneas punteadas representan los espectros de absorción de referencia sin excitación.

Se puede observar que existe una degradación del DPBF en la disolución PFNL:RB, debido a la excitación indirecta del RB por parte del PFNL, evidenciando la TE entre ambas moléculas. Esta excitación de RB por medio de TE genera ROS adicional a la excitación directa de RB.

3.3. Polímero fluorescente no lineal como donador para FRET en películas

Una vez teniendo la evidencia de que se presenta la TE entre PFNL y RB en estado disolución, se procede con la fabricación de películas con y sin matriz polimérica (en este caso Poliestireno), empleando algunas proporciones molares previamente estudiadas y utilizando la técnica de *spin coating* en ambos casos. Así que, al tener este par de moléculas en estado sólido, se deduce que la distancia entre ellas se reduce sustancialmente comparada a las distancias a las que se encuentran en solución, y que es cercana al orden de la distancia Förster (R_0), lo que permite que ocurra el fenómeno foto-físico de transferencia de energía Resonante Tipo Förster (FRET) en este sistema molecular dinámico, [11].

3.3.1. Películas de PFNL:RB

Las mezclas en disolución **Dis PFNL:RB 1,4,5** y **Dis PFNL 50 μM** se utilizaron para fabricar películas de PFNL:RB sin matriz polimérica. Las películas con diferentes proporciones molares se denominan como **Film PFNL:RB 1-3**, como se detalla en la Tabla 3.9. Es importante mencionar que las concentraciones y proporciones molares presentadas en dicha Tabla sirven únicamente como referencia para describir las características de las disoluciones empleadas, y no brindan información de las proporciones reales en las películas.

Una vez fabricadas las películas, se percibe que al utilizar la mezcla de disoluciones de THF sin matriz polimérica, las moléculas no se adhirieron al sustrato de forma homogénea, lo que resultó en un espesor no uniforme. Sin embargo, se tomó el espectro de emisión de cada película al ser excitada con el Diodo Láser 2 (402 nm) del sistema óptico que se muestra en la Figura 3.8.

En la Figura 3.17, se aprecia que la intensidad de estos espectros de emisión disminuye conforme aumenta la proporción molar de RB en la mezcla. Al normalizar la emisión de las películas, como se muestra en la Figura 3.18, se observa que, en la región de máxima emisión del RB, la intensidad de emisión de las películas aumenta. Esto permite plantear la hipótesis de que este aumento se debe a la interacción dipolo-dipolo entre las moléculas, ya que las distancias entre ellas cumplen con la distancia R_0 requerida para que ocurra el fenómeno de FRET. Como resultado, el RB es excitado indirectamente por la emisión del PFNL.

Este comportamiento era esperado ya que las moléculas PFNL y RB mezcladas en película tienen una distancia intermolecular más cercana, en comparación de cuando se encuentran en una disolución. Por lo que este cambio en intensidad se le atribuye al proceso de FRET.

3.3.2. Películas de PFNL:RB:PS

El poliestireno es utilizado en la fabricación de estas películas como matriz polimérica, ya que este ofrece una adherencia homogénea sobre el sustrato, lo que resulta en una película con un espesor uniforme.

TABLA 3.9: Proporciones molares de películas PFNL:RB

Etiqueta	PFNL (μM) ^a	RB (μM) ^a	Proporción Molar
Film PFNL:RB 1	50	0.5	1 : 0.01
Film PFNL:RB 2	50	5	1 : 0.1
Film PFNL:RB 3	50	100	1 : 2

^aLas concentraciones y proporciones molares presentadas en esta tabla hacen referencia a las disoluciones empleadas para la fabricación de estas películas.

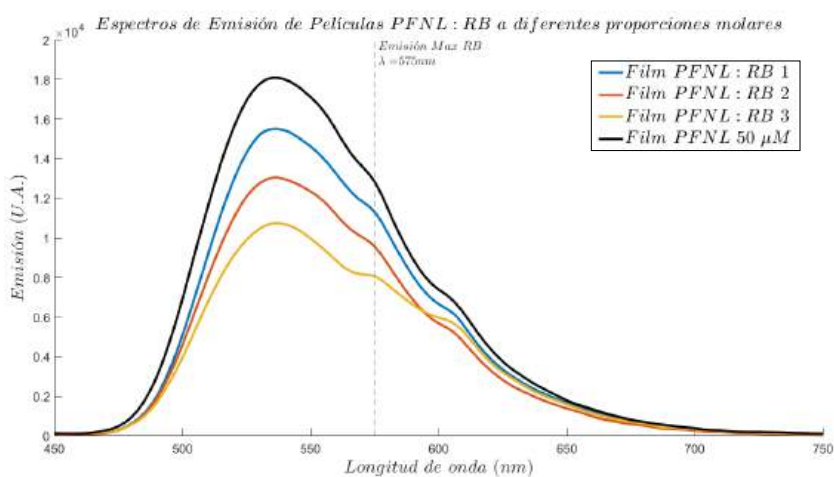


FIGURA 3.17: Emisión de películas de PFNL:RB a diferentes proporciones, excitando a 402 nm.

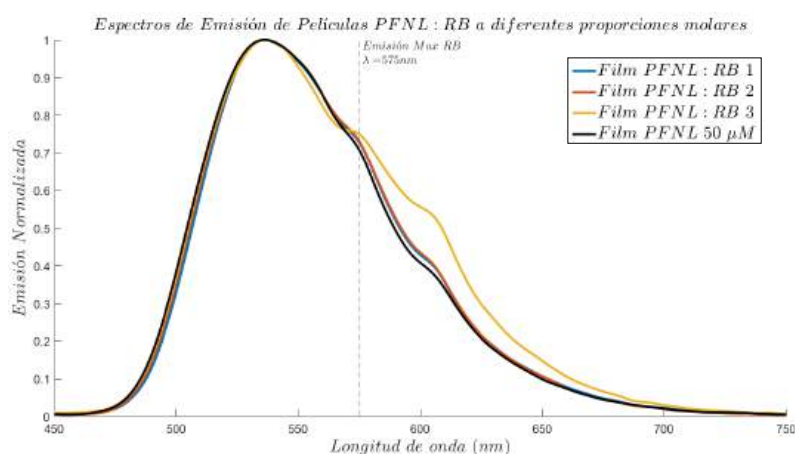


FIGURA 3.18: Emisión normalizada de películas de PFNL:RB a diferentes proporciones, excitando a 402 nm.

Se utilizó PS con una concentración molar fija de 0.173 mM (40mg), para la fabricación de estas películas, las cuales son denotadas como **Film PFNL:RB:PS**, **Film PFNL:PS**, **Film**

RB:PS y **Film PS**, y los detalles se encuentran en la Tabla 3.10. Las concentraciones y proporciones molares presentadas en esta Tabla son usadas como referencia para describir las características de las disoluciones empleadas, y no brindan información de las proporciones reales en las películas con matriz polimérica.

TABLA 3.10: Proporciones molares de película PFNL:RB:PS

Etiqueta	PFNL ^a		RB ^a		PS ^a		Proporción Molar
	mM	mg	mM	mg	mM	mg	
Film PFNL:RB:PS	0.96	0.5	1.927	1.96	0.173	40	1 : 2 : 0.18
Film PFNL: PS	0.96	0.5			0.173	40	1 : 0.18
Film RB: PS			1.927	1.96	0.173	40	1 : 0.09
Film PS					0.173	40	

^aLas concentraciones y proporciones molares presentadas en esta tabla hacen referencia a las disoluciones empleadas para la fabricación de estas películas.

Los espectros de emisión de estas películas, mostrados en la Figura 3.19, fueron medidos en el espectrofluorómetro FS5 excitando a 420 nm, ya que, de acuerdo con la Figura 3.7 a), a esta longitud de onda se encuentra el pico de absorción del PFNL. Al analizar estos resultados, se observa una disminución considerable en la intensidad de emisión en la película **Film PFNL:RB:PS** en comparación con la emisión de **Film PFNL:PS**. Por otro lado, la emisión de las películas **Film RB:PS** y **Film PS** no es detectable, lo que indica que el RB y el PS no contribuyen a la intensidad de emisión al mezclarse con PFNL en estado sólido.

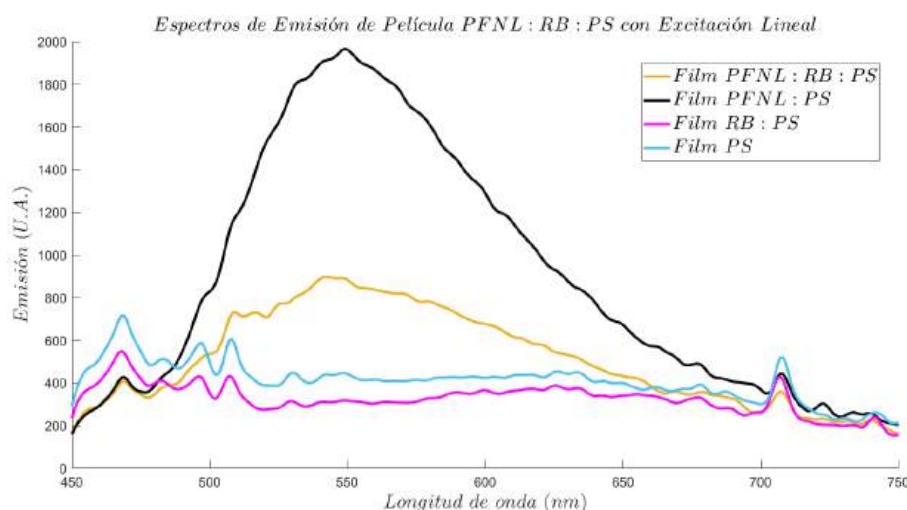


FIGURA 3.19: Emisión de películas de PFNL:RB:PS, excitando a 420 nm.

La Figura 3.20 muestra la emisión normalizada de las películas con PFNL, y se aprecia que la forma del espectro de **Film PFNL:RB:PS** es similar a la emisión de **Film PFNL:PS**. Se plantea la hipótesis de que la disminución de la emisión del PFNL puede ser atribuida a

que parte de esta fue absorbida por RB, confirmando que el proceso de FRET ocurre desde PFNL hacia RB.

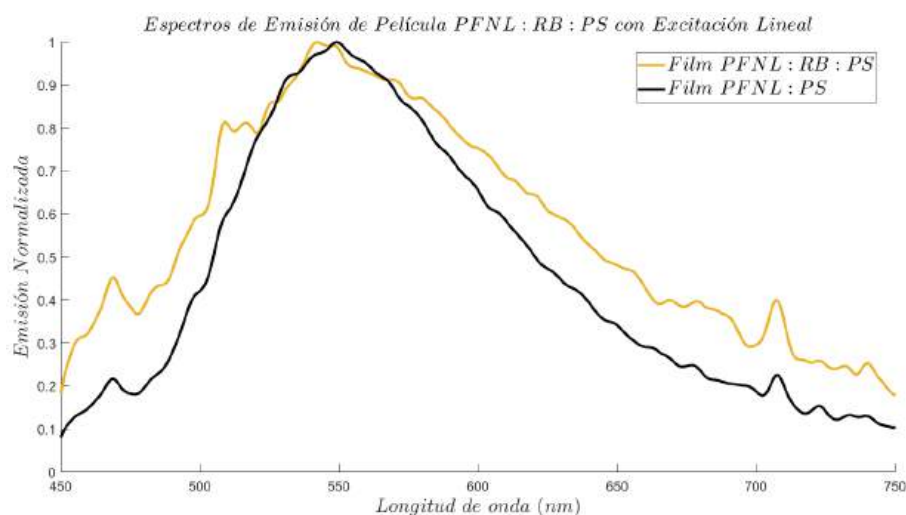


FIGURA 3.20: Emisión normalizada de películas de PFNL:RB:PS, excitando a 420 nm.

3.4. Polímero fluorescente no lineal como donador para FRET en nanopartículas

Para la fabricación de nanopartículas (NPs) se preparan tres disoluciones diferentes para obtener un compuesto donador : aceptor de PFNL:RB a una proporción molar de 1:2 (por cada molécula de PFNL existen 2 de RB), utilizando como surfactante Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio (CTAB) a una concentración de 0.5 mM en 2 mL de un medio acuoso.

A continuación se describe detalladamente el método de fabricación de las NPs estudiadas en esta tesis:

■ NPs PFNL:RB 1

Se inyectan rápidamente a la solución acuosa de CTAB 300 μL de RB a una concentración de 960 μM en THF y posteriormente se agrega el mismo volumen de PFNL a una concentración de 480 μM en THF.

■ NPs PFNL:RB 2

Se mezclan 300 μL de PFNL y RB a una concentración de 480 y 960 μM disueltas en THF, y enseguida se toman 600 μL de esta mezcla y se inyectan rápidamente al CTAB.

■ NPs PFNL:RB 3

Se inyectan rápidamente al CTAB 300 μL de PFNL a una concentración de 480 μM en THF y posteriormente se agrega el mismo volumen de RB a una concentración de 960 μM en THF.

- **NPs PFNL**

Se inyectan rápidamente al CTAB 300 μL de PFNL a una concentración de 480 μM en THF.

- **CTAB RB**

Se inyectan rápidamente al CTAB 300 μL de RB a una concentración de 960 μM en THF.

Posteriormente, todas las NPs pasan por dos procesos de filtrado utilizando filtros de membrana, primero se usa un filtro de 1 μm y después otro de 0.22 μm . La Tabla 3.11 muestra las diferentes proporciones molares de las NPs. Las concentraciones y proporciones molares presentadas en esta Tabla son usadas como referencia para describir las características de las disoluciones empleadas, y no brindan información de las proporciones reales en las NPs.

Los datos espectroscópicos de todas las NPs se midieron en el FS5, al pasar 24 horas después de la fabricación de las NPs. Con esta metodología se desea comprobar la reproducibilidad espectral de las NPs; sin embargo las **NPs PFNL:RB 3** ya no presentaron absorción ni emisión, por lo que se decidió volver a fabricar esas NPs, pero no se obtuvieron resultados diferentes así que, solo se pudieron estudiar las **NPs PFNL:RB 1** y **NPs PFNL:RB 2**.

Los espectros de emisión de las NPs de PFNL:RB bajo excitación lineal se muestran en la Figura 3.21. El espectro de emisión de las **NPs PFNL:RB 1** presenta un cambio significativo de intensidad justo en la región espectral donde se encuentra el pico máximo de absorción de RB (554 nm) y, al mismo tiempo se presenta el pico máximo de emisión de RB (576 nm).

TABLA 3.11: Proporciones molares de nanopartículas PFNL:RB

Etiqueta	PFNL (μM) ^a	RB (μM) ^a	Proporción Molar
NPs PFNL:RB 1	72	144	1 : 2
NPs PFNL:RB 2	72	144	1 : 2
NPs PFNL:RB 3	72	144	1 : 2
NPs PFNL	72		
CTAB RB		144	

^aLas concentraciones y proporciones molares presentadas en esta tabla hacen referencia a las disoluciones empleadas para la fabricación de estas películas.

Esto se interpreta como la reabsorción de la emisión de PFNL por parte de RB demostrando la hipótesis de los procesos de TE y FRET están presentes en este compuesto donador : aceptor. Este comportamiento espectral se reproduce con las **NPs PFNL:RB 2** pero en menor eficiencia. El espectro de emisión de **NPs PFNL** no presenta en esta Figura, ya que su intensidad de emisión saturaba el detector del espectrofluorómetro.

En la Figura 3.22 se presentan los espectros de absorción, los cuales han sido normalizados para discriminar la absorción de **NPs PFNL:RB 1** y **2**. Se observa que cuando el PFNL y RB se mezclan en NPs, la absorción correspondiente a PFNL muestra un corrimiento hacia longitudes de onda más largas en comparación con la absorción de las **NPs PFNL** individuales.

