



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

“Desarrollo de nanopartículas a partir de polímeros y moléculas con estructura donador-aceptor: estudio de su fluorescencia originada por la absorción de uno y dos fotones”

TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORADO EN INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS CON OPCIÓN
TERMINAL EN TECNOLOGÍA DE MATERIALES

M.I.C.A. KARLA KARINA GUZMAN RABADAN

DIRECTORES DE TESIS

DRA. MARISOL GÜIZADO RODRÍGUEZ

DR. MARIO ALEJANDRO RODRÍGUEZ RIVERA

SINODALES

DR. VICTOR BARBA LÓPEZ








DR. ROSENBERG J. ROMERO DOMINGUEZ

Cuernavaca, Morelos, a 19 de septiembre de 2018.

DRA. ELSA CARMINA MENCHACA CAMPOS
DIRECTORA INTERINA DEL CIICAp
P R E S E N T E

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la Tesis titulada **“Desarrollo de nanopartículas a partir de polímeros y moléculas con estructura donador-aceptor: estudio de su fluorescencia originada por la absorción de uno y dos fotones”** que presenta la alumna **Karla Karina Guzmán Rabadán**, para obtener el título de **Doctorado en Ingeniería y Ciencias Aplicadas** con opción terminal en **Tecnología de los Materiales**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
DR. ROSENBERG JAVIER ROMERO DOMÍNGUEZ	Aprobado	
DR. ARTURO MOLINA OCAMPO	Aprobado	
DR. JORGE URUCHURTU CHAVARÍN	Aprobado	
DR. JUAN CARLOS GARCÍA CASTREJÓN	Aprobado	
DR. VÍCTOR BARBA LÓPEZ	Aprobado	
DR. MARIO ALEJANDRO RODRÍGUEZ RIVERA	aprobado	
DRA. MARISOL GÚIZADO RODRÍGUEZ	Aprobado	

PLAZO PARA LA REVISIÓN 20 DÍAS HÁBILES (A PARTIR DE LA FECHA DE RECEPCIÓN DEL DOCUMENTO)

NOTA. POR CUESTION DE REGLAMENTACIÓN LE SOLICITAMOS NO EXCEDER EL PLAZO SEÑALADO, DE LO CONTRARIO LE AGRADECEMOS SU ATENCIÓN Y NUESTRA INVITACIÓN SERÁ CANCELADA.

RESUMEN

Los compuestos orgánicos que presentan un proceso eficiente de absorción de dos fotones (TPA) tienen diversas aplicaciones, ejemplo de ello es la Microscopia de Absorción de dos Fotones (TPM) por lo que han atraído recientemente gran interés por la comunidad científica. Esto ha generado una demanda para desarrollar nuevos colorantes con altos valores de sección transversal de TPA, los requerimientos necesarios para poder sintetizar este tipo de compuestos son estructuras π -conjugadas, con grupos donadores y aceptores de electrones así como puentes π -polarizables, altos valores de eficiencia cuántica de fluorescencia y una buena compatibilidad con medios biológicos, sin embargo la toxicidad de los disolventes en los cuales son solubles los compuestos orgánicos limita su uso en TPM, por lo que se han buscado métodos para introducir éste tipo de compuestos en medios acuosos. Para evitar estas limitaciones, la nanociencia ha proporcionado recientemente métodos para introducir moléculas orgánicas en medios biológicos como el agua. Por ejemplo, siguiendo estos métodos, se pueden sintetizar suspensiones acuosas de nanopartículas orgánicas¹, esferas de látex cargadas con colorante² y nanopartículas de sílice dopadas con colorante³. Entre estos métodos, éste último es particularmente atractivo debido a que la encapsulación con sílice hace que presenten diversas ventajas como excelente biocompatibilidad, no son tóxicas, ópticamente transparentes, altamente hidrofílicas y el revestimiento de sílice protege al fluoróforo del ambiente químico externo.

Basados en las características necesarias para desarrollar fluoróforos con un proceso eficiente de absorción de dos fotones, se realizó la síntesis química vía arilación directa de dos familias de compuestos con estructura donador-aceptor derivados del mismo donador, **fluoreno** el cual presenta excelentes propiedades como son alta eficiencia cuántica de fluorescencia, alta fotoestabilidad y propiedades ópticas no lineales, así como un excelente transporte de huecos, los grupos aceptores utilizados fueron **benzotiadiazol** (BT) el cual tiene un intervalo de energía angosto, deficiente de electrones y en combinación con el fluoreno da fluoróforos verdes altamente fluorescentes⁴ el otro grupo aceptor utilizado es la

tienopirrolodiona (TPD) la cual es una molécula simétrica, compacta y los compuestos derivados de ella dan una estructura coplanar y rígida.⁵ Se realizó también la caracterización fisicoquímica de los compuestos sintetizados de las dos familias mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de una y dos dimensiones, Cromatografía de Permeación en Gel (GPC), Análisis Termogravimétrico (TGA), Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), Infrarrojo Transformada de Fourier (FT-IR), Ultravioleta-visible (UV-vis) de absorción y Emisión. A partir de los compuestos sintetizados se fabricaron NPs de sílice mediante un proceso de microemulsión y se caracterizaron mediante espectroscopía Ultravioleta-visible (UV-vis) de absorción y emisión, fluorescencia de rayos X (XRF), Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (FESEM), finalmente se analizaron mediante el microscopio de fluorescencia para determinar de esta manera si en algún trabajo futuro las nanopartículas podrían ser usadas como biomarcadores.

En la familia del BT se sintetizaron compuestos con diferentes pesos moleculares desde 768 g/mol para el caso de **M1** que es la unidad monomérica, tres oligómeros (**O1aH**, **O1aT**, **O1b**) y dos polímeros (**P1bT** y **P1cT**), **P1cT** es el de mayor tamaño con un peso molecular medio numérico $M_n = 6086 \pm 1.4$ g/mol, los cuales presentan alta estabilidad térmica por arriba de 378 °C, altos valores de eficiencia cuántica de fluorescencia (QY), 92% en solución de THF para el caso de **M1**. La sección transversal de absorción de dos fotones se midió mediante el método de Fluorescencia Excitada por dos Fotones (TPEF) que dio un valor máximo de 18 GM a 730 nm para **O1b** y 2421 GM para **O1aT** a 760 nm en solución de THF y 55 GM para **NPS O1b**. Las NPs fabricadas de sílice dopadas con los compuestos derivados de BT tienen diámetros por debajo de 60 nm. Se realizó el análisis de **O1b** y **NPS O1b** a través de la técnica XRF con la finalidad de determinar la composición química de las diferentes muestras y así comparar los resultados obtenidos de las nanopartículas con la solución de **O1b**, los elementos presentes que se obtuvieron fueron Si (debido al recubrimiento con sílice), S y Br, elementos presentes en el dímero **O1b**, con lo que se puede corroborar la presencia del mismo en las nanopartículas, apoyando así los resultados obtenidos en los espectros de absorción y emisión en donde se observan las mismas bandas de absorción y

emisión con igual forma en los espectros de las nanopartículas **NPS O1b** comparado con los espectros de la solución **O1b**.

Al analizarse las NPs en el microscopio confocal y multifotónico, las **NPS O1aH** y **NPS O1b** tuvieron fluorescencia excitada por la absorción de uno y dos fotones.

En la familia de la TPD se sintetizaron tres polímeros (**P2aH**, **P2aT** y **P2bT**) con pesos moleculares de $M_n = 1404 \pm 0.5$, 3015 ± 0.8 y 2871 ± 3.7 g/mol, respectivamente. **P2aH** presentó la eficiencia cuántica de fluorescencia más alta de la familia 66 % en solución de THF. Se obtuvo un diámetro promedio de las nanopartículas menor a 70 nm. Al analizar las nanopartículas en los microscopios de fluorescencia solo se obtuvo emisión en el microscopio confocal con **NPS P2aH**.

ABSTRACT

Organic compounds that have an efficient absorption process of two photons (TPA) have many applications, for example, the Two Photons Absorption Microscopy (TPM), which has recently attracted great interest in the scientific community. This has generated a demand to develop new dyes with high TPA cross-section values, the necessary requirements to be able to synthesize this type of compounds are π -conjugated structures, with donor and acceptor electron groups as well as π -polarizable bridges, high values of quantum yield of fluorescence and a good compatibility with aqueous biological systems, however the toxicity of the solvents in which the organic compounds are soluble limits its use in TPM, so methods have been sought to introduce this type of compounds in aqueous media. To avoid these limitations, nanoscience has recently provided methods to introduce organic molecules into biological media such as water. For example, following these methods, aqueous suspensions of organic nanoparticles¹, dye-loaded latex spheres² and dye-doped silica nanoparticles³ can be synthesized. Among these methods, the latter is particularly attractive because the encapsulation with silica makes them have a lot of advantages such as excellent biocompatibility, they are not toxic, optically transparent, highly hydrophilic and the silica coating protects the fluorophore from the external chemical environment.

Based on the characteristics necessary to develop fluorophores with an efficient absorption process of two photons, chemical synthesis was carried out via direct arylation of two families of compounds with donor-acceptor structure derived from the same donor, **fluorene** which presents excellent properties such as high fluorescence quantum efficiency, high photostability and non-linear optical properties, as well as an excellent transport of holes, the acceptor groups used were **benzothiadiazole** (BT) which has a narrow energy gap, deficient in electrons and in combination with fluorene gives green fluorophores highly fluorescent, the other group acceptor used is **thienopyrrolodione** (TPD) which is a symmetric, compact molecule and the derivative compounds give a coplanar and rigid structure, as well as the physicochemical characterization of the synthesized compounds of the two families

by means of one- and two-dimensional Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Gel Permeation Chromatography (GPC), Thermogravimetric Analysis (TGA), Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Fourier Transform Infrared (FT-IR), Ultraviolet-visible (UV-vis), Emission (PL), cyclic voltammetry (CV). Silica nanoparticles were manufactured from the synthesized compounds by means of a microemulsion process and were characterized by means of ultraviolet-visible, emission, scanning electron microscopy of field emission (FESEM), finally they were analyzed by means of the fluorescence microscope to determine this so if in some future work the nanoparticles could be used as biomarkers.

In the BT family compounds with different molecular weights from 768 g / mol were synthesized for the case of **M1** which is the monomeric unit, three oligomers (**O1aH**, **O1aT**, **O1b**) and two polymers (**P1bT** and **P1cT**), **P1cT** is that of larger size with a number-average molecular weight $M_n = 6086 \pm 1.4$ g / mol, which have high thermal stability above 378 °C, 92% in solution of THF for the case of **M1**, which is desirable for the type of application sought for these compounds. The cross section of absorption of two photons (TPA) was measured by the method of Two Photon Excited Fluorescence (TPEF) that gave a maximum value of 18 GM at 730 nm for **O1b** and 2421 GM for **O1aT** at 760 nm in THF solution and 55 GM for **NPS O1b**. The nanoparticles made of silica doped with the compounds derived from BT have diameters below 60 nm. The analysis of **O1b** and **NPS O1b** was carried out through the XRF technique in order to determine the chemical composition of the different samples and thus compare the results obtained from the nanoparticles with the solution of the **O1b**, the present elements that were obtained were Si (due to the coating with silica), S and Br, elements present in the dimer **O1b**, which can corroborate the presence of the **O1b** in the nanoparticles, thus supporting the results obtained in the absorption and emission spectra where they are observed the same absorption and emission bands with the same shape in the spectra of the NPS **O1b** nanoparticles compared with the spectra of the parent **O1b** solution.

When analyzing the nanoparticles in the confocal and multiphoton microscope **NPS O1aH** and **NPS O1b** had fluorescence excited by the absorption of one and two photons.

In the TPD family, three polymers were synthesized (**P2aH**, **P2aT** and **P2bT**) with molecular weight of $M_n = 1404 \pm 0.5$, 3015 ± 0.8 and 2871 ± 3.7 g/mol, respectively. **P2aH** presented the highest fluorescence quantum yield of the 66% family in THF solution. An average diameter of the nanoparticles less than 60 nm was obtained. When analyzing the nanoparticles in the fluorescence microscopes, emission was only obtained in the confocal microscope with **NPS P2aH**.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora la Dra. Marisol Güizado por haberme brindado la oportunidad de unirme a su equipo de trabajo, gracias por su tiempo y apoyo para poder concluir una etapa más de mi vida profesional.

Al mi coasesor el Dr. Mario Alejandro Rodríguez Rivera por haberme permitido la oportunidad de conocer nuevos métodos de trabajo durante mis estancias en el CIO asesorándome en cada momento y siempre hacerme ser más analítica en los resultados que fui obteniendo, así como por transmitirme un poco de sus muchos conocimientos.

Al jurado revisor por la dedicación y el tiempo brindado en la revisión de la tesis, así como sus comentarios que enriquecieron este trabajo.

Dr. Rosenberg Javier Romero Domínguez

Dr. Arturo Molina Ocampo

Dr. Jorge Uruchurtu Chavarín

Dr. Juan Carlos García Castrejón

Dr. Victor Barba López

Al Dr. Gabriel Ramos Ortiz y al Dr. Jayaramakrishnan Velusamy por su apoyo en las mediciones ópticas no lineales.

Al Dr. Victor Barba por el análisis de Rayos X.

A mi amiga del laboratorio Arelis por todo su apoyo incondicional y hermosa amistad. A mis compañeros de laboratorio Jonatan, Alejandra, Paty, Miriam y Elías por su apoyo.

A la Dra. Olivia Hernández, Yunuen y el técnico Martín por su apoyo durante mis estancias en el CIO.

Al Centro de Investigaciones en Ingeniería y Ciencias Aplicadas (CIICAp), al Centro de Investigaciones Químicas (CIQ), al Centro de Investigaciones en Óptica (CIO) y al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA), por el apoyo brindado para la realización de esta tesis. Al CIQ por el análisis espectroscópico y al CIO caracterización óptica de las nanopartículas y al LNMA por el análisis de las nanopartículas en los microscopios de fluorescencia. Especialmente agradecemos el apoyo de CONACyT a través de los proyectos CB2015, 257543-Q y por la beca de doctorado no. 509845.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a Dios, por permitirme concluir una etapa más en mi vida profesional.

A mis hijos Emiliano y Paolo por darme la fortaleza para seguir luchando y darme la motivación para brindarles una mejor vida y poderlos guiar por un buen camino. ¡Los amo con todo mi corazón!

A mis padres Josefina y Marco por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; con su amor y apoyo incondicional muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. Me formaron con reglas y con algunas libertades, pero al final de cuentas, me motivaron constantemente para alcanzar siempre mis anhelos. Sin su ayuda hubiera sido casi imposible lograrlo.

A mi esposo Luis por su motivación, apoyo incondicional y amor.

A mis hermanos Marco y Ulises por estar siempre presentes aportando cosas buenas a mi vida, por los grandes momentos de felicidad, por su amor y apoyo.

ÍNDICE	
	Página
Resumen	III
Abstract	VI
Agradecimientos	IX
Dedicatorias	XI
Índice	XII
Lista de abreviaturas	XV
Lista de tablas	XVII
Lista de figuras	XVIII
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis	6
1.2 Objetivos	6
1.2.1 General	6
1.2.2 Específicos	6
1.3 Justificación	7
1.4 Alcance	7
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO	8
2.1 Luminiscencia	8
2.1.1 Procesos de des-excitación de moléculas excitadas	10
2.1.2 Tiempo de vida de fluorescencia y eficiencia cuántica	11
2.2 Introducción a los materiales con absorción de dos fotones	11
2.2.1 Fluorescencia excitada por la absorción de dos fotones	12
2.3 Técnicas para la medición de la sección transversal de absorción de dos fotones	13
2.3.1 Técnica z-scan	13
2.3.2 Técnica fluorescencia excitada por dos fotones (TPEF)	14
2.4 Estrategias de diseño y relación estructura-propiedad	16
2.4.1 Componentes moleculares: donadores, aceptores y puentes π	16
2.4.2 Métodos de síntesis: Arilación directa	18

2.5 Materiales orgánicos con alta actividad de absorción de dos fotones	19
2.6 Métodos utilizados para incorporar materiales con actividad bifotónica en suspensiones acuosas	23
2.6.1 Microemulsión	23
2.6.1.1 Síntesis de nanopartículas de sílice dopadas con orgánicos	24
2.6.2 Reprecipitación	25
2.6.3 Ventajas y desventajas de la formación de nanopartículas	26
2.7 Aplicaciones de los materiales con actividad bifotónica	26
2.7.1 Microscopía de fluorescencia de dos fotones	27
CAPÍTULO 3.- DESARROLLO EXPERIMENTAL	29
3.1 Condiciones experimentales: reactivos, disolventes y equipo utilizado	29
3.2 Síntesis química de los polímeros y moléculas	30
3.2.1 Síntesis química de la familia del benzotiadiazol	30
3.2.2 Síntesis química de la familia de la tienopirrolodiona	35
3.2.3 Síntesis química de las nanopartículas	37
CAPÍTULO 4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1 Caracterización fisicoquímica de los polímeros y moléculas	39
4.1.1 Caracterización espectroscópica: Resonancia Magnética Nuclear, FT-IR.	39
4.1.2 Difracción de rayos x	53
4.1.3 Espectroscopía de infrarrojo	55
4.1.4 Determinación de la distribución del peso molecular: GPC y espectrometría de masas	57
4.1.5 Caracterización térmica (TGA – DSC)	60
4.1.6 Caracterización óptica lineal: UV-vis, fluorescencia y eficiencia cuántica en solución de los fluoróforos	62
4.1.7 Caracterización óptica de las nanopartículas	65
4.1.8 Caracterización morfológica de las nanopartículas	69
4.1.9 Fluorescencia de Rayos X (XRF)	75

4.1.10 Fluorescencia inducida por la absorción de uno y dos fotones en el microscopio de fluorescencia.	76
4.1.11 Estudios de fluorescencia excitada de dos fotones (TPEF) para O1b (solución y NPS)	78
5.- CONCLUSIONES	81
6.- PERSPECTIVAS	83
7.- APÉNDICE	84
8.- REFERENCIAS	93

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
1PA	Absorción de un fotón
A	Aceptor
Aerosol-OT	1-sodio bis (2-etilhexil) sulfosuccinato
AIE	Emisión inducida por agregación
AIQ	<i>Quenching</i> por agregación inducida
APTES	3 - aminopropiltriétoxilano
BT	Benzotiadiazol
C	Carbono
C	Concentración
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₃ H ₂ PO ₂	Fosfonato
COOH	Carboxilo
COSY	Correlation spectroscopy
D	Donador
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
FESEM	Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo
FT-IR	Infrarrojo Transformada de Fourier
GM	Göppert-Mayer
GPC	Cromatografía de Permeación en Gel
HOMO	Orbital molecular ocupado de mayo energía
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	heteronuclear single-quantum correlation
ICT	Transferencia de carga intramolecular
M _n	Peso molecular medio numérico
M _w	Peso molecular medio másico
N	Nitrógeno
Net ₂	Dietil amino

NH ₂	Amina
NMe ₂	Dimetil amino
NMP	N-metil-2-pirrolidinona
NPh ₂	Difenil amino
NPs	Nanopartículas
ns	Nanosegundos
LUMO	Orbital molecular de menor energía desocupado
OH	Hidroxilo
OLEDs	Diodos Orgánicos Emisores de Luz
OPVs	Dispositivos Fotovoltaicos Orgánicos
Pd(OAc) ₂	Acetato de paladio
PEG	Poli(etilenglicol)
PivOK	Pivalato de potasio
PL	Fotoluminiscencia
QY	Eficiencia cuántica de fluorescencia
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
S	Azufre
SiNPs	Nanopartículas de sílice
TGA	Análisis Termogravimétrico
THF	Tetrahidrofurano
Ti	Titanio
TPA	Absorción de dos fotones
TPD	Tienopirrolodiona
TPEF	Fluorescencia Excitada por dos Fotones
TPM	Microscopía de Absorción de dos Fotones
UV-vis	Ultravioleta-visible
VTES	trietoxivinilsilano
XRF	Fluorescencia de rayos X

LISTA DE TABLAS	
	Página
Tabla 1.- Clasificación de la luminiscencia según la fuente de excitación.	8
Tabla 2.- Condiciones de reacción usados en cada uno de las rutas sintéticas para la síntesis de los compuestos derivados de BT.	34
Tabla 3.- Condiciones de reacción usados en cada uno de las rutas sintéticas para la síntesis de los compuestos derivados de TPD.	37
Tabla 4.- Correlaciones H-H obtenidas en el COSY con los respectivos desplazamientos químicos de los hidrógenos.	44
Tabla 5.-Resumen de las correlaciones C-H directamente Unidos y sus desplazamientos químicos obtenidos en el espectro del HSQC	46
Tabla 6.-Resumen de las correlaciones C-H a dos y tres enlaces de distancia y sus desplazamientos químicos obtenidos en el espectro del HMBC.	48
Tabla 7.- Bandas importantes de absorción infrarroja (cm^{-1}) de todos los compuestos sintetizados.	56
Tabla 8.- Resumen de pesos los moleculares de los compuestos sintetizados.	60
Tabla 9.- Resumen de las propiedades térmicas de los compuestos derivados de BT y TPD	61
Tabla 10.- Resumen de las propiedades ópticas de los compuestos derivados de BT y TPD en solución.	65
Tabla 11.- Tabla comparativa de las propiedades ópticas de los fluoróforos en solución, película y en nanopartícula.	67
Tabla 12.- Comparación de las propiedades ópticas de las nanopartículas NPS O1b sintetizadas en este trabajo con nanopartículas reportadas en la literatura derivadas de benzotiadiazol.	69
Tabla 13.- Resumen de los diámetros promedio de las nanopartículas.	75
Tabla 14.- Tabla de los resultados obtenidos mediante la técnica XRF de NPS O1b.	76
Tabla 15.- Propiedades del monocristal de M1	84
Tabla 16.- Distancias entre átomos de la estructura M1	85
Tabla 17.- Ángulos de torsión de los átomos de la estructura de M1	86

LISTA DE FIGURAS	
	Página
Figura 1.- Diagrama de Jablonski para excitación de un fotón (a) y dos fotones (b) El estado inicial (S0-V0) y final (S1-VN) tienen paridad opuesta. Los estados inicial (S0-V0) y final (S1-VN') tienen la misma paridad.	3
Figura 2.- Ejemplos de moléculas y polímeros con estructura donador-aceptor de las cuales se han sintetizado nanopartículas para aplicaciones como la TPM.	5
Figura 3.- Diagrama de Jablonski.	9
Figura 4.- Posibles rutas de des-excitación de moléculas excitadas.	10
Figura 5.- Parámetros que influyen la emisión de fluorescencia.	11
Figura 6.- Esquema de la técnica Z-scan. La energía de un tren de pulsos se mantiene constante, pero los cambios de intensidad se consiguen desplazando la muestra a lo largo de la dirección Z. La transmitancia es medida en cada posición z de la muestra	13
Figura 7.- Configuración experimental común de TPEF para medir la σ_{TPA} en materiales orgánicos	15
Figura 8.- Arquitecturas moleculares para la optimización de respuestas de TPA en compuestos orgánicos	17
Figura 9.- Comparación entre a) reacciones de acoplamiento tradicionales y b) reacciones de arilación directa para la síntesis de sistemas π conjugados	19
Figura 10.- Estructura del 2, 1, 3-benzotiadiazol.	20
Figura 11.- Ejemplos de compuestos que han sido utilizados como biomarcadores para microscopia de absorción de dos fotones.	21
Figura 12.- Estructura de la TPD.	22
Figura 13.- Esquemización de la formación de nanopartículas mediante la metodología de miniemulsión	24
Figura 14.- Esquemización de la metodología de reprecipitación	25
Figura 15.- Diagrama del microscopio confocal de fluorescencia. Un haz de rayos láser infrarrojo pulsado está fuertemente enfocado en la muestra con TPA $\propto I^2$, por lo que la excitación es confinada a la región focal. En la microscopía confocal	28

la emisión de esta, después del filtrado espectral, es fotografiada y transmitida por el <i>pinhole</i> ; la luz de otras regiones es en gran medida rechazada. Se crea una imagen 3D mediante la traducción de la muestra en relación con el foco. El inserto muestra los volúmenes de excitación del 50% para la absorción de un fotón (1PA) y la absorción de dos fotones (2PA), suponiendo que $\lambda = 800$ nm, NA = 1,4.	
Figura 16.- Esquema de las condiciones de reacción utilizadas para la síntesis de la familia del benzotiadiazol.	34
Figura 17.- Esquema de las condiciones de reacción utilizadas para sintetizar los compuestos de la familia de la tienopirrolodiona.	36
Figura 18.- Esquema de la síntesis de NPs de sílice dopadas con orgánicos.	38
Figura 19.- Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de O1b.	40
Figura 20 .- Espectro de RMN de ^{13}C a 400 MHz en CDCl_3 de O1b.	41
Figura 21.- Ampliación de la zona aromática del espectro de RMN de ^{13}C a 400 MHz en CDCl_3 de O1b.	41
Figura 22.- Ampliación de la zona alifática del espectro de RMN de ^{13}C a 400 MHz en CDCl_3 de O1b.	42
Figura 23.- Ampliación de la región alifática del espectro de RMN COSY a 400 MHz en CDCl_3 de O1b.	43
Figura 24.- Ampliación de la región aromática del espectro de RMN COSY a 400 MHz en CDCl_3 de O1b.	44
Figura 25.- Ampliación de la región alifática del espectro de RMN HSQC a 400 MHz en CDCl_3 de O1b.	45
Figura 26.- Ampliación de la región aromática del espectro de RMN HSQC a 400 MHz en CDCl_3 de O1b.	46
Figura 27.- Ampliación de la región alifática del espectro de RMN HMBC a 400 MHz en CDCl_3 de O1b.	47
Figura 28 a.- Ampliación de la región aromática del espectro de RMN HMBC a 400 MHz en CDCl_3 de O1b.	47
Figura 28 b- Ampliación de la región aromática del espectro de RMN HMBC a 400 MHz en CDCl_3 de O1b.	48

Figura 29.- Espectros de RMN de ^1H de a) M1, b) O1aH, C) O1aT, d) P1bT, e) P1cT a 400 MHz en CDCl_3 .	50
Figura 30.-Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de a) P2aH, b) P2aT y c) P2bT.	52
Figura 31.- Estructura molecular del compuesto M1. Distancias de enlace (\AA) = S1-C1 1.713(6), S1-C4 1.731(6), S2-C18 1.723(6), S2-C21 1.7463(6), N1-C23 1.349(8), N2-C24 1.341(8), N1-S3 1.622(6), N2-S3 1.627(7), C25-Br1 1.875(5). Ángulos de enlace ($^\circ$) = C1-S1-C4 92.7(3), S1-C4-C5 121.2(4), C18-S2-C21 92.7(3), S2-C18-C16 121.6(4), S2-C21-C22 120.3(4), N1-S3-N2 101.4(3). Ángulos de torsión ($^\circ$) = S1-C4-C5-C6 -173.7(4), S2-C18-C16-C17 -164.9(4), S2-C21-C22-C23 -169.7(5).	54
Figura 32.- a) y b) Diferentes conformaciones observadas para las dos moléculas independientes de M1 observadas en la celda unitaria. c) Estructura dimérica formada por las interacciones $\pi \cdots \pi$ d) Parte de la vista supramolecular que muestra el arreglo del apilamiento π .	55
Figura 33.- Espectros de FT-IR de los compuestos derivados de a) benzotiadiazol y b) tienopirrolodiona.	56
Figura 34.- Espectro de masas de M1 mediante impacto electrónico (EI) a 70 eV.	58
Figura 35.- Cromatogramas y curvas de distribución de peso molecular obtenidos por GPC de a) O1aH, b) O1aT, c) P1bT, d) P1cT, e) P2aH, f) P2aT y g) P2bT	59
Figura 36.- Termogramas de los compuestos derivados de a) benzotiadiazol y b) tienopirrolodiona	61
Figura 37.- Espectro de absorción normalizados en solución de los compuestos derivados de a) benzotiadiazol y b) tienopirrolodiona	63
Figura 38.- Espectro de emisión de los compuestos derivados de a) benzotiadiazol y b) tienopirrolodiona obtenidos bajo excitación UV a 365 nm.	64
Figura 39.- Espectro de absorción y emisión en solución, película y nanopartícula de a) O1aH, b) O1aT, c) O1b, d) P1bT, e) P2aH y f) P2bT	66
Figura 40.- Análisis morfológico de NPS O1aH a) distribución de tamaños obtenidos mediante FESEM, b) micrografías de las nanopartículas NPS O1aH	70

obtenidas a X100K y c) a X150K en el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo.	
Figura 41.- Análisis morfológico de NPS O1b a) Distribución de tamaños obtenidos mediante FESEM y b) micrografías de las nanopartículas NPS M1 obtenidas a X100K y c) a X150K en el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo.	71
Figura 42.- Análisis morfológico de NPS P1bT a) distribución de tamaños obtenidos mediante FESEM, b) micrografías de las nanopartículas NPS P1bT obtenidas a X100K y c) a X150K en el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo.	72
Figura 43.- Análisis morfológico de NPS P2aH a) Distribución de tamaños obtenidos mediante FESEM, b) micrografías de las nanopartículas NPS P2aH obtenidas a X100K y c) a X150K en el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo.	73
Figura 44.- Análisis morfológico de NPS P2bT a) distribución de tamaños obtenidos mediante FESEM, b) micrografías de las nanopartículas NPS P2bT obtenidas a X100K y c) a X150K en el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo.	74
Figura 45.- Líneas de fluorescencia de rayos X detectadas de una muestra de NPS O1b.	76
Figura 46.- Espectros de emisión obtenidos en el microscopio confocal Olympus FV1000 Multifotónico a) de NPS O1aH en modo confocal (448 nm) y modo multifotónico a 800 nm. b) de NPS O1b en modo confocal a 448 nm y en modo multifotónico a 950 nm, c) de NPS P1bT en modo confocal a 480 nm y c) NPS P2aH modo confocal a 448 nm.	77
Figura 47.- Imágenes obtenidas en el microscopio confocal Olympus FV1000 Multifotónico a) de NPS O1aH en modo confocal (448 nm) y modo multifotónico a 800 nm. b) de NPS O1b en modo confocal a 448 nm y en modo multifotónico a 950 nm, c) de NPS P1bT en modo confocal a 480 nm y c) NPS P2aH modo confocal a 448 nm	78

Figura 48.- (a) Superposición espectral entre el espectro de fluorescencia inducida por la absorción de uno y dos fotones de O1b. (b) Valor de secciones transversales de TPA de O1b en THF para el rango de excitación de longitud de onda de 680 – 870 nm (c) Valor de secciones transversales de TPA de NPs O1b en H ₂ O para la región de longitud de onda de 680 – 870 nm.	80
Figura 49.- Estructura de rayos X en monocristal de M1.	85
Figura 50.- Termograma de O1aH	86
Figura 51.- Termograma de O1aT	87
Figura 52.- Termograma de O1b	87
Figura 53.- Termograma de P1bT	88
Figura 54.- Termograma de P1cT	88
Figura 55.- Termograma de P2aH	89
Figura 56.- Termograma de P2aT	89
Figura 57.- Termograma de P2bT	90
Figura 58.- DSC P1bT	90
Figura 59.- P1cT	91
Figura 60.- DSC P2aH	91
Figura 61.- DSC P2aT	91
Figura 62.-DSC P2bT	92

CAPÍTULO 1.- INTRODUCCIÓN

La fluorescencia es uno de los fenómenos físicos más utilizados en microscopía biológica y analítica, sobre todo por su alto grado de sensibilidad y especificidad. La microscopía de fluorescencia incluso permite a los usuarios determinar la distribución de una sola especie de molécula, su cantidad y su ubicación dentro de una célula. Se pueden realizar estudios de localización e interacción, y se pueden observar las concentraciones de iones y procesos intra y extracelulares como la endocitosis y la exocitosis.

A lo largo de los años, muchas de las mejoras técnicas realizadas a los microscopios se centran en el aumento del contraste entre la señal y el fondo. Un claro ejemplo es la microscopía de fluorescencia o microscopía confocal ya que resalta solo los objetos de interés en un fondo negro. Debido a su selectividad intrínseca, las imágenes de fluorescencia se han convertido en el pilar de la microscopía para aplicaciones biomédicas. Durante las últimas décadas, diseñado una gran variedad de marcadores biológicos para teñir prácticamente cualquier aspecto imaginable de los sistemas biológicos.⁶

La óptica del microscopio confocal está diseñada para irradiar y coleccionar la luz emitida por moléculas fluorescentes situadas en un mismo plano focal del espacio tridimensional. Dicho microscopio cumple las siguientes cuatro funciones: 1) entregar luz de excitación de las longitudes de onda apropiadas para el espécimen; 2) separar la luz de excitación de la fluorescencia emitida; 3) recoger la mayor cantidad de fluorescencia emitida dada por los fluoróforos como sea posible; y 4) permitir la observación de detalles finos en el espécimen. Aunque la microscopía confocal proporciona una capacidad de seccionamiento óptico de alta resolución, tiene algunos problemas inherentes como la apertura confocal que reduce la señal de fluorescencia debido a la exclusión de planos adyacentes o fuera de foco, se necesita una mayor potencia de excitación de la luz UV, azul o verde, lo que aumenta la posibilidad de fotoblanqueo en el agente de contraste utilizado, mientras

que la alta energía de los fotones de dicha luz UV o visible puede inducir daños en la muestra biológica en estudio.⁷

La microscopia de fluorescencia de excitación de dos fotones (TPM) es una tecnología de imagen tridimensional que se basa en la excitación no lineal de fluoróforos y fue inventada por Denk *et al.*⁸ 1991. La TPM es considerada un revolucionario desarrollo en las imágenes biológicas que ha ganado gran aceptación en la comunidad biomédica debido a que presenta mayores ventajas a comparación de la microscopia de fluorescencia confocal por sus cuatro únicas capacidades: 1) TPM reduce el fotodaño y permite imágenes de especímenes vivos 2) puede obtener imágenes de especímenes turbios con una resolución submicrométrica hasta una profundidad de unos pocos cientos de micrómetros debido al uso de luz de excitación en un rango espectral de infrarrojo cercano (650 – 1000 nm), 3) TPM permite obtener imágenes de alta sensibilidad al eliminar la contaminación de la señal de fluorescencia por la luz de excitación. 4) localización tridimensional del volumen de excitación (reducción del fotobloqueo por excitación selectiva del volumen focal mediante limitación de la excitación de fluorescencia dentro de un volumen focal de tamaño de femtolitro.⁹

La TPA es un proceso óptico no lineal de tercer orden cuya magnitud es proporcional al cuadrado de la intensidad de la luz. La magnitud de TPA se puede cuantificar mediante la introducción del parámetro llamado sección transversal TPA (σ_{TPA}). Este parámetro se suele expresar en unidades Goppert-Mayer: 1 GM = $10^{-50} \text{cm}^4 \text{s}/\text{fotón}$.¹⁰ En la Figura 1 se muestra una comparación entre la absorción de uno y dos fotones, en ambos casos después de cualquiera de los procesos de excitación, el fluoróforo se relaja hasta el nivel de energía más bajo de los primeros estados electrónicos excitados a través de procesos vibracionales. Los subsiguientes procesos de emisión de fluorescencia.

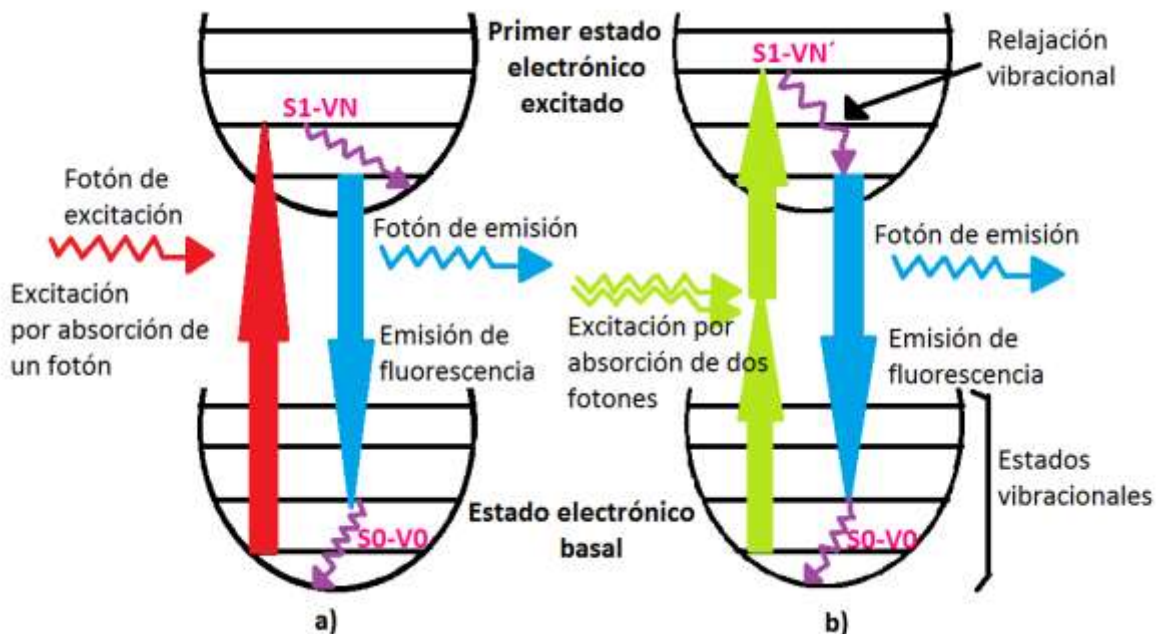


Figura 1.- Diagrama de Jablonski para excitación de un fotón (a) y dos fotones (b) El estado inicial (S0-V0) y final (S1-VN) tienen paridad opuesta. Los estados inicial (S0-V0) y final (S1-VN') tienen la misma paridad.⁹

Los colorantes fluorescentes orgánicos comerciales habituales utilizados actualmente en la formación de imágenes en la TPM presentan valores de sección transversal de TPA muy pequeño comúnmente en el intervalo de 1-100 GM (1 GM = $10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s}$)¹¹, baja intensidad de fluorescencia, baja fotoestabilidad lo que hace que los fluoróforos orgánicos comerciales no sean adecuados para la detección de alta sensibilidad y monitoreo en tiempo real, por lo que en la actualidad uno de los principales objetivos de la microscopía de fluorescencia de dos fotones es el diseño y síntesis de nuevos materiales con alta actividad bifotónica con la finalidad de utilizarlos como fluoróforos conocidos como biomarcadores o agentes de contraste y que cumplan además con requerimientos como alto rendimiento cuántico de fluorescencia, alta absorbancia, resistente al fotoblanqueo, suficiente estabilidad *in vitro* e *in vivo*; adecuada dispersabilidad en medios biológicos y no ser tóxicos.¹²

Se ha encontrado que los compuestos orgánicos fluorescentes, que presentan en su estructura grupos donadores, aceptores, puentes π polarizables, pueden tener altas propiedades de TPA. Sin embargo, la toxicidad de los disolventes orgánicos

en los que son solubles limita enormemente sus aplicaciones en la TPM, sin embargo se han hecho estudios recientes los cuales se han centrado en desarrollar métodos para traer moléculas orgánicas a medios biológicos como el agua, ejemplo de ello son las nanopartículas fluorescentes de sílice (SiNPs) las cuales contienen fluoróforos orgánicos y presentan muchas ventajas: tienen una excelente biocompatibilidad, no son tóxicos, altamente hidrofílicas, ópticamente transparentes, ajustables en tamaño y fácilmente modificables con diversas biomoléculas, además han demostrado ser inocuas y han sido ampliamente investigadas en la aplicación de la entrega de genes como portadores de ADN, la terapia fotodinámica como portadores de fotosensibilizadores y la bioimagen como nanoprobetas. La matriz externa de la cubierta de sílice protege a los fluoróforos de los factores externos como reacciones químicas y proporciona una capa hidrofílica para las nanopartículas lo que aumenta la fotoestabilidad y la biocompatibilidad de los colorantes fluorescentes orgánicos.¹³

Se ha encontrado que los polímeros¹⁴⁻¹⁵ y moléculas¹⁶ con estructura donador-aceptor han sido utilizadas en la fabricación de nanopartículas para aplicaciones como biomarcadores en la TPM, en la Figura 2 se muestran ejemplos de ellos. La estructura **1**¹⁷ es un polímero a partir del cual se fabricaron NPs las cuales se utilizaron como agentes de contraste para teñir células de cáncer de mama, la estructura **2**¹⁸ se ha utilizado para fabricar nanopartículas y a partir de las mismas se han tenido células de Hela, a partir de la molécula **3**¹⁹ se fabricaron nanopartículas y se han teñido células de cáncer de mama y a partir de la estructura **4**²⁰ se han fabricado nanopartículas de sílice con receptores de folato usadas para el biomarcado de células cancerosas.

