



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física

Sistemas nanoparticulados integrados de dióxido de silicio: plataformas de diagnóstico y tratamiento

Tesis presentada para optar por el título de *Doctora de la Universidad de Buenos Aires, Área Química Inorgánica, Química Analítica y Química Física*

Yamili Toum Terrones

Director: Dr. Alejandro Wolosiuk

Consejero de estudios: Dr. Horacio Corti

Lugar de trabajo: Gerencia Química-Centro Atómico Constituyentes-Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA)

Buenos Aires, Febrero de 2019

A mamá, Lai y papá
A mis abuelos Olga y Jorge

“Todas las olas del mar deben la belleza de su perfil
a las que les precedieron y se retiraron”

André Gide

Agradecimientos

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a todas las personas que han hecho posible la realización de esta tesis. Porque una tesis no es un logro individual sino colectivo.

A Ale, mi director, por haber confiado en mí para trabajar cinco años juntos en esto, que no sabíamos cómo iba a ser y fue una de las experiencias más lindas de mi vida. Por guiarme con paciencia, por estar siempre para todo lo que necesité, en los momentos buenos y malos. Porque además de ser un excelente científico es una persona buena y humilde. Porque me dijo “quiero que vayas a ver cómo se hace ciencia en otros lugares, en libertad” y me motivó para viajar a hacer eso. Siempre le voy a estar agradecida.

A todo el grupo de Nanoquímica de la CNEA, a los investigadores y a los becarios. Son un sostén muy importante para que los días de trabajo se hagan amenos, para que además de trabajar disfrutemos de hacer ciencia en libertad. Los quiero mucho a todos.

A Carla Spagnuolo, quien me recibió en su laboratorio sin conocerme, confió en mí para hacer unas moléculas hermosas. Una buena parte de esta tesis es gracias a sus ideas también, a su trabajo y a su esfuerzo.

A Paula Angelomé, la inspiración de Nanoquímica. Por confiar en mí para viajar a San Sebastián, por estar siempre pensando en proyectos nuevos que nos motiven. Por luchar para que las mujeres tengamos más lugar en la ciencia.

A Martín Mirenda, una de las personas que más me ayudó, no sólo con su conocimiento sino también con su contención y su ánimo. Desde el primer día.

A Galo, porque también fue una fuente de inspiración y por contarle a la sociedad que “el tamaño importa”, incansablemente.

A la CNEA, la institución en la que trabajé estos largos años. Me genera mucho orgullo haber trabajado en un lugar tan importante para el desarrollo de nuestro país.

Mi profundo agradecimiento a los integrantes del laboratorio L9 del Departamento de Química Orgánica de la FCEN. Lo que hacen es muy difícil y lo hacen con pasión, lo hacen con amor y eso llega y reconforta.

A Guille Menendez, por valiosa ayuda con las cianinas. Por haber hecho una tesis que nos inspiró a muchos.

A Sergio Moya y a su grupo, por recibirme en su laboratorio de San Sebastián. Por permitirme trabajar en algo nuevo, y aprender que todo lo que hacemos no tiene un resultado directo palpable pero es algo que se va construyendo. Esa experiencia me cambió la vida para bien.

A Hernán, por recibirme en su laboratorio para hacer las medidas de oxígeno singulete. Porque cada minuto de discusión de resultados con él valió oro. Por estar siempre dispuesto para ayudarme en lo que necesité.

A Pedro Aramendía, por ser tan genio. Por recibirme en el Polo y medir conmigo en el tiempo de vida.

A todos los que hacen la Facultad de Exactas, la FCEN. Es mi casa y me siento muy orgullosa de pertenecer a una facultad inclusiva, que defiende el derecho a la educación pública y de calidad, que cree en que ciencia y educación van juntas.

Al departamento de Química Inorgánica de la FCEN, el lugar en el que estoy presentando esta tesis y el lugar del que soy docente, que cuenta con profesores e investigadores que siempre me han recibido, para todo lo que necesitara. A Ale, la secretaria de QI, porque siempre está para todo lo que necesitamos y nos da ánimo.

A mis profesores y alumnos de la FCEN, por ser mi inspiración. Dar clase es renunciar a que vamos a saber todo siempre, es entregarnos al desafío constante y aprender. Es lo que mantiene viva es esa curiosidad que tanto necesitamos los que hacemos ciencia.

A la educación pública argentina, en la que me formé desde el jardín. A la Universidad de Buenos Aires, que es mi casa desde los 11 años.

A las instituciones que financiaron este trabajo, en particular al CONICET que me becó para ello. A todos los argentinos, que financian a través del estado estas investigaciones que son humildes pero día a día tratan de elevar la calidad de vida de todos los ciudadanos.

A mis amigos de CNEA, los quiero profundamente. A mis amigos del L9, a mis amigos de la facu que son unos locos lindos.

A Lichi, por ser mi hermana por elección, por estar conmigo desde los 12 años. A su familia, por recibirme siempre con los brazos abiertos.

A la genia de Male, mi amiga compañera de viajes, compañera en todo. Te admiro mucho, gracias por confiar en mí siempre.

A Gus Vasen, por estar siempre que lo necesito, por ser una inspiración para mí. Por tener una palabra de aliento siempre.

A Gabi, por quererme así, por desprejuiciarse a la par mío, por darme fuerza.

A Esteban, por ser mi compañero y un ser admirable.

A mis amigos de la vida que por suerte son muchos y, aunque no entra el nombre de todos, cada uno de ellos sabe que lo quiero profundamente.

A mis compañeros de militancia, todos ellos soñadores. Todos ellos me dan orgullo, porque persiguen el logro de un país más inclusivo, con igualdad de oportunidades, con posibilidades. Dan tiempo de su vida personal por y para un proyecto colectivo, siempre desde el amor, porque el amor vence al odio.

A mi familia, la gran familia de mi mamá. A mis tíos y tías que siempre expresan su orgullo por mí y están cuando los necesito. A mis primos y primas, que han hecho que mis domingos de la infancia sean hermosos y que hoy, aun grandes, hacen que mi vida sea más feliz.

A mi papá Fuad, que estaría orgulloso de tener una hija química. Gracias por luchar incansablemente en defensa de los derechos humanos, por ser un abogado admirable y ejemplar, que dejó la vida en la lucha.

A mis abuelos Olga y Jorge, quienes construyeron una familia enorme que me acompañó siempre. Por festejar mis logros, por hacer que tenga sueños, por el amor inagotable. Por inculcarnos el amor por el estudio.

A mi hermana Laila, la persona que me acompaña siempre, que siempre fue mi guía y a quien admiro profundamente, amo profundamente. Ojalá se multiplicaran las lailas en el mundo porque sería un mundo mejor.

A mi mamá Martha. No tengo palabras para expresar mi agradecimiento con la persona que me alentó para hacer todo lo que hice en mi vida. Gracias por darnos

libertad, por hacernos quienes somos, por luchar para estemos bien desde siempre. Por darnos el ejemplo de militancia, por ser parte de la generación que dio todo para que este país sea distinto. Por el amor brindado, que siempre está ahí. Mamá siempre está, aunque me vaya lejos.

Sistemas nanoparticulados integrados de dióxido de silicio: plataformas de diagnóstico y tratamiento

El diseño avanzado de sistemas nanoparticulados permite elaborar sistemas químicos integrados donde convergen distintos componentes: metales, óxidos inorgánicos y semiconductores junto con biopolímeros, enzimas o hidratos de carbono. Compatibilizar distintos materiales en entidades funcionales dispersas abre una interesante perspectiva para el desarrollo de sistemas nanoscópicos y microscópicos destinados al tratamiento y diagnóstico de enfermedades (teranóstica), entre otras aplicaciones.

El trabajo de investigación que se presenta en esta tesis incluyó en una primera parte el desarrollo de la síntesis orgánica de una molécula de la familia de las aminotricarbocianinas (Cy-PIP) cuya emisión de fluorescencia es función del pH del medio. Cy-PIP es un sensor molecular de pH con marcada sensibilidad en el rango de pH fisiológico (6-8) y su propiedad distintiva es que absorbe y emite luz en la región del IR cercano del espectro electromagnético (650-950 nm, NIR). La luz de NIR conforma una “ventana biológica” apta para realizar detección no invasiva de moléculas *in vivo*. Luego se sintetizaron nanopartículas de SiO₂ (NP) funcionalizadas para la unión posterior de Cy-PIP a la superficie. Así, se logró desarrollar un nanosensor fluorescente de pH que opera en el NIR (Cy-PIP@SiO₂) y cuyo pK_a es cercano al pH fisiológico. Con el objetivo de emplear estas NP en sistemas biológicos, se evaluó la respuesta de emisión de fluorescencia en células de la línea HeLa, *in vitro* e *in vivo*. Se observó que el cambio de pH que implica el proceso de endocitosis puede ser estudiado mediante la utilización del nanosensor, en las condiciones de trabajo ensayadas.

En una segunda parte, se exploró la incorporación de azul de metileno (MB) a NP de sílice por diversos métodos de síntesis y se estudió su capacidad de generación de ¹O₂ con el objeto de establecer plataformas para fototerapia. Por otra parte, se estudió la incorporación simultánea de dos sondas fluorescentes (de visible y de NIR) en el mismo nano-objeto, para construir nanosensores autoreferenciados de pH.

Todos los resultados obtenidos en este trabajo de tesis han permitido desarrollar una plataforma de síntesis reproducible de NP fluorescentes de SiO₂ que pueden diseñarse de manera específica de acuerdo a la aplicación proyectada. Más aún, la plataforma resulta muy promisorio para el desarrollo de nanosensores que además lleven funciones químicas específicas para el reconocimiento por receptores celulares y/o que, ante ciertas señales del entorno logren disparar acciones específicas (p.ej. liberación controlada de moléculas como respuesta a estímulos enzimáticos o celulares).

Palabras clave: aminotricarbocianinas, infrarrojo cercano (NIR), SiO₂, nanosensores fluorescentes, fototerapia.

Integrated nano-particulate silica based systems as platforms for diagnosis and treatment

The advanced design of nano-particulate systems allows the elaboration of chemical systems where different components converge: metals, inorganic oxides and semiconductors together with biopolymers, enzymes or carbohydrates. Compatibilize different materials in scattered functional entities opens up an interesting perspective for the development of nanoscopic and microscopic systems intended for the treatment and diagnosis of diseases (theranostics), among other applications.

In this work we firstly developed the organic synthesis of a novel aminotricarbocyanine (Cy-PIP) whose fluorescence emission changes with pH. Cy-PIP is a molecular pH sensor with marked sensitivity in the physiological pH range (6-8) and it is outstanding because it absorbs and emits light in the NIR region (650-950 nm). NIR light establishes a "biological window" suitable for non-invasive detection of molecules *in vivo*. Then, Cy-PIP was covalently attached to the surface of conveniently functionalized nano-SiO₂. Thus, we reported the development of a fluorescent pH nanosensor operating in the NIR region (Cy-PIP@SiO₂) and whose pK_a is close to physiological pH. We also evaluated the fluorescence emission response of Cy-PIP@SiO₂ in HeLa cells, both *in vitro* and *in vivo*. It was observed that the change in pH involved in the process of endocytosis could be studied by using our nanosensor.

In a second part, the encapsulation of methylene blue (MB) into silica NP was explored and its ¹O₂ generating capacity was studied in order to establish phototherapy platforms. Furthermore, the incorporation of two fluorescent probes (visible and NIR) in the same nano-object was studied, so as to build ratiometric pH nanosensors.

All the results obtained in this thesis work have made it possible to develop a platform for reproducible synthesis of fluorescent SiO₂ NP according to the projected application. Moreover, the platform is very promising for the development of advanced nanosensors (with specific chemical functions for recognition by cellular receptors).

Keywords: aminotricarbocyanines, NIR, SiO₂, fluorescent nanosensors, phototherapy.

Abreviaturas

ACN acetonitrilo

AF ácido fólico

DMF dimetilformamida

DMSO dimetilsulfóxido

EtOH etanol

MeOH metanol

TEA trietilamina

PEG polietilenglicol

PBS buffer fosfato

THF tetrahidrofurano

MB azul de metileno

NP nanopartículas

Otras:

TLC Cromatografía en capa delgada

ESI Ionización por *electrospray*

FRET Transferencia de energía por resonancia de Förster

FTIR Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

ns nanosegundo

SPC Conteo de fotones individuales

DLS Dispersión de luz dinámica

TEM Microscopia electrónica de transmisión

SEM Microscopia electrónica de barrido

PS fotosensibilizador

PDT terapia fotodinámica

NIR infrarrojo cercano del espectro electromagnético

Índice

Capítulo 1: Introducción general

1.1	Motivación del uso de nanopartículas para visualización <i>in vivo</i>, sensado y teranóstica.....	1-1
1.1.1	¿Por qué nano?.....	1-1
1.1.2	Nanomedicina.....	1-2
1.2	Nanopartículas luminiscentes de dióxido de silicio (SiO₂) y la importancia de la luz de NIR.....	1-6
1.3	El proceso sol-gel.....	1-7
1.3.1	Método de Stöber.....	1-9
1.3.2	Método de microemulsión inversa.....	1-11
1.4	Moléculas fluorescentes.....	1-13
1.4.1	Principios básicos del proceso de emisión.....	1-13
1.4.2	Parámetros que caracterizan la emisión.....	1-15
1.4.3	Propiedades deseables de las especies fluorescentes.....	1-17
1.4.4	Efectos de la estructura molecular en la fluorescencia: compuestos heterocíclicos.....	1-18
1.5	Propiedades fotofísicas y espectroscópicas de las cianinas.....	1-22
1.5.1	Fluorescencia versus fotoisomerización.....	1-22
1.5.2	Tipos de cianinas rígidas.....	1-25
1.6	Propiedades fotofísicas y espectroscópicas de las aminotricarbo- Cianinas.....	1-28
1.6.1	Corrimientos de Stokes e ICT.....	1-28
1.6.2	Influencia del sustituyente amino.....	1-34
1.7	Sensores moleculares fluorescentes.....	1-36
1.7.1	¿Por qué sensores fluorescentes?.....	1-36
1.7.2	Clases de sensores moleculares fluorescentes de acuerdo a la interacción.....	1-37
1.7.3	Sensores moleculares fluorescentes de pH.....	1-38
1.7.4	Sensores fluorescentes autoreferenciados.....	1-40
1.8	Sensores moleculares basados en cianinas.....	1-44
1.8.1	Sensores basados en PET.....	1-44
1.8.2	Sensores basados en ICT.....	1-47
1.8.3	Sensores basados en FRET.....	1-50
1.9	Nanosensores fluorescentes de SiO₂.....	1-52

1.10	Terapia fotodinámica.....	1-55
1.10.1	Generalidades.....	1-55
1.10.2	Azul de metileno.....	1-57
1.11	Referencias.....	1-62

Capítulo 2: Hipótesis y objetivos

2.1	Antecedentes e hipótesis de trabajo.....	2-1
2.2	Objetivos generales y específicos.....	2-2

Capítulo 3: Parte experimental

3.1	Introducción.....	3-1
3.2	Síntesis y caracterización estructural de tricarbocianinas	3-1
3.2.1	Generalidades.....	3-1
3.2.2	Síntesis.....	3-4
3.3	Síntesis de SiO₂-F NP	3-8
3.3.1	Generalidades.....	3-8
3.3.2	Semillas de SiO ₂ por el método de Stöber.....	3-10
3.3.3	APTES@SiO ₂ por modificación del método de Stöber.....	3-10
3.3.4	Cy-PIP@SiO ₂	3-11
3.3.5	MB@ SiO ₂	3-11
3.3.6	NP duales [Ru(bpy) ₃] ²⁺ @SiO ₂ -NH-Cy-PIP.....	3-14
3.3.7	NP duales MB@SiO ₂ -ME-1-NH-CyTest.....	3-15
3.3.8	ATTO488@SiO ₂	3-15
3.3.9	PTCDA@SiO ₂	3-17
3.4	Caracterización rutinaria de los materiales.....	3-17
3.4.1	Dispersión dinámica de luz (DLS).....	3-17
3.4.2	Espectroscopía FTIR.....	3-17
3.4.3	Potencial Z.....	3-18
3.4.4	SEM.....	3-18
3.4.5	TEM.....	3-19
3.5	Espectroscopías.....	3-19
3.5.1	Generalidades UV-vis y fluorescencia en estado estacionario.....	3-19
3.5.2	Fluorescencia resuelta en el tiempo.....	3-22
3.5.3	Rendimiento cuántico de fluorescencia de MB@SiO ₂	3-23
3.6	Experimentos en células.....	3-24
3.7	Medición de la generación de oxígeno singulete (¹O₂) de MB@SiO₂	3-26

	con un monitor químico (DPBF).....	
3.8	Referencias.....	3-29

Capítulo 4: Una aminotricarbocianina (Cy-PIP) como sensor molecular de pH

4.1	Introducción.....	4-1
4.2	Una estrategia sintética general para las aminotricarbocianinas simétricas.....	4-3
4.2.1	Precursor clorado Cy-Cl.....	4-5
4.2.2	Síntesis del derivado N-sustituido.....	4-21
4.3	Caracterización fotofísica de Cy-PIP.....	4-28
4.3.1	Propiedades espectroscópicas de derivados N-sustituidos.....	4-28
4.3.2	Efecto de la concentración en el espectro de absorción de Cy-PIP.....	4-29
4.3.3	Influencia del solvente en la fotofísica de Cy-PIP.....	4-31
4.3.4	Fotoestabilidad de Cy-PIP en solución acuosa.....	4-33
4.3.5	Fluorescencia de Cy-PIP resuelta en el tiempo.....	4-34
4.4	Cy-PIP y su capacidad sensora de pH.....	4-36
4.4.1	Dependencia de la absorbancia con el pH.....	4-36
4.4.2	Dependencia de la emisión con el pH.....	4-37
4.5	Discusión.....	4-38
4.5.1	Estrategia sintética de Cy-PIP.....	4-38
4.5.2	Propiedades fotofísicas de Cy-PIP.....	4-39
4.5.3	Capacidad sensora de pH.....	4-43
4.6	Conclusiones.....	4-46
4.7	Referencias.....	4-48

Capítulo 5: Nanosensor de pH en el NIR basado en la funcionalización superficial de SiO₂

5.1	Introducción.....	5-1
5.2	Síntesis de Cy-PIP@SiO ₂	5-2
5.2.1	Síntesis de Nanopartículas de SiO ₂ funcionalizadas con APTES.....	5-2
5.2.2	Unión de Cy-PIP a APTES@SiO ₂	5-3
5.3	Caracterización del nuevo material.....	5-4
5.3.1	Morfología y tamaño.....	5-4
5.3.2	Espectroscopia infrarroja (FTIR).....	5-6
5.4	Emisión de fluorescencia en estado estacionario.....	5-8

5.5	Cy-PIP@SiO₂ y su rol como nanosensor fluorescente de pH.....	5-9
5.6	Aplicación: Detección de pH en células HeLa <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>.....	5-10
5.6.1	Estudios por microscopía confocal de fluorescencia.....	5-10
5.6.2	Estudios por citometría de flujo.....	5-11
5.7	Discusión.....	5-14
5.7.1	Cy-PIP@SiO ₂ : caracterización y capacidad sensora de pH.....	5-14
5.7.2	Internalización y capacidad sensora de pH de Cy-PIP@SiO ₂ en células HeLa.....	5-17
5.8	Conclusiones.....	5-18
5.9	Referencias.....	5-20

Capítulo 6: NP de SiO₂ modificadas con azul de metileno y potencial aplicación en terapia fotodinámica

6.1	Introducción.....	6-1
6.2	Caracterización de nanopartículas dopadas con MB.....	6-2
6.2.1	Nanopartículas de tipo Stöber (MB@SiO ₂ -ST).....	6-2
6.2.2	Nanopartículas por Micromemulsión Inversa.....	6-6
6.3	Caracterización fotofísica de las nanopartículas.....	6-15
6.3.1	MB@SiO ₂ -ST.....	6-15
6.3.2	MB@SiO ₂ -ME.....	6-23
6.4	Generación de oxígeno singulete.....	6-28
6.4.1	Nanopartículas MB@SiO ₂ -ST.....	6-28
6.4.2	Nanopartículas MB@SiO ₂ -ME.....	6-33
6.4.3	Rendimiento cuántico de emisión de MB@SiO ₂ -ME.....	6-42
6.5	Discusión.....	6-43
6.5.1	Caracterización de los materiales MB@SiO ₂	6-43
6.5.2	Caracterización fotofísica y generación de oxígeno singulete.....	6-45
6.6	Conclusiones.....	6-52
6.7	Referencias.....	6-54

Capítulo 7: NP de SiO₂ con más de una sonda fluorescente

7.1	Introducción.....	7-1
7.1.1	Sistemas con dos sondas fluorescentes como plataformas para nanosensores de pH.....	7-5
7.1.2	Otros sistemas en estudio: resultados preliminares.....	7-17
7.2	Discusión.....	7-22

7.2.1	Nanopartículas duales [Ru(bpy) ₃] ²⁺ @SiO ₂ -NH-CyPIP.....	7-22
7.2.2	Nanopartículas MB@SiO ₂ -NH-Cy-Test como plataforma para nanosensores autoreferenciados de pH.....	7-25
7.2.3	Nanopartículas dopadas con fluoróforos comerciales.....	7-27
7.3	Conclusiones	7-29
7.4	Referencias	7-30

Capítulo 8: Conclusiones generales y perspectivas

1 Introducción general

1.1 Motivación del uso de nanopartículas para visualización *in vivo*, sensado y teranóstica

El conocimiento y las técnicas de nanotecnología han derramado en numerosas disciplinas tales como la física, la ciencia de materiales, química, biología y medicina¹. La nanotecnología aplicada a la medicina (nanomedicina) ha sido reconocida como una tecnología clave (KET, del inglés *Key Enabling Technology*) con un gran impacto en tres áreas principales: terapéutica, diagnóstico/visualización (*imaging*) y medicina regenerativa. De ahí el vocablo *teranóstica* (terapia y diagnóstico). En los últimos años el campo de la nano-oncología se ha expandido enormemente con el desarrollo de nanosistemas para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer. En este contexto, se piensa que los nanosistemas que vengan en la próxima década tendrán una decisiva influencia en el tratamiento del cáncer si contemplan los siguientes aspectos: i) el uso de nuevas formulaciones para la detección temprana de la enfermedad, ii) si los nanosistemas son agentes de visualización y de marcación altamente sensibles y selectivos para el tumor, y iii) minimizan los efectos secundarios en el paciente.²

1.1.1 ¿Por qué nano?

Un nanómetro es la milmillonésima parte de un metro. Por nanotecnología entendemos a un conjunto de tecnologías que derivan de la capacidad de los investigadores de manipular o procesar la materia a la escala

de los nanómetros. La definición más aceptada de nanomaterial es aquél que posee alguna de sus dimensiones entre 1 y 100 nm.³ Así, se tienen diferentes arquitecturas de nanomateriales: esferas, prismas, etc. Uno de los aspectos más interesantes de este campo del conocimiento científico es que, más allá de la identidad del material, adquiere relevancia el tamaño: esa escala “mágica” a la que llamamos “nano”. Un ejemplo clásico es el oro, un metal dorado, buen conductor, que funde a 1065 °C. Cuando el oro se encuentra en forma de nanopartículas (NP) de diámetro menor a 100 nm ya no es más dorado: la suspensión de NP de oro cambia de color de acuerdo al tamaño del objeto.

En este contexto, la síntesis de coloides y NP adquiere relevancia al ser sistemas de dimensiones reducidas susceptibles de ser modificados químicamente y que presentan una elevada área superficial. La disponibilidad de esta área para ser funcionalizada con diversos compuestos moleculares resulta sumamente atractiva para una variedad de disciplinas, desde la catálisis industrial hasta aplicaciones en medicina. Si a esto agregamos la posibilidad de realizar una síntesis de un material de manera racional donde se integran diferentes componentes de manera secuencial o concertada, se expanden notablemente las perspectivas de generar un sistema químico muy integrado con una alta densidad de grupos funcionales.

Así, los materiales “nano” se destacan principalmente por tres motivos: i) presentan propiedades diferentes y novedosas en comparación con los mismos materiales a escala macroscópica (*bulk*, del inglés), ii) tienen una elevada relación superficie/volumen y, iii) ese área puede ser modificada químicamente y dar como resultado un material complejo con una alta densidad de grupos funcionales todos reunidos en una misma entidad nanométrica.

1.1.2 Nanomedicina

Como ya mencionamos, en las últimas décadas, uno de los campos en el que los investigadores han realizado grandes avances es el de la nanomedicina, en particular la nano-oncología. Se han desarrollado una amplia gama de especies de NP que pueden circular por el torrente sanguíneo y dirigirse a los tumores. A diferencia de los medicamentos estándar de bajo peso molecular, las NP son esencialmente multifuncionales, y en ellas se pueden introducir/programar muchas propiedades al mismo tiempo, ya sea en el núcleo de las NP o en su superficie, y aprovechar la gran relación área/volumen. En las NP se pueden combinar componentes/funciones que aporten luminiscencia, magnetismo, calentamiento plasmónico o capacidad de entregar moléculas terapéuticas. Las NP multifuncionales pueden diseñarse para absorber y transportar con alta eficiencia una variedad de compuestos y sondas entre los cuales se encuentran los fármacos de moléculas pequeñas, moléculas fluorescentes, ADN, ARN, proteínas y glicanos.^{1,2}

En 1986 Matsumura y Maeda descubrieron un efecto que llamaron EPR (*enhanced permeability and retention effect*, del inglés) y que resultó clave para el futuro desarrollo de terapias antitumorales.⁴ Las investigaciones de Maeda *et al.* demostraron que la mayoría de los tumores sólidos tienen vasos sanguíneos con arquitecturas defectuosas y, generalmente, producen cantidades extensas de varios factores que otorgan permeabilidad vascular. Así, la permeabilidad vascular alta asegura un suministro suficiente de nutrientes y oxígeno a los tejidos tumorales, lo que les permite un rápido crecimiento. El efecto EPR entonces considera esta naturaleza anatómico-patofisiológica única de los vasos sanguíneos tumorales que facilita el transporte de macromoléculas a dichos tejidos. Las macromoléculas de tamaño mayor a 40 kDa se filtran selectivamente de los vasos y se acumulan en los tejidos tumorales, lo cual no ocurre en tejidos sanos.⁵⁻¹¹ Por su parte, los nanosistemas, en virtud del efecto EPR, también pueden llegar y acumularse selectivamente en los tejidos tumorales, lo que les da una potencialidad terapéutica muy importante.¹

La primera generación de NP antitumorales que ya han sido aprobados para uso clínico incluye fundamentalmente a liposomas y NP poliméricas. La principal ventaja de estos sistemas, conocidos como materiales blandos (*soft matter*), es que aumentan la solubilidad de los medicamentos hidrofóbicos, con lo cual mejoran el tiempo de circulación y tienen una mejor llegada al sitio de acción.¹²⁻¹⁴ En una segunda generación de nanosistemas basados en materia blanda, la administración dirigida se ha impartido mediante la adición de una variedad de antígenos o anticuerpos a diferentes formulaciones.¹⁵ Más recientemente, los sistemas inorgánicos (*hard matter*) basados en NP están ganando impulso, pues ofrecen la posibilidad de añadir en la estructura núcleos con propiedades magnéticas u ópticas, que mejoran la localización y el manejo desde el exterior del cuerpo mediante la aplicación de campos magnéticos externos o la irradiación.^{16,17} También pueden colocarse diferentes grupos químicos en la superficie y así obtener NP multifuncionales. En la Figura 1-1 se muestran dos tipos de nanomateriales a los que nos hemos referido hasta ahora: liposomas y NP inorgánicas multifuncionales.

Actualmente se está desarrollando una tercera generación de nanosistemas sofisticados que combinan núcleos nanoestructurados responsivos con sistemas de poros exactamente diseñados que actúan como reservorios de liberación controlada¹⁸, o con fragmentos moleculares (polímeros, biomoléculas) que permiten una inyección controlada como respuesta a estímulos externos.^{19,20} Esta tercera generación de especies “nanobioactivas”, que emulan sistemas inteligentes y compartimentalizados como las células, implica la integración de la entrega al sitio de acción, la dirección y el seguimiento en nanosistemas complejos, lo que conduce al nuevo campo de la teranóstica.

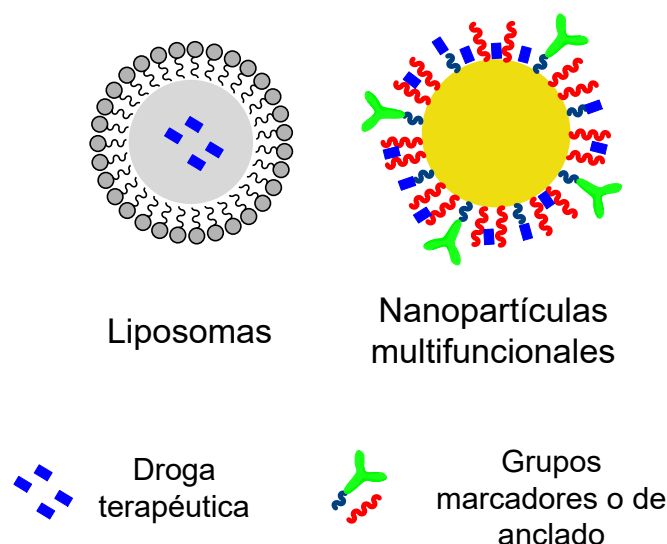


Figura 1-1. Ejemplos de nanosistemas del campo de la nanomedicina: liposomas y NP multifuncionales.

Asimismo, otra área muy interesante es la de la fotonanomedicina, una rama de la medicina que utiliza la nanotecnología para producir materiales en la escala de los nanómetros responsivos a luz. Las técnicas de visualización óptica con luz para monitorear la biodistribución de nanomedicinas resultan muy atractivas por su fácil uso e implementación, a diferencia de las técnicas de PET (Tomografía por emisión de positrones) y SPECT (Tomografía computada de emisión monofotónica), que utilizan compuestos radiomarcados difíciles de manipular y detectores costosos. Las aplicaciones de la fotonanomedicina pueden dividirse en tres grandes áreas: i) visualización para diagnóstico²¹⁻²³, ii) visualización para guiar cirugías²⁴ y, iii) terapias lumínicas, en particular terapia fotodinámica (PDT) y terapia fototérmica (PTT).^{25,26} Como veremos, en esta tesis sólo nos enfocaremos en la construcción de nanomateriales para las aplicaciones de visualización, de sensado de analitos biológicamente relevantes y de terapia fotodinámica.

1.2 Nanopartículas luminiscentes de dióxido de silicio (SiO₂) y la importancia de la luz de NIR

Queda claro que las posibilidades de nanosistemas a construir de acuerdo a la aplicación proyectada son enormes. En este trabajo, delimitaremos nuestra atención a las nanopartículas fluorescentes basadas en SiO₂ (SiO₂ F-NP) para aplicación en visualización *in vivo* y sensado, y cuya emisión se encuentre preferentemente en la región del infrarrojo cercano del espectro electromagnético (NIR). Las SiO₂ F-NP constituyen un sistema atractivo y muy estudiado en nanomedicina debido tanto a propiedades intrínsecas de la SiO₂ como su biocompatibilidad y transparencia a luz visible, como a la posibilidad que ofrecen de construir plataformas complejas con muchas funciones integradas.

Las propiedades fotofísicas de las SiO₂ F-NP vienen determinadas por la identidad de la molécula con la cual se ha dopado el material, o con la cual se ha funcionalizado la superficie. En el caso de las sondas encapsuladas, se ha reportado el rol fotoprotector de la matriz inorgánica de SiO₂ sobre las moléculas activas, lo cual aumenta su fotoestabilidad.²⁷ Asimismo, controlando las variables de síntesis se puede colocar en una misma NP más de una sonda fluorescente. Dichas moléculas podrían interactuar entre sí, por ejemplo, mediante procesos de transferencia de energía (ET). Así, procesos de ET entre el mismo tipo de moléculas podrían llevar a fenómenos de autoapagamiento, lo cual sería una desventaja, pero también a fenómenos de amplificación de señal, en muchos casos deseables. Si la transferencia de energía ocurre entre dos moléculas diferentes que dopan el mismo material, puede dar lugar a procesos de tipo FRET (Transferencia de energía por resonancia de Förster) que pueden ser modulados por ejemplo para la construcción de sensores. También desde el diseño y la síntesis de las NP se puede controlar que la distancia entre las

moléculas fluorescentes sea mayor que la distancia crítica necesaria para que ocurran procesos de tipo FRET, y aprovechar esto para construir sensores autoreferenciados de ciertas propiedades con más de una sonda fluorescente.

Cuando hablamos de técnicas luminiscentes para visualización *in vivo* es importante tener en cuenta que la luz que se utilice debe poder llegar hasta los tejidos en los que se requiera la visualización. Existe una “ventana biológica” de trabajo en la que los tejidos son relativamente transparentes y no absorben luz: la región NIR del espectro electromagnético (650-1800 nm).^{28,29} Dicha región puede ser dividida en tres zonas: a) NIR-1 (650-950 nm), en la cual aún es considerable la dispersión de luz por los tejidos y existe cierta autofluorescencia de los componentes celulares, b) NIR-2 (1000-1350 nm) y c) NIR-3 (1500-1800 nm).³⁰ Para aplicación biológica, es entonces deseable poder construir nanosistemas luminiscentes, en particular SiO₂ F-NP, que absorban y emitan luz en el NIR tanto para marcado y visualización como para aplicaciones de sensado y/o de terapia.

1.3 El proceso sol-gel

La síntesis de SiO₂ F-NP involucra en la mayoría de los casos procesos de tipo sol-gel, que explicaremos a continuación y que fueron los utilizados para sintetizar todos los materiales que se reportan en esta Tesis.

Los procesos sol-gel implican una ruta coloidal que es utilizada para sintetizar materiales cerámicos y en la cual existe una etapa intermedia que incluye el pasaje por los estados sol y/o gel. Llamamos *sol* a una suspensión estable de partículas coloidales en un líquido; y *gel* a una red porosa sólida tridimensional continua, que se expande a lo largo de un medio líquido. Una de las ventajas más importantes de la síntesis sol-gel radica en el uso de bajas temperaturas, en comparación con la síntesis convencional de cerámicos.³¹ Así,

se pueden crear materiales híbridos orgánico-inorgánicos con un control más eficiente y simple de la cinética de las reacciones involucradas, la nucleación y el crecimiento de las partículas. Estas condiciones suaves de síntesis permiten procesar los materiales obtenidos de diversas maneras (polvos, fibras, monolitos, nanopartículas, etc).³²

Se trata de un método análogo a la polimerización en química orgánica: se parte de un monómero para producir un polímero. La diferencia radica en que, en los procesos sol-gel, el monómero es un precursor inorgánico y el polímero es la red del óxido. Para la formación del óxido es necesaria la interconexión de los centros metálicos **M** (éstos pueden ser metales como Ti o Zr y semimetales como Si) mediante puentes oxo M-O-M o hidroxilo M-(OH)-M.³²

El proceso sol-gel involucra dos etapas: hidrólisis y condensación (Figura 1-2). La etapa inicial es la hidrólisis de los precursores inorgánicos MX_n (donde X puede ser, por ejemplo, un anión o un grupo alcóxido -OR) y es análoga a la etapa de iniciación en una reacción de polimerización orgánica. Luego, la especie hidrolizada M-OH participa de una segunda etapa, donde condensan dos centros M, que, luego de sucesivos pasos, permiten la generación de la red de óxido. La etapa de condensación es similar a la etapa de propagación en una polimerización y puede ocurrir a través de una reacción de oxolación (condensación a través de puente oxo) o a través de una reacción de olación (condensación a través de un puente hidroxilo).