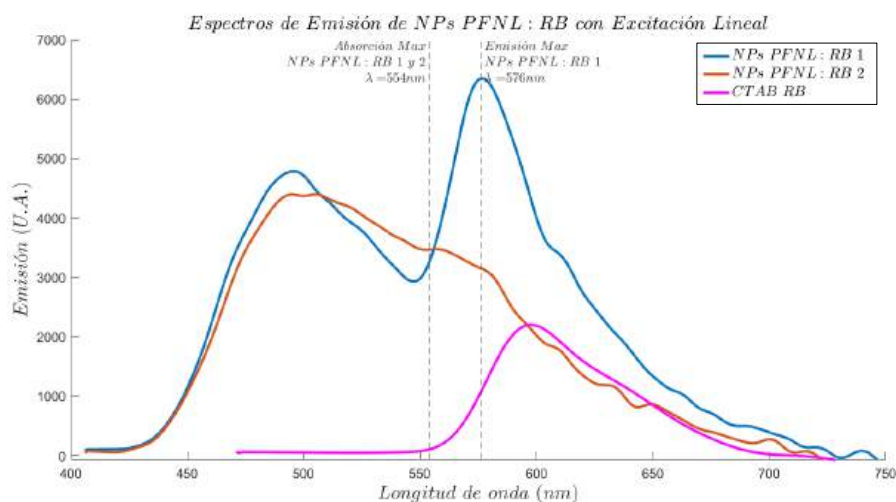


FIGURA 3.21: Emisión de nanopartículas de PFNL:RB, excitando a 402 nm.

Además, se nota un ligero cambio en la forma del espectro de absorción correspondiente al RB, que podría deberse al método empleado para preparar las NPs. Cabe destacar que el espectro de absorción de las **CTAB RB** no se incluye en esta figura, ya que presenta saturación debido a su alta concentración.

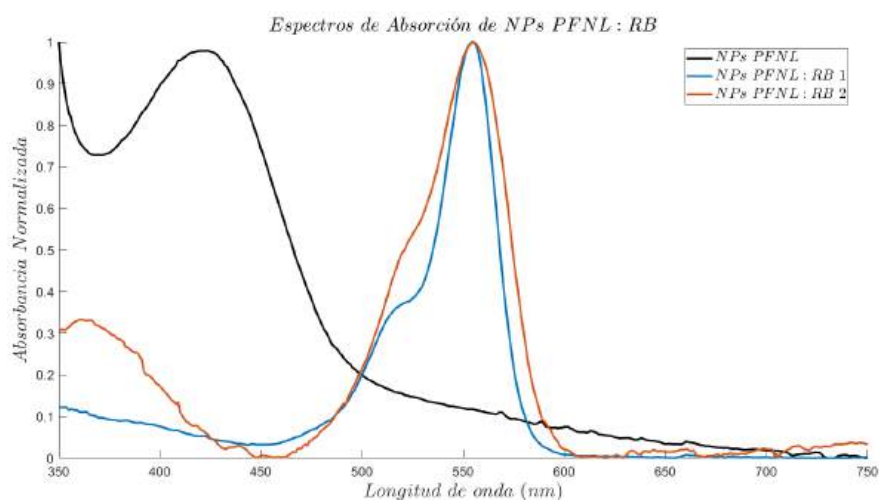


FIGURA 3.22: Absorción normalizada de nanopartículas de PFNL:RB.

3.5. Internalización celular con nanopartículas de PFNL-RB

Una vez fabricadas las nanopartículas, se realiza una tinción celular en un cultivo de neuroblastoma SH-SY5Y de 10,000 células por mL. Para la fijación de células en el sustrato se utilizó una solución al 4% de Paraformaldehído, 0.5% Glutaraldehído, una vez fijadas las

células se realiza un lavado con una Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS) con un PH de 7.4 %, para la permeabilización se agrega 1 mL de la solución Tritón X-100.

Al tener las células fijadas, lavadas y permeabilizadas se tiñen con 10 μL de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) que es un colorante no permeable con afinidad por los ácidos desoxirribonucleico (ADN), finalmente los neuroblastomas se tiñen con las NPs, ya estudiadas en esta tesis. Para propósitos de discusión de resultados en el siguiente capítulo, es importante señalar la superposición espectral de absorción y emisión del PFNL, RB y DAPI, como se muestra en la Figura 3.23.

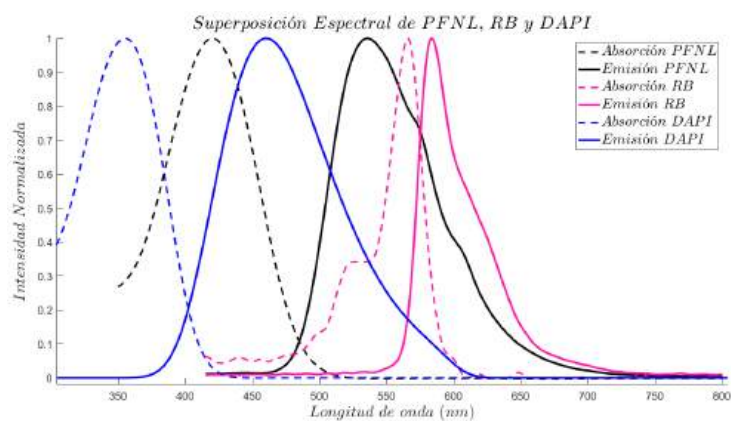


FIGURA 3.23: Espectros de emisión y absorción de PFNL RB y DAPI.

Capítulo 4

Resultados

En este capítulo se realizan los análisis pertinentes para detectar, cuantificar y evidenciar minuciosamente la TE y FRET en el sistema dinámico del compuesto PFNL:RB en disolución, en películas y en NPs. Así como también se presentan los resultados PFNL:RB como un fotosensibilizador potencial para la producción de ROS al excitar con 402 *nm* de forma lineal y no lineal con 800 *nm*, y su capacidad de internalización celular *in vitro* en neuroblastomas.

4.1. Generación de especies reactivas de oxígeno con excitación lineal

Se realizó un procesamiento de datos espectroscópicos en MATLAB para comparar la producción de ROS utilizando al PFNL como donador de energía con excitación lineal y no lineal.

4.1.1. Análisis de detección de ROS en disolución PFNL:RB:DPBF con excitación lineal

El primer procesamiento de datos se realiza a partir de los espectros de absorción de la mezcla **Dis PFNL:RB:DPBF 1**, con las proporciones moleculares detalladas en la Tabla 4.1, con excitación a 402 *nm*, donde todas las moléculas fueron excitadas directamente en diferente proporción de acuerdo a su concentración, observando que esta longitud de onda se encuentra en la región del espectro de absorción de las tres moléculas. Esta excitación desencadena una oxidación química del DPBF debida a la presencia de ROS generadas al excitar de forma directa (402 *nm*) e indirecta (emisión del PFNL) al RB. El espectro de absorción de esta mezcla molecular se describió en el capítulo 3, en la Figura 3.12 donde se presenta la superposición espectral de la absorción del DPBF y el PFNL, lo que implica que los datos deben ser procesados para cuantificar la degradación del DPBF.

Por lo tanto, para poder discriminar específicamente la degradación del DPBF, se realiza una sustracción de la absorción correspondiente a una disolución de PFNL con una de 12.84 μM a cada uno de los espectros de absorción de las disoluciones bajo excitación a 402 *nm*; este procesamiento aritmético es denotado como **Proc Dis PFNL:RB:DPBF 1** y el resultado se muestra en la Figura 4.1.

Con este procedimiento se obtuvieron pequeños valores de absorbancia negativos en algunas de las curvas mostradas en la región de absorción de DPBF; estos pequeños errores

pueden tener origen en la preparación de muestras debido a errores intrínsecos experimentales al pesar y/o disolver las moléculas, lo que ocasiona pequeñas diferencias entre las concentraciones calculadas y las reales; sin embargo, esto no influye en el procesamiento de datos de la siguiente sección.

TABLA 4.1: Disoluciones utilizadas para cuantificar la degradación de DPBF debido a ROS producidas con excitación lineal

Etiqueta	PFNL (μM)	RB (μM)	DPBF (μM)	Proporción Molar
Dis DPBF			30	
Dis RB:DPBF 1		2	30	1 : 15
Dis PFNL:RB:DPBF 1	12.84	2	30	1 : 0.155 : 2.33
Proc Dis PFNL:RB:DPBF 1	-	2	30	1 : 0.155 : 2.33

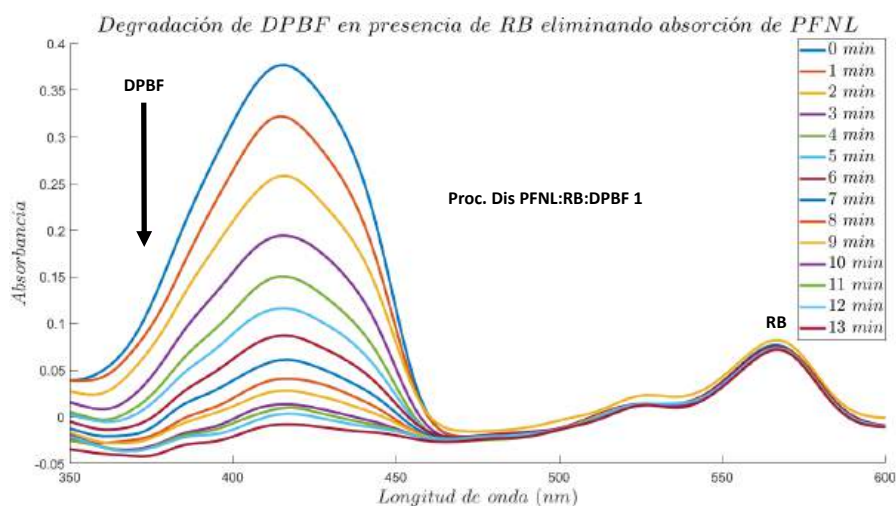


FIGURA 4.1: Procesamiento de los Espectros de absorción de la mezcla **Dis PFNL:RB:DPBF 1** a diferentes tiempos de exposición de radiación, excitando a 402 nm. En estos espectros se ha eliminado la absorción de PFNL.

4.1.2. Degradación relativa con excitación lineal

El objetivo del siguiente procesamiento es analizar la degradación relativa de las mezclas moleculares **Dis DPBF**, **Dis RB:DPBF 1** y **Dis PFNL:RB:DPBF 1** que fueron excitadas a 402 nm durante 15 minutos.

En este análisis se utiliza la Ley de Lambert-Beer [12], ya que la absorbancia se puede describir como lo muestra la siguiente Ecuación (4.1).

$$A = \varepsilon(\lambda) L C \quad (4.1)$$

Donde, A es absorbancia, $\varepsilon(\lambda)$ es el coeficiente de extinción molar a una longitud de onda específica, b es la longitud del camino óptico en cm y C es la concentración de la molécula.

El único dato que se desconoce de la Ecuación (4.1) es $\varepsilon(\lambda)$, este se puede calcular experimentalmente. Para ello, A se toma justo en la longitud de onda de máxima absorción (λ_{det}) correspondiente a cada una de las moléculas presentes en las disoluciones de la Tabla 4.1, la longitud de la celda de cuarzo denotada como $L = 1\text{ cm}$ y en cada experimento se calculó C , por lo tanto, el coeficiente de extinción molar puede calcularse con la Ecuación (4.2).

$$\varepsilon(\lambda) = \frac{A}{L C} \quad (4.2)$$

Una vez que se calcula $\varepsilon(\lambda)$ para la longitud a la que se quiere detectar la degradación (λ_{det}), se denota la población inicial de la molécula como N_0 , que es la concentración a la que se prepara la muestra, y la población o concentración actual (después de determinado tiempo de exposición a radiación) denotada como N , ver Ecuación (4.3).

$$N = \frac{A}{\varepsilon(\lambda) L} \quad (4.3)$$

A partir de estos datos se hace una relación logarítmica entre N_0 y N como se muestra en la Ecuación (4.4) con la cuál se determina la Degradación Relativa de una molécula.

$$\text{Degradación Relativa} = \ln \left(\frac{N_0}{N} \right) \quad (4.4)$$

Para este caso se tomó $\lambda_{det} = 420\text{ nm}$ para detectar la degradación del DPBF y 566 nm para RB, los resultados de este procesamiento se muestra en la Figura 4.2, donde λ_{exc} indica la longitud de onda de excitación de la muestra.

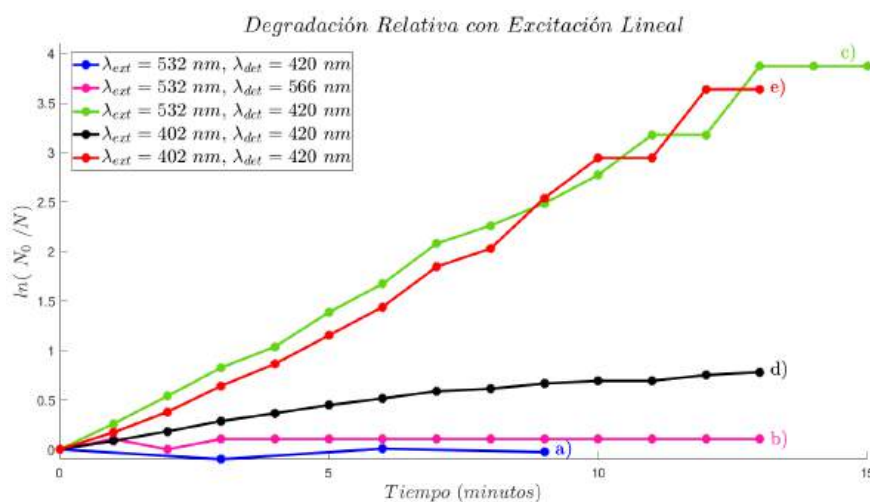


FIGURA 4.2: Degradación relativa con excitación lineal: a) Dis DPBF, b) Dis RB:DPBF 1, c) Dis RB:DPBF 1, d) Dis PFNL:RB:DPBF 1 y, e) Proc. Dis PFNL:RB:DPBF 1 eliminado la absorción de PFNL.

Los resultados de este análisis molecular muestra que el DPBF no se degrada al ser excitado a 532 nm, ya que esta longitud de onda esta fuera del rango de absorción del DPBF, ver Figura 4.2 a); también se demuestra que el RB no se auto degrada al exponerse a su propia producción de 1O_2 al ser excitado 532 nm, ver Figura 4.2 b); por lo que se concluye que al excitar a 532 nm la mezcla **Dis RB:DPBF 1** la degradación del DPBF es característica de la producción de 1O_2 de RB como se muestra en la Figura 4.2 c) y presenta una degradación total al minuto 13.

Al excitar a 402 nm a la mezcla **Dis PFNL:RB:DPBF 1** se observa en la Figura 4.2 d) que el cambio de absorción del DPBF es aparentemente menor en presencia del PFNL, pero esto se debe a que en $\lambda_{det} = 420$ nm se encuentra la absorción de la población de DPBF y de PFNL ya que ambas moléculas absorben a esa longitud de onda. Por ello, se analiza la degradación relativa del DPBF a partir de los datos procesados **Proc. Dis PFNL:RB:DPBF 1**, donde se elimina la absorción del PFNL, lo que permite calcular la degradación relativa auténtica de la molécula DPBF en la mezcla **Dis PFNL:RB:DPBF 1** al excitar a 402 nm y se obtiene un resultado más consistente que se muestra en la Figura 4.2 e).

Cuando la mezcla **Dis PFNL:RB:DPBF 1** es expuesta a la radiación del Diodo Láser 2 que emite a 402 nm (ver Figura 3.8), RB produce 1O_2 por medio de dos mecanismos de excitación:

- 1) Excitación Directa a 402 nm.
- 2) Excitación Indirecta mediante TE a partir de la emisión de PFNL.

Aunque el RB es excitado directamente, tiene una absorbancia muy pequeña (ver Figura 3.7) a) a esta longitud de onda, por lo que se deduce que el mecanismo principal de producción de 1O_2 es la TE radiativa de PFNL a RB, ya que el PFNL tiene una absorbancia muy grande a 402 nm y su espectro de emisión se superpone con el de absorción del RB (ver Figura 3.7) .