La arilación directa presenta diversas ventajas sobre las reacciones de acoplamiento tradicionales como son: un menor número de pasos sintéticos, además de que no tiene subproductos organometálicos lo que hace que sea una alternativa verde.²¹

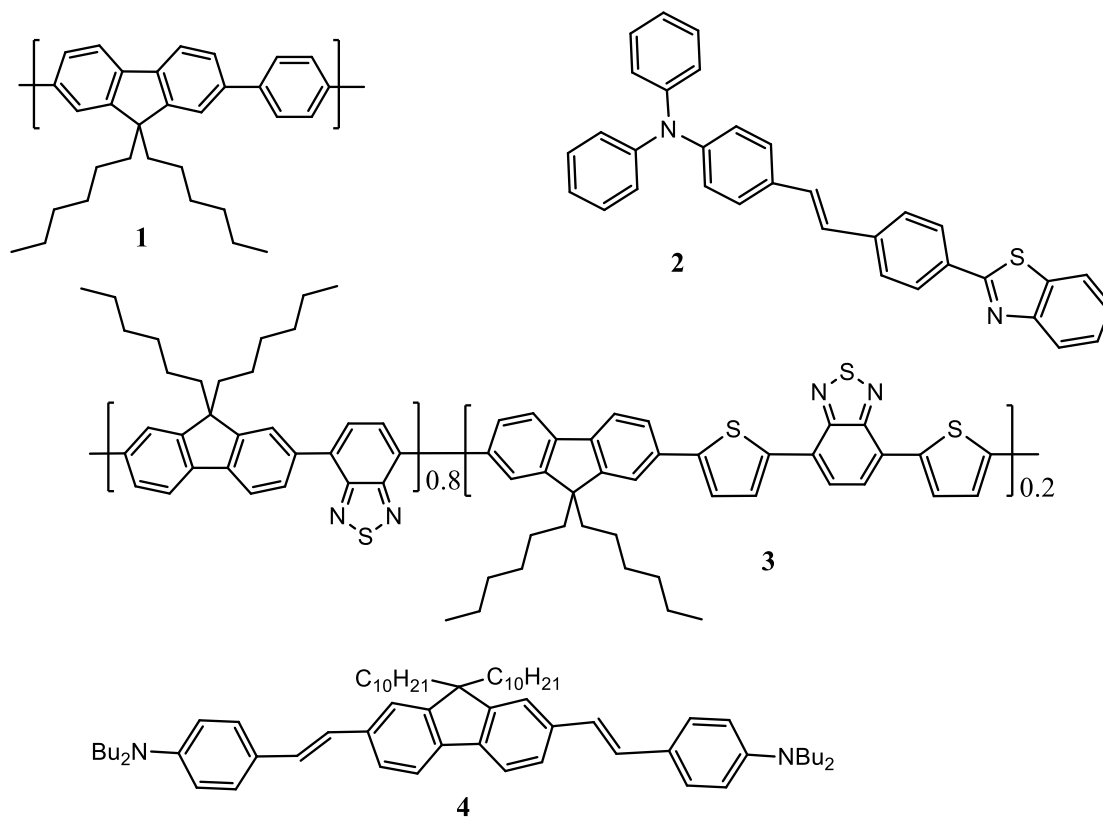


Figura 2.- Ejemplos de moléculas y polímeros con estructura donador-aceptor de las cuales se han sintetizado nanopartículas para aplicaciones como la TPM.

Hipótesis.

Los compuestos orgánicos basados en los fragmentos benzotiadiazol y tienopirrolodiona podrían funcionar como biomarcadores para la microscopía de fluorescencia de excitación de dos fotones debido a que tienen una arquitectura electrónica lineal del sistema π -conjugado, con una estructura donador-aceptor, altos valores de eficiencia cuántica de fluorescencia en solución, además de formar nanopartículas de sílice dopadas compatibles con sistemas biológicos.

1.1 Objetivos.

1.2.1 General.

Sintetizar y caracterizar fisicoquímicamente compuestos orgánicos derivados de benzotiadiazol y tienopirrolodiona con estructura donador-aceptor vía directa y fabricar nanopartículas dopadas con los mismos, así como medir la fluorescencia excitada por la absorción de uno y dos fotones de los compuestos en solución y en nanomateriales.

1.2.2 Específicos.

- Sintetizar dos familias de compuestos orgánicos vía arilación directa con una estructura donador-aceptor derivados de dos fragmentos aceptores, benzotiadiazol y tienopirrolodiona con el mismo grupo donador, fluoreno.
- Evaluar en cada familia la influencia que tiene el aumento de la conjugación del esqueleto π -conjugado (aumento del peso molecular) en las propiedades ópticas de los compuestos obtenidos
- Caracterizar fisicoquímicamente (RMN, FT-IR, GPC, DSC-TGA, espectrometría de masas) de los compuestos orgánicos sintetizados.
- Fabricar de nanopartículas (NPs) de sílice dopadas con los compuestos orgánicos sintetizados y realizar un análisis morfológico de estas mediante el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM).

- Realizar la caracterización óptica lineal (absorción y emisión por la absorción de un fotón) y no lineal (emisión inducida por la absorción de dos fotones) los compuestos sintetizados y sus NPs.
- Analizar la fluorescencia generada por la absorción de uno y dos fotones en los microscopios confocal y multifotónico, respectivamente.

1.3 Justificación.

En la microscopía de fluorescencia de excitación de dos fotones se utilizan láseres con longitudes de onda en el infrarrojo cercano, en donde las células son relativamente transparentes por lo que no dañan los tejidos. Los colorantes comerciales tienen bajos valores de sección transversal de TPA e insuficiente estabilidad, lo que hace que no sean adecuados para la TPM. En este trabajo de investigación se realizará la síntesis de compuestos vía arilación directa derivados de benzotriazol y tienopirrolodiona los cuales presentan una arquitectura electrónica lineal del sistema π -conjugado con elevada planaridad y alta conjugación lo cual favorece el transporte de carga intramolecular, además de tener una estructura donador-aceptor. Se fabricarán nanopartículas de sílice dopadas con los fluoróforos sintetizados y utilizando los microscopios confocal y multifotón se evaluará la fluorescencia generada por las nanopartículas por la excitación de uno y dos fotones respectivamente para su posible aplicación como marcadores biológicos.

1.4 Alcance

En este trabajo de investigación comprenderá la síntesis química vía arilación directa, caracterización fisicoquímica (RMN, FT-IR, UV-vis, GPC, TGA-DSC, espectrometría de masas, Rayos-X) de dos familias de compuestos derivadas de BT y TPD con una estructura donador-aceptor, así como la fabricación de nanopartículas de sílice dopadas con los compuestos sintetizados y caracterización óptica y morfológica de las mismas. Esto servirá de base para estudios posteriores que conlleven la aplicación de dichas nanopartículas como marcadores biológicos.

CAPÍTULO 2.- MARCO TEÓRICO

2.1 Luminiscencia

La luminiscencia es la propiedad de la materia de emitir luz procedente de estados electrónicamente excitados.²² La palabra luminiscencia, que viene del latín (*lumen* = luz), fue introducida por primera vez como *luminescenz* por el físico e historiador de la ciencia Eilhardt Wiedemann en 1888. En la Tabla 1 se muestran los tipos de luminiscencia de acuerdo con su modo de excitación.

Tabla 1.- Clasificación de la luminiscencia según la fuente de excitación.

Tipos de luminiscencia	Fuente de excitación
Fotoluminiscencia (fluorescencia, fosforescencia, fluorescencia retardada)	Absorción de luz (fotones)
Radioluminiscencia	Radiación ionizante (Rayos X, α , β , γ)
Catodoluminiscencia	Rayos catódicos (rayos de electrones)
Electroluminiscencia	Corriente eléctrica
Termoluminiscencia	Calefacción después del almacenamiento previo de energía (Por ejemplo, irradiación radiactiva).
Quimioluminiscencia	Reacción química (por ejemplo, oxidación)
Bioluminiscencia	Reacción bioquímica
Triboluminiscencia	Fuerzas de fricción y electrostática
Sonoluminiscencia	Ultrasonidos

Dependiendo de la naturaleza de los estados excitados, la luminiscencia es formalmente dividida en dos categorías, fluorescencia y fosforescencia. En la fluorescencia cuando una molécula absorbe un fotón de la longitud de onda apropiada un electrón se excita a un estado singulete de mayor energía y casi inmediatamente se colapsa de nuevo a su estado fundamental inicial tras la emisión de fotones, el electrón en el orbital excitado es apareado (por spin opuesto) con el segundo electrón en el orbital en estado basal. Por consiguiente, en el regreso al estado fundamental es permitido el giro y se produce rápidamente por la emisión de un fotón. La velocidad de emisión de fluorescencia es típicamente en el rango de

$10^9 - 10^{12} \text{ s}^{-1}$, de modo que un tiempo de vida de fluorescencia típica es cercano a 10 ns ($10 \cdot 10^{-9} \text{ s}$). La fluorescencia solo dura mientras exista una fuente de excitación. Debido a que hay una relajación vibracional, el fotón que es emitido tiene una longitud de onda más larga (menor energía que el fotón que fue absorbido). Esta descripción se puede observar gráficamente en el diagrama de Jablonski en el cual se ilustran los fenómenos que ocurren entre la absorción y la emisión. Un diagrama típico de Jablonski se muestra en la Figura 3. Muestra una serie de estados energéticos representados con líneas horizontales apiladas, cada nivel tiene subniveles. Hay dos tipos de estados excitados caracterizados por diferentes estados de espín: estado excitado singulete y triplete. Al excitarse un electrón pasa a un estado excitado singulete (flecha roja apuntando hacia arriba) y al regresar al estado fundamental la energía se puede emitir (flecha roja apuntando hacia abajo), o bien pueden ocurrir otros procesos como conversión interna en donde la energía se libera en forma de calor (flechas onduladas apuntando hacia abajo). También puede ocurrir que el electrón pase a un estado excitado triplete mediante un cruce entre sistemas (flecha punteada).²³

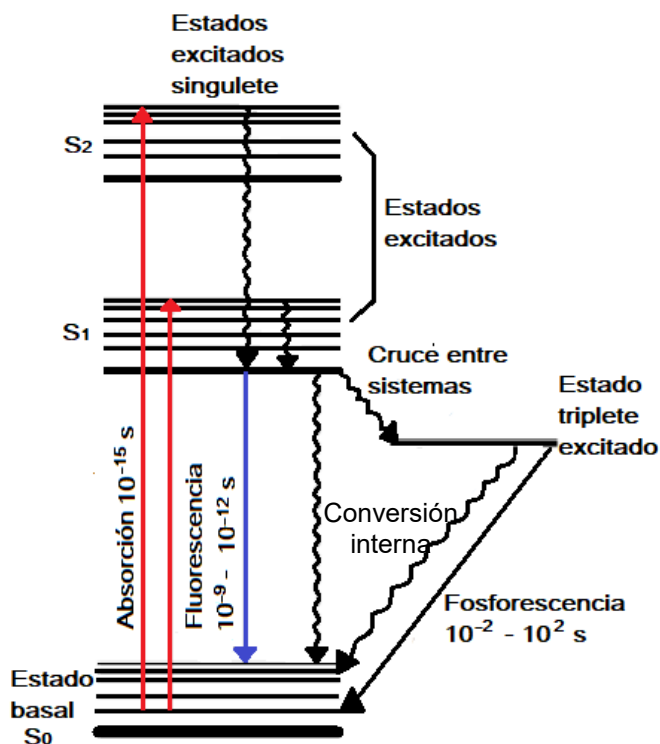


Figura 3.- Diagrama de Jablonski.²³

2.1.1 Procesos de des-excitación de moléculas excitadas

Una vez que una molécula es excitada por la absorción de un fotón, hay diversos caminos con los cuales regresa a su estado basal, con la emisión, transferencia de carga intramolecular, cambio conformacional o bien fosforescencia después de un cruzamiento entre sistemas. También hay interacciones en el estado excitado con otras moléculas como son transferencia de electrón, transferencia de protón, transferencia de energía, formación de excímeros o exciplotes (Figura 4) las cuales podrían también competir con la des-excitación si ellos toman lugar en una escala de tiempo comparable con el promedio de tiempo (tiempo de vida) durante el cual las moléculas se quedan en estado excitado.

Las técnicas fluorométricas tienen alta sensibilidad y especificidad de las características de fluorescencia debido al microambiente de la molécula emisora y de la capacidad de estas últimas para proporcionar información espacial y temporal, debido a esto la fluorescencia es una herramienta poderosa de investigación en el estudio de la estructura dinámica de la materia o sistemas vivos. La Figura 5 muestra los parámetros físicos y químicos que caracterizan el microambiente y pueden afectar así las características de emisión de una molécula.²⁴

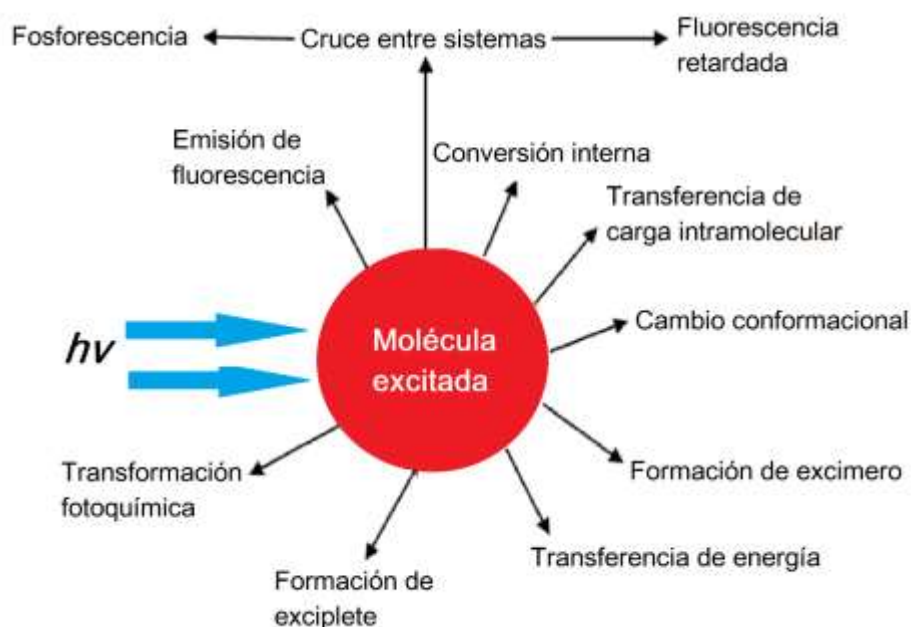


Figura 4.- Posibles rutas de des-excitación de moléculas excitadas.²⁴

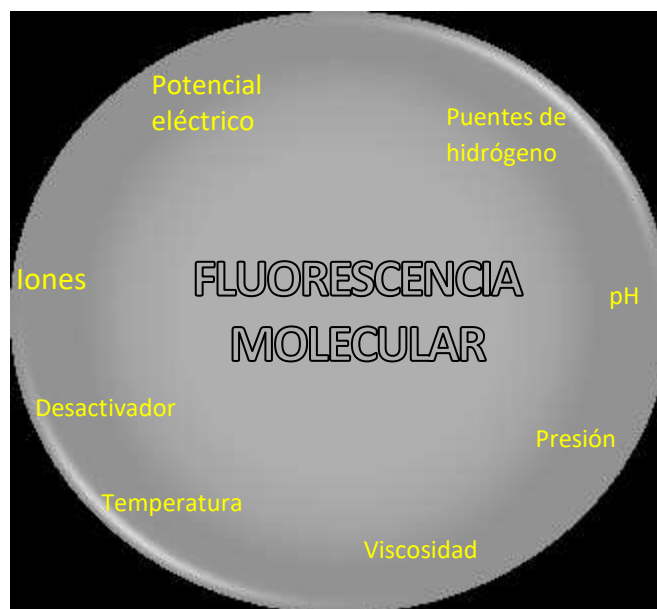


Figura 5.- Parámetros que influyen en la emisión de fluorescencia.²⁴

2.1.2 Tiempo de vida de fluorescencia y eficiencia cuántica

Las características más importantes de un fluoróforo son el tiempo de vida de fluorescencia y la eficiencia cuántica. La eficiencia cuántica es el número de fotones emitidos en relación con el número de fotones absorbidos. El tiempo de vida también es importante, ya que determina el tiempo disponible del fluoróforo para interactuar o difundirse en el medio ambiente y por lo tanto la información disponible de su emisión.²⁵

2.2 Introducción a los materiales con absorción de dos fotones

Los materiales con absorción de dos fotones han sido ampliamente estudiados por su excitación altamente localizada y su eficiencia de excitación no lineal, en esta sección se presentan los procesos involucrados en la absorción de dos fotones, las estrategias de diseño y la relación estructura-propiedad, aplicaciones, así como los avances más recientes en dichos materiales.

2.2.1 Fluorescencia excitada por la absorción de dos fotones

Las moléculas pueden excitarse a un estado electrónico de mayor energía desde el estado basal por absorción de fotones. Una molécula suele ser excitada por un fotón que tiene energía similar a la de su banda prohibida (diferencia de energía entre el orbital molecular más alto ocupado y el orbital molecular más bajo desocupado). Sin embargo, algunas moléculas expuestas a luz de alta intensidad también pueden someterse a la absorción casi simultánea de dos fotones. La energía combinada de los dos fotones también puede acceder al estado excitado estable de la molécula. Este proceso se denomina absorción de dos fotones (TPA por sus siglas en inglés). En este proceso un fotón primero interactúa con la molécula y promueve una transición del estado fundamental a un estado virtual temporal de energía más alta. Este no es un estado real de la molécula y sólo existe durante un corto intervalo de tiempo ($\sim 10^{-15}$ - 10^{-16} s). Si durante este intervalo de tiempo otro fotón interactúa con la molécula, el estado excitado puede ser alcanzado. El adjetivo "simultáneo" para TPA se utiliza para indicar que los dos fotones interactúan con la molécula dentro del intervalo de tiempo antes mencionado y que ningún estado real actúa como un estado intermedio en este proceso.²⁶

La absorción simultánea de dos fotones por la misma molécula fue primeramente analizada teóricamente en 1930 por María Göppert-Mayer²⁷ (Figura 6) quien calculó la probabilidad de transición para la absorción de dos cuantos, de energía, y fue demostrada experimentalmente en 1961,²⁸ poco después de la invención del láser. La absorción de dos fotones se hizo más fácil de investigar, ya que los láseres pulsados sub-picosegundos se volvieron más fácilmente disponibles en la década de 1990 (particularmente el láser Ti: zafiro). La invención de la microscopía de fluorescencia de dos fotones por Webb y colaboradores,²⁹ y la rápida adopción de esta técnica por los fabricantes de microscopios confocales, ha llevado a una explosión de interés en todo tipo de procesos multifotón.³⁰

La sección transversal de TPA está relacionado con la cantidad de fotones que las moléculas pueden absorber bajo excitación de dos fotones, lo cual está generalmente relacionada con la polarizabilidad de una molécula, su longitud de

conjugación π -electrón y la fuerza donante / aceptora de los sustituyentes del fluoróforo.

2.3 Técnicas para la medición de la sección transversal de absorción de dos fotones

Las dos técnicas más comúnmente utilizadas para la medición de la sección transversal de absorción de dos fotones (σ_{TPA}) son TPEF (*two photon excited fluorescence*) y Z-scan sin embargo existen otras menos comunes como son lente térmica y mediciones fotoacústicas.

2.3.1 Técnica Z-scan

La técnica de Z-scan fue desarrollada por el grupo CREOL (Center for Research in Electra-Optics and Lasers)³¹ es un método directo, sensible y simple de medir con precisión las no linealidades ópticas dependientes de la intensidad de los materiales, en esta técnica se monitorea la transmitancia de la muestra bajo prueba en función de la intensidad incidente de un haz láser. La muestra se mueve a lo largo de la dirección de propagación (eje Z) de un haz enfocado, y la variación de la intensidad del campo lejano se utiliza para determinar la no linealidad óptica. Se utilizan principalmente haces gaussianos en las mediciones de Z-scan.³² En la figura 6 se puede observar un esquema de la configuración de la técnica Z-scan.

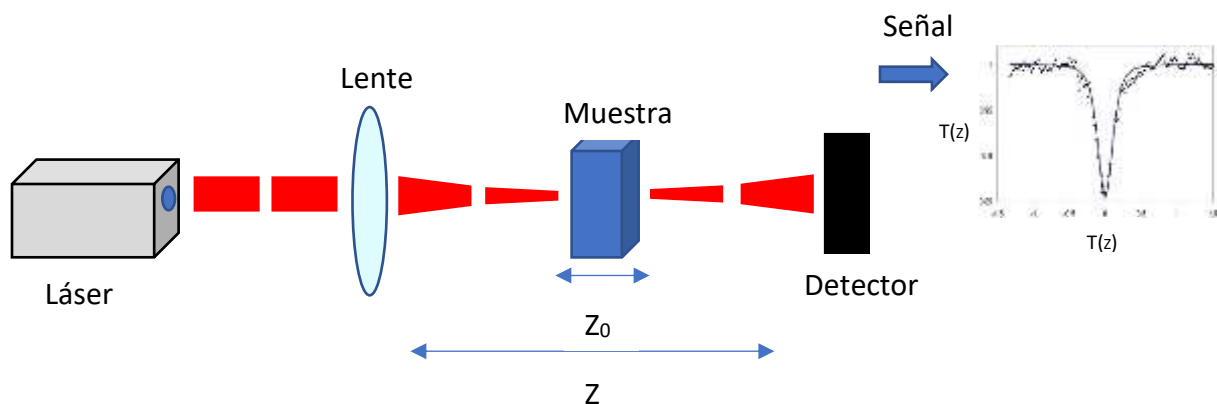


Figura 6.- Esquema de la técnica Z-scan. La energía de un tren de pulsos se mantiene constante, pero los cambios de intensidad se consiguen desplazando la muestra a lo largo de la dirección Z. La transmitancia es medida en cada posición z de la muestra.³²

La curva Z-scan obtenida es simétrica con respecto al foco ($z = 0$), con un mínimo en la transmitancia (absorción multifotónica). La transmitancia normalizada está dada por la ecuación 1:

$$T_{(z)} = 1 - \frac{1}{3} \sigma_{TPA} \frac{CN_A}{\hbar\omega} \frac{I_0 L_{eff}}{1 + (\frac{z}{z_0})^2} \quad [\text{Eq. 1}]$$

Donde C es la concentración del material (normalmente los materiales orgánicos con caracterizados en solución), N_A es el número de Avogadro, ω es la frecuencia óptica del láser, Z_0 el rango Rayleigh del haz, I_0 la intensidad de pico en $z = 0$ y L_{eff} el espesor efectivo de la muestra.

El método Z-scan solo puede emplearse en materiales no fluorescentes o débilmente fluorescentes.

2.3.2 Técnica Fluorescencia excitada por dos fotones (TPEF)

La intensidad TPEF proporciona información sobre la eficiencia de absorción de dos fotones. En esta técnica se mide la intensidad de fluorescencia generada por una solución del material sometido a evaluación después de ser excitado por la absorción de dos fotones. A partir de la señal de fluorescencia de dos fotones la sección transversal de TPE (fluorescencia de excitación de dos fotones) σ_{TPE} puede ser determinada. En la Figura 7 se muestra una configuración experimental representativa. El σ_{TPE} es linealmente proporcional a σ_{TPA} siendo la constante de proporcionalidad la eficiencia cuántica de fluorescencia (η) de la muestra $\sigma_{TPE} = \eta \sigma_{TPA}$.³³

Se han realizado algunas variantes de dicho experimento desde que se reportó por primera vez por Webb y colaboradores.³⁴ Sin embargo, si una muestra de calibración estándar de σ_{TPE} y espectros está disponible, entonces en el enfoque más simple se comparan los espectros de fluorescencia excitada de dos fotones de la muestra con la muestra de referencia probada en condiciones idénticas. Con este método es posible cancelar automáticamente un gran número de variables. Por ejemplo, no es necesario conocer los parámetros relacionados con la excitación (energía del pulso, duración del pulso y distribución de la intensidad temporal).³⁵ La

ecuación para calcular la sección transversal de absorción de dos fotones está dada por la ecuación 2:

$$\sigma_{TPA}(\lambda) = \sigma_{TPA(ref)}(\lambda) \frac{\eta_{ref}(\lambda)C_{ref}}{\eta(\lambda)C} \frac{[F(t)]}{[F(t)]_{ref}} \frac{\eta_{ref}}{n} \quad [\text{Eq. 2}]$$

Donde C es la concentración de la solución, [F(t)] es el tiempo promedio de emisión de fluorescencia, η es el índice de refracción de la muestra, y λ es la longitud de onda de excitación. El subíndice *ref* indica los parámetros del compuesto utilizado como referencia o estándar.

El método TPEF solo puede usarse en materiales fluorescentes, otra desventaja es la dificultad de implementarlo en compuestos que exhiben emisión dependiente de la longitud de onda (en forma de banda o eficiencia) o emisión dual, así como en muestras en estado sólido, en estos casos un método más conveniente es el de Z-scan.

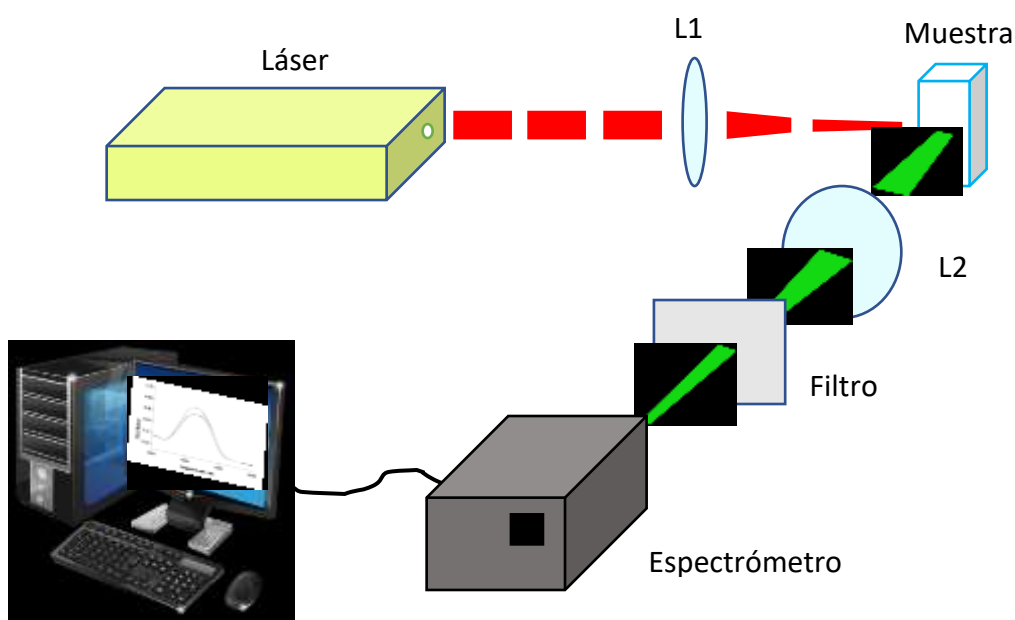


Figura 7.- Configuración experimental común de TPEF para medir la σ_{TPA} en materiales orgánicos.³³

2.4 Estrategias de diseño y relación estructura-propiedad

Durante las últimas décadas una gran cantidad de científicos han enfocado esfuerzos en el desarrollo de moléculas orgánicas y polímeros con esqueletos π -conjugados con propiedades ópticas no lineales, hasta ahora los valores más altos reportados de sección transversal de absorción de dos fotones está en el rango de 10^2 - 10^4 GM.

2.4.1 Componentes moleculares: donadores, aceptores y puentes π

La arquitectura de las moléculas orgánicas que se han investigado por su absorción de dos fotones y sus propiedades fluorescentes se podrían clasificar en dos grupos principales: (a) arquitecturas lineales y (b) bidimensionales. Para ambas arquitecturas, existen algunos requisitos para maximizar la respuesta de la sección transversal de TPA: un componente rico en electrones (grupo donador D), un componente atractor de electrones (grupo aceptor A), o ambos componentes,³⁶ puentes π -polarizables, en este contexto, el término puente se refiere a un sistema con un esqueleto π -conjugado. La coplanaridad también es crítica para mejorar la eficiencia de una transferencia de carga intramolecular. Desde el punto de vista estructural y considerando un proceso de transferencia de carga intramolecular como fuerza motriz se requieren compuestos orgánicos π -conjugados con *band gaps* electrónicos en la región del visible.³⁷ Los grupos donadores (D) generalmente utilizados son grupos amino como difenilamino (NPh₂), dimetilamino (NMe₂) o dietilamino (NEt₂) los cuales son los más utilizados, otros fragmentos usados como aceptores (A) son antraceno, fluor, benzotiadiazol, triazina, porfirina y derivados de bodipys. Para el puente π entre el D y A es común utilizar anillos aromáticos o heteroaromáticos como el tiofeno, un fragmento ampliamente utilizado es también el fluoreno³⁸ debido a su capacidad de extender la longitud de conjugación a través de la estructura plana, así como carbonos con triple enlace.

En arquitecturas lineales se encuentran arquitecturas dipolares (D- π -A) y cuadrupolares tales como: donador-puente-donador (D- π -D), aceptor-puente-aceptor (A- π -A), donador-aceptor-donador (D- π -A- π -D) y aceptor-donador-aceptor (A- π -D- π -A).³⁹ Figura 8. En las arquitecturas octupolares se tienen tres dipolos tales como macrociclos π -conjugados, por ejemplo las porfirinas.⁴⁰

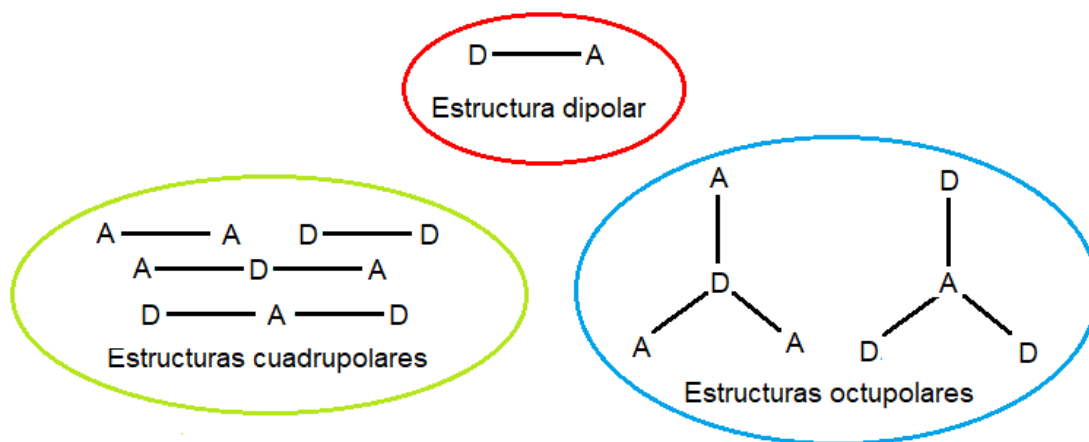


Figura 8.- Arquitecturas moleculares para la optimización de respuestas de TPA en compuestos orgánicos.⁴⁰

La diferencia de energía entre el HOMO (orbital molecular ocupado de mayor energía) al LUMO (orbital molecular de menor energía desocupado) es el *band gap* óptico correspondiente a la transición de excitación promovida por TPA. Dependiendo de la simetría de la molécula orgánica, este *gap* o intervalo puede ser el mismo o diferente que el promovido por la transición de absorción de un fotón (absorción lineal). Por ejemplo, en las moléculas centrosimétricas el TPA máximo suele aparecer a energías más altas que el pico correspondiente a la transición de absorción de un fotón. Esto se debe a que las transiciones de un fotón y dos fotones están reguladas por diferentes reglas de selección de dipolos.⁴¹

2.4.2 Métodos de síntesis: Arilación directa

Los polímeros y moléculas semiconductores conjugados con propiedades optoelectrónicas como las anteriormente mencionadas para aplicaciones como la TPM se sintetizan normalmente a través de reacciones de policondensación catalizadas por metales de transición, como los acoplamientos Suzuki-Miyaura y Migita-Kosugi-Stille. Sin embargo, estos métodos de síntesis requieren la preparación de monómeros funcionalizados organometálicos de alta pureza tales como ácido aril diborónico / éster diborónico (para el acoplamiento de Suzuki) y aril diestaño (para el acoplamiento de Stille) utilizando precursores inflamables y tóxicos, además estas reacciones de policondensación tienen subproductos tóxicos tales como compuestos de trialkylestaño, que se convertiría en un problema clave en la futura comercialización de los compuestos para aplicaciones de electrónica orgánica.⁴²

Recientemente se ha reportado y recibido mucha atención una nueva química de acoplamiento llamada arilación directa para la construcción de nuevos enlaces C-C de moléculas y polímeros π conjugados porque involucra el acoplamiento de un monómero de haluro de arilo directamente con otro monómero de areno sin la necesidad de preactivación de enlaces C-H, por lo que no se usan reactivos organometálicos que son inflamables (por ejemplo, n-BuLi) o altamente tóxicos (por ejemplo, organo-estaño) y de ésta manera se reducen los pasos de síntesis. Por lo tanto, la arilación directa es un enfoque eficiente y ambientalmente amigable en comparación con los métodos de acoplamiento tradicionales (como los acoplamientos Stille y Suzuki). Además de las ventajas mencionadas anteriormente para la arilación directa, algunos materiales poliméricos conjugados preparados por arilación directa exhiben pesos moleculares más altos y menos defectos que los obtenidos por reacciones de polimerización de acoplamiento tradicionales.⁴³ En la Figura 9 se representa esquemáticamente una comparación entre las reacciones de acoplamiento tradicionales y reacciones de arilación directa para la síntesis de sistemas π conjugados.



Figura 9.- Comparación entre a) reacciones de acoplamiento tradicionales y b) reacciones de arilación directa para la síntesis de sistemas π conjugados. ⁴³

2.5 Materiales orgánicos con alta actividad de absorción de dos fotones

La variación de los grupos sustituyentes donadores y aceptores se ha convertido en un enfoque popular para crear nuevos materiales orgánicos con actividad bifotónica. Se ha encontrado que moléculas y polímeros presentan procesos de absorción de dos fotones eficientes los cuales han sido utilizados como biomarcadores. En los siguientes párrafos se detallan las características de los fragmentos utilizados en este trabajo de investigación.

Derivados de benzotiadiazol

Dentro de la gama de grupos donadores usados el benzotiadiazol ha sido ampliamente utilizado debido a que tiene propiedades fotofísicas interesantes para aplicaciones en la TPM, tiene un intervalo de energía angosto, deficiente de electrones y en combinación con el fluoreno da fluoróforos verdes altamente fluorescentes. Estudios cristalográficos representativos han confirmado que los átomos de C, N y S en el núcleo de 2,1,3-benzotiadiazol son esencialmente coplanares y que el enlace intramolecular está bien representado por la estructura quinoidal, Figura 10.

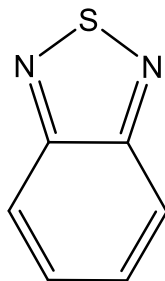


Figura 10.- Estructura del 2, 1, 3-benzotriazol.

