



CENTRO DE INVESTIGACIONES  
EN ÓPTICA, A.C.

**Generación de imágenes de microestructuras fluorescentes:  
un estudio comparativo entre agentes de contraste basados  
en puntos cuánticos y nanoagregados orgánicos.**

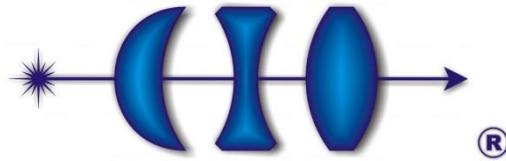


*MAESTRÍA EN CIENCIAS (ÓPTICA)*

*Asesor: Dr. Gabriel Ramos Ortiz.*

*Estudiante: Eduardo Andrés Roco Avilez.*

*Julio de 2016  
León, Guanajuato, México*



**CENTRO DE INVESTIGACIONES  
EN OPTICA, A.C.**

# **Generación de imágenes de microestructuras fluorescentes: un estudio comparativo entre agentes de contraste basados en puntos cuánticos y nanoagregados orgánicos.**

Tesis presentada como requisito para optar al título de:  
Maestro en ciencias (óptica)

Asesor

**Dr. Gabriel Ramos Ortiz**

Estudiante

**Eduardo Andrés Roco Avilez**

LEÓN, GUANAJUATO, MÉXICO 2016

*Dedicado a mi familia*

# Agradecimientos

Primero que todo quiero agradecer a Dios y a mi familia por todo el apoyo recibido durante este proceso y por su constante preocupación.

A mi asesor Dr. Gabriel Ramos Ortiz por los conocimientos y herramientas entregadas, además de brindarme en todo momento su apoyo y confianza.

A cada uno de los profesores que fueron parte de mi formación, por compartir sus conocimientos y experiencias.

A todos aquellos que de alguna manera contribuyeron de manera directa o indirecta en la elaboración de esta tesis en especial al M.C. Enrique Alba, a la Dra. Violeta Álvarez, a la Dra. Laura Aparicio, al Ing. Quim. Martín Olmos y a mis compañeros Alan Bernal, Oscar Ballesteros, Goretti Hernandez, Oscar Muñoz y Oscar Naranjo.

# Resumen

La absorción de dos fotones (TPA) es un proceso no lineal en el cual una sustancia absorbe simultáneamente dos fotones. Este fenómeno posee diversas aplicaciones tecnológicas que van desde la fotónica a las ciencias médicas, como, por ejemplo, almacenamiento óptico 3D, microfabricaciones, microscopía de fluorescencia multifotónica y terapia fotodinámica. En los últimos años estas aplicaciones han manifestado un desarrollo creciente debido a la síntesis de nuevos materiales, tanto orgánicos como inorgánicos, con grandes secciones transversales de absorción de dos fotones ( $\sigma_{TPA}$ ). En la microscopía de fluorescencia multifotónica estos materiales son usados como marcadores fluorescentes (agentes de contraste) para obtener imágenes en detalle de estructuras celulares y tejidos, así como para estudiar procesos biológicos a nivel molecular e intracelular. Para esta aplicación materiales en solución como moléculas o polímeros y marcadores nanoestructurados son de especial interés, pues pueden exhibir propiedades tales como biocompatibilidad, multifuncionalidad y selectividad celular.

En la literatura la forma en que se mide  $\sigma_{TPA}$  en marcadores orgánicos y marcadores inorgánicos (en particular puntos cuánticos) difiere en que la cantidad de materia contenida en las muestras estudiadas se denota como concentración molar de nanopartículas ( $mol_{NPs}/L$ ) para el caso de punto cuánticos y concentración molar molecular ( $mol_{Mlr}/L$ ) para el caso orgánico. Como estas concentraciones no son equivalentes, es difícil hacer una comparación directa del brillo intrínseco (producto de  $\sigma_{TPA}$  y la eficiencia cuántica de fluorescencia) de marcadores inorgánicos y orgánicos a partir de los reportes en la literatura. Además, en la literatura no existen estudios sistemáticos en los cuales, bajo las mismas condiciones de laboratorio, se estudien las propiedades ópticas de estos marcadores usando medidas equivalentes de la cantidad de masa, así como su capacidad para marcar células para formar imágenes utilizando microscopía confocal y multifotónica.

En la presente tesis se empleó la técnica fluorescencia inducida por absorción de dos fotones (TPEF), con el propósito de discernir el brillo intrínseco de un punto cuántico comparado con el de una nanopartícula orgánica. Los estudios para medir los valores de la sección transversal en dichas nanopartículas se llevaron a cabo usando radiación láser pulsada de femtosegundos,

como fuente de excitación, entre los 760 y 820 nm. Además, las nanopartículas estudiadas fueron empleadas para fabricar microestructuras fluorescentes en películas plásticas, así como agentes de tinción en células cancerosas (HeLa), con el objetivo de obtener imágenes comparativas, es decir, que bajo las mismas condiciones de fabricación de las películas plásticas, y tinción celular y los mismos parámetros del microscopio (intensidad de excitación, objetivos, apertura del pinhole, etc) se pudiera determinar la eficiencia de estos marcadores para generar micrografías de fluorescencia.

Con los resultados obtenidos se pudo determinar que la absorción de dos fotones entre los puntos cuánticos y las nanopartículas orgánicas, bajo las mismas condiciones, son equivalente y por lo tanto, la diferencia de  $\sigma_{TPA}$  reportadas en la literatura para uno y otro caso (siendo mayor en los puntos cuánticos por dos y hasta tres ordenes de magnitud) se debe simplemente a la falta de un estándar adecuado para medir estas partículas por el método de TPEF, así como al hecho de que en la literatura se usan de manera poco consistentes las unidades de concentración de suspensiones de nanopartículas. Además, se sugirió implementar una muestra estándar de nanopartículas para ser utilizadas como referencia en la técnica TPEF. Por último, se pudo determinar, en una primera aproximación, que ambas NPs pudieron penetrar y teñir el citoplasma celular, pero al comparar las micrografías usando los mismos parámetros del microscopio empleado, las células teñidas con las NPs-O obtuvieron los mejores resultados.

# Índice general

Capítulos	Páginas
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Absorción de dos Fotones . . . . .	1
1.2. Microscopía de Fluorescencia . . . . .	3
1.2.1. Microscopía Confocal y de Dos Fotones . . . . .	3
1.3. Marcadores fluorescentes usados como agentes de contraste . . . . .	4
1.3.1. Puntos Cuánticos . . . . .	4
1.3.2. Nanopartículas Orgánicas . . . . .	5
1.4. Objetivo General . . . . .	6
1.5. Objetivos Específicos . . . . .	7
<b>2. Óptica no lineal: Absorción de dos Fotones</b>	<b>8</b>
2.1. Introducción a la óptica no Lineal . . . . .	8
2.2. Ecuación de onda en medios ópticos no lineales . . . . .	11
2.2.1. Solución de la ecuación de onda con contribución lineal en la polarización .	12
2.2.2. Solución de la ecuación de onda con contribución no lineal cúbica en la polarización . . . . .	13
2.2.2.1. Coeficiente de absorción no lineal $\beta$ . . . . .	14
2.3. Absorción de dos fotones . . . . .	15
2.3.1. Atenuación de luz inducida por absorción de dos fotones . . . . .	17

2.3.2.	Sección transversal de absorción de dos fotones $\sigma_{TPA}$ . . . . .	18
2.3.3.	Técnicas usadas para medir absorción de dos fotones . . . . .	18
2.3.3.1.	Z-scan . . . . .	19
2.3.3.2.	TPEF . . . . .	20
<b>3.</b>	<b>Microscopía de Fluorescencia por Escaneo: Confocal y Dos Fotones</b>	<b>21</b>
3.1.	Microscopía de Fluorescencia por Escaneo . . . . .	21
3.1.1.	Fluorescencia . . . . .	21
3.1.2.	Características de la Microscopía de Fluorescencia . . . . .	22
3.2.	Microscopía Confocal . . . . .	24
3.3.	Microscopía Multifotónica . . . . .	26
<b>4.</b>	<b>Marcadores Fluorescentes usados como agentes de contraste</b>	<b>29</b>
4.1.	Puntos Cuánticos . . . . .	29
4.1.1.	Composición y Estructura de los PCs . . . . .	31
4.1.2.	Propiedades Ópticas y Aplicaciones de los PCs . . . . .	31
4.1.2.1.	Puntos Cuánticos como marcadores fluorescentes biológicos . . . . .	33
4.2.	Nanoagregados Orgánicos . . . . .	34
4.2.1.	Compuestos Orgánicos . . . . .	34
4.2.1.1.	Compuesto Orgánicos $\pi$ -conjugados . . . . .	35
4.2.1.2.	Componentes moleculares: donadores, aceptores y puentes $\pi$ . . . . .	35
4.2.2.	Nanopartículas Orgánicas . . . . .	36
4.2.2.1.	NPs-O en microscopía de fluorescencia multifotónica . . . . .	37



<b>5. Desarrollo Experimental</b>	<b>40</b>
5.1. Preparación de las Muestras . . . . .	40
5.1.1. Nanopartículas Inorgánicas: Puntos Cuánticos . . . . .	40
5.1.2. Nanopartículas Orgánicas . . . . .	41
5.1.3. Preparación de Microestructuras Fluorescentes . . . . .	42
5.1.4. Tinción Celular . . . . .	42
5.2. Determinación de la Concentración Molar de las Muestras . . . . .	43
5.3. Instrumentos para la caracterización de las propiedades ópticas lineales . . . . .	44
5.3.1. Espectrofotómetro Lambda 900 UV/VIS/NIR . . . . .	44
5.3.2. Fluorómetro FS5 . . . . .	45
5.4. Arreglo experimental para la caracterización de la fluorescencia inducida por absorción de dos fotones . . . . .	46
5.5. Microscopio ZEISS LSM-710-NLO . . . . .	47
<b>6. Análisis y Discusión de Resultados</b>	<b>49</b>
6.1. Tamaño de las NPs . . . . .	49
6.2. Propiedades Ópticas Lineales . . . . .	50
6.3. Sección Transversal de Absorción de Dos Fotones . . . . .	53
6.4. Microestructuras Fluorescentes . . . . .	59
6.5. Micrografías Celulares . . . . .	64
<b>Bibliografía</b>	<b>70</b>

# Capítulo 1

## Introducción

En este capítulo se hará una introducción general al tema de esta tesis, las motivaciones y los objetivos de investigación.

### 1.1. Absorción de dos Fotones

La óptica se define como “Rama de la física que estudia el comportamiento de la luz y su interacción con la materia”. Estas interacciones originan diversos tipos de fenómenos que, a su vez, permiten clasificar a la óptica en: Óptica Lineal y Óptica No-lineal. La óptica no lineal estudia los fenómenos que ocurren como consecuencia de la modificación de las propiedades ópticas de un material por la presencia de campos electromagnéticos intensos. Pese a que la invención del láser en 1960 es posterior al origen de la óptica No-lineal, es gracias a este invento que se logra potenciar y desarrollar más a fondo esta área de la física, debido a que se logra demostrar experimentalmente los fenómenos no lineales.

Uno de los fenómenos ópticos no lineales de mayor importancia por sus implicaciones científicas y tecnológicas es la absorción de dos fotones (TPA, por sus siglas en inglés). Este fenómeno no lineal de tercer orden, y que será objeto de estudio en esta investigación, fue originalmente predicho por Maria Goeppert-Mayer en 1931 [1], pero no fue hasta la invención del láser que la fluorescencia inducida por absorción de dos fotones fue observada experimentalmente [2,3]. La absorción de dos fotones ocurre cuando dos fotones excitan simultáneamente un átomo o molécula, resultando en algunas ocasiones, en la emisión de un fotón de mayor energía. La probabilidad de absorción simultánea de dos fotones es muy baja, por lo que, se requieren intensidades de excitación muy altas, que sólo se logran con láseres pulsados de nano, pico o femto segundos.

Las aplicaciones de absorción de dos fotones manifiestan un uso creciente en microscopía de fluorescencia [4], almacenamiento óptico 3D [5], nanofabricaciones [6] y terapia fotodinámica [7]. Es por esto que, en la última década, se ha hecho un esfuerzo significativo en el desarrollo de materiales, tanto orgánicos como inorgánicos, que posean una absorción de dos fotones muy eficiente con el fin de implementar nuevas aplicaciones y seguir trabajando y optimizando las ya existentes.

Una de las formas para cuantificar la absorción de dos fotones es a través de la sección transversal de absorción de dos fotones,  $\sigma_{TPA}$ . Esta propiedad se expresa en Goeppert-Mayer (GM),  $1 \text{ GM} = 1 \times 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s moléculas}^{-1} \text{ foton}^{-1}$ ) y en la literatura es medida principalmente usando dos técnicas experimentales: Z-scan [8,9] y excitación fluorescente inducida por dos fotones (TPEF, por sus siglas en inglés) [10, 11]. La primera de ellas es un método directo, donde se mide la transmisión no lineal de la muestra y, la segunda, se basa en medir la intensidad de fluorescencia inducida por TPA y compararla con la fluorescencia de una muestra de referencia estándar. Estas dos técnicas han sido empleadas ampliamente para cuantificar TPA en materiales en bulto, películas delgadas, soluciones moleculares y nanopartículas. Esta variedad de materiales hace que a veces no sea fácil realizar una comparación de la actividad de TPA en materiales diferentes. Por ejemplo, no existe uniformidad en la literatura respecto a la forma en que se deben reportar las concentraciones en muestras de nanopartículas (NPs) al momento de medir sus valores de  $\sigma_{TPA}$ , mientras las investigaciones sobre NPs inorgánicas (Puntos cuánticos) emplean concentraciones en términos de densidad de Nps ( $Nps/cm^3$ ) o concentración molar de Nps ( $mol_{NPs}/L$ ) [12–14], los trabajos sobre nanopartículas orgánicas emplean, la mayoría de las veces, concentración molar molecular ( $mol_{Mlr}/L$ ) [15–17]. Como estas maneras de expresar las concentración no son equivalentes, realizar una comparación directa, a partir de los resultados reportados en la literatura, entre ambos tipos de nanopartículas, no sería apropiada. Ésta podría ser la razón del porqué los valores de  $\sigma_{TPA}$ , como se verá más adelante, entre estos dos tipos de NPs son muy distintos, dejando la sensación de que los puntos cuánticos poseen una actividad de TPA mucho más grande que los nanoagregados orgánicos. Es por esto que, realizar un estudio comparativo de las propiedades de TPA, usando las mismas unidades de concentración, es de mucha importancia dada sus aplicaciones.

## 1.2. Microscopía de Fluorescencia

Entre las técnicas de obtención de bio-imágenes para el diagnóstico de enfermedades, como el cáncer, se puede citar la tomografía [18], resonancia magnética [19], microscopía de fluorescencia [4] e imágenes de fluorescencia por reflectancia [20], entre otras. La fluorescencia tiene la ventaja de proporcionar una razón señal-ruido muy alta, lo que nos permite estudiar procesos biológicos y bioquímicos intracelulares y generar imágenes de gran resolución. Para utilizar la fluorescencia, se puede utilizar la fluorescencia endógena (autofluorescencia) o se puede etiquetar la muestra (una célula o un tejido) con marcadores fluorescentes, cuya distribución se hará evidente después de la iluminación. Es por esto que, la microscopía de fluorescencia se ha convertido en la mejor técnica para la formación de bio-imágenes.

### 1.2.1. Microscopía Confocal y de Dos Fotones

En décadas pasadas la mayoría de las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia se obtenían mediante técnicas espectroscópicas basadas en la absorción de un fotón, como, por ejemplo, la microscopía de epifluorescencia y posteriormente la microscopía confocal. Esta última técnica de observación ha logrado excelentes resultados en diversas ramas de la ciencia (medicina, biología, materiales, geología, etc). Su éxito se debe a las indudables ventajas que ofrece frente a la microscopía óptica tradicional (imágenes de mayor nitidez y contraste, mayor resolución vertical y horizontal, etc.) y, sobre todo, a la posibilidad de obtener secciones “ópticas” de la muestra, lo que permite su estudio tridimensional. Sin embargo, la posibilidad de excitación mediante la absorción de dos fotones, abrió otra ventana de estudio en la microscopía de fluorescencia, pues es posible generar bio-imágenes a partir de radiación infrarroja, sobre todo en la ventana de interés biomédico (700-900nm) en donde el tejido es altamente transparente.

En la microscopía de dos fotones, demostrada por primera vez por Denk et al [21], los marcadores son excitados por la absorción simultánea de dos fotones. La fluorescencia producida por este proceso también proporciona una herramienta visual directa para la observación de los procesos biológicos y la clínica de imágenes, además, ofrece una serie de ventajas únicas sobre la

microscopía confocal, tales como: reducción del fotodaño en el tejido, debido a que la excitación se encuentra localizada en un pequeño volumen, mayor poder de penetración, debido a que la excitación se hace en el infrarrojo cercano, y reducción de la fluorescencia de fondo, debido a que las biomoléculas responsables de la autofluorescencia en los sistemas biológicos no presentan excitación por dos fotones.

Actualmente, uno de los intereses principales en el campo de la microscopía de fluorescencia, es el desarrollo de nuevos marcadores, para ser utilizados como agentes de contraste o bio-marcadores, con: alto rendimiento cuántico de fluorescencia, secciones transversales de dos fotones grandes, baja o nula toxicidad, compatibilidad con el entorno biológico y facilidad de conjugación con biomoléculas para la orientación a sitios celulares específicos, lo cual podría tener un gran impacto para el diagnóstico oportuno de diversas enfermedades.

### **1.3. Marcadores fluorescentes usados como agentes de contraste**

Entre las diferentes investigaciones que se realizan en el campo de la microscopía de fluorescencia, el desarrollo y estudio de NPs para ser usadas como agentes de contraste o biomarcadores, ha tenido un gran auge en los últimos años. El tipo de NPs que se han estudiado se dividen principalmente en orgánicas e inorgánicas.

#### **1.3.1. Puntos Cuánticos**

Dentro de los nanomarcadores inorgánicos como las nanopartículas metálicas y las de sílice se encuentran los puntos cuánticos (PCs). Éstos corresponden a nanocristales de semiconductores tales como: CdSe, CdTe, InP, CdHgTe y PbSe , cuyos tamaños se encuentran entre los  $1nm$  y  $10nm$ . Una de las principales ventajas de los PCs es que, dependiendo del material o del tamaño, se puede ajustar la longitud de onda de emisión a diferentes regiones del espectro y, en particular, a las regiones del IR cercano. Otra de las ventajas, y que hace a los PCs muy interesantes, es la amplia e intensa banda absorción óptica combinada con una alta fotoluminiscencia y fotoestabilidad. Debido a estas propiedades únicas, los PCs han sido utilizados en varias

aplicaciones industriales, tales como: emisores de luz [22], celdas solares [23] y fotovoltaicas [24], dispositivos fotónicos [25], etc.

En las aplicaciones biológicas, los PCs han estado recibiendo atención, debido a sus aplicaciones en las microscopías de fluorescencia y , recientemente, en la microscopía de dos fotones, esto debido a que se ha reportado que poseen secciones transversales de absorción de dos fotones muy grandes que van desde los  $10^3$  hasta los  $10^6$  GM (usando concentración molar de NPs) [26, 27] permitiendo así, obtener imágenes de una variedad de muestras biológicas, incluso muestras gruesas sin tanto ruido. Sin embargo, los PCs tienen la desventaja de que están hechos de materiales altamente tóxicos. A pesar de que existen estrategias para reducir la toxicidad, para estudios celulares in vitro sin afectar a la funcionalidad de las células vivas, los reportes muestran que las propiedades ópticas de las nanopartículas decaen luego de hacerlos biocompatibles.

### 1.3.2. Nanopartículas Orgánicas

Las nanopartículas orgánicas (NPs-O) pueden ser descritas generalmente como partículas sólidas compuestas de materiales orgánicos (moléculas, polímeros, lípidos, etc) que varían en diámetro desde  $10\text{nm}$  a  $1\mu\text{m}$ . Durante las últimas décadas, este tipo de nanopartículas ha sido objeto de intensas investigaciones, debido a sus altas potencialidades en un amplio espectro de áreas industriales, que van desde la electrónica a la fotónica, de materiales conductores a sensores y de la medicina a la biotecnología [28]. Cabe señalar que las NPs-O son un tema que no ha sido explorado tan extensamente como su contraparte inorgánica, pero, debido a su alto rendimiento cuántico de fluorescencia y excelentes propiedades no lineales, combinado con un bajo costo, baja toxicidad, síntesis relativamente fácil y una compatibilidad con medios acuosos, lo que facilita la bio-compatibilidad, hace que estas nanopartículas tengan un enorme potencial en aplicaciones biomédicas [29, 30].

Al igual que los PCs, las NPs-O que presentan absorción de dos fotones, han despertado un interés creciente en la microscopía multifotónica. NPs-O formadas por compuestos  $\pi$ -conjugados han sido utilizadas para este tipo de aplicaciones con valores de  $\sigma_{TPA}$  entre  $10^2 - 10^3$  GM [31](usando concentración molar molecular) y  $10^5$  GM (usando concentración molar de NPs) [32].

A pesar de que estos valores son 2 ó 3 órdenes de magnitud más grande que colorantes orgánicos comerciales [33] (ver Tabla 1.1) diversas investigaciones se siguen llevando a cabo para optimizar aún más las propiedades no lineales de las NPs-O.

Como se ha mencionado, en la literatura se han reportado NPs tanto orgánicas como inorgánicas para la generación de bio-imágenes. Aunque las ventajas de cada tipo de NPs son realizadas por la comunidad científica que trabaja en uno y otro campo, no existen estudios sistemáticos, en donde bajo las mismas condiciones de laboratorio y tomando en cuenta los diferentes parámetros que pueden influenciar el cálculo del parámetro  $\sigma_{TPA}$  se haga una comparación de sus propiedades. Es por esto que, esta investigación busca realizar un estudio comparativo entre estos dos tipos de marcadores.

Tabla 1.1: Actividad de TPA de algunos colorantes comerciales y naturales

Colorantes	$\lambda_{exc}$ [nm]	$\sigma_{TPA}$ [GM]
Alexa480	750	100
Alexa568	780	180
Bodipy	930	100
DAPI	700	100
Dil	700	95
RodaminaB	700	280
dsRed*	1000	110
mCFP*	850	190
Retinol*	700	0.1

\*colorantes naturales

## 1.4. Objetivo General

Realizar un estudio comparativo de las propiedades ópticas entre marcadores fluorescentes orgánicos e inorgánicos (puntos cuánticos) usados en microscopía de fluorescencia por escaneo láser.

## 1.5. Objetivos Específicos

- Determinar propiedades ópticas lineales tales como: absorción, fluorescencia, eficiencia cuántica y tiempos de vida.
- Determinar mediante la técnica TPEF la sección transversal de absorción de dos fotones.
- Generar imágenes de microestructuras fluorescentes mediante microscopía de fluorescencia (de uno y dos fotones).
- Controlar los parámetros instrumentales del microscopio confocal-multifotónico, para obtener figuras de mérito que permitan realizar una comparación de las imágenes obtenidas con PCs y NPs-O.



# Capítulo 2

## Óptica no lineal: Absorción de dos Fotones

A lo largo de este capítulo se desarrollará una descripción general de la interacción de la luz con la materia en el régimen óptico no lineal. Para ello se comenzará describiendo el significado de óptica no lineal. Posteriormente, se deducirá la ecuación de onda para una onda monocromática propagándose en un medio dieléctrico con respuesta lineal y no lineal cúbica, es decir, considerando influencia del término no lineal de tercer orden en el vector de polarización. Por último, se estudiará el fenómeno de absorción no lineal de dos fotones junto con dos métodos para medir la sección transversal de absorción de dos fotones en un material.