Química sol-gel

Bajas Temperaturas (RT)
Soft Chemistry

Integra funciones orgánicas y biológicas
(Materiales híbridos)

Precursores inorgánicos : $M(OR)_4$ $M = \text{Si, Ti, Sn, etc}$ $OR = -OEt, -OnPr, -OnBu$

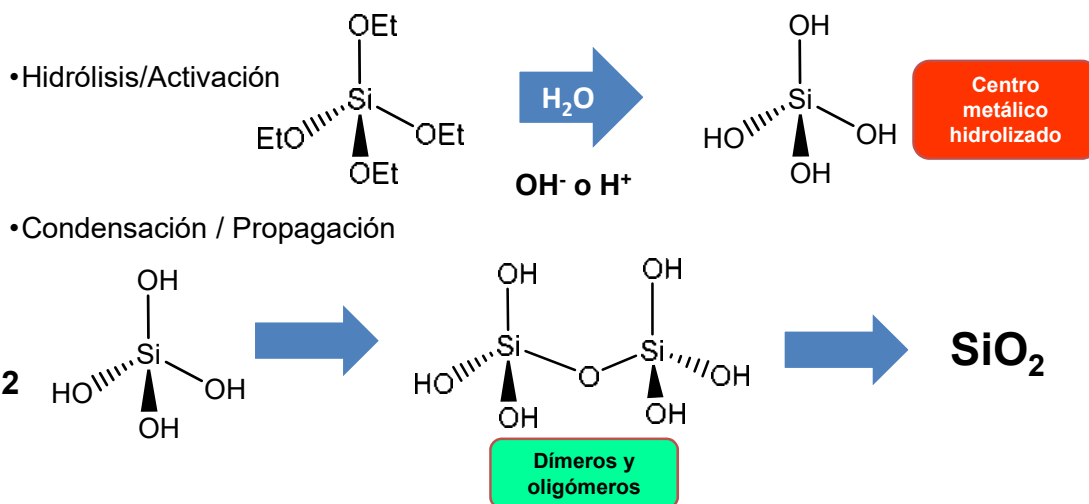


Figura 1-2. Reacciones involucradas en la síntesis sol-gel de SiO_2 (Adaptación de Galo Soler y autores varios)

Las velocidades de las reacciones de hidrólisis y condensación dependen, entre otros factores, de la identidad del precursor inorgánico. Por ejemplo, para alcóxidos de silicio como el TEOS ($\text{Si}(\text{OEt})_4$) la hidrólisis es lenta y debe ser catalizada en medio ácido o en medio básico, y la velocidad de condensación se minimiza a pH 1-3.³² En definitiva, los procesos sol-gel permiten tener control sobre el esqueleto inorgánico y así variar el tamaño, la forma y la funcionalidad superficial mediante la elección adecuada del precursor inorgánico, el solvente, el pH, el uso de complejantes o de catalizadores, la temperatura y las concentraciones de las distintas especies en solución.

1.3.1 Método de Stöber

En 1968, Stöber *et al.* reportaron la síntesis de nanopartículas de sílice en un medio alcohólico con pequeñas cantidades de agua para la hidrólisis y con amoníaco en cantidades catalíticas. Como precursores utilizaron alcóxidos de silicio. Dichas NP resultaron altamente monodispersas y esféricas, con un tamaño controlable entre 100 y 600 nm.³³

Más tarde, Bogush *et al.* extendieron el trabajo de Stöber, Fink y Bohn y, a partir de sus experimentos lograron establecer una correlación entre el diámetro de las NP (monodispersas) y las concentraciones iniciales de TEOS, agua y amoníaco. Esto permitió disponer de una fórmula a partir de la cual predecir el tamaño de las NP de sílice (Ecuación (1)).³⁴

$$d = A \cdot (H_2O)^2 \cdot e^{(-B \cdot (H_2O)^{1/2})} \quad (1)$$

donde d es el diámetro de las NP, A es un parámetro función de las concentraciones de TEOS y amoníaco y B es un parámetro que sólo es función de la concentración de amoníaco.

Asimismo, Bogush *et al.* estudiaron la cinética del proceso sol-gel de formación de las NP. A través de medidas de conductividad establecieron que el mecanismo de crecimiento de las NP involucra reacciones en solución (que proceden independientemente de la presencia de NP) que dan lugar a la formación de núcleos de sílice que luego se agregan para formar partículas.³⁵

Por otra parte, Van Blaaderen *et al.* reportaron en 1992 la síntesis de SiO₂ F-NP, esféricas y monodispersas.³⁶ El enfoque consistió en la co-condensación del derivado de fluoresceína isotiocianato (FITC) y 3-aminopropiltietoxisilano (APTES) junto con TEOS en condiciones de Stöber. Se agregó el fluoróforo derivatizado con APTES en diferentes momentos de la síntesis para obtener las arquitecturas mostradas en la Figura 1-3. Hasta el día de hoy, se han reportado una numerosa cantidad de SiO₂-F NP sintetizadas a partir de este enfoque.

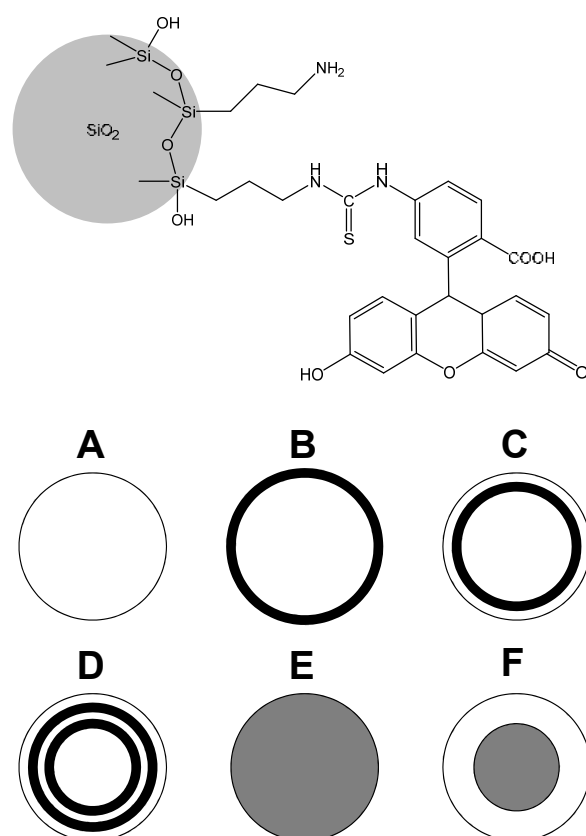


Figura 1-3. Diferentes arquitecturas de SiO₂-F NP sintetizadas por Van Blaaderen et al³⁶. Las partes oscuras representan las regiones en las que se ha unido el fluoróforo. Arriba se representa la situación B de funcionalización superficial con APTES-FITC.

1.3.2 Método de microemulsión inversa

Con el método de Stöber es difícil obtener NP monodispersas de diámetros menores a 100 nm. Alternativamente, las NP preparadas en microemulsiones agua-en-aceite (W/O, *water in oil*, del inglés) resultan monodispersas, y es relativamente fácil controlar su tamaño.^{37,38} Por “aceite” entendemos a un solvente orgánico inmiscible con agua. Una microemulsión de agua en aceite puede definirse como una solución termodinámicamente estable, isotrópica y transparente de aceite, agua y surfactante, en la que las gotas de agua se dispersan como entidades líquidas nanométricas en un dominio continuo de aceite. Las nanogotas de agua sirven como nano-reactores para la

síntesis de NP. Este método tiene la ventaja de que no requiere condiciones extremas de temperatura y presión, y el tamaño y la forma de las partículas se pueden controlar simplemente variando los parámetros de la microemulsión. Bagwe *et al.* estudiaron la encapsulación de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ en NP de SiO_2 sintetizadas en microemulsiones inversas en diferentes condiciones experimentales.³⁹ En su trabajo, exploraron los efectos de la naturaleza del surfactante, las concentraciones de TEOS y amoníaco, la relación molar agua/surfactante y la relación molar co-surfactante/surfactante en el tamaño, la polidispersión y el espectro de fluorescencia de las NP $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}@\text{SiO}_2$ obtenidas.

En primer lugar, la identidad del surfactante (AOT aniónico, NP-5 neutro) determina qué tipo de micela se formará (Figura 1-4). El AOT forma micelas esféricas, mientras que las micelas de NP-5 tienen una estructura lamelar. Las micelas lamelares permiten la asociación entre micelas para formar canales de intercambio de agua, a diferencia de lo que ocurre con micelas esféricas. Así, la nucleación es rápida y los tamaños de NP obtenidos con NP-5 (micelas lamelares) son menores que AOT (micelas esféricas).

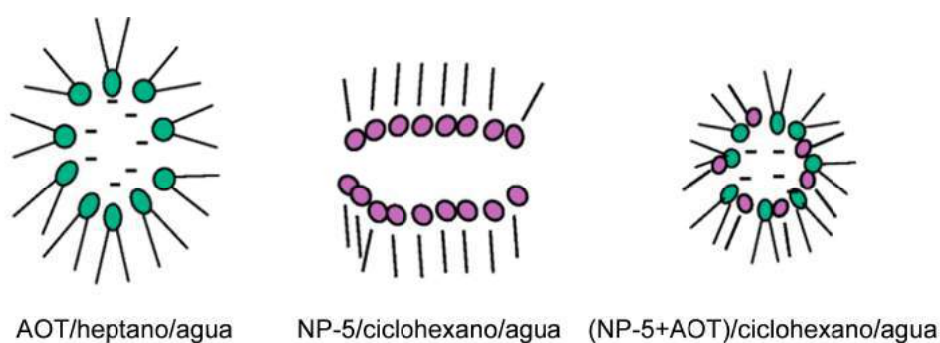


Figura 1-4. Estructura de micelas representativas. Adaptado de Ref.³⁹

Por otra parte, el parámetro clave en estos sistemas es la relación molar agua/surfactante, **R**. Esencialmente, un mayor valor de **R**: 1) incrementa el tamaño del “pool” de agua en la micela, y habrá menos agua *bulk* en contacto

con las moléculas de surfactante, 2) incrementa el número de monómeros por nanogota y, 3) favorece el intercambio intermicelar por el aumento en el tamaño de la micela.

Por último, y como veremos en el Capítulo 6, el surfactante puede interactuar con el colorante mediante fuerzas electrostáticas si se trata moléculas cargadas³⁹, o formando complejos surfactante-fluoróforo⁴⁰.

1.4 Moléculas fluorescentes

1.4.1 Principios básicos del proceso de emisión

Por *luminiscencia* (del latín, *lumen* = luz) entendemos el proceso de emisión de fotones de UV, visible o NIR de una especie en estado excitado. La fluorescencia y la fosforescencia son casos particulares de luminiscencia, en los que la excitación de las especies ocurre mediante la absorción de fotones (por ello se las llama *fotoluminiscencias*). Se han reportado una extensa variedad de materiales luminiscentes, entre los que se cuentan minerales, moléculas orgánicas, complejos con metales de transición o NP de metales nobles o de semiconductores. Entre ellos, las moléculas orgánicas fluorescentes (también denominadas fluoróforos, fluorocromos o sondas fluorescentes) son las más estudiadas.⁴¹

Una vez que una molécula es excitada por la absorción de un fotón de luz, puede retornar a su estado basal emitiendo luz de fluorescencia (desde su primer estado electrónico excitado, S1). Sin embargo, pueden ocurrir diversos procesos que compiten con la fluorescencia (Figura 1-5).

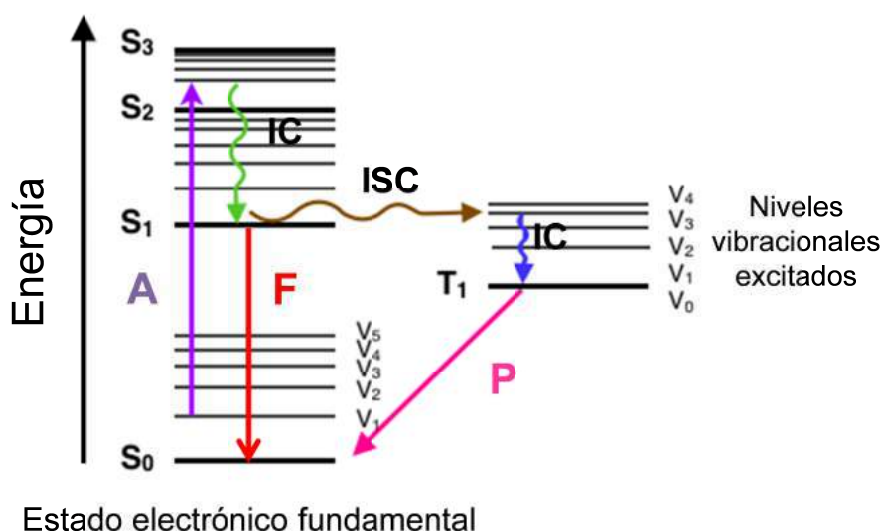


Figura 1-5. Diagrama de Jablonski en el que se indican los procesos fundamentales de fotoluminiscencia (F: fluorescencia, P: fosforescencia) y procesos alternativos como IC (conversión interna) e ISC (cruce entre sistemas).

Los caminos principales de relajación alternativos a la fluorescencia son: conversión interna (IC, relajación vibracional hasta el S_0 , sin emisión de luz), cruce entre sistemas (ISC, paso del S_1 al T_1 , puede dar lugar a la fosforescencia), transferencia intramolecular de carga (ICT) y, cambio conformacional. Existen también caminos de relajación que involucran a otras moléculas: transferencia electrónica, transferencia de protón, transferencia de energía y la formación de excímeros y exciplejos.

Es importante destacar que las vías de des-excitación mencionadas pueden competir con la emisión de fluorescencia si tienen lugar en una escala de tiempo comparable con el tiempo promedio (tiempo de vida) durante el cual las moléculas permanecen en el estado excitado. Como veremos, el tiempo de vida de una especie representa la ventana experimental de tiempo para la observación de procesos dinámicos.

El éxito de la fluorescencia como herramienta de investigación en el estudio de la estructura y la dinámica de la materia o de los sistemas vivos se debe a la alta sensibilidad de las técnicas fluorométricas. Asimismo, a través de

la fluorescencia se puede estudiar la influencia del microambiente (determinado por el pH del medio, la viscosidad, la fuerza iónica, la temperatura, la presión, etc) de la molécula en sus propiedades emisivas. Entonces, las moléculas fluorescentes son capaces de proporcionar información espacial y temporal sobre las propiedades del entorno, herramienta que será clave a lo largo de esta Tesis.

1.4.2 Parámetros que caracterizan la emisión

Existen varios parámetros relevantes que caracterizan la fotofísica de un fluoróforo: la intensidad de fluorescencia (I_F) y el rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F), la longitud de onda de excitación (λ_{exc}) y de emisión (λ_{em}) en relación con los espectros de absorción y emisión, el tiempo de vida medio de fluorescencia (τ_F) y la polarización de la emisión fluorescente (en relación a la anisotropía).

Consideremos el caso de una solución diluida de un fluoróforo A que es excitado con un pulso corto de luz. Así, una fracción de moléculas de A absorberá luz instantáneamente y pasará al estado excitado A^* , a partir del cual relajará al estado basal S_0 de forma radiativa (r) o no radiativa (nr), o pasará al estado triplete. La Ecuación (2) representa este proceso desde el punto de vista de la cinética química.

$$\frac{-d(^1A^*)}{dt} = (k_r^S + k_{nr}^S) \cdot (^1A^*) \quad (2)$$

Si se integra la Ecuación (2), se puede definir el tiempo de vida media de fluorescencia tal como se expresa en la Ecuación (3).

$$\tau^S = \frac{1}{k_r^S + k_{nr}^S} \quad (3)$$

Por su parte, el rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) es la fracción de moléculas excitadas que regresan al estado basal S_0 con emisión de fotones de fluorescencia (Ecuación (4)). En otras palabras, es la proporción entre el número de fotones absorbidos y emitidos.

$$\Phi_F = \frac{k_r^S}{k_r^S + k_{nr}^S} = k_r^S \cdot \tau^S \quad (4)$$

La intensidad de emisión (I_F) depende del coeficiente de extinción molar del fluoróforo (ϵ) y del rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F). A su vez, los espectros de absorción y emisión, caracterizados por las longitudes de onda de máxima absorción y emisión, λ_A y λ_F , respectivamente, dependen de la naturaleza química (estructura) de la molécula. La diferencia entre el máximo de la primera banda de absorción y el máximo de la emisión (expresados en número de onda) se conoce como “corrimiento de Stokes” (Ecuación (5)).

$$\Delta\nu = \nu_A - \nu_F \quad (5)$$

Cuando una población de fluoróforos es iluminada por un haz de luz linealmente polarizada, aquellas moléculas cuyos momentos de transición están orientados en la misma dirección que la del vector campo eléctrico incidente se excitan preferentemente. A este fenómeno se lo llama *fotoselección*. Así, dado que la distribución de los fluoróforos excitados es anisotrópica, la fluorescencia emitida también lo es. Cualquier cambio en la dirección del momento de transición del fluoróforo durante su tiempo de vida de estado excitado causará que la anisotropía de la muestra disminuya. Esto significa que se está

induciendo una despolarización parcial (o total) de la fluorescencia. Entre las causas de la despolarización de la fluorescencia se tienen: que los momentos de transición de absorción y emisión no sean paralelos, las torsiones de las moléculas, el movimiento browniano, la transferencia de la energía de excitación a otra molécula. Las mediciones de la polarización de la fluorescencia pueden, por lo tanto, proporcionar información útil sobre movilidad molecular, tamaño, forma y flexibilidad de las moléculas, fluidez de un medio, así como también sobre parámetros de orden (en una bicapa lipídica, por ejemplo). En el Capítulo 3 se especifican las fórmulas que se utilizaron para calcular la anisotropía promedio r .

1.4.3 Propiedades deseables de las especies fluorescentes

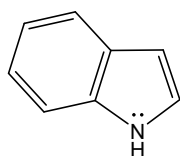
Cuando se debe elegir un fluoróforo para marcado de biomoléculas, visualización o sensado de analitos, se espera que cumplan con ciertos requisitos en sus parámetros característicos:

- ◆ *Longitudes de onda de excitación y de emisión.* Si el fluoróforo puede excitarse a una longitud cercana al máximo de absorción, se logrará un mayor brillo. Para estudios en células *in vivo*, la longitud de onda de excitación debe ser mayor a 400-500 nm, e idealmente la sonda debe poder excitarse en el NIR.
- ◆ *Corrimiento de Stokes.* Un valor alto de esta propiedad permite disminuir los efectos de dispersión de luz y facilita la separación de la radiación de excitación y emisión, por lo cual es muy deseable cuando se va a trabajar con sistemas *in vivo*. Como veremos, existen pocas sondas que cumplen con esta propiedad y un ejemplo son las aminotricarbocianinas que se estudian en esta tesis.

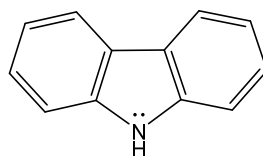
- ◆ *Coeficiente de absortividad molar (ϵ) y rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F).* Cuanto mayor sean estos valores, más brillo tendrá la sonda y mayor será la sensibilidad de la detección. En general, para fluoróforos orgánicos ϵ se debe encontrar entre 10^3 y $10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.
- ◆ *Fotoestabilidad.* Las fuentes de irradiación láser de los microscopios de fluorescencia son potentes y todos los fluoróforos pueden sufrir degradación en la exposición continua luego de algunos ciclos de excitación-emisión. Esta degradación ocurre en muchos casos por reacciones fotoquímicas durante el tiempo de vida del estado excitado por ejemplo, con el oxígeno del medio. Se busca que las especies fluorescentes logren la mayor cantidad de ciclos de excitación-emisión sin ser degradadas. Es aquí que entran en juego los (nano)materiales como protectores de los fluoróforos orgánicos.

1.4.4 Efectos de la estructura molecular en la fluorescencia: compuestos heterocíclicos

Los compuestos heterocíclicos como indoles y carbazoles derivados del pirrol (cuyas estructuras se muestran en el Esquema 1-1) poseen altos rendimientos cuánticos de fluorescencia. El orbital no enlazante del N heterocíclico es perpendicular al plano de la molécula, lo que le permite el solapamiento con los orbitales π de los carbonos adyacentes. Así, las transiciones que involucran a los electrones libres del N heterocíclico son similares a transiciones de tipo π - π^* .⁴¹



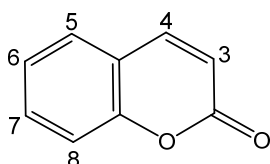
indol



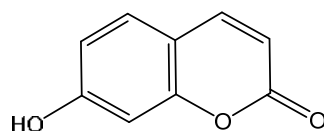
carbazol

Esquema 1-1. Estructuras de compuestos N-heterocíclicos.

Muchos fluoróforos de interés son derivados de compuestos heterocíclicos. En el Esquema 1-2 se muestra la estructura de la *cumarina*, un compuesto heterocíclico con un Φ_F muy bajo. Sin embargo, la sustitución en algunas de sus posiciones genera compuestos fluorescentes que emiten en la región del azul-verde (400-500 nm). La sustitución en la posición de la molécula por un grupo $-OH$ (7-hidroxycumarinas) resulta en compuestos muy sensibles al pH.



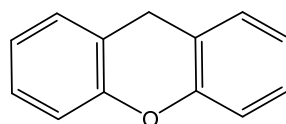
cumarina



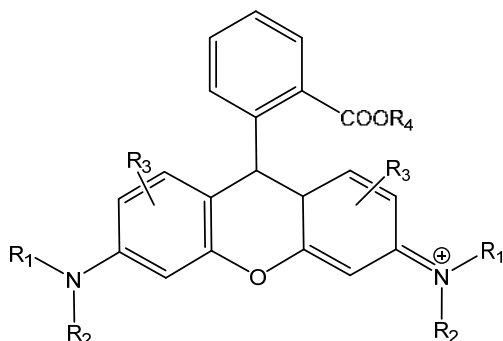
7-hidroxi
cumarina

Esquema 1-2. Estructura de la *cumarina* y su derivado 7-hidroxi *cumarina*.

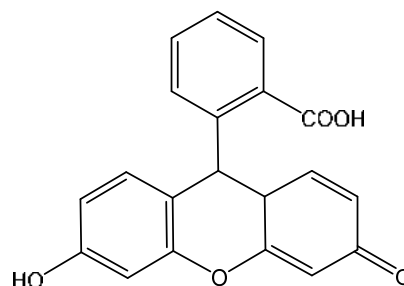
Por otra parte, se tienen los derivados de *xanteno*: *rodaminas* y *fluoresceínas*. En contraste con las *cumarinas*, sus espectros de absorción y emisión son estrechos (emiten luz en el rango de 500-700 nm) y su corrimiento de Stokes es pequeño. La *fluoresceína* y sus derivados son muy sensibles al pH y se utilizan a menudo como sensores moleculares de esta propiedad.



xanteno



rodamina



fluoresceína

Esquema 1-3. Estructuras del xanteno y sus derivados rodamina ($R = H$ o alquilo) y fluoresceína.

Por último, tenemos a los fluoróforos de la familia de las *cianinas*. La estructura base se muestra en el Esquema 1-4 y la sustitución adecuada genera una librería de compuestos cuyo cromóforo es una cadena de dobles enlaces π conjugados flaqueada por dos heteroátomos, uno de los cuales se comporta como donante de electrones (D) y el otro como aceptor de electrones (A).

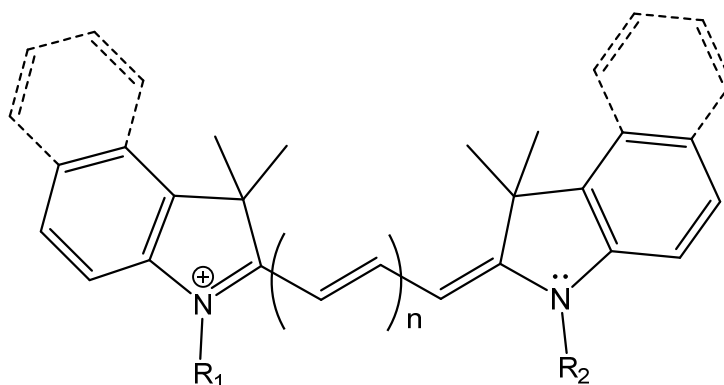


Esquema 1-4. Estructura base de las cianinas.

Se trata de compuestos muy utilizados en fotografía⁴², tecnologías láser⁴³ y celdas fotovoltaicas⁴⁴. Se utilizan también para visualización de biomoléculas en microscopías de fluorescencia, *in vitro* e *in vivo*⁴⁵ y, para estudios de moléculas únicas.⁴⁶ Presentan una gran fotoestabilidad, buena solubilidad en agua y alto rendimiento cuántico de fluorescencia. La gran mayoría tienen

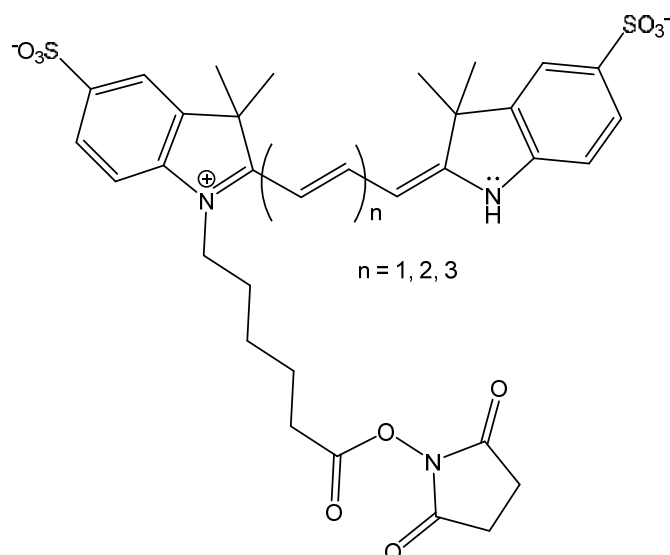
corrimientos de Stokes pequeños y tiempos de vida muy cortos (menores a 1 ns). Sus espectros de absorción cubren una región amplia del espectro electromagnético (visible y NIR).

Los grupos donante y aceptor de electrones pueden ser compuestos *N*-heterocíclicos de tipo indol, benzoindol, benzoxazol, benzotiazol y quinolina, lo que da lugar a *carbocianinas*. El N es terciario en el grupo donante, mientras que en el grupo aceptor resulta cuaternario (carga positiva).⁴⁷ Sin embargo, la carga del grupo aceptor se encuentra en resonancia a través de los dobles enlaces conjugados, por lo cual la estructura que se suele esquematizar no es más que uno de los híbridos de resonancia posibles. En el Esquema 1-5 se halla la estructura de una carbocianina derivada de indol y benzoindol.



Esquema 1-5. Estructura de cianinas derivadas de indol y benzoindol (línea punteada).

Dado que se trata de moléculas complejas, fue necesario introducir una nomenclatura para ellas. En los años 90, Waggoner y colaboradores introdujeron la nomenclatura “Cy” para nombrar a una familia de indocarbocianinas para marcación de proteínas y ácidos nucleicos.^{48,49} Los ejemplos más conocidos son Cy3, Cy5 y Cy7 (Esquema 1-6).



Esquema 1-6. Carbocianinas en forma de ésteres succimidilo Cy3 ($n=1$), Cy5 ($n=2$) y Cy7 ($n=3$).

1.5 Propiedades fotofísicas y espectroscópicas de las cianinas

1.5.1 Fluorescencia *versus* fotoisomerización

Ya dijimos que las carbocianinas son fluoróforos catiónicos que se caracterizan por una conjugación extendida de dobles enlaces que conforma un sistema π de electrones deslocalizados. Muestran una banda de absorción $\pi \rightarrow \pi^*$ muy intensa que puede ser ajustada a través del rango visible y NIR del espectro electromagnético aumentando el número de dobles enlaces conjugados de la cadena. En otras palabras, a medida que aumenta la extensión de la cadena polimetínica de dobles enlaces conjugados ocurre un desplazamiento batocrómico de los espectros de absorción y emisión que se conoce como “desplazamiento del vinileno”.⁵⁰ Se calcula que por cada enlace agregado el desplazamiento es de unos 100 nm. Así, en etanol, Cy3 absorbe luz a 548 nm, mientras que Cy7 lo hace a 747 nm.

Dado que el tiempo de vida media de fluorescencia está en el orden de unos pocos nanosegundos, si existe algún proceso competitivo a la emisión de luz, de tratarse de un fenómeno muy rápido.⁵¹

El estado fundamental de las cianinas se asocia a la configuración completamente *trans* de los dobles enlaces conjugados con los N en el mismo plano que la cadena de polimetinos, a pesar de que pueden ocurrir isomerizaciones. Cuando una cianina pasa a un estado excitado por absorción de luz, la relajación puede ocurrir mediante los procesos fotofísicos que hemos visto (fluorescencia, conversión interna, cruce entre sistemas) o implicar algún tipo isomerización y es aquí donde se utiliza el término *fotoisomerización*. Este proceso compite críticamente con la emisión de fluorescencia, y se ve como una desventaja de esta familia de fluoróforos. Entonces, luego de la absorción de luz, puede ocurrir isomerización desde el primer estado excitado singulete de la molécula (1N) para dar un fotoisómero en estado fundamental (**P**) con una configuración mono-*cis*.⁵² En la Figura 1-6 se presenta el diagrama cinético que normalmente se utiliza para representar el comportamiento fotofísico de las cianinas, y su fotoisomerización. Θ es la coordenada de rotación responsable de la isomerización, **N** es el estado singulete fundamental, 1N es el primer estado singulete excitado, **P** es el estado fundamental del fotoisómero y **t** es un intermediario excitado no espectroscópico parcialmente retorcido (*twisted state*) que se desactiva muy rápidamente de forma no radiativa hacia el estado fundamental. Los procesos de desactivación de 1N tienen lugar en la escala de los pico a nano segundos (muy rápidos), dependiendo de la identidad del compuesto y del medio⁵¹, mientras que la reacción de vuelta de **P** a **N** ocurre en una ventana de tiempo de micro a milisegundos⁵³. Los dos procesos de isomerización ($^1N \rightarrow t \rightarrow P$ y $P \rightarrow N$) involucran la misma coordenada Θ y se trata de procesos activados con constantes de velocidad (k_{Nt} y k_{PN}) que dependen de la temperatura y de la viscosidad del medio. Para DTICI (ioduro de 3,3'-dietiltiacarbocianina) la relajación de 1N al estado fundamental ocurre en

pequeña medida por fluorescencia ($\Phi_F(N) = 0,07^{54}$), mientras que la fotoisomerización tiene una relevancia destacada (la relajación al estado fundamental ocurre vía el intermediario t , $\Phi_{Nt} = 0,93-0,95^{54,55}$).

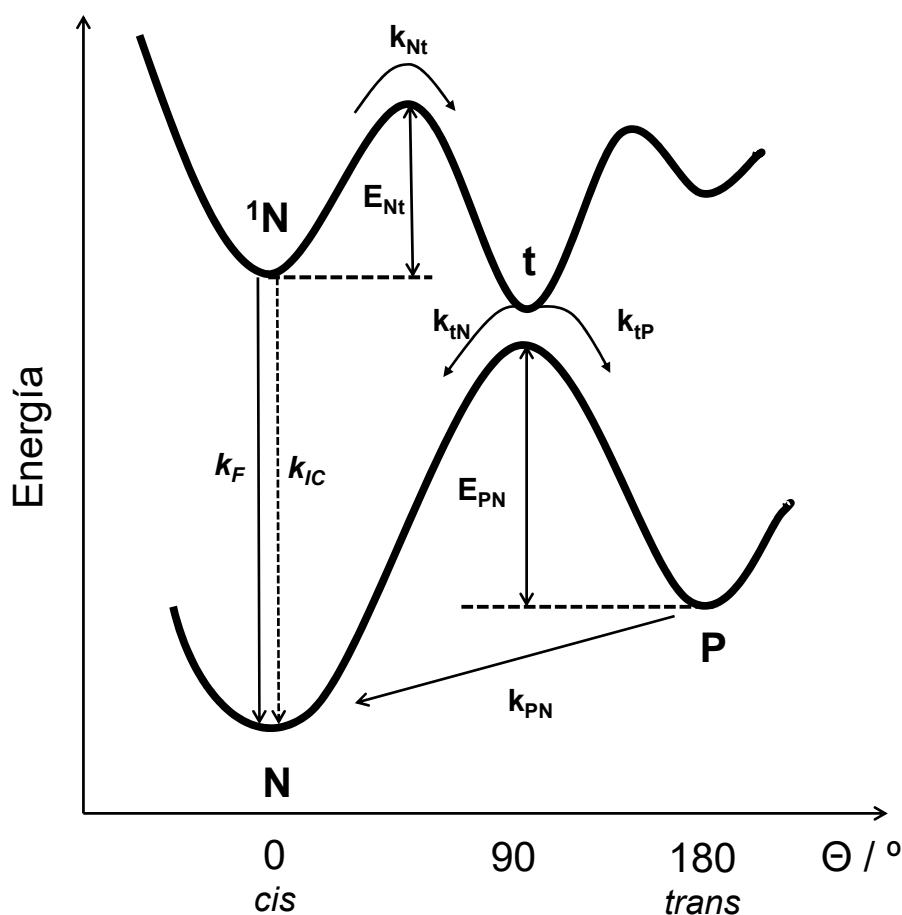


Figura 1-6. Diagrama de energía potencial para la fotoisomerización de cianinas.