Además, las unidades de 2,1,3-benzotriazol se han incorporado como restos pobres en electrones en varios polímeros *push-pull* conjugados con π y pequeñas moléculas para uso como materiales luminiscentes y como componentes de dispositivos optoelectrónicos de película delgada, incluidos diodos, celdas solares, transistores de efecto de campo y biosensores.⁴⁴ En la Figura 11, se muestran ejemplos de compuestos derivados de benzotriazol que presentan altas propiedades de absorción de dos fotones. Junlong Geng, Chi Ching Goh, *et al.*⁴⁵ reportaron la síntesis de NPs de sílice dopadas con (9,9-dihexilfluoreno-alt-2,1,3-benzotriazol) (polímero **1**) llamadas PFBT-F127-SiO₂ NPs las cuales muestran una sección transversal de 1085 GM a 810 nm con una eficiencia de fluorescencia de 75 %, utilizaron una matriz de F127 como estrategia para aumentar la eficiencia cuántica de fluorescencia así como la sección transversal de absorción de dos fotones, con lo que obtuvieron un alto rendimiento cuántico al reducir el *quenching* por agregación. La estructura **2**⁴⁶ es un polímero conjugado cruzado con estructura cuadrupolar derivado de BT el cual exhibe una sección transversal de absorción de dos fotones de 9860 GM a 740 nm y se han fabricado NPS a partir del mismo las cuales han sido utilizadas para teñir células de HeLa. La molécula **3**⁴⁷ tiene una sección transversal TPA de 2600 GM a 750 nm en solución, el compuesto **4**⁴⁸ presenta una sección transversal de 1000 GM en solución.

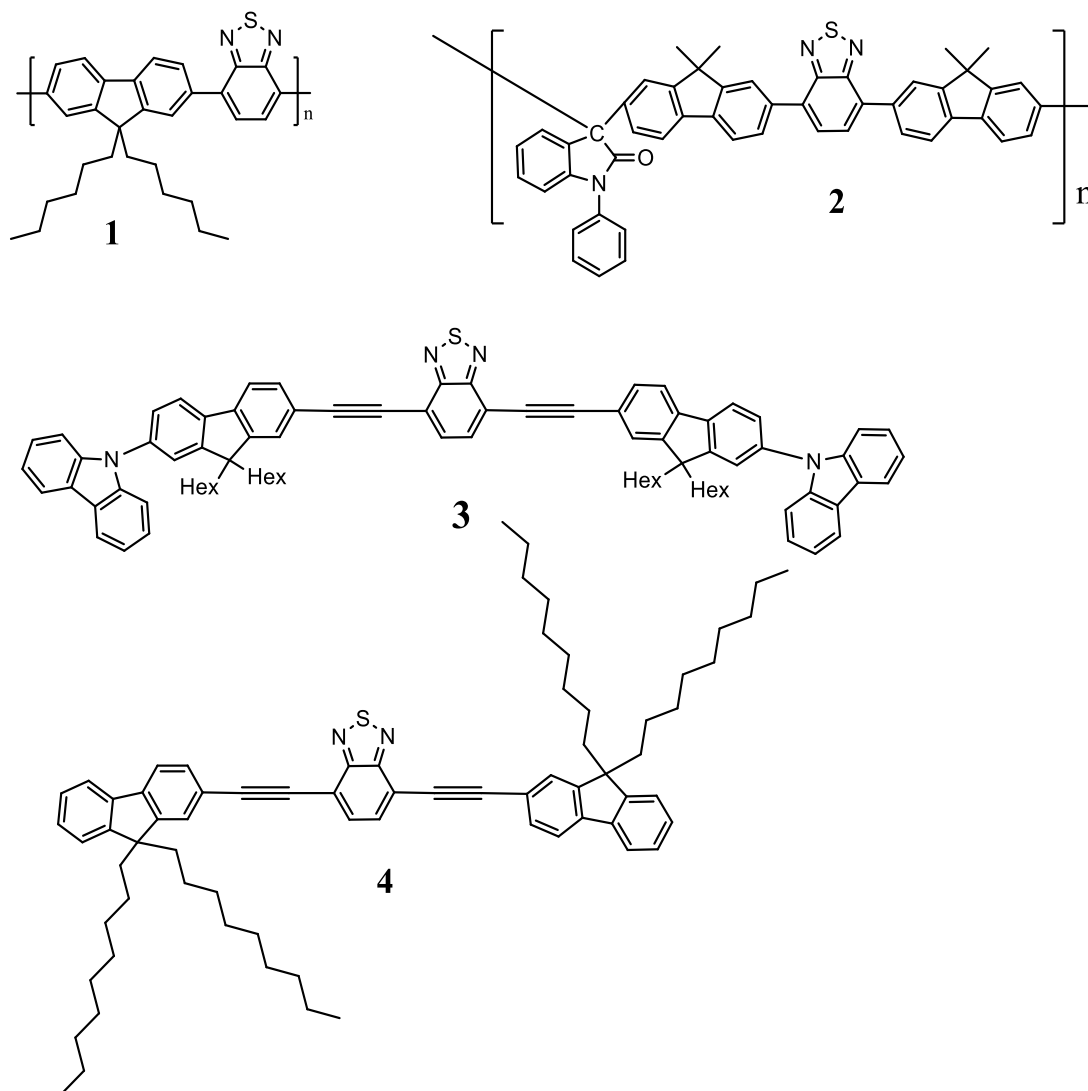


Figura 11.- Ejemplos de compuestos que han sido utilizados como biomarcadores para microscopia de absorción de dos fotones.

Tienopirrolodiona

La 5-(2-etilhexil)-4H-tieno[3,4-c]pirrolo-4,6(5H)-diona (TPD) es un grupo aceptor de electrones simétrico, compacto y rígido.⁴⁹ Los compuestos orgánicos basados en anillos TPD dan estructuras coplanares, con altas eficiencias cuánticas de fluorescencia y también forman una disposición quinoide de tiofeno-maleimida para estabilizar la estructura y el estado de energía excitado por lo que han sido ampliamente utilizados en aplicaciones como celdas solares orgánicas (OPVs)⁵⁰, diodos orgánicos emisores de luz (OLEDs)⁵¹, transistor de película delgada⁵². De

cuántico de fluorescencia, grandes no linealidades ópticas, gran fotoestabilidad y excelentes propiedades de transporte de huecos.⁵⁷

2.6 Métodos utilizados para incorporar materiales con actividad bifotónica en suspensiones acuosas

Cómo se mencionó anteriormente, una de las limitantes que presentan los compuestos orgánicos en la aplicación como biomarcadores usados en la microscopía de absorción de dos fotones es que normalmente son solubles en disolventes orgánicos, los cuales son tóxicos para las células, por lo que para superar dicha adversidad se han encontrado métodos para estabilizar moléculas orgánicas en agua como son la síntesis de nanopartículas, su fabricación en tamaños y propiedades deseadas, biocompatibilidad y su no toxicidad hacen estos materiales altamente atractivos para las aplicaciones dentro de los métodos más utilizados está el de microemulsión y reprecipitación, a continuación se muestran cada una de ellas así como sus ventajas y desventajas.

2.6.1 Microemulsión

Este es el método más común utilizado en la síntesis de nanopartículas a base de compuestos π -conjugados. La metodología consiste en disolver el compuesto en un disolvente orgánico inmiscible en agua y luego la solución resultante se inyecta en una solución acuosa que contenga un surfactante apropiado.⁵⁸ La mezcla se agita rápidamente con ondas ultrasónicas para formar miniemulsiones estables que contienen pequeñas gotas de la solución del compuesto orgánico. Finalmente, el disolvente orgánico es evaporado y las NPs quedan suspendidas en el agua. Se ha encontrado que con esta metodología se puede obtener una gama amplia de tamaño de NPs (30 a 500 nm) dependiendo de la concentración de la solución del compuesto orgánico utilizado. Unas de las desventajas que presenta esta metodología es la maduración de Ostwald la cual desestabiliza las NPs, al igual que la floculación causada por la coalescencia de las gotitas. La floculación y la maduración de Ostwald se pueden evitar con la adición de un surfactante a la fase dispersa. El surfactante promueve la formación de una presión osmótica dentro de las gotitas que contrarresta la presión de Laplace previniendo la difusión de una

gotita al medio acuoso circundante.⁵⁹ En la Figura 13 se esquematiza la formación de NPs mediante miniemulsión.

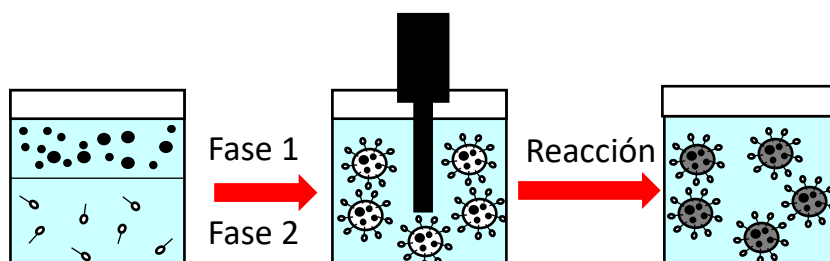


Figura 13.- Esquematación de la formación de nanopartículas mediante la metodología de miniemulsión.⁵⁹

2.6.1.1 Síntesis de nanopartículas de sílice dopadas con orgánicos

La necesidad de nuevos materiales para la fabricación de nanopartículas fluorescentes ha aumentado rápidamente, dentro de los tipos de nanopartículas que existen las NPs de sílice dopadas con orgánicos (SiNPs) sintetizadas mediante la técnica de microemulsión tienen un gran potencial para desarrollar agentes de contraste como una plataforma nueva e ideal para el monitoreo de células vivas y el cuerpo entero. Además con ésta estrategia al utilizar un revestimiento de presenta diversas ventajas las cuales se enlistan a continuación.

1. La matriz externa del revestimiento de sílice protege a los fluoróforos de los factores externos de degradación química y proporciona una capa hidrofílica para las NPs insolubles, con esto aumenta la fotoestabilidad y la biocompatibilidad de los colorantes orgánicos fluorescentes.
2. La sílice no es tóxica por lo que causa poco daño a las células vivas.
3. La periferia de las SiNPs son fácilmente modificables se puede funcionalizar con biomoléculas de manera eficaz con una variedad de grupos tales como poli (etilenglicol) (PEG), hidroxilo (OH), carboxilo (COOH), fosfonato ($\text{CH}_3\text{H}_2\text{PO}_2$) y amina (NH_2) en su superficie.

4. La matriz de sílice es ópticamente transparente por lo que puede encapsular colorante, además de aumentar la estabilidad del colorante después de ser dopado con la matriz de sílice.

5. Se puede ajustar el tamaño de las NPs, lo cual las hace adecuadas para utilizarlas en bioimágenes en vivo en donde el tamaño de nanopartícula debe ser menor a 70 nm.⁶⁰

2.6.2 Reprecipitación

En método se muestra en la Figura 14, en donde un compuesto orgánico hidrófobo con cadenas alquílicas se disuelve en un disolvente orgánico el cual sea miscible con agua por ejemplo THF, posteriormente la solución del compuesto orgánico se inyecta a la solución acuosa y la mezcla resultante se agita con ondas ultrasónicas para ayudar a la formación de las NPs por efecto de la hidrofobicidad del compuesto ya que para evitar el contacto con el agua las cadenas alquílicas del compuesto se repliegan en formas esféricas, finalmente se elimina el disolvente orgánico quedando las NPs dispersas en agua.⁶¹

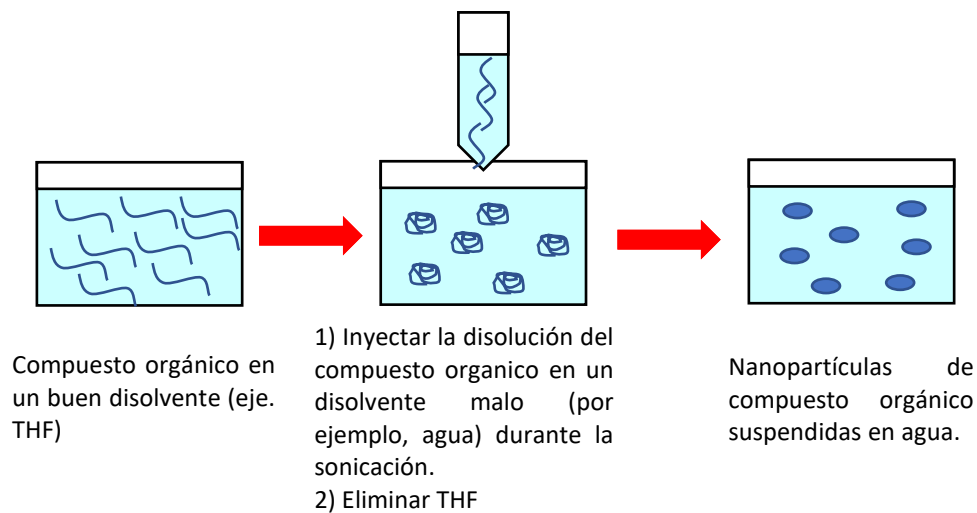


Figura 14.- Esquematización de la metodología de reprecipitación.⁶¹

2.6.3 Ventajas y desventajas de la formación de nanopartículas

***Quenching* por agregación inducida**

Muchos materiales orgánicos en solución exhiben propiedades fotofísicas muy diferentes en comparación a cuando están en sólido. Por ejemplo, es un fenómeno común que la luminiscencia a menudo se debilita o apaga a altas concentraciones. Este "apagamiento por concentración" es causado principalmente por la formación de agregados, dicho fenómeno es llamado "*quenching* por agregación inducida (AIQ por sus siglas en inglés *aggregation-induced quenching*).

Una de las desventajas que tiene la formación de NPs es que en ciertos casos promueve el AIQ, lo que limita en gran medida la generación de bioimágenes.

Emisión inducida por agregación

Sin embargo se han encontrado compuestos⁶² que presentan exactamente la característica opuesta al AIQ, emisión inducida por agregación (AIE *aggregation-induced emission*) y son una herramienta poderosa en campos como el de bioimagen y biosensado.⁶³ A diferencia de las moléculas fluorescentes convencionales, los compuestos que presentan un comportamiento AIE muestran fluorescencia débil cuando están en solución, sin embargo, cuando están en estado sólido son altamente fluorescentes debido a la restricción de su rotación intramolecular, proporcionando así una solución directa al problema de AIQ.⁶⁴

2.7 Aplicaciones de los materiales con actividad bifotónica

Los materiales que presentan absorción de dos fotones han sido ampliamente estudiados debido a sus propiedades ópticas no lineales como son excitación altamente localizada y eficiencia de excitación no lineal, deseables en una amplia gama de aplicaciones como marcadores biológicos o agentes de contraste en la microscopía de fluorescencia de dos fotones (TPM).

2.7.1 Microscopía de fluorescencia de dos fotones

El microscopio de fluorescencia o confocal es una variación del microscopio de luz ultravioleta en el que los objetos son iluminados por rayos de una determinada longitud de onda. La imagen observada es el resultado de la radiación electromagnética emitida por las moléculas que han absorbido la excitación primaria y re-emitido una luz con mayor longitud de onda. Para dejar pasar sólo la emisión secundaria deseada, se deben colocar filtros apropiados debajo del condensador y encima del objetivo.

Los microscopios confocales están equipados con una pieza llamada “diafragma de detección confocal” o “pinhole”, que consiste en un pequeño orificio en el filtro detector de la luz que impide el paso de aquella procedente de los planos de la muestra que no están enfocados. Así, se obtiene sólo la información de la región enfocada, denominada “plano focal”, y se elimina el resto.⁶⁵ El microscopio confocal irradia y recoge la luz emitida desde un pequeño volumen en el foco del objetivo. El volumen focal se escanea a través de la muestra para construir para construir un mapa de la intensidad de emisión. Cuando la absorción molecular requiere un único fotón, la densidad de excitación en la región focal es proporcional a la intensidad local, mientras que la densidad de excitación de dos fotones es proporcional al cuadrado de la intensidad y por lo tanto se desprende rápidamente del foco. El volumen de excitación de dos fotones es por lo tanto más pequeño dentro de un tamaño de femtolitro y aumenta la resolución del microscopio.⁶⁶ Figura 15.

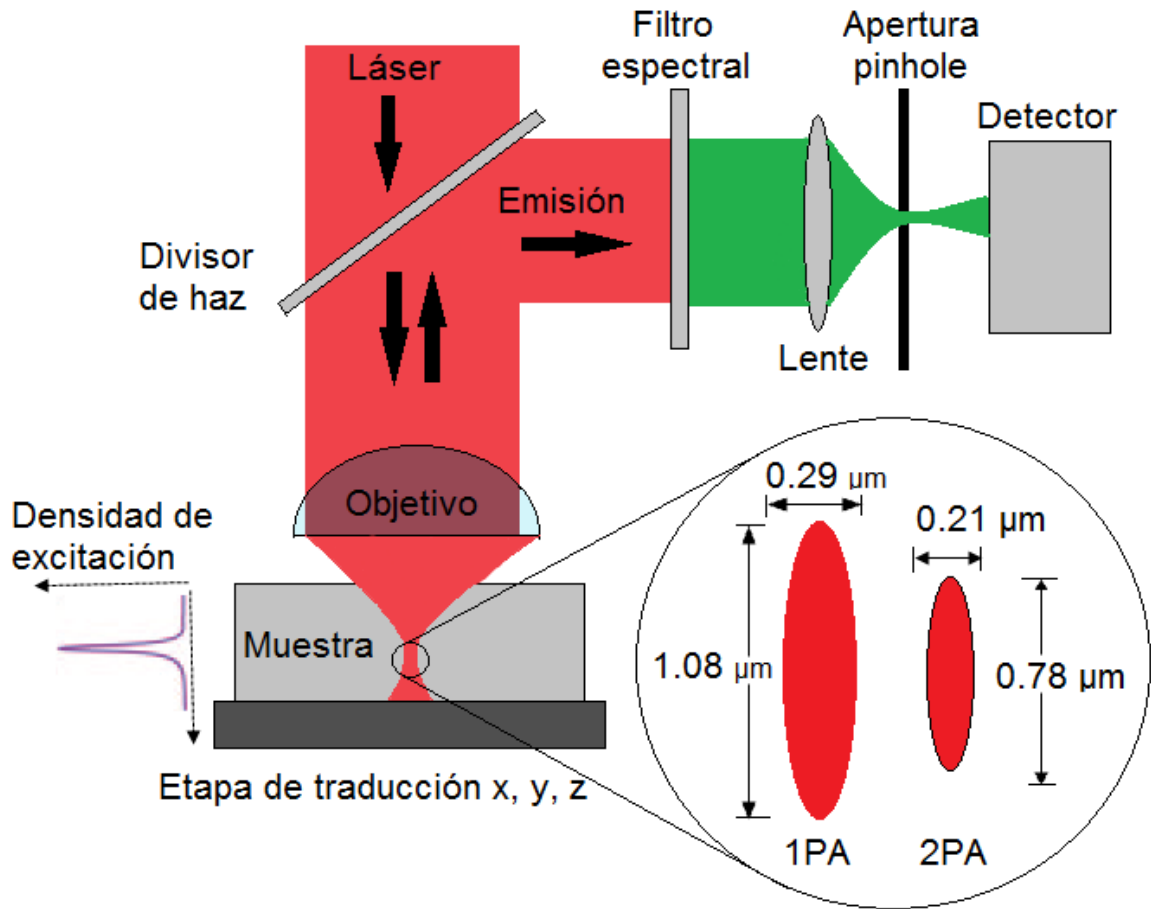


Figura 15.- Diagrama del microscopio confocal de fluorescencia. Un haz de rayos láser infrarrojo pulsado está fuertemente enfocado en la muestra con $TPA \propto I^2$, por lo que la excitación es confinada a la región focal. En la microscopía confocal la emisión de esta, después del filtrado espectral, es fotografiada y transmitida por el *pinhole*; la luz de otras regiones es en gran medida rechazada. Se crea una imagen 3D mediante la traducción de la muestra en relación con el foco. El inserto muestra los volúmenes de excitación del 50% para la absorción de un fotón (1PA) y la absorción de dos fotones (2PA), suponiendo que $\lambda = 800 \text{ nm}$, $NA = 1,4$.⁶⁶

CAPÍTULO 3.- DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1 Condiciones experimentales: reactivos, disolventes y equipo utilizado

Todos los reactivos se adquirieron de Sigma Aldrich Chemical Co. y se usaron sin purificación adicional. 4,7-dibromobenzo[c]-1,2,5-tiadiazol 95%, 2,2'-(9,9-dioctil-9H-fluoreno-2,7-diil) bistiofeno 97%, carbonato de potasio 99%, acetato de paladio 98%, ácido neo-decanoico 99%, los reactivos se manipularon en una atmósfera libre de humedad. Para la síntesis de NPs de sílice dopada se utilizaron los siguientes reactivos: agua desionizada, 1-butanol 99,8%, 1-sodio bis (2-etilhexil) sulfosuccinato (Aerosol-OT), N-metil-2-pirrolidinona (NMP), trietoxivinilsilano (VTES), 3 - aminopropiltriethoxisilano (APTES). Los espectros de RMN de ^1H de los compuestos orgánicos se midieron a temperatura ambiente con un espectrómetro Varian Mercury 400 MHz usando soluciones al 5% en CDCl_3 y TMS como patrón interno. Los espectros de absorción se registraron en un espectrofotómetro Genesys 10s UV-vis y en un espectrofotómetro PERKIN ELMER LAMDA 900. Los espectros IR ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) se registraron en un espectrofotómetro Spectrum 400 de Perkin Elmer (modo de reflectancia ATR). Para el equipo de análisis TGA se utilizó SDT Q600 V8.2 Build 100, se utilizó nitrógeno gaseoso a 100 mL / min, equilibrado a 50 °C. El programa utilizado fue Universal V4.2E. El análisis de DSC se llevó a cabo en un analizador térmico Q2000 de TA Instruments, con celda DSC estándar. Los pesos moleculares medios y los valores de los polímeros de polidispersidad se determinaron por cromatografía de permeabilidad en gel (GPC) en un cromatógrafo Alliance 2695, utilizando estándares de poliestireno para calibración y dos columnas PL lineales de PL, se realizaron mediciones a 30 °C en THF y un volumen de inyección de 25 ML, la eficiencia cuántica y emisión se llevaron a cabo en un Fluorómetro, Fabricante Edimburg Instruments, modelo FS5; modulo para TCSPC; módulo de esfera integradora, medidor de potencia; osciloscopio de dos canales. Para determinar el peso molecular de **M1** se utilizó un espectrómetro de Masas de Alta Resolución JMS700-JEOL. El tamaño (diámetro hidrodinámico) y distribución de tamaño de las NPs, fue determinado por dispersión de luz dinámica (DLS) con el equipo Nano Zetasizer Malvern, modelo ZEN 3600. El tamaño y la

morfología de las NPs se determinaron por microscopía electrónica de barrido (SEM, modelo JSM-7800F de Jeol), y se obtuvieron imágenes de fluorescencia de las NPs por la absorción de uno y dos fotones en el Microscopio confocal Olympus FV1000 Multi-fotónico.

3.2 Síntesis química de los polímeros y moléculas

3.2.1 Síntesis química de la familia del benzotiadiazol

Ruta sintética 1

Se colocaron en un matraz bola en condiciones anhidras los monómeros (con una proporción de 1:1) 4,7-dibromobenzo[c]-1,2,5-tiadiazol (0.3242 g, 1.048 mmol), 2,2'-(9,9-dioctil-9H-fluoreno-2,7-diil) bistiofeno (0.6 g, 1.048 mmol), 3 equivalentes de carbonato de potasio (0.438 g, 3.14 mmol), (0.6 equivalentes de ácido neodecanoico (0.109 g, 0.628 mmol) y acetato de paladio (0.5% molar, 0.012 g, 0.00524 mmol) y 50 mL de *N,N*-dimetilacetamida. El matraz de reacción se colocó en un baño de aceite y se agitó a una temperatura de 70 °C durante 20 h, la mezcla de reacción se precipita en metanol, el precipitado se filtra y se purifica mediante extracción soxhlet usando hexano, tolueno y clorobenceno, los compuestos respectivos obtenidos fueron **O1aH** (49 mg, rendimiento: 7%), **O1aT** (26 mg, rendimiento: 4%) y **O1aC** (4 mg, rendimiento: 0.5%). Las fracciones se concentraron a presión reducida, se precipitaron en una mezcla de cloroformo-metanol, se filtraron y secaron.

Adicionalmente, se añadieron 200 mL de hexano a las aguas madres por lo que se separaron en dos fases, la fase orgánica se extrajo por medio de un embudo de separación. A la fase orgánica se añadieron 20 mL de cloruro de metileno, y se dejaron reposar durante 3 días, se obtuvieron cristales. Posteriormente, los cristales se purificaron por medio de una columna cromatográfica, a la molécula obtenida que se denominó **M1** (30 mg, rendimiento: 4%). El rendimiento total de la reacción fue de 15%. La fracción obtenida en clorobenceno no se analizó porque no se obtuvo una cantidad representativa.

M1: RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) ppm: δ 0.6 (m, 4H), 0.7 (t, 6), 1 (m, 16H), 1.5 (m, 4H), 2 (m, 4H), 7.05 (dd, 1H), 7.17 (s, 2H), 7.2 (d, 1H), 7.3 (d, 1H), 7.4 (d, 1H), 7.45-7.7 (m, 4H), 7.8 (d, 2H), 8.05 (d, 1H).

O1aH: RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) ppm: δ 0.75 (m, 10H), 1.1 (m, 16H), 2.05 (m, 4H), 2.2 (m, 4H), 7.15 (dd, 1H), 7.45 (d, 1H), 7.55 (d, 1H), 7.7 (d, 1H), 7.85-8.1 (m, 8H), 8.15 (m, 1H).

O1aT: RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) ppm: δ 0.7 (m, 4H), 0.8 (t, 6H), 1-1.3 (m, 16H), 1.5 (m, 4H), 2.05 (m, 4H), 7.1 (dd, 1H), 7.23 (s, 2H), 7.27 (d, 1H), 7.37 (d, 1H), 7.47 (m, 1H), 7.55-7.95 (m, 6H), 8.15 (m, 1H).

Ruta sintética 2

Se colocaron en un matraz bola en condiciones anhidras se añaden los monómeros (en una proporción de 1:1) 4,7-dibromobenzo[c]-1,2,5-tiadiazol (0.538 g, 1.74 mmol), 2,2'-(9,9-dioctil-9H-fluoren-2,7-diil) bistiofeno (1 g, 1.74 mmol), 3 equivalentes de carbonato de potasio (0.728 g, 5.22 mmol), (0.6 equivalentes de ácido neodecanoico (0.180 g, 1.04 mmol), acetato de paladio ((1 mol%, 0.0039 g, 0.0174 mmol) y 5 mL de *N,N*-dimetilacetamida. El matraz de reacción se coloca en un baño de aceite y se agita a una temperatura de 70 °C durante 6.5 h, al final, se añaden 20 mL de metanol para precipitar el compuesto y se filtra, se obtuvieron 1.272 g. La purificación del compuesto **O1b** obtenido se llevó a cabo por columna de cromatografía, se obtuvieron 0.207 g, rendimiento: 16%.

O1b: RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) ppm: δ 0.7 (m, 4H), 0.8 (t, 6H), 1-1.2 (m, 16H), 1.3 (m, 4H), 2.05 (m, 4H), 7.12 (dd, 1H), 7.3 (d, 1H), 7.4 (d, 1H), 7.42 (m, 1H), 7.6 (s, 2H), 7.62-7.72 (m, 4H), 7.78 (d, 2H), 8.06 (d, 1H).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 400 MHz) ppm: δ **BT:** 154.1 (C25), 147.2 (C23), 145.3 (C22), 137.6 (C25), 129.5 (C26), 124.8 (C27), **Fluoreno:** 152.0 (C7, C12), 141.0 (C16), 132.5 (C14, C9), 127.3 (C5), 125.2 (C10, C15), 124.2 (C27) 120.4 (C6, C17), 112.3 (C8, C13), 55.6 (C11), 40.7 (C28, C36), 32 (C30, C38), 30.1 (C33, C41). 29.4 (C32,

C40, C34, C42), 24 (C29, C37), 22.7 (C31, C39), 14.3 (C35, C43), **Tiofeno**: 140.2 (C4), 133.7 (C18), 133.0 (C21), 128.3 (C2), 125.5 (C19, C20), 125.2 (C3), 123.2 (C1).

Ruta sintética 3

Se colocó en un matraz con *N, N*-dimetilacetamida (4 mL) en condiciones anhidras, los monómeros (con una proporción de 1:1), 4,7-dibromobenzo [c] -1,2,5-tiadiazol (0.432 g) , 1.39 mmol), 2,2 '- (9,9-dioctil-9H-fluoreno-2,7-diil) bistiofeno (0.8 g, 1.39 mmol), 3 equivalentes de carbonato de potasio (0.585 g, 4.1 mmol), (0.6 equivalentes de ácido neodecanoico (0.144 g, 0.83 mmol) y acetato de paladio ((4% mol, 0.0128 g, 0.055 mmol), el matraz de reacción se coloca en un baño de arena y se agita a una temperatura de 70 °C durante 5 h, después del tiempo de reacción, se precipita con metanol, el precipitado se filtra, el papel de filtro se coloca en el equipo de soxhlet para realizar extracciones con metanol, hexano, tolueno y clorobenceno. Las fracciones se concentraron a presión reducida, se precipitaron en una mezcla de cloroformo-metanol, se filtraron y secaron.

Se obtuvo de la fracción de hexano 0.014 mg (rendimiento del 1%), 0.7254 g de la fracción de tolueno llamada **P1bT** (76% de rendimiento) y 1 mg de la fracción de clorobenceno (rendimiento del 0.1%), no se obtuvo fracción insoluble. Se obtuvo un rendimiento total de 0.7395 g y 77 %. Las fracciones obtenidas en hexano y clorobenceno no se analizaron porque no se obtuvo una cantidad representativa.

P1bT: RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) ppm: δ 0.65 (m, 10H), 0.95 (m, 16H), 1.4 (m, 4H), 1.9 (m, 4H), 6.95 (dd, 1H), 7.1 (s, 2H), 7.15 (d, 1H), 7.35 (d, 1H), 7.55 (m, 1H), 7.75 (m, 6H), 7.95 (m, 1H).

Ruta sintética 4

Se añadieron en un matraz con *N, N*-dimetilacetamida (4 mL) bajo condiciones anhidras, los monómeros (con una relación 1:1) 4,7-dibromobenzo [c] -1,2,5-

tiadiazol (0.162 g, 0.524 mmol), 2,2'- (9,9-dioctil-9H-fluoreno-2,7-diilo) bistiofeno (0.3 g, 0.524 mmol), 3 equivalentes de carbonato de potasio (0.219 g, 1.57 mmol), ácido neodecanoico (1.2 equivalentes, 0.106 g, 0.62 mmol) y acetato de paladio ((16.6 % molar, 0.02 g, 0.087 mmol). El matraz de reacción se colocó en un baño de aceite y se agitó a una temperatura de 70 °C durante un 17 h. La mezcla de reacción se precipitó en metanol. La purificación se realizó por extracción soxhlet usando hexano, tolueno y finalmente clorobenceno. Las fracciones se concentraron a presión reducida y precipitaron en una mezcla de cloroformo-metanol, se filtraron y secaron.

Se obtuvo de la fracción de hexano 0.01 mg (3 % rendimiento), 0.12 g de la fracción de tolueno (**P1cT**) (33% de rendimiento), y 0.012 mg de la fracción de clorobenceno (3 % de rendimiento), no se obtuvo fracción insoluble. Se obtuvo un rendimiento total de 0.142 g, 40 %. Las fracciones de hexano y clorobenceno no se analizaron debido a que no se obtuvo una fracción representativa.

P1cT: RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) ppm: δ 0.7 (m, 10H), 1.05 (m, 16H), 1.5 (m, 4H), 2.05 (m, 4H), 6.8-7.85 (m, 12H), 8.05 (m, 1H).

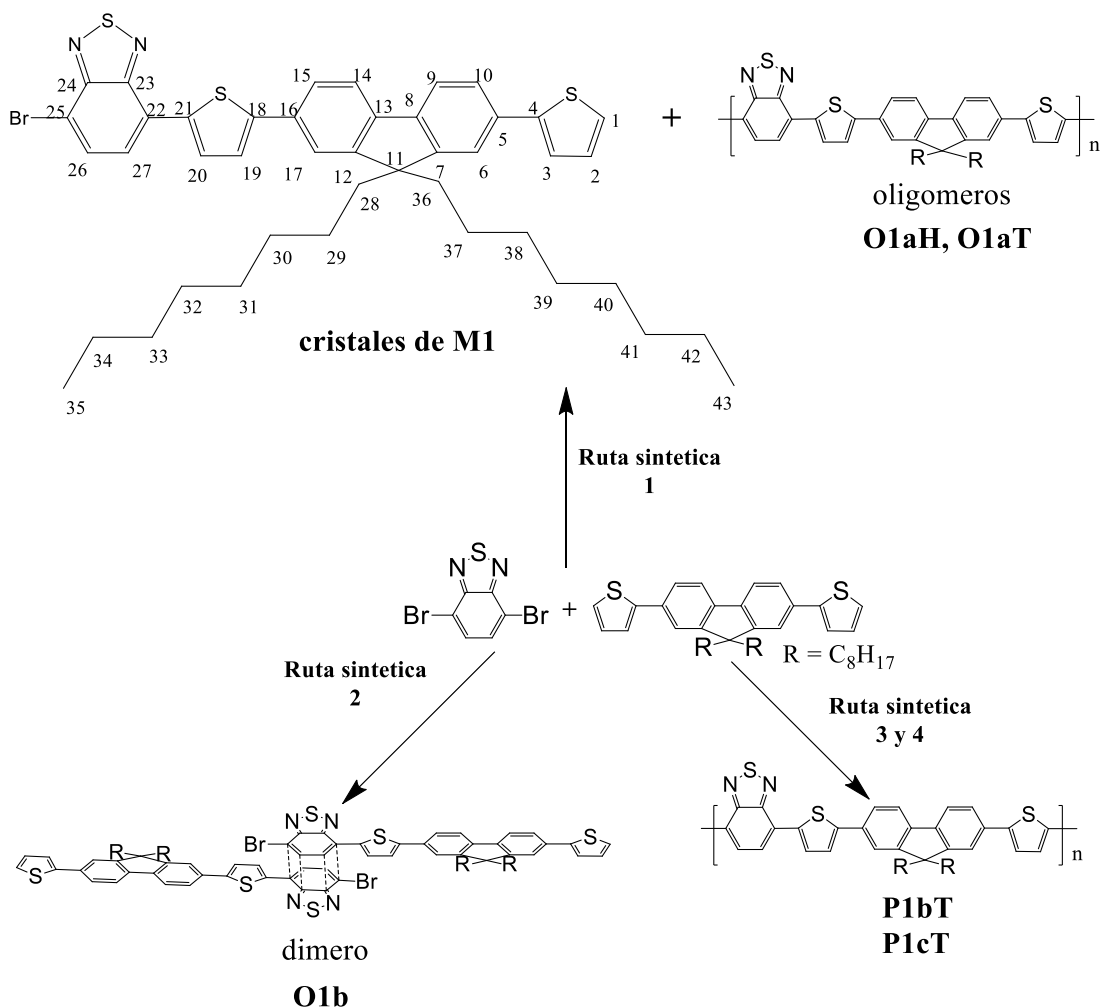


Figura 16.- Esquema de las condiciones de reacción utilizadas para la síntesis de la familia del benzotriazolol.

Tabla 2.- Condiciones de reacción usados en cada uno de las rutas sintéticas para la síntesis de los compuestos derivados de BT.

Ruta sintética	Acetato de paladio (% mol)	Ácido neodecanoico (equivalentes)	Disolvente DMA (mL)	Tiempo de reacción (h)	Productos
1	0.5	0.62	50	20	M1
					O1aH
					O1aT
2	1	0.6	5	6.5	O1b
3	4	0.6	4	5	P1bT
4	16.6	1.2	4	17	P1cT

3.2.2 Síntesis química de la familia de la tienopirrolodiona

Síntesis de P2a

La síntesis química de **P2a**, se llevó a cabo mediante una reacción de arilación directa, en calentamiento por microondas. En la Figura 17 se muestra el esquema de reacción.

Se añaden en un matraz los monómeros (con una relación 1:1) 1,3 – dibromo-S-(2-etilhexil)-4H-tieno[3,4-c]pirrol-4,6-(5H)-dion (0.3 g, 0.687 mmol), 2,2'-(9,9-dioctil-9H-fluoreno-2,7-diilo) bistiofeno (0.392 g, 0.687 mmol), 3 equivalentes de pivalato de potasio (PivoK) (0.288 g, 2.06 mmol), y acetato de paladio (12.7 % molar, 0.02 g, 0.087 mmol) con *N,N*-dimetilacetamida (3 mL) bajo condiciones anhidras. El matraz de reacción se coloca en el microondas y se agita a una temperatura de 110°C durante 1 h. La mezcla de reacción se precipita en metanol. La purificación se lleva a cabo en un soxhlet utilizando hexano, tolueno y cloroformo, se concentran a presión reducida, se precipitan en una mezcla de cloroformo-metanol y se filtran. La fracción extraída en hexano se le denominó **P2aH** y tuvo un rendimiento de 15.8% (0.177 g), en tolueno **P2aT** se obtuvieron 0.134 g y un rendimiento de 12 %, en cloroformo 0.007 g, 0.6 % y se obtuvieron en total 0.318 g con un rendimiento total de 28.4%. La fracción en cloroformo no se analizó debido a que se obtuvo muy poco.

P2aH: RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) ppm: δ 0.61-0.83 (m, 16H), 0.851-0.24 (m, 16H), 1.27-1.42 (m, 8H), 1.49-1.57 (m, 4H), 1.82-2.14 (m, 5H), 3.55-3.64 (m, 2H), 7.056-7.12 (m, 1H), 7.2-7.3 (m, 1H), 7.35-7.42 (m, 1H), 7.52-7.33 (m, 6H), 8.302-8.2 (m, 2H).

P2aT: RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) ppm: δ 0.58-0.82 (m, 16H), 0.85-0.99 (m, 6H), 1-1.25 (m, 10H), 1.25-1.48 (m, 8H), 1.50-1.68 (m, 4H), 1.82-2.17 (m, 5H), 3.53-3.69 (m, 2H), 7.07-7.18 (m, 1H), 7.26-7.34 (m, 1H), 7.36-7.45 (m, 1H), 7.53-7.79 (m, 6H), 8.05-8.23 (m, 2H).