### 2.1. Introducción a la óptica no Lineal

La óptica no lineal en los últimos años ha demostrado ser un tema de investigación importante, debido a sus aplicaciones en el área de la fotónica. La óptica no lineal estudia los fenómenos que ocurren como consecuencia de la modificación de las propiedades ópticas del material por la presencia de campos electromagnéticos intensos, por ejemplo: la luz láser. A los fenómenos ópticos no lineales se les denomina así porque ocurren cuando la respuesta de un material a un campo electromagnético depende de manera no lineal de la amplitud del campo aplicado.

Para describir más precisamente el significado de no linealidad óptica y las propiedades ópticas del material cuando se propaga una onda electromagnética a través de él, se considera el momento dipolar por unidad de volumen (polarización)  $P(t)$  que depende del campo aplicado  $E(t)$ . La Figura 2.1 muestra esquemáticamente cómo esta dependencia es lineal para campos eléctricos pequeños y no lineal para campo eléctricos altos.

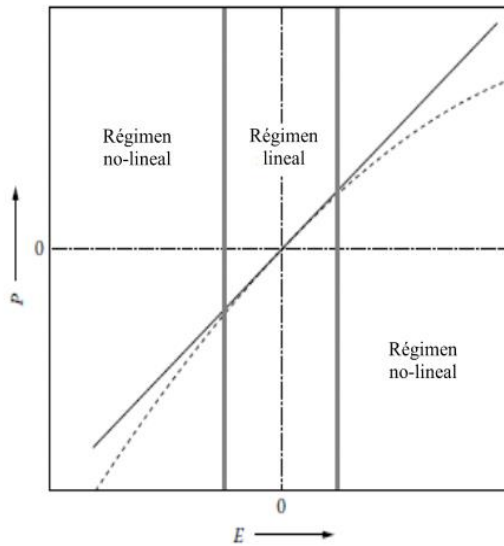


Figura 2.1: Respuesta de la polarización  $P(t)$  a la magnitud del campo eléctrico aplicado  $E(t)$

En el caso de la óptica convencional (lineal), la polarización inducida en el material depende de manera lineal del campo eléctrico, por ende, puede ser escrita como:

$$P(t) = \varepsilon_0 \chi^{(1)} E(t), \quad (2.1)$$

donde  $\chi^{(1)}$  se conoce como la susceptibilidad eléctrica lineal y  $\varepsilon_0$  es la permitividad en el vacío. Algunos fenómenos pertenecientes a la óptica lineal son: la reflexión, la refracción y la absorción lineal. En la óptica no lineal la polarización puede ser escrita en términos de una serie de potencias del campo eléctrico, esto es:

$$P(t) = \varepsilon_0 [\chi^{(1)} E(t) + \chi^{(2)} E^2(t) + \chi^{(3)} E^3(t) + \dots] \equiv P^L + P^{NL}. \quad (2.2)$$

Las cantidades  $\chi^{(2)}$  y  $\chi^{(3)}$  se conocen como susceptibilidades no lineales de segundo y tercer orden, respectivamente. Cabe mencionar que por simplicidad se ignoró el carácter vectorial de los campos  $E(t)$  y de  $P(t)$  y el carácter tensorial de las susceptibilidades  $\chi^{(1)}$ ,  $\chi^{(2)}$  y  $\chi^{(3)}$  en las ecuaciones (2.1) y (2.2).

El procedimiento más usual para describir los fenómenos no lineales se basa en expresar la polarización  $P(t)$  en términos de la intensidad de un campo eléctrico  $E(t)$ , como se hizo en la

ecuación (2.2). La razón por la cual la polarización juega un rol importante en la descripción de los fenómenos no lineales es debido a que la variación temporal de la polarización puede actuar como la fuente de un nuevo campo eléctrico. Por ejemplo, se mostrará en la siguiente sección que la ecuación de onda no lineal viene dada por:

$$\nabla^2 E - \frac{n_0^2}{c^2} \frac{\partial^2 E}{\partial t^2} = \frac{1}{\epsilon_0 c^2} \frac{\partial^2 P^{NL}}{\partial t^2}, \quad (2.3)$$

donde  $n_0$  es el índice de refracción lineal del material y  $c$  es la velocidad de la luz en el vacío. Esta ecuación se puede interpretar como una ecuación de onda no homogénea en la cual la polarización  $P^{NL}$  se asocia con la respuesta no lineal inducida por el campo eléctrico. Debido a que  $\partial^2 P^{NL}/\partial t^2$  es una medida de la aceleración de las cargas que constituyen el medio, esta ecuación es consistente con el teorema de Larmor's del electromagnetismo el cual establece que una carga acelerada genera radiación electromagnética.

Como en esta investigación se busca estudiar, entre otras cosas, la absorción de dos fotones, la cual es un fenómeno no lineal de tercer orden, el término  $P^{NL}$  se escribirá como:

$$P^{NL} = \epsilon_0 \chi^{(3)} E^3(t). \quad (2.4)$$

Otros fenómenos de tercer orden, que no serán objeto de estudio en esta investigación, pero también de gran importancia desde el punto de vista tecnológico [34], son: la generación de tercer armónico, efecto óptico Kerr, conjugación de fase óptica, mezcla de cuatro ondas degeneradas y no degeneradas entre otros. Un hecho importante es que estos fenómenos, a diferencia de los de segundo orden, pueden ser observados en cualquier tipo de material, ya sea centro-simétrico o no centro-simétrico.

## 2.2. Ecuación de onda en medios ópticos no lineales

Para estudiar la ecuación de onda en medios no lineales, se debe comenzar con las ecuaciones de Maxwell. Estas ecuaciones escritas en el sistema internacional de unidades se expresan como:

$$\nabla \cdot \mathbf{D} = \rho, \quad (2.5)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{B} = 0, \quad (2.6)$$

$$\nabla \times \mathbf{E} = -\frac{\partial \mathbf{B}}{\partial t}, \quad (2.7)$$

$$\nabla \times \mathbf{H} = \frac{\partial \mathbf{D}}{\partial t} + \mathbf{J}, \quad (2.8)$$

donde  $\rho$  y  $\mathbf{J}$  son la densidad de carga y corriente, respectivamente. Como se está buscando soluciones a estas ecuaciones en regiones libres de carga y corriente, entonces  $\rho = 0$  y  $\mathbf{J} = 0$ .

Tomando el rotacional de la ecuación (2.7) y usando la ecuación (2.5) junto con las relaciones constitutivas  $\mathbf{D} = \epsilon_0 \mathbf{E} + \mathbf{P}$  y  $\mathbf{B} = \mu_0 \mathbf{H}$ , las cuales relacionan las propiedades de la materia a nivel macroscópico con los campos electromagnéticos, se obtiene la ecuación de onda:

$$\nabla^2 \mathbf{E} - \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 \mathbf{E}}{\partial t^2} = \frac{1}{c^2 \epsilon_0} \frac{\partial^2 \mathbf{P}}{\partial t^2}, \quad (2.9)$$

donde  $\epsilon_0$  y  $\mu_0$  son la permitividad eléctrica y la permeabilidad magnética en el vacío, respectivamente, y  $c^2 = 1/\epsilon_0 \mu_0$  corresponde al cuadrado de la velocidad de la luz también en el vacío.

### 2.2.1. Solución de la ecuación de onda con contribución lineal en la polarización

Para el caso de la polarización lineal la ecuación de onda (2.9) se escribe como:

$$\nabla^2 \mathbf{E} - \frac{[1 + \chi^{(1)}]}{c^2} \frac{\partial^2 \mathbf{E}}{\partial t^2} = 0. \quad (2.10)$$

Para resolver la ecuación (2.10) se propone como solución una onda plana monocromática de frecuencia  $\omega$  de la forma

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{E}(\mathbf{r}, \omega) e^{-i\omega t} + c.c. \quad (2.11)$$

sustituyendo (2.11) en (2.10) se obtiene la ecuación de Helmholtz:

$$\nabla^2 E(\mathbf{r}, \omega) + [1 + \chi^{(1)}] \frac{\omega^2}{c^2} E(\mathbf{r}, \omega) = 0, \quad (2.12)$$

cuya solución viene dada por

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}, \omega) = \mathbf{E}_0 e^{i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}}, \quad (2.13)$$

donde  $\mathbf{E}_0$  es una constante vectorial y  $\mathbf{k}$  corresponde al vector de onda e indica la dirección de propagación de la onda. La magnitud del vector de onda viene dada por:

$$k^2 = [1 + \chi^{(1)}] \frac{\omega^2}{c^2}. \quad (2.14)$$

La ecuación (2.14) es la relación de dispersión. El término  $\sqrt{1 + \chi^{(1)}}$  se define como el índice de refracción lineal del material ( $n_0$ ).

$$n_0 = \sqrt{1 + \chi^{(1)}} \quad (2.15)$$

### 2.2.2. Solución de la ecuación de onda con contribución no lineal cúbica en la polarización

En este caso la polarización total del medio viene dada por  $\mathbf{P} = \mathbf{P}^L + \mathbf{P}^{NL}$ . Entonces la ecuación (2.9) se puede escribir como:

$$\nabla^2 \mathbf{E} - \frac{n_0^2}{c^2} \frac{\partial^2 \mathbf{E}}{\partial t^2} = \frac{1}{\epsilon_0 c^2} \frac{\partial^2 \mathbf{P}^{NL}}{\partial t^2}, \quad (2.16)$$

donde  $n_0$  es el índice de refracción lineal del material definido en (2.15).

Antes de resolver la ecuación (2.16), se estudiarán los efectos que tiene la incidencia del campo eléctrico monocromático sobre la polarización no lineal cúbica. Reescribiendo la solución propuesta en (2.11) de manera escalar y reemplazándola en la ecuación (2.4), se obtiene:

$$P^{NL} = \epsilon_0 \chi^3 [(E^3(\mathbf{r}, w)e^{-i3\omega t} + c.c) + (3E(\mathbf{r}, w)|E(\mathbf{r}, w)|^2 e^{-i\omega t} + c.c)] \quad (2.17)$$

El primer término de la ecuación (2.17) describe la generación del tercer armónico y el segundo término representa los fenómenos dependientes de la intensidad. Debido a que el tema de interés en esta investigación es la observación de un fenómeno dependiente de la intensidad, la contribución no-lineal de la polarización será escrita como

$$P^{NL} = \epsilon_0 \chi^3 (3E(\mathbf{r}, w)|E(\mathbf{r}, w)|^2 e^{-i\omega t}). \quad (2.18)$$

Para dar solución a la ecuación (2.16) se hará un tratamiento similar al de la sección anterior, es decir, se considerará como solución una onda plana y monocromática. Sustituyendo (2.11) en (2.16) se obtiene

$$\nabla^2 E(\mathbf{r}, \omega) + n^2 \frac{\omega^2}{c^2} E(\mathbf{r}, \omega) = -3 \frac{\omega^2}{c^2} \chi^3 |E(\mathbf{r}, w)|^2 E(\mathbf{r}, w) \quad (2.19)$$

Por simplicidad y sin pérdida de generalidad se asumirá que el campo eléctrico viaja sólo en la dirección del eje  $z$  ( $\mathbf{r} \rightarrow \mathbf{z}$ ). Proponiendo una nueva solución de la forma

$$E(z, \omega) = \varepsilon(z) e^{ikz}, \quad (2.20)$$

donde  $k$  corresponde a la magnitud del vector de onda definido en (2.14), la ecuación (2.19) queda

$$\frac{d^2\varepsilon}{dz^2} + 2ik \frac{d\varepsilon}{dz} = -3 \frac{\omega^2}{c^2} \chi^3 |E(z, w)|^2 \varepsilon. \quad (2.21)$$

Utilizando la aproximación de la envolvente de variación lenta (SVEA) que establece que  $|\frac{d^2\varepsilon}{dz^2}| \ll |2ik \frac{d\varepsilon}{dz}|$ , el primer término de la ecuación anterior se desprecia, entonces la ecuación (2.21) se reduce a

$$\frac{d\varepsilon}{dz} = i \frac{3\omega^2}{2c^2k} \chi^3 |E(z, w)|^2 \varepsilon. \quad (2.22)$$

Resolviendo (2.22) para  $\varepsilon(z)$  se obtiene

$$\varepsilon(z) = \varepsilon_0 e^{i \frac{3\omega^2}{2c^2k} \chi^3 |E(z, w)|^2 z}. \quad (2.23)$$

sustituyendo (2.23) en (2.20) se obtiene

$$E(z, \omega) = e^{i \left( k + \frac{3\omega^2}{2c^2k} \chi^3 |E(z, w)|^2 \right) z}, \quad (2.24)$$

que es la solución completa a la ecuación de onda (2.19) para el caso unidimensional.

### 2.2.2.1. Coeficiente de absorción no lineal $\beta$

Reemplazando el valor de  $k$  en la ecuación (2.24) y tomando en cuenta que la intensidad ( $I$ ) de un campo eléctrico está relacionado con el módulo cuadrado del campo eléctrico por medio de la expresión

$$I = 2n_0 \epsilon_0 c |E(z, w)|^2, \quad (2.25)$$

se obtiene

$$E(z, \omega) = e^{i \frac{\omega}{c} \left( n_0 + \frac{3\chi^3}{4cn^2\epsilon_0} I \right) z}. \quad (2.26)$$

Por lo tanto, el índice de refracción total del medio viene representado por

$$\hat{n} = n_0 + \frac{3\chi^3}{4cn^2\epsilon_0} I \equiv n_0 + n_2 I \quad (2.27)$$

donde  $n_2$  se conoce como índice de refracción no lineal del medio.

Se sabe que el índice de refracción posee una parte real y una parte imaginaria, por lo que, podemos escribirlo de la siguiente forma

$$\hat{n} = n + i\kappa \quad (2.28)$$

donde  $n$  es el índice refracción usual y  $\kappa$  es el coeficiente de extinción. Considerando que  $\chi^3 = Re[\chi^3] + iIm[\chi^3]$  y reemplazándolo en (2.27) se obtiene

$$\hat{n} = n_0 + \frac{3Re[\chi^3]}{4cn^2\epsilon_0}I + i\frac{3Im[\chi^3]}{4cn^2\epsilon_0}I. \quad (2.29)$$

Comparando (2.28) con (2.29) se deduce que

$$\kappa = \frac{3Im[\chi^3]}{4cn^2\epsilon_0}I. \quad (2.30)$$

Introduciendo un nuevo parámetro dado por  $\beta = 4\pi\kappa/\lambda$ , y que se define como el coeficiente de absorción no lineal del material, se obtiene

$$\beta = \frac{3\pi Im[\chi^3]}{c n^2\epsilon_0\lambda}. \quad (2.31)$$

$\beta$  también se conoce como el coeficiente de absorción de dos fotones.

### 2.3. Absorción de dos fotones

La absorción de dos fotones fue uno de los primeros fenómenos no lineales en ser observado experimentalmente, poco después de la invención del primer láser. A pesar que Geoppert-Mayer estableció las bases del proceso de absorción simultánea de dos fotones en 1931 [1], no fue hasta 1961 que fue comprobado experimentalmente cuando Kaiser y Garrett observaron fluorescencia azul en un cristal  $CaF_2 : Eu^{2+}$  excitando a  $643nm$  con un láser pulsado de ruby [2].

La absorción de dos fotones es un proceso por el cual un sistema (por ejemplo una molécula)



absorbe simultáneamente dos fotones de igual o diferente energía (Figura 2.2). En este proceso el primer fotón promueve una transición del estado base ( $E_0$ ) a un estado virtual ( $E_v$ ) de mayor energía. Este estado no es un estado real y sólo existe en un corto periodo de tiempo que va desde los  $10^{-15}$  a  $10^{-16}$ s [35] para fotones con energías entre el visible e infrarrojo cercano. Si durante ese pequeño intervalo de tiempo otro fotón interactúa con la molécula, el estado excitado puede ser alcanzado ( $E_1$ ). Es importante señalar que una condición necesaria, pero no suficiente, para que ocurra este proceso, es que la suma de las energías de ambos fotones sea resonante con algún nivel energético del sistema. Reglas de selección de simetría también tienen que ser cumplidas para que se permita el proceso TPA. Estas reglas de selección se han obtenido y descrito dentro de la aproximación dipolar en muchas contribuciones en el pasado [36, 37]

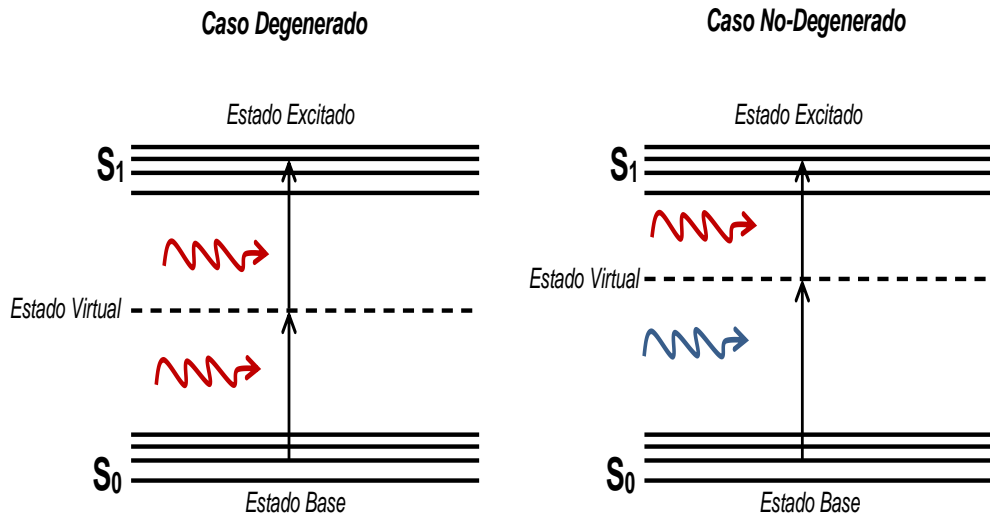


Figura 2.2: Diagrama esquemático que muestra la absorción de dos fotones. Los fotones involucrados en el proceso pueden tener la misma energía (caso degenerado) o diferente energía (caso no degenerado)

### 2.3.1. Atenuación de luz inducida por absorción de dos fotones

La atenuación de un haz al pasar por un medio óptico con propagación en la dirección  $z$  y que posee absorción multifotón puede ser escrito de la siguiente forma:

$$\frac{dI(z)}{dz} = -\alpha(\lambda)I(z) - \beta(\lambda)I^2(z) - \gamma(\lambda)I^3(z)\dots, \quad (2.32)$$

donde la  $I(z)$  es la intensidad del haz incidente y  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  son los coeficientes de absorción de uno, dos y tres fotones del medio, respectivamente. Como sólo estamos interesados en el proceso de absorción de dos fotones, la ecuación (2.32) se escribe como

$$\frac{dI}{dz} = -\beta(\lambda)I^2(z). \quad (2.33)$$

El significado físico de esta expresión es que la probabilidad de absorción de dos fotones, en una posición dada, es proporcional al cuadrado de la intensidad local de luz. La solución de la ecuación (2.33) viene dada por:

$$I(z) = \frac{I_0}{1 + I_0\beta(\lambda)z} \quad (2.34)$$

donde  $I_0$  es la intensidad incidente y  $z$  corresponde a la distancia recorrida por el haz dentro del medio. De la ecuación (2.34) se aprecia que para intensidades altas ( $I_0 \gg 1$ ), la intensidad dentro del medio decae como  $1/\beta z$ . De la definición de transmisión,  $T = I(z)/I_0$ , se puede observar que para un material con absorción de dos fotones, es decir, despreciando la absorción lineal, la transmisión depende de la intensidad del haz incidente, como se muestra en la ecuación (2.35)

$$T = \frac{I(z)}{I_0} = \frac{1}{1 + I_0\beta(\lambda)z}. \quad (2.35)$$

Es importante señalar que  $\beta$  es un parámetro macroscópico (cantidad extensiva), pues depende de la cantidad de moléculas absorbentes de dos fotones que se encuentran en la muestra. Su unidad de medida es  $cm/GW$ .

### 2.3.2. Sección transversal de absorción de dos fotones $\sigma_{TPA}$

La sección transversal de dos fotones  $\sigma_{TPA}$  se introduce como un parámetro intensivo para cuantificar la absorción de dos fotones por molécula. Se define como

$$\sigma_{TPA}(\lambda) = \frac{\beta(\lambda)\hbar\omega}{N}, \quad (2.36)$$

donde  $N$  es la densidad de moléculas (número de moléculas por unidad de volumen) y  $\hbar\omega$  es la energía del fotón del haz incidente. De acuerdo a la definición de  $\sigma_{TPA}$  sus unidades de medida son [ $cm^4 s \text{ moléculas}^{-1} \text{ foton}^{-1}$ ]. Existen casos en los cuales la unidad mínima de repetición no es molecular como, por ejemplo, compuestos formados por nanocristales (PCs). En estos casos, la definición de  $N$  cambia por densidad de nanopartículas haciendo que la unidad de medida de  $\sigma_{TPA}$  se modifique a [ $cm^4 s \text{ partículas}^{-1} \text{ fotón}^{-1}$ ]. Como las variables: moléculas, partículas y fotón son adimensionales se acostumbra a usar sólo [ $cm^4 s$ ] para medir  $\sigma_{TPA}$ . En la práctica la mayoría de las medidas de  $\sigma_{TPA}$  están en el rango de  $10^{-51}$  a  $10^{-46} cm^4 s$ , por lo que algunos investigadores prefieren usar [GM],

$$1GM = 10^{-50} cm^4 s. \quad (2.37)$$

### 2.3.3. Técnicas usadas para medir absorción de dos fotones

A través de los años, diferentes técnicas han sido usadas para determinar el espectro de absorción de dos fotones y medir la sección transversal de dos fotones. Las técnicas más utilizadas, hasta la fecha, se pueden clasificar como métodos directos, en los que se controla la atenuación del haz de excitación, y métodos indirectos, en los que efectos secundarios del proceso de TPA, tales como la fluorescencia inducida o cambios de temperatura, son medidos. En esta sección describiremos dos de los métodos más utilizados en la literatura: Z-scan y fluorescencia inducida por dos fotones (TPEF)

### 2.3.3.1. Z-scan

Esta técnica consiste en el control de la transmitancia de la muestra bajo prueba como función de la intensidad incidente del haz láser. Los cambios en la intensidad incidente se consiguen moviendo la posición  $z$  de la muestra (de ahí el término "Z-scan") a lo largo de un haz gaussiano enfocado de la lente. La transmitancia normalizada para un pulso con perfil temporal gaussiano y considerando sólo absorción no lineal de dos fotones, viene dada por [38]:

$$T(z) = \frac{1}{\sqrt{\pi}q_0(z)} \int_{-\infty}^{+\infty} [\ln(1 + q_0(z, 0)e^{-\tau^2})] d\tau \quad (2.38)$$

con

$$q_0(z) = \beta I_0 L \left( 1 + \frac{z^2}{z_0^2} \right)^{-1}, \quad (2.39)$$

donde  $L$  es la longitud de la muestra,  $z_0$  es la longitud de Rayleigh,  $z$  es la posición de la muestra y  $I_0$  es la intensidad del haz láser en el foco ( $z = 0$ ). Para  $|q_0| < 1$  la transmitancia puede ser expresada en término de la intensidad y la posición relativa de la muestra respecto a la cintura del haz gaussiano enfocado, esto es:

$$T(z) = \sum_{m=0}^{\infty} \frac{(-q_0(z))^m}{(m+1)^{3/2}} \quad (2.40)$$

Considerando sólo los dos primeros términos de la ecuación (2.40), la transmitancia finalmente viene dada por:

$$T(z) \approx 1 - \frac{1}{2^{3/2}} \sigma_{TPA} \frac{N}{\hbar\omega} \frac{I_0 L}{\left(1 + \frac{z^2}{z_0^2}\right)}. \quad (2.41)$$

Por lo tanto, ajustando los datos experimentales de la transmitancia, a la expresión (2.41) se obtiene el valor de  $\sigma_{TPA}$ . Usando láser de femtosegundos o picosegundos se puede determinar  $\sigma_{TPA}$  en forma directa, no así con láseres de nanosegundos, ya que, otros efectos, distintos a TPA, como reabsorción de estados excitados o efectos térmicos, podrían estar presentes.