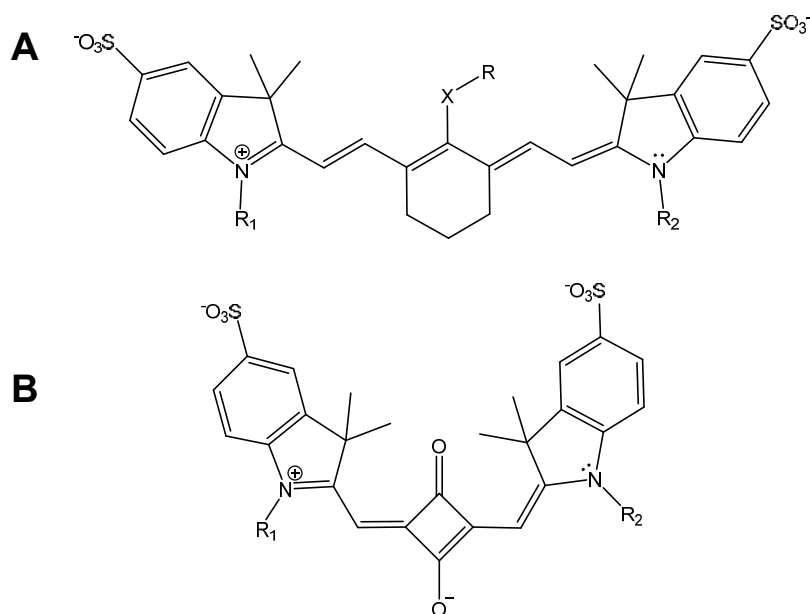
En este sentido, Aramendía *et al.* estudiaron en profundidad la dependencia de la fluorescencia y de procesos de fotoisomerización con la temperatura (rango de 0-70°C) en una variedad de solventes (alcoholes primarios). Para todas las cianinas estudiadas encontraron que los Φ_F disminuían al aumentar la temperatura y aumentaban si el solvente era más viscoso, en forma opuesta a lo que ocurría con los rendimientos cuánticos de fotoisomerización.⁵⁴ Por otra parte, Di Paolo *et al.* utilizaron las técnicas de espectroscopía de absorción por láser, fluorescencia inducida por láser y

espectroscopía optoacústica de láser pulsado para estudiar los parámetros fotofísicos y espectroscópicos de la cianina ioduro de 3,3'-dietiltiacarbocianina (DTCI), en particular del fotoisómero **P**. Los autores encontraron que $\Phi_F(\mathbf{P}) \leq 0,004$, un valor muy bajo que sugiere que la desactivación del primer estado excitado de **P** debe ocurrir principalmente por un proceso no radiativo (conversión interna), a diferencia de lo que sucede con la desactivación de $^1\mathbf{N}$ que tiene lugar a través del pasaje por la forma retorcida (**t**).⁵⁶

A modo de resumen, hemos visto que la rotación en torno al enlace C-C (fotoisomerización) es muy efectiva en cianinas, en particular en aquellas de cadena corta ($n=1$, por ejemplo Cy3). Esto hace que el Φ_F sea muy pequeño para estos fluoróforos.⁵⁷ Para aumentar el rendimiento cuántico de fluorescencia de las cianinas se debe impedir de alguna manera la mencionada isomerización. Para ello, una opción es utilizar solventes de alta viscosidad⁵⁷ o hacer cambios estructurales en la molécula como unirla a biomoléculas grandes que inhiban la rotación por impedimento estérico.⁵⁸ Sin embargo, otra solución estructural radica en la inclusión de ciclos en la cadena de polimetinos, que le dan cierta rigidez a la molécula e impiden la isomerización, como veremos en la Sección 1.5.2.

1.5.2 Tipos de cianinas rígidas

Como vimos en la Sección 1.5.1, se puede aumentar el Φ_F de las cianinas mediante la inclusión de ciclos que le impongan a la estructura una cierta rigidez. En el Esquema 1-7 se muestran las estructuras de dos tipos de cianinas rígidas: las tricarbocianinas, en las cuales se agrega un anillo de seis miembros en el centro de la estructura y, las escuaráinas^{59,60} que contienen una unidad de ácido escuárico.



Esquema 1-7. Estructuras químicas de cianinas rígidas. (A) Tricarbocianinas, $\text{X}=\text{O}, \text{S}, \text{N}$; (B) escuarainas.

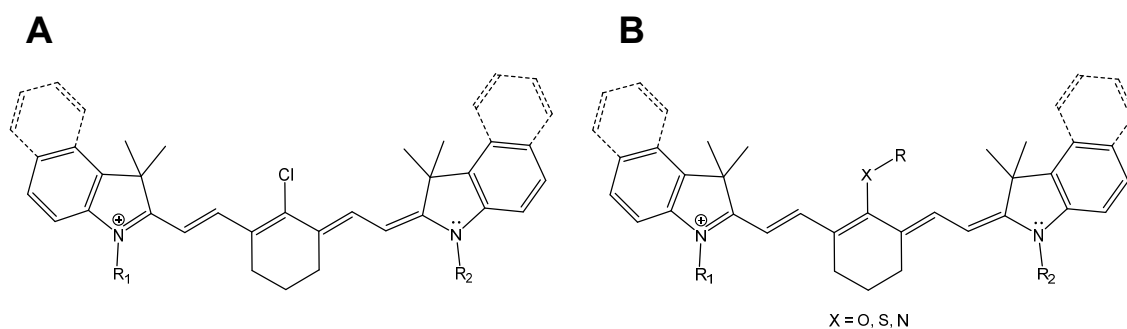
Ambas familias de cianinas rígidas tienen la propiedad de absorber y emitir luz en la región del NIR del espectro electromagnético. Como ya referimos en la Sección 1.2, esta característica presenta múltiples ventajas para su aplicación en biomedicina y microscopías de fluorescencia ya que la luz de NIR ofrece mínimas interferencias de absorción y de fluorescencia con muestras biológicas, se pueden usar diodos láser de bajo costo para la excitación, se obtiene una menor dispersión de la luz de excitación y la penetración en tejidos es mucho mayor que la de la luz visible.

Cabe mencionar que las escuarainas sufren de dos importantes limitaciones: son muy susceptibles al ataque nucleofílico (de nucleófilos biológicos, por ejemplo), lo que limita su estabilidad química y, tienen una gran tendencia a formar agregados no fluorescentes. En este sentido, Johnson *et al.* estudiaron la encapsulación de escuarainas en cavidades de rotaxanos y de ciclodextrinas para superar ambas dificultades.^{61,62}

Por su parte, las tricarbocianinas, al igual que la mayoría de las cianinas, tienen tendencia a formar agregados en agua. Para disminuir la agregación se

puede introducir grupos voluminosos en la molécula o dotarla de una carga permanente extra a fin de favorecer la repulsión electrostática. También se ha ensayado, al igual que con las escuaraínas, la formación de complejos supramoleculares en los que las cavidades son rotaxanos⁶³ o ciclodextrinas⁶⁴.

Este trabajo de tesis se centra en las propiedades fotofísicas de una tricarbocianina, como veremos más adelante. Por lo tanto, dedicaremos especial atención a esta familia de fluoróforos. El heteroátomo en la posición *meso* de la cadena de polimetinos puede ser cloro, lo que da lugar a las clorotricarbocianinas, oxígeno, azufre o nitrógeno (Esquema 1-8).



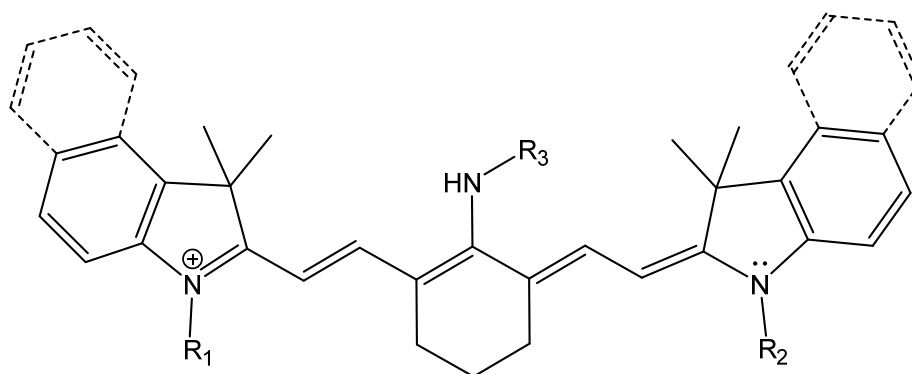
Esquema 1-8. Tricarbocianinas rígidas con distintos sustituyentes en la posición *meso* de la estructura.

(A) Clorotricarbocianina, (B) Oxa, sulfo y amino-tricarbocianinas.

Las clorotricarbocianinas son moléculas precursoras en la síntesis de oxa, sulfo y amino-tricarbocianinas. Cuando en la posición *meso* de la tricarbocianina se tienen átomos de cloro, oxígeno y azufre, se obtienen sondas fluorescentes de NIR con bajos corrimientos de Stokes. Sin embargo, cuando se coloca un sustituyente amino, las propiedades fotofísicas cambian drásticamente. A este punto nos referiremos en el apartado siguiente y también será objeto de estudio del Capítulo 4.

1.6 Propiedades fotofísicas y espectroscópicas de las aminotricarbocianinas

Como veremos en el Capítulo 4 para una aminotricarbocianina particular, colocar una función amino en la posición *meso* de la tricarbocianina en vez de Cl, O y S redunda en un cambio drástico de las propiedades espectroscópicas. En el Esquema 1-9 se muestra la estructura general de las aminotricarbocianinas que estudiaremos.

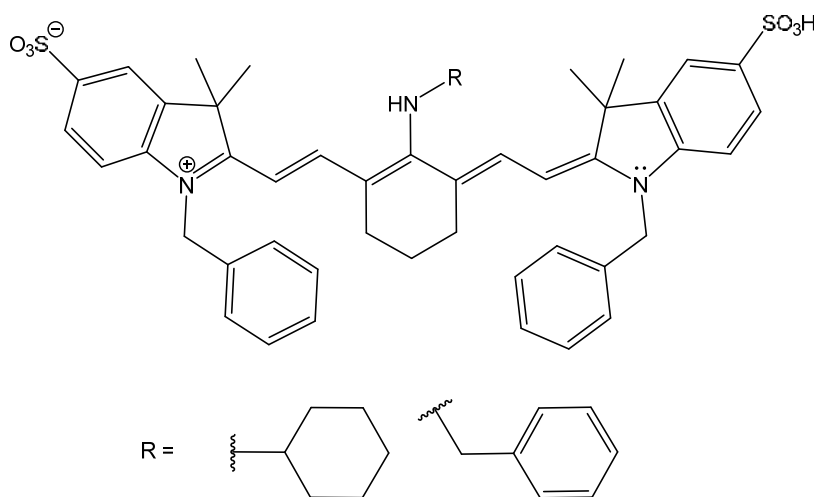


Esquema 1-9. Estructura general de una aminotricarbocianina (heptametincianina). R₁, R₂ y R₃ son grupos alquilo.

1.6.1 Corrimientos de Stokes e ICT

Una de las propiedades más salientes de las tricarbocianinas *N*-sustituidas en la posición *meso*, en comparación con sus precursores clorados, es su alto corrimiento de Stokes (se pasa de ~10 nm a ~100 nm). A lo largo de los años, los investigadores han intentado racionalizar dicho comportamiento especial de las aminotricarbocianinas. Uno de los mecanismos que se han propuesto para explicarlo es el de la Transferencia Intramolecular de Carga (ICT, de sus siglas en inglés *Intramolecular Charge Transfer*). En 1995, Peng *et al.*⁶⁵ reportaron la síntesis y caracterización de aminotricarbocianinas que contenían

un grupo sulfonato como sustituyente en el anillo bencénico del indol (Esquema 1-10).



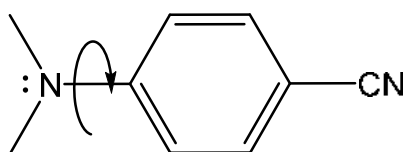
Esquema 1-10. Aminotricarbocianinas estudiadas por Peng *et al.*⁶⁵

En los espectros de los derivados *N*-sustituídos de Peng *et al.* se observaban tres características fundamentales: i) un gran corrimiento de Stokes en comparación con el de precursores clorados, ii) un espectro de fluorescencia ancho y sin estructura vibracional y, iii) que los espectros de absorción y emisión no eran imágenes especulares entre sí. Los autores vincularon este comportamiento con un mecanismo de ICT.⁶⁵

En este punto hagamos un paréntesis para comprender qué implica una ICT. Como sabemos, la excitación de un fluoróforo induce el movimiento de un electrón de un orbital a otro (en el caso de las cianinas se trata de una transición π - π^*). Si ambos orbitales están separados en el espacio, la transición electrónica se ve acompañada por un cambio casi instantáneo del momento dipolar del fluoróforo. Cuando dicha molécula posee a la vez un grupo donante de electrones **D** (ej. $-\text{NH}_2$, $-\text{NMe}_2$, $-\text{CH}_3\text{O}$) conjugado a un grupo aceptor de electrones **A** (ej., $-\text{CN}$), el aumento en el momento dipolar al excitar con luz puede ser muy grande.⁴¹ En consecuencia, el estado excitado (llamado “Estado

de Franck—Condon” o “Estado localmente excitado”, LE) sufre un corrimiento hipsocrómico en el espectro de absorción respecto del precursor clorado y no se halla en equilibrio con el solvente circundante si las moléculas de este último son polares. En un medio suficientemente fluido, las moléculas de solvente rotan durante el tiempo de vida del LE hasta que se llega al equilibrio termodinámico entre la capa de solvatación y el estado excitado del fluoróforo, lo que conduce a un estado más relajado llamado estado de transferencia intramolecular de carga, ICT. En el estado ICT, el grupo **D** de la molécula le ha cedido un electrón al grupo **A** a través del sistema π conjugado. Se establece entonces una transferencia neta de carga. De esta manera se tienen dos estados excitados diferentes, LE e ICT, que pueden ser ambos emisivos. Así, en determinadas condiciones pueden observarse dos bandas en el espectro de emisión de este tipo de compuestos (p. ej. en solventes polares).

Otro aspecto a tener en cuenta es que la relajación hacia un estado ICT puede ir acompañada de una rotación interna en el fluoróforo. Un caso muy estudiado es el del 4-*N,N*-dimetilaminobenzonitrilo (DMABN)⁴¹, cuya estructura se muestra en el Esquema 1-11. En el DMABN el grupo donante de electrones es el dietilamino, mientras que el grupo aceptor es el grupo ciano.



Esquema 1-11. Estructura del dimetilaminobenzonitrilo (DMABN). Se muestra una flecha que simboliza la posible rotación alrededor del enlace N-C que conecta el grupo dimetilamino a la molécula.

A pesar de su simplicidad estructural, el DMABN presenta una doble fluorescencia en disolventes polares. Lippert y colaboradores estudiaron este fenómeno en profundidad.⁶⁶ En su estado basal, la molécula es casi plana, lo que corresponde a la máxima conjugación entre el grupo dimetilamino y el

anillo fenílico. Según el principio de Franck-Condon, el estado localmente excitado LE sigue siendo plano. Sin embargo, la relajación con el solvente tiene lugar conjuntamente con la rotación del grupo dimetilamino hasta colocarse perpendicular al plano de la molécula (estado TICT, *Twisted Intramolecular Charge Transfer*), lo que conlleva una pérdida de la conjugación. En el estado TICT resultante, estabilizado por las moléculas de disolventes polares, existe una separación total de carga entre el grupo dimetilamino y la parte cianofenólica (Figura 1-7).

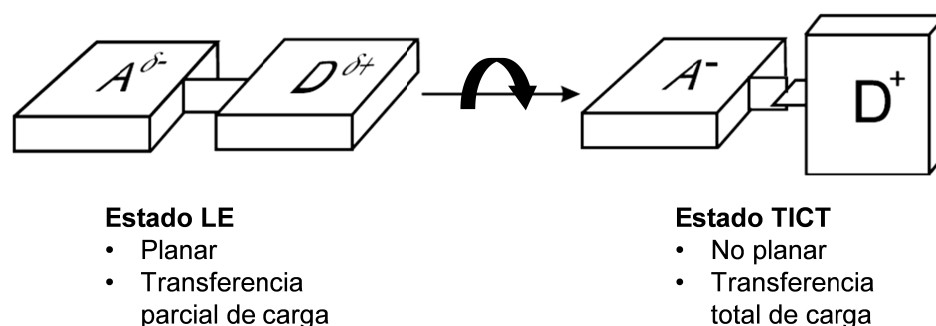


Figura 1-7. Representación de los estados excitados LE y TICT para el DMABN. Adaptado de Ref.⁴¹

En términos de un diagrama de energía potencial, la formación del estado TICT puede representarse como en la Figura 1-8.

Como resultado, en el espectro de emisión puede observarse, además de la banda de fluorescencia debida a la emisión del estado LE (banda "normal"), una banda de emisión correspondiente a la relajación desde el estado TICT a longitudes de onda superiores (banda "anómala"). En THF, un solvente polar que estabiliza la separación de cargas, se observan dos bandas correspondientes a la emisión desde los estados LE y TICT. En hexano, solvente apolar, el estado TICT no se encuentra estabilizado y sólo se observa la "banda normal", es decir, la emisión desde el estado LE.

Además, según Lippert y colaboradores⁶⁶, el supuesto de torsión puede demostrarse comparando la fluorescencia del DMABN en un solvente polar con

la que presenta en solventes en los cuales la torsión está en un caso completamente permitida (sólo se observa la banda TICT) y, en otro caso, completamente impedida (sólo se observa la banda LE).

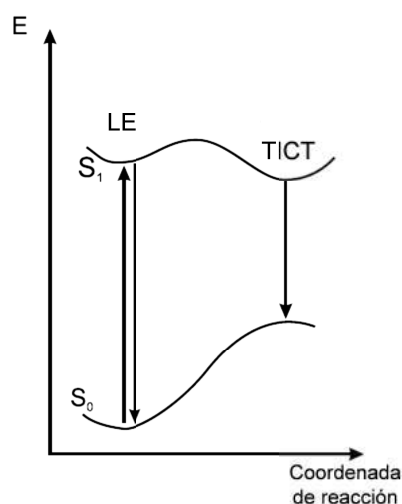
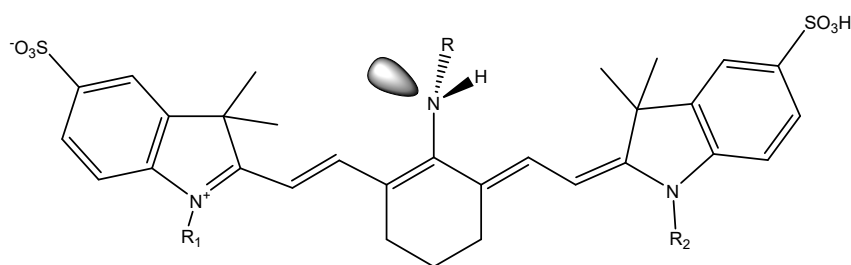


Figura 1-8. Diagrama de energía potencial de DMABN. La coordenada de reacción contiene tanto la relajación por el solvente como la rotación del grupo dimetilamino. Adaptado de Ref.⁴¹

Ahora que ya nos hemos ocupado de qué significa una ICT, veamos cómo se aplica al caso de las tricarbocianinas *N*-sustituidas. Como veremos en el Capítulo 4, los espectros típicos de absorción y emisión de las aminotricarbocianinas no son imágenes especulares entre sí, no existe una relación de simetría entre ellos, los espectros de emisión son anchos y sin estructura vibracional y, por supuesto, los corrimientos de Stokes son altos en comparación con el precursor clorado. De acuerdo a lo que reportan Peng *et al.* este comportamiento es típico de los procesos de tipo ICT.⁶⁵

Más aún, un cambio estructural importante que acompaña a las transferencias intramoleculares de carga (ICT)^{65,67} es que la disposición piramidal de la amina de cabeza de puente en el estado basal se aplanan considerablemente en el estado ICT. Así, luego de la excitación, se forma el estado LE que conserva la geometría piramidal para luego transformarse en un

estado ICT de configuración planar.⁶⁸ En el Esquema 1-12 se muestra una representación de la configuración piramidal de los estados basal y LE de una aminotricarbocianina genérica, estructuralmente similar a la reportada por Peng *et al.*⁶⁵



Esquema 1-12. Geometría piramidal del nitrógeno central de una aminotricarbocianina cuando se halla en el estado basal o en el estado localmente excitado (LE).

En su trabajo, Peng *et al.*⁶⁵ midieron los espectros de fluorescencia de una aminotricarbocianina similar a la del Esquema 1-12 en mezclas de etanol-glicerol. En etanol puro se observó una única banda en el espectro de emisión, alrededor de los 760 nm, asociada al el estado ICT. Cuando se agregaba glicerol, aparecía una banda al azul, a expensas de la banda de 760 nm. En el caso extremo de 100% glicerol, sólo observaron la banda azul de emisión. Cuando se utiliza un solvente de alta viscosidad como el glicerol, la rotación de la molécula se ve impedida, la conformación piramidal de la amina en el estado basal se “congela”, y la única emisión que debe observarse es la del estado LE. Así, en los casos intermedios se observaron las dos bandas, LE e ICT. Con esta evidencia, los autores sugieren que la tasa de transferencia de LE a ICT se reduce en solventes polares viscosos, como el glicerol, y la emisión desde LE es dominante.^{65,69,70} Paralelamente, al cambiar la composición del solvente, los espectros de absorción permanecieron invariantes.⁶⁵

En resumen, en las aminotricarbocianinas el grupo amino se comportaría como un grupo donante de electrones en procesos de ICT. Esa posibilidad que

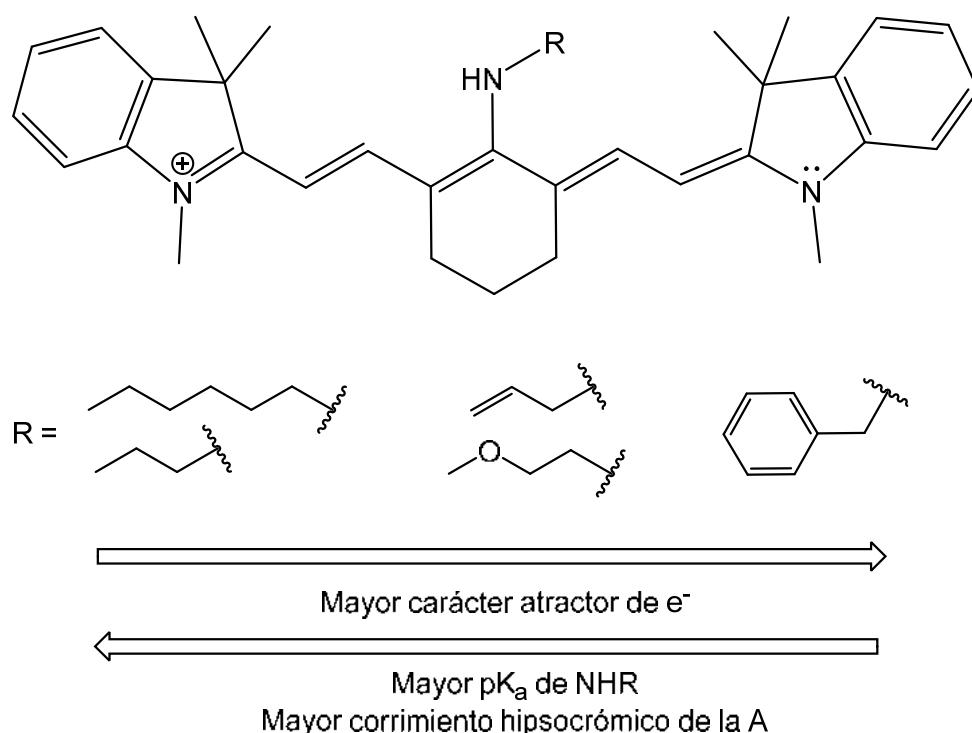
ofrece el grupo amino modificaría las energías de los orbitales de frontera de la molécula, en particular aumentaría la energía del orbital LUMO. Esto haría que se observaran desplazamientos hipsocrómicos del espectro de absorción en relación con los precursores clorados, y un aumento del corrimiento de Stokes. Por otra parte, como veremos luego, si se modula el mecanismo de ICT mediante interacciones adecuadas, puede aprovecharse para construir sensores.⁷¹

1.6.2 Influencia del sustituyente amino

El carácter atractor o donante de electrones de los sustituyentes del átomo de nitrógeno en la posición *meso* de la aminotricarbocianina ejerce una influencia importante en sus propiedades espectroscópicas.

En 2006, Kiyose *et al.* reportaron la síntesis y caracterización fotofísica de derivados aminados de IR-786, con diferentes sustituyentes amino (Esquema 1-13).⁷² En particular, los autores encontraron que la longitud de onda del máximo de absorción está relacionada con la naturaleza del sustituyente amino de la tricarbocianina: si el sustituyente es tal que disminuye la densidad electrónica en el átomo de nitrógeno, entonces disminuye la energía de la transición electrónica y por lo tanto aumenta la longitud de onda del máximo de absorción de la molécula. Tal es así que un sustituyente hexilamino en IR-786 da una molécula con un máximo de absorción a 626 nm, mientras que si el sustituyente es bencilamino, dicho máximo se encuentra a 647 nm; sin embargo, la longitud de onda del máximo de emisión no se ve prácticamente afectada con el cambio de sustituyente.⁷² El resultado mencionado está de acuerdo con la teoría de Khun para fluoróforos basados en cadenas de polimetinos.⁷³ En las heptamentincianinas la densidad electrónica en el átomo de carbono *meso* de la estructura es diferente para los orbitales de frontera: en el HOMO es baja y en el

LUMO es alta. Así, los sustituyentes del átomo de nitrógeno *meso* que sean atractores de electrones estabilizarán al orbital LUMO esencialmente, mientras que no afectarán al orbital HOMO. Esta teoría predice entonces que, con sustituyentes atractores de electrones en el nitrógeno *meso* habrá desplazamientos batocrómicos en el espectro de absorción.



Esquema 1-13. Derivados aminados de IR-786 sintetizados por Kiyose et al. Se indica con flechas la tendencia en la longitud de onda del máximo de absorción en relación al carácter atractor de electrones del sustituyente R del amino y el pK_a de la base libre NHR.

Por otra parte, el pK_a de la amina con la que se sustituye la posición *meso* clorada (NHR) nos da una idea de la disponibilidad de los electrones en el nitrógeno: a mayor pK_a , más básica es la amina y mayor es la disponibilidad de electrones en el nitrógeno, con lo cual el corrimiento hipsocrómico en el máximo de absorción será mayor (y mayor el corrimiento de Stokes). En el Capítulo 4 retomaremos estas ideas.

Todo lo expuesto provee herramientas fundamentales para el diseño de sensores fluorescentes basados en la diferencia de la capacidad donante de electrones del átomo de nitrógeno central cuando está unido o no al analito de interés, un tema del que nos ocuparemos.

1.7 Sensores moleculares fluorescentes

1.7.1 ¿Por qué sensores fluorescentes?

El diseño de sensores fluorescentes resulta de suma importancia debido a la gran demanda en química analítica, bioquímica, medicina, química ambiental, biología molecular, etc. Muchos analitos se pueden detectar mediante técnicas fluorescentes, entre los cuales encontramos cationes (H^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Al^{3+} , Cd^{2+} , etc), aniones (iones haluros, citratos, carboxilatos, fosfatos, ATP, etc), moléculas neutras (azúcares, p. ej. glucosa) o gases (O_2 , CO_2 , NO , etc). Si bien existe una amplia variedad de sensores moleculares fluorescentes, muchos de ellos disponibles comercialmente, aún es necesario desarrollar sensores que mejoren la selectividad y minimicen la perturbación del microentorno estudiado.⁴¹

Ahora bien, ¿por qué elegir un sensor fluorescente? El éxito de los sensores fluorescentes puede explicarse por las distintas ventajas que ofrece la detección de fluorescencia en términos de sensibilidad, selectividad, tiempo de respuesta y observación local (por ejemplo, mediante espectroscopía de imágenes fluorescentes). Asimismo, se han logrado mejoras considerables en la sensibilidad y la resolución espacial y temporal de los instrumentos de medición, lo que constituye un factor clave en el éxito de las técnicas de detección basadas en fluorescencia.

1.7.2 Clases de sensores moleculares fluorescentes de acuerdo a la interacción

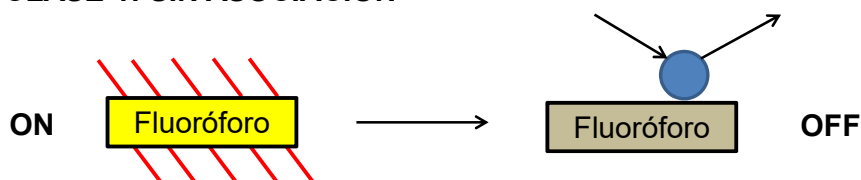
Los procesos de detección con sensores fluorescentes se gestan en interacciones entre especies. Es decir, la especie que se desea detectar (el *analito*) interactúa con la especie diseñada para la detección (el *sensor*). El sensor debe, por una parte, interactuar con el analito en la forma más selectiva posible y reconocerlo y discriminarlo frente a otras especies de estructura y propiedades similares. Para ello los sensores están dotados de un *receptor* o *unidad de reconocimiento*, que es la parte de la molécula responsable de la interacción. Asimismo, el sensor debe ser capaz de convertir la interacción en una señal susceptible de ser reportada, es decir, debe actuar como un transductor. La estructura responsable de la transducción se conoce como *reportero* y, en el caso de los sensores fluorescentes, es el fluoróforo mismo. La señal que se detecta se corresponde con un cambio en alguna de las propiedades fotofísicas del fluoróforo (por ejemplo, Φ_F o τ_F).

En la Figura 1-9 se presenta una representación simplificada de las tres clases de sensores fluorescentes desde el punto de vista de la interacción.

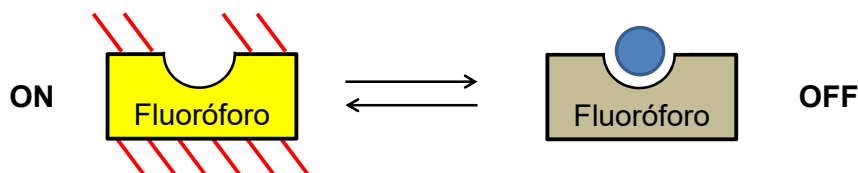
La *Clase 1* está compuesta de sensores en los que no hay asociación entre el fluoróforo y el analito: sólo ocurre apagamiento por colisión (ej. O_2 , Cl^-). Los sensores de *Clase 2* se unen reversiblemente al analito. La unión trae aparejado que el fluoróforo se “apague” (disminución de la fluorescencia por complejación, DFC, caso que se muestra en la Figura 1-9) o se “prenda” (aumento de la fluorescencia por complejación, AFC). Los sensores de pH que abordaremos en esta tesis son un caso particular de sensor de *Clase 2*. La *Clase 3* comprende a fluoróforos unidos (vía espaciador como el caso presentado en la Figura 1-9, o sin espaciador) a un receptor que es el encargado de unirse reversiblemente al analito. La unión del analito perturba la fotofísica normal del

fluoróforo o su interacción con el receptor mediante procesos de transferencia de energía, transferencia de electrones, transferencia de carga, etc. En el caso de que el analito sea un ion, el receptor se llama *ionóforo* y el sensor completo es un *fluoroionóforo*.

CLASE 1: SIN ASOCIACIÓN



CLASE 2: FLUORÓFOROS COMPLEJANTES



CLASE 3: FLUORÓFOROS UNIDOS A UN RECEPTOR

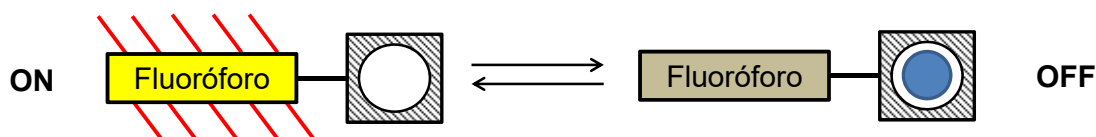


Figura 1-9. Clases principales de sensores para iones o moléculas pequeñas. El círculo azul representa al analito. En los sensores de Clase 3 se presenta el caso de fluoróforos unidos al receptor mediante un grupo espaciador.

1.7.3 Sensores moleculares fluorescentes de pH

Sabemos que el pH se define en función de la actividad de H^+ en el medio. Los métodos ópticos (espectrofotometría y espectrofluorometría) no miden directamente la actividad, sino que se basan en la determinación óptica de las concentraciones de las formas ácida **A** y básica **B** de una especie que

experimenta un equilibrio ácido-base. La constante termodinámica del equilibrio ácido-base se expresa en la Ecuación (6).

$$K = \frac{a_{H^+} \cdot a_B}{a_A} \quad (6)$$

Si se tiene en cuenta que las actividades se pueden expresar como un producto de la concentración por un factor (o coeficiente) de actividad (f), a partir de la Ecuación (6) se puede derivar la Ecuación (7).

$$pH = pK + \log \frac{(B)}{(A)} + \log \frac{f_B}{f_A} \quad (7)$$

Así, el pK_a del fluoróforo se puede definir como en la Ecuación (8) y depende de los coeficientes de actividad de las especies ácida y básica que tienden a 1 en soluciones muy diluidas (estado de referencia: soluto a dilución infinita).

$$pK_a = pK + \log \frac{f_B}{f_A} \quad (8)$$

K_a representa así una constante “aparente” o “efectiva” que no sólo depende de la temperatura sino también de los factores que pueden modificar los coeficientes de actividad (f) como la fuerza iónica, las interacciones específicas del indicador fluorescente con el medio circundante (los componentes del *buffer*, la cercanía a superficies) y los cambios estructurales del medio (en microemulsiones por ejemplo).

La Ecuación (7) puede reescribirse considerando la Ecuación (8) y teniendo en cuenta que en titulaciones fluorométricas se mide la intensidad de

emisión total $I = a \cdot (A) + b \cdot (B)$, que es función de la longitud de onda de excitación y de emisión. Asimismo, a y b son proporcionales a los coeficientes de absortividad molar (a la longitud de onda de excitación) y a los rendimientos cuánticos de fluorescencia de **A** y **B** (Φ_A y Φ_B). Así, se obtiene la Ecuación (9) que es la expresión de la Ecuación de Henderson-Hasselbach para titulaciones fluorométricas.

$$pH = pK_a + \log \frac{I - I_A}{I_B - I} \quad (9)$$

Para más detalles sobre la deducción matemática de las ecuaciones de esta Sección se puede consultar el libro de B.Valeur *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*.⁴¹

1.7.4 Sensores fluorescentes autoreferenciados

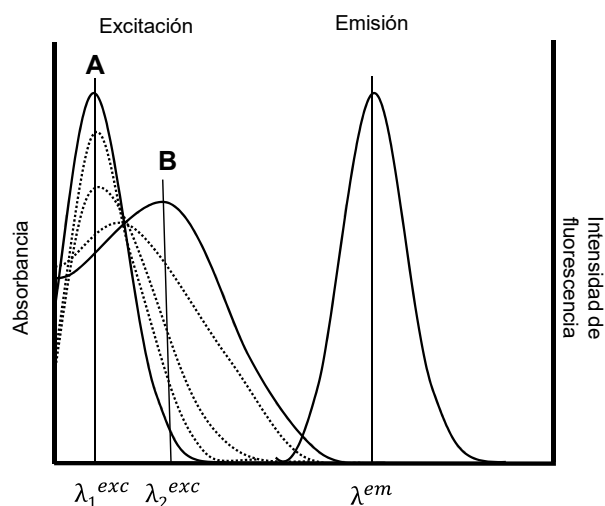
Un sensor fluorescente puede cambiar su señal (intensidad) de emisión en presencia del analito y esta propiedad utilizarse para medir la evolución de alguna propiedad de interés del sistema (por ejemplo, el pH). Este tipo de detección requerirá de una curva de calibración previa a la medición de la muestra incógnita. Sin embargo, en entornos complejos (como los sistemas biológicos) muchas veces es necesario disponer de otro tipo de sensores con los que se pueda medir el cociente de las intensidades de emisión a dos longitudes de onda. En inglés este tipo de sensores se denominan *rationetric sensors* y no existe una traducción literal al español. El término que más se acerca a la idea de estos sensores es “autoreferenciados”, por lo que los llamaremos así.

La importancia de los sensores autoreferenciados radica en que la relación (cociente) de las intensidades de fluorescencia a dos longitudes de

onda es independiente de la concentración total del colorante, el fotoblanqueo, las fluctuaciones de la intensidad de la fuente de iluminación, la sensibilidad del instrumento, etc.

Existen esencialmente tres métodos para generar medidas autoreferenciadas en el caso de utilizar una única sonda fluorescente. Los dos primeros casos se conocen como medidas de tipo “2- λ ” (*Caso I* y *Caso II*) y se esquematizan en la Figura 1-10.