Síntesis de P2b

Se añaden en un matraz con *N,N*-dimetilacetamida (3 mL) bajo condiciones anhidras, 0.6 equivalentes de ácido neodecanoico (0.0692 g, 0.39 mmol), los monómeros (con una relación 1:1) 1,3 – dibromo-S-(2-etilhexil)-4H-tieno[3,4-c]pirrol-

4,6-(5H) (0.29 g, 0.664 mmol), 2,2'-(9,9-dioctil-9H-fluoreno-2,7-diilo) bistiofeno (0.379 g, 0.664 mmol), 3 equivalentes de carbonato de potasio (0.2778 g, 1.9 mmol), y acetato de paladio (16.6 % mol, 0.0252 g, 0.11 mmol). El matraz de reacción se coloca en un baño de aceite y se agita a una temperatura de 110°C durante 2 h, al finalizar se añaden 20 mL de metanol para precipitar el compuesto y eliminar el DMA. La purificación se lleva a cabo en soxhlet con metanol, hexano, tolueno y cloroformo, se concentran a presión reducida, se precipitan en una mezcla de cloroformo-metanol y se filtran. (Figura 15).

En hexano se obtuvieron 0.021 g (rendimiento 1.95%), en tolueno la fracción se denominó **P2bT** y se obtuvieron 0.458 g (rendimiento 42.3%), no se obtuvo fracción en cloroformo, en total se obtuvieron 0.479 g (rendimiento total 44.2%). Solo se analizó la fracción de tolueno.

P2bT: RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) ppm: δ 0.48-0.67 (m, 16H), 0.71-0.85 (m, 6H), 0.86-1.07 (m, 10H), 1.13-1.3 (m, 8H), 1.35-1.45 (m, 4H), 1.71-2 (m, 5H), 3.52-3.43 (m, 2H), 6.94-6.98 (m, 1H), 7.12-7.3 (m, 2H), 7.39-7.59 (m, 6H), 7.88-8.09 (m, 2H).

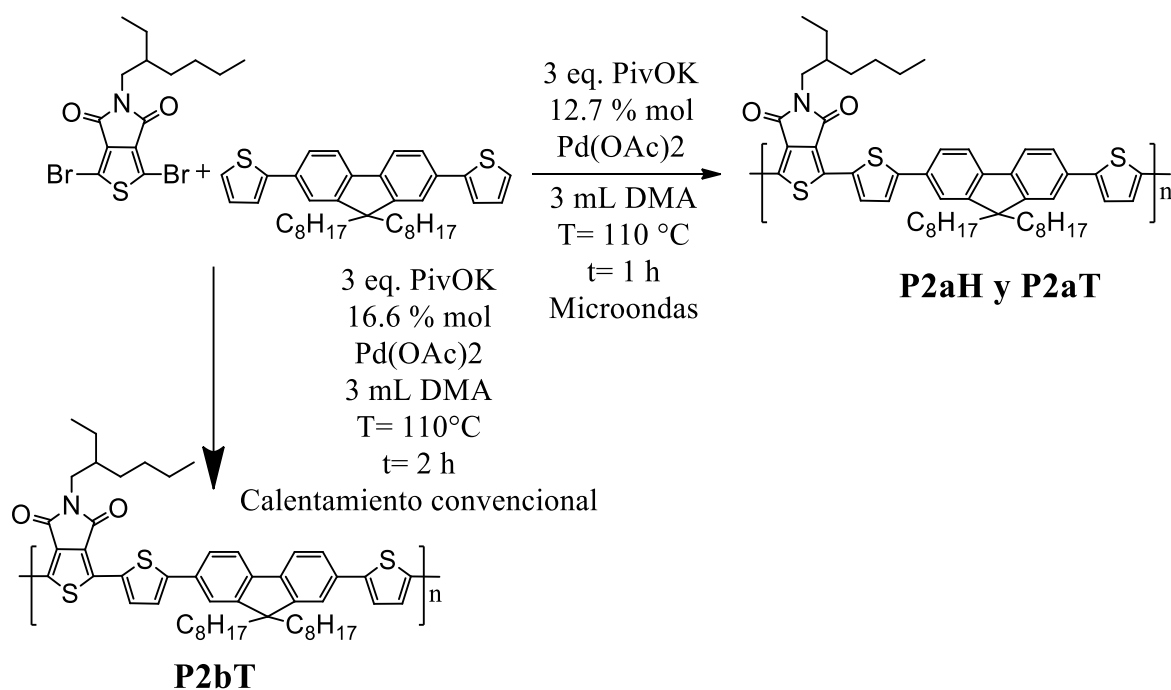


Figura 17.- Esquema de las condiciones de reacción utilizadas para sintetizar los compuestos de la familia de la tienopirrolodiona.

Tabla 3.- Condiciones de reacción usados en cada uno de las rutas sintéticas para la síntesis de los compuestos derivados de TPD.

Compuesto	Pivalato de potasio	K ₂ CO ₃	Ácido neodecanoico	Pd(OAc) ₂	Tiempo	Condiciones de reacción	DMA
P2a	3 eq. 2.06 mmol 0.288 g	-----	-----	12.7% mol 0.087 mmol 0.02 g	1 h	Calentamiento por microondas 110°C	3 mL
P2b	-----	3 eq. 1.99 mmol 0.278 g	0.6 eq 0.398 mmol 0.069 g	16.6 % mol 0.11 mmol 0.0252 g	2 h	Calentamiento convencional 110 °C	3 mL

3.2.3 Síntesis química de las nanopartículas

Una de las propiedades necesarias para la utilización de materiales orgánicos en fabricación de nanopartículas en aplicación como biomarcadores es que sean luminiscentes en sólido, motivo por el cual sólo se fabricaron NPs de **O1aH**, **O1aT**, **O1b**, **P2aH** y **P2bT**, a continuación, se describe la metodología general. Figura 18.

Las NPs dopadas con sílice fueron sintetizadas basándonos en el método descrito por Ixta *et al.*,⁶⁷ En el núcleo no polar de micelas de Aresol-OT/1butanol en agua se preparó un sistema de microemulsión. La solución micelar se sintetizó disolviendo 0.3 g de Aerosol-OT, 300 µL de 1-butanol y 200 µL de NMP en 10 mL de agua desionizada por agitación magnética, a la solución micelar se le agregó una determinada cantidad de fluoróforo disuelto en 200 µL de NMP bajo agitación magnética constante durante media hora. Posteriormente se adicionaron al sistema micelar 100 µL de VTES y se agitó una hora. Finalmente, las NPs dopadas con sílice fueron precipitadas por la adición de 20 µL de APTES y agitación de la solución por 10 h a temperatura ambiente. El uso de APTES modifica la superficie de las NPs con grupos amino (NH₂). La suspensión se centrifugó a 13000 rpm durante 30 min,

con lo que son eliminados los surfactantes, co-surfactantes, fluoróforo, residuos no encapsulados de precursores sin reaccionar, finalmente se eliminó el sobrenadante y al precipitado se le agregaron 20 μL de agua desionizada y se sonificó durante 20 min. Las nanopartículas de O1b se fabricaron con una concentración de 5.3 mM (3.36 mg /200 μL de NMP) y para el resto de las nanopartículas (O1aH, O1aT, P1bT, P2aH y P2bT) se utilizó una concentración de 2mg de fluoróforo /200 μL de NMP.

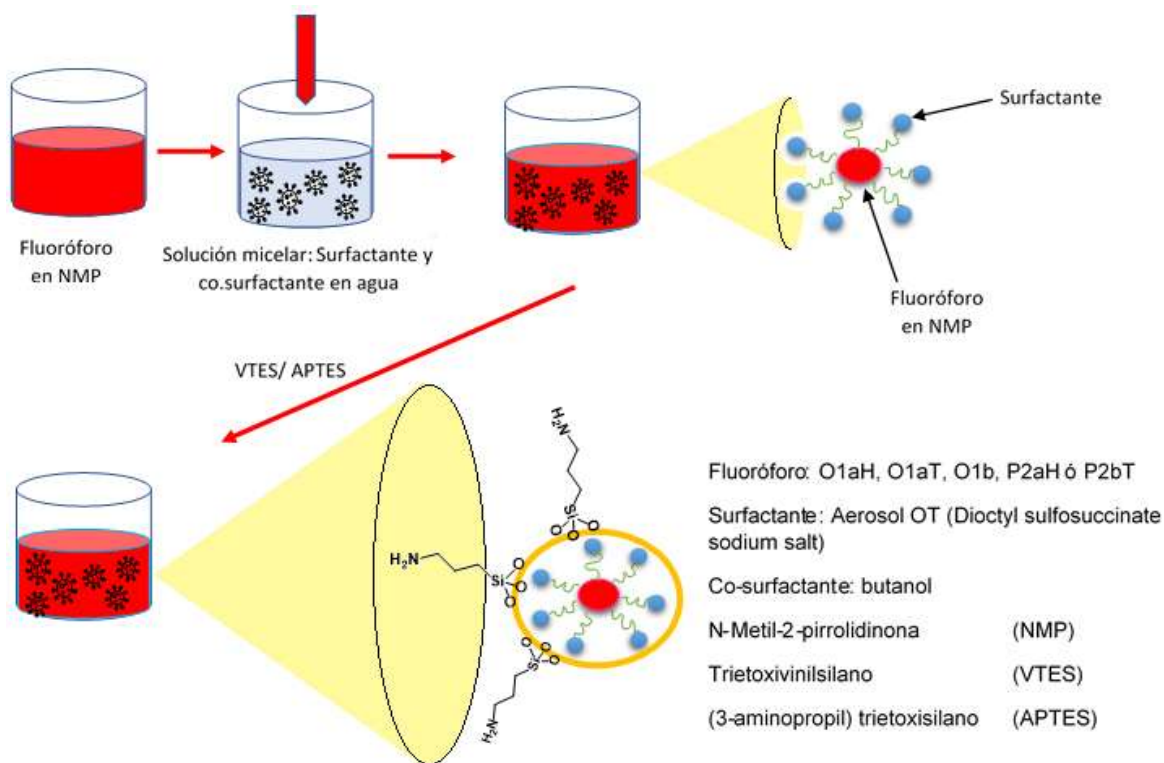


Figura 18.- Esquema de la síntesis de NPs de sílice dopadas con orgánicos.

CAPÍTULO 4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó el diseño de dos familias de compuestos orgánicos con estructuras π conjugadas con el mismo grupo donador, fluoreno y dos grupos aceptores, benzotiadiazol y tienopirrolodiona.

4.1 Caracterización fisicoquímica de los polímeros y moléculas

En este capítulo se mostrarán los resultados de la caracterización fisicoquímica de los compuestos orgánicos sintetizados en este trabajo de investigación, por grupo, en primer lugar, los derivados del benzotiadiazol y en segundo lugar los compuestos derivados de tienopirrolodiona así como los resultados de la caracterización óptica lineal y no lineal de las nanopartículas fabricadas de cada compuesto.

4.1.1 Caracterización espectroscópica: Resonancia Magnética Nuclear, FT-IR.

COMPUESTOS DERIVADOS DE BENZOTIADIAZOL

El dímero **O1b** se elucidó estructuralmente mediante RMN con experimentos de una y dos dimensiones (^1H , ^{13}C , COSY, HMBC y HSQC).

En la Figura 19 se muestra el espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz, el cuál fue completamente asignado dadas las integrales, multiplicidad y los experimentos de dos dimensiones COSY, HMBC y HSQC.

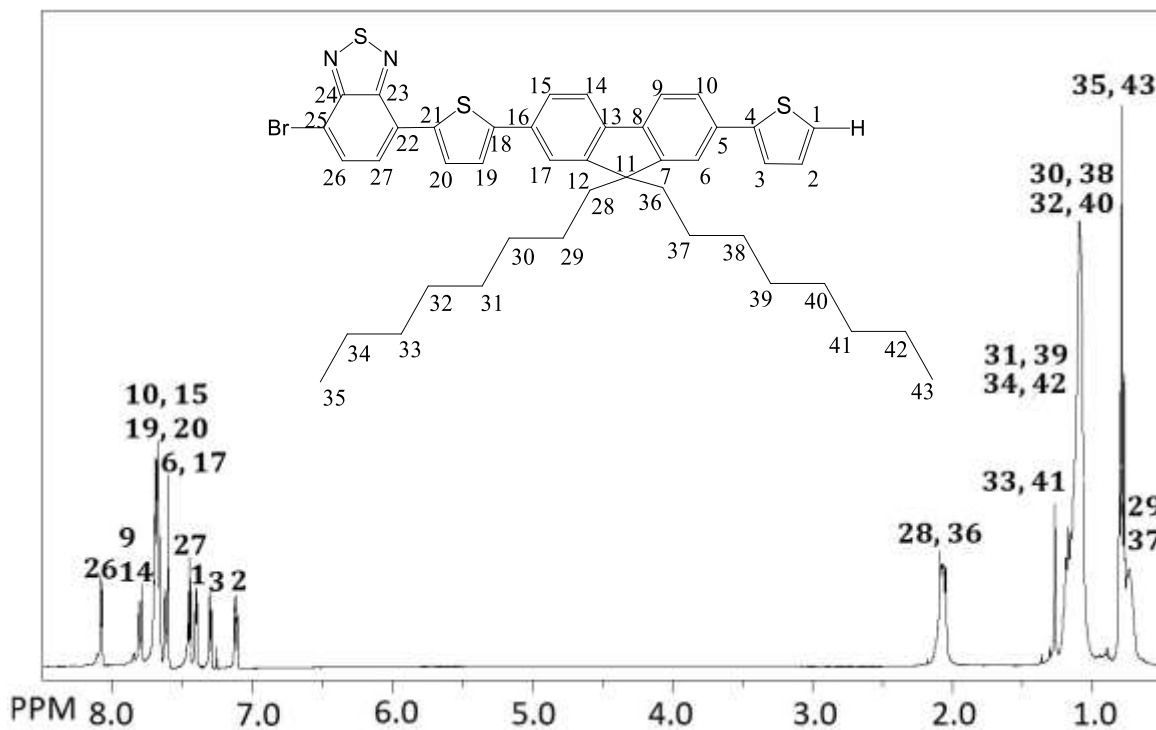


Figura 19.- Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de **O1b**.

En la Figura 20 se muestra el espectro de ^{13}C completamente asignado, en la zona alifática hay 8 señales las cuales corresponden a los 17 carbonos que **O1b** tiene, algunas de las señales corresponden a dos carbonos, debido a que tienen el mismo ambiente químico y por tanto el mismo desplazamiento químico. La señal más desplazada en la zona alifática corresponde al carbono cuaternario 11, debido a que está unido al sistema π -conjugado del fluoreno, lo cual quita densidad electrónica y hace que se desplace a campo bajo. El carbono más desplazado de la zona aromática es el 24 el cual se encuentra desprotegido debido a que se encuentra unido al nitrógeno, átomo electronegativo, además de estar en resonancia en la estructura quinoide del BT. En la Figura 21 y 22 se muestran ampliaciones de la zona aromática y alifática del espectro ^{13}C de **O1b**.

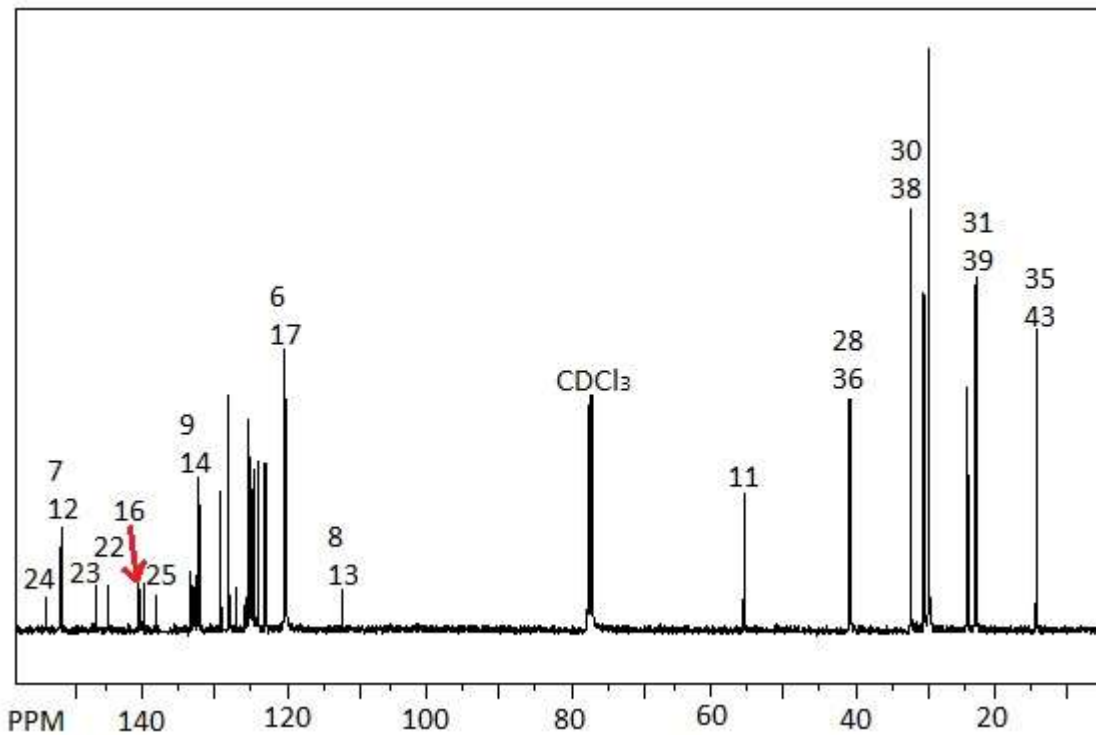


Figura 20 .- Espectro de RMN de ^{13}C a 400 MHz en CDCl_3 de O1b.

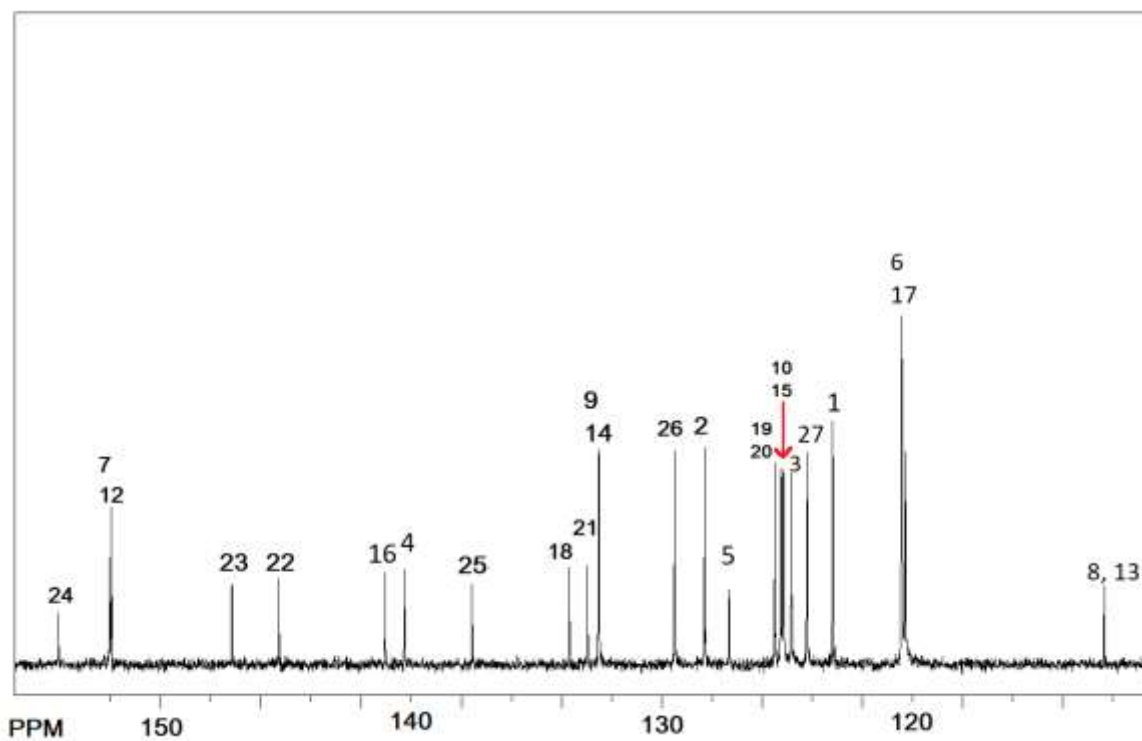


Figura 21.- Ampliación de la zona aromática del espectro de RMN de ^{13}C a 400 MHz en CDCl_3 de O1b.

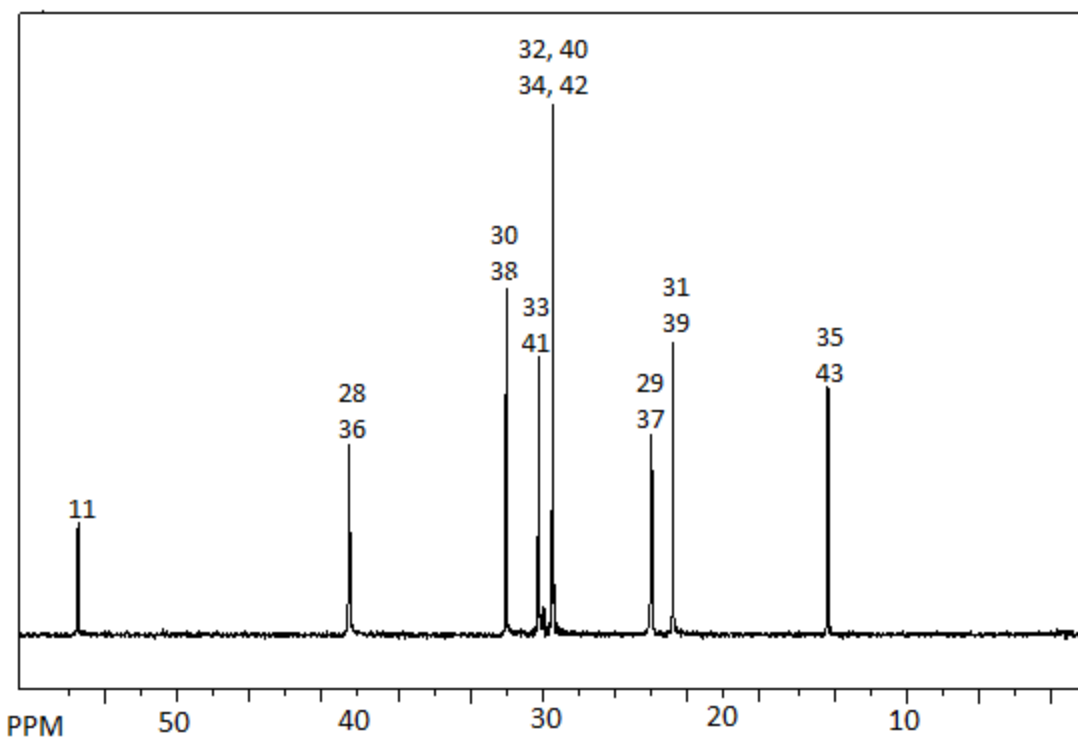


Figura 22.- Ampliación de la zona alifática del espectro de RMN de ¹³C a 400 MHz en CDCl₃ de O1b.

COSY (correlation spectroscopy)

En las Figuras 23 y 24 se muestran ampliaciones de la zona alifática y aromática respectivamente del espectro obtenido del COSY en donde se aprecian las correlaciones que hay entre los hidrógenos, en la Tabla 4 se muestran las correlaciones H-H.

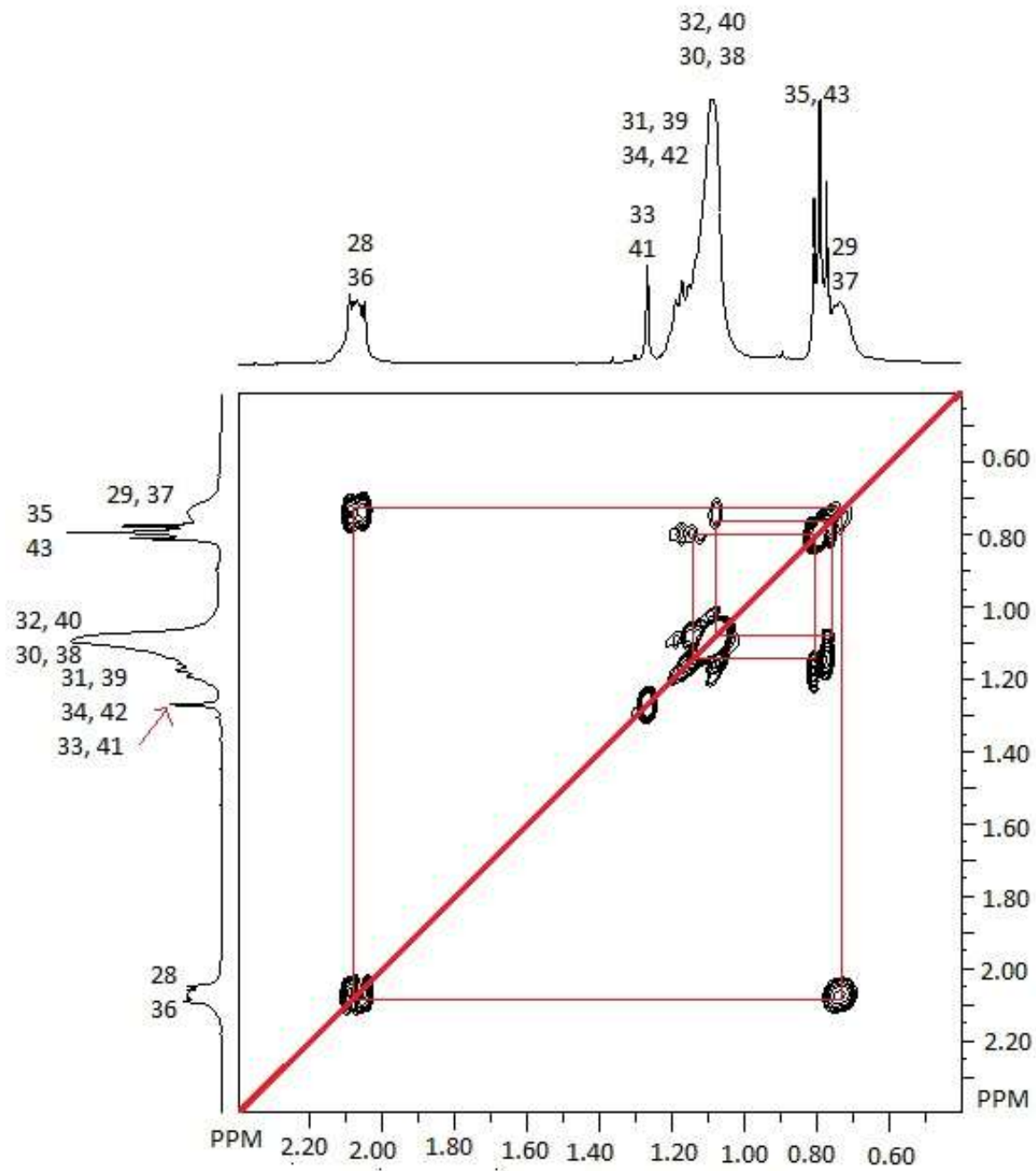


Figura 23.- Ampliación de la región alifática del espectro de RMN COSY a 400 MHz en CDCl₃ de O1b.

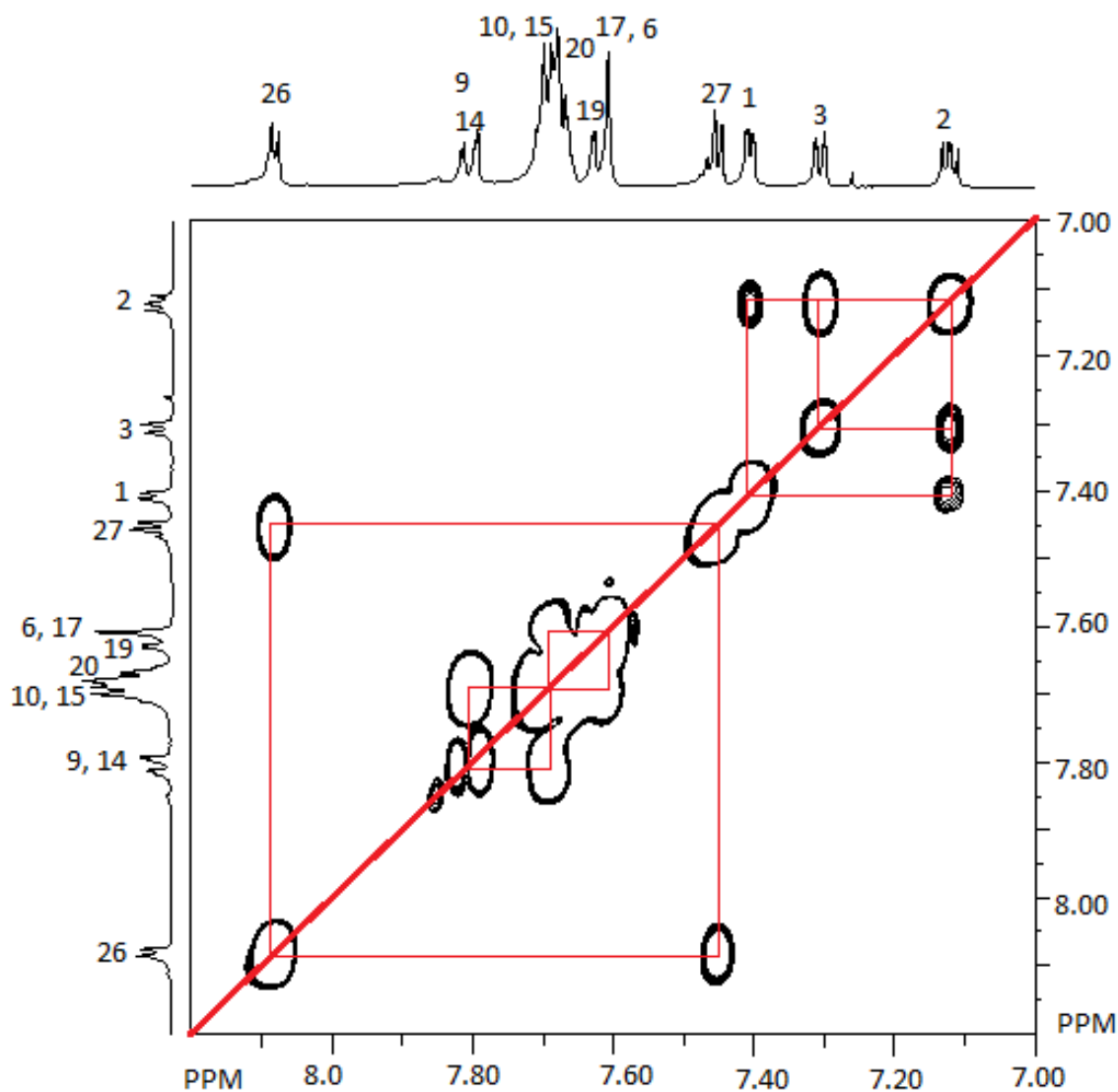


Figura 24.- Ampliación de la región aromática del espectro de RMN COSY a 400 MHz en CDCl₃ de O1b.

Tabla 4.- Correlaciones H-H obtenidas en el COSY con los respectivos desplazamientos químicos de los hidrógenos.

Correlación de hidrogenos F1-F2	Desplazamiento químico 1H F1 (ppm)	Desplazamiento químico 1H F2 (ppm)
H30 – H29	0.73	1.09
H34 – H35	0.79	1.18
H31 – H30, 32	1.09	1.19
H28 – H29	0.72	2.07
H3 – H2	7.12	7.31
H1 – H2	7.12	7.41
H26 – H27	7.45	8.08

HSQC (heteronuclear single-quantum correlation)

Una vez asignadas las señales del espectro de protón y tener ya asignadas unas señales del espectro de ^{13}C , se resolvió el espectro obtenido del HSQC para terminar de asignar las señales de ^{13}C . En la Figura 25 se muestra la ampliación de la zona alifática del espectro de dicho experimento y en la Figura 26 de la zona aromática. En la Tabla 5 se muestra un resumen de las correlaciones H-C unidos directamente con su respectivo desplazamiento químico que se obtuvieron en el espectro HSQC.

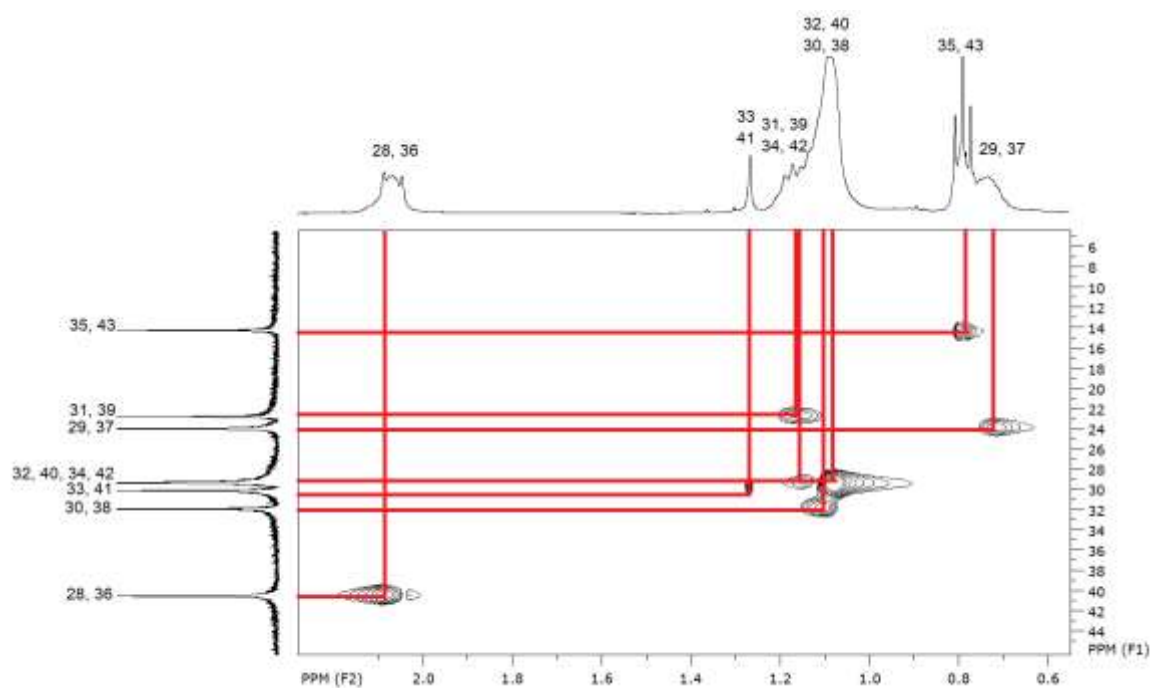


Figura 25.- Ampliación de la región alifática del espectro de RMN HSQC a 400 MHz en CDCl_3 de O1b.

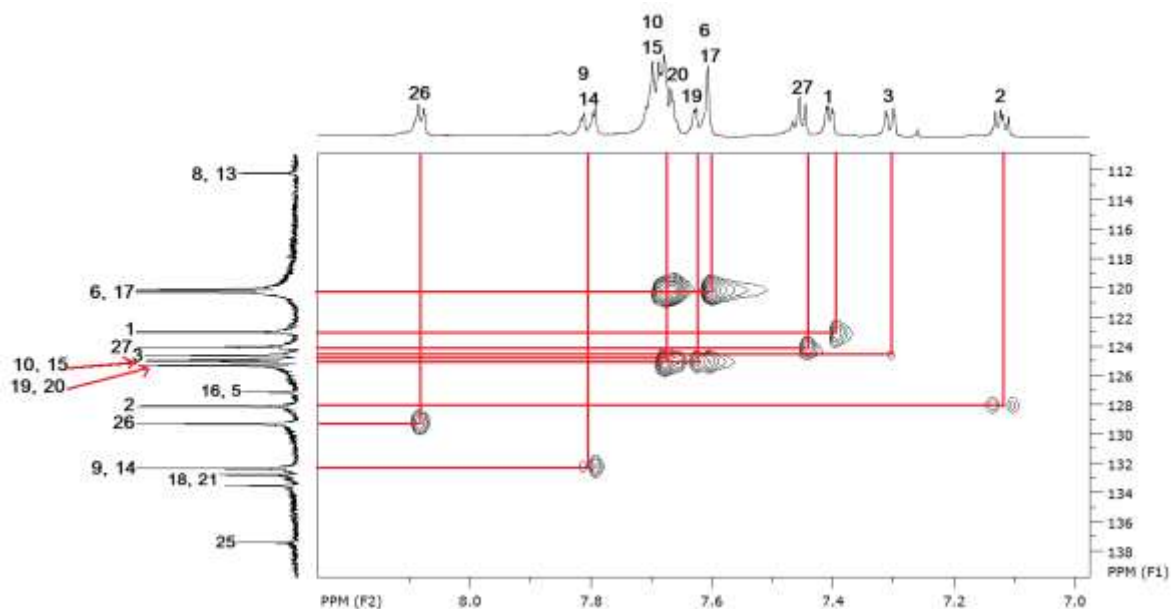


Figura 26.- Ampliación de la región aromática del espectro de RMN HSQC a 400 MHz en CDCl_3 de O1b.

Tabla 5.-Resumen de las correlaciones C-H directamente Unidos y sus desplazamientos químicos obtenidos en el espectro del HSQC.

Correlación de $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ (F1 - F2)	Desplazamiento químico ^{13}C F1 (ppm)	Desplazamiento químico ^1H F2 (ppm)
C35 - H35	14.3	0.78
C29 - H29	22.7	0.72
C31 - H31	22.6	1.16
C33 - H33	30.2	1.27
C34 - H34	29.2	1.53
C32 - H32	29.4	1.08
C28 - H28	40.6	2.09
C2 - H2	122.9	7.39
C3 - H3	124.1	7.44
C6 - H6	120.1	7.60
C19 - H19	125.0	7.62
C10 - H 10	125.1	7.68
C9 - H9	132.3	7.79
C26 - H26	129.3	8.08

HMBC - Heteronuclear Multiple Bond Correlation.

Para terminar de asignar las señales de ^{13}C se realizó un experimento HMBC, en las Figuras 27 y 28 se observan las principales interacciones C-H a dos y tres enlaces y en la Tabla 6 se muestra un resumen de estas.