### 2.3.3.2. TPEF

Este método consiste en medir la señal de fluorescencia generada por el material estudiado después de ser excitado por la absorción de dos fotones. Algunas variantes de este experimento han sido desarrolladas desde que fue reportado, por primera vez en 1996 [10]; sin embargo, el enfoque más sencillo se basa en medir la intensidad de fluorescencia inducida por TPA y compararla con la fluorescencia de una muestra de referencia estándar. Nikolay S. et al [39] reportan secciones transversales de absorción de dos fotones de diversos colorantes orgánicos comerciales para usar como referencia. Asumiendo conocida la concentración  $C_{ref}$ , la sección transversal de dos fotones  $\sigma_{ref}(\lambda)$  y la eficiencia cuántica  $\eta_{ref}$  de la muestra de referencia, la intensidad de fluorescencia inducida por dos fotones para la referencia se puede expresar simplemente como:

$$I_{ref}(\lambda) = \Gamma C_{ref} \sigma_{ref}(\lambda) \eta_{ref}. \quad (2.42)$$

Donde  $\Gamma$  es el coeficiente de proporcionalidad fenomenológico que depende de factores experimentales e instrumentales. Si bajo las mismas condiciones experimentales e instrumentales se mide la muestra, la intensidad puede ser expresada como:

$$I_m(\lambda) = \Gamma C_m \sigma_m(\lambda) \eta_m. \quad (2.43)$$

Comparando las ecuaciones (2.42) y (2.43) y despejando  $\sigma_m$  se obtiene:

$$\sigma_m(\lambda) = \sigma_{ref}(\lambda) \frac{I_m(\lambda) C_{ref} \eta_{ref}}{I_{ref}(\lambda) C_m \eta_m}. \quad (2.44)$$

De la ecuación (2.44) podemos notar que una de las ventajas de este método es que se cancelan todos los factores que dependen del arreglo experimental e instrumental. Por ejemplo, no es necesario conocer los parámetros referente a la excitación (duración, intensidad y frecuencia del pulso). El principal inconveniente de TPEF es que no puede ser usado en materiales no fluorescentes o débilmente fluorescentes. Este método también es difícil de aplicarse en compuestos que exhiben emisión dependiente de la longitud de onda o emisión dual, como también en muestras que se encuentren en estado sólido (películas delgadas). En tales casos se recomienda el uso de Z-scan.

# Capítulo 3

## Microscopía de Fluorescencia por Escaneo: Confocal y Dos Fotones

La obtención de bio-imágenes, utilizando métodos ópticos, constituye una importante contribución a la biofotónica. Lo anterior debido a que éstas pueden ser utilizadas para estudiar una amplia gama de muestras biológicas, desde células en tejidos muertos hasta la obtención de imágenes de objetos vivos en tiempo real. Dentro de los métodos para la obtención de bio-imágenes, la microscopía por fluorescencia ha emergido como una de las mayores técnicas, debido a sus múltiples ventajas respecto a la microscopía convencional. Es por esto que en este capítulo se iniciará describiendo los principios básicos y las características generales de la microscopía de fluorescencia para, posteriormente, abordar los dos temas que son objetivos de esta investigación: la microscopía de fluorescencia confocal y de dos fotones

### 3.1. Microscopía de Fluorescencia por Escaneo

#### 3.1.1. Fluorescencia

El término fluorescencia se relaciona con la capacidad de ciertos materiales de emitir luz al ser excitados con radiación electromagnética a una determinada longitud de onda. Estos materiales absorben la energía proveniente de la radiación  $E = hc/\lambda$  (donde,  $\lambda$  es la longitud de onda,  $h$  es la constante de Planck y  $c$  la velocidad de la luz) y son llevados a un estado electrónico excitado que, luego de un tiempo  $\tau$ , aproximadamente  $10^{-9}s$ , vuelven al estado fundamental (no excitado) liberando su exceso de energía en forma de fotones. La energía requerida para producir

fluorescencia es aquella necesaria para provocar una transición electrónica del estado base a un estado electrónico de mayor energía.

Una vez que el material ha absorbido un fotón, puede relajarse a un estado de menor energía mediante fenómenos radiativos (fluorescencia o fosforescencia) y no radiativos. Por ejemplo, como se puede ver en la Figura 3.1, la relajación al nivel vibracional más bajo, dentro de un nivel electrónico excitado, no está asociada con la emisión de fotones, sino de calor, mientras que si ya alcanzó el nivel vibracional más bajo del estado excitado, la relajación al estado base puede conseguirse con la liberación de un fotón. Por esta razón, la energía total emitida en forma de luz es siempre menor a la energía total absorbida (desplazamiento de Stokes ) y la diferencia entre ambas corresponde al calor liberado en el proceso no radiativo. En la mayoría de los casos la longitud de onda emitida es mayor y, por lo tanto, de menor energía que la absorbida, sin embargo, si la radiación de excitación es intensa, es posible para el material absorber dos fotones; En este caso la longitud de onda emitida es más corta que la absorbida, pese a esto, en ambos casos la energía total emitida es menor que la energía total absorbida.

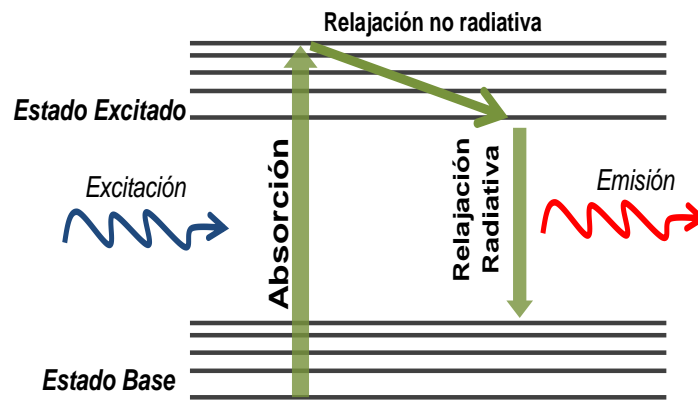


Figura 3.1: Diagrama de energía que describe el proceso de absorción y emisión de un fotón en el fenómeno de fluorescencia.

### 3.1.2. Características de la Microscopía de Fluorescencia

La microscopía de fluorescencia ha emergido como la mayor técnica de bioimágenes en las ciencias biológicas, debido a que tiene la ventaja de proporcionar un relación señal- ruido

muy alta, lo que permite distinguir la distribución espacial de especies incluso en concentraciones bajas. Esta microscopía hace uso de la fluorescencia que posee algunas moléculas en forma natural (autofluorescencia) o la fluorescencia de nanomarcadores artificiales (también llamados fluoróforos) que se introducen en la muestra (células o tejidos) y cuya disposición se hará evidente luego de ser excitadas.

Los microscopios de fluorescencia utilizados hoy en día para la formación de bio-imágenes siguen el diseño básico de “excitación epifluorescente” que consta básicamente de una lente objetivo, filtros y un divisor de haz. La muestra se ilumina con la luz láser de excitación y, a través de la misma lente objetivo, se recoge la señal de fluorescencia para la imagen. Un divisor de haz, que transmite o refleja la luz en función de su longitud de onda, se utiliza para separar la luz de excitación de la luz de fluorescencia. En la disposición, que se muestra en la Figura 3.2, la luz de excitación de menor longitud de onda se refleja, mientras que la luz emitida de mayor longitud de onda es transmitida por el divisor.

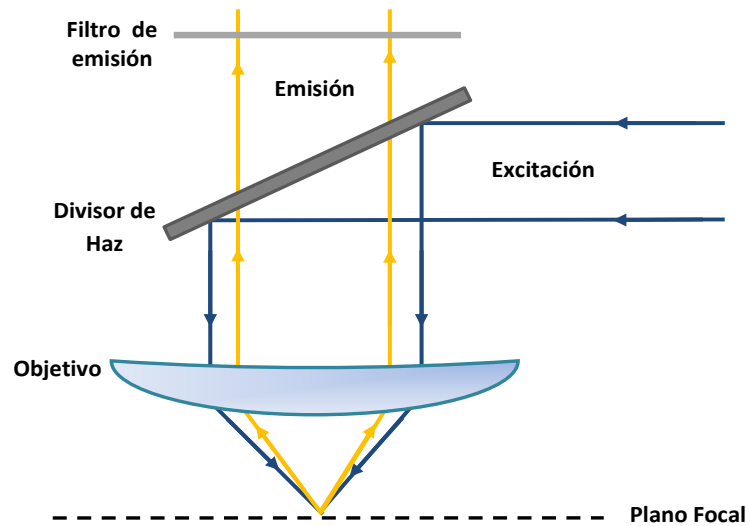


Figura 3.2: Principales componentes de un microscopio de epifluorescencia para la formación de imágenes



## 3.2. Microscopía Confocal

La mayor limitancia en la microscopía de fluorescencia convencional (no confocal) es que todos los puntos, arriba y abajo de la región de enfoque, contribuyen a la formación de la imagen. Como consecuencia, la contribución fuera de foco se mostrará borrosa, resultando una disminución en la calidad y en la resolución axial de la imagen. En el pasado, la solución a este problema era cortar finamente la muestra antes de ser estudiada; sin embargo, con este método se perdía la información tridimensional durante el corte. Con el microscopio confocal estas limitaciones han sido superadas, ya que permite la eliminación o reducción de la información fuera del plano focal y la capacidad de controlar la profundidad de campo, lo que implica imágenes con menos ruido y de alto contraste. Además, tiene la capacidad de realizar cortes ópticos finos en muestras de tejidos más o menos gruesas y realizar reconstrucciones en tres dimensiones a partir de cortes seriados.

El microscopio Confocal fue inventado en el año 1955 por el científico estadounidense Marvin Minsky al estudiar neuronas. El mecanismo es similar al de un microscopio de fluorescencia convencional, pero utiliza técnicas de filtrado espacial para eliminar la fluorescencia o el esparcimiento de la luz de regiones sobre o bajo el plano focal. El principio confocal en un microscopio de epi-fluorescencia de escaneo láser está representado esquemáticamente en la Figura 3.3. La luz de excitación es reflejada por el divisor de haz y llega a la muestra a través de la lente objetivo. La fluorescencia producida por la muestra es colectada por la lente y dirigida hacia el detector, esta vez atravesando el divisor de haz. Un diafragma (pinhole) colocado frente al detector y deja pasar sólo la luz proveniente del plano focal. La fluorescencia fuera de foco, de las zonas que están por encima y por debajo del plano de enfoque, no pasa por el diafragma y, por lo tanto, no contribuirá en la formación de la imagen. Con el fin de adquirir una sección óptica de la muestra, es que se hace un barrido del haz enfocado, en donde se escanea la muestra rápidamente en un patrón de barrido X-Y (punto a punto en línea y luego línea por línea). Diversos métodos para realizar el barrido pueden ser encontrados en Barry R. Masters [40].

La calidad en la reconstrucción 3-D dependerá estrictamente de la capacidad del sistema de despreciar la luz fuera de foco y, por lo tanto, del tamaño del diafragma. El uso de diafragmas muy

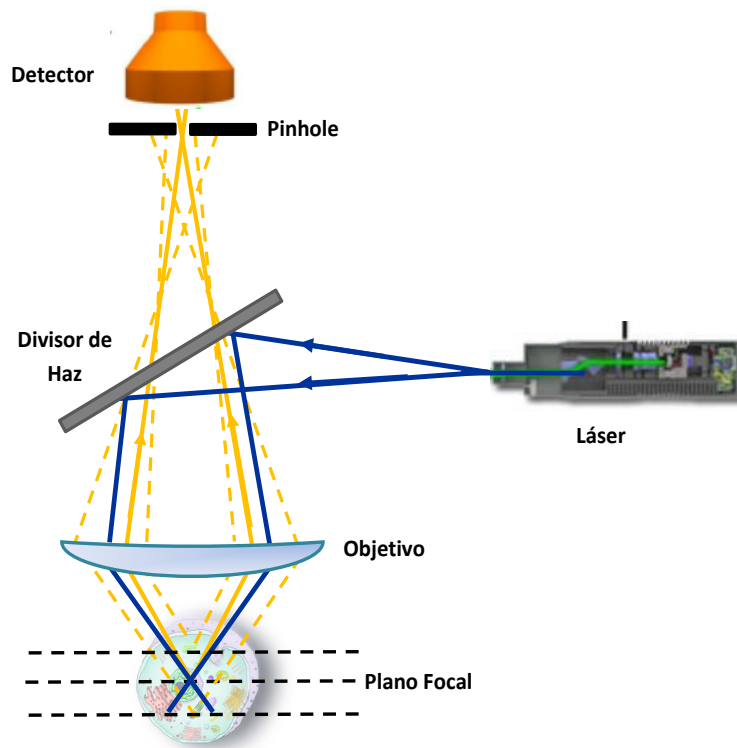


Figura 3.3: Esquema que muestra de manera simplificada el principio de un microscopio confocal y el trayecto de la luz de excitación

pequeños mejora la resolución axial, pero también dará una menor señal de salida. Sin embargo, la resolución axial y el seccionamiento óptico no sólo dependen del tamaño del diafragma, sino que también de las propiedades ópticas de las lentes (apertura numérica), de la longitud de onda de excitación y emisión, de las propiedades de la muestra (índice de refracción) como también de la alineación óptica del instrumento.

A pesar de que la microscopía confocal proporciona una capacidad de seccionamiento óptico de alta resolución, tiene algunos problemas inherentes. Por ejemplo, debido a que la abertura confocal reduce el nivel de la señal de fluorescencia, se necesita una mayor potencia de excitación, aumentando la posibilidad de fotoblanqueamiento. Además, en la microscopía confocal, la excitación para producir fluorescencia es lineal, lo que implica que la fluorescencia se produce a lo largo de un cono de luz de excitación, como se muestra en la Figura 3.4 a, aumentando

así la probabilidad de fotoblanqueamiento en un área grande. Otro problema es la mayoría de los fluoróforos utilizados para bio-imagen se excitan con luz en el rango visible. En estas longitudes de onda, la luz es altamente atenuada en un tejido, lo que limita el acceso de profundidad. Algunos de estos problemas pueden ser superados con el uso de la excitación multifotónica, en particular de dos fotones (también mostrado en la Figura 3.4), que se describirá en la siguiente sección.

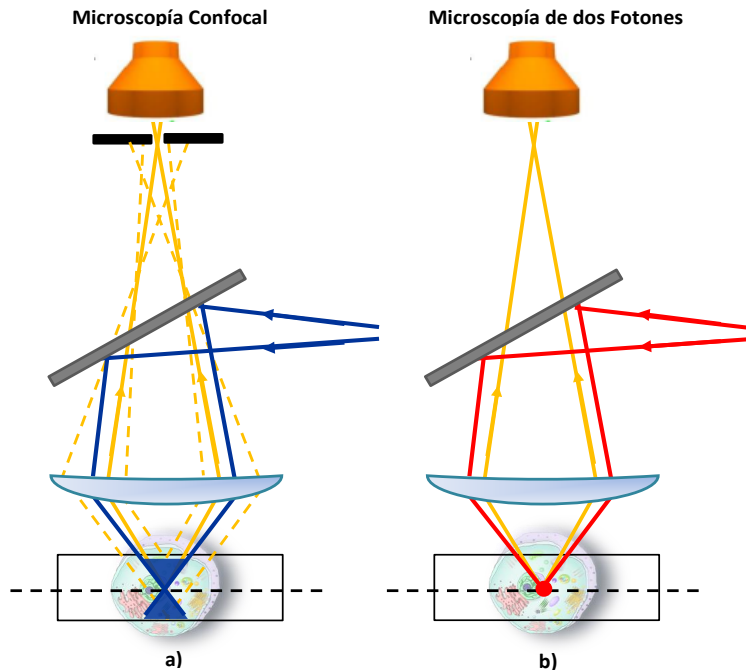


Figura 3.4: Diagrama esquemático que compara las zonas de posible fotoblanqueamiento para a) microscopía confocal y b) microscopía de dos fotones

### 3.3. Microscopía Multifotónica

En la microscopía multifotónica cada marcador es excitado simultáneamente por la absorción de múltiples fotones de baja energía para producir la fluorescencia. Tanto la absorción de dos como de tres fotones ha sido utilizada por la microscopía de fluorescencia multifotónica [41–43]; sin embargo, sólo la microscopía de dos fotones ha emergido como la técnica para la

formación de bio-imágenes, ya que, la absorción de tres fotones requiere de energías picos muy altas por parte de la fuente de excitación.

La microscopía de dos fotones utiliza el principio físico de excitación por dos fotones, el cual señala que la probabilidad de absorción simultánea de dos fotones es proporcional al cuadrado de la intensidad (ecuación 2.33), por lo que, sólo un pequeño volumen de la muestra localizada en el punto focal, donde la intensidad es mayor, contribuirá a la formación de la bio-imagen (Figura 3.4 b). Como la muestra fuera de foco que se encuentra sobre y abajo del plano focal, no contribuirá con fluorescencia, no es necesario la presencia de diafragmas, como en el caso de la microscopía confocal. Por lo tanto, la microscopía de dos fotones proporciona una capacidad de seccionamiento óptico y resolución axial inherente sin el uso de diafragmas. Además, reduce en gran medida el fotoblanqueamiento porque sólo la región enfocada es excitada.

Debido a las características del proceso de absorción no lineal, la microscopía de dos fotones utiliza láseres pulsados ultra cortos (picosegundos o femtosegundos) como fuentes de excitación, debido a las grandes amplitudes de campo en los pulsos, que se traduce en altas intensidades pico. Además, la luz de excitación se encuentra en el rango del rojo e infrarrojo cercano, puesto que la absorción lineal se presenta, generalmente en la región del UV. Usar este rango de longitudes de onda proporciona ciertas ventajas sobre la microscopía confocal como por ejemplo, un mayor poder de penetración en el tejido bajo estudio. En la Figura 3.5 se esquematiza como la radiación infrarroja (IR) puede penetrar mucho más la piel comparada con la radiación UV, debido principalmente, a la menor dispersión y absorción de esta radiación. Otra ventaja es que la radiación IR permite una menor degradación de la muestra, ya que las longitudes de onda larga son menos dañinas que las cortas, lo que permite un mayor tiempo de exposición y de escaneos sobre la muestra para obtener una mejor reconstrucción 3D.

Al comparar la microscopía de dos fotones con la de un fotón sobre la misma muestra, la microscopía de dos fotones teóricamente debería producir una peor resolución, ya que utiliza longitudes de onda significativamente más largas. Sin embargo, existen otros factores, tales como la fluorescencia fuera de foco en la microscopía confocal que pueden entrar en juego y afectar considerablemente la resolución. En general, el poder de la microscopía de dos fotones no reside en la mejora de la resolución, sino en todas las ventajas descritas anteriormente.

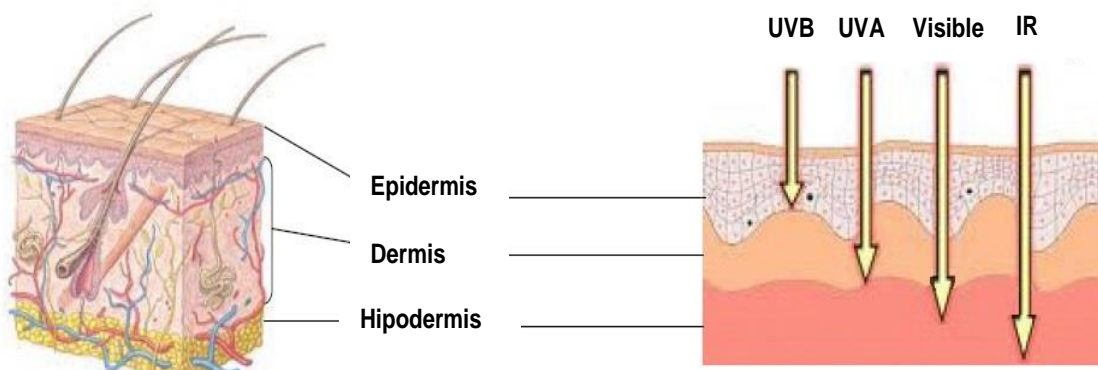


Figura 3.5: Esquema que representa el grado de profundidad que alcanza la radiación UV, visible e IR en la piel

# Capítulo 4

## Marcadores Fluorescentes usados como agentes de contraste

### 4.1. Puntos Cuánticos

Los puntos cuánticos son nanocristales de semiconductores que muestran efectos de confinamiento cuántico, una vez que sus dimensiones se hacen más pequeñas que el radio del excitón de Bohr (este radio depende de cada material, pero es menor a 10 nm para la mayoría de los semiconductores [44]), obligando a los electrones a mantenerse confinados en las tres dimensiones espaciales. Cuando el semiconductor se encuentra bajo los efectos del confinamiento cuántico las bandas de valencia (última banda energética llena de electrones) y de conducción (primera banda energética vacía) se discretizan y la banda prohibida (band gap) aumenta al disminuir el tamaño de la partícula (Ver Figura 4.1). Por lo tanto, las propiedades ópticas de los PCs están

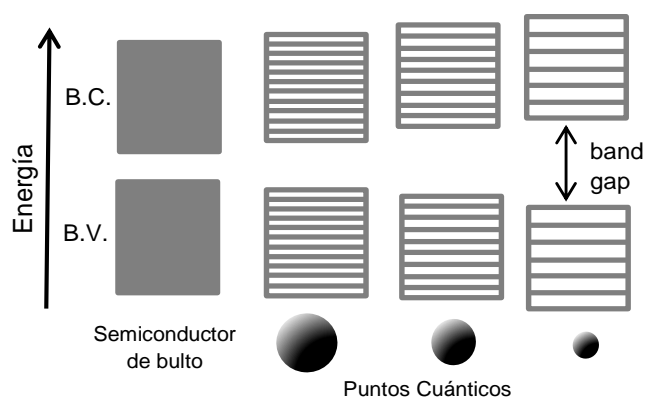


Figura 4.1: Aumento de la banda prohibida a medida que se reduce el tamaño de los PCs. B.C: banda de conducción, B.V: banda de valencia

intimamente relacionadas, tanto con la composición de los mismos como con su tamaño [45,46]. De las Figuras 4.3 y 4.2 se aprecia como el primer pico de absorción excitónica y el pico de emisión se van corriendo hacia el rojo a medida que el tamaño de los PCs va aumentando.