De acuerdo a lo anterior, la degradación de la molécula DPBF en **Dis PFNL:RB:DPBF 1** puede deberse a dos procesos distintos:

- 1) Fotodegradación por Excitación Directa a 402 nm.
- 2) Oxidación química por presencia de 1O_2 .

Al comparar la Figura 4.2 c) con la Figura 4.2 e) se aprecia que la eficiencia de producción de 1O_2 es muy similar al directamente RB a 532 nm o indirectamente a través de TE con excitación de PFNL a 402 nm.

Se concluye que al excitar a RB indirectamente con la emisión del PFNL en la mezcla **Dis PFNL:RB:DPBF 1**, la degradación total del DPBF se presenta en el minuto 12 como se muestra en el procesamiento de datos en la Figura 4.2 e), por lo que queda demostrado que se puede producir ROS con TE radiativa, la cual se presenta en la mezcla **Dis PFNL:RB:DPBF 1** de forma optima al excitar a 402 nm, por lo tanto esta mezcla puede ser considerada como un potencial fotosensibilizador para la aplicación de la PDT.

4.2. Generación de especies reactivas de oxígeno con excitación no lineal

4.2.1. Análisis de detección de ROS en disolución PFNL:RB:DPBF con excitación no lineal

En esta sección se aplica el mismo procedimiento de procesamiento de datos para sustracción de la absorción de PFNL en la mezcla **Dis PFNL:RB:DPBF 2**, que se detalla en la Tabla 4.2. El objetivo es discriminar la degradación característica de DPBF al exponer la mezcla a excitación no lineal (TPA) a 800 nm, como se muestra en la Figura 4.3.

TABLA 4.2: Disoluciones utilizadas para cuantificar la degradación de DPBF debido a ROS producidas con excitación no lineal

Etiqueta	PFNL (μM)	RB (μM)	DPBF (μM)	Proporción Molar
Dis RB:DPBF 2		16	20	1 : 1.25
Dis PFNL:RB:DPBF 2	16	16	20	1 : 1 : 1.25
Proc Dis PFNL:RB:DPBF 2	-	2	30	1 : 1 : 1.25

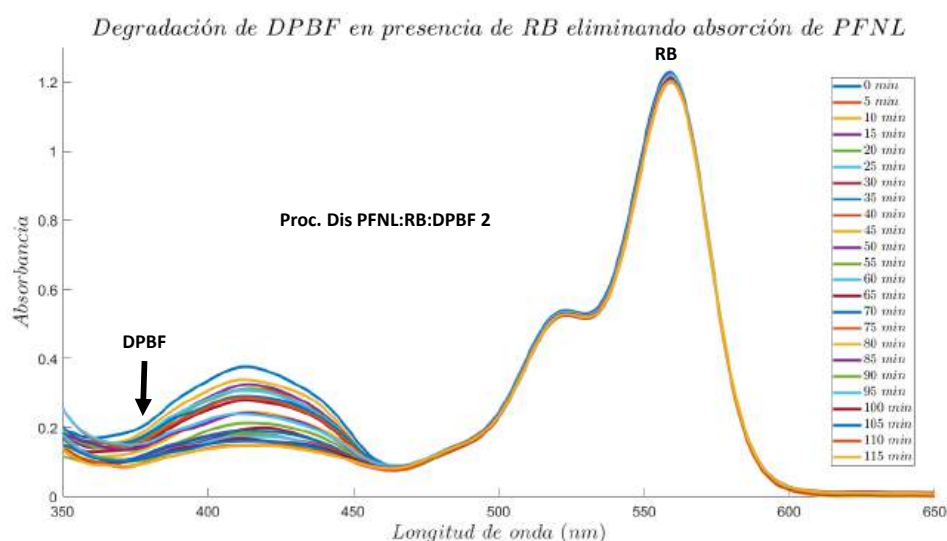


FIGURA 4.3: Procesamiento de los espectros de absorción de la mezcla **Dis PFNL:RB:DPBF 2** a diferentes tiempos de exposición de radiación, excitando a 800 nm. En estos espectros se ha eliminado la absorción de PFNL.

Es importante destacar que tanto PFNL como RB tienen una sección transversal de absorción de dos fotones al excitar a 800 nm ($\sigma_{TPA} = 1\ 200$ y $10\ GM$, respectivamente), lo que les permite ser excitadas por medio de absorción de dos fotones, aunque obviamente de manera mucho más eficiente para PFNL. En cambio, está reportado que el DPBF no presenta absorción cuando es excitado con longitudes de onda en el espectro infrarrojo, por lo que no

experimenta degradación a 800 nm [37].

Entonces, la degradación del DPBF se debe a que el RB realiza la transición electrónica hacia el estado triplete, generando $^1\text{O}_2$, lo que desencadena la oxidación química de DPBF. Sin embargo, en comparación con la excitación lineal este proceso ocurre de manera más lenta, ya que, tras exponer la mezcla a la radiación de 800 nm durante 115 minutos, el DPBF no se degrada por completo. En este experimento, el RB genera $^1\text{O}_2$ a través de dos mecanismos de excitación:

- 1) Excitación directa no lineal a 800 nm.
- 2) Excitación indirecta mediante TE a partir de la emisión de PFNL promovida por absorción no lineal a 800 nm.

Al considerar el proceso de TPA en RB, se prevé que el aumento cuantitativamente pequeño de producción de $^1\text{O}_2$ es generado por la TE entre RB y PFNL al excitar la mezcla **Dis PFNL:RB:DPBF 2** de manera no lineal con 800 nm, este proceso se describe detalladamente en la Figura 1.3 c) del capítulo 1.

4.2.2. Degradación relativa con excitación no lineal

En esta sección se presentan los espectros de absorción de las mezclas **Dis RB:DPBF 2** y **Dis PFNL:RB:DPBF 2**, excitadas a una longitud de onda de 800 nm, con la finalidad de estimar la degradación de DPBF por la presencia de ROS generada por TPA.

La degradación relativa molecular de las mezclas se calcula utilizando la Ecuación (4.4) una longitud de onda de $\lambda_{det} = 420$ y 566 nm, correspondientes a los picos de absorción de DPBF y RB respectivamente, como se muestra en la Figura 4.4.

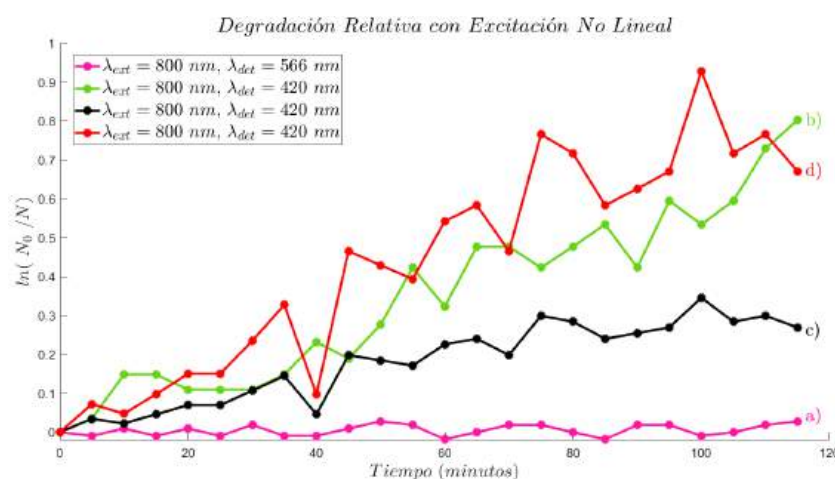


FIGURA 4.4: Degradación relativa con excitación no lineal:
a) **Dis RB:DPBF 2**, b) **Dis RB:DPBF 2**, c) **Dis PFNL:RB:DPBF 2** y,
d) **Proc. Dis PFNL:RB:DPBF 2** eliminando la absorción de PFNL.

Cuando las disoluciones son excitadas a 800 nm, longitud onda correspondiente al infrarrojo cercano (NIR), con un láser pulsado de femtosegundos, como el que se muestra en la Figura 3.13, las moléculas PFNL y RB realizan una transición desde su estado de menor energía (S_0) hacia un estado S_n mediante la absorción de dos fotones; en términos energéticos los dos fotones equivalen a la energía de un fotón de 400 nm.

Estos procesos foto-físicos no lineales no son tan eficientes como en el caso de excitación de un fotón, por lo que las muestras fueron expuestas a la radiación durante un período de 115 minutos

La Figura 4.4 a) muestra que al excitar el RB con una longitud de onda de 800 nm, esta molécula no experimenta degradación alguna, lo que confirma su fotoestabilidad e idoneidad como PS. En cambio, en la Figura 4.4 b) se observa claramente en la mezcla **Dis RB:DPBF 2** la oxidación química del DPBF, resultado de la producción de 1O_2 generada por el RB a través de TPA.

Por otro lado, al mezclar DPBF con RB y PFNL (**Dis PFNL:RB:DPBF 2**), se observa que la degradación de DPBF ocurre aparentemente más lento, como se muestra en la Figura 4.4 c). Sin embargo, según lo discutido anteriormente, esto se debe a la superposición espectral entre los espectros de absorción de DPBF y PFNL. Por esta razón, antes de calcular la degradación molecular al espectro de **Dis PFNL:RB:DPBF 2** se le sustrae el espectro correspondiente a PFNL, obteniéndose como resultado la curva que se muestra en la Figura 4.4 d).

Estos resultados sugirieron lo siguiente:

- 1) La producción de 1O_2 mediante la excitación directa y no lineal del RB con 800 nm en la mezcla **Dis RB:DPBF 2**.
- 2) La producción de 1O_2 no aumenta significativamente en la mezcla **Dis PFNL:RB:DPBF 2** comparada con **Dis RB:DPBF 2** a pesar de la presencia de PFNL que es un polímero no lineal altamente eficiente.

En conclusión, al excitar la mezcla **Dis PFNL:RB:DPBF 2** con 800 nm, el RB produce 1O_2 de manera más eficiente que en la mezcla **Dis RB:DPBF 2** bajo la misma excitación. Este aumento en la eficiencia se debe a la TE entre PFNL y RB.

Como premisa en esta tesis se establece que la mezcla de PFNL:RB puede funcionar como un fotosensibilizador orgánico para aplicaciones en PDT. Al ser excitado de manera no lineal con 800 nm, se busca producir 1O_2 de forma eficiente a esta longitud de onda, ofreciendo una mayor penetración óptica (PO) en la ventana de interés biológica del NIR, lo que permite un tratamiento de mayor profundidad y la capacidad de acceder a órganos más internos. No obstante, como hemos visto en esta sección, en fase líquida el proceso de TE de PFNL a RB no ha aumentado la producción de 1O_2 , al menos con las concentraciones moléculas usadas.

4.3. Transferencia de energía de PFNL:R6G en disolución

En el capítulo anterior se presentaron los espectros de emisión de las disoluciones de PFNL a una concentración fija de $6 \mu M$, mezclado con diversas proporciones molares de R6G (**Dis PFNL:R6G 1-5**). En estos espectros se observa una disminución en la emisión de PFNL inducida por absorción lineal, específicamente en la región espectral coincidente con la banda de absorción del R6G, como se muestra en la Figura 3.9. El estudio de la mezcla **Dis PFNL:R6G 1-5** se realiza con la finalidad de ahondar sobre los procesos de TE entre PFNL como donador y un donador (ya sea R6G o RB) en fase líquida.

A continuación, se presentan los tiempos de decaimiento de las mezclas en disolución, determinados mediante el uso del espectrofluorómetro FS5. Estos resultados proporcionan información clave para analizar la dinámica de los estados excitados de la molécula PFNL. Las mediciones se realizaron a diferentes longitudes de onda de detección, lo que permite visualizar, analizar y evidenciar las variaciones en los tiempos de decaimiento y, de esta forma, justificar los resultados de la TE presente en estos sistemas dinámicos moleculares.

Los tiempos de decaimiento de la fotoluminiscencia (PL) de estas muestras se adquirieron excitando con una longitud de onda de $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$ y detectando a $\lambda_{det} = 480 \text{ nm}$. Con estos parámetros se excita mayormente a PFNL y se observa exclusivamente la PL del mismo polímero, de acuerdo con la Figura 3.7 b). Los tiempos de decaimiento de PL proveniente de R6G permanecen inalterados como se evidencia en la Figura 4.5.

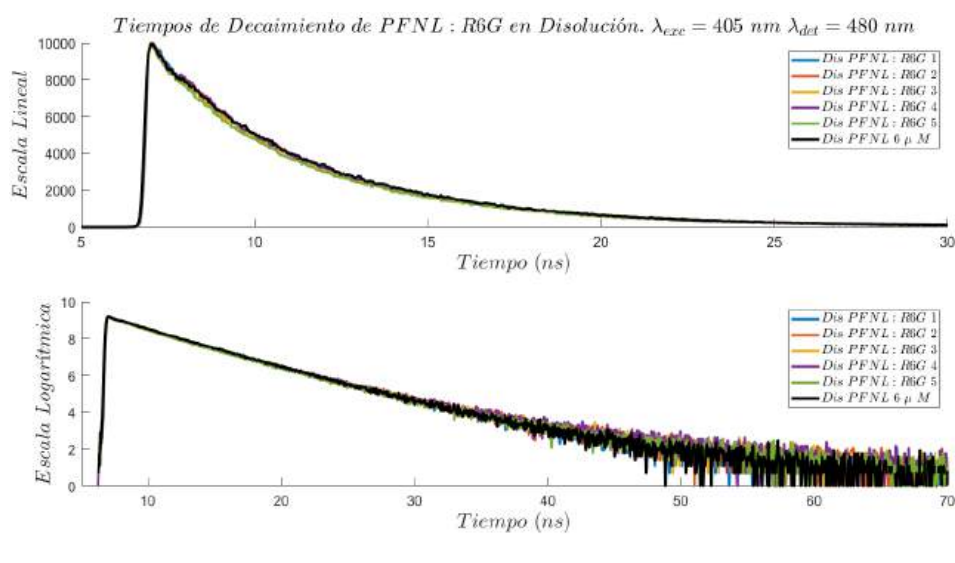


FIGURA 4.5: Tiempos de decaimiento de disoluciones de PFNL y PFNL:R6G a diferentes proporciones molares, excitando a 405 nm y detectando a 480 nm .

El tiempo de vida medio (τ_{medio}) de un proceso de decaimiento de PL se calcula a partir de las curvas de decaimiento en función del tiempo. Las curvas de decaimiento se ajustan a monoexponencial o multiexponencial, según corresponda. Para los resultados de la Figura 4.5, el decaimiento se ajustó a una única función exponencial, como se presenta en la Ecuación (4.5).

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau} \quad (4.5)$$

Por lo tanto, para este caso, se puede escribir que el tiempo de vida medio es simplemente el tiempo de vida (τ), como se muestra en la Ecuación (4.6).

$$\tau_{medio} = \tau \quad (4.6)$$

Y para fines prácticos, el tiempo de vida medio de los estados excitados del polímero PFNL como donador (D) en ausencia y presencia del aceptor (A) se denotan como τ_D y τ_{DA} , respectivamente. Este análisis de datos se llevo a cabo utilizando MATLAB y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.3.

En el caso de un ajuste de decaimiento exponencial, el valor r^2 es el coeficiente de correlación y evalúa que tan bien describe la curva ajustada los datos experimentales de intensidad en función del tiempo. El rango de valores de r^2 se encuentra entre 0 y 1, un r^2 cercano a 1 significa que el ajuste explica casi toda la variabilidad de los datos. Mientras que un r^2 cercano a 0 indica que el ajuste no explica bien los datos.

El valor de r^2 presentado en la Tabla 4.3 indica que el ajuste monoexponencial de los tiempos de decaimiento de las mezclas **Dis PFNL:RB 1-5** representa de manera precisa los datos experimentales.