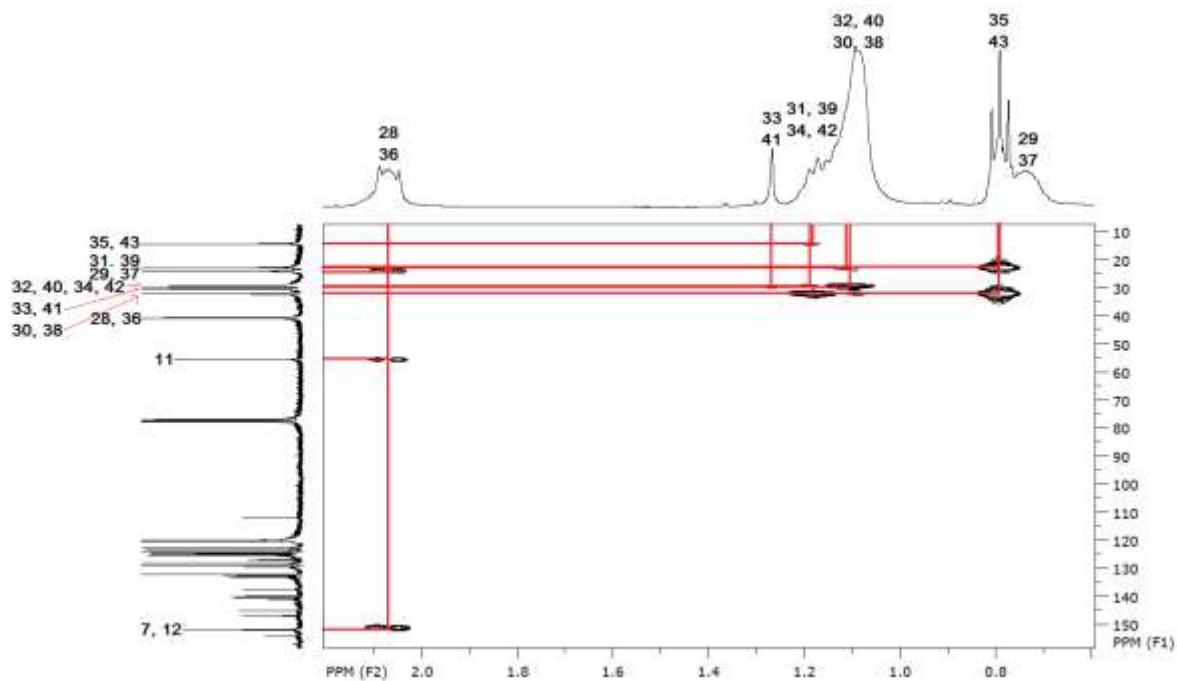


Figura 27.- Ampliación de la región alifática del espectro de RMN HMBC a 400 MHz en CDCl_3 de O1b.

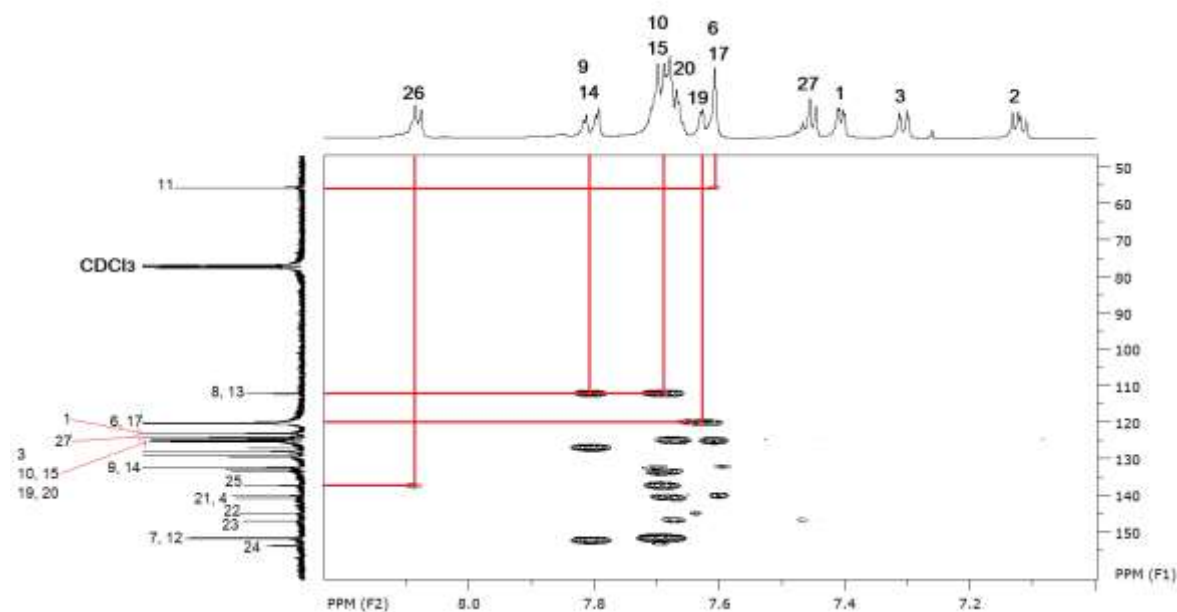


Figura 28 a- Ampliación de la región aromática del espectro de RMN HMBC a 400 MHz en CDCl_3 de O1b.

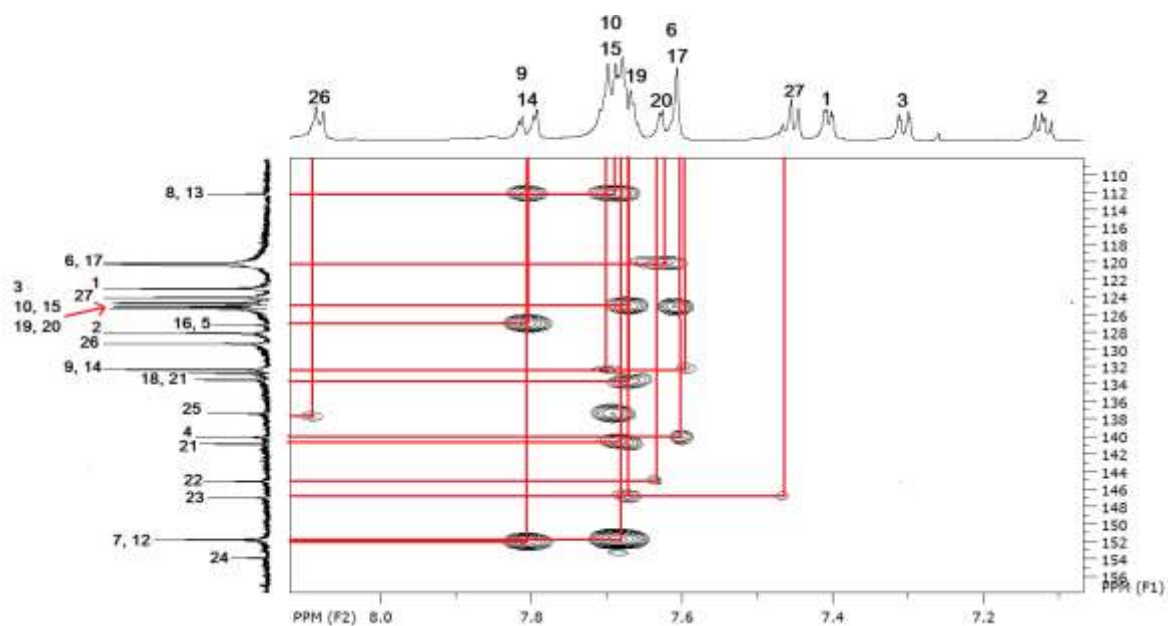


Figura 28 b- Ampliación de la región aromática del espectro de RMN HMBC a 400 MHz en CDCl_3 de O1b.

Tabla 6.-Resumen de las correlaciones C-H a dos y tres enlaces de distancia y sus desplazamientos químicos obtenidos en el espectro del HMBC.

Correlación de $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ (F1 - F2)	Desplazamiento químico ^{13}C F1 (ppm)	Desplazamiento químico ^1H F2 (ppm)
C31 - H35	22.6	0.79
C34 - H35	32.3	0.79
C33 - H32	29.3	1.10
C31 - H30	22.4	1.12
C33 - H34	29.1	1.19
C30 - H31	32.0	1.18
C32 - H33	29.8	1.27
C29 - H28	32.9	2.08
C11 - H28	55.4	2.08
C7 - H28	151.9	2.08
C8 - H10	111.9	7.69
C8 - H9	111.8	7.81
C6 - H20	119.9	7.63
C19 - H6	124.9	7.67
C15 - H19	124.7	7.67

C16 – H9	127.1	7.81
C9 – H10	132.2	7.69
C9 – H6	133.0	7.60
C18 – H19	137.2	7.68
C4 – H6	140.1	7.60
C21 – H19	140.1	7.67
C22 – H20	144.8	7.60
C23 – H20	146.6	7.63
C23 – H27	146.6	7.46
C7 – H10	151.9	7.70
C7 – H9	151.9	7.80

En la Figura 29 se muestran los espectros de RMN de ^1H del resto de los compuestos derivados de benzotiadiazol, en donde se puede observar que los espectros son bastante similares, lo cual es de esperarse debido a que tienen los mismos monómeros (BT y fluoreno) por lo tanto el mismo ambiente químico, solo varían en la anchura de sus señales, a medida que los compuestos aumentan su peso molecular, las señales son más anchas, debido a que hay una mayor cantidad de hidrógenos integrada en cada señal. La señal más desplazada en todos los espectros de protón en la zona alifática es la que corresponde a los hidrógenos 28 y 36, debido a que están unidos al carbono 11, el cual está en resonancia con el esqueleto π conjugado de los compuestos orgánicos, lo que hace que se remueva densidad electrónica de los H 28 y H 36 queden desprotegidos.

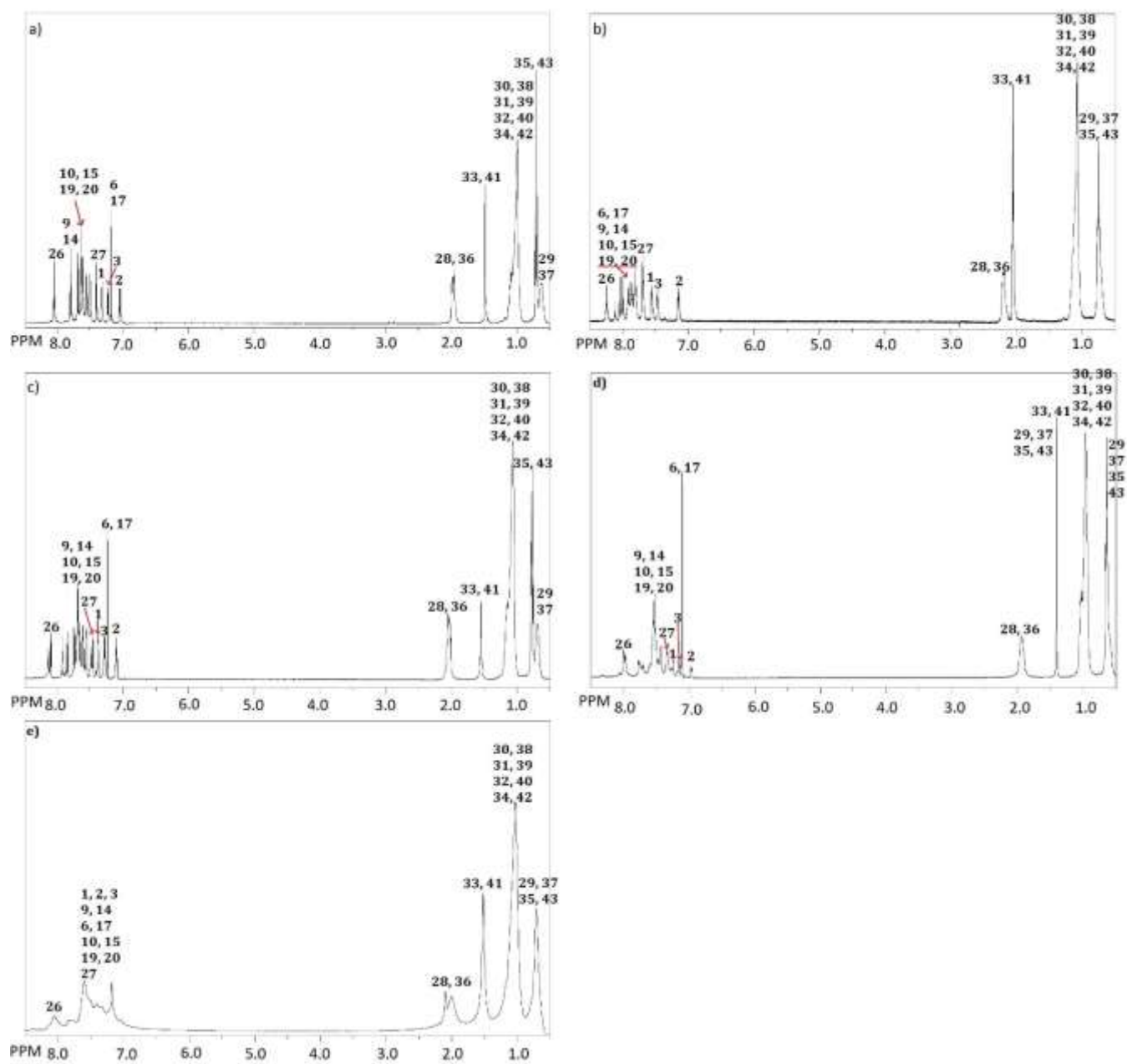


Figura 29.- Espectros de RMN de ^1H de a) M1, b) O1aH, c) O1aT, d) P1bT, e) P1cT a 400 MHz en CDCl_3 .

COMPUESTOS DERIVADOS DE FLUORENO-TIENO PIRROLODIONA

En la Figura 30 se muestran los espectros del polímero **P2** fracción hexano y tolueno, los cuales son iguales debido a que se tienen los mismos monómeros y ambiente químico, con distintos pesos moleculares. En la región alifática, la señal más desplazada a campos bajos (3.6 ppm) corresponde a los Hidrógenos alfa de la cadena alquílica del TPD, debido a la desprotección que le confiere el N, a 2 ppm se encuentra la señal característica de los hidrógenos alfa de la cadena alquílica del fluoreno, el multiplete que está de 0.4 a 0.7 corresponde al resto de los hidrógenos de las cadenas alquílicas. De 7 a 8.3 ppm se encuentra la señal de los hidrógenos aromáticos de los tiofenos y fluoreno.

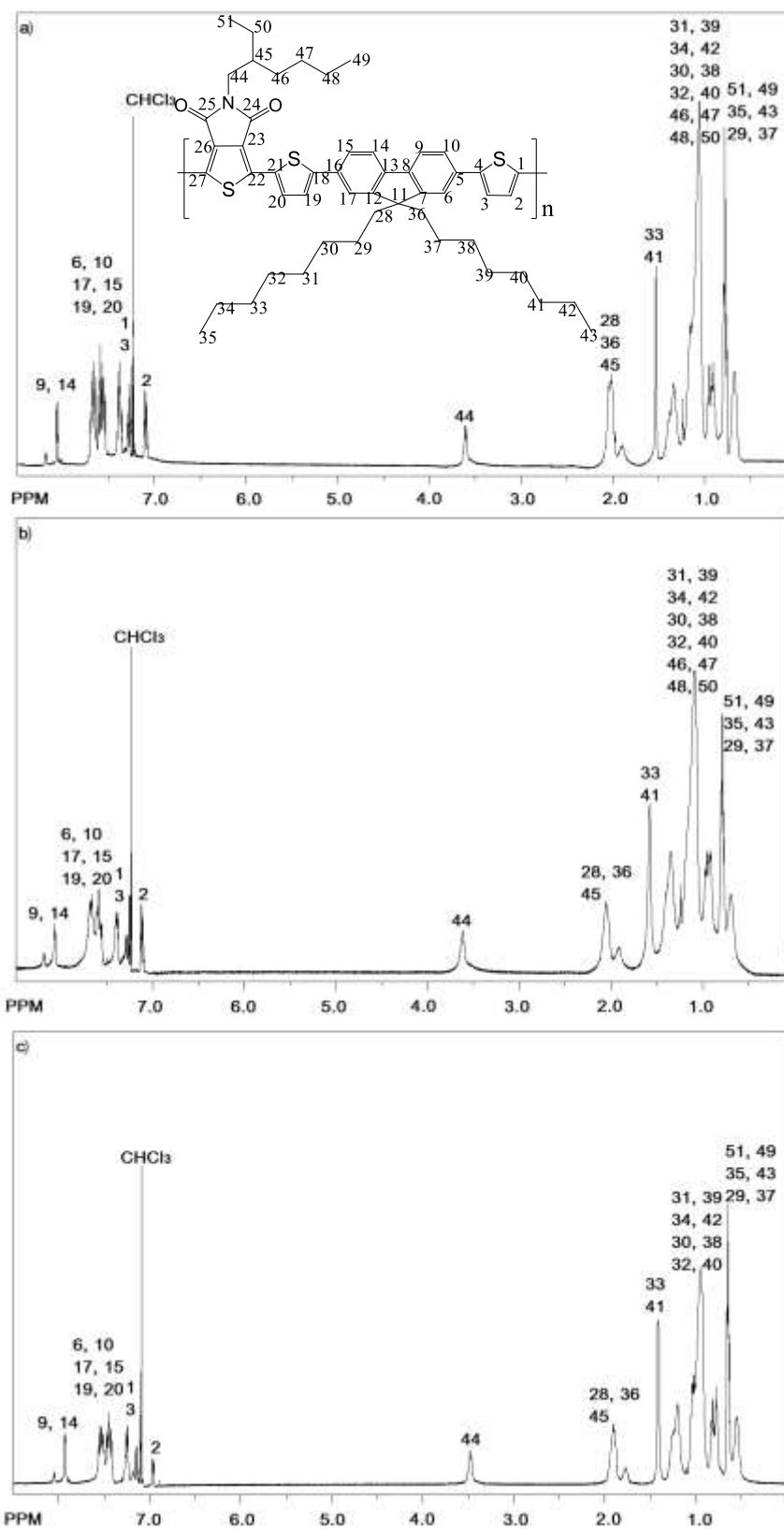


Figura 30.-Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de a) P2aH, b) P2aT y c) P2bT.

4.1.2 Difracción de rayos x

Se obtuvieron cristales adecuados para el análisis de difracción de rayos X para M1 a partir de la evaporación lenta de una solución concentrada de CH₂Cl₂. Compuesto cristalizado como un sistema triclinico en el grupo espacial P-1 y hay dos moléculas independientes en la unidad asimétrica. La Figura 31 muestra la estructura molecular en la que se observa el sistema deslocalizado cuasi plano. La no planaridad se puede observar a partir de los valores de ángulo de torsión de S1-C4-C5-C6 = -173.7(4), S2-C18-C16-C17 = -164.9(4) y S2-C21-C22-C23 = -169.7(5)°. Como resultado de los diferentes sustituyentes unidos a los heterociclos de tiofeno, ambos son asimétricos, esta observación puede notarse a partir de las distancias de enlace medidas de los átomos de azufre con los átomos de carbono vecinos, las distancias de enlace son S1-C1 = 1.713(6), S1-C4 = 1.731(6), S2-C18 = 1.723(6), S2-C21 = 1.7463(6) Å. No obstante, el heterociclo de cinco miembros NCCNS tiene simetría con las distancias de enlace de N1-S3 1.622(6), N2-S3 1.627(7), N1-C23 1.349(8) y N2-C24 1.341(8).

Las longitudes y los ángulos de los enlaces son relativamente similares entre las dos moléculas independientes. No obstante, se producen cambios conformacionales significativos con los fragmentos de octilo como se muestra en la Figura 32. Para una molécula, todos los grupos octilos son casi lineales y realmente ortogonales con respecto al sistema (a), mientras que para otra molécula los grupos octilos están más distorsionados (b). Además, al lado de ambas moléculas, todos los sistemas tienen una pequeña desviación de la planaridad, hay interacciones- π con distancias de 3.622 a 3.794 Å que evidencian la presencia de dímeros (c) y en el nivel supramolecular se muestra un apilamiento π - π de pilares apilados como se muestra en la Figura 32 (d). La Tabla 15 describe las propiedades del monocristal M1.

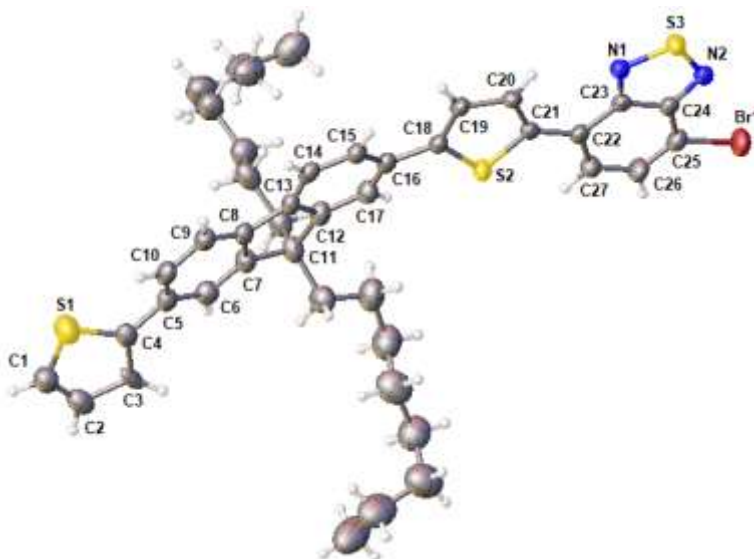
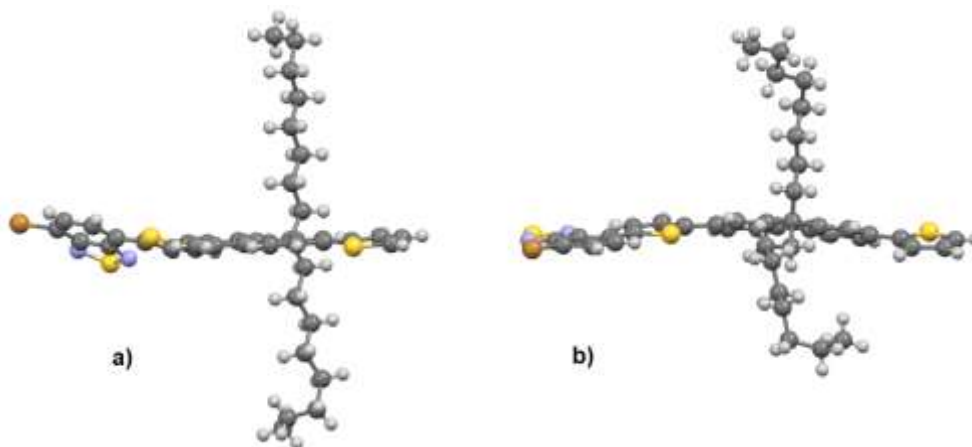


Figura 31.- Estructura molecular del compuesto M1. Distancias de enlace (Å) = S1-C1 1.713(6), S1-C4 1.731(6), S2-C18 1.723(6), S2-C21 1.7463(6), N1-C23 1.349(8), N2-C24 1.341(8), N1-S3 1.622(6), N2-S3 1.627(7), C25-Br1 1.875(5). Ángulos de enlace (°) = C1-S1-C4 92.7(3), S1-C4-C5 121.2(4), C18-S2-C21 92.7(3), S2-C18-C16 121.6(4), S2-C21-C22 120.3(4), N1-S3-N2 101.4(3). Ángulos de torsión (°) = S1-C4-C5-C6 -173.7(4), S2-C18-C16-C17 -164.9(4), S2-C21-C22-C23 -169.7(5).



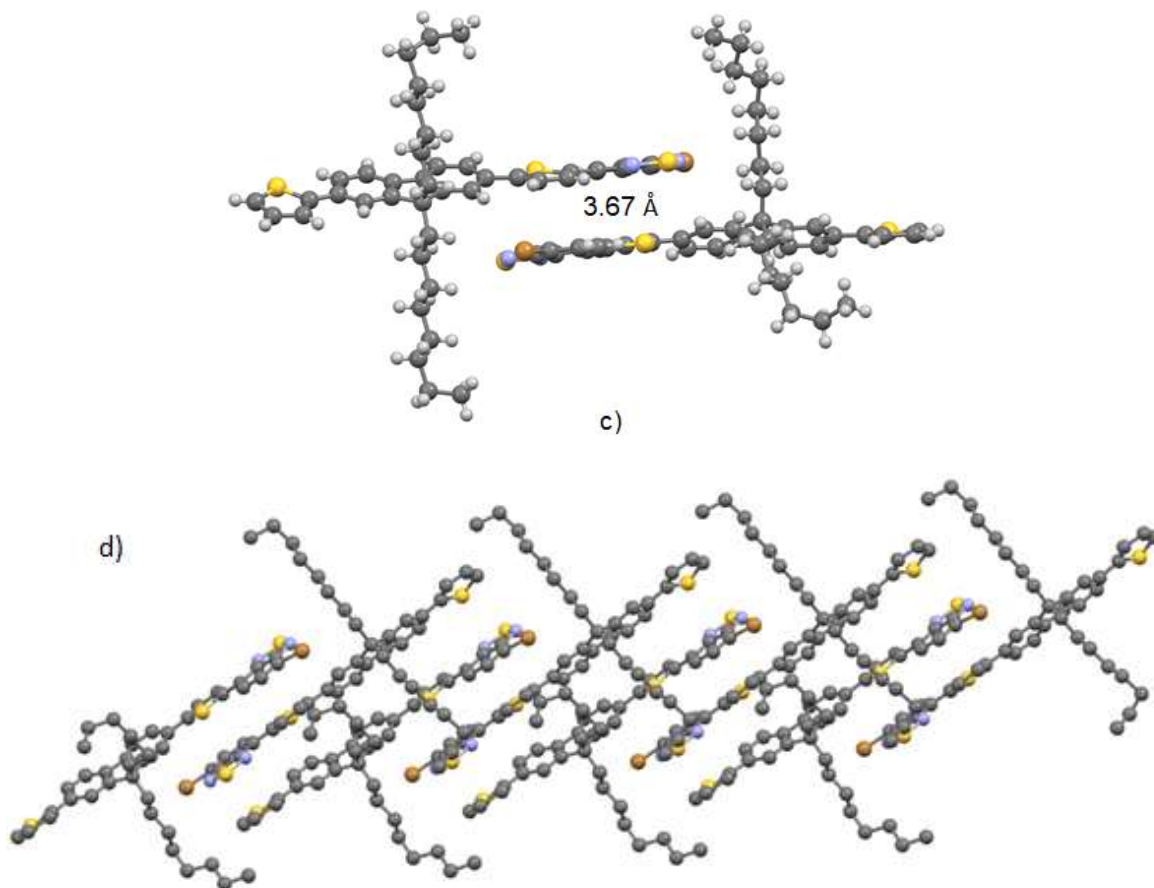


Figura 32.- a) y b) Diferentes conformaciones observadas para las dos moléculas independientes de M1 observadas en la celda unitaria. c) Estructura dimérica formada por las interacciones $\pi \cdots \pi$ d) Parte de la vista supramolecular que muestra el arreglo del apilamiento π .

4.1.3 Espectroscopía de infrarrojo

Como parte de la caracterización espectroscópica los compuestos se analizaron mediante espectroscopía de infrarrojo. En la Figura 33 y Tabla 7 se muestran los espectros obtenidos de cada grupo a) derivados de benzotiadiazol y b) derivados de tienopirrolodiona y la asignación de bandas de absorción infrarroja asociadas a los grupos químicos característicos. En cada espectro se observan las mismas bandas lo que es evidente debido a que se trata de compuestos derivados de los mismos monómeros solo con diferente peso molecular, sin embargo, a 1010 cm^{-1} en el espectro de **M1** (Figura 32 inciso a) se encuentra una señal bien definida la cual es atribuida a la vibración de tensión C-Br que podemos encontrar en la

molécula, dicha aseveración es corroborada con el espectro de masas y estructura de rayos X.

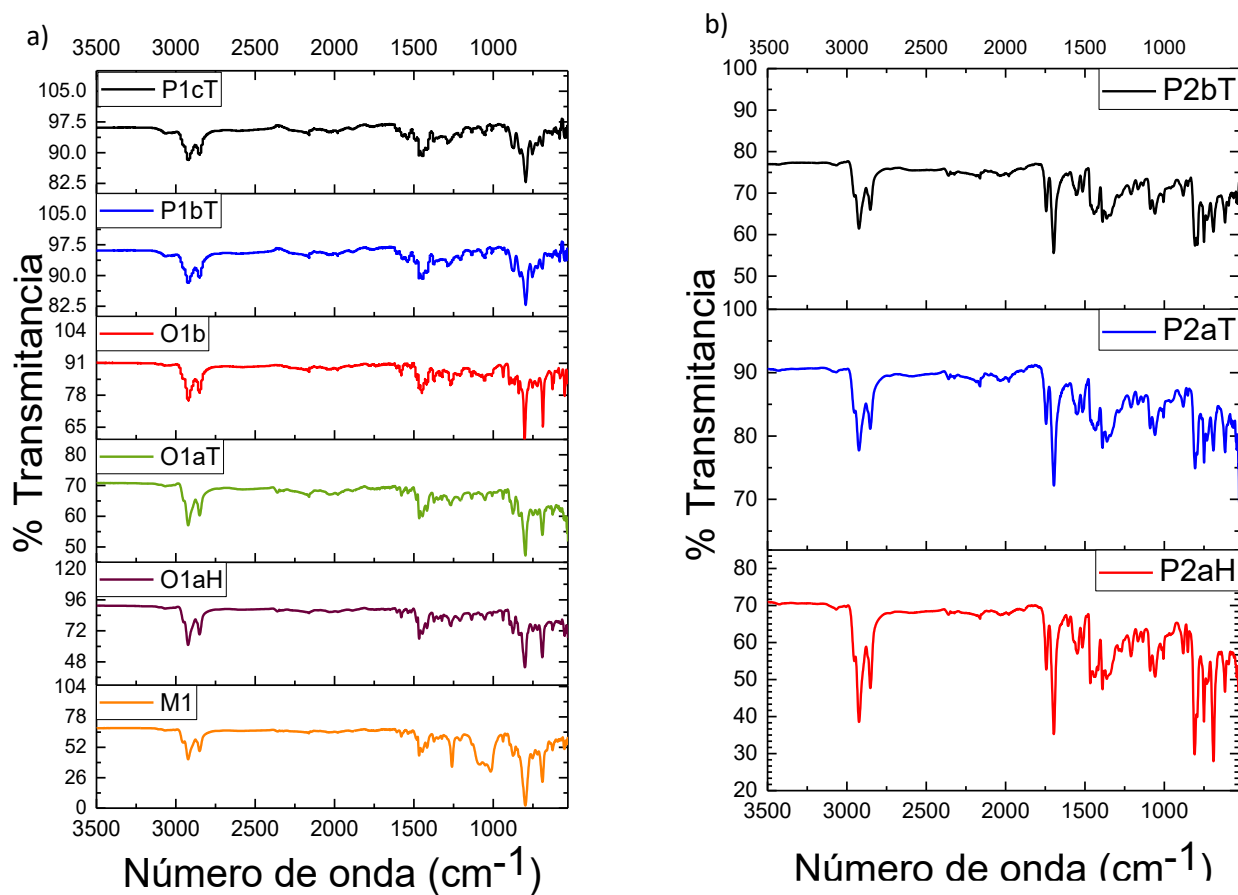


Figura 33.- Espectros de FT-IR de los compuestos derivados de a) benzotriazol y b) tienopirrolodiona.

Tabla 7.- Bandas importantes de absorción infrarroja (cm^{-1}) de todos los compuestos sintetizados.

Compuesto	Tipos de vibración (cm^{-1})							
	C-H st (cm^{-1})	sobretonos del anillo aromático	C=O st	C=N st	C=C st	C-Br st	C-H en el plano del tiofeno	C-H fuera del plano del tiofeno
M1	2917, 2857	2347, 2166, 2039		1578	1465	1010	793	1263
O1aH	2926, 2854	2363, 2165, 2006		1580	1464	-----	803	1266

O1aT	2919, 2855	2369, 2171, 2029		1579	1460	-----	801	1271
O1b	2920, 2850	2370, 2167, 2030		1580	1450	-----	1270	802
P1bT	2920, 2851	2362, 2167, 2040		1578	1465	-----	798	1273
P1cT	2920, 2850	2170, 2030, 1890		1570	1460	-----	792	1280
P2aH	2921, 2853	2348, 2159, 2031	1741	1694	1551	-----	803	1059
P2aT	2924, 2856	2348, 2165, 2039	1742	1692	1551	-----	796	1056
P2bT	2924, 2854	2363, 2164, 2036	1744	1697	1554	-----	797	1057

4.1.4 Determinación de la distribución del peso molecular: GPC y espectrometría de masas

Peso molecular de M1

La determinación del peso molecular de la molécula **M1** se realizó mediante espectrometría de masas por impacto electrónico a 70 eV, en la Figura 34 se muestra su espectro.

Para **M1** tenemos un peso molecular de 768 g/mol el cual corresponde al ion molecular (M+) que es la molécula ionizada, con una intensidad del 100% el cual también es el pico base, lo que indica que la molécula es altamente estable, característica muy importante para la aplicación de un compuesto orgánico como biomarcador en la microscopía de dos fotones.

Con una intensidad del 80% hay un pico con una $m/z = 766$ y se origina debido a un efecto isotópico del Br. En el espectro se observa un pico que corresponde a la pérdida del átomo de bromo con una intensidad del 7% y con una relación $m/z = 688$. El resto de las fragmentaciones más representativas se muestran en el espectro de masas.

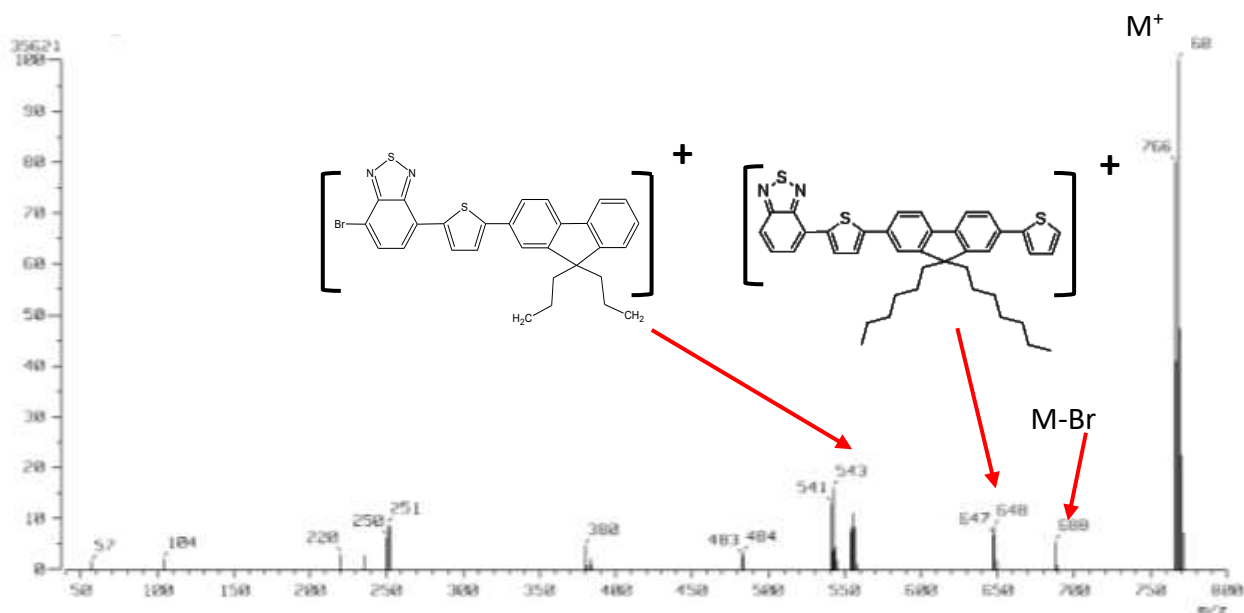


Figura 34.- Espectro de masas de M1 mediante impacto electronico (EI) a 70 eV.

En la Figura 35 se muestran los cromatogramas y las curvas de distribución de los pesos moleculares de los compuestos derivados de **BT** y **TPD** que se realizaron mediante cromatografía de permeación en gel.

En los cromatogramas de **O1aH**, **O1aT** y **O1b** se pueden observar curvas de distribución de pesos moleculares delgadas debido a que tienen un índice de polidispersidad cercano a 1 pero en ambos casos se tienen dos picos lo cual es consistente con los datos obtenidos en TGA en donde se determinó que se tienen dos temperaturas de descomposición debido a que se tiene una mezcla de dos diferentes tamaños de cadenas de oligómeros. Por el contrario, la curva obtenida del análisis del cromatograma de **P1cT** es más ancha debido a que tiene un índice de polidispersidad más alto a comparación con **O1aH**, y solo se observa un pico lo cual también es consistente con el análisis de TGA en donde sólo se tiene una sola temperatura de descomposición. En la Tabla 8 se presentan los valores de Mw (peso molecular medio másico), Mn (peso molecular medio numérico) e IPD (índice de polidispersidad de los polímeros derivados de BT y el peso molecular (PM) de la molécula **M1**.

Los polímeros, como se mencionó anteriormente se extraen en diferentes disolventes, las cadenas poliméricas de menor peso molecular se extraen en hexano debido a la polaridad de este y en tolueno las cadenas de mayor peso molecular, lo cual es consistente con los resultados obtenidos de GPC, en donde **P2aH** tiene un peso molecular medio másico es 2017 g/mol y **P2aT** tiene un $M_w=5008$ g/mol, la misma tendencia se tiene en **O1aH** y **O1aT**.

Realizando una comparación se reportó la síntesis de (PC-DTTPD)⁶⁸ con la misma estructura que P2, sin embargo, éste presenta un mayor peso molecular y un menor índice de polidispersidad que los obtenidos con los polímeros derivados de TPD de este trabajo.