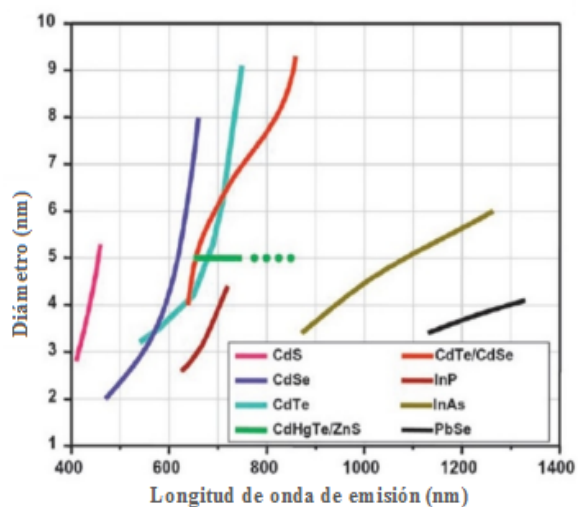


Figura 4.2: Relación entre el diámetro y el pico de emisión de los PCs para diferentes composiciones [45]

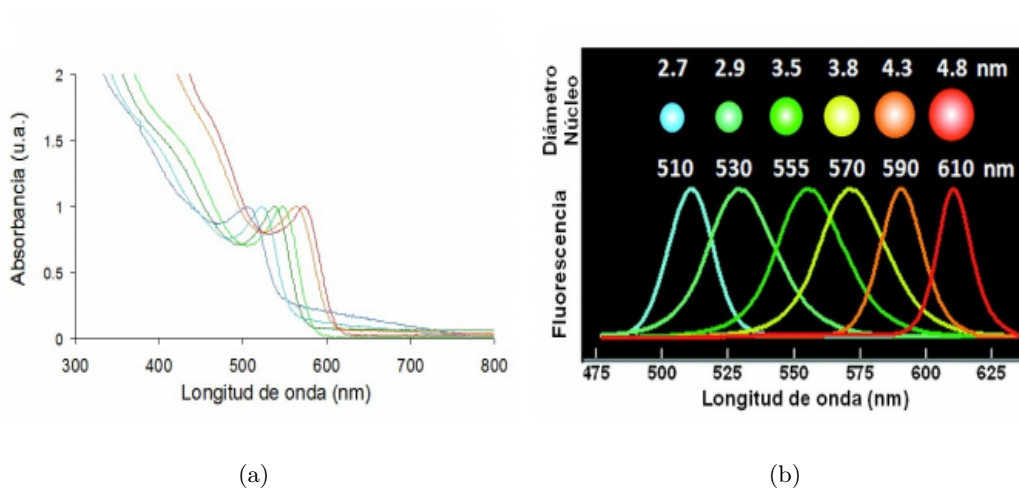


Figura 4.3: Espectros de absorción (a) y de emisión (b) para PCs de CdSe/ZnS (núcleo/recubrimiento) con diferentes tamaños [46]

#### 4.1.1. Composición y Estructura de los PCs

Los PCs más comunes están compuestos por semiconductores binarios formados por los elementos de los grupos 12-16 (CdTe, CdSe, ZnS), 14-16 (PbS, PbSe) y 13-15 (InP, InAs). También hay PCs por combinación ternaria de elementos, como por ejemplo CdZnS, CdSSe y CdTeSe. La mayoría de estas estructuras cristalizan como estructura cúbica tipo Blenda o hexagonal tipo wurtzita, y aunque menos común cúbica tipo halita, pero también se pueden dar situaciones intermedias [47].

Una de las tendencias más empleadas en la actualidad, con el fin de aumentar las propiedades ópticas de los PCs (absorción, emisión, eficiencia cuántica, estabilidad), es trabajar con PCs con estructura tipo núcleo/recubrimiento (core/shell), como por ejemplo, CdSe/ZnS, CdSe/CdS y InP/ZnS. Esta estrategia consiste en generar una capa de un material semiconductor (diferente al material del núcleo) alrededor de la superficie del nanocrystal. El band gap del material del semiconductor del recubrimiento es diferente del correspondiente valor del semiconductor del núcleo. Así, dependiendo del band gap y de la posición relativa de los niveles de energía de los semiconductores involucrados, el recubrimiento puede cumplir diferentes funciones [48]. Por ejemplo, si el salto de banda es mayor en el recubrimiento que en el núcleo, por ejemplo en CdSe/ZnS, el excitón se quedará confinado en el núcleo favoreciendo la emisión luminiscente del PC. Ahora, si el salto de banda es mayor en el núcleo, por ejemplo en CdS/CdSe, los excitones estarán parcial o completamente confinados en el recubrimiento. De esta forma se puede modular la emisión del PC variando el espesor del recubrimiento. Cabe señalar que un parámetro importante para trabajar con PCs tipo núcleo/recubrimiento, es que ambos semiconductores deben cristalizar en la misma fase cristalina y presentar así una continuidad en su estructura cristalográfica que asegure una disminución de los defectos en la interfase o en el recubrimiento.

#### 4.1.2. Propiedades Ópticas y Aplicaciones de los PCs

Los puntos cuánticos han sido ampliamente estudiados debido a que el efecto de confinamiento cuántico permite un ajuste muy fino de sus propiedades ópticas [49]. Entre sus



propiedades destacan, la simétrica y sintonizable banda de fluorescencia, la amplia e intensa absorción óptica y la excelente fotoestabilidad. Debido a estas propiedades únicas, los puntos cuánticos se han utilizado en varias aplicaciones, tales como: emisores de luz [22], celdas solares [23] y fotovoltaicas [24], dispositivos fotónicos [25] y marcadores biológicos altamente fluorescentes en microscopía [50].

Otras de las propiedades destacables de los PCs son sus propiedades no lineales, en particular la absorción de dos fotones. En la literatura se reportan valores muy altos de  $\sigma_{TPA}$  que van desde los  $10^3$  a  $10^5$ GM por partícula. Para enfatizar este hecho la Tabla 4.1 muestra el valor de la  $\sigma_{TPA}$  para diferentes puntos cuánticos con y sin recubrimiento, así como también la técnica utilizada para su medición. Como estos valores de  $\sigma_{TPA}$  superan ampliamente a los valores de  $\sigma_{TPA}$  de los colorantes comerciales, los PCs también han sido investigados y aplicados con éxito como agentes de contraste en microscopía de fluorescencia de dos fotones [26, 27, 51]

Tabla 4.1:  $\sigma_{TPA}$  por partícula para diversos puntos cuánticos.

	Técnica	$\lambda_{exc}$ [nm]	$\sigma_{TPA}$ [GM]	Referencia
ZnS	Z-scan	490	$\sim 10^2$	[14]
CdTe	Z-scan	725	$\sim 10^4$	[52]
CdTe	Z-scan	803	$1.7 \times 10^4$	[53]
CdSe	TPEF	800	$1.03 \times 10^4$	[54]
CdTe	TPEF	840	$7.9 \times 10^3$	[54]
ZnSe	Z-scan	806	$1.2 \times 10^4$	[55]
ZnSe/ZnS	Z-scan	806	$1.4 \times 10^4$	[55]
InP/ZnS	Z-scan-TPEF	880-850	$2.2 \times 10^3 - 1.3 \times 10^3$	[56]
CdSe/ZnS	—	700	$4.7 \times 10^4$ *	[26]
CdSe/ZnS	TPEF	800	$4.1 \times 10^6$	[27]
CdSeS/ZnS	TPEF	800	$6.2 \times 10^6$ *	[51]

\*Sección transversal de acción de dos fotones  $\sigma_{TPA}^*$  ( $\sigma_{TPA}^* = \sigma_{TPA} \cdot \eta$ )

#### 4.1.2.1. Puntos Cuánticos como marcadores fluorescentes biológicos

El estudio de los PCs en aplicaciones biológicas fue reportado por primera vez en dos estudios publicados en 1998: Bruchez et al [57] y Chan y Nie [58]. Los primeros usaron PCs de CdSe/ZnS (core/shell) combinados con una tercera capa de sílice para hacerlos dispersables en agua. Para demostrar la utilidad de estas nanopartículas en la tinción celular obtuvieron micrografías de células de fibroblastos 3T3 de ratón mediante microscopía confocal. Por otra parte Chan y Nie usaron ácido mercaptoacético para la solubilización en agua y para poder acoplar los PCs a biomoléculas (tales como proteínas, péptidos y ácidos nucleicos) mediante un enlace amida. Ellos, por su parte, usaron células cancerosas tipo Hela y un microscopio epi-fluorescente. Ambos trabajos constituyen un hito en el desarrollo y empleo de PCs para aplicaciones biomédicas, ya que, describen por primera vez la posibilidad de sintetizar PCs biocompatibles y con la posibilidad de bioconjugación. El uso de los PCs en microscopía de dos fotones comenzó 4 años más tarde con el trabajo de Larson et al [26]. Ellos también utilizaron PCs de CdSe/ZnS, pero los recubrieron con un polímero anfífilo para hacerlos dispersables en agua. El valor de  $\sigma_{TPA}^*$  fue del orden de  $10^4$  GM permitiéndoles visualizar los PCs en forma dinámica, a través de la piel de ratones vivos a cientos de micrómetros de profundidad.

Al igual que muchos fluoróforos comerciales, los PCs no son los marcadores ideales para todas las aplicaciones biológicas. Sin embargo, combinan una serie de características muy atractivas, que en algunos casos pueden abrir nuevos horizontes en aplicaciones relacionadas con la obtención de imágenes biológicas. Por ejemplo, la excelente fotoestabilidad constituye una de las ventajas más importantes de los PCs sobre los fluoróforos o marcadores orgánicos, ya que, permite un seguimiento del tejido o célula bajo estudio por periodos de tiempos prolongados. Además, como exhiben un alto brillo debido a un coeficiente de absorción grande combinado con una alta eficiencia cuántica de fluorescencia, es posible marcar y obtener imágenes no sólo en muestras delgadas. Debido a su banda de absorción ancha los PCs pueden ser excitados con una longitud de onda muy lejana a la longitud de onda de emisión evitando el uso de filtros para la eliminación de la luz de excitación y mejorando la razón señal ruido. Finalmente, otra de las ventajas es que eligiendo el tamaño o el tipo de material de los PCs se puede ajustar la emisión a regiones cercanas al infrarojo cercano. Esto último es de particular interés debido a la

reducción de la autofluorescencia y a la mayor transparencia del tejido a esas longitudes de onda, resultando imágenes más profundas y de mejor calidad. Varios estudios mediante microscopia confocal y de dos fotones han demostrado que el marcaje de células con PCs ha logrado imágenes bajo iluminación continua con gran resolución, selectividad y precisión [26, 59].

La toxicidad y las posibles interferencias de los PCs con los procesos celulares son temas principales y muy importantes al momento de marcar células vivas o *in vitro*. El crecimiento de recubrimientos de ZnS de alta calidad alrededor de núcleo de PCs tóxicos y el uso de recubrimientos biocompatibles generalmente superan este desafío. Para aplicaciones *in vivo* el recubrimiento no resulta ser suficiente, puesto que la circulación, degradación y acumulación de éstos dentro del organismo, puede también resultar muy dañina. Naturalmente, será necesario un extenso estudio de estos nanomarcadores antes de que puedan ser utilizados en procedimientos médicos.

## 4.2. Nanoagregados Orgánicos

Debido a que los nanoagregados orgánicos están formados por moléculas y/o polímeros orgánicos resulta importante comenzar esta sección con una descripción general de las características y propiedades de estos compuestos.

### 4.2.1. Compuestos Orgánicos

Los compuestos orgánicos son sustancias que contienen principalmente carbono, formando enlaces covalentes carbono-carbono y carbono-hidrógeno. De acuerdo a los tipos de enlaces que se presentan en la molécula, los compuestos orgánicos se pueden clasificar en: saturados e insaturados; los primeros presentan únicamente enlaces simples (covalentes) entre sus átomos constituyentes, mientras que en los segundos puede haber dobles y triples enlaces. Dentro de los compuestos orgánicos para sintetizar nanopartículas fluorescentes, aquellos que contienen sistemas  $\pi$ -conjugados son de gran interés en el campo de la óptica no lineal debido a sus potenciales aplicaciones en la fotónica.

#### 4.2.1.1. Compuesto Orgánicos $\pi$ - conjugados

Un compuesto  $\pi$ -conjugado es aquél en el que los átomos que lo componen están unidos mediante enlaces covalentes simples y dobles alternados (por ejemplo, C=C-C=C-C) (Figura 4.4). En un compuesto conjugado, los electrones no pertenecen a un sólo enlace o átomo, sino a un grupo, y por esta razón los electrones no están localizados sino que exhiben movilidad intramolecular (deslocalización electrónica).

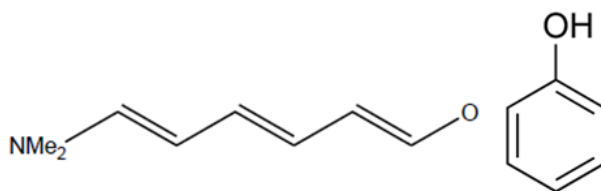


Figura 4.4: Ejemplos de compuestos conjugados.

Una característica de los sistemas conjugados es que absorben radiación, en general, de frecuencias más bajas que los sistemas no conjugados. Además, la banda de absorción de un compuesto orgánico puede modificarse incrementando la longitud de la conjugación  $\pi$  o insertando grupos donadores y aceptores de electrones en el sistema conjugado.

#### 4.2.1.2. Componentes moleculares: donadores, aceptores y puentes $\pi$

Los grupos donadores (D) y aceptores (A) de electrones y un puente polarizable  $\pi$ , son esenciales para que el compuesto molecular tenga grandes propiedades no lineales. Un grupo donador puede proveer electrones adicionales al sistema  $\pi$  conjugado, permitiendo así que el sistema sea fácilmente polarizables a partir de una adecuada combinación donador-aceptor. Mediante grupos específicos donador-aceptor colocados en los extremos de la cadena conjugada se pueden obtener distintas propiedades químicas y ópticas; el número y la combinación apropiada de estas componentes dan como resultado diversos tipo de arquitecturas electrónicas moleculares, tales como: estructuras dipolares (D- $\pi$ -A), estructuras cuadrupolares ( D- $\pi$ -D, A- $\pi$ -A, A- $\pi$ -D- $\pi$ -A, D- $\pi$ -A- $\pi$ -D) o octopolares (A-( $\pi$ -D)<sup>3</sup>, D-( $\pi$ -A)<sup>3</sup> ). La Figura 4.5 muestra la representación de un

sistema conjugado dipolar, cuadrupolar y octopolar.

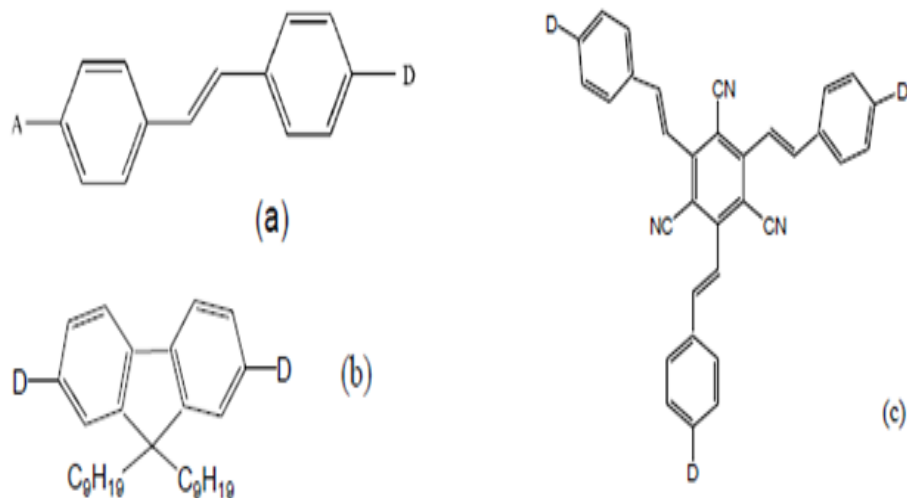


Figura 4.5: Sistema de conjugación  $\pi$ , D representa el grupo donador y A el grupo aceptor. (a) Estructura dipolar, (b) Estructura cuadrupolar y (c) Estructura octopolar.

La adecuada sustitución de los grupos donador-aceptor en los sistemas  $\pi$ -conjugados puede aumentar la actividad TPA, a través de un aumento en el momento dipolar de transición o la diferencia del momento dipolar entre el estado fundamental y el estado excitado. Los experimentos indican que debido a la simetría, las arquitecturas de cuadrupolo en algunos casos son más eficientes que las dipolares. En los sistemas cuadrupolares se han obtenido los mejores resultados para las arquitecturas que contienen grupos D en la periferia y A en el núcleo, debido a que dos grupos donadores favorecen el aumento del momento dipolar en el estado excitado. Para las moléculas que poseen estructuras bidimensionales (Figura 4.5 c) los mejores resultados corresponden a las arquitecturas que contienen un grupo A en el centro y D en una configuración multi-ramificado.

#### 4.2.2. Nanopartículas Orgánicas

Según su arquitectura las nanopartículas orgánicas se pueden clasificar en: nanoagregados, nanoagregados estabilizados con surfactante, nanopartículas cubiertas con polímeros o copolímero

biocompatibles, nanopartículas híbridas y nanocristales. Estas nanopartículas tienen unidades fluorescentes con estructuras anfifílicas que se auto-ensamblan para formar agregados de tipo micelar, que resultan de la interacción intermolecular entre grupos hidrófobos e hidrófilos, respectivamente.

Las propiedades ópticas de las NPs-O derivan de las propiedades ópticas de los compuestos orgánicos que la conforman. Sin embargo, las propiedades ópticas de los compuestos orgánicos no siempre se conservan al momento de formar nanopartículas. Por ejemplo, muchos emisores orgánicos conjugados son altamente emisivos en solución, pero se vuelven débilmente luminiscentes en estado sólido debido al fenómeno conocido como ACQ (aggregation-caused quenching). Por otro lado, existen fluoróforos orgánicos que exhiben el fenómeno opuesto, AIE (aggregation-induced emission), es decir, compuestos que se vuelven altamente fluorescente una vez agregados. En la literatura se sugiere que este fenómeno se debe a que los movimientos intermoleculares de vibración y rotación se restringen en el nanoagregado. Estas nanopartículas ofrecen una prometedora plataforma para aplicaciones biomédicas debido a su buena fotoestabilidad, alta biocompatibilidad y fácil bioconjugación [60].

#### **4.2.2.1. NPs-O en microscopía de fluorescencia multifotónica**

En el área de bio-imágenes, especialmente en la microscopia de fluorescencia confocal y de dos fotones, las nanopartículas orgánicas han emergido como uno de los mejores agentes de contraste debido, principalmente, a que poseen una menor toxicidad, en comparación con marcadores inorgánicos (PCs). Además, porque poseen una alta eficiencia cuántica de fluorescencia, una fácil síntesis, una fuerte resistencia al fotoblanqueamiento y una mayor biocompatibilidad [15].

Debido a las múltiples ventajas que la microscopía de dos fotones ofrece, sobre otros tipos de microscopías de fluorescencia (Capítulo 3), es que diversas investigaciones se han centrado en el desarrollo de marcadores fluorescentes orgánicos biocompatibles con eficiente absorción de dos fotones lo que ayuda a reducir el fotodaño en las muestras biológicas estudiadas, ya que, se requiere de menor energía de excitación para obtener una buena resolución.

Diversas moléculas y polímeros  $\pi$ -conjugados han sido utilizados para la fabricación de nanopartículas. Por ejemplo, McNeill et al [61] fabricaron nanopartículas de una serie de polímeros conjugados hidrófobos por el método de reprecipitación para estudiar las propiedades de fluorescencia excitada por dos fotones y explorar su aplicación en la microscopía multifotón. Las nanopartículas estudiadas obtuvieron tamaños entre 10 y 20 nm y valores de  $\sigma_{TPA}^*$  entre  $10^4 - 10^5$  GM (utilizando concentración molar de partículas), a 770 nm. La aplicación de estas NPs para la microscopía multifotónica se llevó a cabo midiendo la fluorescencia inducida por absorción dos fotones en nanopartículas individuales, inmovilizadas en un cubre objetos de vidrio.

Nanopartículas recubiertas con polímeros biocompatibles o sílice también han sido estudiadas para este tipo de aplicaciones. Un ejemplo de esto, es el trabajo de Peng Liu et al [32]. Este grupo fabricó NPs con DPSB (molécula derivada del estireno) recubiertas con el polímero PSMA (polímero derivado del poliestireno) como matriz de encapsulación para hacerlas dispersables en agua. El máximo valor  $\sigma_{TPA}$  obtenido fue de  $10^3$  GM ( $2,5 \times 10^5$  GM por partícula), a 750 nm. La aplicación de estas NPs como marcadores fluorescentes para microscopía de dos fotones fue demostrada mediante la tinción de la membrana celular de tres tipos de líneas celulares (HeLa, HepG2 y NIH/3T3).

NPs-O basadas en compuestos que presentan emisión inducida por agregación también han sido utilizadas en microscopía de dos fotones. Por ejemplo, nanopartículas de BTPEBT (molécula derivada del benzotriazol) encapsuladas con DSPE-PEG 2000 fueron reportadas para la visualización en tiempo real de vasos sanguíneos mediante fluorescencia de dos fotones [62]. Igualmente, BDSA (molécula derivada del estireno) encapsulado en nanopartículas de sílice modificado (ORMOSIL) se ha utilizado para la formación de imágenes de células cancerosas (Hela) [63]. Los valores de  $\sigma_{TPA}$  de estas NPs, así como también otros trabajos sobre NPs-O en microscopía de fluorescencia de dos fotones son mostrados en la Tabla 4.2. Se debe señalar que a pesar de que existen reportes en los cuales se calcula la actividad de TPA de los agregados orgánicos en función del número de NPs (Tabla 4.2), en la mayoría de los casos y no necesariamente para aplicaciones en microscopía de fluorescencia [64, 65], se sigue calculando  $\sigma_{TPA}$  en términos de concentración molar de moléculas.

Tabla 4.2:  $\sigma_{TPA}$  para diferentes NPs-O.

	Técnica	$\lambda_{exc}$ [nm]	$\sigma_{TPA}$ [GM]	Referencia
BT2	TPEF	750	790	[66]
BdSA	T.N.L	775	217	[63]
BdSA-Bz	TPEF	775	217	[67]
PMC300	TPEF	740	$8.6 \times 10^3$	[31]
PFBT	TPEF	810	$1.8 \times 10^3$	[68]
T1	TPEF	800	$2.2 \times 10^3$	[69]
DPSB	TPEF	750	$10^3/2.5 \times 10^5 \dagger$	[32]
BTPEBT	TPEF	810	$1 \times 10^5 \dagger$	[62]
PPE	TPEF	730	$1.1 \times 10^4 * \dagger$	[70]
PFPV	TPEF	770	$2 \times 10^5 * \dagger$	[61]

\*Sección transversal de acción de dos fotones  $\sigma_{TPA}^*$ .  $\dagger \sigma_{TPA}$  por partícula.



# Capítulo 5

## Desarrollo Experimental

En este capítulo se presenta la metodología experimental utilizada en esta investigación para alcanzar los objetivos propuestos. Para ésto, se comienza describiendo el proceso de preparación de las NPs estudiadas. Posteriormente se describe el procedimiento utilizado para fabricar las microestructuras fluorescentes y el proceso de tinción celular. También se describe el método utilizado para determinar las concentraciones de las muestras en términos de concentración molar de partículas. Se describen los instrumentos usados para la caracterización de la propiedades ópticas lineales (absorción, emisión, eficiencia cuántica y tiempos de vida) así como también el arreglo experimental de la técnica TPEF. Por último, se da una descripción general del microscopio confocal-multifotónico destinado a la obtención de las micrografías celulares.

### 5.1. Preparación de las Muestras

#### 5.1.1. Nanopartículas Inorgánicas: Puntos Cuánticos

A través de la empresa Sigma-Adrich se adquirieron 3 tipos de nanocristales (Puntos Cuánticos):  $CdTe$ ,  $CdSe/ZnS$  y  $InP/ZnS$ . La Tabla 5.1 muestra las principales especificaciones entregadas por el fabricante.