TABLA 4.3: Tiempos de vida de disoluciones de PFNL:R6G.
 $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{det} = 480 \text{ nm}$

Etiqueta	Proporción Molar	τ_D (ns)	τ_{DA} (ns)	r^2
Dis PFNL 6 μM		4.70		0.9994
Dis PFNL:R6G 1	1 : 0.14		4.55	0.9991
Dis PFNL:R6G 2	1 : 0.26		4.62	0.9991
Dis PFNL:R6G 3	1 : 0.40		4.60	0.9991
Dis PFNL:R6G 4	1 : 0.55		4.61	0.9990
Dis PFNL:R6G 5	1 : 1		4.48	0.9988

Una de las condiciones para confirmar la existencia del fenómeno FRET es que $\tau_{DA} < \tau_D$. Al analizar los datos, se observa que el tiempo de vida de los estados excitados del PFNL ($\tau_D = 4.70 \text{ ns}$) es ligeramente mayor que el tiempo de vida de todas las mezclas (τ_{DA}). Esto podría significar la posibilidad de que ocurra FRET entre estas dos moléculas en disolución.

Sin embargo, la eficiencia de FRET (E_{FRET}) depende significativamente de la distancia intermolecular de separación entre D y A (R), la cual idealmente debería mantenerse constante. Según la literatura, en una disolución, R no permanece fija, lo cual dificulta garantizar la eficiencia del proceso [11, 12]. Además, es evidente que en disolución las distancias intermoleculares supera por mucho la distancia óptima de interacción FRET que se sabe es de unos cuantos nanómetros ($< 5 \text{ nm}$) típicamente. En consecuencia, la posibilidad de TE tipo FRET en disolución con PFNL como D y R6G como A queda descartada y se sigue que las pequeñas variaciones en los tiempos de vida media de la Tabla 4.3 son debidas a incertidumbres experimentales. De hecho, los valores calculados de vida media en este caso no

siguen ninguna tendencia específica al variar la concentración de A.

Si las interacciones entre los componentes de la mezcla son débiles, los procesos de transferencia de energía (como FRET) podrían no estar contribuyendo de manera significativa, lo que resulta en tiempos de decaimiento similares a los de los componentes individuales.

Para mayor claridad de lo antes expuesto, se denota I_{PFNL} y I_{R6G} a la PL del donador y del aceptor, respectivamente. Considerando los valores de λ_{exc} y λ_{det} , así como las conjeturas previamente discutidas, la PL de cualquier mezcla detectada en las curvas de decaimiento mostradas en la Figura 4.5 puede describirse mediante la Ecuación (4.7).

$$I_{total} = I_{PFNL} + I_{R6G} \cong I_{PFNL} \quad (4.7)$$

A continuación, se midieron los tiempos de decaimiento de las mismas muestras, que fueron excitadas a una longitud de onda de $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$ y detectadas a $\lambda_{det} = 535 \text{ nm}$. En este rango de detección, se observa la PL correspondiente tanto al PFNL y como al R6G, tal como se muestra en la Figura 3.7 b). A partir de la Figura 4.6 se deduce que los tiempos de decaimiento de PL de las mezclas **Dis PFNL:R6G 1-5** aumentan conforme la proporción de R6G aumenta, en contraste con los tiempos relativamente constantes de la Figura 4.5.

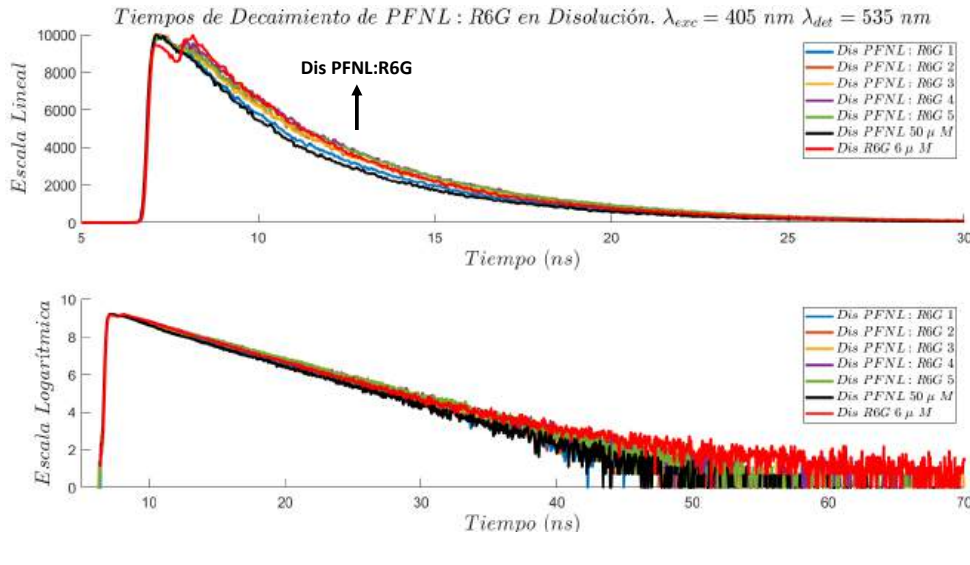


FIGURA 4.6: Tiempos de decaimiento de disoluciones de R6G y PFNL:R6G a diferentes proporciones molares, excitando a 405 nm y detectando a 535 nm.

Según lo observado en la Figura 4.5 se demostró que el tiempo de decaimiento de I_{PFNL} permanece prácticamente inalterado. Por otra parte, al realizar la detección a 535 nm, la contribución de la PL del R6G ya no puede considerarse despreciable. Entonces, la intensidad total de la PL de la mezcla puede expresarse con la Ecuación (4.8).

$$I_{total} = I_{PFNL} + I_{R6G} \quad (4.8)$$

Es importante destacar que bajo excitación de 405 nm la excitación de moléculas de R6G es despreciable comparada con la excitación de moléculas de PFNL, pero suficiente para obtener los datos de la Figura 4.6. Esto sugiere que los estados electrónicos del R6G fueron excitados de manera indirecta por la I_{PFNL} . A medida que aumenta la proporción molar en las mezclas, se incrementa la cantidad de moléculas de R6G en la disolución, lo que provoca un aumento en I_{R6G} y, en consecuencia, un incremento simultáneo en I_{total} . Este proceso fotofísico indica la presencia de TE radiativa entre ambas moléculas cuando se encuentran en disolución.

Para reforzar esta hipótesis, se aplicó un modelo de ajuste monoexponencial a cada una de las curvas utilizando la Ecuación (4.5), con el objetivo de determinar los tiempos de vida del PFNL, del R6G y de la mezcla, cuyos resultados se presentan en la Tabla 4.4.

En este análisis se observa claramente que $\tau_D < \tau_{DA}$, lo cual confirma la existencia de TE radiativa en las mezclas **Dis PFNL:R6G 1-5**. Además se aprecia que el tiempo de vida del R6G (τ_A) es menor que el tiempo de vida de las mezclas, es decir $\tau_A < \tau_{DA}$. Esto indica que los tiempos de vida de cada una de las moléculas son aditivos cuando se encuentran en disolución, al igual que las intensidades de su PL.

TABLA 4.4: Tiempos de vida de disoluciones de PFNL:R6G.

$$\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}, \lambda_{det} = 535 \text{ nm}$$

Etiqueta	Proporción Molar	τ_D (ns)	τ_A (ns)	τ_{DA} (ns)	r^2
Dis PFNL 6 μM		4.40			0.9989
Dis R6G 6 μM			4.60		0.9997
Dis PFNL:R6G 1	1 : 0.14			4.68	0.9993
Dis PFNL:R6G 2	1 : 0.26			5.00	0.9983
Dis PFNL:R6G 3	1 : 0.40			5.06	0.9990
Dis PFNL:R6G 4	1 : 0.55			5.31	0.9978
Dis PFNL:R6G 5	1 : 1			5.33	0.9986

4.4. Transferencia de energía de PFNL:RB en disolución

Los espectros de emisión mostrados en la Figura 3.10 se obtuvieron al excitar las mezclas **Dis PFNL:RB 1-7** con una longitud de onda de $\lambda_{exc} = 402 \text{ nm}$, donde la absorción del PFNL es altamente eficiente, mientras que la de RB es prácticamente mínima, como se demuestra en la Figura 3.7 a). Se observa que la intensidad de la emisión de la mezcla disminuye progresivamente a medida que aumenta la proporción molar de RB. Este fenómeno resulta particularmente evidente en la región de máxima absorción del RB. En este caso, la concentración de PFNL es constante en las mezclas, por lo que su emisión también lo es; pero esta emisión es absorbida por RB. A mayor concentración de RB mayor es la cantidad de radiación absorbida proveniente de PFNL. Los datos de la Figura 3.10 denotan en principio atenuación de PL debida al proceso de TE radiativa.

Para respaldar esta hipótesis se miden los tiempos de decaimiento de estas mismas mezclas, las cuales fueron excitadas a 405 nm . La PL generada es detectada a 535 nm , correspondiente a la longitud de onda máxima de emisión del PFNL, donde la contribución del RB es mínima, como se observa en la Figura 3.7 a). En estos resultados se observan pequeñas variaciones de los tiempos de decaimiento de la PL de las mezclas, que aumentan directamente con la proporción de RB, aunque en escala logarítmica los cambios parecen marginales, como se muestra en la Figura 4.7.

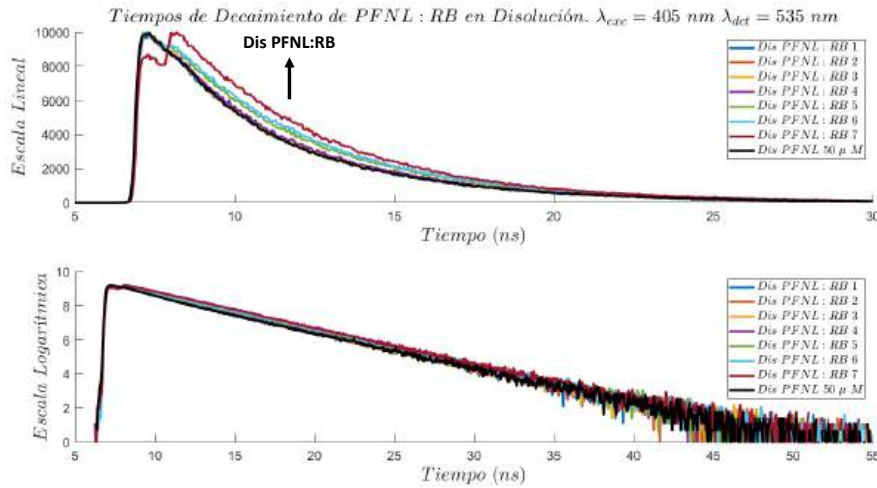


FIGURA 4.7: Tiempos de decaimiento de disoluciones de PFNL y PFNL:RB a diferentes proporciones molares, excitando a 405 nm y detectando a 535 nm .

Este comportamiento en los tiempos de decaimiento se atribuye a que I_{PFNL} excita de manera indirecta un mayor número de moléculas de RB a medida que incrementa su concentración en la disolución, lo que produce un aumento en la intensidad de PL de RB (I_{RB}). Por lo tanto, la intensidad total de la PL de la mezcla puede expresarse con la Ecuación (4.9).

$$I_{total} = I_{PFNL} + I_{RB} \quad (4.9)$$

A estas curvas de tiempo de decaimiento se les ajusta un modelo monoexponencial utilizando la Ecuación (4.5) para determinar los tiempos de vida del PFNL (D) tanto en ausencia como en presencia del RB (A), estos valores se presentan en la Tabla 4.5. Se observa que cuando el PFNL es excitado con 405 nm tiene un tiempo de vida característico de 4.26 ns . Por otro lado, la PL de RB generada bajo excitación a esta longitud de onda es despreciable, de ahí que la Tabla 4.5 y Figura 4.9 no reportan el tiempo de vida media de RB. No obstante, la Figura 4.9 y la Ecuación (4.9) demuestran que la I_{RB} detectada en las mezclas es generada principalmente por TE radiativa, a través de la excitación indirecta por la presencia del PFNL en la mezcla.

Es necesario agregar que la intensidad de I_{RB} a 535 nm es en realidad pequeña, pues corresponde a la región de subida en el perfil espectral de PL, pero es suficiente para ser detectada.

TABLA 4.5: Tiempos de Vida de Disolución de PFNL:RB.
 $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{det} = 535 \text{ nm}$

Etiqueta	Proporción Molar	τ_D (ns)	τ_{DA} (ns)	r^2
Dis PFNL 50 μM		4.26		0.9992
Dis PFNL:RB 1	1 : 0.01		4.31	0.9991
Dis PFNL:RB 2	1 : 0.02		4.33	0.9991
Dis PFNL:RB 3	1 : 0.04		4.32	0.9991
Dis PFNL:RB 4	1 : 0.1		4.45	0.9992
Dis PFNL:RB 5	1 : 0.4		4.82	0.9988
Dis PFNL:RB 6	1 : 1		4.93	0.9985
Dis PFNL:RB 7	1 : 2		4.72	0.9997

Entonces, debido a que la I_{RB} incrementa directamente con la proporción molar de RB, se generan más estados electrónicos excitados de RB, lo que provoca que el tiempo de vida de la mezcla (τ_{DA}) sea progresivamente más largo en las diferentes proporciones, cumpliéndose la relación $\tau_D < \tau_{DA}$. Por lo que queda demostrado, una vez más que al excitar las mezclas **Dis PFNL:RB 1-7** en disolución con 405 nm , se presenta el proceso de TE radiativa entre PFNL y RB.

Posteriormente se midieron los tiempos de decaimiento de las mismas mezclas **Dis PFNL:RB 1-7** excitándolas a $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$, aunque en esta ocasión la PL se detecta en $\lambda_{det} = 577 \text{ nm}$, que es una longitud de onda en donde la contribución de I_{RB} es más significativa, como se observa en la Figura 3.7 a).

En la Figura 4.8 se observa que el comportamiento de los tiempos de decaimiento detectados a $\lambda_{det} = 577 \text{ nm}$ también se describe con la Ecuación (4.9) tal como sucede en la Figura 4.7, donde se detecta la PL a $\lambda_{det} = 535 \text{ nm}$. Sin embargo, en esta ocasión, la contribución de I_{RB} a la PL total de la mezcla I_{total} es significativamente mayor.

Con base en lo discutido anteriormente, estos resultados sugieren de manera contundente que existe TE radiativa entre el PFNL y el RB, siendo más evidente a esta longitud de onda de detección. Además, se observa que la TE en disolución aumenta directamente con la proporción molar de RB en la mezcla.

Adicionalmente, y para reafirmar esta hipótesis, se determinan los tiempos de vida del PFNL (τ_D), del RB (τ_A), ahora que la PL de esta última es detectable, y el de la mezcla (τ_{DA}), utilizando el modelo de ajuste monoexponencial que se muestra en la Ecuación (4.5). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.6.

Con este análisis de datos, se observa que $\tau_A < \tau_D < \tau_{DA}$, y es justo lo que se observa experimentalmente en la Figura 4.8. En la Tabla 3.4 se demuestra que, en la mezcla de proporción molar 1:2 (**Dis PFNL:RB 7**), la I_{PFNL} disminuye en un 74.06 %, lo que se atribuye evidentemente a la TE radiativa. El valor de Φ_F para RB es de 0.10, por lo que se deduce que

una parte de la TE desde el PFNL se convierte en radiación emitida por el RB.