Caso I. Dos excitaciones y una emisión



Caso II. Una excitación y dos emisiones

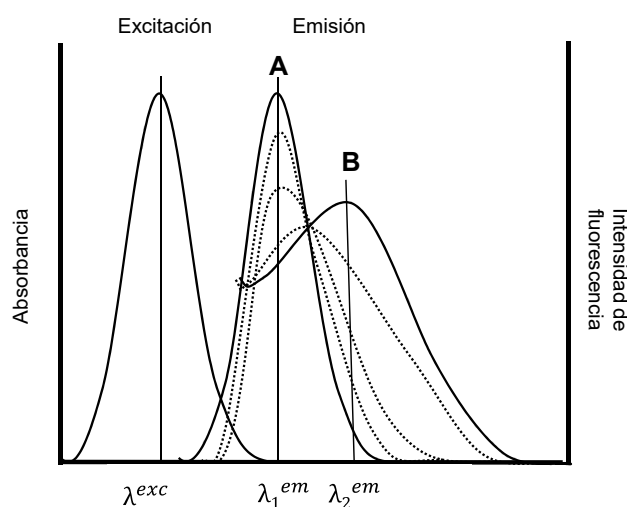


Figura 1-10. Sensores moleculares autoreferenciados. Se tienen dos especies A y B que representan la forma unida y la forma no unida al analito.

El *Caso I* (dos excitaciones y una emisión) ocurre cuando el fluoróforo tiene un espectro de absorción para cada una de las especies. Si se trata de un sensor de pH, las dos especies serían la forma ácida **A** y la forma básica **B**. Así, se calcula el cociente de las emisiones a una longitud de onda fija para las excitaciones a cada una de las longitudes de onda de máxima absorción de **A** y **B**. El *Caso II* (una excitación y dos emisiones) se corresponde con fluoróforos que tienen espectros de emisión diferentes para la forma ácida y la forma básica. Estos fluoróforos son los de preferencia en técnicas de microscopía de fluorescencia y citometría de flujo porque la mayoría de los equipos pueden coleccionar dos longitudes de onda de emisión simultáneamente.

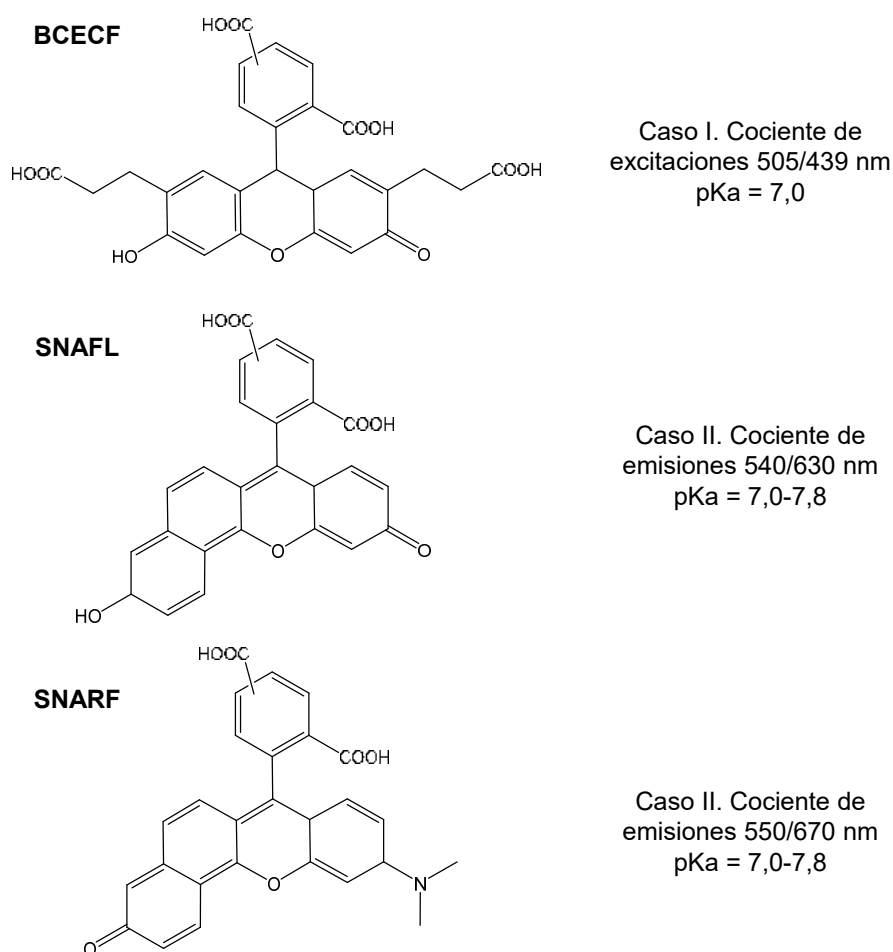
Por último, se tiene el *Caso III* (dos longitudes de excitación y dos longitudes de emisión), que se vincula a sensores moleculares fluorescentes que tienen un espectro de absorción y un espectro de emisión para cada una de las especies **A** y **B**. En total se tendrían cuatro espectros y existen tres cocientes de intensidades posibles para calcular, pero en general se calcula la proporción de las emisiones a las longitudes de onda de excitación dadas por los máximos de absorción de **A** y **B**. La principal ventaja de este método es que las intensidades de emisión son mucho mayores porque tanto la forma ácida como la básica se excitan cerca de sus máximos de absorción, lo que resulta en una emisión más fuerte de ambas especies. Sin embargo, resulta más difícil realizar este tipo de medidas en técnicas como las microscopías de fluorescencia.

La expresión para la ecuación de Henderson-Hasselbach cuando se tienen sensores autoreferenciados es la que se muestra en la Ecuación (10).

$$pH = pK_a + \log \frac{R - R_A}{R_B - R} + \log \frac{I_A(\lambda_2)}{I_B(\lambda_2)} \quad (10)$$

R es el cociente $I(\lambda_1)/I(\lambda_2)$ de intensidades de fluorescencia a dos longitudes de onda de excitación λ_1 y λ_2 (o a dos longitudes de onda de emisión). R_A y R_B son los valores de R cuando sólo está presente la forma ácida y la forma básica, respectivamente. Tanto R como R_A y R_B son muy sensibles a las longitudes de onda elegidas y al arreglo instrumental.

En lo que respecta al pH, existen varios indicadores comerciales que permiten medidas autoreferenciadas (Esquema 1-14). Los que más se utilizan en medidas de microscopía confocal para aplicaciones biológicas son, además de la fluoresceína, los BCECF (2',7'-bis (carboxietil)-5(o 6)-carboxifluoresceína), los de la familia SNAFL (semi-naftofluoreceína) y los de la familia SNARF (semi-naftorodafluor).



Esquema 1-14. Fluoróforos autoreferenciados de pH disponibles comercialmente. Los pKa se han tomado de la Ref.⁴¹

1.8 Sensores moleculares basados en cianinas

Las cianinas son fluoróforos muy usados para construir sensores. A partir del trabajo de Peng *et al.*⁶⁵, las aminotricarbocianinas cobraron relevancia tanto para marcación, como para detección pues tienen la propiedad saliente de presentar un gran corrimiento de Stokes.

En este apartado, veremos los principales mecanismos por los cuales operan los sensores fluorescentes basados en cianinas. Existen esencialmente tres mecanismos clásicos: PET (transferencia electrónica fotoinducida), ICT (transferencia intramolecular de carga) y FRET (transferencia de energía por resonancia de Förster). Se expondrán ejemplos reportados de sensores de pH basados en aminotricarbocianinas que operan por cada uno de los mecanismos.

1.8.1 Sensores basados en PET

PET es uno de los mecanismos más importantes por los que operan los sensores basados en cianinas. En general, los sensores de cianinas para PET son de *Clase 3* (Sección 1.7.2), es decir, con la molécula unida a un receptor (sitio de reconocimiento) mediante un grupo espaciador. Los sitios de reconocimiento con diferentes potenciales de reducción pueden actuar como donantes o aceptores de electrones.^{74,75} Cuando el potencial de oxidación del sitio de reconocimiento es menor que el de la cianina, la transferencia electrónica ocurre desde el receptor hacia la cianina, lo que resulta en un apagamiento de la fluorescencia.⁷⁶ Este proceso se llama “a-PET” porque la cianina se comporta como aceptor de electrones (Figura 1-11). Por el contrario, si el estado excitado del fluoróforo puede donar electrones al orbital LUMO del sitio de reconocimiento ocurre el apagamiento de la fluorescencia de la cianina. En este

último caso el mecanismo se conoce como “**d**-PET” pues la cianina se comporta como donante de electrones (Figura 1-12).

Si el sensor opera por **a**-PET y el analito que interactúa con el sitio de reconocimiento bloquea la transferencia electrónica, el modo de detección se conoce como PET “ON-OFF” (el ON y el OFF se refieren al mecanismo de PET). Así, la presencia del analito hace que la sonda recupere su fluorescencia, se “prenda”. Por el contrario, la reacción inversa de liberación del analito generaría una respuesta de tipo PET “OFF-ON”, lo que se detectaría como un apagamiento de la fluorescencia de la sonda.

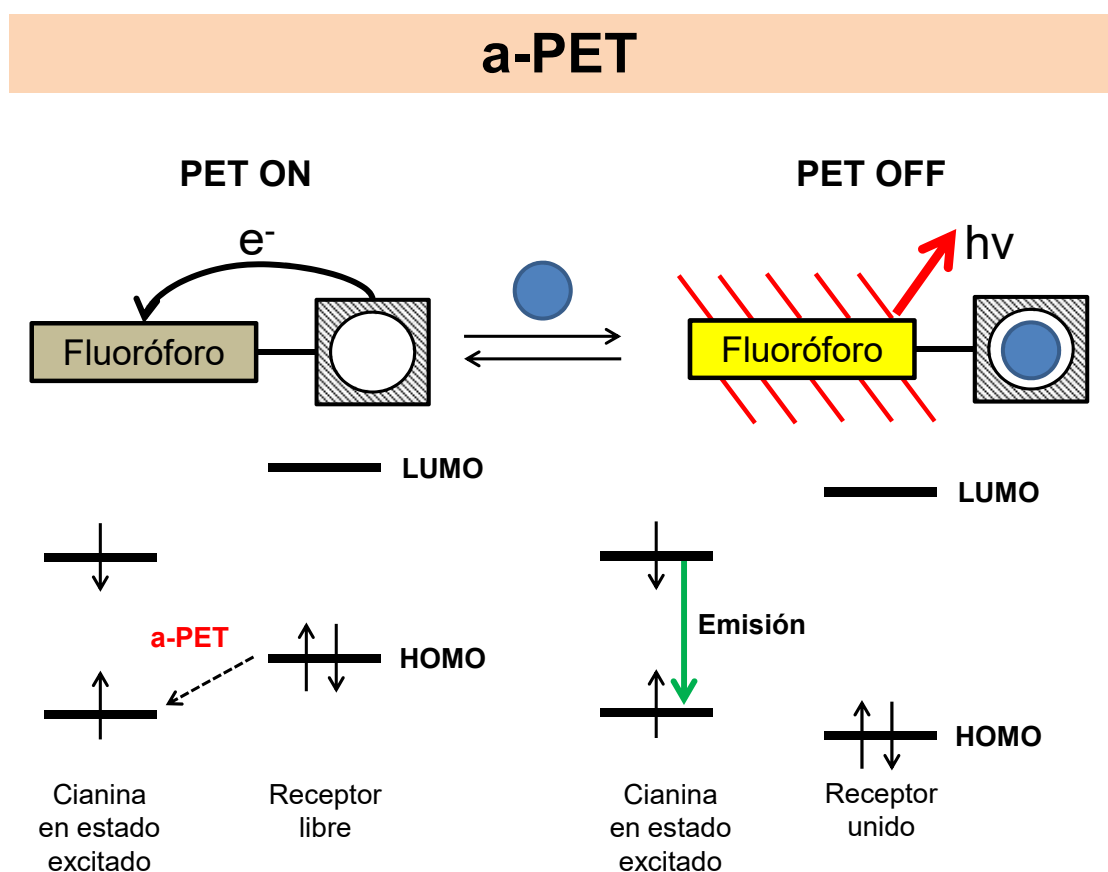


Figura 1-11. Representación de un mecanismo de tipo **a**-PET. El fluoróforo se comporta como aceptor de electrones y el receptor como donante de electrones.

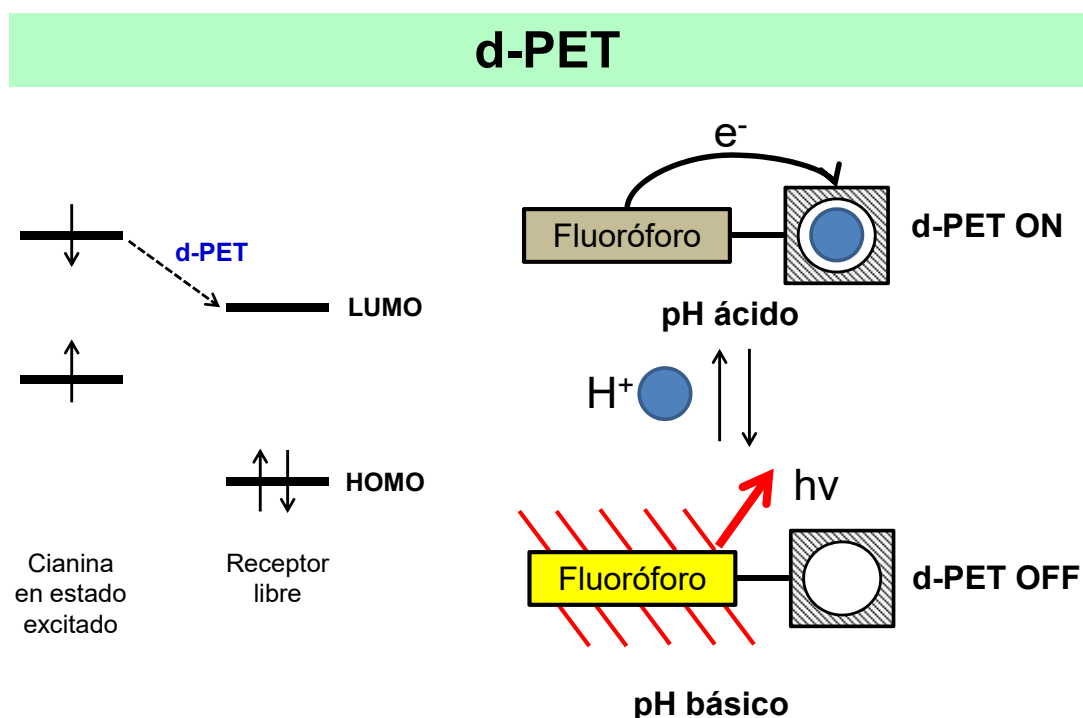
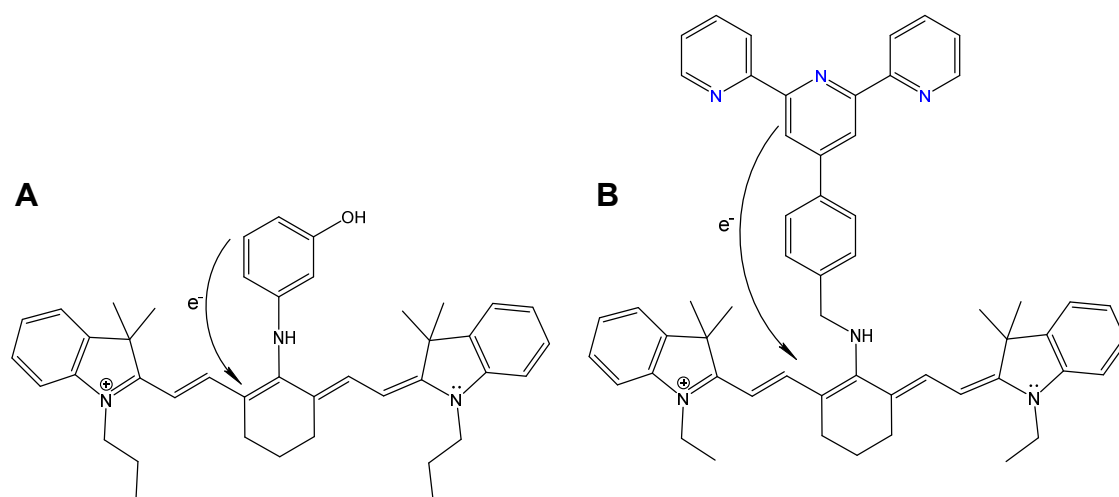


Figura 1-12. Representación de un mecanismo de tipo d-PET para un sensor de pH. El fluoróforo se comporta como donante de electrones mientras que el receptor es el aceptor de electrones.

Existen muchos ejemplos de sensores moleculares fluorescentes de cationes metálicos basados en a-PET.⁷⁷⁻⁷⁹ Sin embargo, vamos a centrar nuestra atención en los sensores de pH que operan vía a-PET y fueron contruidos a partir de aminotricarbocianinas. En 2007, Tang *et al.* reportaron un sensor dual en el cual un grupo aminofenol modulaba la emisión (Esquema 1-15 A).⁸⁰ Con el enfoque de dos longitudes de onda de excitación y dos longitudes de onda de emisión, el sensor respondía a la concentración de H^+ en dos rangos de pH: 4,0-6,5 (λ_{exc} 558 nm, λ_{em} 615 nm) y 10,5-11,8 (λ_{exc} 468 nm, λ_{em} 517 nm). Por otra parte, se tiene el sensor de NIR de Tang *et al.*, contruido a partir de Cy7 y un receptor derivado de la terpiridina (Esquema 1-15 B).⁸¹

Por otro lado, debemos destacar que si bien la absorción y emisión de luz en el NIR es ventajosa para técnicas de detección *in vivo*, la modulación de la emisión por un mecanismo de tipo PET se hace difícil ya que la energía $S_0 \rightarrow S_1$ es muy pequeña para este tipo de fluoróforos, entre los cuales tenemos a las

aminotricarbocianinas. De acuerdo a la ecuación de Rehm-Weller, se puede predecir el ΔG_{PET} , que está determinado en gran parte por la energía de la transición $S_0 \rightarrow S_1$ ΔE_{00} . El hecho de que ΔE_{00} sea tan pequeño para tricarbocianinas en comparación otros fluoróforos resulta una desventaja para controlar su fluorescencia por PET.⁸²



Esquema 1-15. Sensores de pH por α -PET. (A) Ref.⁸⁰ y (B) Ref.⁸¹

1.8.2 Sensores basados en ICT

Como mencionamos en la Sección 1.6.1, el mecanismo de ICT justificaría el gran corrimiento de Stokes en las aminotricarbocianinas. La posibilidad de modular el mecanismo de ICT ofrece otro mecanismo de detección de analitos con cianinas. Si la sonda opera por este mecanismo, siempre se obtienen respuestas autoreferenciadas (*ratiometric*) que permiten la corrección de las interferencias del microambiente. En un arreglo de tipo aminotricarbocianina, dichas respuestas usualmente se obtienen cuando, en presencia del analito, se modifica la capacidad donante de electrones del sustituyente en la posición *meso* de la molécula. Así, la modulación de la capacidad donante de e^- del N con

el analito genera un corrimiento en la posición del máximo de absorción o de emisión.

El aporte más relevante en sensores de pH basados en aminotricarbocianinas fue el realizado por el grupo de Nagano.⁷¹ En su trabajo de 2011 reportaron el diseño racional de sondas de pH basadas en tricarbocianinas *N*-sustituidas con diferentes piperazinas y etilendiaminas.⁸³ Así, obtuvieron sensores moleculares fluorescentes y autoreferenciados (*Caso I*: dos excitaciones y una emisión, ver Sección 1.7.4) que operaban por ICT. La hipótesis que expusieron los autores fue la siguiente: cuando se tiene una estructura de tipo diamina unida al núcleo de la cianina, en condiciones ácidas el H⁺ puede deslocalizar su carga entre los dos nitrógenos, y se obtiene una estructura supramolecular estable, y reversible.

En la Figura 1-13 se muestra la estructura de uno de los sensores de pH que reportan Myochin *et al.* Cuando la molécula se protona disminuye la capacidad donante de electrones de la *N*-metilpiperazina, eso disminuye la energía del orbital LUMO de la molécula y experimentalmente este hecho se observa como un corrimiento batocrómico en el espectro de absorción. Así, la detección de la emisión se realiza a 780 nm y se excita a 750 y 670 nm (cociente $I_{780 \text{ (Exc. 750 nm)}} / I_{780 \text{ (Exc. 670 nm)}}$).

Uno de los conocimientos más relevantes que aporta el trabajo mencionado es la posibilidad de predecir el pK_a del sensor a partir del pK_a calculado de la amina con la que se construye el derivado aminotricarbocianina. Existe una muy buena correlación entre el pK_a calculado de la amina libre y el pK_a experimental de la aminotricarbocianina derivada, de manera que los primeros resultan aproximadamente una unidad superiores al pK_a experimental de la cianina.⁸³

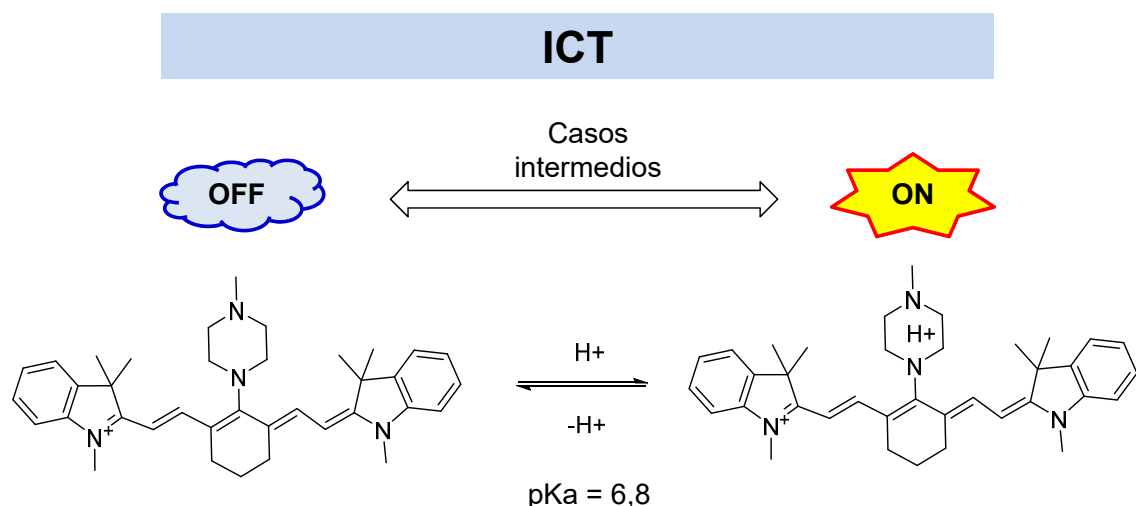


Figura 1-13. Representación del sensor molecular de Myochin *et al.* derivado de N-metilpiperazina.

Las medidas se realizaron en una mezcla de buffer PBS-DMSO 90-10 % *v/v* por cuestiones de solubilidad.

Cabe mencionar que existe controversia en cuanto a la influencia de la concentración de H^+ y de otros cationes en las propiedades fotofísicas de las aminotricarbocianinas. Ya mencionamos el trabajo de Peng *et al.*, que fue un trabajo pionero en proponer la ICT como un mecanismo plausible para justificar el gran corrimiento de Stokes que se observa en las aminotricarbocianinas en comparación con los precursores clorados (Sección 1.6.1).⁶⁵ En dicho trabajo, los autores además estudiaron la influencia del pH en el espectro de absorción. Al disminuir el pH observaron que en el espectro de absorción aparecía una nueva banda a 490 nm (corrimiento hipsocrómico) a expensas de la banda principal a 600 nm (asociada a un estado ICT). Contrariamente a los resultados de Peng *et al.*⁶⁵, Zhu *et al.* reportan un sensor molecular de Hg(II) que, en presencia del analito, desarrolla una nueva banda roja de absorción (desplazamiento batocrómico).⁸⁴ La formación de la estructura supramolecular con Hg(II) reduce la capacidad donante de electrones del nitrógeno de la posición *meso*, reprimiendo la ICT que justificaba el gran corrimiento de Stokes que presentaba la aminotricarbocianina no complejada. En línea con este resultado, Descalzo y

Rurack aportan ejemplos a partir de los que concluyen que la reducción de la capacidad donante de electrones del N en la posición *meso* que puede ocurrir por complejación o por protonación debe dar lugar a desplazamientos batocrómicos del espectro de absorción.⁸⁵ Más aún, a partir del análisis de los espectros de absorción y emisión de su aminotricarbocianina concluyen que, a medida que se acidifica el medio, primero se protona el nitrógeno *meso* de forma reversible (desplazamiento batocrómico en la absorción) y luego se protonan los carbonos metínicos que flanquean la estructura polimetínica, generando una estructura hemicianina que se evidencia como una banda de absorción en el azul (desplazamiento hipsocrómico). Esto último paso es irreversible y ocurre a pHs muy ácidos (alrededor de 1).⁸⁵

En resumen, a partir de todos los antecedentes presentados podemos concluir que las aminotricarbocianinas derivadas de diaminas serán sensores de pH reversibles que pueden operar por ICT y cuyo pK_a puede ajustarse a partir del pK_a de la diamina. En este tipo de sensores cabría esperar un desplazamiento batocrómico del espectro de absorción al acidificar.

Por último, y como ya dijimos en la Sección 1.8.1, las tricarbocianinas tienen un valor muy bajo de ΔE_{00} en la ecuación de Rehm-Weller, lo que dificulta la supresión de la fluorescencia por PET.⁸² En estos casos, las señales de fluorescencia del ambiente (señales de fondo o *background*) cobran relevancia y constituyen una complicación. Por el contrario, los sensores aminotricarbocianina basados en ICT ofrecen respuestas autoreferenciadas, más fiables para la detección cuantitativa. Así, ICT es una herramienta prometedora para el diseño de sensores basados en aminotricarbocianinas.

1.8.3 Sensores basados en FRET

La transferencia de energía por resonancia de Förster (*Förster Resonance Energy Transfer*, FRET) es un proceso que involucra una transferencia de energía no radiativa desde una especie fotoexcitada (donante) hacia otra especie (aceptora) ubicada en las cercanías de la primera y que, a su vez, puede relajarse hacia su estado basal con emisión de radiación. La emisión del aceptor producto del proceso FRET se conoce como “emisión sensibilizada”. Un requerimiento para que ocurra FRET es que el espectro de emisión del donante se superponga, al menos en parte con el espectro de absorción del aceptor, como se muestra en la Figura 1-14.

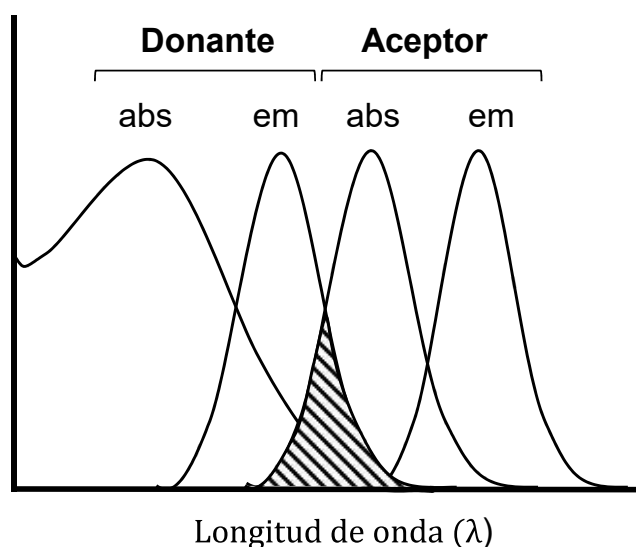


Figura 1-14. Ilustración del solapamiento espectral entre la emisión del donante y la absorción del aceptor.

Se han utilizado numerosos donantes para FRET, pero sólo citaremos un ejemplo que utiliza nanocristales semiconductores (*Quantum Dots*, del inglés; QD), un tipo de material que ha sido adaptado muy favorablemente para la construcción de sensores ópticos.⁸⁶ La absorción y la fluorescencia de los QD es dependiente del tamaño y de la forma de las partículas. Además, poseen las siguientes características químicas y fotofísicas: 1) se pueden preparar fácilmente, son monodispersos en tamaño y se pueden suspender en agua de

acuerdo al recubrimiento, 2) su superficie se puede funcionalizar de acuerdo al requerimiento del sistema, 3) tienen grandes corrimientos de Stokes, altos rendimientos cuánticos de fluorescencia y una extraordinaria fotoestabilidad. Algunos de los sensores basados en QD que utilizan el mecanismo de FRET han sido aplicados en sistemas biológicos. Uno de los ejemplos más relevantes es el trabajo de Tang *et al.* en el que combinaron CdTeSe/ZnS QDs con una molécula sensora de pH derivada de Cy7 y obtuvieron un nanosensor fluorescente por tiempo de vida.⁸⁷ Dicho sensor (Figura 1-15) fue capaz de monitorear pHs entre 2,0 (12 ns) y 10,0 (29 ns).

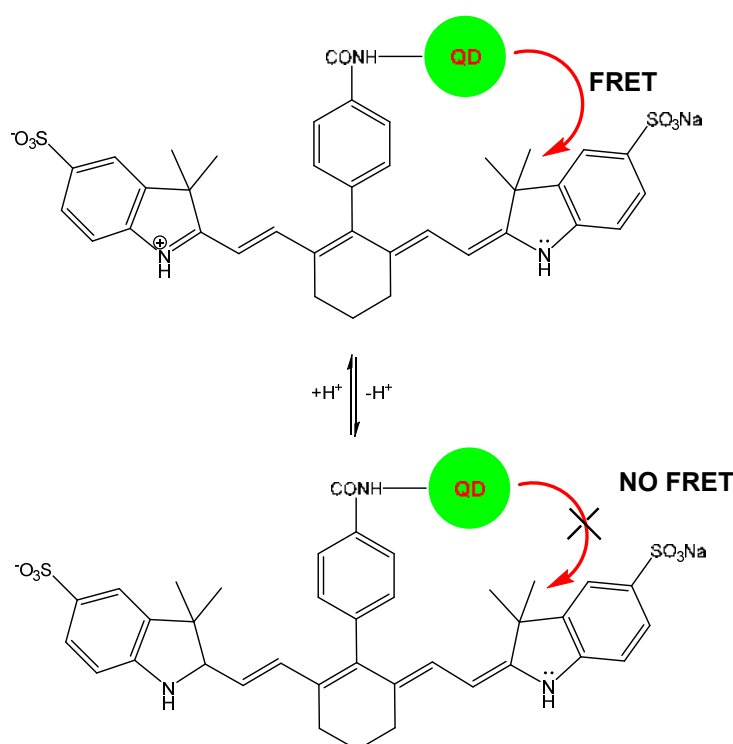


Figura 1-15. Nanosensor de pH reportado por Tang y Achilefu.⁸⁷

1.9 Nanosensores fluorescentes de SiO₂

El desarrollo de sensores sobre soportes de sílice es uno de los campos de la química de materiales que más se ha desarrollado en los últimos años. Una

búsqueda en *Scopus* con las palabras claves “silica”, “sensor” y “fluorescence” al mes de febrero de 2018 arrojó los resultados de la Figura 1-16. Se observa que el número de trabajos presenta un crecimiento sostenido desde los años noventa en adelante, y aún continúa en desarrollo.

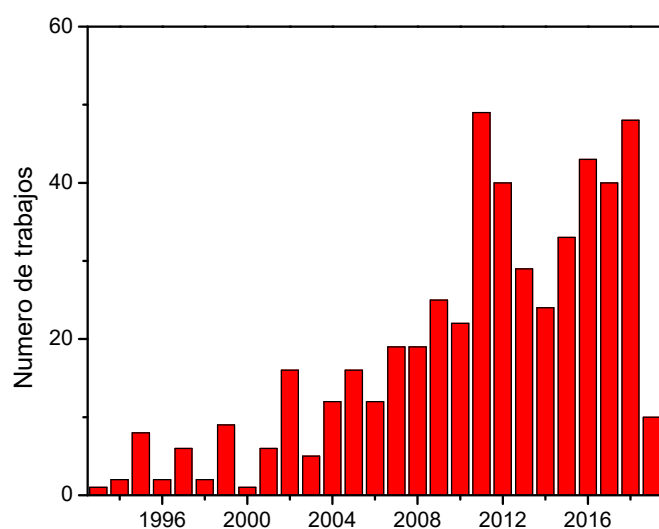


Figura 1-16. Evolución de la producción científica en el período 1993-2019 que da el buscador Scopus con las palabras claves “sensor”, “silica” y “fluorescence”.

Como ya explicamos en la Sección 1.2, la sílice presenta grandes ventajas como soporte de fluoróforos para el desarrollo de SiO₂-F NP pues, entre otras razones, en muchos casos mejora la luminiscencia y la fotoestabilidad de las sondas.⁸⁸

En la Sección 1.7.4 expusimos la importancia de los sensores moleculares autoreferenciados (*ratiometric*). Estos métodos permiten la eliminación de interferencias e independizarse de las concentraciones de la sonda, lo que conducen a una mayor robustez y fiabilidad de las medidas. Además, con las medidas referenciadas se pueden evitar los extensos procesos de calibración que acompañan a cada experimento, aspecto especialmente importante si se quieren estudiar sistemas biológicos (ej. células). Para construir nanosensores autoreferenciados soportados en materiales una opción es unir a la superficie

sensores moleculares autoreferenciados de enfoque “2- λ ” (*Caso I* (una excitación y dos emisiones) y *Caso II* (dos excitaciones y una emisión), Sección 1.7.4).⁸⁹ En otros casos, se pueden incluir dos sondas fluorescentes en el nano-objeto, una de las cuales no debe cambiar su emisión con la propiedad que se quiere medir. Esta sonda se llama “sonda de referencia” y, para que la medida sea autoreferenciada, tanto la sonda de referencia como la sonda que es sensible a la propiedad a medir deben poder excitarse a la misma longitud de onda o emitir luz a la misma longitud de onda. A este tipo de nanosensores los incluiremos dentro del *Grupo c* (enfoque “2- λ ” con dos sondas, una de ellas de referencia). Por último, los nanosensores con dos sondas, una de ellas de referencia y la otra sensora, que se excitan y emiten a dos longitudes de onda diferentes se llamarán “sondas duales” y constituirán el *Grupo d* de nanosensores que no pueden considerarse autoreferenciados con fines prácticos.

Existen algunos ejemplos reportados de nanosensores autoreferenciados de pH a base de SiO₂ con dos sondas fluorescentes. En particular, en 2006 Burns *et al.* reportaron la síntesis y caracterización de NP de sílice de tipo núcleo-cáscara, en las que la sonda de referencia (TRITC, tetrametilrodamina) se incluía en núcleo y FITC (fluoresceína isotiocianato) se unía a la superficie para detectar el pH del entorno.⁹⁰ Por su parte, en 2007 Peng *et al.* reportaron un SiO₂-F NP que encapsulaban [Ru(bpy)₃]²⁺ como sonda de referencia y FITC como sonda sensible al pH.⁹¹ En ambos antecedentes los nanosensores se aplicaron con éxito para monitorear el pH intracelular en diferentes líneas celulares. Sin embargo, todas las moléculas fluorescentes utilizadas son sondas que absorben y emiten luz en la región visible del espectro electromagnético. En el Capítulo 7 abordaremos la construcción de nanosensores autoreferenciados de pH a base de sílice en la zona del NIR del espectro electromagnético. Dado que la región del NIR se puede considerar como una “ventana biológica” de trabajo, el desarrollo de este tipo de nanosensores resulta más que relevante.