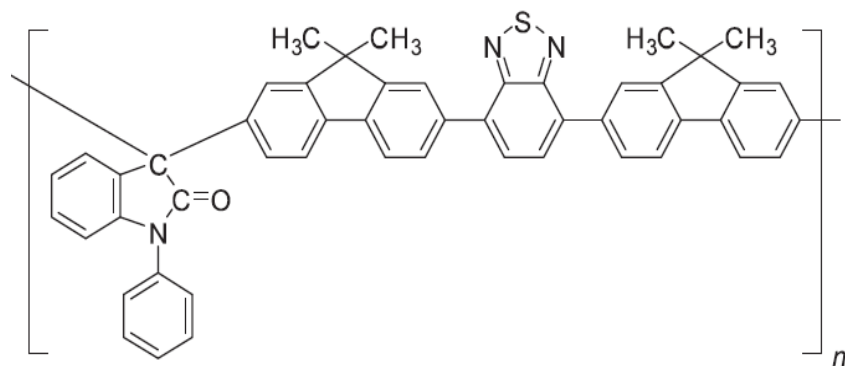
Para los tres puntos cuánticos se prepararon suspensiones con concentraciones de  $1mg/mL$ . En el caso de  $CdTe$  y  $CdSe/ZnS$  se tomaron aproximadamente  $1mg$  de la muestra y se disolvieron en  $1mL$  de agua y tolueno, respectivamente. Como el  $Inp/ZnS$  ya se encontraba disuelto, se tomaron  $200\mu L$  de la muestra y se mezclaron con  $800\mu L$  de tolueno.

Tabla 5.1: Especificaciones entregadas por la empresa Sigma-Adrich referente a los tres puntos cuánticos adquiridos.

	Solubilidad	Forma	Concentración	Eficiencia Cuántica	Emisión (nm)
CdTe	Agua	sólida	—	0,6	$\lambda_{emi} = 570$
CdSe/ZnS	Tolueno	sólida	—	—	$\lambda_{emi} = 580$
InP/ZnS	Tolueno	líquida	5mg/ml	0.4	$\lambda_{emi} = 590$

### 5.1.2. Nanopartículas Orgánicas

El polímero elegido para la fabricación de las nanopartículas orgánicas fue el PMC300 (Figura 5.1), puesto que, la síntesis, caracterización y propiedades ópticas lineales y no lineales ya han sido ampliamente estudiadas [71] y además, porque conserva muy bien estas propiedades al momento de agregarse [31]. La síntesis de las nanopartículas se llevó a cabo mediante el método de reprecipitación. Primero, se tomó 1 mg del compuesto y se disolvió en 1mL de THF. Luego un pequeño volumen de esa solución, aproximadamente de 100 $\mu$ L, se inyectó rápidamente en una solución de 8mL de agua con CTAB que se encontraba bajo agitación ultrasónica. La concentración del surfactante se preparó a una concentración de  $8 \times 10^{-4}M$  para lograr una alta concentración en nanopartículas y larga estabilidad. Luego se removió el THF por evaporación bajo vacío, seguido de una filtración, a través de una membrana con poros de 0,2 $\mu$ m.



Poli[4-(6-[2-oxo-N-fenilindol-1-il]-9,9-dimetil-9H-fluoreno-2-il)-7-(9,9-dimetil-9H-fluoreno-2-il)benzo[c][1,2,5]tiadiazol

Figura 5.1: Nombre completo y estructura química del polímero PMC300

### 5.1.3. Preparación de Microestructuras Fluorescentes

Se prepararon películas delgadas dopadas con PCs de CdTe y NPs-O. Sobre estas películas se generaron microestructuras para ser visualizadas mediante microscopía confocal y Multifotónica. Para la fabricación de las películas delgadas, primero se preparó una solución de polyvinyl alcohol (PVA) mezclando 80mg de este polímero en 2mL de agua. Con el propósito de que las películas dopadas con los PCs y NPs-O tuvieran una absorción equivalente a los 405nm, se realizó una dilución en la suspensión de CdTe para reducir la concentración inicial de 1mg/mL a 0.2mg/mL. Posteriormente se tomó 1mL de las suspensiones de PMC300 y CdTe y se mezclaron con 1mL de PVA, respectivamente. Por último, se tomó un pequeño volumen de las mezclas de CdTe-PVa y PMC300-PVA y se depositaron sobre un sustrato de vidrio mediante Spin-Coating a una velocidad de 400rpm (revoluciones por minuto) por 4min. Una vez listas las películas se les realizó un micrograbado de 8 líneas como el de la Figura 5.2 usando la estación de grabado láser modelo Láser mFAB (Newport)

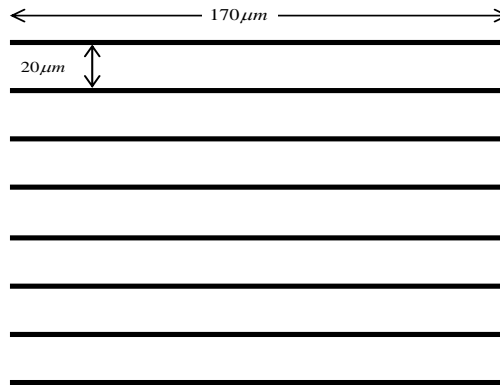


Figura 5.2: Imagen del Micrograbado realizado en las películas delgadas

### 5.1.4. Tinción Celular

Células Hela (línea derivada de cáncer cervical) se cultivaron en DMEM (Dulbecco's minimum essential media) con 10 % de suero bovino fetal (FBS) a  $37^{\circ}C$  en una atmósfera de 5 % de  $CO_2$ . Después se fijaron con 4 % de paraformaldehído + 0.05 % de glutaraldehído en

PBS (amortiguador de fosfatos) durante 30 min. Luego se lavarón con PBS y se colocaron las nanopartículas por 2h lejos de la luz para después ser lavadas nuevamente con PBS. Los núcleos celulares se tiñeron con  $1\mu M$  de Hoechst 33258 que es un colorante comercial con la capacidad de unirse fuertemente al ADN. Es importante señalar que la tinción celular se llevó a cabo sin permeabilizar las células.

## 5.2. Determinación de la Concentración Molar de las Muestras

Como se mencionó al comienzo de esta investigación no hay consistencia, en la mayoría de las investigaciones que se realizan en este campo, al respecto de cómo se reportan las concentraciones de suspensiones de NPs al momento de determinar  $\sigma_{TPA}$ , mientras los trabajos con nanopartículas orgánicas utilizan unidades de molaridad molecular ( $mol_{Mtr}/L$ ) su contraparte inorgánica, para el caso de puntos cuánticos, utilizan concentración molar de partículas ( $mol_{NPs}/L$ ). Claramente estas unidades no son equivalentes, lo que implica que una comparación  $\sigma_{TPA}$  entre las propiedades de TPA reportadas en la literatura para NPs-O y PCs no se puede realizar directamente. De las ecuaciones (2.41) y (2.44) se puede ver como la concentración es un factor muy importante al momento de calcular  $\sigma_{TPA}$  y que la manera en que ésta se reporta (en particular las unidades de concentración utilizadas) puede influir de manera significativa en el resultado.

En este trabajo de tesis se busca caracterizar la actividad TPA en NPs-O y PCs usando las mismas unidades de concentración. Dado que la concentración de los PCs no se pueden expresar en términos de moléculas, debido su naturaleza cristalina, se usará la concentración en términos de nanopartículas, en ambos casos, para realizar la comparación. El método que se utilizará para determinar la cantidad de NPs en la suspensión se basa en considerar que todas ellas son esféricas y poseen aproximadamente el mismo tamaño. Debido a que se conoce la masa total ( $m_t$ ) del material en la suspensión y podemos calcular la masa de cada nanopartícula ( $m_{NPs}$ ), tomando en cuenta las suposiciones hechas arriba, la concentración en términos de molaridad de partículas se puede calcular como:

$$C_{NPs} = \frac{m_t}{m_{NPs}} \frac{1}{N_A V} \quad (5.1)$$

Donde  $N_A$  es la constante de Avogadro ( $6,022 \times 10^{23}$  partículas $^{-1}$ ) y  $V$  es la cantidad de disolvente

en la solución expresada en litros ( $L$ ). Además, para tener una referencia de la  $\sigma_{TPA}$  en términos moleculares para la NPs-O se calculará la concentración en términos moleculares usando la siguiente ecuación

$$C_{mlr} = \frac{m_t}{M} \frac{1}{V}, \quad (5.2)$$

donde  $M$  es la masa molar del compuesto orgánico expresada en gramos/mol.

### 5.3. Instrumentos para la caracterización de las propiedades ópticas lineales

En esta sección se describirá de manera sencilla los instrumentos empleados para la caracterización de las propiedades ópticas lineales.

#### 5.3.1. Espectrofotómetro Lambda 900 UV/VIS/NIR

Con el objetivo de determinar la absorción lineal de las nanopartículas se hizo un análisis de espectroscopía de absorción óptica UV-visible usando el espectrofotómetro Perkin Elmer modelo Lambda 900 UV/VIS/NIR . Este espectrofotómetro cuenta con dos lámparas (deuterio y tungsteno-halogeno) para tener un rango de medición entre los 175 y 3300 nm, dos monocromadores para que la radiación que llegue a la muestra sea altamente monocromática y un fotodetector que determina la intensidad de la luz que es transmitida a través de las muestras. En el compartimiento de las muestras (Figura 5.3) se encuentran dos monturas donde se insertan las celdas de cuarzo que contienen a las suspensiones de NPs. En la montura de abajo (M) se coloca la muestra bajo estudio (suspensión de las nanopartículas) y en la otra (R) una muestra del disolvente en el que se encuentran las nanopartículas, esto con la finalidad de poder descartar la absorción debido al disolvente. El espectro de absorbancia resultante es la comparación cuantitativa entre la intensidad de luz incidente en la muestra y la intensidad de la luz transmitida a través de la misma.

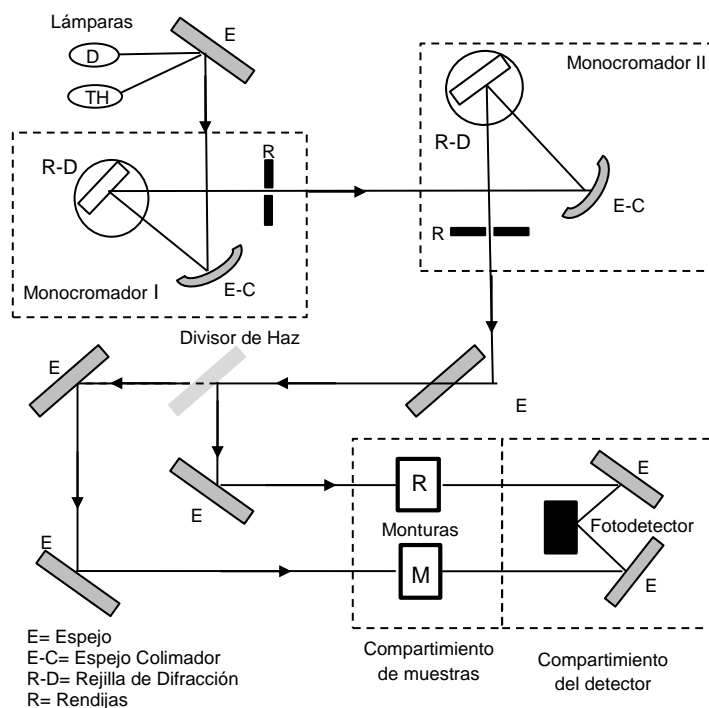


Figura 5.3: Representación esquemática del interior del espectrofotómetro.

### 5.3.2. Fluorómetro FS5

Con el objetivo de determinar el espectro de emisión, la eficiencia cuántica y los tiempos de vida de las nanopartículas, se empleó el fluorómetro FS5 del fabricante Edimburg Instruments. Este fluorómetro cuenta con una lámpara de arco de xenón, dos monocromadores (Czerny–Turner): uno para la excitación y otro para la emisión y tres detectores: uno para la referencia, otro para la señal de fluorescencia y otro para medir la transmisión. La Figura 5.4 muestra la parte interior del fluorómetro con la ubicación de los componentes antes mencionados. La parte central, donde se ubica la muestra, es una caja (módulo) que se puede retirar e intercambiar por otros módulos, de acuerdo al tipo de muestra y a las condiciones experimentales requeridas. Por ejemplo, para medir la eficiencia cuántica de fluorescencia de las muestras se trabajó con el módulo que contiene una esfera integradora en su interior. Para el caso de los espectros de emisión y los tiempos de vida, se empleó un mismo módulo, el cual contiene una

montura en su interior para colocar la muestra. La única diferencia es que para medir los tiempos de vida se usaron láseres pulsados de picosegundos como fuentes de excitación en vez de la lámpara de xenón. Esto debido a que el método usado para medir los tiempos de vida (TCSPC, Time Correlated Single Photon Counting) es un método estadístico y requiere una fuente de excitación altamente repetitiva para acumular la mayor cantidad de conteos y así obtener una buena precisión en la medición.

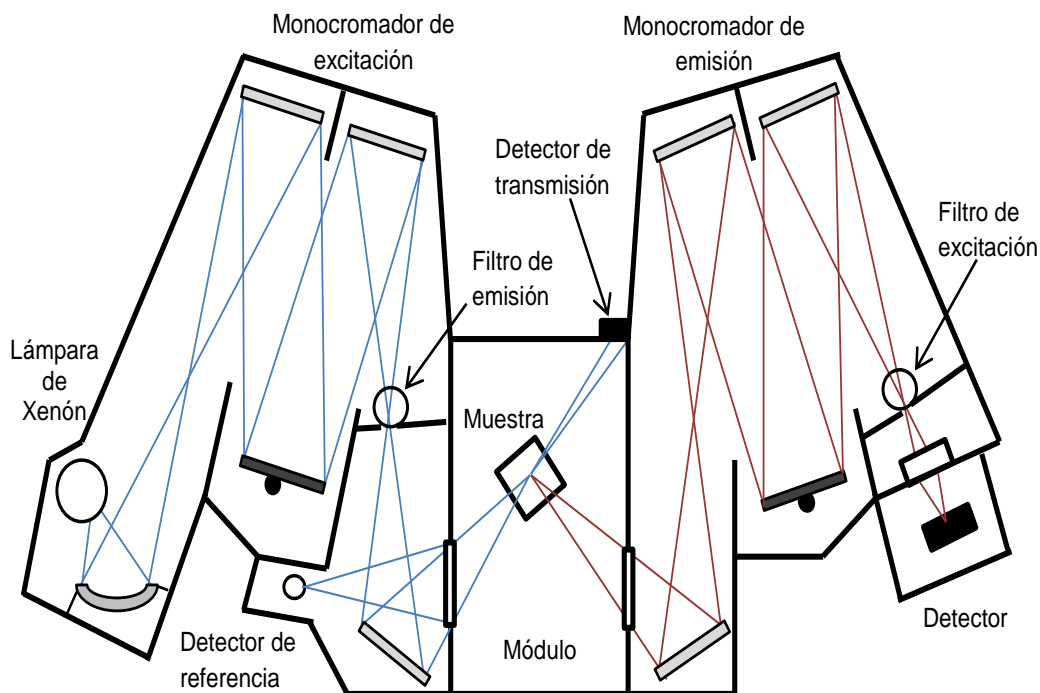


Figura 5.4: Representación esquemática del interior del fluorómetro.

#### 5.4. Arreglo experimental para la caracterización de la fluorescencia inducida por absorción de dos fotones

La absorción de dos fotones fue estudiada por la técnica de fluorescencia inducida por absorción de dos fotones (TPEF). El arreglo empleado se muestra en la Figura 5.5. Este arreglo consiste en un láser de Titanio-Zafiro (marca spectra Physics, modelo Tsunami) de 1W de potencia

promedio, sintonizable entre los 760 y 830 nm, cuya duración y repetición del pulso son de 100fs y 80 MHz, respectivamente. Mediante un atenuador, colocado a la salida del láser, se redujo la potencia promedio del haz a valores entre los 200 y 400 mW. Usando la lente 1 se enfocó el haz cerca de una de las paredes laterales de la celda de cuarzo de 1 cm, con la finalidad de evitar la absorción de la fluorescencia debido a efectos de absorción lineal. Posteriormente, la fluorescencia inducida por la absorción de dos fotones fue colectada por la lente 2 y dirigida al espectrómetro (Ocean Optics USB 2000 UV-Vis). La fluorescencia es recolectada a 90° respecto al bombeo, para eliminar la mayor cantidad de radiación de bombeo quedando sólo la porción esparcida por la muestra, la cual es bloqueada por un filtro de radiación infrarroja

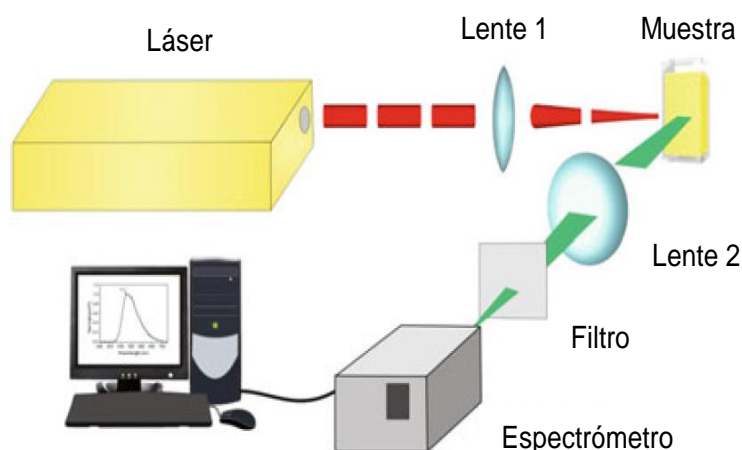


Figura 5.5: Arreglo experimental para determinar la sección transversal de Fluorescencia inducida por absorción de dos fotones.

## 5.5. Microscopio ZEISS LSM-710-NLO

Para tomar las micrografías de las microestructuras fluorescentes y las células se usó el microscopio ZEISS LSM-710-NLO (Figura 5.6). Este microscopio permite tomar imágenes por



fluorescencia lineal con detección confocal, utilizando fuentes láseres a diferentes longitudes de onda: 405, 458, 488, 514, 543 y 633 nm. Además se cuenta con un láser de Titanio-Zafiro de pulsos ultra-rápidos sintonizables, marca Coherent, modelo Chameleon Ultra II con las siguientes especificaciones: 3.5 W de potencia promedio máxima, tasa de repetición de 80 MHz, duración de pulso de 140 fs y rango de sintonizabilidad de 680 a 1080 nm. Esta fuente de luz permite las aplicaciones de óptica no lineal, como la microscopía de excitación de dos fotones y la de generación de segundo armónico. Un diagrama esquemático simple del funcionamiento de este microscopio se encuentra en el capítulo 3.



Figura 5.6: Vista frontal del microscopio ZEISS LSM-710-NLO

# Capítulo 6

## Análisis y Discusión de Resultados

### 6.1. Tamaño de las NPs

Como se mencionó en el Capítulo 4 existe una relación directa entre los espectros de absorción y de emisión, y el tamaño de los PCs. Por lo tanto, basándose en esta característica y mediante comparación de espectros, es decir, comparando los primeros picos de absorción excitónica y los picos de emisión aquí obtenidos (ver sección 6.2, Figuras 6.2 y 6.3) con los que se reportan en la literatura, se estimaron los diámetros de los PCs así como el espesor de los recubrimientos para los del tipo core/shell. Varios reportes previos sobre la absorción y la emisión junto con el tamaño de los PCs fueron usados para este propósito [56, 72, 73]. Por otra parte, las NPs-O fueron observadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) para poder calcular sus diámetros. Debido a que las NPs-O son bastante irregulares (Figura 6.1), el diámetro se estimó suponiendo que la imagen obtenida de cada nanoagregado posee una forma circular. En la Figura 6.1 se muestra una de las micrografías obtenidas así como la distribución de los tamaños de las NPs-O. La Tabla 6.1 resume los resultados de los tamaños y espesores de los PCs y NPs-O como también las concentraciones de las suspensiones preparadas con estas NPs.

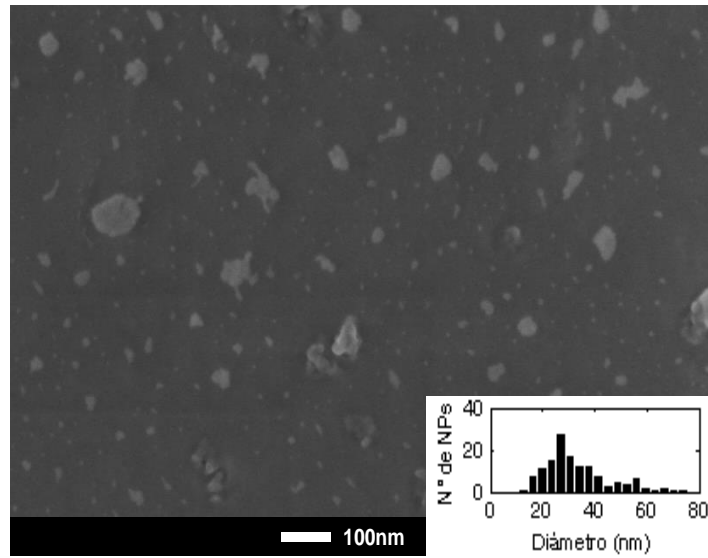


Figura 6.1: Micrografía SEM de la suspensión de NPs-O. Recuadro: distribución de los tamaños a partir del análisis de 10 micrografías.

Tabla 6.1: Tamaños de NPs-O y PCs y concentraciones de las suspensiones estudiadas

	Diámetro (nm)	Espesor Recubrimiento (nm)	Concentración ( $mol_{Mlr}/L$ )	Concentración ( $mol_{NPs}/L$ )
CdTe	4	—	—	$1.4 \times 10^{-5}$
CdSe/ZnS	5	0.46	—	$5.2 \times 10^{-6}$
InP/ZnS	4	0.46	—	$1.1 \times 10^{-5}$
PMC300	36*	—	$1.1 \times 10^{-7}$	$9.3 \times 10^{-10}$

\*valor promedio de todas las NPs-O analizadas (desviación estandar=  $20nm$ )

## 6.2. Propiedades Ópticas Lineales

La Figura 6.2 muestra los espectros de absorción normalizados de las NPs bajo estudio. Se puede ver que los PCs presentan una banda de absorción mucho más ancha y creciente hacia la región UV, después del primer pico de absorción excitónica, en comparación con las NPs-O. Esto se debe a que eventualmente cualquier fotón con energía mayor a la energía del band gap

será absorbido y formará un excitón. Los primeros picos de absorción excitónica para CdTe, CdSe/ZnS se encuentran a 531nm, 561nm respectivamente, en tanto que los PCs de InP/ZnS no mostraron una banda excitónica bien definida. Las NPs-O presentan un pico principal de absorción a los 325nm debido a una transición electrónica  $\pi-\pi^*$  y una segunda banda menos intensa a los 423nm asociada a una transición electrónica  $n-\pi^*$  del benzotiadiazol debido a una transferencia intramolecular de carga (TIC).