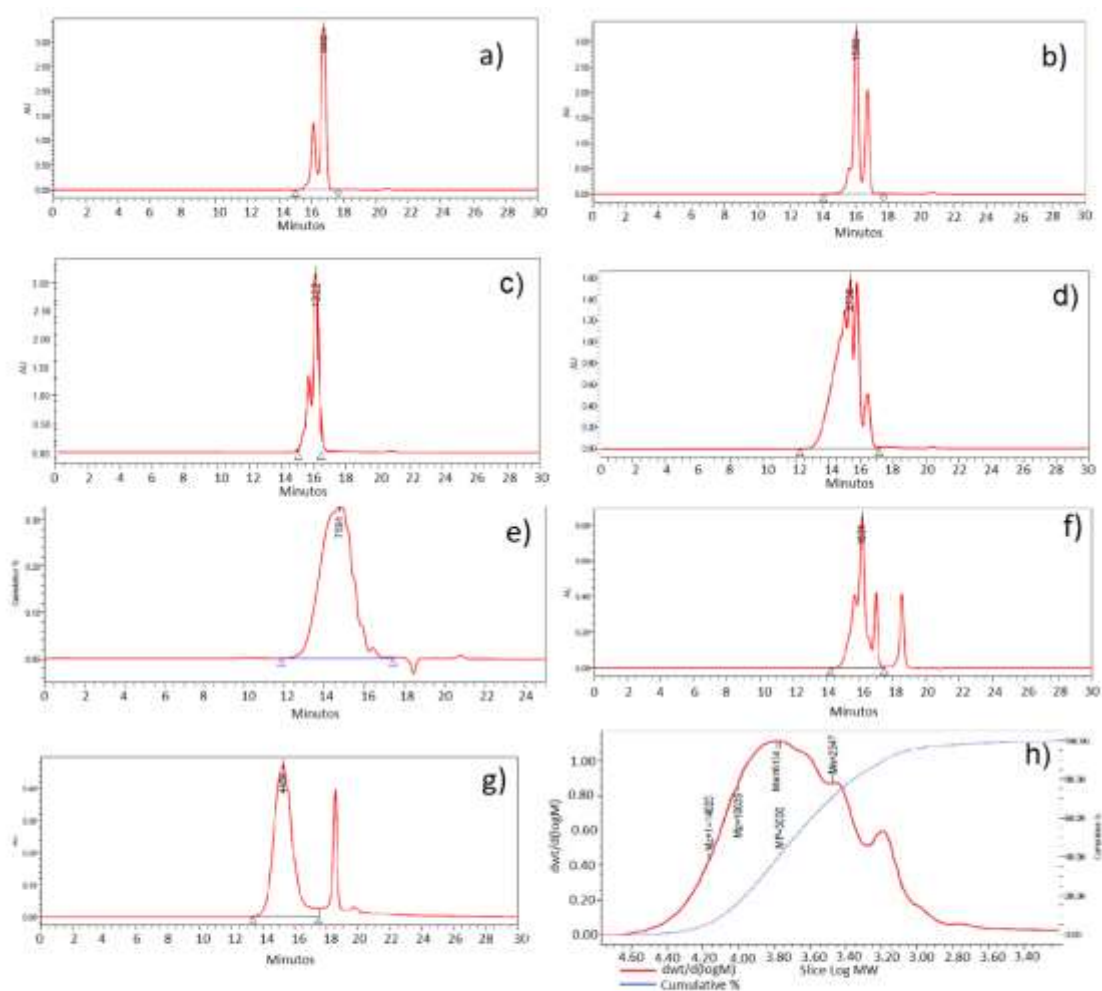


Figura 35.- Cromatogramas y curvas de distribución de peso molecular obtenidos por GPC de a)O1aH, b) O1aT, c) P1bT, d)P1cT, e)P2aH, f)P2aT y g) P2bT

Tabla 8.- Resumen de pesos los moleculares de los compuestos sintetizados.

Compuestos	Mw (g/mol)	Mn (g/mol)	IPD (Mw/Mn)
O1a H	920 ± 0.8	780 ± 0.7	1.18 ± 0.1
O1a T	1 421 ± 0.05	1 123	1.26 ± 0.05
O1b	1818 ± 0.04	1 576 ± 0.04	1.15 ± 0.005
P1bT	4 813 ± 3.7	2 296.5 ± 4.4	2.1 ± 0.8
P1cT	12 588 ± 0.03	6 086 ± 1.4	2.1 ± 1.4
P2aH	2 017 ± 0.7	1 404 ± 0.5	1.4 ± 0.1
P2aT	5 008 ± 1.8	3 015 ± 0.8	1.7 ± 1.0
P2bT	6 003 ± 3.1	2 871 ± 3.7	2.1 ± 0.6
	Peso molecular (PM g/mol)		
M1	768		

4.1.5 Caracterización térmica (TGA – DSC)

Los compuestos sintetizados se analizaron mediante análisis termogravimétrico (TGA) a fin conocer la temperatura de descomposición. Las moléculas y oligómeros **O1aH**, **O1aT**, **O1b** y **P2aH** tienen dos temperaturas de descomposición, lo que nos habla de que tenemos probablemente una mezcla cadenas de compuesto de diferentes tamaños, a diferencia de **P1cT** y **P1bT**, en donde se tiene una sola temperatura de descomposición.

En ambas familias se sigue la tendencia, al aumentar el peso molecular a pesar de que la temperatura de descomposición se mantiene en el mismo rango hay un menor porcentaje de pérdida en peso lo que nos habla de una mayor estabilidad. En la Figura 36 se muestran los termogramas de los compuestos derivados de a) BT y b) TPD y en la Tabla 9 se encuentran los valores de Td, perdida en peso y punto de fusión para el caso de **M1**.

La temperatura de transición vítrea (Tg) en los polímeros es la temperatura por encima de la cual el compuesto pierde rigidez y se vuelve gomoso⁶⁹, en los derivados de BT como de TPD, al ir aumentando el peso molecular medio másico, la temperatura de transición vítrea también aumenta, debido probablemente que al aumentar el tamaño del esqueleto π-conjugado, las cadenas del polímero tienen una menor probabilidad de poder rotar y al restringir el movimiento, la Tg aumenta.

Tabla 9.- Resumen de las propiedades térmicas de los compuestos derivados de BT y TPD

Compuesto	Temperatura de descomposición (°C)	Pérdida en peso (%)	Temperatura de transición vítrea (Tg, °C)	Temperatura de fusión (Tf, °C)	Temperatura de Cristalización (Tc, °C)	Entalpía
M1	-----	-----	-----	85	-----	-----
O1a H	389.3, 463.6	61.1	-----	-----	-----	-----
O1a T	378, 455.1	52.4	-----	-----	-----	-----
O1b	412.9, 492.6, 519.5	53	-----	-----	-----	-----
P1bT	477.04	43	86.89	-----	-----	-----
P1cT	458.3	38.6	105.77	227.35	221.76	1.24
P2aH	370, 452.3	61.7	34.02	-----	-----	-----
P2aT	440.4	39.4	70.02, 106.63	-----	-----	-----
P2bT	481.4	42.4	92.17	-----	-----	-----

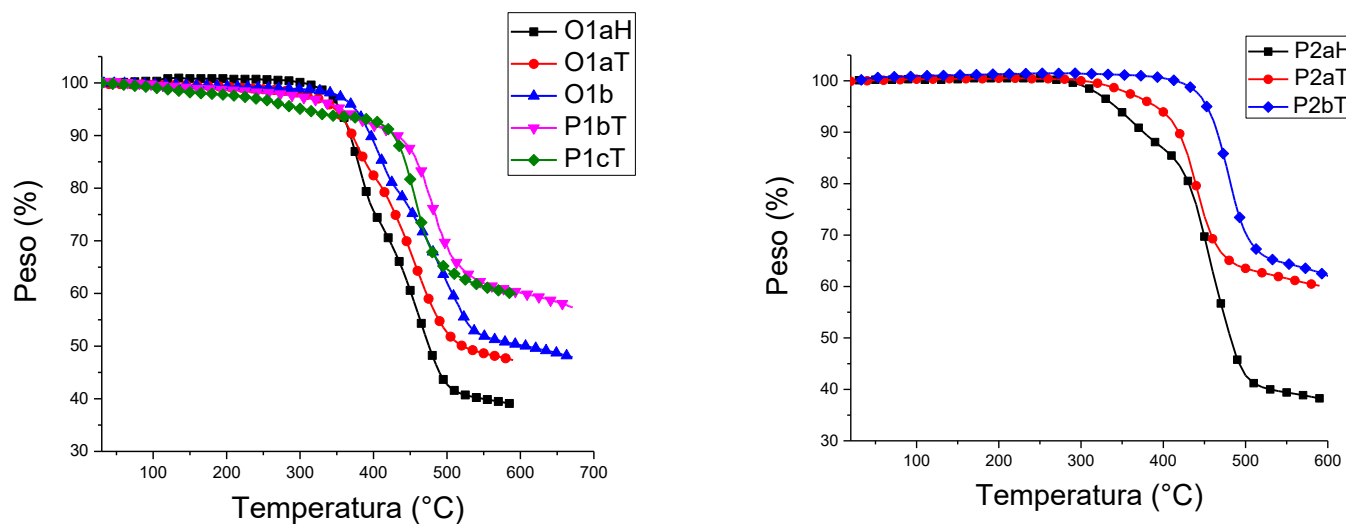


Figura 36.- Termogramas de los compuestos derivados de a) benzotiadiazol y b) tienopirrolodiona

4.1.6 Caracterización óptica lineal: UV-vis, fluorescencia y eficiencia cuántica en solución de los fluoróforos

En la Figura 36 se muestran los espectros de absorción normalizados de los compuestos derivados de a) benzotiadiazol y b) tienopirrolodiona en donde para todos los compuestos se aprecian dos bandas lo cual es característico de compuestos con una arquitectura electrónica lineal donador-aceptor. La banda que se encuentra más desplazada al azul alrededor de los 353-389 nm se debe a una transición electrónica $\pi \rightarrow \pi^*$ de la fracción donadora de los compuestos (fluoreno) y la banda más desplazada al rojo alrededor de los 500 nm se deben a un proceso de transferencia de carga intramolecular (ICT) ⁷⁰, donde la carga es transferida de los orbitales π del fluoreno (donador) a los orbitales π^* de los grupos aceptores benzotiadiazol y tieno-pirrolodiona, respectivamente. Se reportó la síntesis de un polímero con una estructura similar a los oligómeros derivados de BT⁷¹ que se presentan en éste trabajo, dicho polímero presenta bandas de absorción alrededor de los 510 y 638 nm en THF con una eficiencia cuántica de 64%, lo cual es consistente con los datos obtenidos en éste trabajo de investigación para los compuestos derivados de BT. Se realizó la comparación de los compuestos derivados de TPD con uno reportado (PC-DTTPD) ⁷² el cual tiene bandas de absorción similares en forma y longitud de absorción máxima (494 nm) a las obtenidas de los compuestos derivados de TPD de este trabajo (~540 nm).

En la Figura 37 se puede observar que en ambos espectros los compuestos con un mayor peso molecular (**P1cT**, **P2aT** y **P2bT**), tienen bandas de absorción con un mayor corrimiento al rojo, lo cual es debido al aumento del peso molecular por lo tanto hay un incremento de la conjugación, lo que hace que el band gap disminuya.

En relación a la intensidad de las bandas tanto en el espectro de los compuestos derivados de **BT** como en el de los **TPD**, se puede observar como la segunda banda correspondiente a la transferencia de carga intramolecular de los compuestos aumenta de intensidad en relación a la primer banda conforme aumenta el peso

molecular de los compuestos y esto lleva a una disminución de la eficiencia cuántica, esto debido probablemente a que cuando aumenta de intensidad significa que hay una mayor cantidad de moléculas transfiriendo la carga en vez de emitirla debido a que al aumentar el peso molecular hay un mayor proceso de ICT, de ésta manera se tiene una mayor pérdida de energía en forma vibracional y una menor cantidad de energía en forma radiativa.

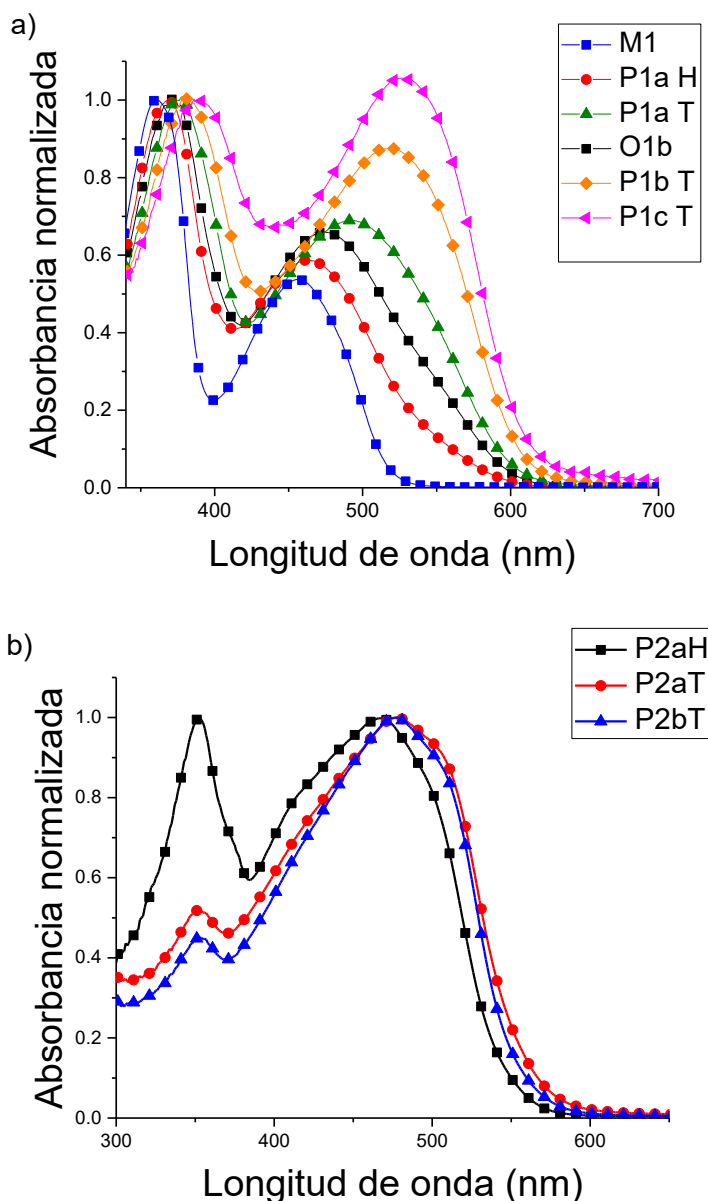


Figura 37.- Espectro de absorción normalizados en solución de los compuestos derivados de a) benzotriazol y b) tienopirrolodiona.

Al igual que con los espectros de absorción, en los de emisión (ver Figura 38) al aumentar la longitud del esqueleto π -conjugado, hay un mayor corrimiento al rojo en las bandas de emisión tanto en la familia del BT como del TPD. Las bandas de los compuestos derivados de BT tienen un mayor corrimiento al rojo a comparación de los derivados de TPD.

En la Tabla 10 se muestran los valores de la longitud de onda de absorción y emisión máxima de los compuestos de la familia BT-fluoreno en solución de THF así como los respectivos valores de eficiencia cuántica.

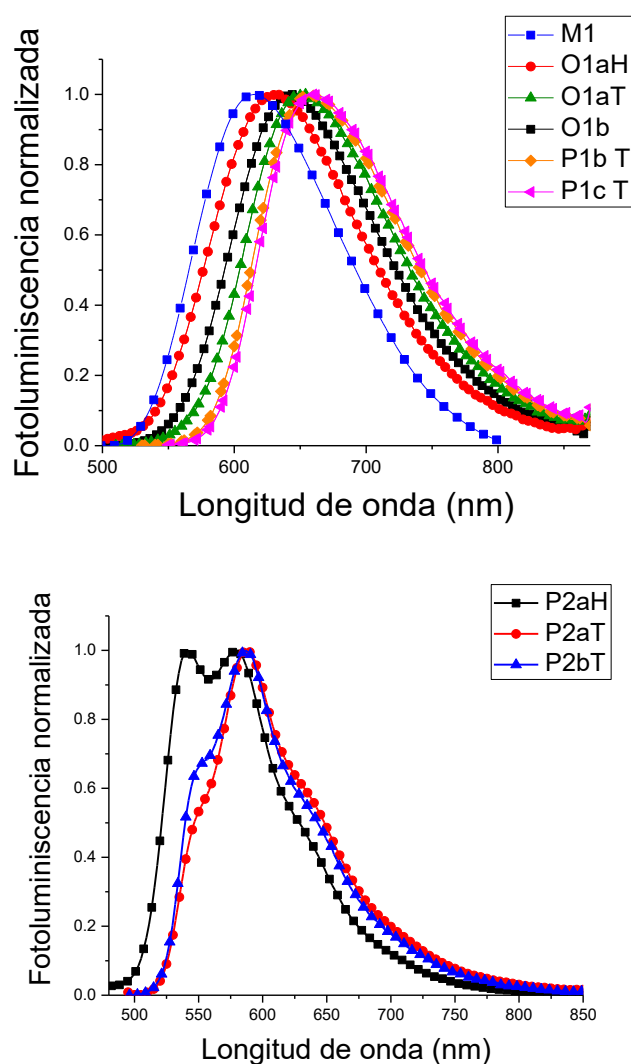


Figura 38.- Espectro de emisión de los compuestos derivados de a) benzotiadiazol y b) tienopirrolodiona obtenidos bajo excitación UV a 365 nm.

Tabla 10.- Resumen de las propiedades ópticas de los compuestos derivados de BT y TPD en solución.

Compuesto	λ_{\max} absorción (THF)	λ_{\max} emisión (THF)	Desplazamiento de Stockes (cm⁻¹)	Eficiencia cuántica de fluorescencia (QY) (THF) (%)
M1	360, 456	537	3307.9	92
O1a H	369, 463	632	5775.5	69
O1a T	375, 494	653	4929	60
O1b	373, 477	645	5460.5	75
P1b H	370, 469	639	5672.5	66
P1b T	378, 518	657	4084.3	43
P1c T	389, 526	660	3859.9	38
P2aH	353, 468	544	2985.2	66
P2aT	353, 478	551	2771.7	33
P2bT	353, 477	548	2716.2	32

4.1.7 Caracterización óptica de las nanopartículas

Se analizaron las propiedades ópticas (absorción, emisión y eficiencia cuántica) de los compuestos procesados como nanopartícula, en película y se realizó una comparación con los resultados obtenidos en solución.

En la Figura 39 se muestran los espectros de absorción y emisión normalizados en solución, sólido y como NPs de **O1aH**, **O1aT**, **O1b**, **P1bT**, **P2aH** y **P2bT**, en la Tabla 11 se presentan los datos de las propiedades ópticas lineales. Se observan en todos los espectros de la familia del BT la misma tendencia, se mantiene la forma de la banda de absorción y emisión en las diferentes formas de agregación molecular, sin embargo, hay un mayor desplazamiento hacia el rojo en las bandas de los compuestos en sólido y como NPs debido a que hay un apilamiento π - π , lo cual puede corroborarse al comparar la intensidad de la banda más desplazada hacia el rojo en los espectros de solución y en nanopartícula, como se puede observar en la figura 40 en todos los espectros de absorción la segunda banda es más intensa cuando está en nanopartícula así como en película porque como se mencionó anteriormente hay una mayor cantidad de moléculas en un proceso de ICT. A

comparación con los espectros de BT, en los espectros de absorción de la familia del TPD mantienen la misma forma cuando están en solución y en película, además también tienen longitudes de absorción máxima similares tanto en solución como en película lo que indica que hubo pocas interacciones intermoleculares en el estado sólido, lo cual puede atribuirse a las cadenas alquílicas laterales voluminosas tanto del fluoreno como al de las unidades del TPD.

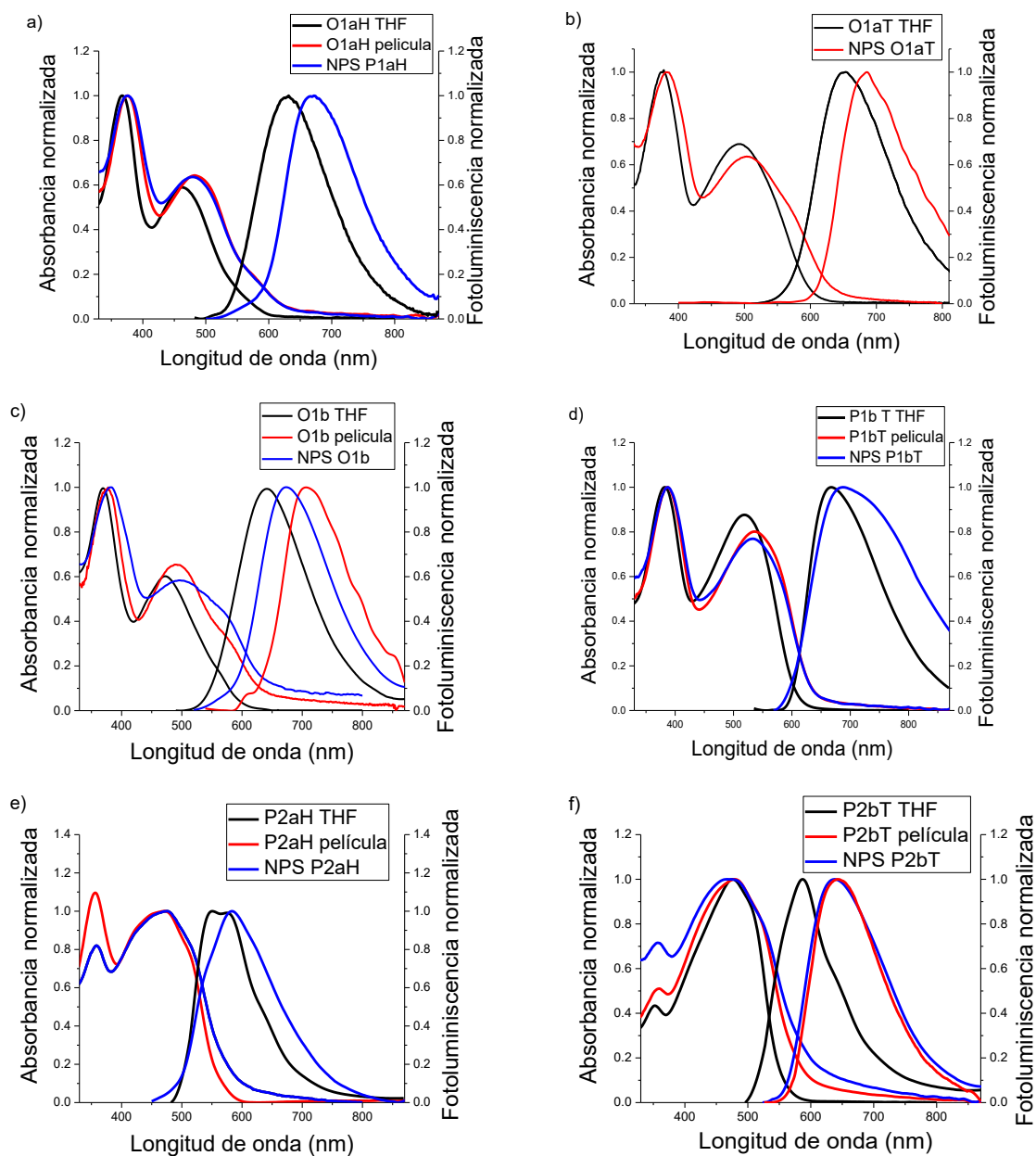


Figura 39.- Espectro de absorción y emisión en solución, película y nanopartícula de a) O1aH, b) O1aT, c) O1b, d) P1bT, e) P2aH y f) P2bT

El material en las NPs se encuentra en estado sólido, por lo tanto es en este estado en el que se miden las propiedades ópticas, se ha encontrado que las propiedades de luminiscencia de las moléculas en el estado sólido dependen de las interacciones intermoleculares y, por lo tanto, están afectadas por la auto-ensamble o modo apilado de los cromóforos.⁷³ En éste trabajo se compararon los valores de eficiencia cuántica obtenidos en solución, película y como NPs de los compuestos descritos en éste trabajo de investigación, se encontró que cuando los fluoróforos están en película y en NP la eficiencia cuántica disminuye considerablemente, debido probablemente a que forman agregados por interacciones π - π lo que hace que la eficiencia cuántica decaiga, efecto denominado “*quenching* por agregación inducida (ACQ por sus siglas en inglés)⁷⁴”, dicho inconveniente lo presentan todos los compuestos sintetizados en éste trabajo.

Tabla 11.- Tabla comparativa de las propiedades ópticas de los fluoróforos en solución, película y en nanopartícula.

Compuesto	λ_{\max} absorción (nm)	λ_{\max} emisión (nm)	Eficiencia cuántica (%)
O1aH THF	369, 463	632	69
O1aH película	376, 482	-----	-----
NPS O1aH	374, 477	667	13
O1a T THF	378, 494	653	60
NPS O1aT	383. 501	686	4
O1b THF	373, 474	641	75
O1b película	378, 490	706	5
NPS O1b	377, 490	673	12
P1bT THF	378, 518	657	43
P1b película	387, 536	-----	-----
NPS P1bT	383, 535	687	3
P2aH THF	359, 475	551	66
P2aH película	356, 470	-----	-----

NPS P2aH	358, 475	583	9
P2bT THF	352, 476	586	32
P2bT película	359, 479	643	4
NPS P2bT	357, 466	638	3

Comparación de las propiedades ópticas de las nanopartículas con lo reportado en la literatura

En la Tabla 12 se muestra una comparación de las propiedades ópticas de las NPs sintetizadas **NPS O1b** en este trabajo de investigación y de NPs que hay reportadas en la literatura, las cuales son fabricadas a partir de compuestos derivados de benzotriazol. Las NPs reportadas por Aparicio Ixta *et al.*⁷⁵ en donde la estructura del fluoróforo a partir del cual fabricaron las NPs tiene una gran semejanza al de **O1b** en estructura (derivado de fluoreno y benzotriazol) y en peso molecular tienen una sección transversal de TPA de 76 GM, valor comparable con el obtenido para las **NPS O1b** (55 GM), sin embargo la eficiencia cuántica que obtuvieron para **M1-SNPs**, es arriba de 8 órdenes de magnitud mayor a la obtenida en éste trabajo de investigación para **NPS O1b**. Las nanopartículas fabricadas por X. Guo *et al.*⁷⁶ presenta una eficiencia cuántica de 4%, un valor con tres órdenes de magnitud menor que las **NPS O1b** las cuales tienen valor de eficiencia cuántica de 12 %, sin embargo, dichos autores lograron obtener imágenes de células de cáncer gástrico humano, lo cual abre la posibilidad de que **NPS O1b** a pesar de la QY obtenida pueda ser utilizado como agente de contraste. Las bandas de absorción y emisión para **NPS O1b** están dentro del rango obtenido para nanopartículas fabricadas a partir de benzotriazol, el tamaño de las nanopartículas a pesar de ser más grande que las reportadas en la literatura están por debajo de 70 nm, diámetro deseable para nanopartículas utilizadas como agentes de contraste para la TPM.

Tabla 12.- Comparación de las propiedades ópticas de las nanopartículas NPS O1b sintetizadas en este trabajo con nanopartículas reportadas en la literatura derivadas de benzotiadiazol.

Compuesto / disolvente	λ_{\max} absorción (nm)	λ_{\max} emisión (nm)	QY (%)	σ (GM) /técnica	Tamaño de nanopartícula (nm) / técnica usada para la medición	Referencia
NPS O1b /agua	377, 490	673	12	55/TPEF	51.4 +/- 10.5 FESEM	En este trabajo
PFBT-F127-SiO ₂ NPs / agua	360, 420	545	75	1085 /TPEF	12 FE-TEM	77
M1-SNPs / agua	330, 415	511	~100	76/TPEF	19 TEM	78
PDTPBT NPs /agua	410, 675	----	----	----	45 TEM	79
PFSBT NPs /agua	317, 438	560	4	----	22 DSL	80

4.1.8 Caracterización morfológica de las nanopartículas

El análisis de tamaño y distribución de tamaños de las NPs fabricadas se realizó mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM).

En las Figuras 40 a 44 se presentan las micrografías obtenidas de cada una de las NPs fabricadas a partir de los diferentes materiales sintetizados en este trabajo de investigación, así como análisis de distribución de tamaños de las NPs obtenidas de varias micrografías las cuales fueron procesadas mediante el programa IMAGEJ. En las micrografías se puede observar claramente la encapsulación con sílice hace que las nanopartículas tengan una forma esférica. En la Tabla 13 se muestra un resumen de los diámetros obtenidos mediante esta técnica.

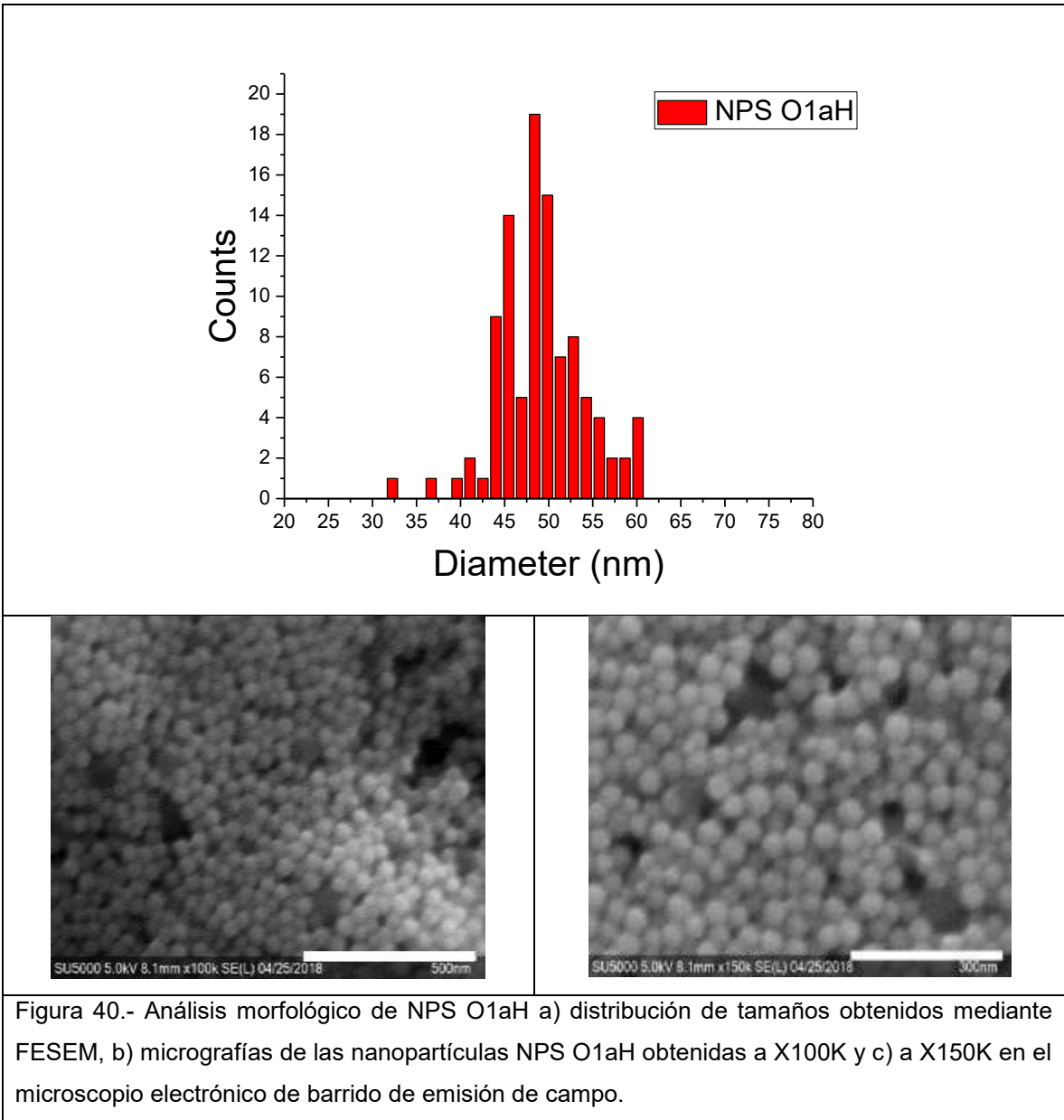
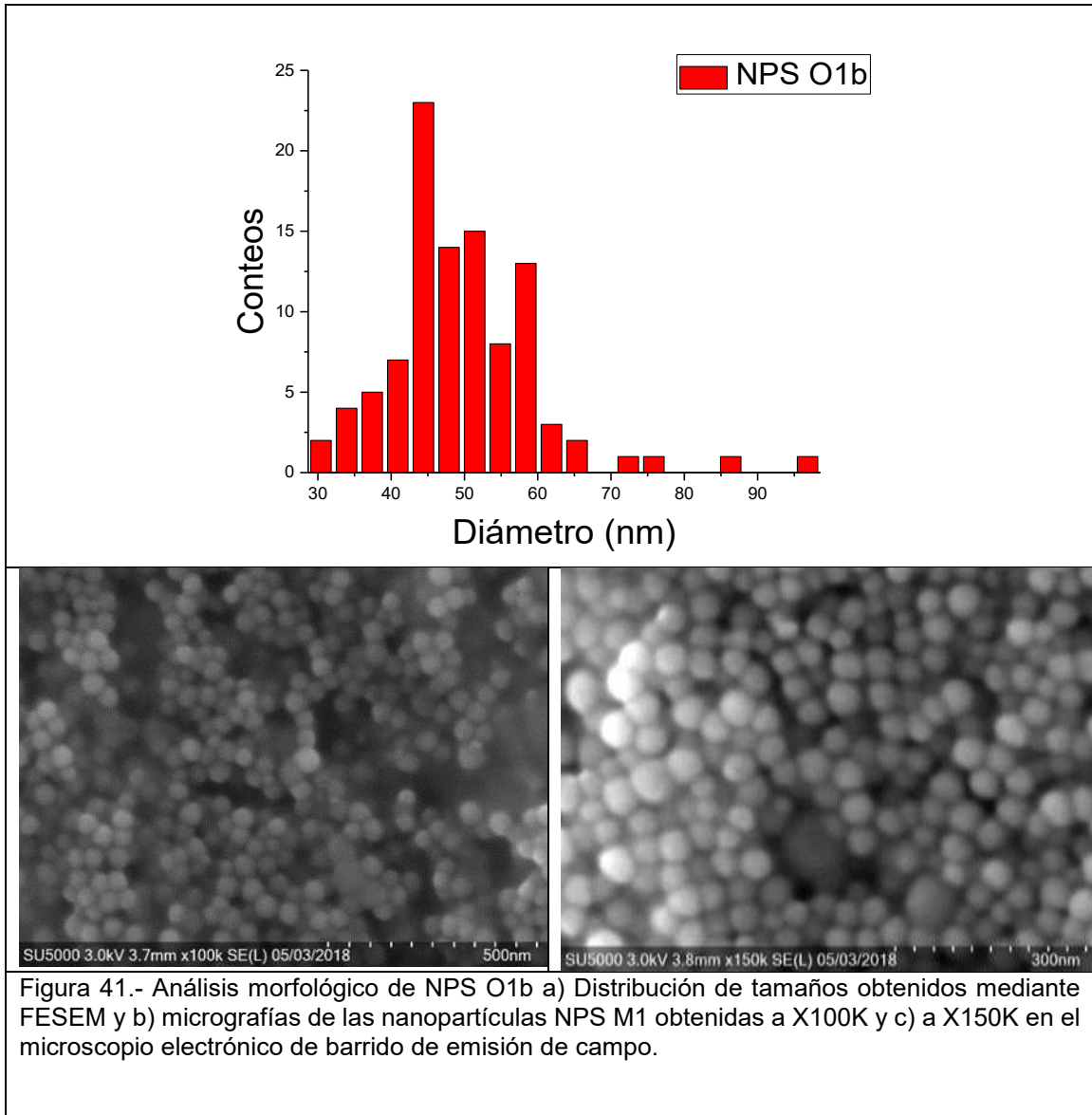
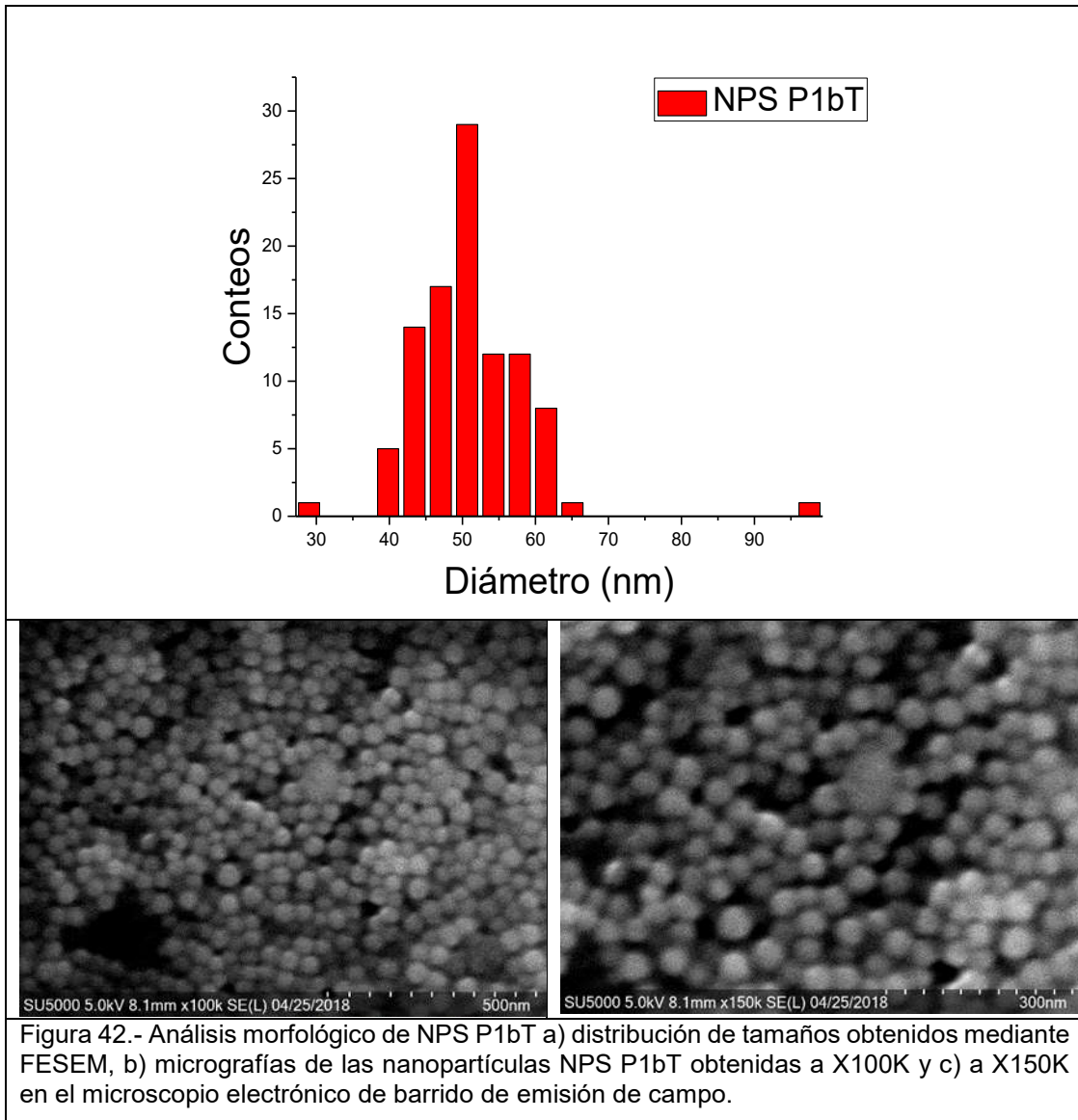
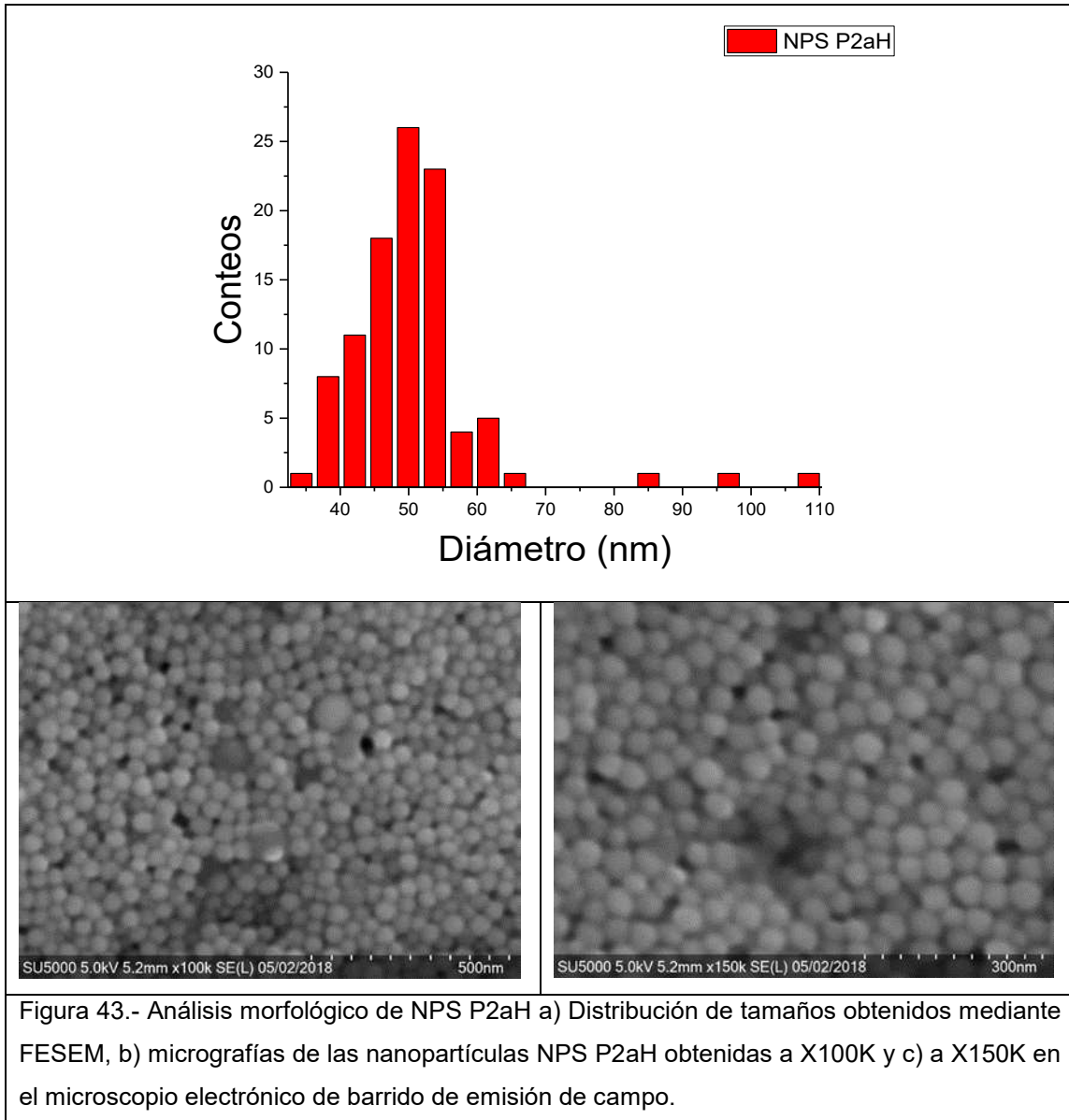


Figura 40.- Análisis morfológico de NPS O1aH a) distribución de tamaños obtenidos mediante FESEM, b) micrografías de las nanopartículas NPS O1aH obtenidas a X100K y c) a X150K en el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo.