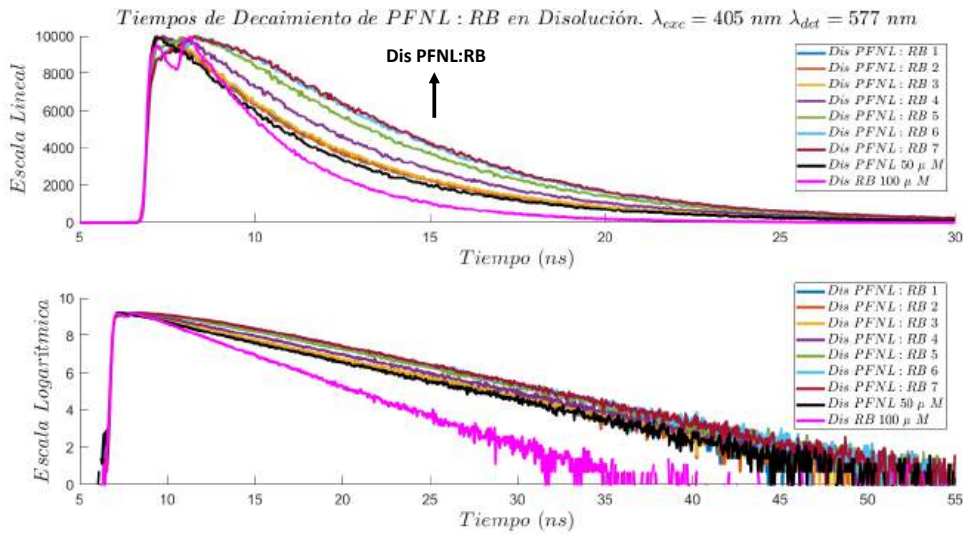


FIGURA 4.8: Tiempos de decaimiento de disoluciones de PFNL, RB y PFNL:RB a diferentes proporciones molares, excitando a 405 nm y detectando a 577 nm .

TABLA 4.6: Tiempos de Vida de Disolución de PFNL:RB.
 $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{det} = 577 \text{ nm}$

Etiqueta	Proporción Molar	τ_D (ns)	τ_A (ns)	τ_{DA} (ns)	r^2
Dis PFNL $50 \mu M$		4.72			0.9990
Dis RB $100 \mu M$			3.01		0.9997
Dis PFNL:RB 1	1 : 0.01			5.00	0.9989
Dis PFNL:RB 2	1 : 0.02			5.01	0.9987
Dis PFNL:RB 3	1 : 0.04			5.10	0.9985
Dis PFNL:RB 4	1 : 0.1			5.60	0.9972
Dis PFNL:RB 5	1 : 0.4			5.98	0.9970
Dis PFNL:RB 6	1 : 1			6.40	0.9942
Dis PFNL:RB 7	1 : 2			6.49	0.9933

4.5. Transferencia de energía de PFNL:RB en película

Las mezclas en disolución **Dis PFNL:RB 1,4,7** y **Dis PFNL $50 \mu M$** , se emplearon para la fabricación de películas PFNL:RB sin matriz polimérica. Estas películas se denominan como **Film PFNL:RB 1-3** y **Film PFNL $50 \mu M$** , cuyas características se detallan en la Tabla 4.7. Es importante destacar que las concentraciones y proporciones indicadas en esta tabla se utilizan únicamente como referencia, ya que corresponden a las especificaciones originales de

las mezclas en disolución.

De acuerdo con los espectros de absorción y emisión del PFNL y RB mostrados en la Figura 3.7 a), se selecciona nuevamente como excitación la longitud de onda de $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$, ya que a esta longitud de onda excita principalmente al PFNL. Los tiempos de decaimiento son detectados en $\lambda_{det} = 550 \text{ nm}$, y los resultados se observan en la Figura 4.9.

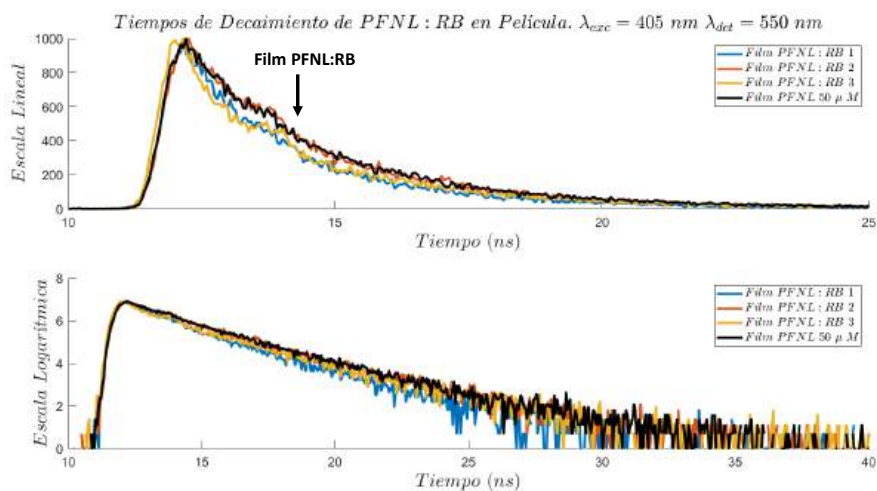


FIGURA 4.9: Tiempos de decaimiento de películas de PFNL y PFNL:RB a diferentes proporciones molares, excitando a 405 nm y detectando a 550 nm .

En las películas **Film PFNL:RB 1-3** predomina casi exclusivamente la PL del PFNL, ya que la PL del RB es de baja eficiencia en estado sólido. Por esta razón, no fue posible reportar en la Figura 4.9 el tiempo de decaimiento del RB en película.

El tiempo de decaimiento de los estados excitados de las películas **Film PFNL:RB 1-3** disminuyó conforme aumenta la concentración de RB, lo que se interpreta como evidencia de que la energía de PFNL, al ser excitado con 405 nm , se transfiere hacia RB a través de una interacción Dipolo-Dipolo. Es importante señalar que a diferencia del caso de las disoluciones, en el caso de las películas la fase sólida hace que la distancia intermolecular sea muy pequeña, del orden de la distancia típica FRET. Esto permite establecer que el proceso fotofísico FRET se presenta en estas películas sin matriz polimérica. Por lo tanto, la PL de estas películas obedece la siguiente Ecuación (4.10).

$$I_{total} = I_{PFNL} + I_{RB} \cong I_{PFNL} \quad (4.10)$$

Se determinan los tiempos de vida de estas películas mediante el modelo de ajuste monoexponencial de la Ecuación (4.5), ya que el cálculo de la eficiencia de FRET (E_{FRET}) se basa en los tiempos de vida del D (τ_D) y del D en presencia del A (τ_{DA}), como se describe en la Ecuación (1.3). Estos resultados se presentan detalladamente en la Tabla(4.7).

Este análisis demuestra claramente que $\tau_{DA} < \tau_D$ en todas las proporciones molares de las películas estudiadas. Dado que no se detecta PL del RB, la reducción del tiempo de

decaimiento confirma de manera contundente que este fenómeno es resultado del proceso de FRET entre PFNL y RB.

TABLA 4.7: Tiempos de vida de películas de PFNL:RB.
 $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{det} = 550 \text{ nm}$

Etiqueta	Proporción Molar	τ_D (ns)	τ_{DA} (ns)	r^2	E_{FRET} (%)
Film PFNL 50 μM		2.64		0.9969	
Film PFNL:RB 1	1 : 0.01		2.15	0.9952	18.41
Film PFNL:RB 2	1 : 0.1		2.58	0.9956	2.04
Film PFNL:RB 3	1 : 0.2		2.42	0.9903	8.11

4.6. Transferencia de energía de PFNL:RB:PS en película

El tiempo de decaimiento de las películas **Film PFNL:RB:PS** y **Film PFNL:PS**, se muestra en la Figura 4.10. Estas fueron excitadas a $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$ y la PL generada se detectó a $\lambda_{det} = 550 \text{ nm}$, longitudes de onda en las cuales se excita y detecta mayormente el PFNL, de acuerdo con la Figura 3.7 a). La disminución en los tiempos de decaimiento de la película **Film PFNL:RB:PS** se debe a que la distancia entre el PFNL y el RB está en el orden de R_0 , lo que facilita una interacción Dipolo-Dipolo entre estas moléculas, dando lugar a que existe FRET entre estas moléculas. Esto sugiere que ocurre FRET entre ellas, resultando en una disminución de la emisión del PFNL. Los tiempos de decaimiento de **Film RB:PS** y **Film PS** no se muestran en este análisis, ya que su PL es muy difícil de detectar en estado sólido.

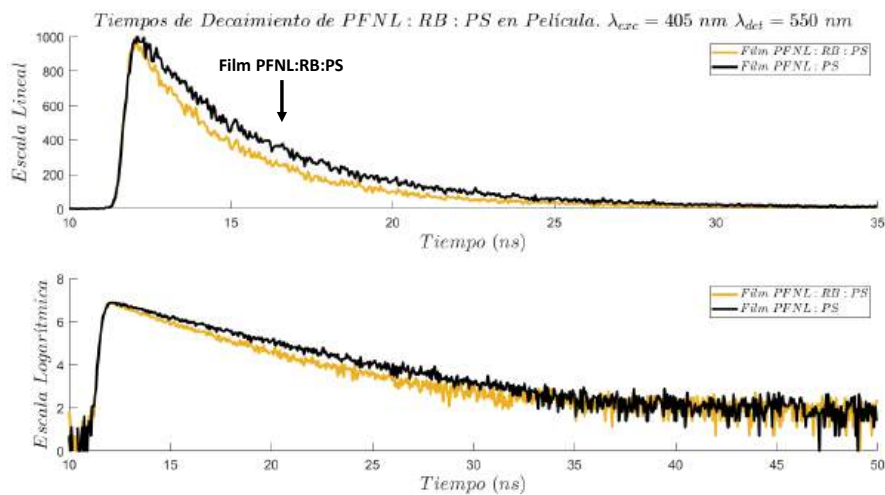


FIGURA 4.10: Tiempos de decaimiento de película de PFNL:PS y PFNL:RB:PS, excitando a 405 nm y detectando a 550 nm

Dado que estamos ahora en un escenario donde el proceso de FRET puede estar sucediendo, y con la finalidad de refinar el análisis, se utiliza un modelo de ajuste multiexponencial en las curvas de tiempo de decaimiento. Este tipo de ajuste permite describir la contribución de cada componente en un proceso complejo. La forma general de un ajuste multiexponencial se muestra en la Ecuación (4.11).

$$I(t) = \sum_{i=1}^n A_i e^{-t/\tau_i} \quad (4.11)$$

Donde $I(t)$ es la intensidad en función del tiempo, A_i es la amplitud o contribución de la componente i , τ_i es el tiempo de vida de la componente i y, n es el número de componentes exponenciales.

Se determina el tiempo de vida medio de las películas **Film PFNL:RB:PS** y **Film PFNL:PS**, utilizando la Ecuación (4.12).

$$\tau_m = \frac{A_1\tau_1 + A_2\tau_2}{A_1 + A_2}, \quad (4.12)$$

donde τ_1 y τ_2 se refieren a las constantes de tiempo rápida y lenta, respectivamente, mientras que A_1 y A_2 son las constantes de amplitud [38].

El espectrofluorómetro FS5 es capaz de realizar este ajuste multiexponencial y calcular todas las constantes de la Ecuación (4.12), y el valor de χ^2 (la suma de los cuadrados de los errores), que debería ser lo más cercano posible a 1. Los resultados de estos cálculos se presentan de manera detallada en la Tabla 4.8, incluyendo el cálculo de E_{FRET} en la película **Film PFNL:RB:PS**, el cual se determina a partir de la Ecuación (1.3).

TABLA 4.8: Tiempos de vida de películas de PFNL:RB:PS.
 $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{det} = 550 \text{ nm}$

Etiqueta	τ_1 (ns)	A_1	τ_2 (ns)	A_2	τ_{mD} (ns)	τ_{mDA} (ns)	χ^2	E_{FRET} (%)
Film PFNL:PS	3.06	442.34	5.07	532.30	4.13		1.13	
Film PFNL:RB:PS	2.11	428.59	4.47	534.22		3.34	1.05	19.29

En este análisis se observa que el tiempo de vida medio del PFNL en presencia del RB (τ_{mDA}) es menor que el tiempo de vida medio del PFNL por sí solo (τ_{mD}). Dado que se cumple la relación $\tau_{mDA} < \tau_{mD}$ y no se detecta PL proveniente de RB, se confirma que la reducción en el tiempo de decaimiento de **Film PFNL:RB:PS** se debe al proceso FRET. Esto es posible debido a que estas moléculas se encuentran a una distancia intermolecular cercana a la distancia de Förster (R_0), lo que favorece la transferencia de energía a través del proceso FRET.

4.7. Transferencia de energía de PFNL:RB en nanopartículas

Los espectros de emisión de las NPs **PFNL:RB 1** y **NPs PFNL:RB 2** presentados en la Figura 3.21 y analizados en el capítulo anterior, sugieren que el proceso de FRET también

tiene lugar cuando las moléculas se encuentran en forma de NPs. Además, tanto el espectro de absorción, mostrado en la Figura 3.22, como el de emisión, varían según el método de fabricación empleado.

De acuerdo con las Figuras 3.21 y 3.22, los tiempos de decaimiento de estas NPs se obtuvieron mediante excitación a $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$ y detección a $\lambda_{det} = 535 \text{ nm}$. Estos parámetros permiten excitar predominantemente los estados electrónicos del PFNL y detectar de manera casi exclusiva su PL.

Este experimento muestra una disminución del tiempo de decaimiento de los estados excitados del PFNL, resultado de TE hacia el RB. Esto se debe a que la distancia entre ambas moléculas es lo suficientemente pequeña como para permitir la interacción dipolo-dipolo, lo que provoca una reducción significativa en la PL del PFNL. Además, se observa que el comportamiento de ambas NPs es muy similar, independientemente del método de preparación empleado.

Con el software del espectrofluorómetro FS5, se aplicó un modelo de ajuste multiexponencial a las curvas de tiempo de decaimiento de estas NPs, utilizando la Ecuación (4.11). Nótese que, a diferencia de los estudios sobre la vida media de los estados excitados realizados en disoluciones y en película, ahora los tiempos no son monoexponenciales. La necesidad de realizar un ajuste a los datos con más de un término exponencial de decaimiento es incluso evidente en la escala logarítmica de la Figura 4.11.

A partir de este ajuste, se determinó el tiempo de vida medio para cada una de las NPs mediante la Ecuación (4.12). Los resultados obtenidos se presentan detalladamente en la Tabla 4.9 así como la eficiencia de FRET.

En estos resultados se observa $\tau_{mDA} \ll \tau_{mD}$, lo que indica que el proceso FRET es altamente eficiente. Según lo reportado en la literatura, cuando $E_{FRET} = 50\%$, la distancia entre donador y aceptor (R) es igual a la distancia de Förster (R_0) [11, 12]. En este caso, las NPs PFNL:RB 1 y NPs PFNL:RB 2 presentan eficiencias de FRET 74.45% y 75.20%, respectivamente. Por lo tanto, se deduce que la distancia R entre PFNL y RB es incluso menor que R_0 .

TABLA 4.9: Tiempos de vida de nanopartículas de PFNL:RB.

$$\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}, \lambda_{det} = 535 \text{ nm}$$

Etiqueta	τ_1 (ns)	A_1	τ_2 (ns)	A_2	τ_{mD} (ns)	τ_{mDA} (ns)	χ^2	E_{FRET} (%)
NPs PFNL	3.38	6 132.48	6.00	4 516.95	4.49		1.15	
NPs PFNL:RB 1	1.05	10 273.14	5.58	217.54		1.14	1.666	74.45
NPs PFNL:RB 2	1.01	11 178.13	4.71	323.27		1.14	1.42	75.20

Posteriormente, se realiza otro análisis de los tiempos de decaimiento con las mismas NPs, manteniendo la longitud de onda de excitación en $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$. En esta ocasión, se

detectan los estados excitados a $\lambda_{det} = 577 \text{ nm}$, donde la PL tanto de PFNL como de RB es claramente apreciable, como se muestra en la Figura 3.21.