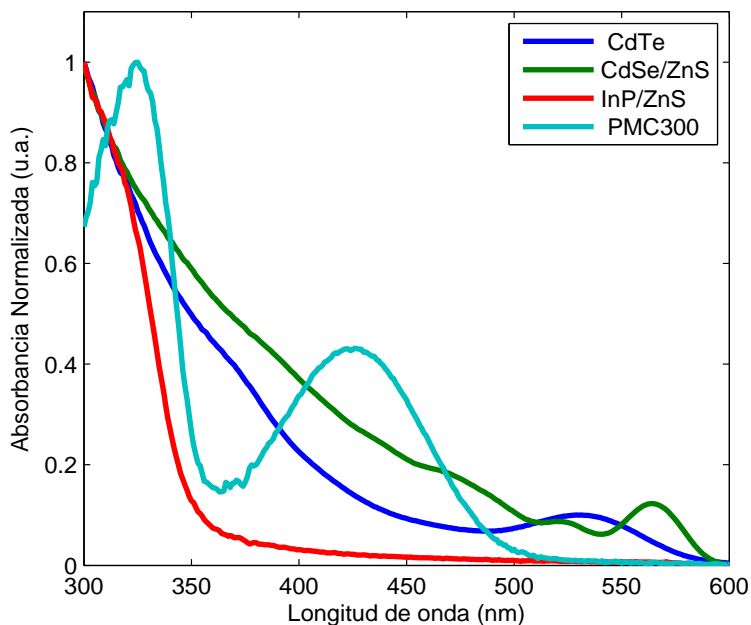


Figura 6.2: Espectros de absorción normalizados para las NPs estudiadas

Los espectros de fluorescencia normalizados de las NPs bajo estudio son mostrados en la Figura 6.3. Se aprecia que los espectros de emisión para los PCs tienen un perfil tipo Gaussiano y son más estrechos y simétricos que el de las nanopartículas orgánicas, esto debido a que, gracias al confinamiento cuántico, los niveles de energía en la banda de valencia y de conducción están discretizados. Los picos de emisión para las NPs de CdTe, CdSe/ZnS, InP/ZnS y PMC300 son 574nm, 580nm, 590nm y 550nm, respectivamente.

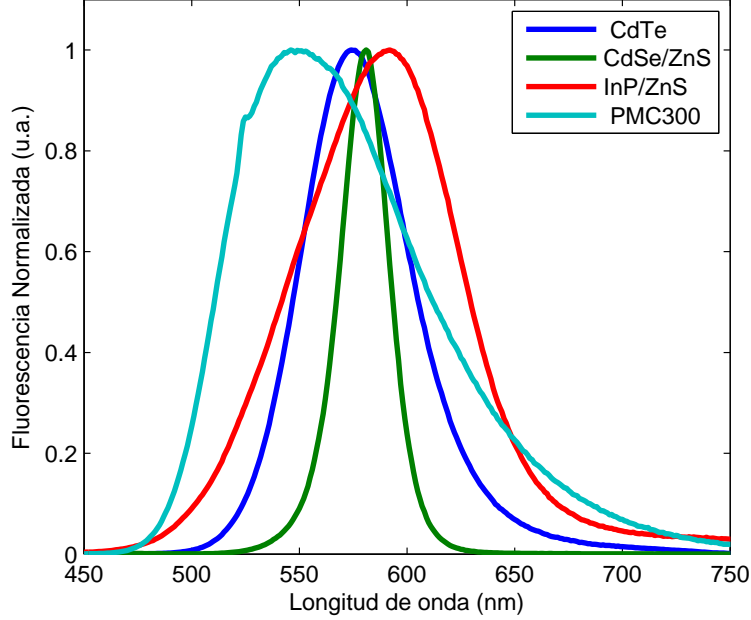


Figura 6.3: Espectros de emisión normalizados para las NPs estudiadas

La Figura 6.4 muestra las curvas de decaimiento de la fluorescencia para las muestras estudiadas. Se aprecia que los PCs presentan una curva de decaimiento mucho más lenta, lo que se traduce a tiempos de vida más largos en comparación a la NPs-O. Esto permite, al momento de usar los PCs como marcadores celulares, realizar una discriminación temporal de la señal de fluorescencia, es decir, se puede evitar coleccionar señal que provenga de la autofluorescencia de la células y de la luz de excitación esparcida durante la medición, mejorando de este modo la sensibilidad. El valor de los tiempos de vida se encontraron ajustando las curvas experimentales a funciones de decrecimiento de doble exponencial de la forma

$$F(t) = A_1 e^{t/\tau_1} + A_2 e^{t/\tau_2}, \quad (6.1)$$

donde  $\tau_1$  y  $\tau_2$  representan los tiempos de vida y  $A_i$  representa la intensidad en el proceso de decaimiento con el tiempo de vida de  $\tau_i$ . El valor de los tiempos de vida promedio ( $\tau_{prom}$ ) así como los rendimientos cuánticos de fluorescencia ( $\eta$ ) de las muestras se detallan en la Tabla 6.2. Se aprecia que los valores de los tiempos de vida se encuentran dentro de los rangos reportados

en la literatura [74], esto es, entre 1 y 10 ns para compuestos orgánicos y entre 10 y 100 ns para PCs.

Tabla 6.2: Rendimientos cuánticos de fluorescencia y tiempos de vida promedios de las NPs estudiadas.

	$\eta$	$A_1^*$	$\tau_1$ (ns)	$A_2^*$	$\tau_2$ (ns)	$\tau_{prom}(ns)^*$
CdTe	0.57	0.14	42	0.78	48.3	44
CdSe/ZnS	0.63	0.96	16	0.04	41	17
InP/ZnS	0.3	0.33	12.6	0.67	41.0	32
PMC300	0.93	0.84	4.8	0.16	6.8	5

\* $A_i$  normalizados. \* $\tau_{prom} = \Sigma(A_i \cdot \tau_i)$ .

### 6.3. Sección Transversal de Absorción de Dos Fotones

Como se mencionó en el Capítulo 5 la técnica TPEF fue empleada para medir el valor de  $\sigma_{TPA}$  de las nanopartículas. Esta técnica, al ser un método indirecto, necesita de una muestra de referencia para poder realizar la medición. En esta investigación se utilizó como referencia el colorante orgánico comercial rodamina 6G, a una concentración de  $1 \times 10^{-4}$  M, el cual tiene muy bien caracterizada su actividad TPA desde los 630nm hasta los 1090nm [39]. La Tabla 6.3 muestra los valores de  $\sigma_{TPA}$  de la rodamina 6G para las longitudes de onda de excitación utilizadas en este trabajo. Es importante señalar que los valores mostrados en la Tabla 6.3 están dados en función de la concentración molar molecular de la rodamina 6G, por lo tanto, usar estos valores como referencia para calcular los valores de  $\sigma_{TPA}$  en términos de concentración molar de partículas, no es del todo correcto, ya que, las unidades de concentración no son las mismas. Este error se ha cometido en todos los trabajos reportados en la literatura, los cuales usan la técnica TPEF para calcular los valores de  $\sigma_{TPA}$  en función de la concentración de partículas (ver Tabla 4.1 y 4.2), ya que, no existen estándares, en donde se reporten los valores de  $\sigma_{TPA}$  en función del número de partículas, para ser usados como referencia. A pesar de esto, en esta investigación, se usará este procedimiento porque nos da una buena primera evaluación del valor de  $\sigma_{TPA}$  para suspensiones

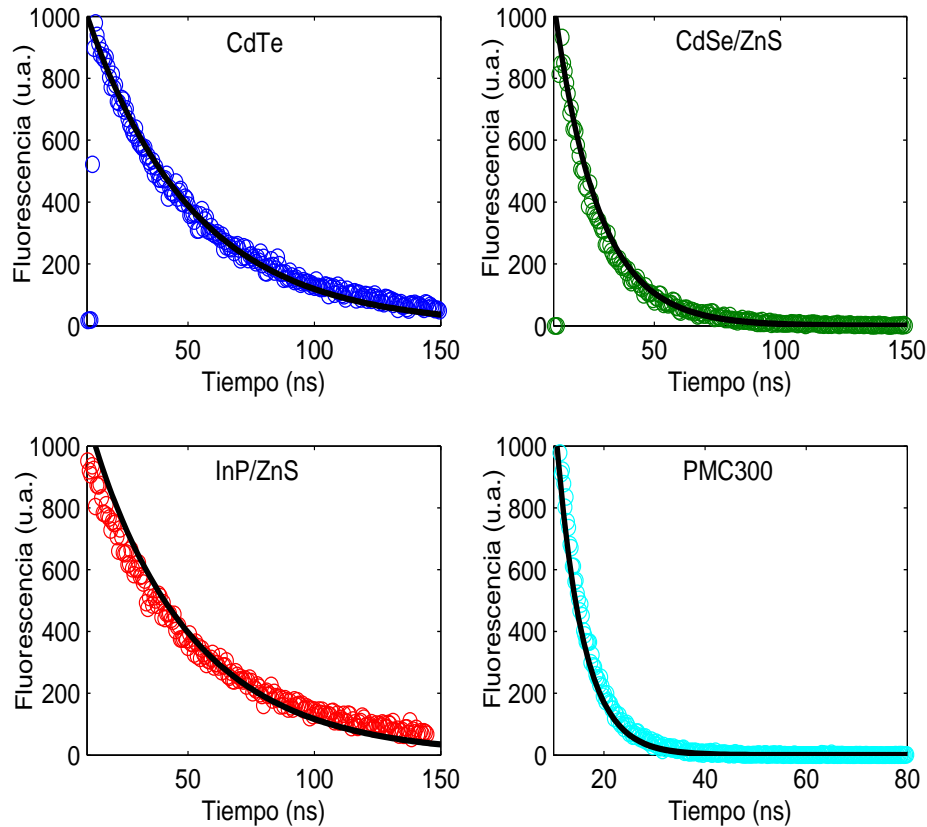


Figura 6.4: Círculos: muestran la curva experimental del decaimiento de la fluorescencia. Línea: muestra el ajuste de los datos experimentales

de nanopartículas.

Como constantemente se estará hablando del valor de  $\sigma_{TPA}$  en función del tipo de concentración empleada, de moléculas o de partículas, se usará la siguiente notación para referirnos a cada caso, esto es,  $\sigma_{TPA}^M$  cuando se utilice concentración molar de moléculas y  $\sigma_{TPA}^P$  cuando se utilice concentración molar de partículas.

Tabla 6.3: Valores de  $\sigma_{TPA}^M$  de la rodamina 6G para longitudes de excitación entre los 760 y 820 nm

$\lambda_{exc.}$ (nm)	760	770	780	790	800	810	820
$\sigma_{TPA}$ (GM)	55	59	56	61	65	70	64

La Figura 6.5 muestra los valores de  $\sigma_{TPA}^P$  en función de la longitud de onda de excitación para cada uno de los PCs estudiados. Se aprecia que los valores máximos se obtienen a los 760nm y son del orden  $10^3$ GM para CdTe y CdSe/ZnS y de  $10^2$ GM para InP/ZnS. Ambos valores se encuentran aproximadamente entre los órdenes de magnitud reportados en la literatura para puntos cuánticos similares, esto es,  $10^3 - 10^4$  para CdTe [54] y CdSe/ZnS [26] y  $10^2 - 10^3$  para InP/ZnS [56]. Las Figuras 6.6 a) y 6.6 b) muestran los valores de  $\sigma_{TPA}^M$  y  $\sigma_{TPA}^P$  para las NPs-O, respectivamente. Se observa que el valor  $\sigma_{TPA}^P$  es  $10^2$  veces más grandes que los valores de  $\sigma_{TPA}^M$ . Además, comparando las Figuras 6.5 y 6.6 b) se puede observar que los valores de  $\sigma_{TPA}^P$ , del compuesto orgánico, logran superar, en gran medida, a los valores de  $\sigma_{TPA}^P$  de los PCs.

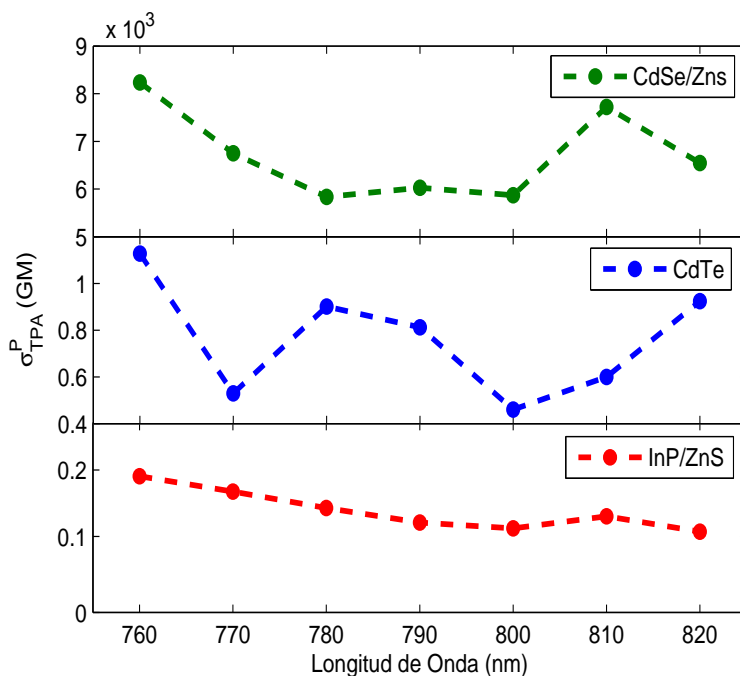


Figura 6.5: Sección transversal de absorción de dos fotones en función de la longitud de excitación para los PCs usando concentración molar de partículas



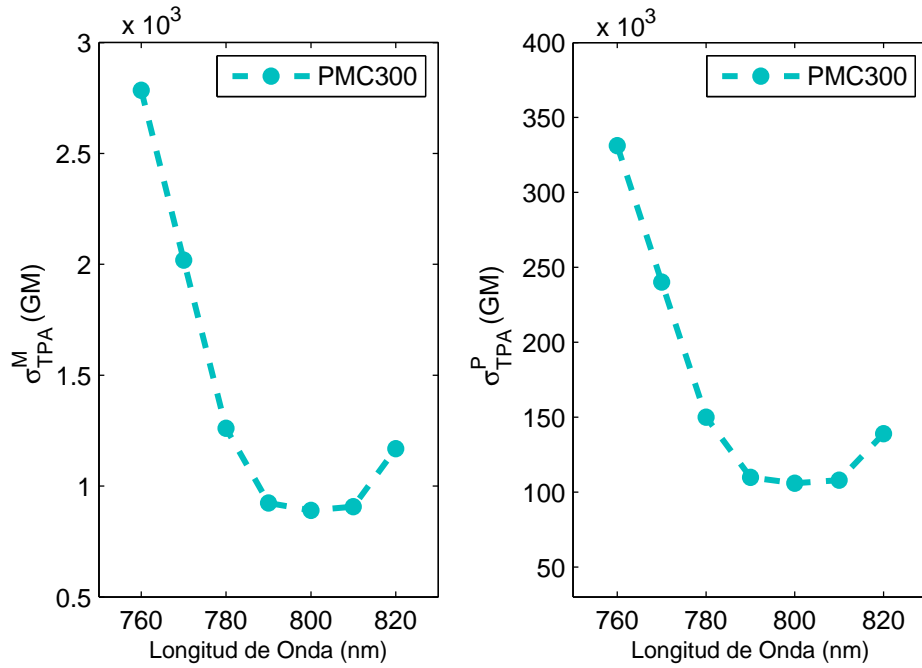


Figura 6.6: Sección transversal de absorción de dos fotones en función de la longitud de onda de excitación usando concentración molar a) de moléculas y b) de partículas

Como se señaló al inicio de esta sección los valores calculados de  $\sigma_{TPA}^P$  y mostrados en las Figuras 6.5 y 6.6 b, son sólo aproximaciones, ya que, fueron calculados usando una solución molecular como referencia. Es por esto que, una solución para evitar este problema y poder comparar la actividad de TPA entre los PCs y las NPs-O sería calcular los valores relativos de estas NPs, es decir, encontrar la razón entre los valores de  $\sigma_{TPA}^P$  de los PCs con los valores  $\sigma_{TPA}^P$  de las NPs-O. Para esto, se parte de la ecuación (2.44) y se escribe de la siguiente forma

$$\frac{\sigma_{PMC300}^P(\lambda)}{\sigma_{PCs}^P(\lambda)} = \frac{I_{PMC300}(\lambda) C_{PCs} \eta_{PCs}}{I_{PCs}(\lambda) C_{PMC300} \eta_{PMC300}}, \quad (6.2)$$

como en este caso ambas concentraciones,  $C_{PCs}$  y  $C_{PMC300}$ , se pueden usar en términos de concentración molar de partículas, no se comete el error que se comete al usar la Rodamina 6G. La Figura 6.7 muestra los valores obtenidos a partir de la ecuación (6.2). Usando estos resultados se podría decir, en primera instancia, que bajo las mismas unidades de concentración las NPs-O de PMC300 poseen una actividad de TPA mucho mayor que los PCs aquí estudiados, pero se debe hacer notar que los valores relativos mostrados en la Figura 6.7 no son del todo

absolutos, ya que, se ven afectados, de manera indirecta, por el tamaño de las NPs-O.

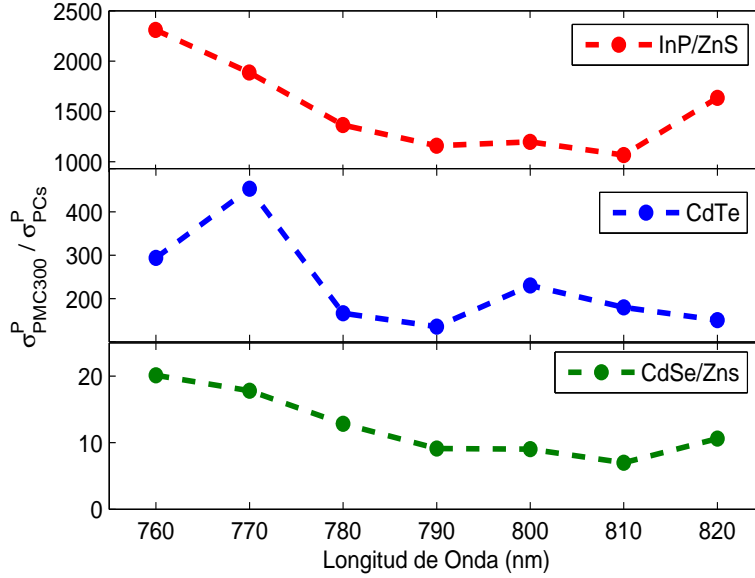


Figura 6.7: Razón de los valores de  $\sigma_{TPA}^P$  entre las NPs-O y Los PCs

Como una primera aproximación para elucidar como depende la actividad TPA del tamaño de las NPs-O, se reemplaza la ecuación (5.1) en (2.44), y usando  $m_{NPs} = \rho \pi D^3 / 6$ , donde  $\rho$  y  $D$  son la densidad y el diámetro de las NPs-O, respectivamente, se obtiene

$$\sigma_m^P(\lambda) = \sigma_{ref}^P(\lambda) \frac{\pi I_m(\lambda) C_{ref} \eta_{ref} \rho N_A V}{6 I_{ref}(\lambda) m_t \eta_m} D^3. \quad (6.3)$$

De la ecuación (6.3) se aprecia cómo a medida que el tamaño de las NPs aumenta también aumenta el valor de  $\sigma_{TPA}^P$ . Se debe señalar que esto no quiere decir que aumentando el tamaño de las NPs-O se optimicen las propiedades intrínseca de TPA, ya que, a diferencia de los PCs las propiedades ópticas de las NPs-O no dependen del tamaño, sino más bien, de las propiedades ópticas de las moléculas que la conforman. Por lo tanto, lo que realmente ocurre es que al formar NPs-O de gran tamaño se reduce el número total de NPs en la suspensión, haciendo que el valor  $\sigma_{TPA}^P$ , sea más grande respecto a NPs de menor tamaño sintetizadas a partir de una misma cantidad de material (por ejemplo, de miligramos de polímero). Dicho esto, para que

la comparación de las propiedades de TPA, en función de la concentración molar de partículas, sea equivalente, lo ideal sería realizar la comparación con tamaños muy similares. Debido a que formar NPs de PMC300 con diámetros más pequeños es difícil, debido en parte, al gran tamaño del polímero, se hará una extrapolación a los resultados obtenidos a partir de la ecuación (6.3) para poder estimar, aproximadamente, cuál sería el valor de  $\sigma_{TPA}^P$ , de las NPs de PMC300 para diámetros similares al de los PCs. La Figura 6.8 muestra una curva de extrapolación de los valores de  $\sigma_{TPA}^P$ , en función del tamaño de partícula para una longitud de onda de excitación de 760nm y se aprecia cómo para diámetros cercanos al de los PCs el valor de  $\sigma_{TPA}^P$ , de los agregados de PMC300 posee el mismo orden de magnitud que el valor de  $\sigma_{TPA}^P$  de los PCs. Por lo tanto, los valores  $\sigma_{TPA}$  de las NPs-O y los PCs usando las mismas unidades de concentración y para tamaños similares son en esencia equivalentes. Dicho esto se puede concluir que la diferencia, entre 1 y 2 órdenes de magnitud, que existe en la literatura respecto a los valores de  $\sigma_{TPA}$  entre NPs-O y PCs se debe a la forma en que se reportan las concentraciones en uno y otro caso y la falta de un standar de referencia apropiado constituido de nanopartículas.

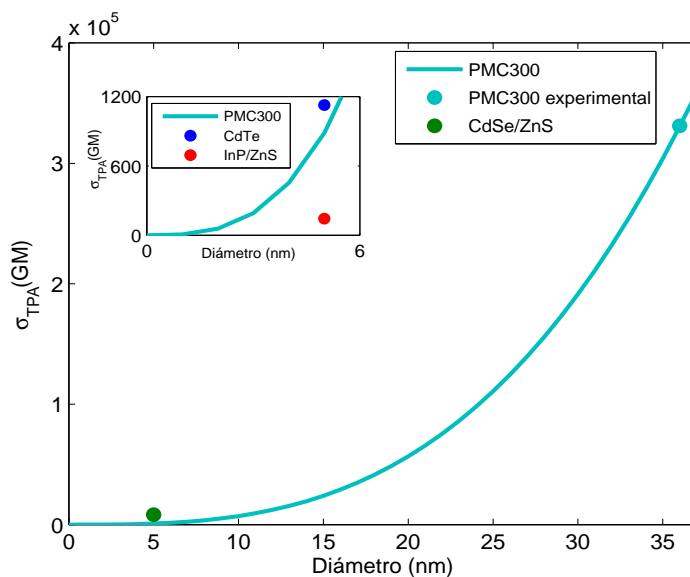


Figura 6.8: línea: muestra el valor de  $\sigma_{TPA}$  en función del diámetro de las NPs-O a una longitud de onda de excitación de 760nm. Círculo verde: muestra el valor de  $\sigma_{TPA}$  del CdSe/ZnS a una longitud de excitación de 760nm. Círculo celeste: muestra el valor de  $\sigma_{TPA}$  obtenido experimentalmente para las NPs de PMC300 a una longitud de excitación de 760nm. Recuadro: Muestra los valores de los otros PCs (CdTe y InP/ZnS) a una longitud de excitación de 760nm comparada con los valores de  $\sigma_{TPA}$  de las NPs-O en función del diámetro

## 6.4. Microestructuras Fluorescentes

Las microestructuras fluorescentes fueron fabricadas con el propósito de poder comparar el brillo real,  $\sigma_{TPA}^P \cdot \eta$  (producto entre la sección transversal de absorción de dos fotones y la eficiencia cuántica de fluorescencia), de los PCs y las NPs-O, bajo excitación de dos fotones, y no caer en los problemas relacionados con los tamaños y las concentraciones de las NPs al momento de medir su actividad de TPA. Además, porque permiten tener un mejor control del número total de NPs que se van a depositar, lo que no ocurre en el proceso de tinción celular. La concentración molar de las NPs de CdTe y PMC300 usadas para dopar las películas de PVA fueron  $1.2 \times 10^{-6}$  y  $1.4 \times 10^{-10}$ , respectivamente. Para verificar si el PVA cambió las propiedades ópticas de las suspensiones de CdTe y PMC300 se midieron las propiedades ópticas lineales de las suspensiones de PVA-CdTe y PVA-PMC300. La Figura 6.9 muestra los espectros de absorción y emisión así como también las curvas de decaimiento de la fluorescencia de las nuevas suspensiones. Se puede apreciar que las propiedades de absorción y emisión no tuvieron un cambio aparente, ya que, se siguen conservando las formas de los espectros de las Figuras 6.2 y 6.3. Por el contrario, los valores de los rendimientos cuánticos y los tiempos de vida mostrados en la Tabla 6.4 exhiben una disminución en comparación a los resultados de la Tabla 6.2. La disminución en estas propiedades puede deberse a que el PVA formó aglomerados de NPs lo que favorece el decaimiento no radiativo.