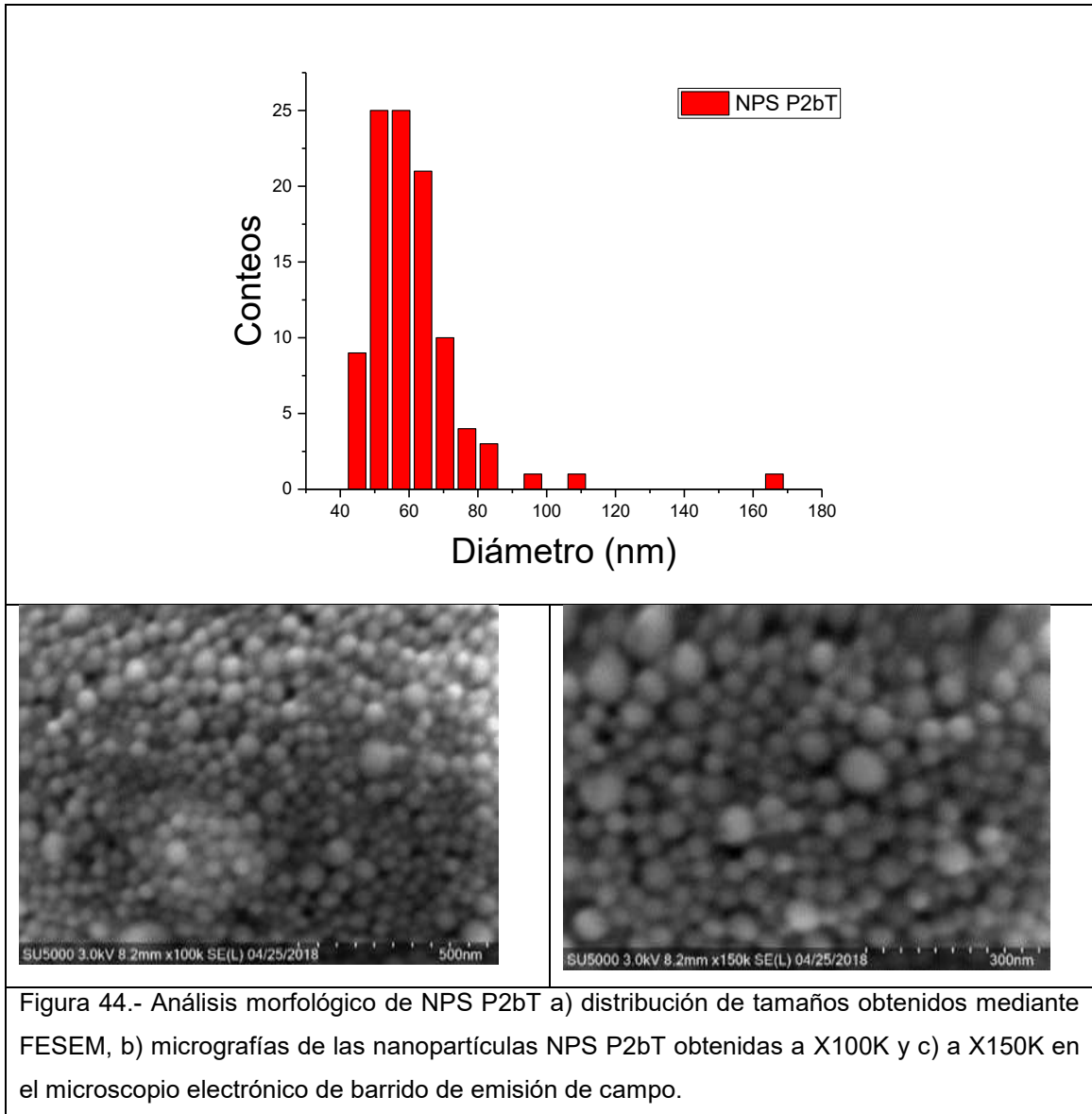


Tabla 13.- Resumen de los diámetros promedio de las nanopartículas.

Nanopartículas	Diámetro promedio (nm) (SEM)
NPS O1aH	49.9 +/-4.9
NPS O1b	51.4 +/- 10.5
NPS P1bT	52.9+/-7.94
NPS P2aH	52.3 +/- 10.5
NPS P2bT	64.1 +/- 15.46

4.1.9 Fluorescencia de Rayos X (XRF)

Se realizó el análisis de **O1b** y **NPS O1b** a través de la técnica fluorescencia de rayos X (XRF) con la finalidad de determinar la composición química de las diferentes muestras y así comparar los resultados obtenidos de las nanopartículas con la solución del oligómero inicial. En la figura 45 se pueden observar los picos de los elementos obtenidos en el espectro de XRF de **NPS O1b** y en la Tabla 14 se muestran un resumen de cada elemento obtenido. La matriz usada es agua debido a que las NPs están suspendidas en agua, y los elementos presentes que se obtuvieron fueron Si debido a que las nanopartículas están forradas con sílice, también se obtuvo S y Br, elementos presentes en el dímero **O1b**, con lo que se puede corroborar la presencia del mismo en las nanopartículas, apoyando así los resultados de absorción y emisión en donde también se observa que los espectros tienen las mismas bandas en la solución de las nanopartículas que tiene la solución de **O1b**.

Tabla 14.- Tabla de los resultados obtenidos mediante la técnica XRF de NPS O1b.

Formula	Z	Concentración	Estatus	Concentración calculada	Error estándar
H ₂ O	1	100.00%	Matriz		
Si	14	0.01%	XRF 1	0.013	4.76%
S	16	30 PPM	XRF 1	0.003	5.80%
Br	35	2 PPM	XRF 1	0	16.00%

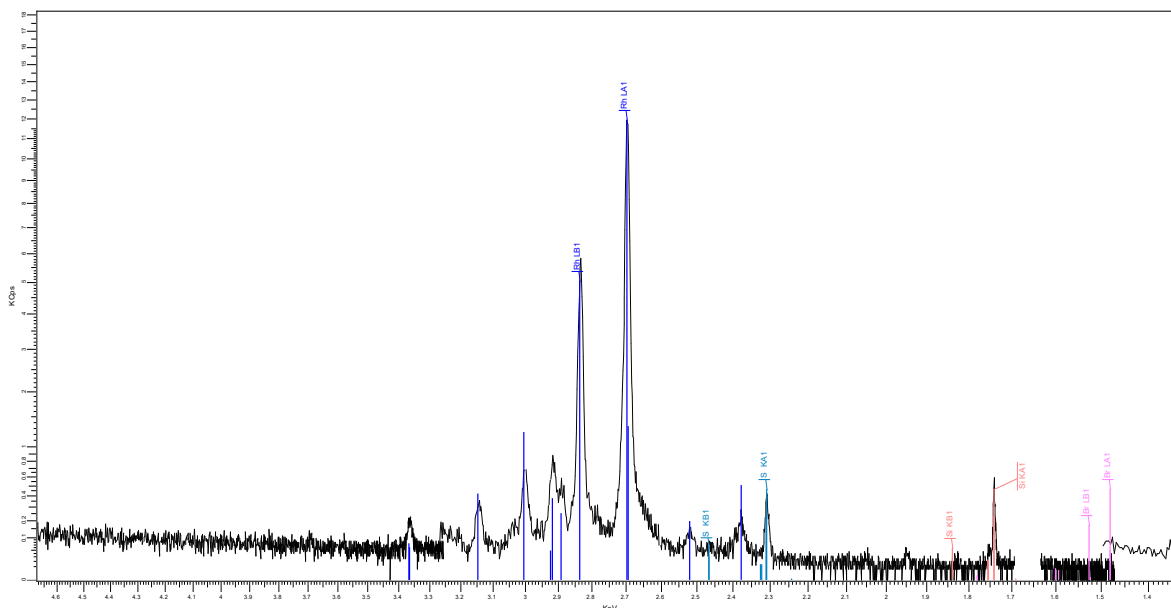


Figura 45.- Líneas de fluorescencia de rayos X detectadas de una muestra de NPS O1b.

4.1.10 Fluorescencia inducida por la absorción de uno y dos fotones en el microscopio de fluorescencia.

Una de las aplicaciones posibles de las nanopartículas de sílice dopadas con los compuestos orgánicos sintetizados (**O1aH**, **O1b**, **P1bT**, **P2aH** y **P2bT**) es como agentes de contraste para microscopía excitada por la absorción de dos fotones, para estudiar la fluorescencia de estos materiales a la excitación de uno y dos fotones, se usaron los microscopios de fluorescencia confocal y multifotón respectivamente, y de esta manera poder evaluar si las NPs emiten al ser excitados

con los mismos, de esta manera se realizó un barrido espectral en ambos microscopios y los espectros obtenidos se muestran en las gráficas de la Figura 46 y en la Figura 47 se muestran las imágenes obtenidas con cada solución de nanopartículas testadas. Como se puede observar en los espectros de fluorescencia obtenidos en los microscopios de modo confocal y multifotón, las **NPS O1aH** y **NPS O1b** emiten cuando se analizan con ambos microscopios, en el caso de las NPs de **NPS P1b** y **NPS P2aH** solo emiten cuando se analizan con el microscopio confocal, en el multifotón, no, porque dichas NPs tienen una eficiencia cuántica menor en comparación con las NPs derivadas de **O1aH** y **O1b**.

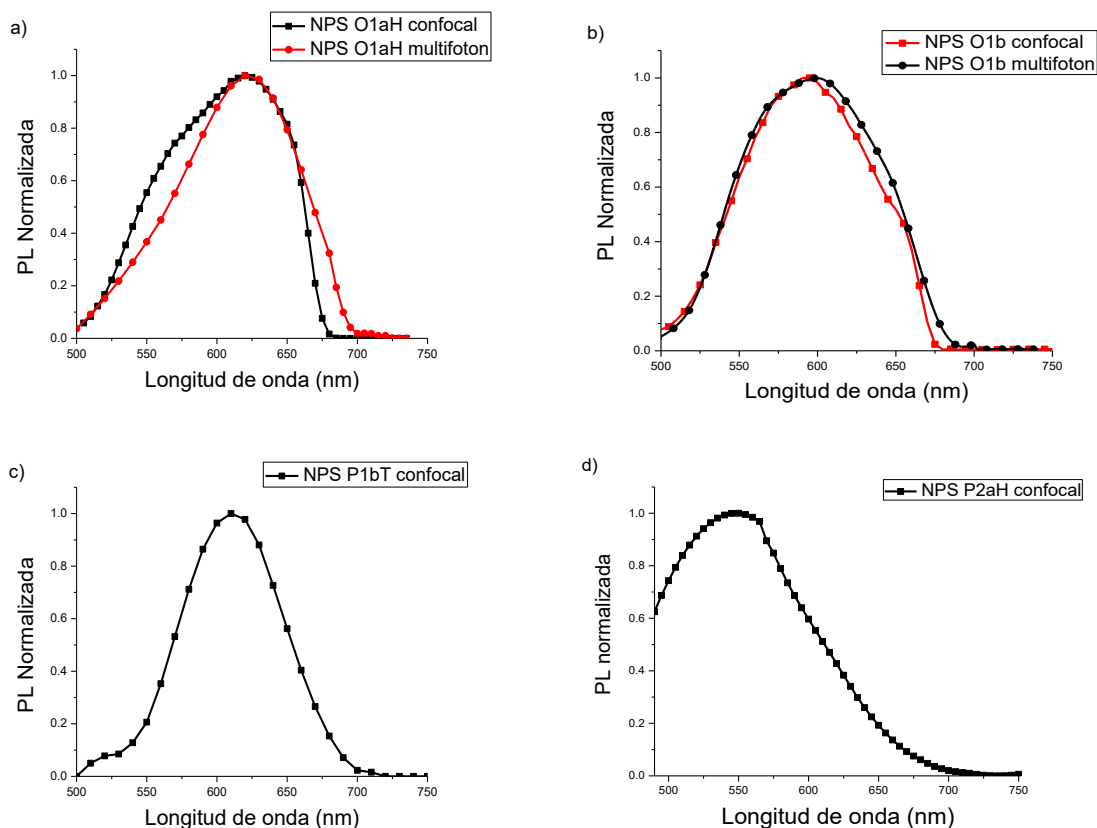


Figura 46.- Espectros de emisión obtenidos en el microscopio confocal Olympus FV1000 Multifotónico a) de NPS O1aH en modo confocal (448 nm) y modo multifotónico a 800 nm. b) de NPS O1b en modo confocal a 448 nm y en modo multifotónico a 950 nm, c) de NPS P1bT en modo confocal a 480 nm y d) NPS P2aH modo confocal a 448 nm.

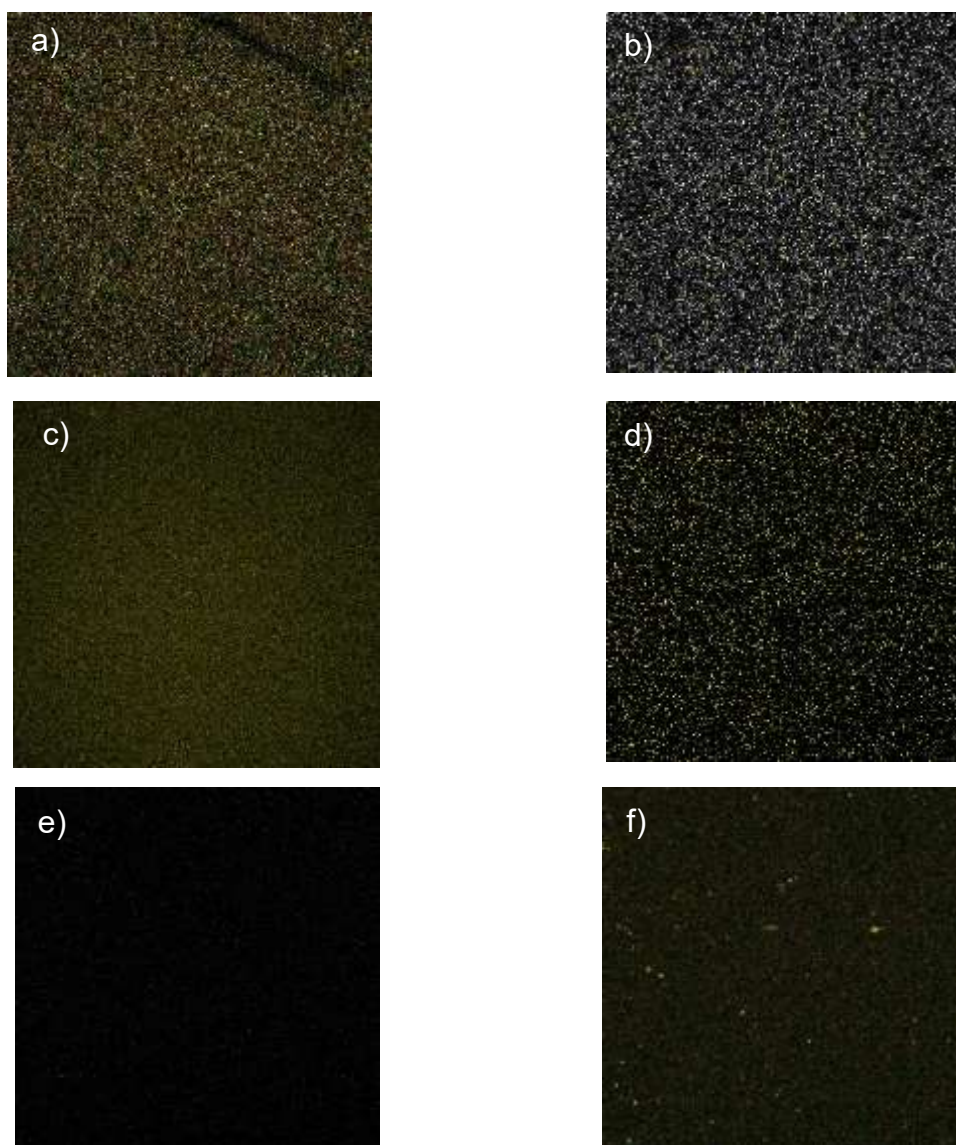


Figura 47.- Imágenes obtenidas en el microscopio confocal Olympus FV1000 Multifotónico a) de NPS O1aH en modo confocal (448 nm) b) NPS O1aH modo multifotónico a 800 nm. c) de NPS O1b en modo confocal a 448 nm d) NPS O1b modo multifotónico a 950 nm, e) de NPS P1bT en modo confocal a 480 nm y f) NPS P2aH modo confocal a 448 nm.

4.1.11 Estudios de fluorescencia excitada de dos fotones (TPEF) para O1b (solución y NPS)

La Figura 48a muestra la superposición espectral entre la absorción de un fotón y el espectro de fluorescencia excitado de uno y dos fotones de **O1b**. Se observó un

amplio espectro de TPEF (línea roja) con una intensidad máxima de alrededor de 567 nm para el dímero **O1b** en el disolvente THF bajo un bombeo láser de 810 nm. Además, el espectro de un fotón con láser de diodo (405 nm, 3 mW) de excitación visto en la figura y un pico agudo reducido alrededor de 405 nm se debe a la bomba residual parcialmente transmitida a través del filtro de bloqueo. En la Figura 38b se muestra un resumen de las longitudes de onda de excitación de dos fotones óptimas y los picos de los valores correspondientes de sección transversal (por pulso de energía) para las regiones de longitud de onda de 680 - 870 nm. La máxima sección transversal de TPA (σ) de **O1b** se calculó en aproximadamente igual a **18 GM** ($1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} / \text{fotón}$) cuando se excita con una energía promedio de 3.75 nJ / pulso a 740 nm. Los espectros de TPEF de **NPS O1b** disperso en agua con $6.2 \times 10^{-5} \text{ M}$ son similares a los de la emisión, excitados la absorción de un fotón. La sección transversal de TPA estimado de **NPs O1b** es de aproximadamente **55 GM** (Figura 38c) con una señal de excitación a 750 nm. Las **NPS O1b** dispersas en agua exhibieron un valor de sección transversal de TPA tres veces mayor que la molécula de **O1b**.

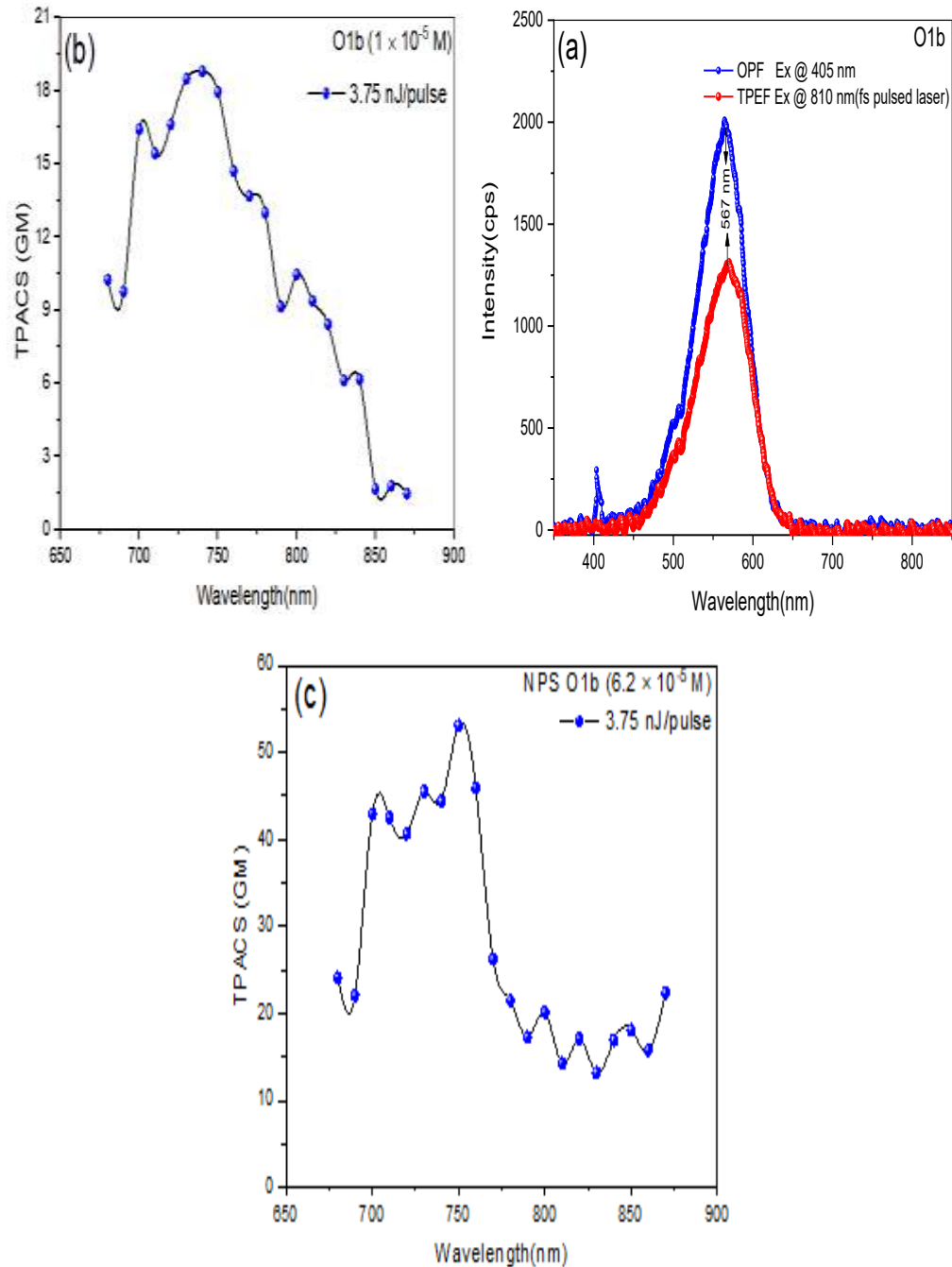


Figura 48.- (a) Superposición espectral entre el espectro de fluorescencia inducida por la absorción de uno y dos fotones de O1b. (b) Valor de secciones transversales de TPA de O1b en THF para el rango de excitación de longitud de onda de 680 – 870 nm (c) Valor de secciones transversales de TPA de NPs O1b en H₂O para la región de longitud de onda de 680 – 870 nm.

5.- CONCLUSIONES

Se sintetizaron dos familias de compuestos orgánicos derivados de benzotiadiazol (BT) y tienopirrolodiona (TPD) vía arilación directa.

En la familia del BT las bandas de absorción tienen una misma forma en solución, película y nanopartícula, sin embargo hay un desplazamiento batocrómico de las bandas de absorción en película y en NPs comparado con los compuestos en solución debido a que en estas dos hay un apilamiento π que origina un mayor corrimiento al rojo, sin embargo en la familia del TPD las bandas de absorción máxima aparecen a la misma longitud de onda en solución, película y nanopartícula debido a que en estos compuestos hay cadenas alquílicas voluminosas presentes en el TPD y en el fluoreno lo que genera una mayor repulsión estérica, un menor apilamiento π y por lo tanto no exista un desplazamiento batocrómico en las bandas de absorción en película y NPs.

Al variar el tiempo, cantidad de catalizador y volumen de disolvente en las rutas sintéticas se obtuvieron compuestos con diferentes pesos moleculares. En la familia del BT como en la del TPD al aumentar la longitud del esqueleto π conjugado de los compuestos disminuye la eficiencia cuántica de fluorescencia debido a que hay un mayor proceso de transferencia de carga intramolecular, de esta manera se pierde una mayor cantidad de energía en forma vibracional y una menor cantidad de energía es la que se emite.

Las NPs sintetizadas en este trabajo tienen una morfología esférica debido al sílice que las recubre y un diámetro promedio en el rango de 40 a 70 nm, lo cual es deseable para utilizarlos como agentes de contraste en la TPM. En estas NPs decae la eficiencia cuántica considerablemente a comparación de cuando se encuentran en solución, debido probablemente a un efecto de *quenching* por agregación inducida; esto es por las interacciones intermoleculares que existen entre los fluoróforos dentro de las NPs ya que estos se encuentran en estado sólido.

Las NPs fabricadas fueron analizadas con el microscopio confocal y multifotónico, para establecer su posible funcionamiento como agentes de contraste, de las cuales solo **NPS O1aH** y **NPS O1b** son prometedoras debido los valores de eficiencias cuánticas (13 % y 12 %), los cuales son los más altos en este grupo de NPs, además de presentar fluorescencia por absorción de dos fotones. Las **NPS O1b** dispersadas en agua exhibieron un valor de sección transversal de TPA de 55 GM tres veces mayor que la molécula de **O1b** de 18 GM.

6.- PERSPECTIVAS

A partir de los estudios y discusiones presentados en este trabajo de investigación doctoral, las perspectivas de trabajos futuros se orientan en la siguiente dirección.

En primer plano estaría el fabricar nanopartículas de sílice con otras metodologías que permitan mantener la eficiencia cuántica de fluorescencia que se tiene en solución. En específico, se podría utilizar un polímero inerte que forme micelas, en la literatura se ha reportado que el polímero tribloque, poli (óxido de etileno) -b-poli (óxido de propileno) -b-poli (óxido de etileno) (F127)⁸¹ ha funcionado bien para dicho fin.

Diseñar y sintetizar polímeros que tengan una estructura donador-aceptor que además tengan un efecto de "AIE" (fluorescencia mejorada por agregación).

7.-APENDICE

DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Tabla 15.- Propiedades del monocristal de M1

Propiedad del monocristal	M1
Formula química	2(C ₄₃ H ₄₇ Br N ₂ S ₃)
Peso molecular	767.909
Sistema cristalino	Triclínico
Grupo espacial	P -1
<i>a</i> (Å)	13.6229(6)
<i>b</i> (Å)	16.8998(7)
<i>c</i> (Å)	18.4011(10)
α (°)	65.046(5)
β (°)	88.203(4)
γ (°)	81.365(4)
Volumen de la celda unitaria (Å ³)	3794.95
<i>Z</i>	2
<i>R-factor</i> (%)	8.47

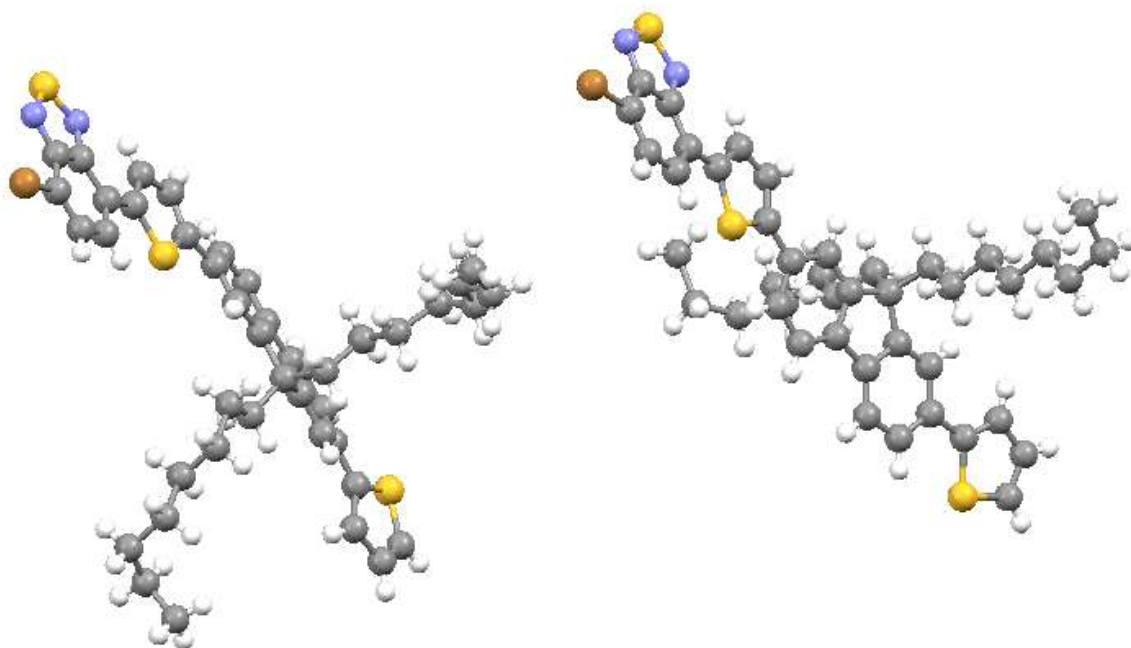


Figura 49.- Estructura de rayos X en monocristal de M1.