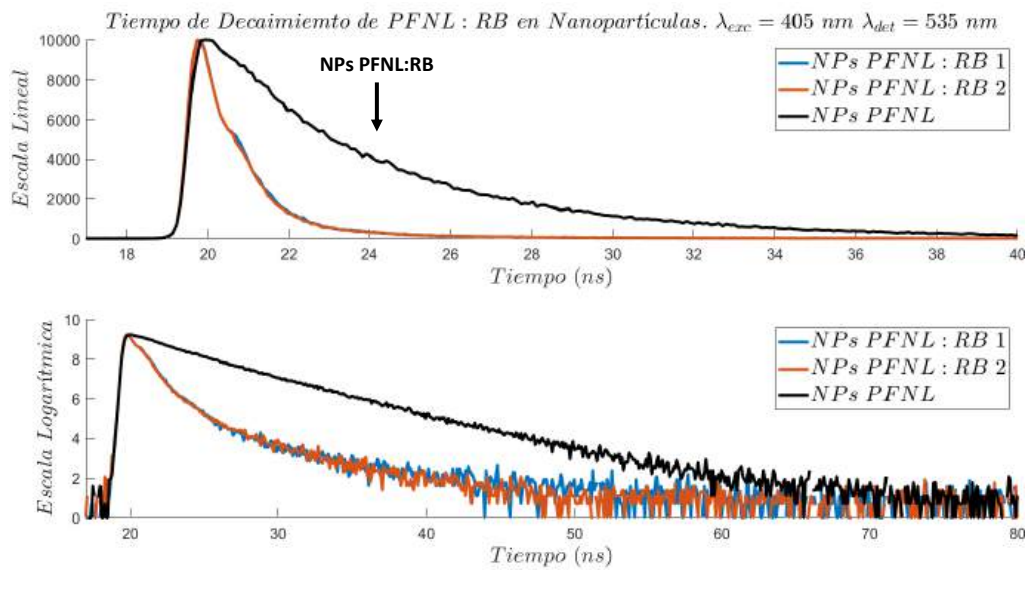


FIGURA 4.11: Tiempos de decaimiento de nanopartículas de PFNL y PFNL:RB, excitando a 405 nm y detectando a 535 nm .

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 4.12, donde se observa el mismo comportamiento cuando los tiempos de decaimiento se detectan a 535 nm . En la Tabla 4.6 se confirma nuevamente que $\tau_{m_{DA}} \ll \tau_{m_D}$. Por lo tanto, las **NPs PFNL:RB 1** y **NPs PFNL:RB 2** tienen eficiencias de FRET de 80.67% y 77.05% , respectivamente. Esto indica que la mayor parte de la energía de los estados excitados del PFNL se transfiere directamente por FRET debido a la interacción dipolo-dipolo entre PFNL y RB. Este resultado confirma una vez más que la distancia intermolecular entre las moléculas en forma de NPs es menor que la distancia de Förster, es decir $R < R_0$.

En este caso no se encuentra un modelo de ajuste multiexponencial que describa adecuadamente la curva del tiempo de decaimiento de las **NPs RB**, por lo tanto es imposible determinar su tiempo de vida media. Esto se debe a que el equipo no resuelve temporalmente el decaimiento de PL del RB, de ahí que la curva respectiva a RB en la Figura 4.12 corresponda básicamente a la función de respuesta al impulso del equipo.

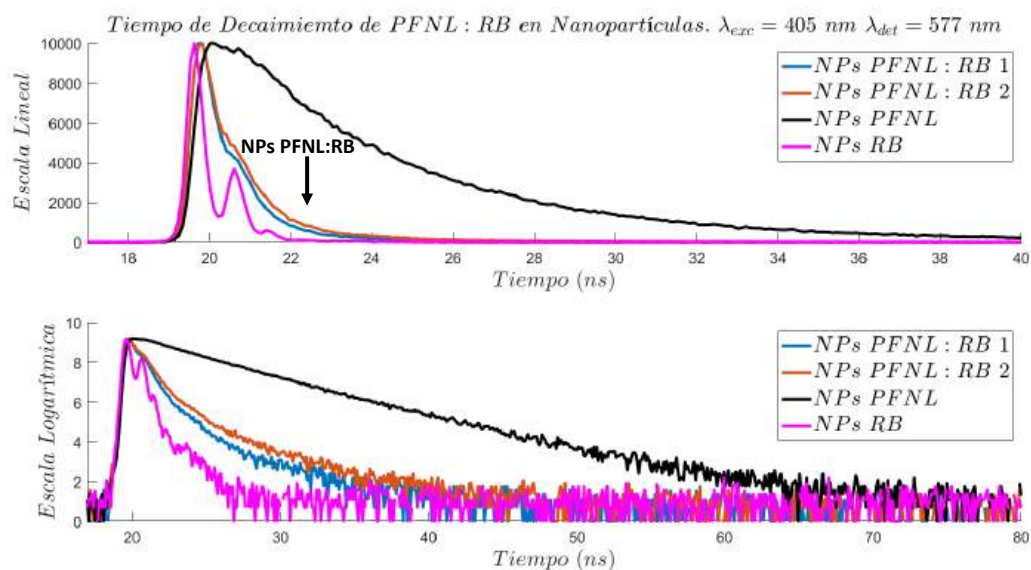


FIGURA 4.12: Tiempos de decaimiento de nanopartículas de PFNL, RB y PFNL:RB, excitando a 405 nm y detectando a 577 nm.

TABLA 4.10: Tiempos de vida de nanopartículas de PFNL:RB.

$$\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}, \lambda_{det} = 577 \text{ nm}$$

Etiqueta	τ_1 (ns)	A_1	τ_2 (ns)	A_2	τ_{mD} (ns)	τ_{mDA} (ns)	χ^2	E_{FRET} (%)
NPs PFNL	4.23	8 667.46	6.83	2 321.46	4.78		1.48	
NPs PFNL:RB 1	0.85	10 780.47	3.65	270.02		0.92	1.39	80.67
NPs PFNL:RB 2	0.97	9 502.40	4.17	371.97		1.09	1.30	77.05

4.8. Microscopía electrónica de barrido

Los nanomateriales son aquellos que presentan tamaños inferiores a un micrómetro (1 μm), por lo menos en una de sus dimensiones. En este contexto, las NPs se definen como partículas con un tamaño que se encuentra en el rango de 1 – 100 nm. Este tamaño reducido confiere a las nanopartículas propiedades físicas y químicas distintas a las de sus versiones a mayor escala.

Para caracterizar las dimensiones y la morfología de las NPs estudiadas previamente, se emplea un microscopio electrónico de barrido (SEM). Las micrografías obtenidas con esta técnica se muestran en la Figura 4.13.

Las NPs PFNL (Figura 4.13 a) presentan una morfología irregular, con un tamaño que varía entre 100 y 150 nm, lo que indica cierta variabilidad en su tamaño. Las NPs PFNL:RB 1 (Figura 4.13 b) tienen un tamaño mínimo observado de 96.9 nm y adoptan una forma casi circular, probablemente debido a la región hidrofóbica del polímero. Las NPs PFNL:RB 2 (Figura 4.13 c) tienen un tamaño inferior a 100 nm y mantienen una forma circular, aunque

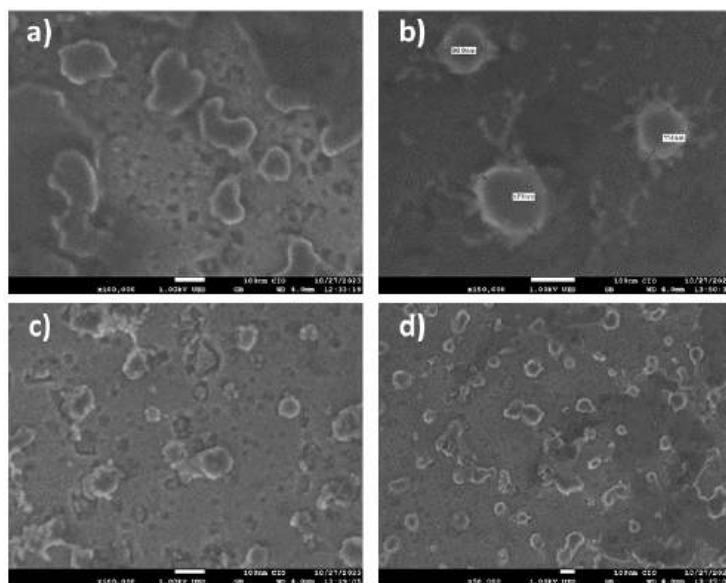


FIGURA 4.13: Nanopartículas vistas a través de un microscopio electrónico de barrido: a) NPs PFNL; b) NPs PFNL:RB 1; c) NPs PFNL:RB 2 y; d) NPs PFNL:RB 3.

presentan algunas irregularidades en su morfología. Las **NPs PFNL:RB 3** (Figura 4.13 d)) tienen la mayoría de sus partículas con un tamaño inferior a 100 nm , pero su morfología es bastante irregular.

En general, se observa que las partículas fabricadas varían en tamaño y morfología, pero en su mayoría tienen tamaños del orden de 100 nm . La forma y las irregularidades en su morfología dependen de las composiciones y métodos de preparación utilizados.

4.9. Microscopía óptica

El tamaño de las partículas es crucial para la internalización celular, ya que las NPs con tamaños inferiores a 100 nm tienen mayor probabilidad de ser internalizadas eficientemente.

Las células de neuroblastoma humano son un modelo ampliamente utilizado para estudiar procesos neurobiológicos, enfermedades neurodegenerativas y mecanismos de transporte intracelular.

Las **NPs PFNL:RB 1**, **NPs PFNL** y **NPs RB** se presentan como excelentes candidatas para la internalización en células de neuroblastoma SH-SY5Y. Además, la Tabla 4.10 evidencia que las **NPs PFNL:RB 1** exhiben un proceso de FRET altamente eficiente del 80.67%, lo que indica proximidad molecular inferior a R_0 entre PFNL y RB.

El análisis de colocalización de las NPs se realiza mediante imágenes de fluorescencia obtenidas con técnicas de microscopía de fluorescencia o confocal. Estas herramientas permiten identificar la región celular donde se internalizaron las NPs de PFNL:RB. Para capturar las micrografías del cultivo celular SH-SY5Y, se utilizó un microscopio multifotónico modelo LSM710, optimizado para obtener imágenes de alta resolución.

4.9.1. Microscopía de fluorescencia

El microscopio multifotónico fue configurado para detectar la fluorescencia característica de cada una de estas moléculas través de diferentes canales de detección, los cuales se muestra en la Figura 4.14, y se describen a continuación:

- **Ch₁**: En este canal se utiliza un láser de helio-neón (HeNe) que emite luz a una longitud de onda de $\lambda_{Ch_1} = 543 \text{ nm}$ con una **Potencia** de 1 mW , de la cual se empleó únicamente el 3.5%. Para la detección de fluorescencia se utilizó el **Detector 635** con una **Ganancia** de 800, cuya sensibilidad abarca un rango de detección entre 592 nm y 679 nm , como se muestra en la Figura 4.14 a). Para separar la luz de excitación de la señal de emisión, se empleó un divisor de haz dicróico **MBS 488/543** (*Main Dichroic Beam Splitter*). Estos parámetros están diseñados para excitar específicamente el RB y, en consecuencia, detectar su fluorescencia con alta precisión.
- **Ch₂**: En este canal se utilizó una línea del láser de Argón que emite luz con una longitud de onda de $\lambda_{Ch_2} = 458 \text{ nm}$ con una **Potencia** de 35 mW , de la cual se empleó únicamente únicamente el 13%. La fluorescencia fue detectada en el rango de 504 nm y 533 nm mediante del **Detector 519**, configurado con una **Ganancia** de 1 200. El **MBS 458** fue utilizado para separar la longitud de onda de la excitación. Estos parámetros permiten excitar marginalmente al RB y predominantemente al PFNL, mientras que la fluorescencia detectada corresponde únicamente al PFNL, como se muestra en la Figura 4.14 b).
- **Ch₃**: Este canal utilizó un diodo láser que emite luz con una longitud de onda de $\lambda_{Ch_3} = 405 \text{ nm}$ con una **Potencia** de 30 mW , de la se empleó únicamente el 4%. La fluorescencia fue registrada mediante el **Detector 423**, un tubo fotomultiplicador (PTM), configurado con una **Ganancia** de 980, capaz de detectar señales en el rango de 410 nm y 436 nm , como se muestra en la Figura 4.14 c). Para aislar cualquier señal óptica igual o menor a 405 nm , se utilizó el **MBS -405** se utilizó. Esta configuración excita principalmente tanto al DAPI, al PFNL y, en menor medida, al RB, pero solo detecta la fluorescencia emitida el DAPI.

Previamente, una muestra del cultivo celular SH-SY5Y, denominada **DAPI - NPs PFNL:RB 1**, fue teñida con una disolución de **DAPI**, para identificar el núcleo de las células, y con las **NPs PFNL:RB 1**. Las micrografías de fluorescencia de esta muestra fueron obtenidas utilizando los parámetros específicos de los canales **Ch₁**, **Ch₂** y **Ch₃** descritos previamente, y se presentan en la Figura 4.15.

La Figura 4.15 a) presenta la micrografía obtenida de la muestra **DAPI - NPs PFNL:RB 1** bajo los parámetros de detección del canal **Ch₁** ($592 - 679 \text{ nm}$). A partir de los espectros de absorción y emisor ilustrados en la Figura 4.14 a), y que la muestra fue excitada con una longitud de onda de $\lambda_{Ch_1} = 543 \text{ nm}$, se concluye que la fluorescencia detectada corresponde

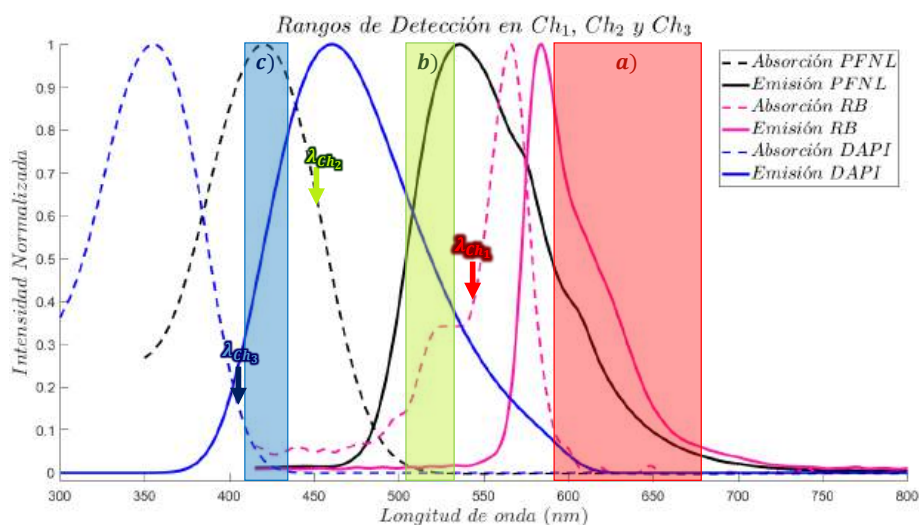


FIGURA 4.14: Rangos de detección de fluorescencia con excitación lineal:

- a) **Ch₁**: Excitación $\lambda_{Ch_1} = 543 \text{ nm}$ Detección $592 \text{ nm} - 679 \text{ nm}$,
 b) **Ch₂**: Excitación $\lambda_{Ch_2} = 458 \text{ nm}$ Detección $504 \text{ nm} - 533 \text{ nm}$ y,
 c) **Ch₃**: Excitación $\lambda_{Ch_3} = 405 \text{ nm}$ Detección $410 \text{ nm} - 436 \text{ nm}$.