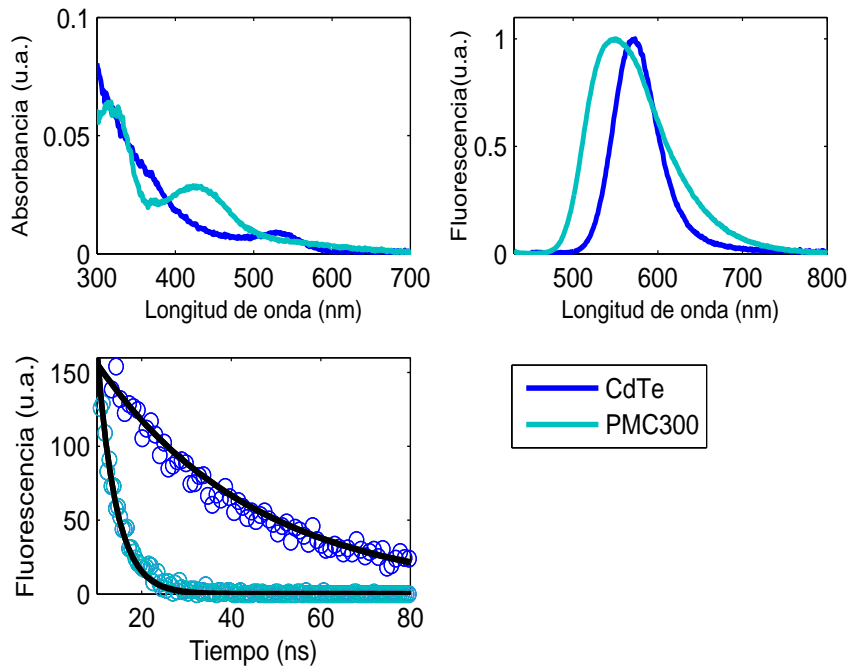


Figura 6.9: a) espectro de absorción, b) espectros de emisión normalizados y c) decaimiento de la fluorescencia con el respectivo ajuste (línea negra) de las suspensiones de CdTe-PVA y PMC300-PVA

Tabla 6.4: Rendimientos cuánticos y tiempos de vidas promedio de las suspensión de NPs de CdTE-PVA y PMC300-PVA

	$\eta$	$\tau_{prom}$ (ns)
CdTe	0.4	35.4
PMC300	0.87	4.2

Con el propósito de verificar la morfología de las películas de PVA, dopadas con PCs y NPs-O, como también la estructura del micrograbado, se tomaron imágenes por medio de un microscopio de fuerza atómica y un microscopio óptico. La Figura 6.10 muestra las micrografías tomadas con el microscopio de fuerza atómica y se aprecia cómo la morfología de las películas son muy parecidas y presentan una buena calidad, ya que, no presentan muchas rugosidades y tampoco grandes cúmulos de NPs. En la Figura 6.11 tomada con el microscopio óptico se aprecia cómo el grabado no se realizó de la misma forma en las películas. Además, se puede ver que para el

caso de la película de PMC300 el láser deformó mucho más el lugar de grabación en comparación a la película de CdTe.

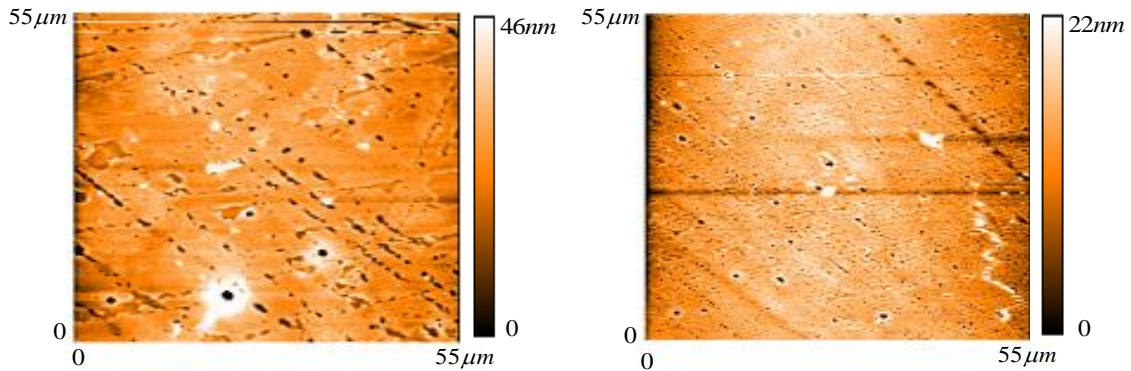


Figura 6.10: micrografías de la morfología de las películas delgadas de PVA dopadas con NPs de CdTe(izquierda) y PMC300 (derecha)

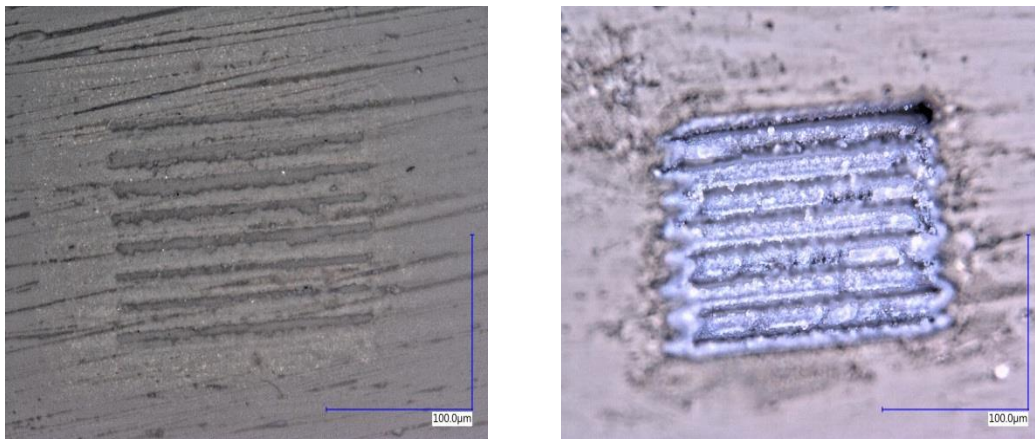


Figura 6.11: Micrografías obtenidas mediante un microscopio óptico de las películas de CdTe (izquierda) y PMC300 (derecha) con un micrograbado láser en su superficie.

La Figura 6.12 muestra las micrografías tomadas con el microscopio de fluorescencia confocal usando una longitud de onda de excitación de 405 nm. Estas micrografías fueron tomadas, en ambos casos, usando los mismos parámetros de adquisición (intensidad de excitación, objetivos, tamaño del pixel, etc). Se aprecia cómo el defecto en las líneas mostradas, a través del microscopio óptico, son también visibles mediante fluorescencia. Además, se aprecia como, aparentemente, las NPs de PMC300 formaron cúmulos sobre la película, ya que, se aprecian pequeñas regiones con

diversos picos de intensidades. Por otra parte, se puede apreciar que la película de PMC300 posee un brillo más intenso que la película de CdTe. Para poder cuantificar este hecho, se calculó el brillo medio de la micrografía ( $\overline{B}$ ) definido por

$$\overline{B} = \frac{1}{m \cdot n} \sum_{i=0}^m \sum_{j=0}^n u_{ij}, \quad (6.4)$$

donde  $m$  y  $n$  son las dimensiones de la imagen en términos del número de píxeles y  $u_{ij}$  es el brillo del píxel en la ubicación  $ij$  que toma valores entre 0 y 255. Transformando las micrografías a escala de grises y tomando una sección fuera de la región donde está la microestructura grabada, se pudo determinar que el brillo medio para las películas de CdTe y PMC300 es 18 y 32 u.b. (unidades de brillo), respectivamente. La diferencia obtenida de estos valores entre ambas películas se puede explicar del hecho de que ambas películas fueron fabricadas con suspensiones que tenían una absorción muy similar en los 405 nm (ver Figura 6.9a), pero que diferían en el valor del rendimiento cuántico en aproximadamente la misma proporción que difieren los brillos medios.

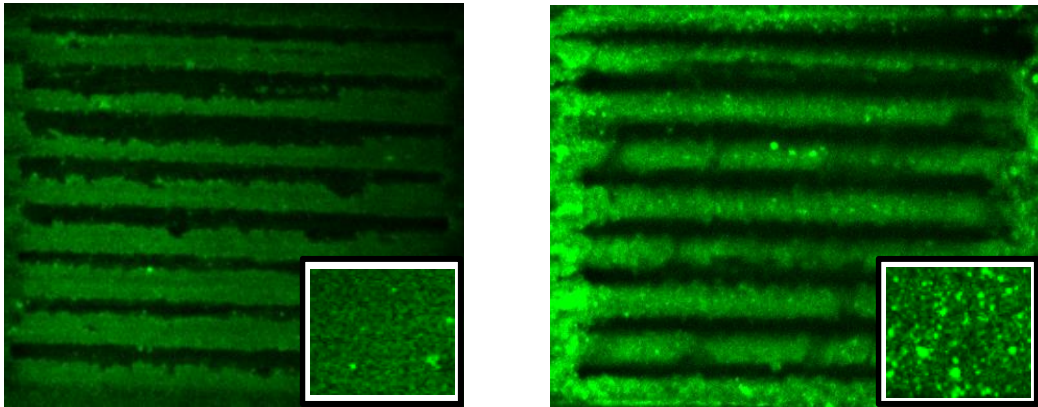


Figura 6.12: Micrografías obtenidas mediante microscopía confocal de las películas de PVA dopadas con NPs de CdTe (izquierda) y PMC300 (derecha). Las imágenes fueron tomadas usando los siguientes parámetros de adquisición: láser de 405nm a una intensidad del 6%, lente objetivo de 20x (apertura numérica de 0.4), pinhole 1 u.a (unidades de airy) y un tamaño del píxel de  $0.8 \times 0.8 \mu\text{m}$ . Recuadros: muestran a una sección de la película que esta fuera de la región con la microestructura grabada

La Figura 6.13 muestra las micrografías obtenidas mediante microscopía de dos fotones a una longitud de onda de excitación de 760 nm. Se aprecia cómo la diferencia en el brillo entre

ambas películas es mucho más notorio que en el caso de la microscopía confocal. Esta diferencia también se ve reflejada en los valores de  $\overline{B}$ , 6 y 13 (u.b) para CdTe y PMC300, respectivamente. Sin embargo, se debe hacer notar que esta diferencia no es lo suficientemente grande si se toma en cuenta que el brillo medio es proporcional a  $\sigma_{TPA}^P \cdot \eta$ , ya que, el valor de  $\sigma_{TPA}^P$  del PMC300 (sin tomar en cuenta la extrapolación de los valores de  $\sigma_{TPA}^P$  a tamaños similares a los PCs) es mucho mayor,  $10^2$  veces más grande, que el valor de  $\sigma_{TPA}^P$  del CdTe a 760nm (Ver Figura 6.7). Por lo tanto, una vez más se pone en evidencia que los valores de  $\sigma_{TPA}^P$  calculados para las NPs-O están sobre estimados a partir de las mediciones de TPEF, por el tamaño de la agregación, puesto que, los brillos encontrados en ambas micrografías no son muy diferentes. Además, cabe mencionar, que debido a que se usaron los detectores externos del microscopio multifotónico, la detección de emisión estaba restringida a regiones entre los 500 y 550nm, lo que perjudicó en mayor medida a la película de CdTe, ya que, el rango de detección se encontraba más próximo al rango de emisión de las NPs de PMC300 (ver figura 6.9b).

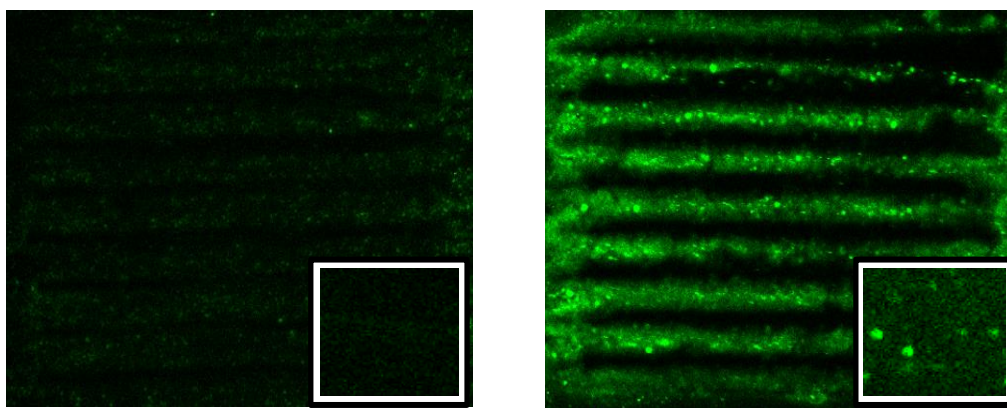


Figura 6.13: Micrografías obtenidas mediante microscopía de dos fotones de las películas de CdTe (izquierda) y PMC300 (derecha). Las imágenes fueron tomadas usando los siguientes parámetros de adquisición: láser de 760nm a una intensidad del 10 %, lente objetivo de 20x ( apertura numérica de 0.4) y un tamaño del pixel de  $0.8 \times 0.8 \mu m$ . Recuadros: muestran a una sección de la película que esta fuera de la región grabada



## 6.5. Micrografías Celulares

Como otro de los objetivos de esta investigación es realizar un estudio comparativo entre los PCs y las NPs-O, como marcadores celulares, usando los mismos parámetros de excitación y tinción celular, se intentó preparar suspensiones con un número equivalente de NPs de tal modo que las células fueran teñidas con aproximadamente la misma cantidad de NPs de PMC300 y CdTe, pero debido a la gran diferencia de tamaños entre estas NPs, esto fue imposible. Por lo tanto, las concentraciones molares de partículas de CdTe y PMC300 empleadas en la tinción celular fueron de  $2.3 \times 10^{-7}$  y  $4.3 \times 10^{-10}$ , respectivamente. La Figura 6.14 muestra los espectros de absorción de las suspensiones de NPs utilizadas en la tinción celular. Se aprecia que para una longitud de onda de excitación cercana a los 400nm la absorbancia de las NPs de PMC300 es aproximadamente el doble que el de las NPs de CdTe.

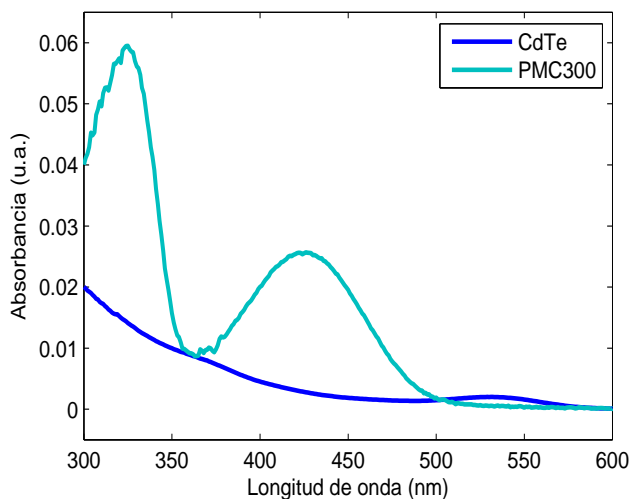


Figura 6.14: Espectros de absorción de las suspensiones de CdTe y PMC300 utilizadas en la tinción celular.

Antes de obtener las micrografías de las células teñidas con los PCs y las NPs-O, usando los mismos parámetros en el microscopio, se tomaron micrografías con diferentes intensidades de excitación, para uno y otro caso, con el propósito de obtener imágenes claras y, de esta manera, verificar la calidad de la tinción. Estas micrografías son mostradas en la Figura 6.15 y muestran en color rojo el núcleo celular teñido con Hoechst 33258 y en verde el citoplasma teñido con las NPs.

Para poder verificar, de manera muy general, si las NPs lograron penetrar la membrana celular y marcar el citoplasma, se realizó un barrido vertical y se obtuvieron micrografías en diferentes planos. La Figura 6.16 muestra las micrografías obtenidas durante el barrido vertical y se aprecia cómo para diferentes planos, se logran ver, en forma simultánea, el núcleo y el citoplasma de cada célula. Dicho esto y considerando que las imágenes muestran células alargadas, lo cual es propio de las células HeLa, se puede decir, en una primera aproximación, que ambas NPs lograron penetrar al interior de la célula y marcar el citoplasma.

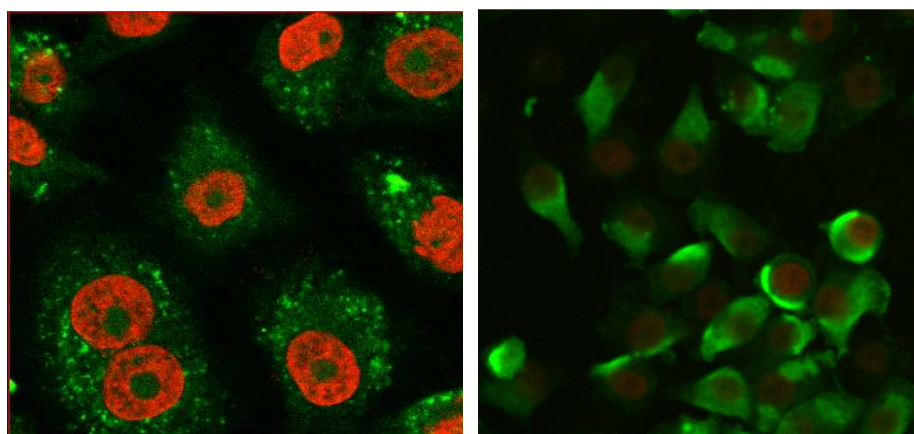


Figura 6.15: Micrografías de células teñidas con NPs de CdTe (izquierda) y PMC300 (derecha). La imagen de la izquierda fue obtenida usando un láser de 543 nm con una intensidad del 50 %, un objetivo de 63x (apertura numérica de 1.46) y un tamaño de pixel de  $0.13 \times 0.13 \mu m$ . La imagen de la derecha fue obtenida usando un láser de 405nm con una intensidad del 6 % , un objetivo de 50x (apertura numérica de 0.55) y un tamaño de pixel de  $0.3 \times 0.3 \mu m$ . Además, en ambas imágenes se usó un pinhole 1u.a (unidades de airy)

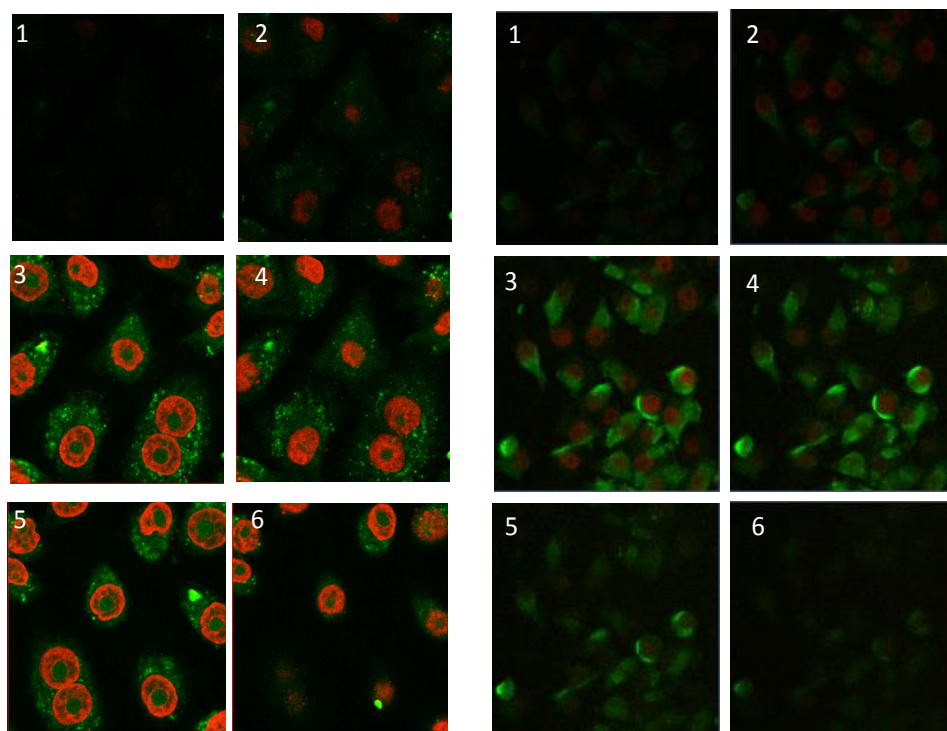


Figura 6.16: Micrografías obtenidas en diferentes planos para las células marcadas con las Nps de CdTe (izquierda) y PMC300 (derecha). Las imágenes fueron obtenidas usando los mismos parámetros de adquisición de la Figura 6.15

Las micrografías obtenidas usando los mismos parámetros (intensidad de excitación, objetivos, tamaño del pixel, etc) son mostradas en la Figura 6.17. La primera y tercera fila muestran las micrografías obtenidas mediante microscopía confocal, a una longitud de excitación de 405nm, y la segunda y cuarta fila muestran las micrografías obtenidas mediante microscopía de dos fotones para una longitud de onda de excitación de 760nm. Se aprecia que la diferencia en el brillo entre las células marcadas con CdTe y PMC300 es muy notoria. Transformando las micrografías a escala de grises se determinó que para las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal, el brillo medio de cada célula teñida con CdTe y PMC300 es, aproximadamente, 9 y 21 u.b, respectivamente. Mientras que el brillo medio de las micrografías celulares obtenidas mediante microscopía de dos fotones es de 6 y 17 u.a para las células teñidas con CdTe y PMC300, respectivamente. Estas diferencias encontradas en los brillos se debe, en principio, a las propiedades ópticas presentadas por los marcadores, pero también se debe a que la cantidad de

NPs que lograron penetrar y teñir el citoplasma no son las mismas.