1.10 Terapia fotodinámica

1.10.1 Generalidades

Tal como dijimos en la Sección 1.1, la terapia fotodinámica (PDT) se ha popularizado como una opción viable en el tratamiento del cáncer. El principio de la PDT consiste en que al irradiar con luz a una molécula, el llamado fotosensibilizador (PS), se pueden generar especies moleculares citotóxicas derivadas del oxígeno.² Estas especies reactivas de oxígeno (ROS) dañan las organelas y las membranas de las células, lo que puede provocar la muerte celular (por apoptosis, necrosis o autofagia). Los PS (ej. rosa de bengala, azul de metileno) son moléculas que poseen un alto rendimiento cuántico de formación de estado triplete y desde allí son capaces de transferir la energía que han absorbido de la luz a moléculas de oxígeno del medio para producir oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) (PS Tipo II) o experimentar una reacción de transferencia electrónica con moléculas circundantes para formar radicales libres, que luego pueden reaccionar con oxígeno molecular y producir radicales superóxido, peróxido de hidrógeno e hidroxilo (PS Tipo I).⁹² En la Figura 1-17 se muestra el diagrama de orbitales para un PS.

El éxito de la PDT depende en gran medida de la eficiencia con la que los PS logren producir $^1\text{O}_2$ (Φ_Δ) y de su capacidad para ser administrados selectivamente en el tejido tumoral a las concentraciones terapéuticas.⁹³ Como las ROS tienen un tiempo de vida muy corto ($< 3,5 \mu\text{seg}$) y pueden difundir distancias de alrededor de 10-20 nm, el daño que pueden provocar está en general limitado a la zona en la que se acumulan las moléculas del PS (mayormente mitocondrias y retículo endoplasmático).^{92,94} La mayoría de los PS absorben luz en la región visible del espectro electromagnético, lo que limita la

terapia a tratar lesiones superficiales (la luz visible penetra sólo unos pocos milímetros en los tejidos).

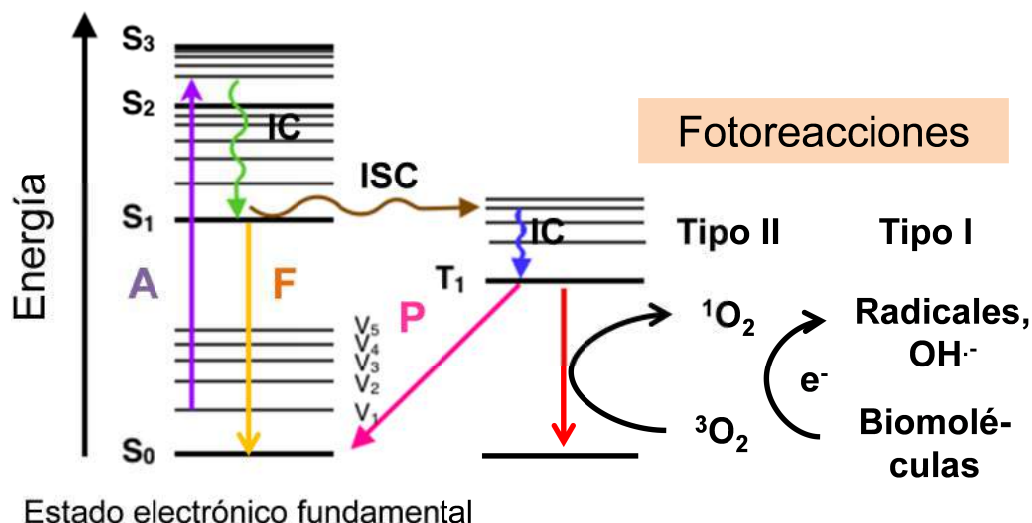


Figura 1-17. Diagrama de orbitales para un PS. El PS en estado triplete excitado puede reaccionar con oxígeno molecular o con biomoléculas.

Las NP que se utilizan en PDT (liposomas, de polímeros, de materiales cerámicos o NP metálicas) pueden clasificarse en dos grupos: A) NP “pasivas”, que transportan PS para producir estrés oxidativo en los tejidos y, B) NP “activas”, que no llevan un PS sino que ellas mismas pueden generar ROS.

En cuanto a las NP “pasivas” (Figura 1-18), se ha demostrado que tienen una mayor fotoactividad que los PS libres. Además, las NP más pequeñas presentan un mayor efecto fototóxico en comparación con las NP más grandes debido a su mayor tasa de absorción intracelular por endocitosis, lo que resulta en la liberación de las moléculas de PS dentro del citosol y no en el entorno extracelular. Asimismo, cuanto menor es el tamaño de las NP, mayor es la relación superficie/volumen, lo que en muchos casos aumenta la tasa de liberación del PS.²

Existen muchas arquitecturas posibles de NP para PDT. Una de ellas consiste en incluir en el mismo objeto un colorante con capacidad donante para

FRET y el fluoróforo PS, que actuaría como aceptor en FRET. Este enfoque de co-encapsulación, posible en el caso de tener un soporte nanoparticulado, permitiría la transferencia eficiente de energía entre el colorante y el PS. Para que el proceso sea eficiente es necesario que la cantidad inmovilizada (carga) del colorante donante sea mucho mayor que la cantidad de PS. Dado que las NP funcionalizadas de SiO₂ permiten lograr una carga diferencial de moléculas a la vez que son biocompatibles y relativamente porosas para permitir que el O₂ llegue a encontrarse con las moléculas de PS, resultan una plataforma excelente para PDT. Un ejemplo es trabajo de Kim *et al.*, quienes co-encapsularon una sonda fluorescente que presenta absorción de dos fotones, forma nano-agregados y actúa como donante en FRET en conjunto con una droga PS derivada del piro-feoforbido.⁹⁵

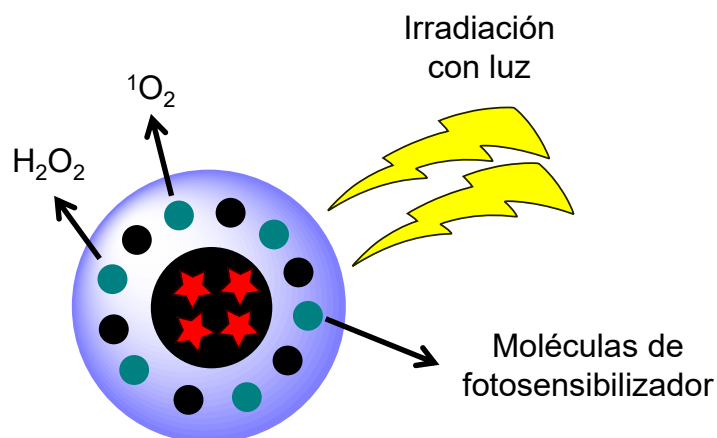
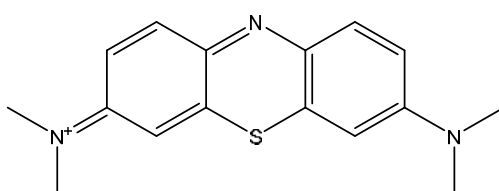


Figura 1-18. Representación de NP multifuncionales pasivas que llevan encapsulado el PS y otras moléculas fotoactivas.

1.10.2 Azul de metileno

El azul de metileno (MB) es un colorante catiónico derivado de las tiazinas (Esquema 1-16), y se comporta como un PS. Tiene características fotofísicas interesantes como un alto rendimiento cuántico de cruce entre sistemas (ISC) y de generación de ¹O₂ ($\Phi_{\Delta} \sim 0,5$), largo tiempo de vida de

fosforescencia, bajo rendimiento cuántico de fluorescencia y bajo potencial redox.⁹⁶⁻⁹⁹ Además, absorbe y emite luz en la región del NIR del espectro electromagnético. Así, se ha utilizado en una variedad de aplicaciones fotoquímicas que incluyen la conversión de energía solar y como PS en PDT.^{100,101} El aspecto de esta molécula que más nos interesará y que trataremos en el Capítulo 6 será su capacidad de generación de $^1\text{O}_2$, es decir, su rol como PS.



Esquema 1-16. Estructura del azul de metileno.

Otro aspecto saliente del MB es su tendencia a formar agregados tanto en solución acuosa como en sistemas confinados que se han caracterizado ampliamente por espectrofotometría.^{102,103}

La tendencia de las moléculas a formar agregados depende tanto de la estructura química del fluoróforo como de propiedades del entorno (pH, fuerza iónica, concentración del fluoróforo, polaridad del solvente y temperatura). En general, a mayor concentración y fuerza iónica, mayor será la agregación y, a mayor temperatura se verá desfavorecida la agregación.

La agregación es un proceso que influye en las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de los fluoróforos. En particular, los agregados en solución muestran cambios en los espectros de absorción al compararlos con las especies monoméricas. Se han caracterizado dos tipos de comportamientos en cuanto al espectro de absorción: 1) la aparición de bandas a menores longitudes de onda (corrimiento hipsocrómico respecto del monómero), las llamas bandas H¹⁰⁴ y, 2) bandas con un desplazamiento batocrómico respecto del monómero, las

llamadas bandas J¹⁰⁵. La teoría de acoplamientos de excitones moleculares permite explicar la relación existente entre la orientación relativa de los fluoróforos en los agregados (momentos de transición) y los desplazamientos espectrales observados.¹⁰⁶ En el marco de esta teoría, los monómeros (M) se consideran dipolos puntuales que interactúan entre sí para formar un dímero (D) y esa interacción da lugar a la formación de bandas excitónicas nuevas, que estarán relacionadas con la estructura del dímero (Figura 1-19).

Existen dos clases ideales (extremos) de estructuras de dímeros¹⁰⁷:

- 1) *Estructura sándwich*. Los momentos de transición de los M son paralelos en el estado de energía más alto (Ψ^+), lo que significa que la intensidad y la fuerza del oscilador de la transición $\Psi_0 \rightarrow \Psi^+$ es sustancial. Para la transición de menor energía ocurre lo opuesto. Así, en el espectro de absorción del D aparece una banda H a menores longitudes de onda respecto del M (Figura 1-19 H).
- 2) *Estructura cabeza-cola*. La transición $\Psi_0 \rightarrow \Psi^-$ está prohibida porque los momentos de transición se ubican en direcciones opuestas. Sin embargo, la transición de menor energía está permitida y aparece como una banda J en el espectro de absorción (Figura 1-19 J).

Los casos que hemos presentado son casos ideales de dímeros y, en la realidad, los momentos de transición no son ni completamente paralelos ni antiparalelos, lo que lleva a la aparición de bandas H y J al mismo tiempo en el espectro del dímero. La intensidad relativa de las bandas H y J depende del ángulo entre los momentos de transición, α , que se define en la Ecuación (11):

$$\alpha = 2 \cdot \arctan \sqrt{\frac{\nu_H \cdot f_J}{\nu_J \cdot f_H}} \quad (11)$$

donde ν es la posición de la banda (en cm^{-1}) y f es la fuerza del oscilador de la transición correspondiente.

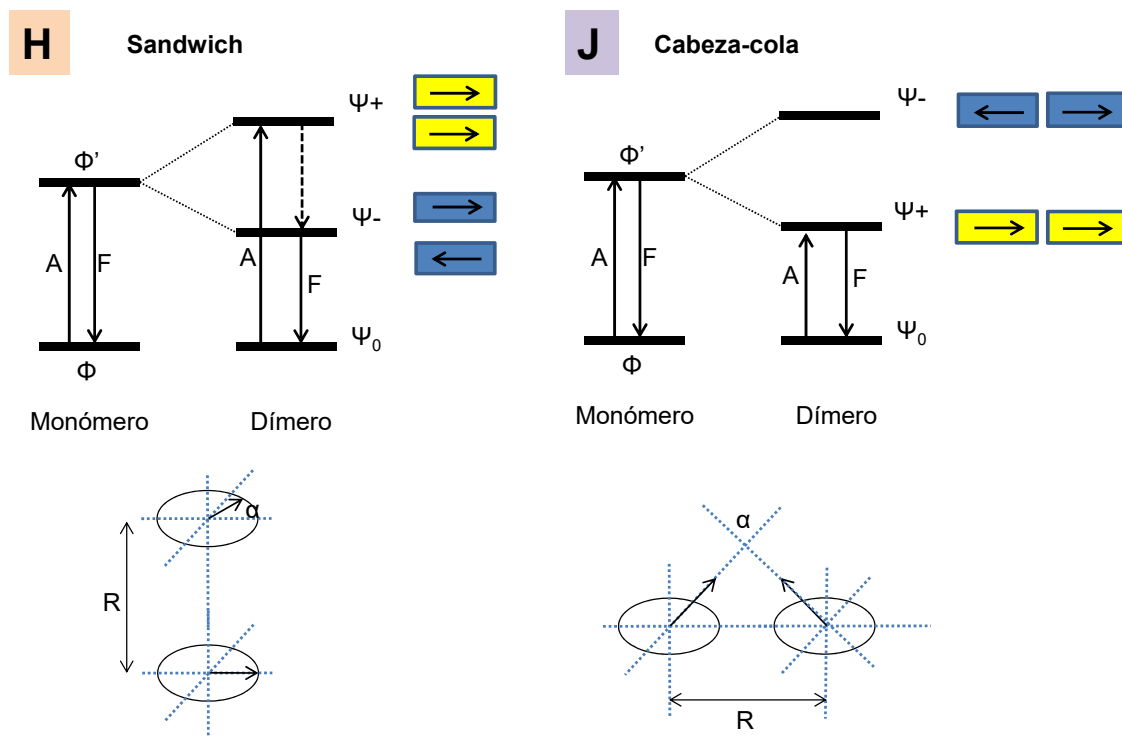


Figura 1-19. Diagramas de energía y esquemas de las estructuras de dímeros tipo H y J. α es el ángulo entre los momentos de transición.

Un fenómeno interesante que abordamos en esta tesis es el del confinamiento. En particular, cuando se confinan fluoróforos en un espacio reducido se observa en muchos casos un apagamiento dependiente de la concentración o “autoapagamiento”. La pérdida de fluorescencia se debe principalmente a dos procesos: la transferencia de energía (homo-FRET por ejemplo) y/o la formación de complejos no fluorescentes (trampas fluorescentes) que operan por apagamiento estático, usualmente dímeros y agregados. El apagamiento estático muchas veces ocurre por un mecanismo de tipo PET. De hecho, controlar la agregación de los fluoróforos puede resultar un mecanismo muy eficiente para modular la emisión de fluorescencia.¹⁰⁸ Los dímeros que

actúan como trampas de luz absorben radiación pero no presentan emisión de fluorescencia.

Por otra parte, la geometría de los dímeros afecta el rendimiento cuántico de fluorescencia del dímero en comparación con las especies monoméricas. Los dímeros de tipo J tienen un Φ_F mayor y los de tipo H un Φ_F menor.¹⁰⁹⁻¹¹³ En el caso particular del azul de metileno, sólo se ha observado una disminución en Φ_F en diferentes medios al formarse dímeros, lo que indica su gran tendencia a formar agregados de tipo H.¹¹⁴ En consecuencia, los espectros de dímeros y agregados de azul de metileno presentarán corrimientos hipsocrómicos en sus bandas de absorción respecto del monómero, y una disminución en la intensidad de emisión y el Φ_F . En el Capítulo 6 nos ocuparemos de la encapsulación del MB en matrices de sílice, de la repercusión del confinamiento en las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de la sonda (en particular de su capacidad de producción de $^1\text{O}_2$ en los sistemas como herramienta para PDT).

1.11 Referencias

1. Hockl, P. F. *et al.* Glyco-nano-oncology: Novel therapeutic opportunities by combining small and sweet. *Pharmacological Research* **109**, 45–54 (2016).
2. Thakor, A. S. & Gambhir, S. S. Nanooncology: The future of cancer diagnosis and therapy. *CA. Cancer J. Clin.* **63**, 395–418 (2013).
3. Soler-Illia, G. J. A. A. *¿Qué es la Nanotecnología?* (Paidós, 2015).
4. Maeda, H. & Matsumura, Y. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* **46**, 6387–6392 (1986).
5. Maeda, H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: The key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv. Enzyme Regul.* **41**, 189–207 (2001).
6. Maeda, H. SMANCS and polymer-conjugated macromolecular drugs: Advantages in cancer chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46**, 169–185 (2001).
7. Iyer, A. K., Khaled, G., Fang, J. & Maeda, H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov. Today* **11**, 812–818 (2006).
8. Seki, T., Fang, J. & Maeda, H. Enhanced delivery of macromolecular antitumor drugs to tumors by nitroglycerin application. *Cancer Sci.* **100**, 2426–2430 (2009).
9. Maeda, H., Bharate, G. Y. & Daruwalla, J. Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **71**, 409–419 (2009).
10. Maeda, H. Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: Background and future prospects. *Bioconjugate Chemistry* **21**, 797–

802 (2010).

11. Fang, J., Nakamura, H. & Maeda, H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 136–151 (2011).
12. Zhang, L. *et al.* Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. *Clin. Pharmacol. Ther.* **83**, 761–769 (2008).
13. Farokhzad, O. C. & Langer, R. Impact of Nanotechnology on Drug Discovery. *ACS Nano* **3**, 16–20 (2009).
14. Kamaly, N., Xiao, Z., Valencia, P. M., Radovic-Moreno, A. F. & Farokhzad, O. C. Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: Design, development and clinical translation. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2971–3010 (2012).
15. Shi, J., Votruba, A. R., Farokhzad, O. C. & Langer, R. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: From discovery to applications. *Nano Lett.* **10**, 3223–3230 (2010).
16. Kobayashi, T. Cancer hyperthermia using magnetic nanoparticles. *Biotechnol. J.* **6**, 1342–1347 (2011).
17. Kennedy, L. C. *et al.* A new era for cancer treatment: Gold-nanoparticle-mediated thermal therapies. *Small* **7**, 169–183 (2011).
18. Liu, J., Detrembleur, C., Mornet, S., Jérôme, C. & Duguet, E. Design of hybrid nanovehicles for remotely triggered drug release: An overview. *J. Mater. Chem. B* **3**, 6117–6147 (2015).
19. Alberti, S., Soler-Illia, G. J. A. A. & Azzaroni, O. Gated supramolecular chemistry in hybrid mesoporous silica nanoarchitectures: Controlled delivery and molecular transport in response to chemical, physical and biological stimuli. *Chem. Commun.* **51**, 6050–6075 (2015).
20. Melancon, M. P., Zhou, M. & Li, C. Cancer theranostics with near-infrared light-activatable multimodal nanoparticles. *Acc. Chem. Res.* **44**, 947–956 (2011).

21. Wolfbeis, O. S. An overview of nanoparticles commonly used in fluorescent bioimaging. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 4743–4768 (2015).
22. Bae, S. W., Tan, W. & Hong, J. I. Fluorescent dye-doped silica nanoparticles: New tools for bioapplications. *Chem. Commun.* **48**, 2270–2282 (2012).
23. Ma, K., Sai, H. & Wiesner, U. Ultrasmall sub-10 nm near-infrared fluorescent mesoporous silica nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 13180–13183 (2012).
24. Bradbury, M. S. *et al.* Clinically-translated silica nanoparticles as dual-modality cancer-targeted probes for image-guided surgery and interventions. *Integr. Biol. (United Kingdom)* **5**, 74–86 (2013).
25. Molina, M. *et al.* Stimuli-responsive nanogel composites and their application in nanomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 6161–6186 (2015).
26. Obaid, G. *et al.* Photonanomedicine: A convergence of photodynamic therapy and nanotechnology. *Nanoscale* **8**, 12471–12503 (2016).
27. Ow, H. *et al.* Bright and Stable Core-Shell fluorescent Silica Nanoparticles. *Nano Lett.* **5**, 113–117 (2005).
28. Rox Anderson, R. & Parrish, J. A. The optics of human skin. *J. Invest. Dermatol.* **77**, 13–19 (1981).
29. Burks, P. T. *et al.* Nitric Oxide Releasing Materials Triggered by Near-Infrared Excitation Through Tissue Filters. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 18145–18152 (2013).
30. Hemmer, E. *et al.* Upconverting and NIR Emitting Rare Earth based Nanostructures for NIR-Bioimaging. *Nanoscale* **5**, 11339–113361 (2013).
31. Pierre, A. C. *Introduction to Sol-Gel Processing*. **1**, (Springer US, 1998).
32. Brinker, C. J. & Scherer, G. W. *Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing*. (Academic Press, 1990).
33. Stöber, W., Fink, A., Bohn, E. Controlled Growth of Monodisperse Silica

- Spheres in the Micron Size Range. *J. Colloid Interface Sci.* **26**, 62–69 (1968).
34. Bogush, G. H., Tracy, M. A. & Zukoski IV, C. F. Preparation of monodisperse silica particles: Control of size and mass fraction. *J. Non. Cryst. Solids* **104**, 95–106 (1988).
 35. Bogush, G. H. & Zukoski IV, C. F. Studies of the kinetics of the precipitation of uniform silica particles through the hydrolysis and condensation of silicon alkoxides. *J. Colloid Interface Sci.* **142**, 1–18 (1991).
 36. Van Blaaderen, A. & Vrij, A. Synthesis and Characterization of Colloidal Dispersions of Fluorescent, Monodisperse Silica Spheres. *Langmuir* **8**, 2921–2931 (1992).
 37. Bagwe, R. P. & Khilar, K. C. Effects of the Intermicellar Exchange Rate and Cations on the Size of Silver Chloride Nanoparticles Formed in Reverse Micelles of AOT. *Langmuir* **13**, 6432–6438 (1997).
 38. Bagwe, R. P. & Khilar, K. C. Effects of intermicellar exchange rate on the formation of silver nanoparticles in reverse microemulsions of AOT. *Langmuir* **16**, 905–910 (2000).
 39. Rahul P. Bagwe, Chaoyong Yang, Lisa R. Hilliard, and W. T. Optimization of Dye-Doped Silica Nanoparticles Prepared Using a Reverse Microemulsion Method. *Langmuir* **20**, 8336–8342 (2004).
 40. Pramanick, D. & Mukherjee, D. Molecular interaction of methylene blue with triton X-100 in reverse micellar media. *J. Colloid Interface Sci.* (1993). doi:10.1006/jcis.1993.1166
 41. Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. (Wiley-VCH, 2002).
 42. James, T. H. & Kenneth Mees, C. E. *The theory of the photographic process*. (Macmillan, 1977).
 43. Schäfer, F. P. & Drexhage, K. H. *Dye lasers*. (Springer-Verlag, 1990).
 44. Spitler, M. & Parkinson, B. Dye sensitization of single crystal

- semiconductor electrodes. *Acc. Chem. Res.* **42**, 2017–2029 (2009).
45. Weissleder, R. & Ntziachristos, V. Shedding light onto live molecular targets. *Nat. Med.* **9**, 123–128 (2003).
 46. Blanchard, S. C., Gonzalez Jr, R. L., Kim, H. D., Chu, S. & Puglisi, J. D. tRNA selection and kinetic proofreading in translation. *Nat. Struct. & Mol. Biol.* **11**, 1008 (2004).
 47. Mishra, A., Behera, R. K., Behera, P. K., Mishra, B. K. & Behera, G. B. Cyanines during the 1990s: A Review. *Chem. Rev.* **100**, 1973–2012 (2000).
 48. Ernst, L. A., Gupta, R. K., Mujumdar, R. B. & Waggoner, A. S. Cyanine dye labeling reagents for sulfhydryl groups. *Cytometry* **10**, 3–10 (1989).
 49. Southwick, P. L. *et al.* Cyanine dye labeling reagents—carboxymethylindocyanine succinimidyl esters. *Cytometry* **11**, 418–430 (1990).
 50. König, W. Über "vinylhomologe" Indol- und Pyrrol-Farbstoffe. *Angew. Chemie* **38**, 743–748 (1925).
 51. Dempster, D. N., Morrow, T., Rankin, R. & Thompson, G. F. Photochemical characteristics of cyanine dyes. Part 1.—3,3'-diethyloxadibenzocyanine iodide and 3,3'-diethylthiadibenzocyanine iodide. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **68**, 1479–1496 (1972).
 52. West, W., Pearce, S. & Grum, F. Stereoisomerism in cyanine dyes--meso-substituted thiadibenzocyanines. *J. Phys. Chem.* **71**, 1316–1326 (1967).
 53. Rullière, C. Laser action and photoisomerisation of 3,3'-diethyl oxadibenzocyanine iodide (DODCI): Influence of temperature and concentration. *Chem. Phys. Lett.* **43**, 303–308 (1976).
 54. Aramendia, P. F., Negri, R. M. & Roman, E. S. Temperature Dependence of Fluorescence and Photoisomerization in Symmetric Carbocyanines. Influence of Medium Viscosity and Molecular Structure. *J. Phys. Chem.* **98**, 3165–3173 (1994).

55. Ponterini, G. & Momicchioli, F. Trans-cis photoisomerization mechanism of carbocyanines: experimental check of theoretical models. *Chem. Phys.* **151**, 111–126 (1991).
56. Di Paolo, R. E., Scaffardi, L. B., Duchowicz, R. & Bilmes, G. M. Photoisomerization Dynamics and Spectroscopy of the Polymethine Dye DTCl. *J. Phys. Chem.* **99**, 13796–13799 (1995).
57. Åkesson, E. *et al.* Analysis of microviscosity and reaction coordinate concepts in isomerization dynamics described by Kramers' theory. *J. Chem. Phys.* **95**, 6508–6523 (1991).
58. Harvey, B. J., Perez, C. & Levitus, M. DNA sequence-dependent enhancement of Cy3 fluorescence. *Photochem. Photobiol. Sci.* **8**, 1105 (2009).
59. Oswald, B. *et al.* Synthesis, Spectral Properties, and Detection Limits of Reactive Squaraine Dyes, a New Class of Diode Laser Compatible Fluorescent Protein Labels. *Bioconjug. Chem.* **10**, 925–931 (1999).
60. Tatarets, A. L. *et al.* Synthesis of water-soluble, ring-substituted squaraine dyes and their evaluation as fluorescent probes and labels. *Anal. Chim. Acta* **570**, 214–223 (2006).
61. Johnson, J. R. *et al.* Squaraine rotaxanes: superior substitutes for Cy-5 in molecular probes for near-infrared fluorescence cell imaging. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **46**, 5528–31 (2007).
62. Arun, K. T., Jayaram, D. T., Avirah, R. R. & Ramaiah, D. β -Cyclodextrin as a Photosensitizer Carrier: Effect on Photophysical Properties and Chemical Reactivity of Squaraine Dyes. *J. Phys. Chem. B* **115**, 7122–7128 (2011).
63. Buston, J. E. H., Young, J. R. & Anderson, H. L. Rotaxane-encapsulated cyanine dyes: enhanced fluorescence efficiency and photostability. *Chem. Commun.* **0**, 905–906 (2000).
64. Yau, C. M. S. *et al.* Stabilisation of a heptamethine cyanine dye by

- rotaxane encapsulation. *Chem. Commun.* 2897 (2008). doi:10.1039/b802728e
65. Peng, X. *et al.* Heptamethine cyanine dyes with a large Stokes shift and strong fluorescence: a paradigm for excited-state intramolecular charge transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 4170–4171 (2005).
 66. Lippert, E., Rettig, W., Bonačić-Koutecký, V., Heisel, F. & Miehé, J. A. Ph1. Lippert, E., Rettig, W., Bonačić-Koutecký, V., Heisel, F. & Miehé, J. A. Photophysics of Internal Twisting. *Adv. Chem. Phys.* 68, 1–173 (1987). Photophysics of Internal Twisting. *Adv. Chem. Phys.* **68**, 1–173 (1987).
 67. Grabowski, Z. R., Rotkiewicz, K. & Rettig, W. Structural Changes Accompanying Intramolecular Electron Transfer: Focus on Twisted Intramolecular Charge-Transfer States and Structures. *Chem. Rev.* **103**, 3899–4031 (2003).
 68. Kosower, E. M. Intramolecular Donor-Acceptor Systems. 9. Photophysics of (Phenylamino)naphthalenesulfonates: A Paradigm for Excited-State Intramolecular Charge Transfer. *Acc. Chem. Res.* **15**, 259–266 (1982).
 69. Upadhyay, A., Bhatt, T., Tripathi, H. B. & Pant, D. D. Photophysics of 8-anilinonaphthalene-1-sulphonate. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **89**, 201–207 (1995).
 70. Edward M. Kosower, H. K. Intramolecular donor-acceptor systems. 10. Multiple fluorescences from 8-(N-phenylamino)-1-naphthalenesulfonates. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 6236–6243 (1983).
 71. Sun, W., Guo, S., Hu, C., Fan, J. & Peng, X. Recent Development of Chemosensors Based on Cyanine Platforms. *Chemical Reviews* 7768–7817 (2016). doi:10.1021/acs.chemrev.6b00001
 72. Kiyose, K., Kojima, H., Urano, Y. & Nagano, T. Development of a Ratiometric Fluorescent Zinc Ion Probe in Near-Infrared. **98**, 6548–6549 (2006).
 73. Khun, H. Neuere Untersuchungen über das Elektronengasmodell

- organischer Farbstoffe. *Angew. Chemie* **71**, 93–101 (1959).
74. Daly, B., Ling, J. & De Silva, A. P. Current developments in fluorescent PET (photoinduced electron transfer) sensors and switches. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 4203–4211 (2015).
 75. De Silva, A. P., Moody, T. S. & Wright, G. D. Fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) sensors as potent analytical tools. *Analyst* **134**, 2385–2393 (2009).
 76. Loudet, A. & Burgess, K. BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties. *Chem. Rev.* **107**, 4891–4932 (2007).
 77. Tang, B. *et al.* Highly sensitive and selective near-infrared fluorescent probe for zinc and its application to macrophage cells. *Chem. Commun.* **0**, 3609 (2006).
 78. Li, P. *et al.* A near-infrared fluorescent probe for detecting copper(II) with high selectivity and sensitivity and its biological imaging applications. *Chem. Commun.* **47**, 7755–7757 (2011).
 79. Zeng, L., Miller, E. W., Pralle, A., Isacoff, E. Y. & Chang, C. J. A selective turn-on fluorescent sensor for imaging copper in living cells. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 10–11 (2006).
 80. Tang, B. *et al.* A dual near-infrared pH fluorescent probe and its application in imaging of HepG2 cells. *Chem. Commun.* **0**, 3726 (2007).
 81. Tang, B. *et al.* A Near-Infrared Neutral pH Fluorescent Probe for Monitoring Minor pH Changes : Imaging in Living HepG2 and HL-7702 Cells A Near-Infrared Neutral pH Fluorescent Probe for Monitoring Minor pH Changes : Imaging in Living HepG2 and HL-7702. 3016–3023 (2009). doi:10.1021/ja809149g
 82. Kiyose, K. *et al.* Molecular design strategies for near-infrared ratiometric fluorescent probes based on the unique spectral properties of aminocyanines. *Chem. - A Eur. J.* **15**, 9191–9200 (2009).

83. Myochin, T. *et al.* Rational design of ratiometric near-infrared fluorescent pH probes with various pKa values, based on aminocyanine. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 3401–3409 (2011).
84. Zhu, M. *et al.* Visible Near-Infrared Chemosensor for Mercury Ion Visible Near-Infrared Chemosensor for Mercury Ion. 1133–1136 (2008). doi:10.1021/ol800197t
85. Descalzo, A. B. & Rurack, K. On the signalling pathways and CuII-mediated anion indication of N-meso-substituted heptamethine cyanine dyes. *Chem. - A Eur. J.* **15**, 3173–3185 (2009).
86. Freeman, R. & Willner, I. Optical molecular sensing with semiconductor quantum dots (QDs). *Chem. Soc. Rev.* **41**, 4067 (2012).
87. Tang, R., Lee, H. & Achilefu, S. Induction of pH sensitivity on the fluorescence lifetime of quantum dots by NIR fluorescent dyes. *J. Am. Chem. Soc.* (2012). doi:10.1021/ja300276s
88. Schäferling, M. Nanoparticle-based luminescent probes for intracellular sensing and imaging of pH. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **8**, 378–413 (2016).
89. Zhang, F. *et al.* Ion and pH sensing with colloidal nanoparticles: influence of surface charge on sensing and colloidal properties. *Chemphyschem* **11**, 730–735 (2010).
90. Burns, A., Sengupta, P., Zedayko, T., Baird, B. & Wiesner, U. Core/shell fluorescent silica nanoparticles for chemical sensing: Towards single-particle laboratories. *Small* **2**, 723–726 (2006).
91. Peng, J. *et al.* Noninvasive monitoring of intracellular pH change induced by drug stimulation using silica nanoparticle sensors. *Anal. Bioanal. Chem.* **388**, 645–654 (2007).
92. Foote, C. S. Definition of Type I and Type II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.* **54**, 659–659 (1991).

93. Chatterjee, D. K., Fong, L. S. & Zhang, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1627–1637 (2008).
94. Hatz, S., Lambert, J. D. C. & Ogilby, P. R. Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability. *Photochem. Photobiol. Sci.* **6**, 1106 (2007).
95. Kim, S., Ohulchanskyy, T. Y., Pudavar, H. E., Pandey, R. K. & Prasad, P. N. Organically modified silica nanoparticles co-encapsulating photosensitizing drug and aggregation-enhanced two-photon absorbing fluorescent dye aggregates for two-photon photodynamic therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 2669–2675 (2007).
96. Tuite, E. M. & Kelly, J. M. New trends in photobiology: Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **21**, 103–124 (1993).
97. Murov, S. L., Hug, G. L. & Carmichael, I. *Handbook of photochemistry*. (M. Dekker, 1993).
98. Wilkinson, F., Helman, W. P. & Ross, A. B. Quantum Yields for the Photosensitized Formation of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **22**, 113–262 (1993).
99. Chan, M. S. & Bolton, J. R. Structures, reduction potentials and absorption maxima of synthetic dyes of interest in photochemical solar-energy storage studies. *Sol. Energy* **24**, 561–574 (1980).
100. Mellish, K. J., Cox, R. D., Vernon, D. I., Griffiths, J. & Brown, S. B. In Vitro Photodynamic Activity of a Series of Methylene Blue Analogues. *Photochem. Photobiol.* **75**, 392–397 (2007).
101. Niedre, M., Patterson, M. S. & Wilson, B. C. Direct Near-infrared Luminescence Detection of Singlet Oxygen Generated by Photodynamic

- Therapy in Cells In Vitro and Tissues In Vivo¶. *Photochem. Photobiol.* **75**, 382–391 (2002).
102. Lewis, G. N., Goldschmid, O., Magel, T. T. & Bigeleisen, J. Dimeric and Other Forms of Methylene Blue: Absorption and Fluorescence of the Pure Monomer. *J. Am. Chem. Soc.* **65**, 1150–1154 (1943).
 103. Lee, C., Sung, Y. W. & Park, J. W. Multiple Equilibria of Phenothiazine Dyes in Aqueous Cyclodextrin Solutions †. *J. Phys. Chem. B* **103**, 893–898 (1999).
 104. Herz, A. H. Aggregation of sensitizing dyes in solution and their adsorption onto silver halides. *Adv. Colloid Interface Sci.* **8**, 237–298 (1977).
 105. Jelley, E. E. Spectral Absorption and Fluorescence of Dyes in the Molecular State. *Nature* **138**, 1009–1010 (1936).
 106. Kasha, M. Energy Transfer Mechanisms and the Molecular Exciton Model for Molecular Aggregates. *Radiat. Res.* **20**, 55–71 (1963).
 107. Antonov, L., Gergov, G., Petrov, V., Kubista, M. & Nygren, J. UV-Vis spectroscopic and chemometric study on the aggregation of ionic dyes in water. *Talanta* **49**, 99–106 (1999).
 108. Johansson, M. K. & Cook, R. M. Intramolecular Dimers: A New Design Strategy for Fluorescence-Quenched Probes. *Chem. - A Eur. J.* **9**, 3466–3471 (2003).
 109. del Monte, F. & Levy, D. Identification of Oblique and Coplanar Inclined Fluorescent J-Dimers in Rhodamine 110 Doped Sol-Gel-Glasses. *J. Phys. Chem. B* (1999). doi:10.1021/jp991491g
 110. Del Monte, F., Mackenzie, J. D. & Levy, D. Rhodamine fluorescent dimers adsorbed on the porous surface of silica gels. *Langmuir* (2000). doi:10.1021/la000540+
 111. Bernik, D., Tymczyszynl, E., Daraio, M. E. & Negri, R. M. Fluorescent Dimers of Merocyanine 540 (MC540) in the Gel Phase of P hosp hat id y

- Ic holi ne Li posomes. **70**, 40–48 (1999).
112. Kikteva, T., Star, D., Zhao, Z., Baisley, T. L. & Leach, G. W. Molecular Orientation, Aggregation, and Order in Rhodamine Films at the Fused Silica/Air Interface. *J. Phys. Chem. B* **103**, 1124–1133 (1999).
113. Das, S. & Kamat, P. V. Can H-Aggregates Serve as Light-Harvesting Antennae? Triplet–Triplet Energy Transfer between Excited Aggregates and Monomer Thionine in Aersol-OT Solutions. *J. Phys. Chem. B* (1999). doi:10.1021/jp983816j
114. Severino, D., Helena, C., Dino, S. & Mauricio, S. Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue. **77**, 459–468 (2003).