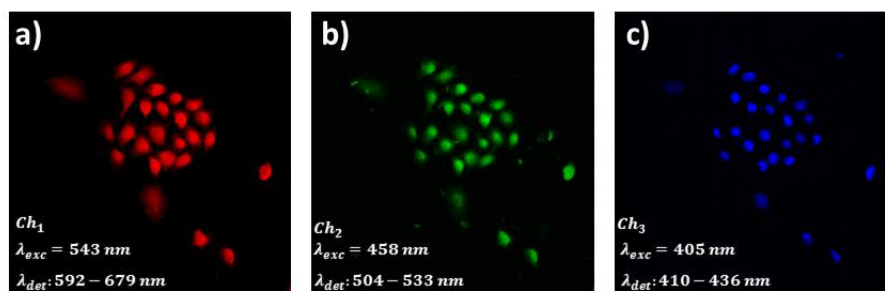


FIGURA 4.15: Micrografías de fluorescencia de la línea celular SH-SY5Y tratada con tinción (denominada **DAPI - NPs PFNL:RB 1**) y excitación lineal: a) **Ch₁**, b) **Ch₂** y, c) **Ch₃**.

exclusivamente al RB. En esta micrografía también se observa que la molécula RB se encuentra distribuida en todo el citoplasma de las células. Además, destaca en la estructura nuclear, ya que el RB tiene afinidad por el ADN presente en el núcleo celular [39], lo que explica su mayor concentración en esta región.

La micrografía de la muestra **DAPI - NPs PFNL:RB 1** se obtuvo utilizando los parámetros específicos el canal **Ch₂**, con una longitud de onda de excitación de $\lambda_{Ch_2} = 458 \text{ nm}$, y un rango de detección de $410 - 436 \text{ nm}$. Según lo indicado en la Figura 4.14 b), esta configuración permite excitar eficientemente al PFNL y detectar exclusivamente su fluorescencia, como se muestra en la Figura 4.15 b). La fluorescencia observada sugiere que el PFNL se encuentra localizado en el citoplasma celular, aunque presenta una mayor concentración en la región nuclear.

Cuando la muestra **DAPI - NPs PFNL:RB 1** es excitada con una longitud de onda de $\lambda_{Ch_3} = 405 \text{ nm}$, se logra excitar simultáneamente al **DAPI**, al **PFNL** y al **RB**, como se ilustra en la Figura 4.14 c). No obstante, con el rango de detección del canal **Ch₃** (410 – 436 nm), se observa exclusivamente la fluorescencia emitida del **DAPI**, tal como se aprecia en la Figura 4.15 c). Esta micrografía confirma que el **DAPI** se ha localizado en la región nuclear, como era de esperarse, dado su alta afinidad por los ácidos nucleicos.

Para determinar en qué región celular se internalizaron las tres moléculas utilizadas para teñir la muestra **DAPI - NPs PFNL:RB 1**, se generó un *Merge*, que en este contexto corresponde a la superposición de las imágenes obtenidas en los distintos canales de detección. Este enfoque permite visualizar simultáneamente la distribución de cada molécula dentro de la célula. El resultado de esta combinación se presenta en la Figura 4.16, facilitando el análisis de su colocalización y posibles interacciones.

La Figura 4.16 a) presenta la superposición de las imágenes obtenidas en los canales **Ch₁** y **Ch₂**. En este *Merge* se observa que las **NPs PFNL:RB 1** están colocalizadas en el citoplasma, con una mayor concentración en la región nuclear. Estos resultados sugieren de manera contundente que ambas moléculas podrían estar próximas unas de otras, ya sea ambas en una misma NP o bien en NPs hechas de una y otra molécula. Esta proximidad intermolecular es lo que podría desencadenar el proceso de FRET.

Las superposición de los canales **Ch₁** y **Ch₃** permite visualizar que las NPs de **RB** y el **DAPI** tienen una colocalización específica en la región nuclear de la célula, como se ilustra en la Figura 4.16 b). Por otro lado, la Figura 4.16 c) presenta el *Merge* de los canales **Ch₂** y **Ch₃**, donde se observa que las NPs de **PFNL** y el **DAPI** también colocalizan en el área del núcleo celular. Este hallazgo sugiere la hipótesis de que el **PFNL** también tiene afinidad por los ácidos nucleicos, lo que explicaría su acumulación en esta región.

4.9.2. Microscopía de excitación multifotónica

Para el análisis de óptica no lineal (NLO) se utiliza un láser de titanio-zafiro (Ti:Sa), conocido comercialmente como *Chameleon*, del fabricante *Coherent*. Este dispositivo genera luz láser pulsada con una longitud de onda sintonizable en el rango de 680 a 1064 nm. Su longitud de onda central es de 800 nm, con una alta **Potencia** de salida de 3 W, un ancho de pulso de 140 fs y una frecuencia de repetición de 80 MHz. La luz pulsada del *Chameleon* se utiliza para este estudio de microscopía de excitación multifotónica en las muestras biológicas.

En este caso, la longitud de onda del *Chameleon* se ajusta a $\lambda_{exc} = 800 \text{ nm}$ para excitar a la muestra **DAPI - NPs PFNL:RB 1**. Cuando la muestra es irradiada con la luz pulsada de alta energía del *Chameleon*, las moléculas son excitadas con fotones de 800 nm a altas intensidades pico, lo que permite la excitación multifotónica. En este proceso, las moléculas **PFNL** y **RB** experimentan absorción por dos fotones (TPA), gracias a su sección transversal de absorción de dos fotones (σ_{TPA}) de 1200 GM y 10 GM, respectivamente.

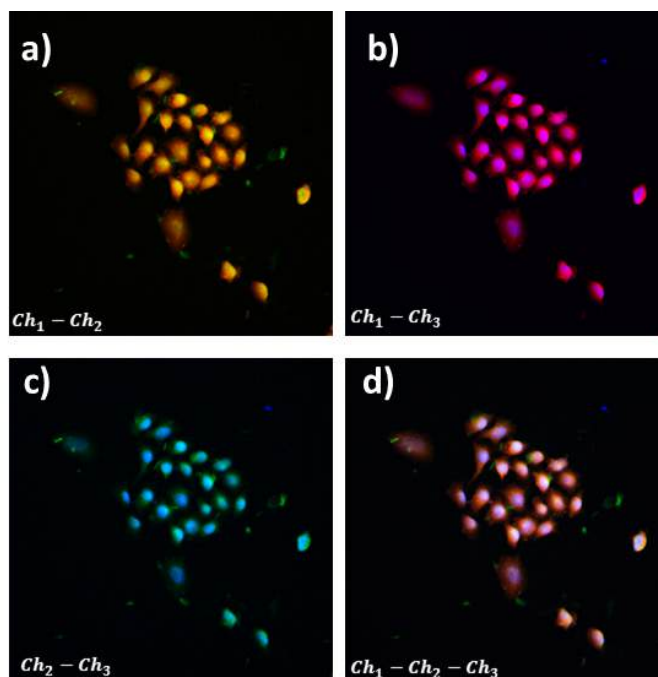


FIGURA 4.16: Colocalización molecular en DAPI - NPs PFNL:RB 1, con excitación lineal: a) Ch_1 - Ch_2 , b) Ch_1 - Ch_3 , c) Ch_2 - Ch_3 y, d) Ch_1 - Ch_2 - Ch_3 .

Es importante destacar que no se ha observado fluorescencia del DAPI a esta longitud de onda de excitación. Según lo reportado en la literatura, la molécula no absorbe los fotones en este rango, como se demuestra en el espectro de absorción del DAPI presentado en la Figura 4.14.

Los canales Ch_1 NL, Ch_2 NL, y Ch_3 NL están configurados para detectar la fluorescencia de la muestra DAPI - NPs PFNL:RB 1 inducida mediante excitación multifotónica con $\lambda_{exc} = 800 \text{ nm}$. Para ello, los tres canales emplean el divisor de haz dicróico MBS 760 +, que elimina de los canales de detección la excitación en el rango de NIR para longitudes de onda superiores a 760 nm .

A continuación, se detalla la configuración de los parámetros utilizados en cada uno de los canales de detección; como se observa, salvo la excitación que en este caso es no lineal a 800 nm , la detección es la misma que la utilizada para el caso de excitación lineal:

- **Ch_1 NL:** En este canal se utiliza únicamente el 1.20 % de la **Potencia** del láser *Chameleon*. El rango de detección del **Detector 635** ($592 - 679 \text{ nm}$), mostrado en la Figura 4.14 a), está configurado con una **Ganancia** de 830. Esto permite observar principalmente la fluorescencia de RB, aunque también se detecta una contribución de PFNL.
- **Ch_2 NL:** Para este canal se emplea el 3 % de la **Potencia** de emisión del *Chameleon*. El **Detector 519** ($504 - 533 \text{ nm}$) es utilizado para detectar la fluorescencia casi exclusiva del PFNL, como se observa en la región espectral de la Figura 4.14 b). La **Ganancia** del detector está ajustada a 1 200.

- **Ch₃ NL:** En este canal también se utiliza el 3% de la **Potencia** del láser *Chameleon*. Para confirmar la ausencia de la fluorescencia del **DAPI** bajo la excitación con $\lambda_{exc} = 800 \text{ nm}$, se utiliza el **Detector 423** (410 – 436 nm), el cual tiene un rango de detección ilustrado en la Figura 4.14 c), con una **Ganancia** configurada en 980.

Las Figuras 4.17 a), b) y c) muestran las micrografías de fluorescencia obtenidas de la muestra **DAPI - NPs PFNL:RB 1** a través de los tres canales de detección.

La fluorescencia mostrada en la Figura 4.17 a) corresponde tanto a RB como a PFNL, iluminando toda la región del citoplasma. En contraste, la Figura 4.17 b) presenta fluorescencia casi exclusiva de PFNL, lo que revela que esta molécula se localiza principalmente en la región nuclear de la célula. La Figura 4.17 c) correspondiente a la detección del canal **Ch₃ NL** confirma que el **DAPI** no emite fluorescencia bajo excitación con una longitud de onda de 800 nm.

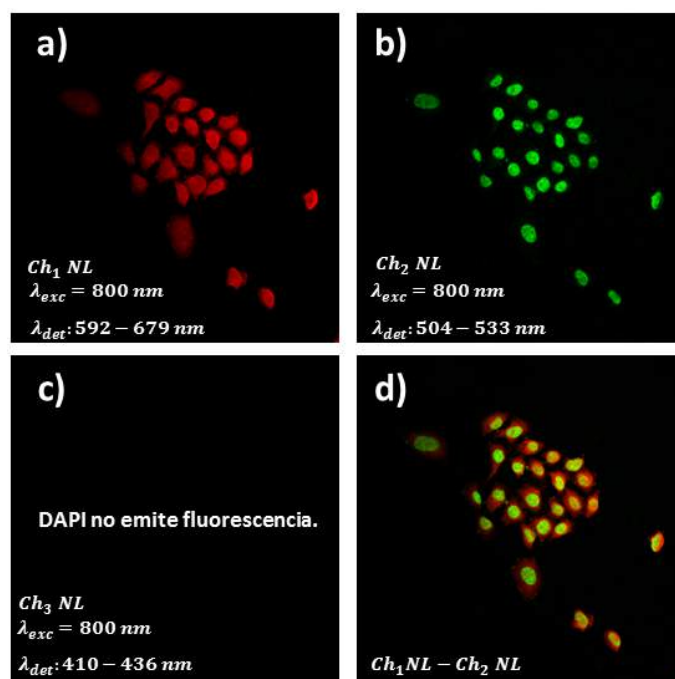


FIGURA 4.17: Micrografías de excitación multifotónica de **DAPI - NPs PFNL:RB 1**, con Excitación no lineal: a) **Ch₁ NL**, b) **Ch₂ NL**, c) **Ch₃ NL** y, d) Colocalización de **Ch₁-Ch₂ NL**.

Por otro lado, la Figura 4.17 d) muestra el *Merge* entre los canales **Ch₁ NL** y **Ch₂ NL**. En esta imagen se observa la colocalización de las moléculas RB y PFNL en el núcleo celular. Debe recordarse que las moléculas pueden estar contenidas en NPs de PFNL:RB o bien que las moléculas de manera independiente estén contenidas en NPs de PFNL y RB, respectivamente.

Este resultado sugiere de manera contundente que el PFNL presenta afinidad por los ácidos nucleicos, destacando su interacción preferencial en esta región. Con estos resultados se confirma que las **NPs PFNL:RB 1** son capaces de teñir los neuroblastomas sin dañar la membrana celular obteniendo así NPs como colorantes funcionales.

4.9.3. Imágenes espectrales

La adquisición de datos espectrales se hace necesaria cuando las señales de emisión superpuestas de muestras con múltiples colorantes tienen que separarse, o cuando el parámetro celular que se va a medir está codificado por cambios en el espectro de emisión, como lo es en el proceso de FRET.

El microscopio multifotónico cuenta con un sistema para la adquisición rápida de imágenes de alta resolución espectral. El hardware que permite esta funcionalidad consta de un elemento espectralmente dispersivo, un fotomultiplicador (PMT) con 32 canales de detección paralelos (**META Detector**) y circuitos electrónicos especiales para el control del detector y la amplificación de la señal.

Mientras que las trayectorias del haz para la detección convencional y META son idénticas en el lado de la excitación, el haz de emisión para la detección espectral, después de haber pasado por el orificio (*pinhole*), incide en una rejilla de reflexión. Esta rejilla descompone el haz en un espectro y lo proyecta sobre la superficie de una matriz lineal de detectores. Cada uno de los 32 elementos PMT en esa matriz registra una parte diferente del espectro, con un ancho espectral de 9.7 nm por cada parte. El resultado es un conjunto de imágenes XY, donde cada imagen representa una ventana espectral diferente.

El detector espectral de 32 canales (**META Detector**) permite la separación espectral precisa de las señales emitidas por cada molécula fluorescente. Esto proporciona un espectro detallado para cada muestra, permitiendo observar la localización celular de las NPs y la evaluación de posibles interacciones entre las moléculas.

El **META Detector** se utiliza para analizar los espectros de emisión de tres muestras del cultivo celular SH-SY5Y, teñidas previamente con nanopartículas específicas: **NPs PFNL**, **NPs RB**, **NPs PFNL:RB 1**. Para facilitar la identificación del núcleo celular, las muestras también fueron teñidas con **DAPI**, un marcador fluorescente que se une específicamente al ADN nuclear. Estas muestras se denominan **DAPI-NPs PFNL**, **DAPI-NPs RB**, **DAPI-NPs PFNL:RB 1**, en las Figuras 4.18 a), b) y c), respectivamente.

Estas muestras se excitan utilizando la luz pulsada del láser *Chameleon*, configurado para emitir a una longitud de onda de $\lambda_{exc} = 800 \text{ nm}$. Además, se utiliza el **MBS:760 +**, para aislar de manera efectiva la señal de excitación. El **META Detector** permite registrar el espectro de emisión de las muestras en un rango que abarca desde 417 nm hasta 727 nm con un ancho de paso espectral de 9.7 nm , como se muestran en la Figura 4.18 d).

Es importante destacar que los colores representados en estas imágenes espectrales son únicamente ilustrativos y han sido seleccionados para reflejar las tonalidades que el ojo humano asocia con las longitudes de onda correspondientes. Estos colores no corresponden

necesariamente a las emisiones reales percibidas por los detectores, sino que buscan facilitar la interpretación visual de los datos espectrales.

La Figura 4.17 c), confirma la ausencia de la emisión de fluorescencia del DAPI al ser excitado con 800 nm, lo que garantiza que las señales detectadas por el META Detector provienen exclusivamente de la fluorescencia emitida por las NPs RB y NPs PFNL, tal como se muestra en la Figura 4.18 d).

El espectro de emisión de la muestra DAPI - NPs PFNL:RB 1 se presenta en la Figura 4.18, donde se observa una región en la que hay disminución en la intensidad de emisión, particularmente alrededor de 550 nm. Según la Figura 3.22, esta longitud de onda corresponde a la región de máxima absorción de las NPs RB. Además, este espectro de emisión de la muestra biológica DAPI - NPs PFNL:RB 1 es similar al reportado para las NPs PFNL:RB 1 individuales, como se muestra en la Figura 3.21.