Tabla 16- Distancias entre átomos de la estructura M1

Átomo	Átomo	Distancia entre átomos (Å)
Br1	C25	1.875 (5)
S1	C1	1.713 (6)
S1	C4	1.731 (6)
S2	C18	1.723 (6)
S2	C21	1.743 (6)
S3	N1	1.622 (6)
S3	N2	1.627 (7)
N1	C23	1.349 (8)
N2	C24	1.341 (8)
C21	C22	1.449 (8)
C22	C23	1.430 (8)
C18	C16	1.473 (8)
C5	C4	1.472 (8)

Tabla 17.- Ángulos de torsión de los átomos de la estructura de M1

Átomo	Átomo	Átomo	Átomo	Ángulo de torsión (°)
C6	C5	C4	S1	-173.7 (4)
C6	C5	C4	C3	5.1 (10)
C10	C5	C4	S1	4.9 (8)
C10	C5	C4	C3	-176.3 (6)
C20	C21	C22	C27	-167.4 (6)
C23	C22	C21	S2	-169.7 (5)
C23	C22	C21	C20	11.7 (10)
C27	C22	C21	S2	11.1 (8)

Análisis termogravimétrico

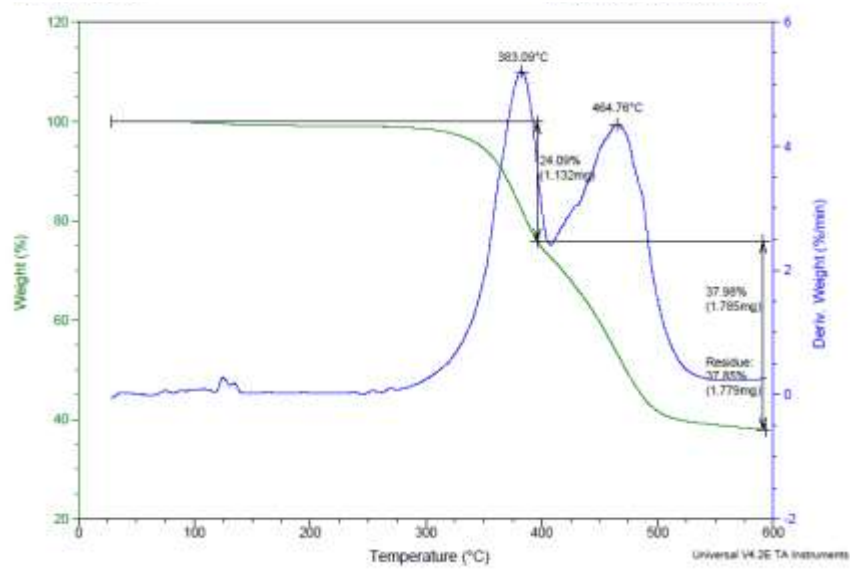


Figura 50.- Termograma de O1aH

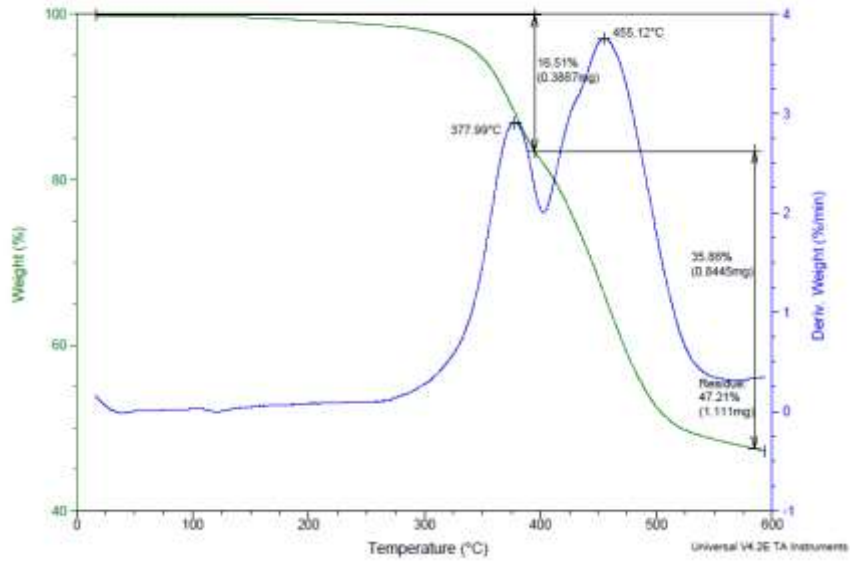


Figura 51.- Termograma de O1aT

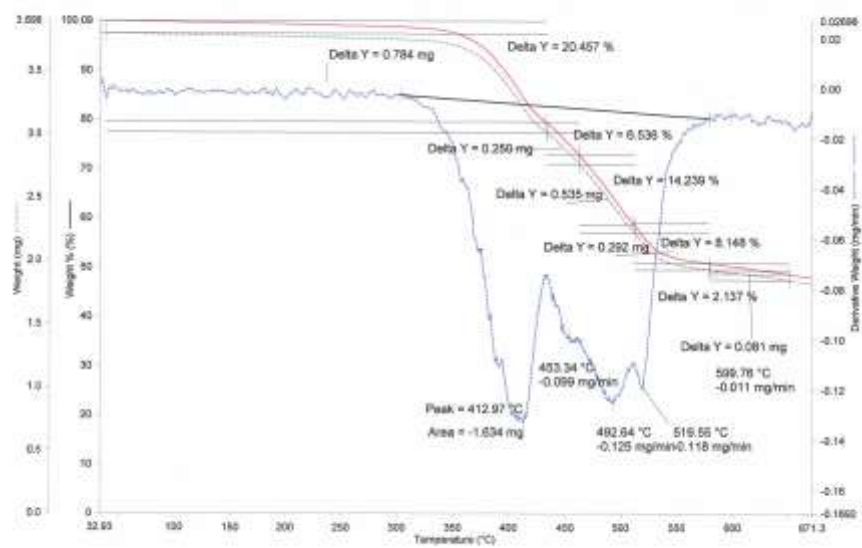


Figura 52.- Termograma de O1b

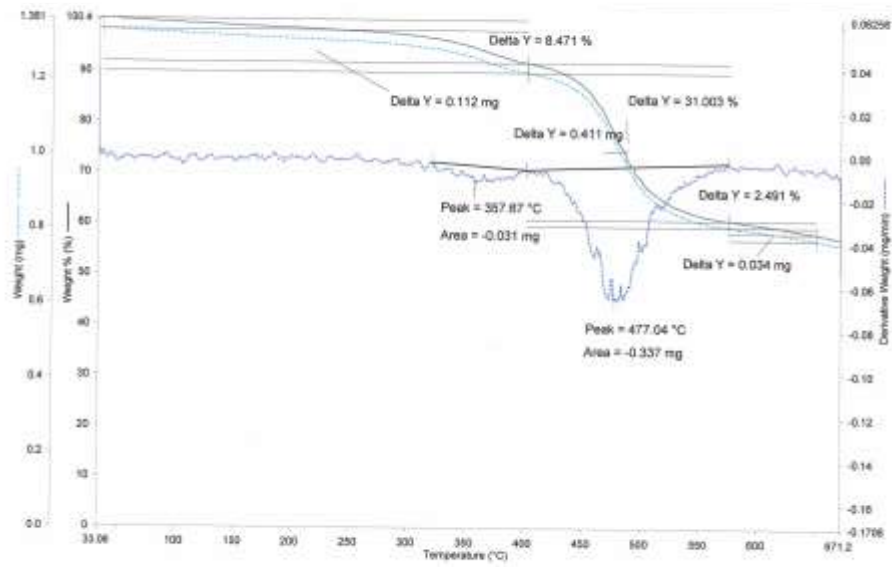


Figura 53.- Termograma de P1bT

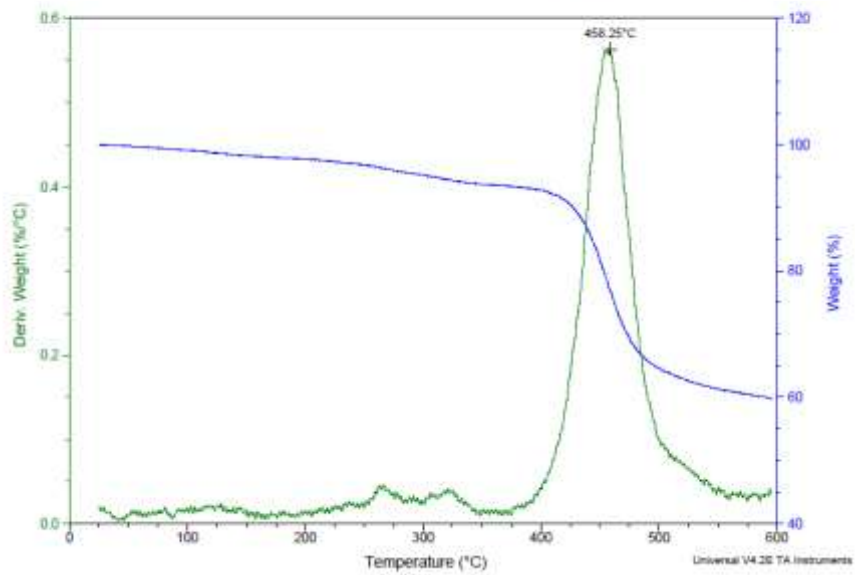


Figura 54.- Termograma de P1cT

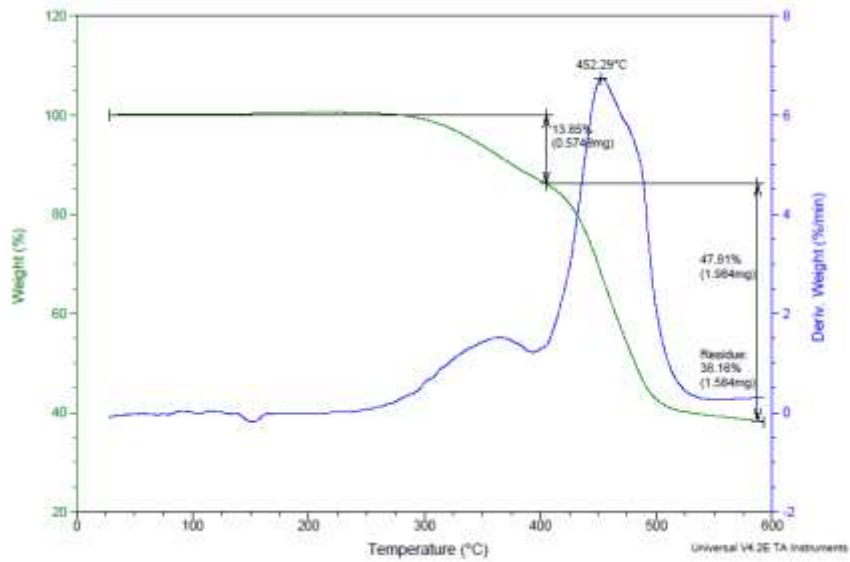


Figura 55.- Termograma de P2aH

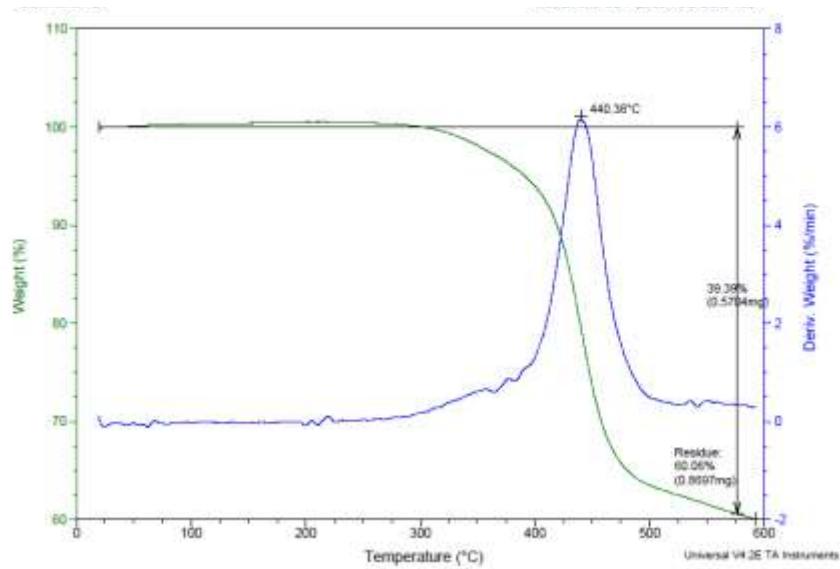


Figura 56.- Termograma de P2aT

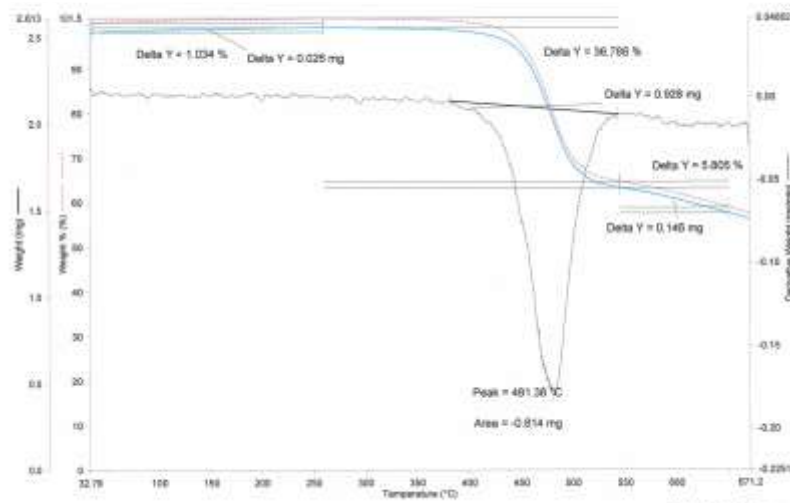


Figura 57.- Termograma de P2bT

Análisis mediante calorimetría diferencial de barrido

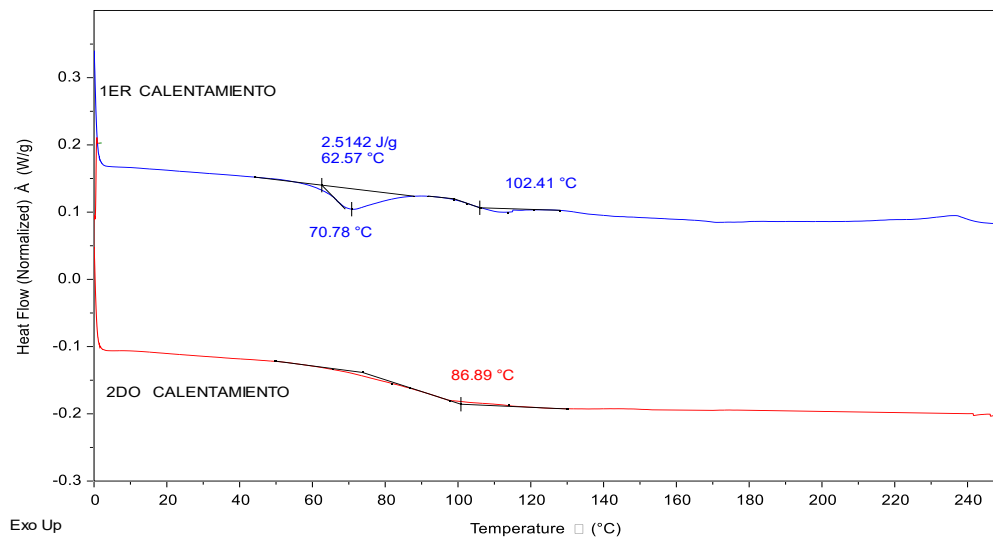


Figura 58.- DSC P1bT

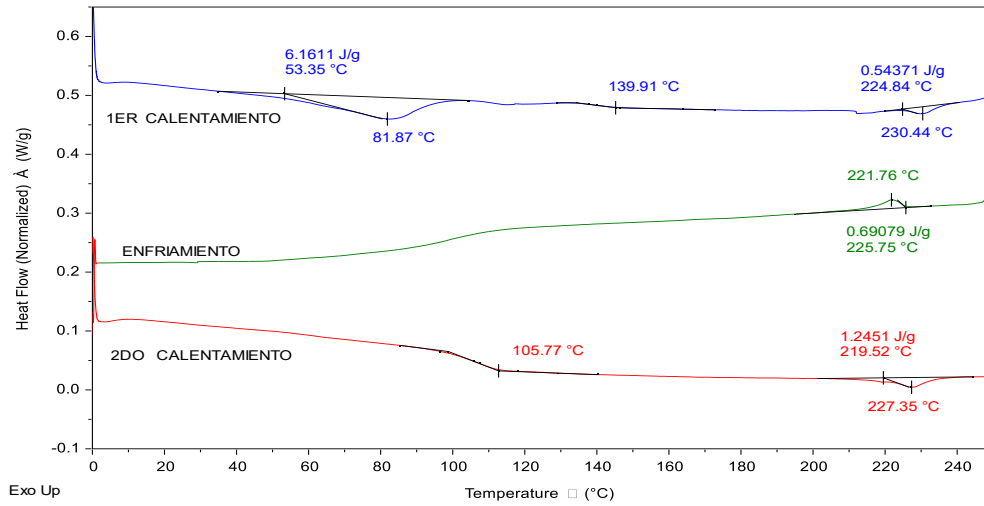


Figura 59.- P1cT

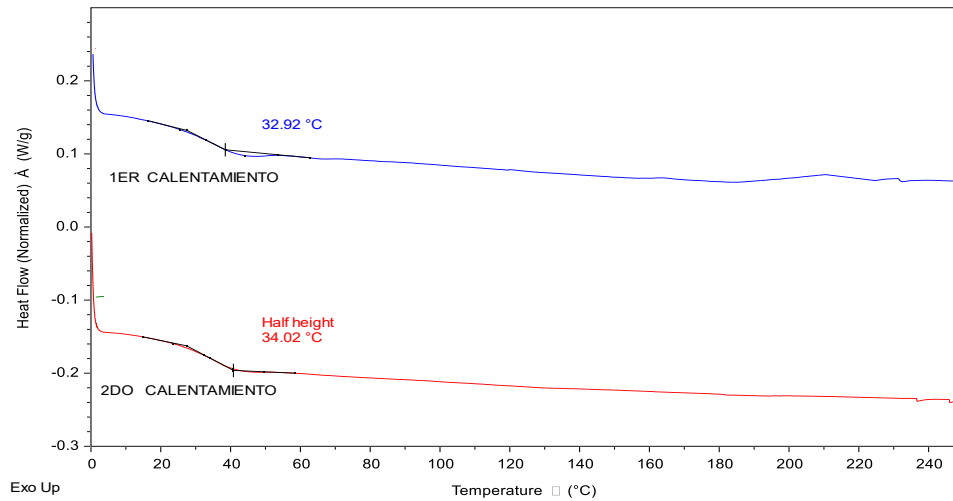


Figura 60.- DSC P2aH

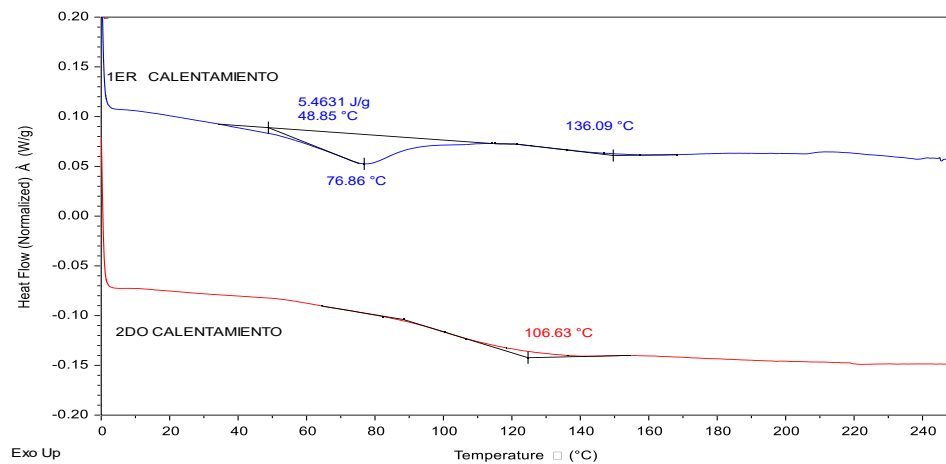


Figura 61.- DSC P2aT

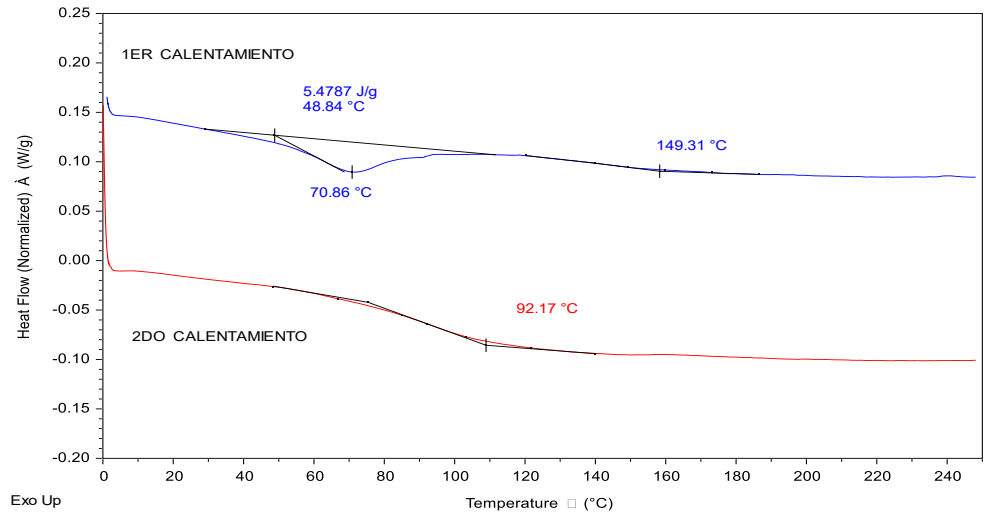


Figura 62.-DSC P2bT

8.- REFERENCIAS

- ¹ S. Kim, Q. Zheng, G. S. He, D. J. Bharali, H. E. Pudavar, A. Baev and P. N. 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 (2006) 2317–2323.
- ² Y. S. Zhao, H. Fu, A. Peng, Y. Ma, D. Xiao and J. Yao, Low-Dimensional Nanomaterials Based on Small Organic Molecules: Preparation and Optoelectronic Properties, *Adv. Mater.* 20 (2008) 2859–2876.
- ³ X. Wang, S. Yao, H. Y. Ahn, Y. Zhang, M. V. Bondar, J. A. Torres, K. D. Belfield, Folate receptor targeting silica nanoparticle probe for two-photon fluorescence bioimaging, *Biomed. Opt. Express*, 1 (2010) 453 – 462.
- ⁴ K. M. Omer, S. Y. Ku, K. T. Wong, A. J. Bard, Green electrogenerated chemiluminescence of highly fluorescent benzothiadiazole and fluorene derivatives, *J. Chem. Soc.*, 131 (2009) 10733–10741.
- ⁵ H. S. Chung, W. H. Lee, C. E. Song, Y. Shin, J. Kim, S. K. Lee, W. S. Shin, S. J. Moon, I. N. Kang, Highly conjugated side chain substituted benzo[1,2-b:4,5-b⁰]dithiophene based conjugated polymers for use in polymer solar cells. *Macromolecules*, 47 (2014) 97–105.
- ⁶ J. W. Lichtman, J. A. Conchello, Fluorescence microscopy, *Nat. Methods*, 2, 12 (2005) 910–919.
- ⁷ T. Y. Ohulchansky, I. Roy, K. T. Yong, H. E. Pudavar, y P. N. Prasad, High-resolution light microscopy using luminescent nanoparticles. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2, (2010) 162–175.
- ⁸ W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb, Two-photon laser scanning fluorescent microscopy, *Science* 248, (1990) 73–76.
- ⁹ P. T. C. So, C. Y. Dong, B. R. Masters, K. M. Berland, Two-photon excitation fluorescence microscopy, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2 (2000) 399–429.

¹⁰ L. Aparicio-Ixta, M. Rodriguez, G. Ramos-Ortiz, Organic Nanomaterials with Two-Photon Absorption Properties for Biomedical Applications, in: O. Shulika, I. Sukhoivanov, (Eds.), Materials, materials and device applications, contemporary optoelectronics, Springer, 2016, pp. 25-50.

¹¹C. Xu, W. W. Webb, Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm, *J. Opt. Soc. Am. B*, 13 (1996) 481–491.

¹² L. Aparicio-Ixta, M. Rodriguez, G. Ramos-Ortiz, Organic Nanomaterials with Two-Photon Absorption Properties for Biomedical Applications, in: O. Shulika, I. Skhoivanov (Eds.), Contemporary Optoelectronics, Material and Device Applications, Springer Series in Optical Sciences, 2016, pp. 27-50.

¹³ W. H. Zhang, X. X. Hu, X. B. Zhang, Dye-Doped Fluorescent Silica nanoparticles for Live Cell and In Vivo Bioimaging, *Nanomaterials*, 6 (2016) 81.

¹⁴Y. Lv, P. Liu, H. Ding, Y. Wu, Y. Yan, H. Liu, X. Wang, F. Huang, Y. Zhao, Z. Tian, conjugated polymer-based hybrid nanoparticles with two-photon excitation and near-infrared emission features for fluorescence bioimaging within the biological window, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7 (2015) 20640–20648.

¹⁵ J. Geng, J. Liu, J. Liang, H. Shia, B. Liu, A general approach to prepare conjugated polymer dot embedded silica nanoparticles with a SiO₂@CP@SiO₂ structure for targeted HER2-positive cellular imaging, *Nanoscale*, 5 (2013) 8593–8601.

¹⁶ X. Wang, S. Yao, H. Y. Ahn, Y. Zhang, M. V. Bondar, J. A. Torres, K. D. Belfield, Folate receptor targeting silica nanoparticle probe for two-photon fluorescence bioimaging, *Biomed. Opt. Express*, 1 (2010) 453-462.

¹⁷ Junlong Geng, Jie Liu, Jing Liang, Haibin Shi and Bin Liu, A general approach to prepare conjugated polymer dot embedded silica nanoparticles with a SiO₂@CP@SiO₂ structure for targeted HER2-positive cellular imaging, *Nanoscale*, 5 (2013) 8593–8601.

-
- ¹⁸ X. Gan, H. Wang, L. Lu, H. Li, K. Wang, L. Kong, F. Li, Y. Tian, J. W, H. Zhou, Three new water-soluble fluorescent organic nanoparticles with embedded structure: Structure-activity relationship and two-photon bio-imaging application, *Dyes and Pigments* 150 (2018) 27–35.
- ¹⁹ Jie Liu, Junlong Geng and Bin Liu, A bright far-red and near-infrared fluorescent conjugated polyelectrolyte with quantum yield reaching 25%, *Chem. Commun.* 49 (2013) 1491.
- ²⁰ X. Wang, S. Yao, H. Y. Ahn, Y. Zhang, M. V. Bondar, J. A. Torres, K. D. Belfield, Folate receptor targeting silica nanoparticle probe for two-photon fluorescence bioimaging, *Biomedical Optics Express*, 1 (2010) 453 -462.
- ²¹ Amsalu Efrem, Kai Wang, Tao Jia, Mingfeng Wang, Direct Arylation Polymerization Toward a Narrow Bandgap Donor–Acceptor Conjugated Polymer of Alternating 5,6-Difluoro-2,1,3- benzothiadiazole and Alkyl-Quarternarythiophene: From Synthesis, Optoelectronic Properties to Devices, Wiley Periodicals, Inc. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 55 (2017) 1869–1879.
- ²² Xiaofeng Ma, Rui Sun, Jinghui Cheng, Jiaoyan Liu, Fei Gou, Haifeng Xiang, Xiangge Zhou, Fluorescence Aggregation-Caused Quenching versus Aggregation-Induced Emission: A Visual Teaching Technology for Undergraduate Chemistry Students, *J. Chem. Educ.* 93 (2016) 345–350.
- ²³ D. B. Murphy and M. W. Davidson, *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*, Second Ed., Wiley-Blackwell, 2013.
- ²⁴ B. Valeur, M. N. Berberan Santos, *Molecular Fluorescence Principles and Applications*, second ed., Wiley-VCH, 2012.
- ²⁵ D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Fundamentos de química analítica*, sexta ed., Vol. 2, Reverte, 1997.
- ²⁶ P. T. So, C. Y. Dong, B. R. Masters, K. M. Berland, Two-photon excitation fluorescence microscopy, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2 (2000) 399–429.
- ²⁷ M. Goppert-Mayer, Elementary processes with two quantum jumps, *Ann. Phys.* 9 (1931), 273 – 294.

-
- ²⁸ W. Kaiser, C. G. B. Garrett, Two-photon excitation in CaF₂:Eu⁺⁺, Phys. Rev. Lett. 1961, 7, 229 – 231.
- ²⁹ W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb, Two-photon laser scanning fluorescence microscopy, Science, 248 (1990) 73 – 76.
- ³⁰ S. R. Marder, Organic nonlinear optical materials: where we have been and where we are going, Chem. Commun. 2006, 131 – 134.
- ³¹ M. Sheik bahae, A. A. Said, E. W. Van Stryland, High-sensitivity, single-beam n₂ measurements, Opt. Lett. 14 (1989) 955-957.
- ³² W. Zhao and P. Palffy-Muhoray, Z-scan technique using top-hat beams, Appl. Phys. Lett. 63 (2003) 1613.
- ³³ L. Aparicio-Ixta, M. Rodriguez, G. Ramos-Ortiz, Organic Nanomaterials with Two-Photon Absorption Properties for Biomedical Applications, in: O. Shulika, I. Sukhoivanov, (Eds.), Materials, materials and device applications, contemporary optoelectronics, Springer, 2016, pp. 25-50.
- ³⁴ C. Xu, W.W. Webb, Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm, J. Opt. Soc. Am. B, 13 (1996) 481 – 491.
- ³⁵ G.S. He, L.-S. Tan, Q. Zheng, P.N. Prasad, Multiphoton Absorbing Materials: Molecular Designs, Characterizations, and Applications, Chem. Rev. 108 (2008) 1245–1330.
- ³⁶ G. S. He, L. S. Tan, Q. Zheng, P. N. Prasad, Multiphoton absorbing materials: molecular designs, characterizations, and applications, Chem. Rev. 108 (2008) 1245-1330.
- ³⁷ S. R. Marder, W. E. Torruellas, M. Blanchard-Desce, V. Ricci, G. I. Stegeman, S. Gilmour, J. L. Bredas, J. Li, G. U. Bublitz, S. G. Boxer, Large Molecular Third-Order Optical Nonlinearities in Polarized Carotenoids, Science, 276 (1997) 1233.
- ³⁸ O. Mongin, L. Porres, M. Charlot, C. Katan and M. Blanchard-Desce, Chem.–Eur. J., 2007, 13, 1481–1498.

-
- ³⁹ L. Aparicio-Ixta, M. Rodriguez, G. Ramos-Ortiz, Organic Nanomaterials with Two-Photon Absorption Properties for Biomedical Applications, in: O. Shulika, I. Sukhoivanov, (Eds.), Materials, materials and device applications, contemporary optoelectronics, Springer, 2016, pp. 25-50.
- ⁴⁰ J. Arnbjerg, A. Jimenez-Banzo, M. J. Paterson, S. Nonell, J. I. Borrell, O. Christiansen, P. R. Ogilby, Two-Photon Absorption in Tetraphenylporphycenes: Are Porphycenes Better Candidates than Porphyrins for Providing Optimal Optical Properties for Two-Photon Photodynamic Therapy? *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 5188 – 5199.
- ⁴¹ L. Aparicio-Ixta, M. Rodriguez, G. Ramos-Ortiz, Organic Nanomaterials with Two-Photon Absorption Properties for Biomedical Applications, in: O. Shulika, I. Sukhoivanov, (Eds.), Materials, materials and device applications, contemporary optoelectronics, Springer, 2016, pp. 25-50.
- ⁴² A. Efrem, K. Wang, T. Jia, M. Wang, Direct Arylation Polymerization Toward a Narrow Bandgap Donor–Acceptor Conjugated Polymer of Alternating 5,6-Difluoro-2,1,3-benzothiadiazole and Alkyl-Quarternarythiophene: From Synthesis, Optoelectronic Properties to Devices, *journal of polymer science, part a: polymer chemistry* 55(11) (2017) 1869–1879.
- ⁴³ W. Wenting, X. Hanshen, G. Congwu, G. Xike, Application of direct (hetero)arylation in constructing conjugated small molecules and polymers for organic optoelectronic devices, *Tetrahedron Letters* 58 (2017) 175-184.
- ⁴⁴ S. Langis-Barsetti, T. Maris, J. D. Wuest, Molecular Organization of 2,1,3-Benzothiadiazoles in the Solid State, *J. Org. Chem.* 82 (2017) 5034–5045.
- ⁴⁵ J. Geng, C. C. Goh, N. Tomczak, J. Liu, R. Liu, L. Ma, B. Liu, Micelle/Silica Co-protected Conjugated Polymer Nanoparticles for Two-Photon Excited Brain Vascular Imaging. *Chemistry of Materials*, 26 (2014) 1874–1880.
- ⁴⁶ 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, 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 (2012) 7751.

⁴⁷ C. Lavanya Devi, K. Yesudas, N. S. Makarov, V. J. Rao, K. Bhanuprakash, J. W. Perry, Combined experimental and theoretical study of one- and two-photon absorption properties of D- π -A- π -D type bis(carbazolylfluorenylethynyl) arene derivatives: Influence of aromatic acceptor bridge, *Dyes and Pigm.* 113 (2015) 682-691.

⁴⁸ J. Rodríguez-Romero, L. Aparicio-Ixta, M. Rodríguez, G. Ramos-Ortíz, J.L. Maldonado, A. Jiménez-Sánchez, N. Farfán, R. Santillan, Synthesis, chemicoptical characterization and solvent interaction effect of novel fluorene-chromophores with DeAeD structure, *Dyes Pigm.* 98(1) (2013) 31-41.

⁴⁹ X. Guo, N. Zhou, S. J. Lou, J. W. Hennek, R. P. Ortiz, M. R. Butler, P. L. Boudreault, J. Strzalka, P. O. Morin, M. Leclerc, Bithiopheneimide-Dithienosilole/Dithienogermole Copolymers for Efficient Solar Cells: Information from Structure-Property-Device Performance Correlations and Comparison to Thieno[3,4-c]pyrrole-4,6-dione Analogues. *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 18427-18439.

⁵⁰ T. A. Welsh, A. Laventure, G. C. Welch, Direct (hetero)arylation for the synthesis of molecular materials: coupling thieno [3,4-c] pyrrole-4,6-dione with perylene diimide to yield novel non-fullerene acceptors for organic solar cells, *Molecules*, 23 (2018) 931/1-931/17.

⁵¹ Akito Ichige, Hitoshi Saito, Junpei Kuwabara, Takeshi Yasuda, Jun-Chul Choi, Takaki Kanbara, Facile synthesis of thienopyrroledione-based π -conjugated polymers via direct arylation polycondensation under aerobic conditions, *Macromolecules*, 51 (2018) 6782-6788.

⁵² G. Ouyang, H. Wu, X. Qiao, J. Zhang, H. Li, Modulating Surface Morphology and Thin-Film Transistor Performance of Bi-thieno[3,4-c]pyrrole-4,6-dione-Based

Polymer Semiconductor by Altering Preaggregation in Solution, ACS Omega 3 (2018) 9290-9295.

⁵³ B. Liu, W. L. Yu, Y. H. Lai, W. Huang, Blue-Light-Emitting Fluorene-Based Polymers with Tunable Electronic Properties, Chem. Mater. 13 (2001) 1984-1991.

⁵⁴ Y. L. Wang, Q. S. Li, Z. S. Li, End-capped group manipulation of fluorene-based small molecule acceptors for efficient organic solar cells, Comp. Mater. Sci. 156 (2019) 252-259.

⁵⁵ M. Gangopadhyay, S. K. Mukhopadhyay, S. Gayathri, S. Biswas, S. Barman, S. Dey, N. D. P. Singh, Fluorene-morpholine-based organic nanoparticles: lysosome-targeted pH-triggered two-photon photodynamic therapy with fluorescence switch on-off, Journal of Materials Chemistry B: Materials for Biology and Medicine, 4 (2016) 1862-1868.

⁵⁶ H. Zhang, J. Fan, H. Dong, S. Zhang, W. Xu, J. Wang, P. Gao, X. Peng, Fluorene-derived two-photon fluorescent probes for specific and simultaneous bioimaging of endoplasmic reticulum and lysosomes: group-effect and localization, Journal of Materials Chemistry B: Materials for Biology and Medicine, 1 (2013) 5450-5455.

⁵⁷ J. Rodríguez Romero, L. Aparicio Ixta, M. Rodríguez, G. Ramos-Ortiz, J. L. Maldonado, A. Jiménez Sánchez, N. Farfán, R. Santillan, Synthesis, chemicoptical characterization and solvent interaction effect of novel fluorene-chromophores with D-A-D structure, Dyes and Pigments 98 (2013) 31-41.

⁵⁸ P. Sarrazin, D. Chaussy, L. Vurth, O. Stephan, D. Beneventi, Surfactant (TTAB) Role in the Preparation of 2,7-Poly(9,9-dialkylfluorene-co-fluorenone) Nanoparticles by Miniemulsion Langmuir, 25 (2009) 6745-6752.

⁵⁹ D. Tuncel, H. Volkan-Demir, Conjugated polymer nanoparticles, Nanoscale, 2 (2010) 484-494.

-
- ⁶⁰ W. H. Zhang, X. X. Hu, X. B. Zhang, Dye-Doped Fluorescent Silica Nanoparticles for Live Cell and In Vivo Bioimaging, *Nanomaterials*, 6 (2016) 81.
- ⁶¹ C. Wu, C. Szymanski, J. McNeill, Preparation and Encapsulation of Highly Fluorescent Conjugated Polymer Nanoparticles, *Langmuir*, 22 (2006) 2956.
- ⁶² H. Han, Q. Jin, Y. Wang, Y. Chen, J. Ji, The rational design of a gemcitabine prodrug with AIE-based intracellular light-up characteristics for selective suppression of pancreatic cancer cells. *Chem. Comm.* 51 (2015) 17435–17438.
- ⁶³ J. Mei, N. L. Leung, R. T. Kwok, J. W. Lam, B. Z. Tang, Aggregation-Induced Emission: Together We Shine, United We Soar!, *Chem Rev*, 2015, 115, 11718–11940.
- ⁶⁴ L. Wang, H. Zhang, A. Qin, Q. Jin, B. Z. Tang, J. Ji, Theranostic hyaluronic acid prodrug micelles with aggregation-induced emission characteristics for targeted drug delivery, *Sci China Chem*, 2016, Vol.59 No.12, 1609-1614.
- ⁶⁵http://www.uam.es/ss/Satellite?c=UAM_Laboratorio_FA&cid=1242666590435&language=es&pagename=UniversidadAutonomaMadrid%2FUAM_Laboratorio_FA%2FUAM_laboratorio&pid=1242668321277&title=Laboratorio+de+Microscop%3Fa+Confocal
- ⁶⁶ M. Pawlicki, H. A. Collins, R. G. Denning, H. L. Anderson, Two-Photon absorption and the design of two-photon dyes, *Chem. Int. Ed.* 48 (2009) 3244 – 3266.
- ⁶⁷ 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, 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 (2012) 7751.
- ⁶⁸ E. Zhou, J. Cong, K. Tajima, C. Yang, and K. Hashimoto, Conjugated Polymers Based on 1,3-Dithien-2-yl-thieno[3,4-c] pyrrole-4,6-dione: Synthesis, Characterization, and Solvent Effects on Photovoltaic performance *J. Phys. Chem. C*, 116 (2012) 2608–2614.

⁶⁹ William D. Callister, *Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales*. Vol. 2, ed., Reverté, 1996.

⁷⁰ P. C. Rodrigues, L. S. Berlim, D. Azevedo, N. C. Saavedra, P. N. Prasad, W. H. Schreiner, T. D. Z. Atvars, and L. Akcelrud, Electronic Structure and Optical Properties of an Alternated Fluorene–Benzothiadiazole Copolymer: Interplay between Experimental and Theoretical Data, *J. Phys. Chem. A*, 116 (2012) 3681–3690.

⁷¹ K. D. Belfield, M. V. Bondar, S. Yao, I. A. Mikhailov, V. S. Polikanov y O. V. Przhonska, Femtosecond Spectroscopy of Superfluorescent Fluorenyl Benzothiadiazoles with Large Two-Photon and Excited-State Absorption. *J. Phys. Chem. C*, 118 (2014) 13790–13800.

⁷²E. Zhou, J. Cong, K. Tajima, C. Yang, and K. Hashimoto, Conjugated Polymers Based on 1,3-Dithien-2-yl-thieno[3,4-c] pyrrole-4,6-dione: Synthesis, Characterization, and Solvent Effects on Photovoltaic performance *J. Phys. Chem. C*, 116 (2012) 2608–2614.

⁷³ H. Lu, Y. Zheng, X. Zhao, L. Wang, S. Ma, X. Han, B. Xu, W. Tian, H. Gao, Highly Efficient Far Red/Near-Infrared Solid Fluorophores: Aggregation-Induced Emission, Intramolecular Charge Transfer, Twisted Molecular Conformation, and Bioimaging Applications. *Angew. Chem., Int. Ed.* 55 (2016) 155–159.

⁷⁴ L. Wang, H. Zhang, A. Qin, Q. Jin, B. Zhong Tang, J. Ji, Theranostic hyaluronic acid prodrug micelles with aggregation-induced emission characteristics for targeted drug delivery, *Sci China Chem*, 59 (2016) 1609–1615.

⁷⁵ 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, O. Barbosa Garcia, 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 (2012) 7751–7759.

⁷⁶ X. Guo, P. Li, Z. Liu, S. Yin, Z. Wang, Y. Wang, Bright green-emitting hydrophilic conjugated polymer nanoparticles with different surface charges for cellular imaging. *Journal of Materials Science*, 52 (2017) 8465–8471.

⁷⁷ J. Geng, C. C. Goh, N. Tomczak, J. Liu, R. Liu, L. Ma, L. G. Ng, G. G. Gurzadyan, B. Liu, Micelle/Silica Co-protected Conjugated Polymer Nanoparticles for Two-Photon Excited Brain Vascular Imaging, *Chem. Mater.* 26 (2014) 1874–1880.

⁷⁸ L. Aparicio Ixta, G. Ramos Ortiz, J. L. Pichardo Molina, J. L. Maldonado, M. Rodríguez, Victor M. Tellez Lopez, Daniel Martinez Fong, M. G. Zolotukhin, S. Fomine, M. A. Meneses-Nava, O. Barbosa Garcia, 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 (2012) 7751–7759.

⁷⁹ J. Liu, X. Cai, H. C. Pan, A. Bandla, C. K. Chuan, S. Wang, N. Thakor, L. D. Liao, B. Liu, Molecular Engineering of Photoacoustic Performance by Chalcogenide Variation in Conjugated Polymer Nanoparticles for Brain Vascular Imaging. *Small*, 14 (2018) 1703732.

⁸⁰ X. Guo, P. Li, Z. Liu, S. Yin, Z. Wang, Y. Wang, Bright green-emitting hydrophilic conjugated polymer nanoparticles with different surface charges for cellular imaging. *Journal of Materials Science*, 52 (2017) 8465–8471.

⁸¹ J. Geng, C. C. Goh, N. Tomczak, J. Liu, R. Liu, L. Ma, L. G. Ng, G. G. Gurzadyan, B. Liu, Micelle/Silica Co-protected Conjugated Polymer Nanoparticles for Two-Photon Excited Brain Vascular Imaging, *Chem. Mater.* 26 (2014) 1874–1880.