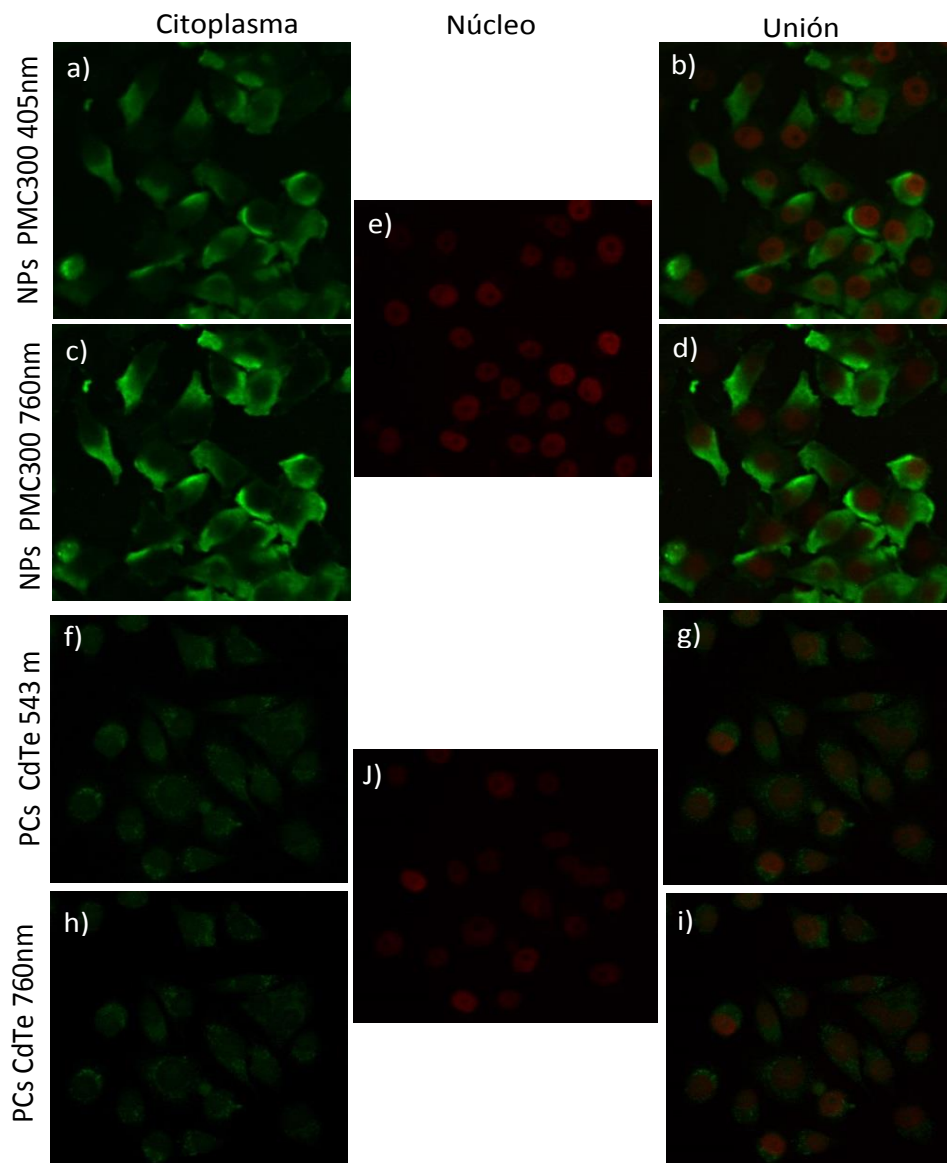


Figura 6.17: Micrografías celulares obtenidas mediante microscopía de fluorescencia confocal (primera y tercera fila) y microscopía de dos fotones (segunda y cuarta fila). Las imágenes fueron tomadas usando los siguientes parámetros de adquisición: en el caso confocal, láseres de 405nm y 543nm para las células teñidas con NPs-O y CdTe, respectivamente, con una intensidad del 6% y una apertura del pinhole de 1u.a, mientras que, para el caso de dos fotones, un láser de 760nm con una intensidad del 10%. Además, en ambos casos, se usó la lente objetivo de 50x (apertura numérica de 0.55) y un tamaño de pixel de  $0.3 \times 0.3 \mu m$ .

# Conclusiones

En esta investigación se logró realizar un estudio comparativo de las propiedades ópticas lineales y no lineales de agregados orgánicos y puntos cuánticos. Para el estudio de las propiedades lineales, se midieron los espectros de emisión y absorción como también los rendimientos cuánticos y los tiempos de vida. Para la caracterización no lineal se midieron los valores de  $\sigma_{TPA}$  para diferentes longitudes de onda de excitación empleando la técnica TPEF. Además, se hicieron películas de PVA dopadas con NPs de PMC300 y CdTe y se tiñeron células cancerosas Hela, usando dichas NPs como marcadores de contraste, para analizarlas mediante microscopía de fluorescencia confocal y multifotónica.

Con los resultados obtenidos en la caracterización no lineal se concluyó que bajo las mismas unidades de concentración (concentración molar de partículas) y para tamaños equivalentes los agregados orgánicos de PMC300 presentaron propiedades de absorción de dos fotones similares a los PCs estudiados. Esta conclusión también está soportada en los valores de brillos medios calculados en las microestructuras fluorescentes. En conjunto, estos resultados sugieren que no existe una diferencia significativa en el brillo inducido por TPA, como se podría esperar, si se tomaran en cuenta los valores de  $\sigma_{TPA}$  de PCs y NPs-O que se reportan en la literatura. Por lo tanto, la gran diferencia que existe en la literatura respecto a los valores de  $\sigma_{TPA}$  para esta clase de NPs se debe a la forma en que se reportan y se calculan las concentraciones, así como también, al tamaño de las NPs.

Además se hizo notar que la manera en que se calculan los valores de  $\sigma_{TPA}^P$ , en PCs o agregados orgánicos, por medio de la técnica TPEF, no es la más apropiada, ya que, existe una inconsistencia entre las unidades de concentración de la muestra y de la referencia. Es por esto, que resulta muy importante generar un estándar de NPs en función del tamaño para ser usado como referencia.

Por último, se pudo determinar, en una primera aproximación, que ambas NPs pudieron penetrar y teñir el citoplasma celular, pero al comparar las micrografías usando los mismos

parámetros del microscopio empleado, las células teñidas con las NPs-O obtuvieron los mejores resultados. Esto es muy relevante porque a pesar de la diferencia en el tamaño, las NPs-O pudieron penetrar de mejor manera que los PCs aún estando sin permeabilizar las células.

Como trabajo a futuro se pretende:

- Sintetizar NPs-O con tamaños equivalentes a los PCs para realizar una mejor comparación de los valores de  $\sigma_{TPA}^P$ .
- Estudiar la relación entre las propiedades no lineales y las dimensiones de las NPs-O
- Crear un estándar de nanopartículas para utilizar como referencia en la técnica TPEF o idear un método alternativo para cuantificar de manera más efectiva la fluorescencia inducida por absorción de dos fotones.

# Bibliografía

- [1] M. Goeppert-Mayer. Über elementarakte mit zwei quantensprüngen. *Ann. Phys.*, 9:273, 1931.
- [2] W. Kaiser and C. Garrett. Two-photon excitation in  $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$ . *Phys. Rev. Lett.*, 7:229–231, 1961.
- [3] I. D. Abella. Optical double-quantum absorption in cesium vapor. *Phys. Rev. Lett.*, 9:453, 1962.
- [4] W. R. Zipfel, R. M. Williams, and W. W. Webb. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat. Biotechnol.*, 21:1369–1377, 2003.
- [5] D. A. Parthenopoulos and P. M. Rentzepis. Three-dimensional optical storage. *Science*, 245:843–845, 1989.
- [6] B. H. Cumpston, S. P. Ananthavel, S. Barlow, D. L. Dyer, J. E. Ehrlich, L. L. Erskine, A. A. Heikal, S. M. Kuebler, I.Y. S. Lee, D. McCord-Maughon, J. Qin, H. Rockel, M. Rumi, X.L. Wu, S. R. Marder, and J. W. Perry. Two-photon polymerization initiators for three-dimensional optical data storage and microfabrication. *Nature*, 398:51–53, 1999.
- [7] J. D. Bhawalkar, N. D. Kumar, C. F. Zhao, and P. N. Prasad. Two-photon photodynamic therapy. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, 15:201–204, 1997.
- [8] S.S. Chunosova, V.A. Svetlichnyi, and Yu.P. Meshalkin. Measurement of the two-photon absorption cross sections of dicyanomethylene-pyrans by the z-scan method. *Quantum Electronics*, 35:415–418, 2005.
- [9] L. Antonov, K. Kamada, and K. Ohta. Estimation of two-photon absorption characteristic by a global fitting procedure. *Appl. Spectrosc.*, 56:1508–1511, 2002.
- [10] C. Xu and W. W. Webb. Measurement of two-photon excitation cross section of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. *J. Opt. Soc. Am. B.*, 13:481–491, 1996.
- [11] M. A. Albota, C. Xu, and W. W. Webb. Two-photon fluorescence excitation cross sections of biomolecular probes from 690 to 960 nm. *Appl. Opt.*, 37:7352–7356, 1998.
- [12] L. Padilha, J. Fu, D. Hagan, E. Van Stryland, C. Cesar, L. Barbosa, C. Cruz, D. Buso, and A. Martucci. Frequency degenerate and nondegenerate two-photon absorption spectra of semiconductor quantum dots. *Phys. Rev. B*, 75:075325, 2007.
- [13] L. Padilha, J. Fu, D. Hagan, and E. Van Stryland. Two-photon absorption in CdTe quantum dots. *OPTICS EXPRESS*, 13:6460–6467, 2005.
- [14] M. Vivas, J. Cury, M. Schiavon, and C. R. Mendonca. Two-photon absorption of ZnS quantum dots: Interpreting the nonlinear spectrum. *J. Phys. Chem. C*, 117:8530–8535, 2013.

- [15] Z. Zhao, B. Chen, J. Geng, Z. Chang, L. Aparicio-Ixta, H. Nie, C. Ching Goh, L. Guan Ng, A. Qin, G. Ramos-Ortiz, B. Liu, and B. Zhong Tang. Red emissive biocompatible nanoparticles from tetraphenylethene-decorated bodipy luminogens for two-photon excited fluorescence cellular imaging and mouse brain blood vascular visualization. *Part. Part. Syst. Charact.*, 31:481–491, 2014.
- [16] M. Rumi, J. E. Ehrlich, A. A. Heikal, J. W. Perry, S. Barlow, Z. Hu, D. McCord-Maughon, T. Parker, H. Ro1ckel, S. Thayumanavan, S. Marder, D. Beljonne, and J. Brédas† and. Structure-property relationships for two-photon absorbing chromophores: Bis-donor diphenylpolyene and bis(styryl)benzene derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, 122:9500–9510, 2000.
- [17] R. de la Garza-Rubi, M. Güizado-Rodríguez, D. Mayorga-Cruz, M. Basurto-Pensado, J. Guerrero-Alvarez, G. Ramos-Ortiz, M. Rodríguez, and J. Maldonado. Polythiophene derivative functionalized with disperse red 1 chromophore: its third-order nonlinear optical properties through Z-scan technique under continuous and femtosecond irradiation. *Optical Materials*, 46:366–372, 2015.
- [18] N. Adonai, K. N. Nguyen, J. Walsh, M. Iyer, T. Toyokuni, M. E. Phelps, T. McCarthy, D. W. McCarthy, and S. S. Gambhir. Ex vivo cell labeling with  $^{64}\text{Cu}$ -pyruvaldehyde-bis( $n^4$ -methylthiosemicarbazone) for imaging cell trafficking in mice with positron-emission tomography. *Proc Natl. Acad. Sci.*, 3030-3035, 2002.
- [19] F. Zhang, J. Xie, G. Liu, Y. He, G. Lu, and X. Chen. In vivo mri tracking of cell invasion and migration in a rat glioma model. *Mol. Imag. Biol.*, 13:695–701, 2011.
- [20] X. Zhang, S. Bloch, Walter Akers, and S. Achilefu. Near-infrared molecular probes for vivo imaging. *Current Protocols in Cytometry*, 12.27.1-12.27.20, 2012.
- [21] W. Denk, J.H. Strickler, and Webb W.W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248:73–76, 1990.
- [22] L. Qian, Y. Zheng, J. Xue, and P.H. Holloway. Stable and efficient quantum-dot light-emitting diodes based on solution-processed multilayer structures. *Nat. Photonics*, 5:543–548, 2011.
- [23] X. Hu, Q. Zhang, X. Huang, D. Li, Y. Luo, and Q. Meng. Aqueous colloidal  $\text{CuInS}_2$  for quantum dot sensitized solar cells. *J. Mater. Chem*, 21:15903–15905, 2011.
- [24] J. Bang, J. Park, J.H. Lee, N. Won, J. Nam, J. Lim, B. Y. Chang, H.J. Lee, B. Chon, and J. Shin. ZnTe/ZnSe (core/shell) type-ii quantum dots: Their optical and photovoltaic properties. *Chem. Mater.*, 22:233–240, 2010.
- [25] P. Prabhakaran, W.J. Kim, K.S. Lee, and P.N. Prasad. Quantum dots (qds) for photonic applications. *Opt. Mater. Express*, 2:578–593, 2012.
- [26] D.R. Larson, W. R. Zipfel, R. M. Williams, S.W. Clark, M. P. Bruchez, F. W. Wise, and W. W. Webb. Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo. *SCIENCE*, 300:1434–1436, 2003.



- [27] U. Bazylińska, S. Drozdek, M. Nyk, J. Kulbacka, Marek Samoc, and K. Wilk. Core/shell quantum dots encapsulated in biocompatible oil-core nanocarriers as two-photon fluorescent markers for bioimaging. *Langmuir*, 30:14931–14943, 2014.
- [28] D. Tuncel and H. Volkan Demirbc. Conjugated polymer nanoparticles. *Nanoscale*, 2:484–494, 2010.
- [29] Y. Piao, A. Burns, J. Kim, U. Wiesner, and T. Hyeon. Designed fabrication of silica-based nanostructured particle systems for nanomedicine applications. *Adv. Funct. Mater*, 18:3745–3758, 2008.
- [30] S. Kaur, A. Kaur, N. Kaur, and N. Singh. Development of chemosensor for  $\text{Sr}^{2+}$  using organic nanoparticles: application of sensor in product analysis for oral care. *Org. Biomol. Chem.*, 12:8230–8238, 2014.
- [31] L. Aparicio-Ixta, G. Ramos-Ortiz, J. L. Pichardo-Molina, J. L. Maldonado, M. Rodríguez, V. M. Tellez-Lopez, D. Martinez-Fong, M.G. Zolotukhin, S. Fomine, M. A. Meneses-Nava, and O. Barbosa-García. Two-photon excited fluorescence of silica nanoparticles loaded with a fluorene-based monomer and its cross-conjugated polymer: their application to cell imaging. *Nanoscale*, 4:7751–7759, 2012.
- [32] P. Liu, S. Li, Y. Jin, L. Qian, N. Gao, S. Yao, F. Huang, Q. Xu, and Yong Cao. Red-emitting DPSB-based conjugated polymer nanoparticles with high two-photon brightness for cell membrane imaging. *Appl. Mater. Interfaces*, 7:6754–6763, 2015.
- [33] Cornell University. [www.drbio.cornell.edu](http://www.drbio.cornell.edu).
- [34] R.W. Boyd. Nonlinear optics. *Third edición*, Academic Press, 2008.
- [35] M. C. Rumi and J.W. Perry. Two-photon absorption: an overview of measurements and principles. *Adv. Opt. Photon*, 2:451–518, 2010.
- [36] W. M. McClain. Excited state symmetry assignment through polarized two-photon absorption studies of fluids. *J. Chem. Phys.*, 55:2789–2796, 1971.
- [37] O. S. Mortensen and E. N. Svendsen. Initial and final molecular states as “virtual states” in two-photon processes. *J. Chem. Phys*, 74:3185–3189, 1981.
- [38] M. Sheik-Bahae, A.A. Said, T.H. Wei, D.J.Hagan, and E.W. Van Stryland. Sensitive measurement of optical nonlinearities using a single beam. *J.Q.E*, 26:760–769, 1990.
- [39] N.S. Makarov, M. Drobizhev, and Aleksander Rebane. Two-photon absorption standards in the 550-1600 nm excitation wavelength range. *Optics Express*, 16:4029–4047, 2008.
- [40] B. R. Masters. Confocal microscopy and multiphoton microscopy: The genesis of live cell imaging. *First edición*, SPIE, 2005.
- [41] P. T. C. So, C. Y. Dong, B. R. Masters, and K. M. Berland. Two-photon excitation fluorescence microscopy. *Annu. Rev. Biomed. Eng*, 2:399–429, 2002.
- [42] S. W. Hell, K. Bahlmann, M.A.S.H.M. Schrader, I. Gryczynski, and J.R. Lakowicz. Three-photon excitation in fluorescence microscopy. *J. Biomed. Opt.*, 1:71–74, 1996.

- [43] S. Mait, J.B. Shear, R.M. Williams, W.R. Zipfel, and W.W. Webb. Measuring serotonin distribution in live cells with three-photon excitation. *Science*, 275:530–532, 1997.
- [44] G.W. Bryant and G.S. Solomon. Optics of quantum dots and wires. *First edición*, Artech House, 2005.
- [45] X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, and S. Weiss. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *SCIENCE*, 307:538–544, 2005.
- [46] W. R. Algar, Kimihiro Susumu, J. B. Delehanty, and I. L. Medintz. Semiconductor quantum dots in bioanalysis: Crossing the valley of death. *Anal. Chem.*, 83:8826–8837, 2012.
- [47] A. P. Alivisatos. Perspectives on the physical chemistry of semiconductor nanocrystals. *J. Phys. Chem.*, 100:13226–13239, 1996.
- [48] P. Reiss, M. Protiere, and L. Li. Core/shell semiconductor nanocrystals. *small*, 5:194–168, 2009.
- [49] S. V. Gaponenko. Optical properties of semiconductor nanocrystals. *First edición*, Cambridge University Press, 2003.
- [50] B. J. Muller-Borer, M. C. Collins, P. R. Gunst, W. E. Cascio, and A. P. Kypson. Quantum dot labeling of mesenchymal stem cells. *J. Nanobiotechnology*, 5:1–9, 2007.
- [51] Y. Fan, H. Liu, R. Han<sup>1</sup>, L. Huang, H. Shi, Y. Sha, and Y. Jiang<sup>1</sup>. Extremely high brightness from polymer-encapsulated quantum dots for two-photon cellular and deep-tissue imaging. *Sci. Rep.*, 5:9908, 2015.
- [52] Y. Qu and W. Ji. Two-photon absorption of quantum dots in the regime of very strong confinement: size and wavelength dependence. *J. Opt. Soc. Am. B*, 26:1897–1904, 2009.
- [53] L. Pan, N. Tamai, K. Kamada, and S. Deki. Nonlinear optical properties of thiol-capped cdte quantum dots in nonresonant region. *Appl. Phys. Lett*, 91:051902, 2007.
- [54] S. Pu, M. Yang, C. Hsu, C. Lai, C. Hsieh, S. Lin, Y. Cheng, and P. Chou. The empirical correlation between size and two-photon absorption cross section of cdse and cdte quantum dots. *small*, 2:1308–1313, 2006.
- [55] A. Lad, P. Kiran, D. More, G. Ravindra, and S. Mahamuni. Two-photon absorption in ZnSe and ZnSe/ZnS core/shell quantum structures. *Appl. Phys. Lett.*, 92:043126, 2008.
- [56] D. Wawrzynczyk, J. Szeremeta, M Samoc, and Marcin Nyk. Optical nonlinearities of colloidal InP-ZnS core-shell quantum dots probed by zscan and two-photon excited emission. *APL MATERIALS*, 3:116108, 2015.
- [57] M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, and A.P. Alivisatos. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science*, 281:1013–2016, 1998.
- [58] S. Nie W. C. W. Chan. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science*, 281:2016–2018, 1998.

- [59] J. Weng, X. Songa, L. Li, H. Qian, K. Chenb, and J. Rena X. Xub amd C. Caob. Highly luminescent cdte quantum dots prepared in aqueous phase as an alternative fluorescent probe for cell imaging. *Talanta*, 70:397–402, 2006.
- [60] L. Yan, Y. Zhang, B. Xu, and W. Tian. Fluorescent nanoparticles based on aie fluorogens for bioimaging. *Nanoscale*, 8:2471–2487, 2016.
- [61] C. Wu, C. Szymanski, Z. Cain, and Jason McNeill. Conjugated polymer dots for multiphoton fluorescence imaging. *J. AM. CHEM. SOC.*, 129:12904–12905, 2007.
- [62] D. Ding, C. Goh, G. Feng, Z. Zhao, J. Liu, Rongrong Liu, N. Tomczak, J. Geng, B. Tang, L. Ng, and B. Liu. Ultrabright organic dots with aggregation-induced emission characteristics for real-time two-photon intravital vasculature imaging. *Adv. Mater.*, 2013.
- [63] S. Kim, H. Pudavar, A. Bonoiu, and P. Prasad. Aggregation-enhanced fluorescence in organically modified silica nanoparticles: A novel approach toward high-signal- output nanoprobes for two-photon fluorescence bioimaging. *Adv. Mater.*, 19:3791–3795, 2007.
- [64] J. Rodríguez-Romero, L. Aparicio-Ixta, M. Rodríguez, G. Ramos-Ortiz, J. Maldonado, A. Jiménez-Sánchez, Norberto Farfán, and R. Santillan. Synthesis, chemical-optical characterization and solvent interaction effect of novel fluorene-chromophores with D-A-D structure. *Dyes and Pigments*, 98:31–41, 2013.
- [65] Y. Wan, L. Yan, Z. Zhao, X. Ma, Q. Guo, M. Jia, P. Lu, G. Ramos-Ortiz, J. Maldonado, M. Rodriguez, and A. Xia. Gigantic two-photon absorption cross sections and strong two-photon excited fluorescence in pyrene core dendrimers with fluorene/carbazole as dendrons and acetylene as linkages. *J. Phys Chem B*, 114:11737–11745, 2010.
- [66] L. Aparicio-Ixta, J. Alba-Rosales, G Ramos-Ortiz, M. Rodriguez, J. Pichardo-Molina, G Gutierrez-Juarez, M. Sabanero-Lopez, L Flores, R. Santillan, V. Tellez-Lopez, and D. Martinez-Fong. Two-photon imaging of a cellular line using organic fluorescent nanoparticles synthesized by laser ablation. *Part. Part. Syst. Character.*, 33:101–109, 2016.
- [67] S. Kim, Q. Zheng, G. He, D. Bharali, H. Pudavar, A. Baev, and P. Prasad. Aggregation-enhanced fluorescence and two-photon absorption in nanoaggregates of a 9,10-bis[4'-(4"-aminostyryl)styryl]anthracene derivative. *Adv. Funct. Mater.*, 16:2317–2323, 2006.
- [68] J. Geng, C. Goh, N. Tomczak, J. Liu, R. Liu, L. Ma, L. Ng, G. Gurzadyan, and B. Liu†. Micelle/silica co-protected conjugated polymer nanoparticles for two-photon excited brain vascular imaging. *Chem. Mater.*, 26:1874–1880, 2014.
- [69] K. Li, Y. Jiang, D. Ding, X. Zhang, Y. Liu, J. Hua, S. Fenga, and B. Liu. Folic acid-functionalized two-photon absorbing nanoparticles for targeted MCF-7 cancer cell imaging. *Chem. Commun.*, 47:7323–7325, 2011.
- [70] N. Rahim, W. McDaniel, K. Bardón, S. Srinivasan, V. Vickerman, P. So, and J. Ho. Conjugated polymer nanoparticles for two-photon imaging of endothelial cells in a tissue model. *Adv. Mater.*, 21:3492–3496, 2009.

- [71] G. Ramos-Ortíz, J.L. Maldonado, M.C.G. Hernández, M.G. Zolotukhin, S.Fomine, N. Fröhlich, U. Scherf, F. Galbrecht, E. Preis, M. Salmon, J. Cárdenas, and M.I. Chávez. Synthesis, characterization and third-order non-linear optical properties of novel fluorene monomers and their cross-conjugated polymers. *Polymer*, 51:2351–2359, 2010.
- [72] T. Rajh, O. I. Micic, and A. J. Nozik. Synthesis and characterization of surface-modified colloidal CdTe quantum dots. *J. Phys. Chem.*, 97:11999–12003, 1993.
- [73] B. O. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen, and M. G. Bawendi. (CdSe)ZnS core-shell quantum dots: Synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites. *J. Phys. Chem. B*, 101:9463–9475, 1997.
- [74] U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, and T. Nann. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nature Methods*, 5:763–775, 2008.