2 Hipótesis y objetivos

2.1 Antecedentes e hipótesis de trabajo

Sobre la base de lo visto en el Capítulo 1, queda claro que el campo de los nanomateriales para aplicaciones biológicas está en pleno desarrollo. Se conocen muy bien los métodos de síntesis de nanopartículas de SiO₂, densas y mesoporosas, y diferentes métodos de funcionalización. Sin embargo, existen pocos ejemplos de materiales biocompatibles de SiO₂ que integren sondas fluorescentes de NIR. En resumen, sabemos que: a) las NP de SiO₂ ofrecen la posibilidad de funcionalización con diversos grupos orgánicos e inorgánicos, lo que permite integrar en un mismo nano-objeto funciones químicas de distinta naturaleza y generar así bloques de construcción complejos b) la sílice es un material biocompatible, c) las tricarbocianinas son sondas fluorescentes activas en el NIR y su síntesis puede diseñarse racionalmente para orientar sus propiedades fotoquímicas, resultando en sensores moleculares fotoactivos de propiedades de interés biológico y, d) se han utilizado nanopartículas de sílice para terapia y diagnóstico (teranóstica) de enfermedades en investigación básica y aplicada. Así, tanto las tricarbocianinas como las nanopartículas pueden considerarse bloques de construcción de nanomateriales fluorescentes avanzados.

A partir de la adecuada elección de los bloques de construcción motivada por la aplicación final del material y utilizando los métodos de síntesis de nanopartículas detallados en el Capítulo 1, se pueden crear nuevos materiales para aplicación biológica como reporteros, transportadores (*carriers*), sensores y/o agentes terapéuticos. Esta es la premisa a partir de la cual iniciamos los estudios de este trabajo de tesis.

2.2 Objetivos generales y específicos

El trabajo presentado en esta tesis se enmarcó en un proyecto general que plantea el diseño y la construcción de nuevos nano-objetos, nano-herramientas o nano-vehículos fluorescentes basados en la integración de moléculas orgánicas a nanopartículas de dióxido de silicio. La motivación principal es la de reportar y ofrecer (tanto para investigación básica como para investigación aplicada) nuevos materiales que puedan ser utilizados con fines biológicos (ej. en microscopías de fluorescencia para elucidar los mecanismos biofísicos y bioquímicos responsables de la función celular) y en aplicaciones de teranóstica y/o sensado de analitos de interés.

El objetivo general de esta tesis estuvo así orientado al desarrollo de sensores basados en nanopartículas fluorescentes de sílice (SiO_2 -F NP) en las que la molécula responsable de la interacción con la luz se encontraba o bien encapsulada en la nanopartícula, o bien unida a su superficie. Las principales sondas fluorescentes con las que se trabajó compartían la propiedad de absorber y emitir luz en la región del infrarrojo cercano del espectro electromagnético (NIR) que, como se explicó, resulta una “ventana biológica” de trabajo porque se trata de una luz de alta penetración en tejidos, entre otras razones. En varios casos, se buscó colocar en el mismo nano-objeto más de una sonda fluorescente. Así, se desarrollaron diversos métodos sintéticos para construir los nanomateriales que cumplieran con las características buscadas.

En este marco, se propusieron también varios objetivos específicos:

- El desarrollo y la optimización de rutas de síntesis orgánicas para la obtención de aminotricarbocianinas simétricas nuevas, en particular de una molécula sensora de pH (**Cy-PIP**, su estructura se reporta en el Capítulo 4).

-Caracterizar el comportamiento fotofísico de Cy-PIP y establecer la dependencia de su absorción y emisión de fluorescencia con el pH del medio para evaluar su potencial aplicación como marcador y sensor fluorescente de pH.

-La síntesis y caracterización fisicoquímica de un nanosensor de pH basado en la modificación superficial de nanopartículas de SiO₂ con **Cy-PIP** (Cy-PIP@SiO₂). Luego, el ensayo de este sistema en células HeLa como una prueba de concepto para medir pH en entornos celulares.

-Sintetizar nanopartículas que encapsulen azul de metileno, un colorante catiónico de bajo costo y, fundamentalmente, de NIR, por distintos métodos de síntesis de SiO₂ (método de Stöber y microemulsión inversa), caracterizar su fotofísica y establecer su capacidad de generación de oxígeno singulete (¹O₂) con miras a ser aplicadas en terapia fotodinámica (PDT). En este punto, se buscó establecer una correlación entre el método de síntesis, el estado de agregación del colorante (de acuerdo a su espectro de absorción) y su rendimiento cuántico de formación de ¹O₂ (Φ_{Δ}).

-Aumentar la robustez del nanosensor Cy-PIP@SiO₂ agregando otras sondas fluorescentes a la plataforma, como por ejemplo, [Ru(bpy)₃]²⁺ y azul de metileno. Así, se apuntó a construir nanopartículas duales (con dos fluoróforos) como punto de partida para la síntesis de nanosensores fluorescentes y autoreferenciados de pH cuya respuesta se encuentre completamente en el NIR.

-Estudiar la encapsulación de sondas fluorescentes comerciales en NP de SiO₂ por distintos métodos de síntesis y agregar diferentes funcionalidades a la

superficie que, en una etapa avanzada, puedan aprovecharse para dar mayor complejidad a la plataforma.

3 Parte experimental

3.1 Introducción

En este capítulo se describen los procedimientos sintéticos llevados a cabo en esta tesis, tanto de moléculas como de materiales híbridos. Por otra parte, se presentan las técnicas de caracterización empleadas y su aplicación a los sistemas estudiados.

3.2 Síntesis y caracterización estructural de tricarbocianinas

3.2.1 Generalidades

Todas las reacciones de la ruta de síntesis de Cy-PIP se llevaron a cabo en colaboración con el laboratorio de la Dra. Carla Spagnuolo del CIHIDECAR-QO, FCEN-UBA.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado pureza analítica o superior, y el proveedor fue *Sigma Aldrich*. No se realizaron purificaciones extras de los reactivos comerciales. Los solventes orgánicos para reacciones de síntesis fueron purificados y secados por métodos estándar con anterioridad a su uso. En el caso del acetonitrilo, se destiló y se recogió el destilado sobre tamices moleculares (MS, *molecular sieves*) 3A°, al igual que en el caso del MeOH para realizar purificaciones. La DMF fue adquirida anhidra y sobre MS.

En todos los casos en los que las reacciones fueran sensibles a la humedad, el material de vidrio utilizado fue previamente secado en estufa, y las reacciones se llevaron a cabo bajo atmósfera de nitrógeno o argón.

3.2.1.1 Cromatografías

Las reacciones de síntesis de tricarbocianinas se monitorearon por cromatografía en placa delgada de fase reversa (TLC RP-18). Como fase móvil se utilizaron mezclas de MeOH-agua-ácido acético, según el requerimiento de la reacción. Para purificar los productos intermedios obtenidos, se ensayaron cromatografías en columna utilizando como fase estacionaria sílice de tipo RP-18 (*Lichroprep RP-18* 40-63 μm , *Merck*) y como fase móvil mezclas de MeOH y agua. El producto final Cy-PIP se purificó mediante cromatografía en placa preparativa sobre soporte de vidrio (RP-18). Así, se raspó la sílice a la altura de la banda de interés, se resuspendió en MeOH para extraer el compuesto y se filtró la suspensión con vacío. Luego se evaporó el solvente a presión reducida y se secó el producto obtenido con vacío a temperatura ambiente, protegido de la luz.

3.2.1.2 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Las caracterizaciones de los productos intermedios de la síntesis se realizaron por RMN ^1H y ^{13}C . Los espectros de RMN se adquirieron con dos equipos: Bruker AC-200 del Departamento de Química Orgánica (FCEN, UBA) que trabaja a 200 MHz para ^1H y a 50 MHz para ^{13}C y Bruker AM-500 (LANAIS RMN-500, CONICET) que opera a 500 MHz para ^1H y a 125 MHz para ^{13}C .

Para la preparación de las muestras se utilizaron solventes deuterados en todos los casos, principalmente MeOH deuterado y DMSO deuterado, solventes en los que los precursores y las tricarbocianinas son solubles. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) respecto del solvente deuterado.

Los espectros se analizaron por completo utilizando el *software Mestre Nova*. En los casos en los que fue posible, las señales se asignaron teniendo en cuenta espectros informados de ^1H y ^{13}C para compuestos similares. También se utilizó la herramienta del *software Mestre Nova* para simular espectros de RMN. En el caso de Cy-Cl y Cy-PIP, para asignar las señales inequívocamente, se requirieron experimentos de RMN bidimensional por las técnicas de HSQC, HMBC y COSY.

3.2.1.3 *Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)*

Las muestras se enviaron al servicio de Espectrometría de masas del UMYMFOR (FCEN, UBA). El equipo con el que se llevó a cabo el análisis de las muestras fue un equipo Bruker microTOFQ-II (ESI+, ESI-). La fuente de ionización era de *electrospray* (ESI) y el analizador un cuadrupolo-tiempo de vuelo (TOF) que provee masas exactas con error menor a 3 ppm en EM y menor a 5 ppm en EM/EM.

3.2.1.4 *Horno de microondas para síntesis*

Para la reacción de *N*-alquilación del benzoindol de partida se utilizó un horno de microondas especial para síntesis orgánica (*Monowave 300, AntonPaar*) perteneciente al CIHIDECAR, FCEN, UBA. En la Figura 3-1 se muestra una foto del equipo.

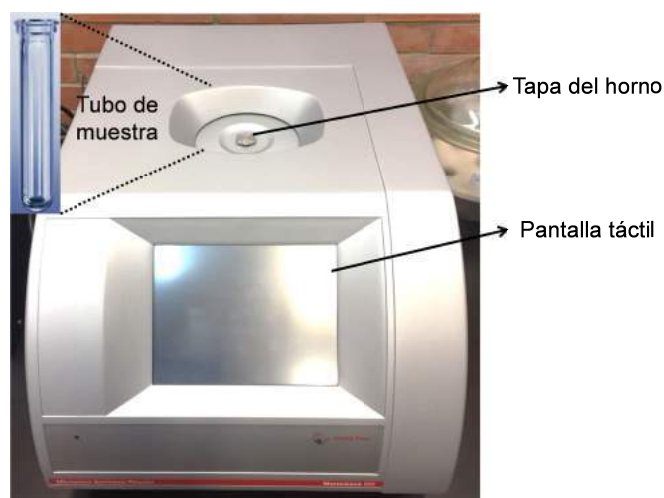


Figura 3-1. Horno de microondas Monowave 300 de marca AntonPaar (CIHIDECAR, FCEN, UBA). El equipo cuenta con una conexión a un tubo de nitrógeno, gas que se utiliza para enfriar la muestra una vez finalizada la reacción. En la parte superior izquierda de la figura se muestra una foto del tubo de vidrio de borosilicato de 10 ml empleado para las reacciones.

A diferencia de lo que ocurre en un procedimiento de calentamiento tradicional (reacciones por la vía térmica), en los procesos en los que se utilizan microondas para generar calor, la radiación incide en las moléculas del medio y produce un supercalentamiento interno. El calentamiento del solvente o del reactivo mediante microondas depende de lo que se conoce como su “factor de pérdida”, magnitud que está relacionada con su constante dieléctrica. Para tener una absorción eficiente y, en consecuencia, un calentamiento rápido hace falta un medio de reacción con un valor de factor de pérdida elevado (mayor a 0.5). El agua y el MeOH tienen factores de pérdida altos, mientras que para disolventes polares como CCl_4 , dichos valores resultan muy bajos.¹

3.2.2 Síntesis

3.2.2.1 Bromuro de 3-(5-carboxipentil)-1,1,2-trimetil-1H-benzo[e]indolenonio(benzoindol o producto alquilado)

En un recipiente de reacción de microondas de 10 ml provisto de una barra magnética para agitación se colocaron: 1,1,2-trimetilbenzo[e]indol (0,96 g, 4,6 mmol), ácido 6-bromohexanoico (1,34 g, 6,8 mmol) y acetonitrilo (anh) (6,0 mL). El recipiente de reacción se calentó en un horno de microondas para síntesis orgánica a 150°C durante 2 horas. Se dejó enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y después se conservó a -20°C (*freezer*) durante 2 semanas. Luego de ese tiempo se observó que el producto había precipitado en gran cantidad como un sólido gris. El producto crudo se filtró con vacío, se lavó con éter etílico (3 x 10 mL) y se secó con vacío a temperatura ambiente para obtener 1,75 g (95%). Para la siguiente reacción se continuó con este producto crudo, sin purificaciones adicionales, si bien fueron ensayadas.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 8,19 – 7,89 (m, 3H); 7,87 – 7,51 (m, 3H); 4,59 (t, J = 7,3 Hz, 2H); 2,25 (t, J = 6,4 Hz, 2H); 2,02 – 1,83 (m, 2H); 1,75 (s, 6H); 1,68 – 1,55 (m, 2H); 1,47 (m, 2H).

3.2.2.2 2-cloro-1-formil-3-(hidroximetilen)-1-ciclohexeno (bisaldehído insaturado, BI)

Antes de iniciar la reacción, todo el sistema fue purgado con gas argón. El sistema constaba de un balón de dos bocas provisto de un refrigerante de reflujo en la boca central y un *septum* de goma en la boca lateral. El balón se cargó con una solución de DMF (20,0 mL, 0,26 mol) en DCM anhidro (20,0 mL, 0,31 mol), la boca superior del refrigerante se cerró con un *septum* y se purgó el sistema con argón. A través de una cánula de acero inoxidable limpia y seca se trasvasó usando presión de gas nitrógeno y manteniendo la temperatura a 0°C (baño de hielo) al balón de dos bocas, gota a gota, una solución de oxiclورو de fósforo (18,5 mL; 0,2 mol) en diclorometano (17,5 mL; 0,2 mol). El color de la solución se tornó amarillo. Luego, manteniendo la temperatura a 0°C se añadió ciclohexanona (5,0 g; 5,3 mL; 0,05 mol) gota a gota (jeringa de vidrio) durante 30

minutos (la reacción es altamente exotérmica). La solución se puso roja. Una vez completada la adición de ciclohexanona, a la salida del refrigerante se colocó una trampa de CaCl₂ (anh) para evitar el ingreso de la humedad ambiente al sistema y la mezcla se llevó a reflujo durante 3 horas. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente (1 hora) y luego se enfrió a -20°C, temperatura a la cual se mantuvo durante 18 horas. Luego de ese tiempo, se observó la aparición de unos cristales amarillos que se filtraron bajo vacío y se lavaron primero con agua fría (10 ml) y luego con éter dietílico (3 x 10 mL). Los cristales secaron al vacío (a temperatura ambiente) para obtener 3,97 g (46%). Es importante tener en cuenta que el producto es inestable y debe almacenarse a -20°C (durante un período no superior un mes).

¹H RMN (200 MHz, DMSO-d₆): δ 2,35 (t, J = 6,1 Hz, 4H); 1,65 - 1,48 (m, 2H).

3.2.2.3 Tricarbocianina clorada Cy-Cl

En un balón de dos bocas equipado con un refrigerante de reflujo en la boca central se colocaron el "benzoindol" bromuro de 3-(5-carboxipentil)-1,1,2-trimetil-1H-benzo[e]indolenonio (0,0698 g; 0,173 mmol) y el "bisaldehído insaturado" 2-cloro-1-formil-3-(hidroximetilen)-1-ciclohexeno (0,0297 g; 0,173 mmol). Luego, utilizando una jeringa de vidrio de 10 ml se añadieron *n*-butanol anhidro (9,4 ml) y benceno anhidro (4,0 ml). El sistema se purgó con argón bajo agitación. La mezcla se reflujo durante 1 hora y la reacción fue monitoreada por TLC. Se dejó enfriar la mezcla de reacción a 50 °C y se añadió otro equivalente de bromuro de 3-(5-carboxipentil)-1,1,2-trimetil-1H-benzo[e]indolenonio (0,0698 g; 0,173 mmol) junto con piridina anhidra (2,7 ml; 33,2 mmol). La mezcla se reflujo durante otra hora y luego de ello se dejó enfriar a temperatura ambiente. La piridina se eliminó a presión reducida en rotavapor mediante arrastres con tolueno (forma un azeótropo) y el residuo resultante se lavó con Et₂O para inducir la cristalización. Se obtuvo un sólido verde que luego fue purificado por

cromatografía de exclusión por tamaño *Sephadex* utilizando MeOH como eluyente. Las fracciones puras se recogieron, se evaporaron y se secaron al vacío a temperatura ambiente. El producto purificado se obtuvo como un sólido color verde inglés (87 mg, 49%).

^1H NMR (500 MHz, MeOD- d_4): δ 8,55 (dd, $J = 14,7, 3,0$ Hz, 2H); 8,27 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H); 8,09 – 7,95 (m, 4H); 7,65 (t, $J = 8,9$ Hz, 4H); 7,57 – 7,43 (m, 2H); 6,33 (dd, $J = 14,6, 4,9$ Hz, 2H); 4,31 (t, $J = 6,7$ Hz, 4H); 2,77 (t, $J = 6,0$ Hz, 4H); 2,34 (ddd, $J = 15,6, 9,5, 5,3$ Hz, 4H); 2,02 (s, 11H); 1,95 – 1,81 (m, 12H); 1,71 (dd, $J = 14,5, 7,7$ Hz, 4H); 1,54 (dd, $J = 13,9, 7,3$ Hz, 4H).

3.2.2.4 Aminotricarbocianina Cy-PIP

En un balón de una boca de 5 ml se colocaron Cy-Cl (95 mg), *N*-metilpiperazina (25 μL ; 0,2 mmol) y 1 mL de DMF anhidra. Se agregó TEA (123 μL ; 0,9 mmol) y se purgó el sistema con argón, bajo agitación. La solución resultante se agitó durante toda la noche, protegida de luz, y la atmósfera inerte se garantizó usando un globo con presión positiva de argón. Una vez monitoreada la reacción por TLC (RP-18, MeOH), el disolvente se eliminó en un *Speedvac*. Se obtuvo el producto crudo como un residuo azul intenso que se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño en columna *Sephadex* (LH-20, MeOH) y cromatografía en columna RP-18 (MeOH- H_2O 90:10). El producto puro resultó un sólido de color azul oscuro (62,5 mg, 62%).

^1H NMR (500 MHz, MeOD- d_4): δ (ppm) 8,22 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H); 7,99 – 7,94 (m, 6H); 7,61 (dd, $J = 14,0, 7,1$ Hz, 3H); 7,52 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H); 7,46 – 7,40 (m, 2H); 6,08 (d, $J = 13,7$ Hz, 2H); 4,17 (t, $J = 7,4$ Hz, 4H); 3,79 (s, $J = 4,7$ Hz, 4H); 2,89 (s, 4H); 2,63 – 2,55 (m, 7H); 2,29 (t, $J = 7,3$ Hz, 4H); 2,02 (s, 12H); 1,93 – 1,85 (m, 6H); 1,72 (dt, $J = 15,0, 7,3$ Hz, 4H); 1,53 (t, $J = 7,7$ Hz, 4H).

^{13}C NMR (500 MHz, MeOD- d_4): δ (ppm) 178,77; 172,82; 142,59; 141,51; 133,88; 132,95; 132,38; 131,55; 131,07; 129,88; 129,63; 128,56; 126,38; 125,46; 123,17;

111,77; 97,88; 72,91; 57,72; 55,13; 51,44; 46,46; 44,51; 35,91; 28,87; 28,06; 27,62; 26,23; 26,16; 23,16.

HRMS (ESI+): Calculado $[M+H]^+$ 847,51703; Experimental: 847,51568.

3.3 Síntesis de SiO₂-F NP

3.3.1 Generalidades

Todas las síntesis de materiales descritos en esta tesis se realizaron en los laboratorios de la Gerencia Química (Centro Atómico Constituyentes, CNEA).

3.3.1.1 Acondicionamiento del material de vidrio

Para todas las reacciones de síntesis de NP se emplearon como reactores balones o frascos adecuados de vidrio que, provistos de una barra magnética agitadora, fueron limpiados antes de ser utilizados. La limpieza consistió en un tratamiento bajo agitación con solución de potasa alcohólica (KOH/EtOH) fresca, luego enjuagues exhaustivos con EtOH, agua destilada y, por último, agua calidad mQ. Los reactores de vidrio se secaron en estufa a 130°C y se retiraron de ella sólo treinta minutos antes de su uso.

3.3.1.2 Condiciones experimentales generales y tratamiento previo de los reactivos

Siempre que se utilizó NH₃ (c) se trabajó bajo campana de extracción. La temperatura, salvo se indique en el procedimiento experimental específico, no se controló y las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente, entre 18

y 35°C. El agua utilizada en las reacciones siempre fue calidad mQ y el EtOH de grado absoluto. En todas las síntesis, el EtOH, el agua y el NH₃ (c) se pesaron. En el caso de los solventes orgánicos como ciclohexano y *n*-hexanol, las cantidades a utilizar se midieron en volumen en probetas o pipetas graduadas perfectamente limpias y secas.

En la mayoría de los casos, salvo indicación expresa, el TEOS (tetraetilortosilicato) comercial se destiló (dest. fraccionada) a presión atmosférica (P.eb. TEOS: 168°C) para purificarlo de los oligómeros de sílice producto de la hidrólisis y condensación parcial del reactivo con la humedad ambiente (Figura 3-2). Las fracciones puras se conservaron en viales de vidrio de 10 ml con *septum*, bajo atmósfera de nitrógeno.

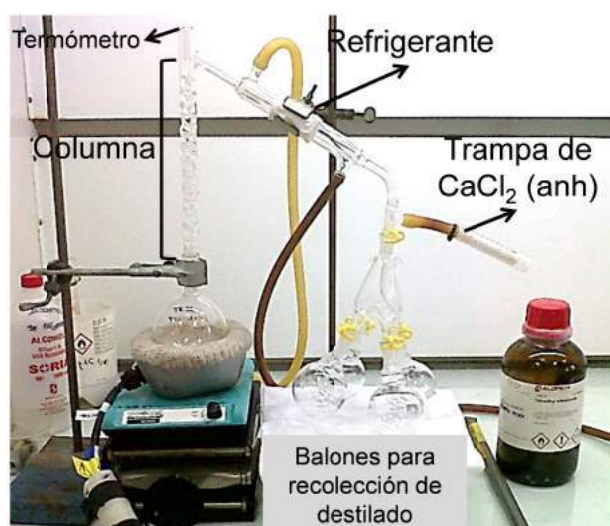


Figura 3-2. Equipo de destilación fraccionada armado en el laboratorio para la purificación de TEOS. Se adaptó una trampa de cloruro de calcio (anhidro) en una de las salidas del refrigerante para imponer una barrera al ingreso al sistema de la humedad del ambiente.

Por otra parte, en las reacciones en las que se utilizaron colorantes, se buscó proteger los reactores de la luz ambiente. Así, siempre se cubrieron con papel de aluminio en todas las etapas de reacción, desde la adición del colorante.

Las NP siempre se purificaron mediante ciclos de centrifugación-sonicado. La velocidad y el tiempo de centrifugación se eligieron de acuerdo al tamaño de las NP.

3.3.2 Semillas de SiO₂ por el método de Stöber

Las cantidades de los reactivos se calcularon, de acuerdo al tamaño deseado de las NP, utilizando como guía Ecuación (1) de Bogush *et al.*² (Capítulo 1). Los diámetros típicos buscados fueron de 100 nm.

En un balón de 100 ml (Vol. total de reacción 55 ml) se pesaron 39,4 g de EtOH absoluto (0,856 mol), 0,971 g de H₂O (0,054 mol) y 1,7 g NH₃ (c) (~0,1 mol). Bajo agitación vigorosa, se agregaron 2,25 ml de TEOS (0,01 mol) y el sistema se dejó agitando durante 18 horas a temperatura ambiente. El diámetro hidrodinámico se monitoreó por DLS (cerca de 115 nm con este protocolo). Las NP se purificaron mediante ciclos de centrifugación-sonicado con EtOH de farmacia.

3.3.3 APTES@SiO₂ por modificación del método de Stöber

En una botella de vidrio se preparó una solución con 157,5 g de EtOH absoluto, 3,7 g de agua mQ y 6,7 g de NH₃ (c). Bajo agitación vigorosa se agregaron 8,6 g (4,1 mmol) de TEOS a la solución. Se dejó agitando la mezcla de reacción durante 5 horas a temperatura ambiente a una velocidad moderada, y al cabo de ese tiempo se observó un aumento de la opalescencia. Se agregó a la mezcla una solución preparada mezclando 0,3 ml de APTES con 5 ml de EtOH absoluto. Se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas y, una vez transcurrido ese tiempo, la suspensión resultante se centrifugó (7200 rpm, 30 minutos) y se separó el sobrenadante. Las NP así obtenidas se purificaron

mediante ciclos de centrifugado-resuspensión con EtOH y agua desionizada, hasta que el sobrenadante alcanzó un pH de 7. Las NP se secaron bajo vacío a 60°C durante 16 horas y así se obtuvo el producto como un fino polvo blanco.

3.3.4 Cy-PIP@SiO₂

Se agregaron 100 µL de una solución de 1,1-carbonildiimidazol (11,6 mg) en DMF anhidra (1,0 ml) sobre una solución de Cy-PIP (4,2 mg) en DMF anhidra (250 µL). El sistema fue purgado con nitrógeno y agitado durante 1 hora hasta completar la activación de los ácidos carboxílicos de la molécula. Luego, la mezcla de reacción fue agregada sobre una suspensión bien dispersa de 20,9 mg de APTES@SiO₂ en 200 µl de DMF. Se dejó que la mezcla reaccionara *overnight*, protegida de la luz. Luego, se eliminaron los remanentes de reactivos mediante ciclos de centrifugación y resuspensión, hasta no observar más emisión de fluorescencia en el sobrenadante ($\lambda_{\text{exc}} = 650 \text{ nm}$).

3.3.5 MB@ SiO₂

3.3.5.1 Por modificación del método de Stöber (MB@SiO₂-ST)

El volumen de reacción fue de 40 ml y con las siguientes concentraciones de los reactivos principales: 0,17 M de TEOS, 4,6 M de agua y 0,53 M de NH₃.

Procedimiento general:

En una botella de vidrio se colocaron 27,5 g de EtOH absoluto, 2,4 g de agua mQ y 1,3 g de NH₃ (c), bajo campana. Se adicionó un pequeño volumen de solución etanólica de MB (*Solución 1*). Bajo agitación vigorosa, se agregaron 1,52 ml (1,43 g; $6,86 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$) de TEOS. El reactor se cubrió de la luz y se dejó

agitando durante 24 horas. A las 2 horas de reacción ya se observaba una mayor opalescencia en las soluciones. Para aislar las NP, se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos y se obtuvieron un residuo sólido azul o celeste según el caso y un sobrenadante de color violeta. Los precipitados de NP se purificaron por ciclos de centrifugación-sonicación, hasta no observar MB en el sobrenadante por espectroscopía UV-visible.

La *Solución 1* se preparó con x mg de MB $C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 3H_2O$ (MW 373,85) en 0,5 ml de EtOH absoluto, donde x fue: a) 5,1 mg ($1,36 \cdot 10^{-5}$ mol) o b) 0,51 mg ($1,36 \cdot 10^{-6}$ mol). En el caso a) la relación molar MB: SiO_2 resulta de 1: 500 (MB@ SiO_2 -ST-1) y, en el caso b) de 1: 5000 (MB@ SiO_2 -ST-2).

Los productos de ambas síntesis se caracterizaron por DLS, SEM, espectroscopía UV-visible y espectroscopía de fluorescencia.

3.3.5.2 Por microemulsión inversa (MB@ SiO_2 -ME)

NP núcleo

La solución de microemulsión (ME) se preparó mezclando cantidades adecuadas de surfactante, co-surfactante, disolvente orgánico, solución acuosa de colorante y NH_3 (c), que actúa como catalizador para la hidrólisis de los silanos. El volumen total inicial del lote fue de 227 ml. La relación molar agua/surfactante fue 10,7. Se variaron las relaciones molares de TEOS-HDTMOS (hexadecil-trimetoxisilano) sin variar los moles totales de silano para obtener 3 tipos de NP diferentes: 1/3 (MB@ SiO_2 -ME-1), 2/2 (MB@ SiO_2 -ME-2) y 3/1 (MB@ SiO_2 -ME-3).

Procedimiento general para MB@ SiO_2 -ME-2: la solución de la ME se preparó mezclando 34,8 g de Triton-X (55,7 mmol), 32 ml de *n*-hexanol (26,05 g, 254,9 mmol), 150 ml de ciclohexano (116,85 g), 8 ml de agua mQ (8 g, 444.4 mmol) y 1,2 ml de una solución acuosa de MB 0,1 M (0,12 mmol MB, 66,7 mmol agua). Luego, se agregaron 2,4 ml de NH_3 (0,60 g NH_3 , 35,3 mmol NH_3 , 1,56 g

H₂O, 86,7 mmol H₂O). Bajo agitación, rápidamente se agregó una mezcla de 1760 µl de HDTMOS (1,566 g, 4,52 mmol) y 1000 µl de TEOS (0,933 g, 4,48 mmol). Luego de 18 horas de reacción bajo agitación moderada, se separaron 5 ml del lote como contramuestra y el resto del volumen se dividió en dos fracciones, para sintetizar NP núcleo-cáscara como se detalla a continuación.

NP núcleo-cáscara

Reacciones

1) MB@SiO₂-ME

Se agregaron 125 µl de TEOS y 375 µl de NH₃ (c) a 50 ml de mezcla de reacción de NP núcleo y la mezcla se dejó agitando durante 18 horas.

2) MB@SiO₂-ME-NH₂

Se agregaron 375 µl (0,356 g, 1,60 mmol) de APTES y 1125 µl de NH₃ (c) a 172 ml de mezcla de reacción de NP núcleo. Se dejó reaccionar bajo agitación por un lapso de 18 horas.

Purificaciones

Para romper las emulsiones, a cada lote se agregaron 20 ml de acetona por cada 50 ml de volumen de reacción. La mezcla se dejó reposar durante 1 hora y se observó turbidez en el fondo de los frascos de reacción. Se separó el sobrenadante y se recuperó el precipitado con EtOH. Las suspensiones etanólicas de NP se purificaron por ciclos de centrifugación-resuspensión (7500 rpm, 1 hora) en EtOH y agua mQ hasta que el pH de los sobrenadantes se acercó a 7.

En el caso de que MB@SiO₂-ME-NH₂ fueran a utilizarse en reacciones de funcionalización de la superficie, las NP se secaron a 60°C durante 3 horas y luego bajo vacío a temperatura ambiente hasta peso constante. El producto se obtuvo como un fino polvo azul. Caso contrario, las suspensiones etanólicas se conservaron en heladera, protegidas de la luz.

3.3.6 NP duales [Ru(bpy)₃]²⁺@SiO₂-NH-Cy-PIP

3.3.6.1 [Ru(bpy)₃]²⁺@SiO₂-NH₂

Se realizaron mediante una modificación del método reportado por Mirenda *et al.*³

Primero se sintetizaron semillas de SiO₂ con el protocolo descrito en la Sección 3.3.2. A las 2 horas de reacción, se agregó a la mezcla una solución preparada con 0,57 mg de Ru(bpy)₃.Cl₂.6 H₂O en 0,5 ml de EtOH absoluto junto con 100 µl de TEOS. Luego de 1 hora se adicionaron 100 µl de TEOS (en 0,3 ml de EtOH) y, después de otra hora, 100 µl más (en 0,3 ml de EtOH). Luego de 1 hora más, se agregaron 100 µl de APTES (en 0,5 ml de EtOH) y la mezcla de reacción se dejó agitando *overnight*.

Las NP se purificaron mediante ciclos de centrifugación (7500 rpm, 15 min)-resuspensión. Parte del lote se secó en estufa a 60°C durante 1 hora y luego en estufa de vacío a temperatura ambiente. Las NP se obtuvieron como un polvo amarillo.

3.3.6.2 Post-funcionalización con Cy-PIP

El grupo -COOH de Cy-PIP se activó con CDI en DMF (anh) de forma análoga al procedimiento descrito en la Sección 3.3.4. Para ello, en un vial se mezclaron una solución preparada con 1,1 mg de Cy-PIP y 200 µl de DMF y una solución de 12,2 mg de CDI en 600 µl de DMF. Se dejó reaccionar 1 hora protegido de la luz (*Solución A*). Mientras, en un vial de vidrio de 5 ml se pesaron 170 mg de NP [Ru(bpy)₃]²⁺@SiO₂-NH₂ y se dispersaron en 700 µl de DMF. A dicha suspensión de NP se le agregaron 750 µl de la *Solución A*, y se

dejó agitando *overnight*. Las NP se recuperaron por centrifugación (13000 rpm, 15 min) y se lavaron con etanol y agua para eliminar los restos de imidazol de la reacción de acoplamiento.

3.3.7 NP duales MB@SiO₂-ME-1-NH-CyTest

Se prepararon soluciones madre de Cy-Test en DMF (1,84 mg/ml) y de CDI en DMF (10 mg/ml). En un vial de vidrio provisto de una barra magnética para agitación se mezclaron 22 µl de solución madre de Cy-Test y 200 µl de solución madre de CDI. Se agregaron 800 µl de DMF y se dejó que la reacción procediera durante 1 hora bajo atmósfera de nitrógeno. Luego se agregó al vial de reacción una dispersión de MB@SiO₂-ME-1-NH₂ (secas) en 1 ml de DMF y se dejó reaccionar durante 18 horas, protegido de la luz.