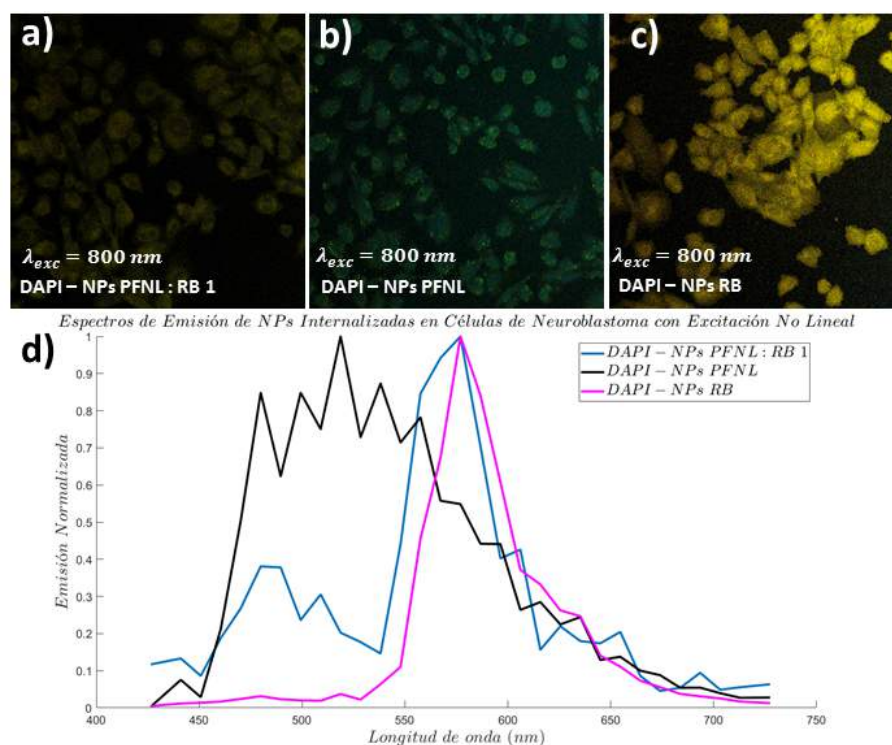


FIGURA 4.18: Imágenes espectrales con excitación no lineal: a) DAPI - NPs PFNL:RB 1.

Estos hallazgos sugieren de manera contundente que, una vez colocadas en la célula, las NPs RB y NPs PFNL alcanzan una proximidad igual o inferior a R_0 , lo que permite la interacción dipolo-dipolo característica de un proceso FRET. Este fenómeno confirma la capacidad de interacción entre las nanopartículas en el entorno intracelular.

El análisis espectral detallado permite caracterizar las propiedades ópticas y la interacción de las **NPs RB** y **NPs PFNL**, proporcionando datos clave para su aplicación en estudios celulares avanzados como destrucción de células, eliminación de bacterias, tratamientos dermatológicos, medicina veterinaria, entre otros. Las propiedades fluorescentes y espectrales de estas nanopartículas posicionan a las **NPs RB** y **NPs PFNL** como potentes fotosensibilizadores (PS) para su uso en terapias fotodinámicas (PDT) en un amplio rango espectral, abarcando tanto el espectro visible como el infrarrojo cercano.

Capítulo 5

Conclusiones

En conclusión, el estudio de este trabajo fue exitoso en demostrar el uso del polímero PFNL como donador de energía en procesos de transferencia de energía radiativa (TE) y no radiativa (FRET) hacia el fotosensibilizador RB, explorando así aplicaciones para PDT y estudios de biofotónica.

Entre las propiedades ópticas que distinguen al PFNL como un donador de energía efectivo destacan su alto rendimiento cuántico de fluorescencia en THF ($\Phi_F = 0.95$), y como nanopartícula ($\Phi_F \approx 1$), así como su amplia sección transversal de dos fotones ($\sigma_{TPA} = 1200 \text{ GM}$) cuando es excitado a 800 nm . Estas características fueron determinantes para los excelentes resultados experimentales obtenidos en esta tesis de maestría, lo cual permite plantear las siguientes conclusiones:

Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS):

- 1) El estudio demostró que el uso de nanopartículas del PFNL como donador molecular, en combinación con el RB como aceptor, facilita el proceso de FRET, lo que resulta en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) bajo condiciones de excitación lineal como no lineal, utilizando longitudes de onda de 402 nm y 800 nm respectivamente.
- 2) La eficiencia de generación de ROS del sistema molecular PFNL:RB permite ser propuesto como un potencial PS en aplicaciones de PDT para el tratamiento de tejidos cancerosos.
- 3) El sistema molecular PFNL:RB a través de la excitación en la ventana de interés biomédico (NIR) ofrece una mayor profundidad de PO en tejido celular.

Transferencia de energía:

- 1) Se verificó que la TE entre PFNL y RB ocurre tanto de manera radiativa como no radiativa, lo cual depende de las condiciones experimentales, como el tipo de excitación (lineal o no lineal) y el estado físico (disolución, película o nanopartículas).
- 2) En disolución con excitación lineal, la eficiencia de TE radiativa PFNL y RB alcanzó el 74.06 %, mientras que bajo excitación no lineal llegó al 89.83 %.
- 3) En películas y nanopartículas, la eficiencia del proceso FRET varió notablemente, siendo mayor en las NPs (75 %) en comparación con las películas (19 %).

Microscopía óptica:

- 1) Los resultados sugieren que las **NPs PFNL** como donador y las **NPs RB** como aceptor se pueden optimizar al reducir la distancia intermolecular entre D y A, así como evaluar su interacción en cultivos celulares para PDT, como se demostró en las pruebas de internalización celular en líneas de neuroblastoma (SH-SY5Y).
- 2) La internalización de las NPs es comprobada por medio de microscopia de fluorescencia.
- 3) Las NPs (internadas en las células) pueden ser excitadas en la ventana de interés biológico (700 – 900 nm), permitiendo una mayor PO en tejidos.
- 4) Las propiedades ópticas, fluorescentes y espectrales de las **NPs PFNL:RB** las posicionan como candidatas altamente eficaces para su aplicación como fotosensibilizadores (PS) en terapias fotodinámicas (PDT), especialmente en el tratamiento de células malignas que requieren excitación profunda y específica.

Finalmente, este trabajo aporta un enfoque innovador para la activación de PS a través de un polímero fluorescente no lineal, abriendo nuevas posibilidades en la terapia fotodinámica con mayor penetración óptica, apoyada en técnicas avanzadas como la microscopía confocal.

Bibliografía

1. Laquai, F., Park, Y.-S., Kim, J.-J. y Basché, T. Excitation Energy Transfer in Organic Materials: From Fundamentals to Optoelectronic Devices. *Macromolecular Rapid Communications* **30**, 1203-1231. <https://doi.org/10.1002/marc.200900309> (jul. de 2009).
2. Gather, M. C. y Yun, S. H. Bio-optimized energy transfer in densely packed fluorescent protein enables near-maximal luminescence and solid-state lasers. *Nature Communications* **5**. <https://doi.org/10.1038/ncomms6722> (dic. de 2014).
3. Aparicio-Ixta, L. *et al.* Two-photon excited fluorescence of silica nanoparticles loaded with a fluorene-based monomer and its cross-conjugated polymer: their application to cell imaging. *Nanoscale* **4**, 7751. <https://doi.org/10.1039/c2nr31925j> (2012).
4. Amore, S., Lagorio, M. G., Dicalio, L. E. y Román, E. S. Photophysical Properties of Supported Dyes. Quantum Yield Calculations in Scattering Media. *Progress in Reaction Kinetics and Mechanism* **26**, 159-177. <https://doi.org/10.3184/007967401103165235> (jun. de 2001).
5. Ramon-Gallegos, E. *Terapia fotodinámica: teoría y práctica*. ISBN: 978-607-414-490-1 (oct. de 2015).
6. Jorizzo, J. L., Bologna, J. L. y Schaffer, J. V. *Dermatology: 2-volume set* 3.^a ed. (W B Saunders, London, England, jun. de 2012).
7. Stiel, H., Teuchner, K., Paul, A., Freyer, W. y Leupold, D. Two-photon excitation of alkyl-substituted magnesium phthalocyanine: radical formation via higher excited states. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **80**, 289-298. ISSN: 1010-6030. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/1010603094010579> (1994).
8. Karotki, A. *et al.* Efficient singlet oxygen generation upon two-photon excitation of new porphyrin with enhanced nonlinear absorption. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* **7**, 971-975 (2001).
9. Bhawalkar, J. D., He, G. S. y Prasad, P. N. Nonlinear multiphoton processes in organic and polymeric materials. *Reports on Progress in Physics* **59**, 1041. <https://dx.doi.org/10.1088/0034-4885/59/9/001> (sep. de 1996).
10. Algar, W. R., Hildebrandt, N., Vogel, S. y Medintz, I. L. FRET as a biomolecular research tool - understanding its potential while avoiding pitfalls. *Nature Methods* **16**, 815-829. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02400319> (sep. de 2019).
11. Algar, W. R., Hildebrandt, N., Vogel, S. S. y Medintz, I. L. FRET as a biomolecular research tool — understanding its potential while avoiding pitfalls. *Nature Methods* **16**, 815-829. ISSN: 1548-7105. <http://dx.doi.org/10.1038/s41592-019-0530-8> (ago. de 2019).
12. Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy* 3.^a ed., 59. ISBN: 978-0 387-31278-1 (Springer, New York, NY, mar. de 2011).

13. Shen, X., Li, L., Wu, H., Yao, S. y Wu, H. Photosensitizer-doped conjugated polymer nanoparticles for simultaneous two-photon imaging and two-photon photodynamic therapy in living cells. *Nanoscale* **3**, 5140-6 (dic. de 2011).
14. Awan, M. y Tarin, S. Review of photodynamic therapy. *The Surgeon* **4**, 231-236. ISSN: 1479-666X. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1479666X0680065X> (2006).
15. Prabhakaran, P., Kim, T. y Lee, K. en *Polymer Science: A Comprehensive Reference* 211-260 (Elsevier, 2012). ISBN: 9780080878621. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00207-7>.
16. Campagnola, P. J. *et al.* 3-Dimensional Submicron Polymerization of Acrylamide by Multiphoton Excitation of Xanthene Dyes. *Macromolecules* **33**, 1511-1513. <https://doi.org/10.1021/ma991042e> (feb. de 2000).
17. Xu, C., Williams, R., Zipfel, W. y Webb, W. Multiphoton cross-sections of molecular fluorophores. *Bioimaging* **4**, 198-207. [https://doi.org/10.1002/1361-6374\(199609\)4:3%3C198::AID-BI010%3E3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1361-6374(199609)4:3%3C198::AID-BI010%3E3.0.CO;2-X) (sep. de 1996).
18. Paschotta, R. *Fluorescence RP Photonics Encyclopedia*. Dic. de 2005. <https://www.rp-photonics.com/fluorescence.html> (2024).
19. Pawel Mroz Ying-Ying Huang, T. W. y Hamblin, M. R. en *Cap. Fullerenes in Photodynamic Therapy of Cancer* (sep. de 2010). ISBN: 978-142-00-754-65. <https://www.routledgehandbooks.com/doi/10.1201/9781420075496-45>.
20. *The Science of Photobiology* ISBN: 9781468417135. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4684-1713-5> (Springer US, 1977).
21. Hader, D. *General Photobiology* ISBN: 9781483286389. <https://books.google.com.mx/books?id=uETgBAAAQBAJ> (Elsevier Science, 2013).
22. Chen, Q. *et al.* Improvement of Tumor Response by Manipulation of Tumor Oxygenation During Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology* **76**, 197-203. ISSN: 0031-8655. [http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)076%3C0197:iotrbb%3E2.0.co;2](http://dx.doi.org/10.1562/0031-8655(2002)076%3C0197:iotrbb%3E2.0.co;2) (2002).
23. Guan, Q., Li, Y.-A., Li, W.-Y. y Dong, Y.-B. Photodynamic Therapy Based on Nanoscale Metal–Organic Frameworks: From Material Design to Cancer Nanotherapeutics. *Chemistry – An Asian Journal* **13**, 3122-3149. ISSN: 1861-471X. <http://dx.doi.org/10.1002/asia.201801221> (oct. de 2018).
24. Nyman, E. S. e Hynninen, P. H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **73**, 1-28. ISSN: 1011-1344. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2003.10.002> (ene. de 2004).
25. Zhang, X.-F. y Li, X. The photostability and fluorescence properties of diphenylisobenzofuran. *Journal of Luminescence* **131**, 2263-2266. ISSN: 0022-2313. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jlumin.2011.05.048> (nov. de 2011).
26. Alejandro, V.-C. *et al.* Brominated BODIPYs as potential photosensitizers for photodynamic therapy using a low irradiance excitation. *Polyhedron* **176**, 114207. ISSN: 0277-5387. <http://dx.doi.org/10.1016/j.poly.2019.114207> (ene. de 2020).

27. Entradas, T., Waldron, S. y Volk, M. The detection sensitivity of commonly used singlet oxygen probes in aqueous environments. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **204**, 111787. ISSN: 1011-1344. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111787> (mar. de 2020).
28. Wang, P. *et al.* Luminescence and photosensitivity of gadolinium labeled hematoporphyrin monomethyl ether. *Opt. Express* **22**, 2414-2422. <https://opg.optica.org/oe/abstract.cfm?URI=oe-22-3-2414> (feb. de 2014).
29. Bonnett, R. *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy* ago. de 2000. <http://dx.doi.org/10.1201/9781482296952>.
30. Prasad, P. N. *Introduction to Biophotonics* ISBN: 0-471-28770-9 (John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2003).
31. *Advances in radiation oncology in lung cancer* 2.^a ed. (ed. Jeremic, B.) 371-378 (Springer, Berlin, Germany, sep. de 2011).
32. Buytaert, E., Dewaele, M. y Agostinis, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1776**, 86-107. ISSN: 0304-419X. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2007.07.001> (sep. de 2007).
33. López-Fernández, A. M., Moisesescu, E. E., de Llanos, R. y Galindo, F. Development of a Polymeric Film Entrapping Rose Bengal and Iodide Anion for the Light-Induced Generation and Release of Bactericidal Hydrogen Peroxide. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 10162. ISSN: 1422-0067. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms231710162> (sep. de 2022).
34. *Handbook of Nanophysics* cap. Fullerenes in Photodynamic Therapy of Cancer. ISBN: 9781420075496. <http://dx.doi.org/10.1201/9781420075496> (CRC Press, sep. de 2010).
35. Rauf, M., Graham, J. P., Bukallah, S. B. y Al-Saedi, M. A. Solvatochromic behavior on the absorption and fluorescence spectra of Rose Bengal dye in various solvents. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **72**, 133-137. ISSN: 1386-1425. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2008.08.018> (feb. de 2009).
36. Stracke, F., Heupel, M. y Thiel, E. Singlet molecular oxygen photosensitized by Rhodamine dyes: correlation with photophysical properties of the sensitizers. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **126**, 51-58. ISSN: 1010-6030. [http://dx.doi.org/10.1016/S1010-6030\(99\)00123-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1010-6030(99)00123-9) (sep. de 1999).
37. Martínez, R. *et al.* 808 nm-activable core@multishell upconverting nanoparticles with enhanced stability for efficient photodynamic therapy. *Journal of Nanobiotechnology* **18**. ISSN: 1477-3155. <http://dx.doi.org/10.1186/s12951-020-00640-3> (jun. de 2020).
38. Alvarez-Venicio, V. *et al.* Red fluorescent benzothiadiazole derivative loaded in different nanoformulations: Optical properties and their use in bio-imaging. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **290**, 122250. ISSN: 1386-1425. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2022.122250> (abr. de 2023).

-
39. Hu, Y., Yu, S., Ma, N., Kong, J. y Zhang, X. Rose bengal-mediated photoinduced atom transfer radical polymerization for high sensitivity detection of target DNA. *Talanta* **254**, 124104. ISSN: 0039-9140. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914022009006> (2023).