Las NP se lavaron con etanol mediante ciclos de centrifugación (12000 rpm, 30 min)-sonicado.

3.3.8 ATTO488@SiO₂

La inclusión del colorante se realizó por co-condensación de TEOS y del derivado APTES del ATTO 488.

Síntesis del silano APTES-ATTO488

Se realizaron dos protocolos, dependiendo del colorante de partida. Con ATTO 488 en su forma de ácido carboxílico libre, se realizó una activación con CDI de forma análoga a lo explicado en secciones previas.

Cuando se utilizó ATTO 488 en forma de éster de N-hidrosuccinimida (NHS), la reacción se llevó a cabo en DMF (1100 µl) a partir de 0,2 mg de colorante ($2,04 \cdot 10^{-7}$ mol), 10 µl de APTES ($4,28 \cdot 10^{-5}$ mol). El vial de reacción se

selló, se purgó con nitrógeno y se dejó agitando durante 2 horas, protegido de la luz. La solución de reacción (color rojiza) se llamó *Solución A*.

Síntesis de NP ATTO488@SiO₂-VS

Se sintetizó a partir de una variación del protocolo reportado por Penelas *et al.*⁴ En un balón de 100 ml se pesaron 48,04 g EtOH absoluto, 1,13 g de H₂O mQ, y 2,7 ml de NH₃ (c). Bajo agitación vigorosa, se agregó rápidamente una solución preparada con 3 ml de TEOS, 9,64 g de EtOH absoluto y 550µl de *Solución A*. Se dejó agitando la mezcla durante 18 horas. Se controló el tamaño por DLS, y se obtuvo un diámetro hidrodinámico (EtOH) de 96 nm (PDI 0,073). Sobre esa base, y a partir de consideraciones de tamaño, se calculó agregar 969 µl de viniltrietoxisilano (VTES) a la reacción (50 monocapas). Nuevamente, la mezcla se dejó reaccionar *overnight*. Se realizaron tres arrastres a presión reducida (30°C) hasta la mitad del volumen y se repuso EtOH fresco cada vez, para eliminar el NH₃ de la reacción. Después de la destilación, el pH fue de 7. Luego se eliminó el exceso de VS por ciclos de centrifugación-resuspensión en EtOH. Las NP así obtenidas (~6 % p/v) se utilizaron en el paso siguiente de reacción.

Considerando un rendimiento de 100% para la formación de las NP a partir de TEOS, se esperaban ~0,8 g de NP (*Lote de VTES*).

Reacción click tiol-eno sobre la superficie

Se separó una tercera parte del volumen del *Lote de VS* (~0,3 g NP, ~6 % p/v) para esta reacción. En una botella de 50 ml se pesaron 0,2580 g de ácido mercaptosuccínico (MSA) (relación molar VS-MSA 1:1) y 0,0625 g de benzofenona (Bzf) (relación molar VS-Bzf 1:0,2). Se ajustó el volumen de reacción con EtOH para que la suspensión de NP fuera ~1% p/v. Bajo agitación, se irradió la suspensión con una lámpara de tubo de 15 W de potencia y una longitud de irradiación máxima de 352 nm. Una vez finalizada la reacción, la

suspensión se purificó mediante ciclos de centrifugación y resuspensión con EtOH y agua. Las NP se almacenaron en suspensión de EtOH (heladera) para ensayos posteriores.

3.3.9 PTCDA@SiO₂

La sonda PTCDA (Perileno-dianhidrido-3,4,9,10-tetracarboxílico) se encapsuló en la matriz de sílice por el método de microemulsión inversa, de forma análoga a lo descrito para las NP núcleo-cáscara MB@SiO₂ de la Sección 3.3.5.2.

3.4 Caracterización rutinaria de los materiales

3.4.1 Dispersión dinámica de luz (DLS)

El equipo empleado fue un BI-200 SM (Brookhaven Instrument) equipado con un detector de fotodiodo de avalancha (λ 637 nm). Dicho equipo cuenta con un accesorio para termostatizar la celda de medición. En general, las muestras se prepararon a partir de la dilución de 50 μ l de suspensión madre de NP (~1% p/v, EtOH) en 15 ml del solvente en el que se quisiera evaluar el diámetro hidrodinámico (EtOH absoluto o agua mQ, en general). Las muestras se sonicaron durante 15 minutos en viales especiales para DLS. Las temperatura de las muestras se estabilizó a 25°C en la celda de medida (15 minutos). En la mayoría de los casos, se midió la dispersión dinámica de luz a 90°. En algunos casos, se trabajó a ángulo variable, midiendo la dispersión dinámica de luz desde 30° a 150°, cada 10°. Los diámetros hidrodinámicos que el *software* de Brookhaven informa se calcularon a partir de aplicar el método de Análisis de Acumulados y teniendo en cuenta la Ecuación de Stokes-Einstein. Asimismo,

otro dato valioso del análisis de DLS es el índice de polidispersión (PDI), relacionado con el ancho de la distribución del tamaño de partícula.

3.4.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Se utilizó un equipo *Nicolet Magna 560* con un detector MCT-A en modo DRIFTS (Espectroscopía infrarroja de reflectancia difusa por Transformada de Fourier). Para enfriar el detector se utilizó nitrógeno líquido.

Las NP se secaron bajo vacío a temperatura ambiente hasta peso constante antes de las medidas. Las muestras se prepararon como mezclas 1% p/p de NP muestra en KBr calidad espectroscópica. Las mezclas se homogeneizaron en un mortero de ágata previo al montaje en los soportes de DRIFTS.

3.4.3 Potencial zeta

Las mediciones se realizaron en un equipo *Zetasizer 2000* (*Malvern Instruments Ltd.*). Las muestras se prepararon en soluciones acuosas de KCl 10 mM de diferente pH (ajustado con pequeñas alícuotas de HCl y NaOH) 0,1 M, y medido con un pH-metro *Metrohm 691* adecuadamente calibrado). A 20 ml cada una de las soluciones se le añadieron 100 µl de suspensión de NP muestra (concentración final ~0,015 % p/v). Se verificó el valor del pH con pH-metro. Entre muestra y muestra, el canal de inyección se lavó 3 veces con agua mQ y KCl 10 mM.

3.4.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las micrografías de FE-SEM se tomaron en un microscopio *Zeiss Leo 982 Gemini* (CMA, FCEN, UBA) en el modo de electrones secundarios. Los análisis de las imágenes se realizaron con el programa libre Image J. En general, para cada imagen, se midió el diámetro de 100 NP, se calculó el promedio y la desviación estándar.

3.4.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las imágenes de TEM se tomaron en un microscopio *TEM Philips EM 301* (CMA, FCEN, UBA). Los análisis de las imágenes se realizaron de forma análoga a las de SEM.

3.5 Espectroscopías

3.5.1 Generalidades UV-vis y fluorescencia en estado estacionario

En general, todas las medidas de fluorescencia en estado estacionario (incluyendo la anisotropía) se realizaron en colaboración con el Dr. Martín Mirenda, investigador de CONICET con lugar de trabajo en CNEA.

Las medidas de absorción UV-visible se realizaron en un espectrofotómetro *Cary 50 Conc UV-Vis (Varian)*, equipado con un portamuestras termostatzado. En la mayoría de los casos, se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

Los espectros de fluorescencia de estado estacionario se registraron en un Fluorómetro *Felix X32 PTL*, equipado con una lámpara de xenón UXL-75XE y un portamuestras termostatzado. Tanto los monocromadores de excitación como los de emisión presentan rejillas de 1200 líneas/mm, en las que 1 mm corresponde a un ancho de banda de 4 nm. Las rendijas de excitación y emisión

se ajustaron de acuerdo a los requerimientos de cada experimento. Sin embargo, para medir soluciones típicamente se utilizaron (tanto en excitación como emisión) en 0,5 mm (2 nm) y, para medir coloides en 1,5 mm (6 nm).

Las medidas de anisotropía de fluorescencia se realizaron con el mismo fluorómetro, agregando polarizadores en la excitación y en la emisión. La anisotropía de fluorescencia en estado estacionario $\langle r(\lambda) \rangle$ se calculó a cada longitud de onda de emisión mediante las ecuaciones (1) y (2):⁵

$$\langle r(\lambda) \rangle = \frac{I_{VV}(\lambda) - I_{VH}(\lambda)G(\lambda)}{I_{VV}(\lambda) + 2I_{VH}(\lambda)G(\lambda)} \quad (1)$$

$$G(\lambda) = \frac{I_{HV}(\lambda)}{I_{HH}(\lambda)} \quad (2)$$

$I(\lambda)$ representa la intensidad de emisión y los subíndices denotan la orientación del vector, linealmente polarizado, de los haces de excitación y emisión respectivamente. V indica polarización vertical mientras que H representa polarización horizontal con respecto al plano de incidencia. El factor $G(\lambda)$ corrige las diferencias de sensibilidad de los elementos ópticos del espectrofluorómetro en la dirección de polarización de la luz.

Para coloides, las medidas de anisotropía se llevaron a cabo de forma análoga a las medidas de moléculas, pero utilizando DMF como solvente.

Si bien el fenómeno de dispersión de luz coloidal es la base de técnicas como DLS, en el caso de la espectroscopía UV-visible, complica el análisis de la absorción de luz ya que debe tenerse en cuenta una componente dispersiva (que posee una dependencia con $1/\lambda^4$) en la señal de absorción. Una forma de solucionar parcialmente este problema es elegir un solvente que posea un índice de refracción similar a las NP como medio dispersante. La DMF es un solvente adecuado pues tiene un índice de refracción de 1.4288 (298.15 K)⁶, muy similar al de las NP de SiO₂, que puede tomarse como 1.475⁷, valor altamente dependiente del grado de porosidad o condensación de las redes de Si-O-Si.

Dado que la dispersión de luz es función de la diferencia entre los índices de refracción entre las NP y el solvente, minimizar este contraste permite discernir las bandas de absorción de los colorantes inmovilizados en las NP.

Así, para evaluar el espectro de absorción de colorantes inmovilizados en matrices de SiO₂, en la mayoría de los casos se utilizaron dispersiones en DMF. Luego de restar la absorción del blanco de solvente (DMF), los espectros se corrigieron por el efecto residual de la dispersión de luz, simulando una línea de base de dispersión (función exponencial entre 400 y 800 nm, muy similar a un decaimiento proporcional a $1/\lambda^4$) a partir de los espectros experimentales con un programa creado en MATLAB. Los espectros que se presentan en el Capítulo 7 NP de MB@SiO₂ se han corregido de esta manera.

Por otra parte, las curvas de titulación tanto de moléculas como de NP por absorbancia y por fluorescencia se llevaron a cabo en cubetas de cuarzo de 1cmx1cm, bajo agitación. Las muestras se prepararon en buffer PBS 10 mM ((Cy-PIP) < 10 μ M o 200 μ l de suspensión de NP ~10 mg/ml EtOH en 2 ml de PBS) y el pH se ajustó con un microelectrodo mediante el agregado de pequeños volúmenes de HCl y NaOH 1 M. Todas las soluciones se filtraron previo a su uso con filtros de jeringa de 0,22 μ m. Los espectros se corrigieron por línea de base y por dilución y, en algunos casos de medidas de coloides, fue necesaria una corrección por dispersión de luz a partir de medir una dispersión blanco de NP o, de simular una función de corrección.

3.5.1.1 Estimación de la liberación de MB de MB@SiO₂-ST

Típicamente, las NP se guardaron suspendidas en EtOH absoluto protegidas de la luz hasta el momento del ensayo. Para evaluar la liberación e colorante de MB@SiO₂-ST, se partió de un volumen total de 7,5 ml de suspensión. Se centrifugaron dichas suspensiones (5000 rpm, 20 minutos) y se separaron los sobrenadantes etanólicos para su posterior medición por UV-

visible. Por otra parte, las NP ya centrifugadas se reconstituyeron en su volumen original de 7,5 ml de EtOH absoluto, se sonicaron durante 30 minutos y se tomaron alícuotas de alrededor de 0,3 ml que se trasvasaron a eppendorfs limpios. Dichas alícuotas se centrifugaron en microcentrífuga a 12000 rpm durante 15 minutos, se separaron los sobrenadantes etanólicos y se agregaron 0.8 ml de DMF calidad espectroscópica. Se sonicaron durante 30 minutos y, luego se midieron en el espectrofotómetro UV-visible utilizando DMF como solvente y realizando diluciones adecuadas.

En todos los casos, y por supuesto teniendo en cuenta las diluciones, se evaluó la relación molar de dímero de MB en el sobrenadante respecto de las NP para todo el volumen total de suspensión (7,5 ml). Se tomó la absorbancia a 597 nm en todos los casos (máximo del dímero) y se consideró un 100% de dímero para las NP, sobre el cual se calculó la contribución porcentual del dímero en el sobrenadante etanólico.

3.5.2 Fluorescencia resuelta en el tiempo

Todas las medidas resueltas en el tiempo se llevaron a cabo en colaboración y bajo la supervisión del Dr. Pedro Aramendía en el CIBION-CONICET.

Se realizaron medidas de tiempo de vida de Cy-PIP en mezclas de MeOH-buffer PBS 50:50 a diferentes pHs básicos (8,85; 8,38; 8,01 y 7,53). La concentración utilizada de fluoróforo fue siempre menor a 5 μ M.

Las curvas de decaimiento de emisiones dependientes del tiempo se registraron equipo IBH-Horiba-Jovin-Ivon *Time Correlated Single Photon Counting*. La muestra fue excitada con un nanoLED de pulso a 653 nm. La luz pasó a través de un monocromador antes de incidir en la muestra en una cubeta de cuarzo de 10 x 10 mm. La dependencia de la detección con la polarización se eliminó utilizando la condición de “ángulo mágico” (polarizadores de

excitación y emisión a 0° y 54,7°, respectivamente). Usando filtros de emisión adecuados, la señal de emisión fue registrada en por un fototubo multiplicador. Se utilizó una configuración de detección de 13,7 ps/canal para todas las medidas.

Los ajustes mono y bi-exponenciales se realizaron utilizando el software de deconvolución *IBH DataStation*.

3.5.3 Rendimiento cuántico de fluorescencia de MB@SiO₂

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia experimentales (Φ_f) se obtienen utilizando la siguiente ecuación:

$$\Phi_f = \Phi_f^R \frac{(1 - 10^{-A_R})J_M}{(1 - 10^{-A_M})J_R} \quad (3)$$

siendo Φ_f^R el rendimiento cuántico de fluorescencia de una referencia en el mismo medio que la muestra, A_M y A_R las absorbancias de la muestra y la referencia a la longitud de onda de excitación y J_M y J_R el número de fotones emitidos por la muestra y la referencia calculados a través de la siguiente integral:

$$J = \int I(\lambda) d\lambda \quad (4)$$

donde $I(\lambda)$ representa la intensidad de luz emitida por la muestra o por la referencia a cada longitud de onda. Tanto la muestra como la referencia se excitan a la misma longitud de onda.

Como referencia se utilizó MB colorante libre que tiene un $\Phi_F = 0,04$ en etanol.⁸ Tanto los espectros de emisión de MB libre como de las NP MB@SiO₂-

ME-1-¹O₂ ($\lambda_{\text{ex}} = 580 \text{ nm}$) se colectaron luego de desgasar las muestras 15 minutos con nitrógeno.

3.6 Experimentos en células

Los experimentos en células fueron llevados a cabo por el Dr. Federico Coluccio Leskow en el IQUIBICEN-QB, FCEN-UBA.

Se hicieron crecer células HeLa de carcinoma cervical humano (ATCC-CCL-2) en un medio *Eagle* modificado por Dulbecco (GIBCO) suplementado con penicilina, estreptomycin y FBS al 10%, a 37°C en 5% CO₂. Las células se plaquearon 24 horas antes del tratamiento (hasta 1×10^5 por *well*) sobre cubreobjetos de vidrio de 12 mm en 24 *well-plates* para experimentos de microscopía. Para los experimentos de citometría de flujo, se plaquearon de a $2,5 \times 10^6$ células en platos para citometría de 60 mm. Para evaluar la absorción y la internalización de la nanosonda Cy-PIP@SiO₂ por microscopía de fluorescencia, las células fueron tratadas durante 1 hora con diluciones de diferente concentración de NP, lavadas con PBS e incubadas durante 240 min a 37°C en medio de cultivo. Luego fueron fijadas con paraformaldehído al 5% y analizadas en la microscopía. Si bien en el rango de mg/mL las células mostraron protrusiones de membrana y desprendimiento, en el rango de 2 µg/mL no se observó toxicidad biológica aparente, manteniendo una señal robusta de fluorescencia en la ventana de tiempo del experimento.

3.6.1 Microscopía confocal de fluorescencia

La microscopía confocal de fluorescencia de barrido por láser se realizó utilizando un microscopio *Olympus Fluoview FV 1000* con un objetivo de inmersión en agua UPLSAPO 60x 1,2 NA. El colorante DAPI (4',6-Diamidino-2-

fenilindol dihidrocloruro, *Invitrogen*) se utilizó para teñir los núcleos celulares, y se excitó con un láser de 405 nm (en la emisión se usó un filtro pasa banda (BP) de 430–470 nm. Para excitar a Cy-PIP se usó un láser de 637 nm y para recoger su emisión se empleó un filtro pasa banda de 655–755 nm. Para la adquisición de imágenes siempre se utilizó el modo secuencial de barrido.

Se analizaron muestras fijadas a distintos tiempos posteriores a la incubación con NP: 1, 2, 3 y 4 horas.

3.6.2 Citometría de flujo

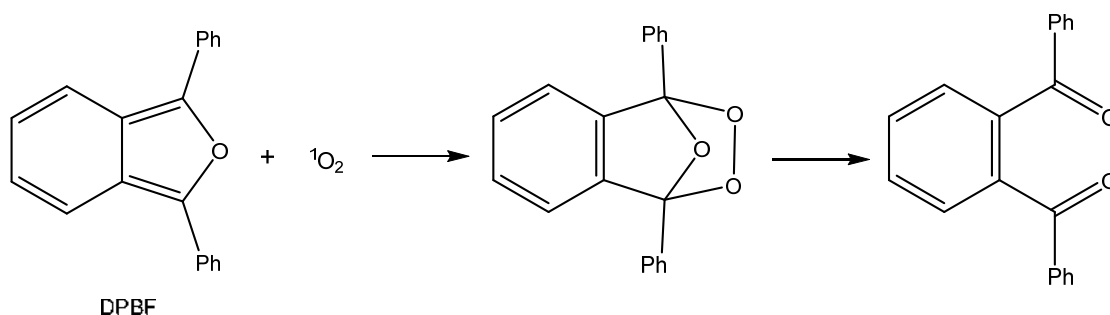
La citometría de flujo se llevó a cabo con un instrumento *Benton Dickinson FACSAriaII*. Para la dispersión de luz en las componentes lateral (SSC) y frontal (FSC) se utilizó un láser 488 nm, y se colectó la dispersión a 530 ± 15 nm. Para excitar a la sonda Cy-PIP se utilizó un láser de 633 nm y la observación de la fluorescencia se realizó a 780 ± 30 nm. Se evaluaron muestras a 1, 2, 3 y 4 horas (como se realizó para la microscopía) una vez transcurrida la incubación con NP. Se realizaron dos experimentos controles: la medición de NP Cy-PIP@SiO₂ y la medición de células HeLa sin tratar con NP.

El análisis de datos fue realizado con el *software* WinMDI Version 2.9. Parte del análisis de datos consistió en generar histogramas para cada tiempo post-incubación (1, 2, 3 y 4 horas) seleccionando una ventana (*gating*) de eventos positivos para la señal de la sonda con aproximadamente el 20% de los eventos a tiempo cero (teniendo en cuenta la autofluorescencia celular basal de los experimentos control de células sin tratar con NP). Para cada histograma se determinó la intensidad de fluorescencia promedio de la población analizada y se estableció un porcentaje de la población celular de la muestra que presentaba mayor intensidad de fluorescencia que la IF promedio (fluorescencia positiva) dentro de la ventana establecida.

3.7 Medición de la generación de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) de MB@SiO₂ con un monitor químico (DPBF)

Estas medidas se realizaron en carácter de colaboración con el Dr. Hernán B. Rodríguez en el Departamento de Química Inorgánica de FCEN, UBA.

DPBF (1,3-difenilisobenzofurano) es un monitor químico muy utilizado para medir $^1\text{O}_2$ en diferentes medios y condiciones.^{9,10} Presenta una banda de absorción con un máximo a 415 nm que desaparece al reaccionar con $^1\text{O}_2$, producto de su peroxidación (Esquema 3-1).^{11,12} Los experimentos con este monitor se realizaron en solución de DMF (para minimizar la dispersión de la luz de las NP).



Esquema 3-1. Reacción de peroxidación del DPBF en presencia de $^1\text{O}_2$.

Se realizó una estimación de Φ_Δ para suspensiones de MB@SiO₂ en DMF (purificada y anhidra). El procedimiento consiste en agregar un pequeño volumen de suspensión de NP (con absorbancia menor que 0,1) dentro de una cubeta de absorción de 1 × 1 cm que contiene la solución con el DPBF. El arreglo experimental puede observarse en la Figura 3-3. Los ensayos fueron realizados utilizando irradiación policromática con una lámpara de proyector (Philips 7748SEHJ, 24V-250W), un filtro de agua y un filtro de corte de 495 nm (Schott GG 495) a fin de evitar la absorción de luz por parte del monitor químico.

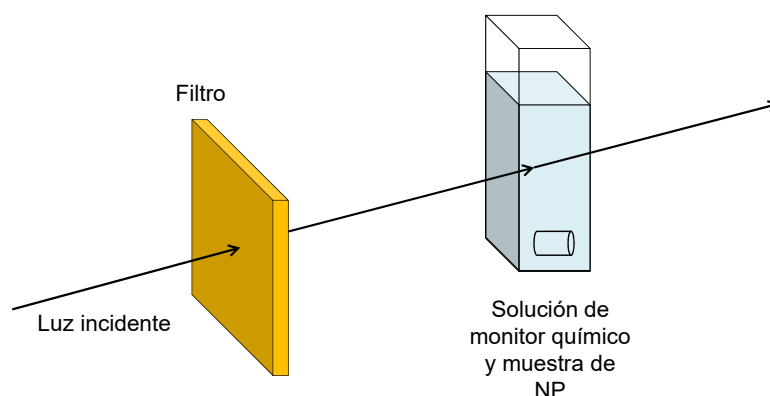


Figura 3-3. Experimento de fotólisis para generar oxígeno singulete a partir de NP MB@SiO₂ en presencia de DPBF.

La cubeta se colocó en su portamuestras y se irradió por un cierto tiempo (cronómetro) con la lámpara, bajo agitación. Inmediatamente se registró el espectro de absorción de la muestra. Este procedimiento se repitió para cubrir una ventana representativa de tiempo de irradiación para cada muestra.

En la aproximación de estado estacionario, la velocidad de desaparición del monitor, v (M s⁻¹), resulta igual a:

$$v = \frac{I_A \Phi_{\Delta} k_Q [Q]}{k_d + k_Q [Q]} \quad (5)$$

donde I_A es la intensidad absorbida por el fotosensibilizador (Einstein L⁻¹ s⁻¹), Q es la concentración de monitor, k_Q la constante de apagamiento (*quenching*) y k_d es la constante difusional del oxígeno en el medio de reacción.

En experiencias bajo irradiación policromática:

$$I_A = \int I_0(\lambda) (1 - 10^{-A(\lambda)}) d\lambda \quad (6)$$

donde $I_0(\lambda)d\lambda$ es la intensidad de radiación incidente entre λ y $\lambda + d\lambda$, $A(\lambda)$ es la absorbancia del fotosensibilizador a la longitud de onda λ y la

integral se extiende al intervalo de longitudes de onda de medición, limitada por el sistema de radiación utilizado y las características del fotosensibilizador. En las experiencias realizadas, la absorción se colectó entre 350 nm y 700 nm, pero para los cálculos de intensidad absorbida se utilizó el rango 480-700 nm, que es la región en la que absorbe luz el azul de metileno. Los espectros de NP debieron corregirse por dispersión de luz.

En el caso particular en que $k_d \ll k_Q [Q]$, la Ecuación (3) se convierte en:

$$v = I_A \Phi_{\Delta} \quad (7)$$

independientemente de la concentración de monitor, condición que debe ser verificada experimentalmente.

La determinación de Φ_{Δ} se realiza usando un compuesto de referencia con rendimiento cuántico de formación de 1O_2 conocido (Φ_{Δ}^R). A partir de la pendiente del gráfico absorbancia vs. tiempo para la muestra (M) y para la referencia (R) se pueden obtener las velocidades v_M y v_R , respectivamente. Utilizando la siguiente ecuación se calcula Φ_{Δ}^M :

$$\Phi_{\Delta}^M = \frac{v^M I_A^R \Phi_{\Delta}^R}{v^R I_A^M} \quad (8)$$

En nuestro caso, la referencia fue MB colorante libre que tiene un rendimiento cuántico Φ_{Δ} de 0,52.

3.8 Referencias

1. Obermayer, D. *et al.* Design and Performance Validation of a Conductively Heated Sealed-Vessel Reactor for Organic Synthesis. *J. Org. Chem.* **81**, 11788–11801 (2016).
2. Bogush, G. H., Tracy, M. A. & Zukoski IV, C. F. Preparation of monodisperse silica particles: Control of size and mass fraction. *J. Non. Cryst. Solids* **104**, 95–106 (1988).
3. Mirenda, M. *et al.* Temperature response of luminescent tris(bipyridine)ruthenium(II)-doped silica nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **392**, 96–101 (2013).
4. Penelas, M. J., Soler-Illia, G. J. A. A., Levi, V., Bordoni, A. V. & Wolosiuk, A. Click-based thiol-ene photografting of COOH groups to SiO₂ nanoparticles: Strategies comparison. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **562**, 61–70 (2019).
5. Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. (Wiley-VCH, 2002).
6. Baragi, J. G., Aralaguppi, M. I., Aminabhavi, T. M., Kariduraganavar, M. Y. & Kittur, A. S. Density, Viscosity, Refractive Index, and Speed of Sound for Binary Mixtures of Anisole with 2-Chloroethanol, 1,4-Dioxane, Tetrachloroethylene, Tetrachloroethane, DMF, DMSO, and Diethyl Oxalate at (298.15, 303.15, and 308.15) K. *J. Chem. Eng. Data* **50**, 910–916 (2005).
7. Khlebtsov, B. N., Khanadeev, V. A. & Khlebtsov, N. G. Determination of the size, concentration, and refractive index of silica nanoparticles from turbidity spectra. *Langmuir* **24**, 8964–8970 (2008).
8. Taniguchi, M. & Lindsey, J. S. Database of Absorption and Fluorescence Spectra of >300 Common Compounds for use in PhotochemCAD.

- Photochem. Photobiol.* **94**, 290–327 (2018).
9. Linden, S. M. & Neckers, D. C. Type I and type II sensitizers based on rose bengal onium salts. *Photochem. Photobiol.* **47**, 543–550 (1988).
 10. Bourdelande, J. L. *et al.* Phthalocyanines bound to insoluble polystyrene. Synthesis and properties as energy-transfer photosensitizers. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **108**, 273–282 (1997).
 11. Nowakowska, M., Sustar, E. & Guillet, J. E. Studies of the antenna effect in polymer molecules 25. Photozymes with rose bengal chromophores. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **80**, 369–376 (1994).
 12. Zhang, X.-F. & Li, X. The photostability and fluorescence properties of diphenylisobenzofuran. *J. Lumin.* **131**, 2263–2266 (2011).

4 Una aminotricarbocianina (Cy-PIP) como sensor molecular de pH

4.1 Introducción

Conocer el pH intra y extra celular es de fundamental importancia en lo que respecta a entender procesos fisiológicos y biológicos tales como la endocitosis, el metabolismo celular, el transporte de iones o enfermedades como el cáncer¹. En este contexto, todas las proteínas dependen del pH para mantener su estructura y función, mientras que los procesos de protonación-desprotonación determinan la carga de las superficies biológicas y habilitan diversos caminos metabólicos². En la Figura 4-1 se esquematizan los diferentes pHs de algunos compartimientos de células eucariotas¹.

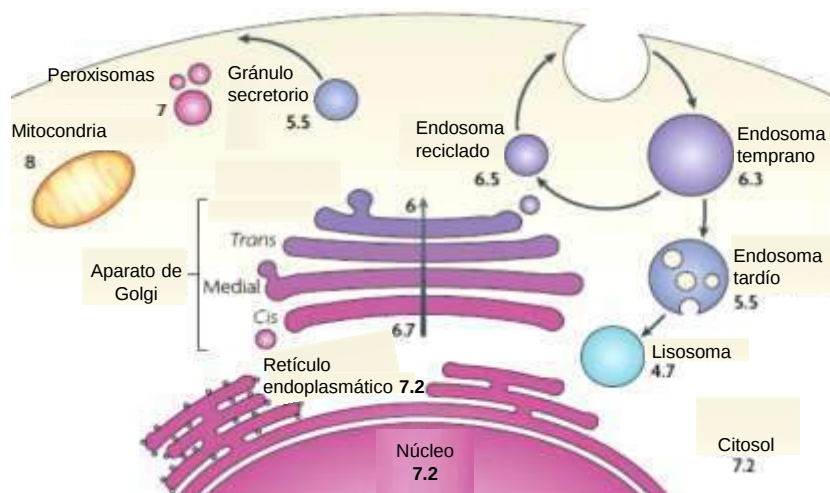


Figura 4-1. pH de los diferentes compartimientos celulares eucariotas. Adaptación de Casey et al. 2010.¹

Un ejemplo de la importancia del pH en los procesos celulares es la alteración del metabolismo de las células tumorales en comparación con células

sanas. En las primeras, la falta de oxígeno y nutrientes lleva a niveles elevados de ácido láctico (bajo pH), que afecta la permeabilidad de la célula a las drogas terapéuticas y, por tanto, promueve la diseminación de tumores^{3,4}. En este contexto, la detección de eventos biológicos y su transducción lumínica estimula la investigación en sistemas moleculares (fluoróforos orgánicos⁵) y de tamaño nanométrico (nanopartículas emisoras^{6,7}). Por otro lado existe un gran interés en el desarrollo de técnicas de visualización (*imaging*) óptica para monitorear la biodistribución de nanofármacos basándose en las propiedades ópticas de los tejidos subcutáneos humanos. Existe una “ventana biológica” de trabajo en la región del infrarrojo cercano del espectro electromagnético (NIR, 650-900 nm) donde los tejidos son relativamente transparentes ya que poseen una baja absorción de luz, autofluorescencia y dispersión de luz.

La síntesis de fluoróforos orgánicos y nanopartículas de “conversión ascendente” (*upconversion*) basadas en lantánidos con actividad en el NIR es altamente relevante debido a su aplicación en biología y medicina⁸⁻¹². La luz de emisión de estos sistemas de NIR tiene alta penetración en tejidos y mínima señal de emisión o fondo (*background*) de los componentes celulares. Técnicas alternativas como la Tomografía por Emisión de Positrones (PET) o la Tomografía Computada por Emisión Monofotónica (SPECT) involucran la utilización de compuestos radiomarcados con bajos tiempos de vida media y equipamientos experimentales complejos con detectores costosos. Así, en comparación con las técnicas de PET y SPECT, la visualización de procesos celulares/tejidos con sistemas fluorescentes activos en el NIR resulta naturalmente ventajoso.

La mayoría de los fluoróforos disponibles para detectar pH en el rango de pH fisiológico (6-8) absorben y emiten luz en la región visible del espectro electromagnético, tienen bajos corrimientos de Stokes y son poco solubles en agua con lo cual es necesario utilizar co-solventes orgánicos citotóxicos^{5,13,14}. Dada la escasa oferta de verdaderos fluoróforos de NIR que superen las

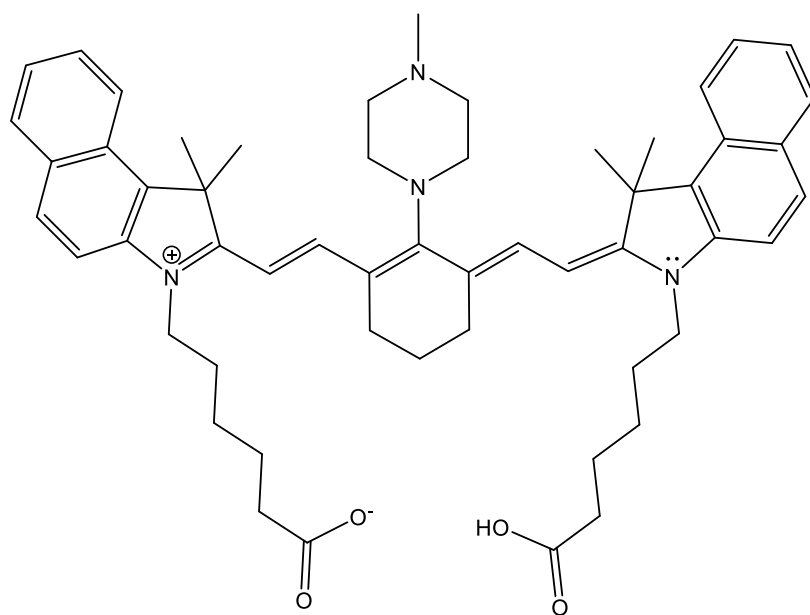
desventajas mencionadas, las tricarbocianinas emergen como candidatos muy convenientes. La síntesis de estas sondas fluorescentes es realmente versátil y las moléculas que se obtienen pueden diseñarse *a priori* para tener una buena solubilidad en agua.¹⁵ Eligiendo adecuadamente los sustituyentes de la molécula, los corrimientos de Stokes resultan muy altos (> 100 nm), de los más altos reportados para sondas fluorescentes. Esta gran separación entre la luz de excitación y la de emisión que se logra cuando se incluye un grupo amino en la posición *meso* de la molécula minimiza el apagamiento por autoabsorción de la luz de emisión y la influencia de la dispersión de luz¹⁶.

Se ha demostrado el excelente rendimiento de este tipo de sondas NIR como marcadores y sensores en células vivas^{17–20}. En particular, sondas sensoras de pH derivadas de tricarbocianinas que contienen piperazina, terpiridina o que tienen a los nitrógenos de los heterociclos como receptores de protones presentan una gran sensibilidad a los cambios de pH^{21–23}. Para el momento en el que nuestro grupo se involucró en esta línea de investigación, no se había reportado una tricarbocianina de NIR sensora de pH con buena solubilidad en agua y un pK_a dentro del rango fisiológico. Esto nos motivó a diseñar una molécula que superara estas dificultades y que, además, tuviera grupos químicos funcionales que permitieran la unión a estructuras supramoleculares y/o materiales.

En este capítulo se describe la síntesis y la caracterización fotofísica de una molécula derivada de las tricarbocianinas que se comporta como sensor molecular fluorescente de pH (de aquí en más, **Cy-PIP**).

4.2 Una estrategia sintética general para las aminotricarbocianinas simétricas

En este apartado nos ocuparemos de la síntesis de las moléculas precursoras y del derivado de interés con propiedades sensoras de pH (**Cy-PIP**). Dicha abreviatura hace referencia al hecho de que la molécula es de la familia de las cianinas (Cy) y se encuentra modificada con una *N*-metilpiperazina (PIP). Decidimos focalizarnos en la obtención de un derivado simétrico (la molécula es equivalente a ambos lados del centro o posición *meso* de la estructura). La estructura de la molécula se muestra en el Esquema 4-1.



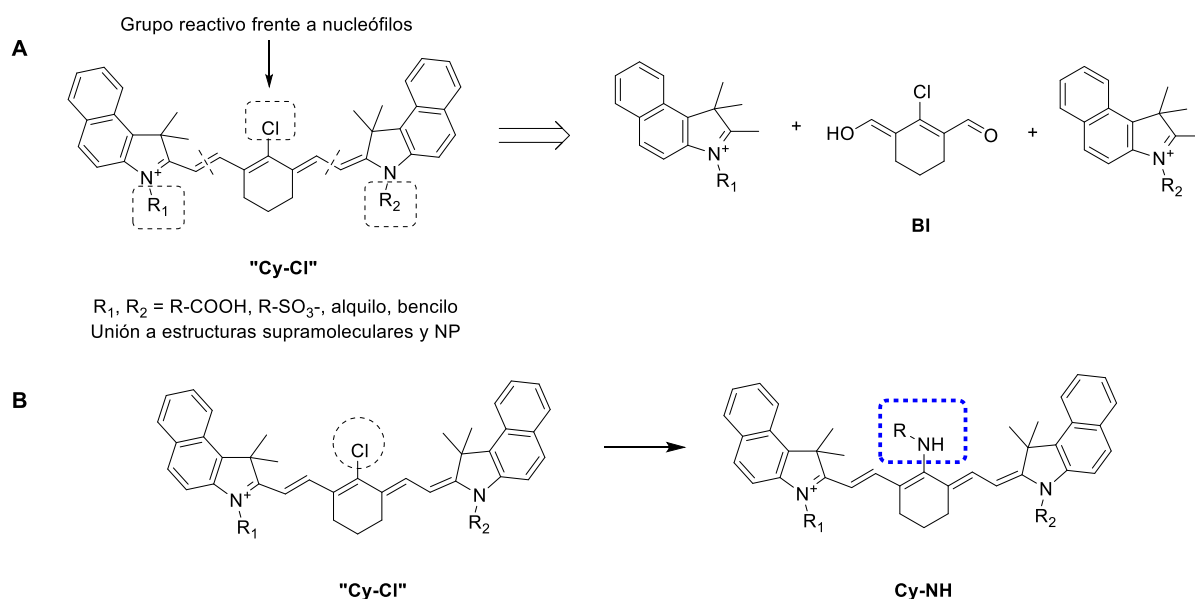
Esquema 4-1. Estructura de Cy-PIP.

En nuestro caso, se desarrolló una síntesis convergente de cuatro pasos, con buen rendimiento en comparación a los reportados en literatura para cianinas similares.²⁴ Todas las reacciones resultaron robustas, reproducibles y escalables a los gramos, un aspecto clave desde el punto de vista sintético.

Más allá de las ventajas que las tricarbocianinas rígidas muestran en cuanto a sus propiedades fotofísicas, como ya explicamos en el Capítulo 1, también poseen una ventaja desde el punto de vista sintético. Tal es así que la ruta sintética de estos compuestos presenta un precursor común de gran versatilidad (“Cianina clorada”, **Cy-Cl**) a partir del cual pueden derivarse

múltiples compuestos fluorescentes con sólo un paso de síntesis (Esquema 4-2 B). Más específicamente, **Cy-Cl** posee un átomo de cloro en la posición *meso* de la molécula que puede ser sustituido fácilmente por diversos nucleófilos (alcóxidos, aminas o tioles) a través de una reacción del tipo Sustitución Aromática Nucleofílica Radicalaria (SRN1), mecanismo al que nos referiremos en detalle más adelante. Sumado a ello, dicho precursor agrega versatilidad a partir de cambiar la identidad de los grupos unidos a la molécula a través del N del indol (R1 y R2).

Por otra parte, en el Esquema 4-2 A se muestran en forma de retrosíntesis las moléculas que dan lugar a la formación de la **Cy-Cl**: los heterociclos N-alquilados y el bisaldehído insaturado (**BI**).



Esquema 4-2. A) Representación esquemática de la retrosíntesis del precursor versátil **Cy-Cl**; B)

Modificación de **CyCl** con nucleófilos amino para obtener aminotricarbocianinas.

4.2.1 Precursor clorado **Cy-Cl**

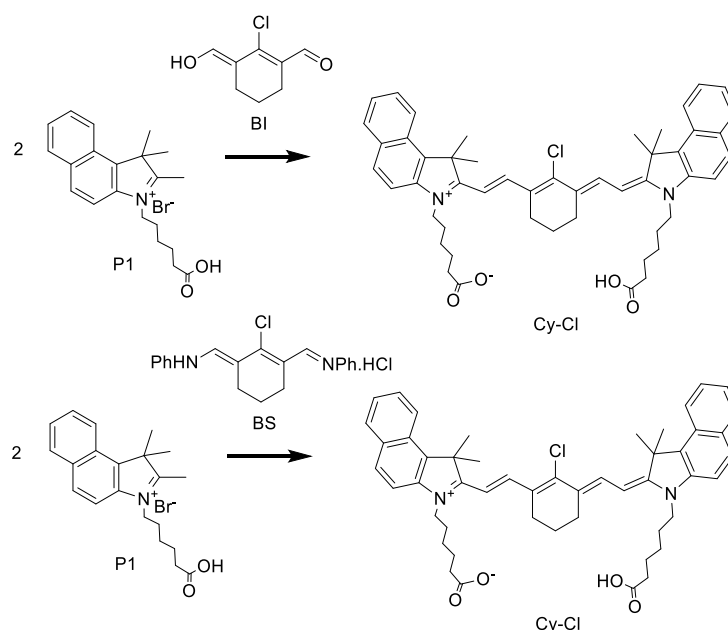
4.2.1.1 Antecedentes

Se pueden desarrollar una gran variedad de tricarbocianinas modificando las cadenas R1 y R2 unidas a los heterociclos. Los derivados resultantes muestran similares propiedades espectroscópicas ya que, mediante estas variantes, no se está afectando directamente a la cadena π - π conjugada. En 1977, Reynolds y colaboradores reportaron por primera vez sondas fluorescentes estables de la familia de los heptametín pirilio que contenían un átomo de cloro reactivo en la posición meso de la molécula.²⁵ Dichos colorantes absorbían luz fundamentalmente en la región del IR, entre 1000 y 1300 nm. En el mismo año, Makin *et al.* reportaron sondas de NIR con otros anillos heterocíclicos en los extremos de la cadena conjugada, de forma tal de obtener compuestos de la familia de las cianinas. El procedimiento sintético incluía una reacción de condensación entre un anillo heterocíclico que contenía un grupo metilo activado y un bisaldehído insaturado o su derivado en presencia de un catalizador como acetato de sodio.²⁶ Las cianinas resultantes ofrecían, además, un grupo funcional nuevo para la modificación posterior. Se trataba de compuestos más versátiles en términos de sus propiedades espectroscópicas, que absorbían luz entre 700 y 1100 nm.

Hasta el día de hoy y, como retomaremos más adelante, la posición *meso* que ocupa el átomo de cloro en las tricarbocianinas ha sido modificada por diferentes nucleófilos: tioles, alcoholes, fenoles, aminas y anilinas. La primera sustitución del cloro de la posición *meso* fue realizada por Streckowski *et al.* en 1992.²⁷ Los autores reportaron la sustitución nucleofílica con metóxido de sodio, metilamina, fenóxido de sodio, tiofenóxido de sodio, tiofenol y 4-aminotiofenol. Así, obtuvieron un amplio espectro de moléculas activas en NIR. La novedosa estrategia sintética abrió las puertas para obtener una diversidad de estructural enorme de tricarbocianinas de NIR.

En 1995, Narayanan y Patonay diseñaron un procedimiento más eficiente de síntesis de heptametincianinas y tricarbocianinas que el reportado por Makin *et al.* en 1977²⁶, que no involucraba la presencia de un catalizador para la

reacción.²⁸ Así, sentaron las bases para disponer de un procedimiento versátil y reproducible para obtener tricarbocianinas variadas, lo cual resultó un aporte muy importante a la síntesis orgánica de moléculas fluorescentes de NIR. Sin embargo, las propiedades fotofísicas (especialmente la emisión de fluorescencia) no habían sido bien caracterizadas hasta el momento. En 1997, Flanagan *et al.* reportaron una novedosa tricarbocianina de NIR modificada con un grupo isotiocianato susceptible de reaccionar con aminas primarias.²⁴ Recapitulando, tenemos dos métodos ampliamente extendidos para la formación del derivado clorado de tricarbocianinas a partir de una reacción de condensación: 1) el método con catalizador y, 2) el método de Narayanan sin catalizador. Asimismo, como reactivo de la reacción de condensación se pueden utilizar esencialmente dos equivalentes sintéticos del mismo bloque de construcción de la cianina. Esto es: en un caso, se utiliza un bisaldehído insaturado (**BI**) sin ningún tipo de purificación para la reacción posterior de condensación²⁹ y, en el otro caso, el bisaldehído se obtiene “protegido” como una base de Schiff (**BS**)²⁴. Más adelante se ahondará en cada uno de los pasos de síntesis, y en el mecanismo de las reacciones relevantes. En el Esquema 4-3 se muestran las dos rutas de síntesis más utilizadas para construir tricarbocianinas, como hemos explicado en los párrafos precedentes.



Esquema 4-3. Esquemas sintéticos para la obtención de tricarbocianinas simétricas a partir del mismo precursor N- alquilado P1 y **BI** (arriba) o **BS** (abajo).

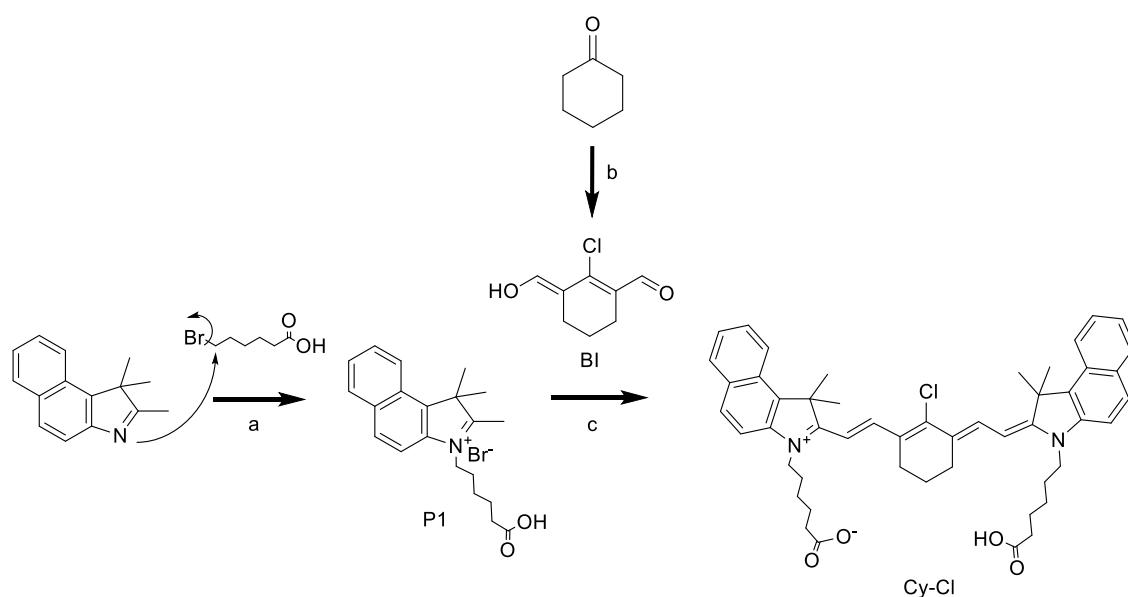
4.2.1.2 Síntesis convergente del Precursor Clorado (Cy-Cl)

La síntesis de **Cy-Cl** se lleva a cabo mediante la condensación de dos 2-metil-aza-heterociclos funcionalizados en el N del heterociclo (P1) con un bisaldehído insaturado (**BI**, o un equivalente del mismo, por ejemplo una base de Schiff), a reflujo en medio neutro (o básico). En esta tesis se trabajó con la estrategia de Narayanan sin catalizador.²⁸ Lógicamente, se pueden lograr diversas estructuras variando la funcionalidad de las moléculas de partida: i) los sustituyentes de los átomos de N de los heterociclos (R1 y R2), ii) la identidad del ciclo que estará en el centro de la cadena poliénica a través de modificar el bisaldehído insaturado (**BI**) y, iii) la identidad de los aza-heterociclos (benzoindol e indolenina).

Combinando estas variables en el diseño de la estructura final es posible controlar la solubilidad, reactividad y propiedades espectroscópicas de las cianinas cloradas derivadas de ellos. En cuanto al punto i), los grupos funcionales más utilizados son cadenas alquílicas derivatizadas con grupos

sulfonato o carboxilato. Estos grupos confieren al compuesto final una mayor solubilidad en agua, a la vez que, en el caso del carboxilato, ofrecen un grupo químico funcionalizable para uniones posteriores, ya sea biomoléculas, superficies variadas y nanopartículas. Asimismo, no es menor el hecho de que los grupos $-\text{SO}_3\text{H}$ y $-\text{COOH}$ son inertes en las condiciones de reacción para la obtención de **Cy-Cl** y para su modificación posterior en la posición *meso* -Cl.

En el Esquema 4-4 se muestra la ruta final diseñada para obtener el precursor **Cy-Cl** en base a lo discutido previamente. El desarrollado de las rutas sintéticas se realizó en colaboración con el grupo de la Dra. Carla Spagnuolo, del DQO-FCEN-UBA, con amplia experiencia en la síntesis orgánica de esta familia de fluoróforos.

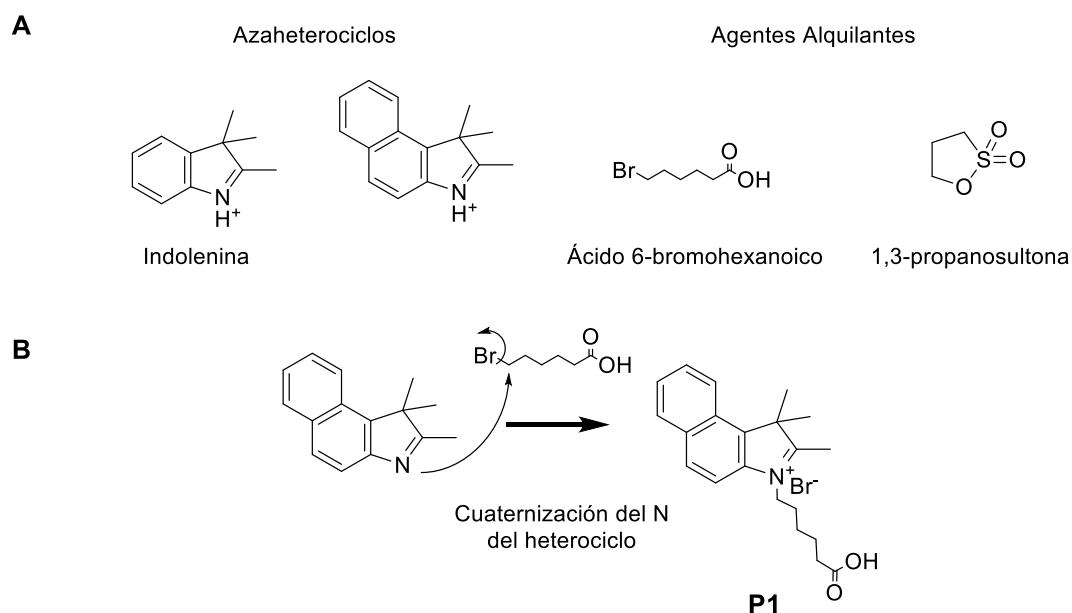


Esquema 4-4. Síntesis convergente de **Cy-Cl**.

Cabe destacar que, en cada paso de síntesis, el producto es fuertemente coloreado lo que permite monitorear las reacciones de una manera sencilla.

4.2.1.2.1 Primer bloque de construcción: el precursor N-alquilado

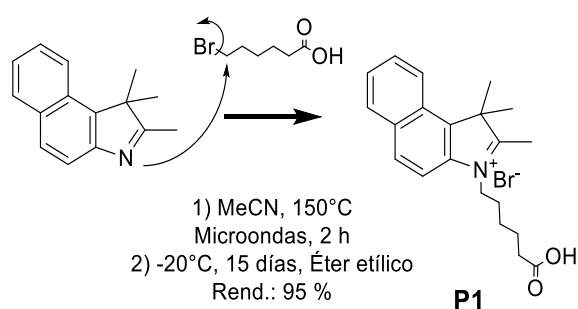
En el Esquema 4-5 se muestran los azaheterociclos comerciales más comunes de partida, junto con dos ejemplos de agentes alquilantes del N del indol (que dan lugar a la funcionalización con R1 y R2), y las reacciones de cuaternización de los N heterocíclicos para la obtención del primer bloque de construcción de la molécula. Se trabajó con los heterociclos 2,3,3-trimetilindolenina (“indolenina”, de aquí en más) y 1,1,2-trimetilbenzo[e]indol (“benzoindol”, de aquí en adelante) y con el alquilante ácido 6-bromohexanoico. En esta tesis sólo se muestran los resultados correspondientes al 1,1,2-trimetilbenzo[e]indol, pues es esta molécula la que estaba menos explorada al momento de comenzar este trabajo y revestía mayor novedad tanto desde el punto de vista sintético (el benzoindol es menos reactivo que la indolenina) como desde el punto de vista fotofísico.



Esquema 4-5. A) Bloques de construcción del precursor alquilado P1 y, B) reacción genérica de alquilación del N del heterociclo.

Cabe destacar que la reactividad del nitrógeno del heterociclo frente al ataque de nucleófilos es mayor para la indolenina en comparación con el benzoindol.³⁰ Jares y colaboradores estudiaron ampliamente la síntesis de tricarbociananas fluorescentes^{18,19}, tal es así que sentaron las bases para gran parte de los conocimientos adquiridos en esta tesis. Uno de los aspectos que los autores establecieron fue la diferencia de reactividad para la *N*-alquilación. En particular, Menéndez³⁰ estudió la alquilación por la vía térmica de indolenina y benzoindol con ácido 6-bromohexanoico en diferentes solventes orgánicos y a distintas temperaturas. Así, observó que los mejores rendimientos se obtenían cuando hacía la reacción a reflujo en tolueno para la indolenina, pero ningún solvente conseguía alquilar el nitrógeno del benzoindol con ácido bromohexanoico por vía térmica. Más aún, reportó la alquilación exitosa de la indolenina en una reacción de microondas utilizando como solvente de reacción acetonitrilo.

Conscientes de esta gran diferencia de reactividad, decidimos desarrollar y optimizar la alquilación de 1,1,2-trimetilbenzo[e]indol con ácido 6-bromohexanoico por la vía de las microondas, sin descartar controles de reacción por la vía térmica. En el Esquema 4-6 se muestra la reacción en las condiciones experimentales más optimizadas que se pudieron lograr.



Esquema 4-6. Reacción de N-alquilación del 1,1,2-trimetilbenzo[e]indol con ácido bromohexanoico por la vía de las microondas.

De esta manera, se probaron diferentes relaciones molares de reactivos, diferentes temperaturas y tiempos de reacción. La reacción de microondas usando una relación molar de 1,1,2-trimetilbenzo[e]indol- ácido 6-bromohexanoico 1: 1,5 se monitoreó por cromatografía en placa delgada de fase reversa (MeOH-ACOH 99,9:0,1). La mejor conversión se obtuvo a las dos horas de reacción y, a partir de ese momento, no se observó más avance. En cuanto a la relación molar, se utilizó un exceso de medio equivalente de agente alquilante respecto del benzoindol, en línea con la baja reactividad de este compuesto frente a la alquilación. Dicha relación molar resulta el mejor compromiso entre obtener un avance de reacción adecuado y no impurificar demasiado el producto con reactivo sin reaccionar. En la Tabla 4-1 se muestra la comparación entre los productos obtenidos mediante la vía térmica y la de las microondas en cuanto al tiempo de reacción, en acetonitrilo. El acetonitrilo, como se vio en el Capítulo 3, es un solvente con un factor de pérdida bajo (0.062) y, por lo tanto, con una capacidad baja de absorción de la energía de microondas. Sin embargo, resulta buen solvente en cuanto a que disuelve los reactivos y, más adelante, al enfriar, el producto precipita con una buena pureza del medio de reacción y se puede recuperar por filtración.

Tabla 4-1. Comparación de las vías térmica y de microondas para la N-alquilación de 1,1,2-trimetilbenzo[e]indol con ácido 6-bromohexanoico (1 eq: 1,5 eq) en acetonitrilo.

Vía	Temperatura /°C	Tiempo	Aspecto sólido crudo
Térmica	82 (reflujo)	4 días	Gris-verdoso (impuro)
Microondas	150	2 horas	Verde

Solamente luego de 4 días de reflujo en acetonitrilo se observó reacción. A la luz de los resultados de la Tabla 4-1, queda claro que la vía de las microondas es la más conveniente para la reacción.

Dado el carácter *zwitteriónico* del producto, una sal interna de bromuro, éste resulta difícil de purificar por técnicas convencionales de química orgánica. En muchos casos, el mayor desafío con esta familia de fluoróforos reside en las etapas de aislamiento y purificación, además de la síntesis en sí. La precipitación del producto crudo de acetonitrilo en frío (-20°C) generó un producto con un muy buen rendimiento (95 %) sin detectarse el reactivo de partida por cromatografía en placa delgada. Así, se pudo continuar el proceso sin realizar purificaciones adicionales.

Por otra parte, se prestó atención al escalado de la reacción. En este caso, se testó la reacción desde los miligramos a los gramos y, en todos los casos, se obtuvieron rendimientos superiores al 80 %, con un rendimiento promedio de (86±7) % en la obtención de 5 lotes diferentes.

La caracterización de este precursor se realizó por RMN ^1H (Figura 4-2).

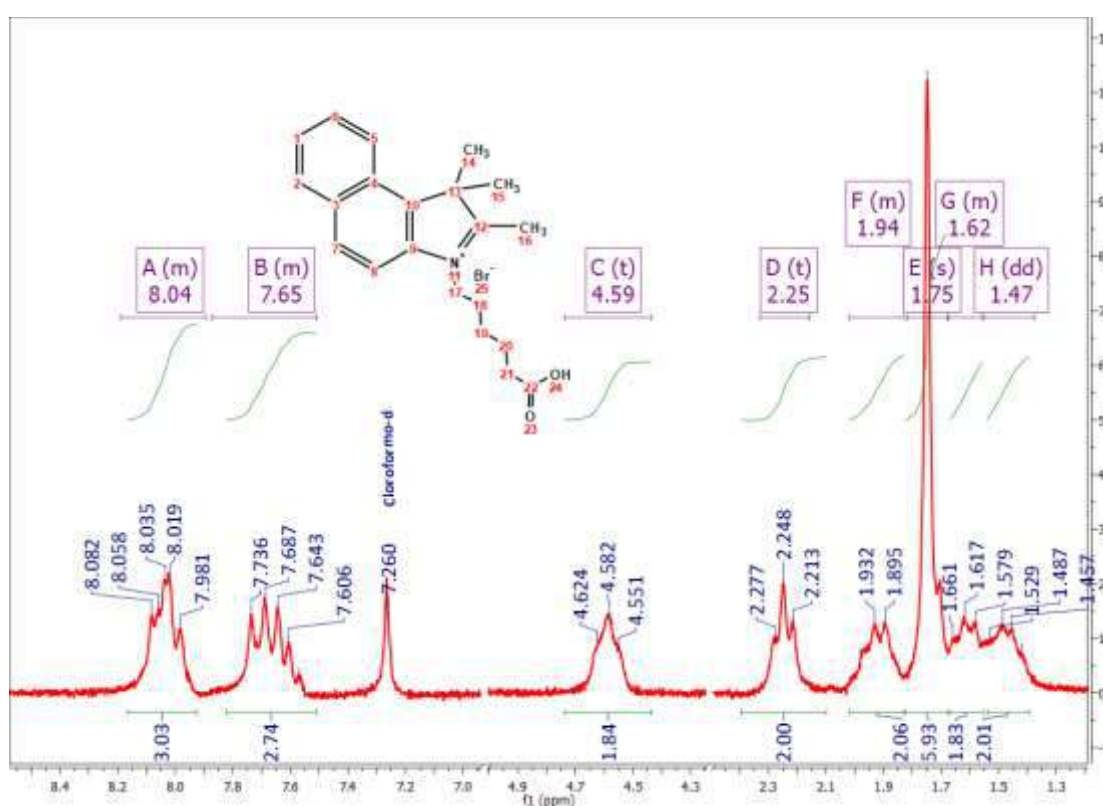


Figura 4-2. Espectro de RMN ^1H del precursor N-alkilado P1 (200 MHz, solvente Cloroforno- d_1).

La señal diagnóstica del espectro es la C, un triplete a 4,59 ppm que integra para aproximadamente dos hidrógenos y se corresponde con los hidrógenos equivalentes del metileno unido directamente al nitrógeno del indol. Se trata de los hidrógenos alquílicos más desprotegidos de la molécula y esto tiene que ver con el carácter catiónico del nitrógeno al que están unidos. Por otra parte, la señal D (triplete, 2,25 ppm) corresponde a los dos hidrógenos del metileno unido al carbono del ácido carboxílico. El singulete E a 1,75 ppm proviene de los 6H de los metilos del benzoindol de partida que también, lógicamente, se encuentran en el producto alquilado. El resto de las señales alquílicas (F, G y H) completan las señales de los metilenos correspondientes a los carbonos 18, 19 y 20, según lo indicado en la Figura 4-2. Por último, nos queda el conjunto de señales A (8,04 ppm) y B (7,65 ppm), que se corresponden con los seis hidrógenos del sistema aromático.

4.2.1.2.2 Síntesis del núcleo de la cianina: el bisaldehído insaturado (BI)

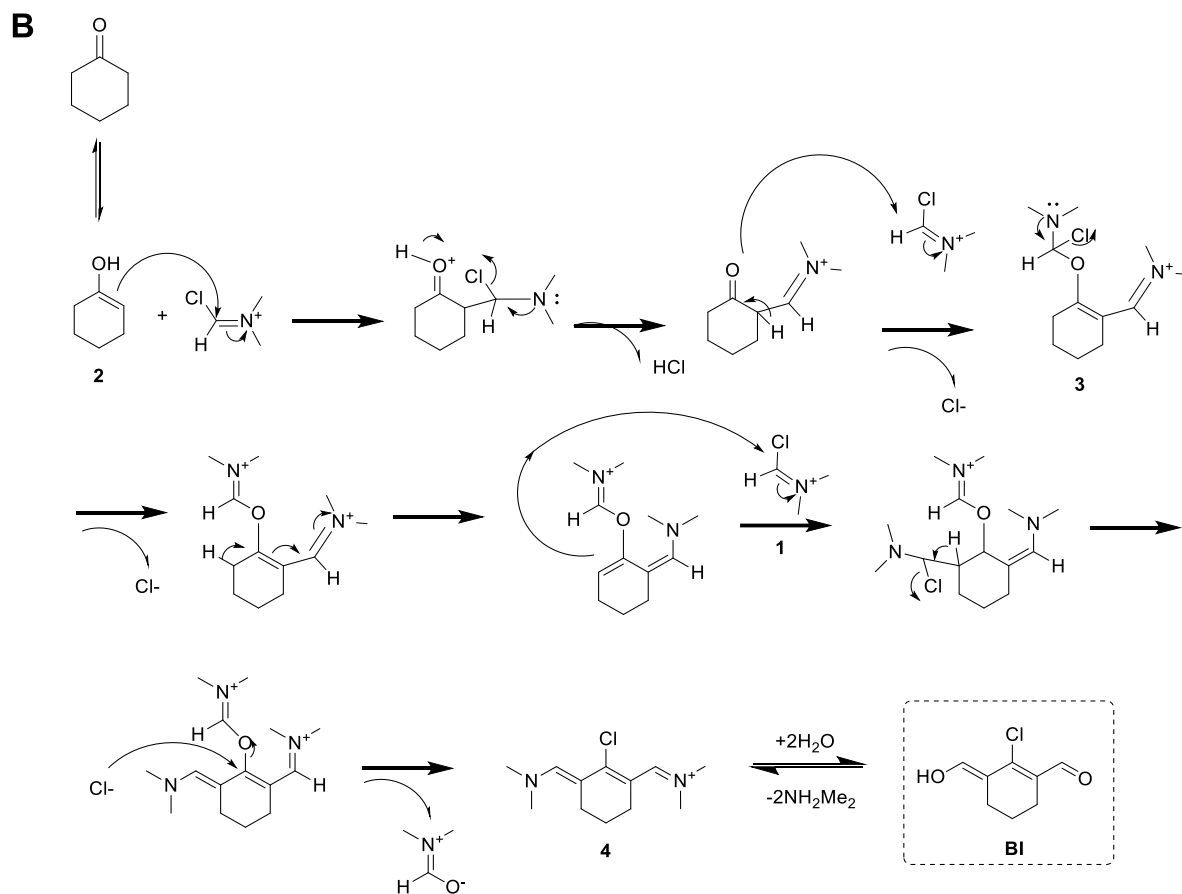
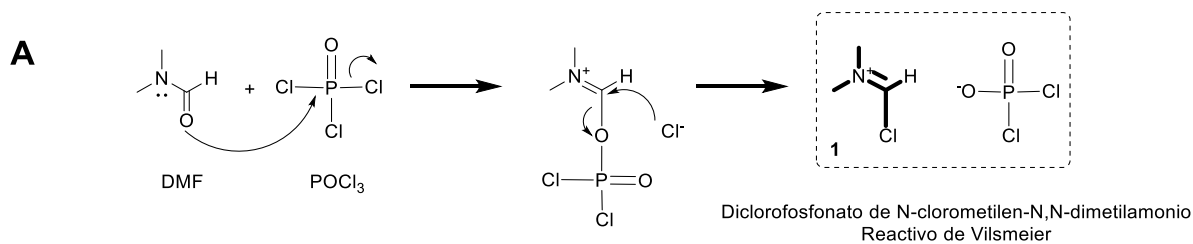
Como ya dijimos en la Sección 4.2.1.1, se tienen dos posibilidades en cuanto la elección del bloque de construcción del núcleo de la cianina: **BI** o **BS**. Si bien **BI** y **BS** son equivalentes sintéticos, existen diferencias de estabilidad y de reactividad. El precursor **BS** es fácilmente cristalizable y más estable que **BI**, tal es así que puede ser almacenado por meses a temperatura ambiente y cubierto de la luz sin signos de descomposición.³⁰ Por su parte, el **BI** es difícil de cristalizar en el medio de reacción y se puede almacenar durante un mes y medio a -20°C y bajo atmósfera de nitrógeno. Sin embargo, y de acuerdo a lo reportado por Zhang y Achilefu, la mejora en la estabilidad se opone a la reactividad del derivado: **BI** muestra una mayor reactividad y mejores rendimientos en la posterior reacción de condensación con los heterociclos *N*-alquilados.²⁹ Esto está en línea con lo reportado por Menéndez, quien comparó la reactividad de BI y BS para dos síntesis de tricarbocianinas cloradas a partir

de precursores *N*-alquilados diferentes. En un caso, reportó una baja de 73% (**BI**) a 58% (**BS**) de rendimiento y, en el otro caso, una disminución de 62% (**BI**) a 48% (**BS**).³⁰ Así, utilizar la molécula protegida **BS** en vez de **BI** impacta en promedio en un 15% en el rendimiento de la reacción de síntesis de la tricarbocianina clorada. Esto se debe a que cuando la reacción de formación de la tricarbocianina clorada se hace con el precursor protegido **BS**, se obtiene una mezcla compleja de productos que resulta difícil de caracterizar, lo que disminuye el rendimiento de la reacción.³⁰

Sobre la base de este conocimiento, se decidió optar por sintetizar el bisaldehído insaturado **BI**. Se tomó la precaución de disponer de precursor *N*-alquilado fresco en cantidad para utilizar todo el **BI** sintetizado en la reacción posterior de síntesis de **Cy-Cl**, pues sabíamos que **BI** no era un precursor estable. El rendimiento promedio que obtuvimos en nuestro laboratorio para el **BI** crudo fue de 46%.

El mecanismo propuesto para la reacción de formación de **BI** se muestra en el Esquema 4-7.³⁰⁻³²

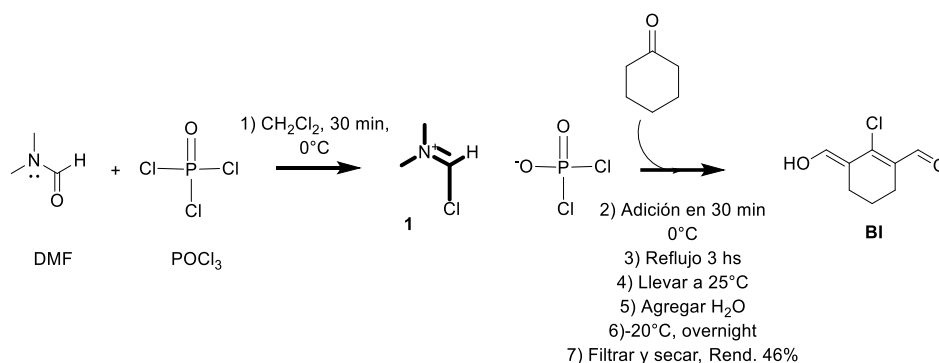
La reacción comienza con el ataque de la dimetilformamida sobre el oxiclورو de fósforo para formar el reactivo de Vilsmeier-Haack, **1** (diclorofosfonato de *N*-clorometilen-*N,N*-dimetilamonio). El mismo se adiciona sobre el enol de la ciclohexanona, **2**, para (luego de la adición de otra molécula de **1**) dar el derivado hemicianina **3**. La reacción posterior de adición de una nueva molécula de **1** seguida de un ataque de cloruro sobre el carbono *meso* del sistema heptametino rinde la base de Schiff derivada de la *N,N*-dimetilamina, la cual se hidroliza para dar el bisaldehído **BI**.



Esquema 4-7. Mecanismo de formación del bisaldehído insaturado a partir del Reactivo de Vilsmeier-Haack.

Así, en el

Esquema 4-8 se muestra la reacción de síntesis de **BI**, tal y como se llevó a cabo en el laboratorio. Luego de la cristalización y el secado se obtuvo un sólido amarillo-anaranjado, tal y como reportan otros autores.^{29,30}



Esquema 4-8. Síntesis de **BI** especificando las condiciones utilizadas en el laboratorio.

La caracterización del bloque de construcción **BI** se realizó por ¹H-RMN y el espectro obtenido se muestra en la Figura 4-3. Lo primero que cabe aclarar es que no se observan las señales de los protones aldehídicos, y esto tiene que ver con que forman parte de un equilibrio tautomérico cuyo tiempo característico muy probablemente sea menor que la escala de tiempo de adquisición del RMN. Tenemos, además, dos tipos de H alquílicos en la molécula, como se ve en la Figura 4-3: los dos correspondientes al metileno “3”, quienes se acoplan con los cuatro H equivalentes “2” y “4”, y por eso se ven en el espectro como un multiplete. Los “2” y “4”, por su parte, sólo acoplan con los H “3” y por ello su señal corresponde a un triplete.

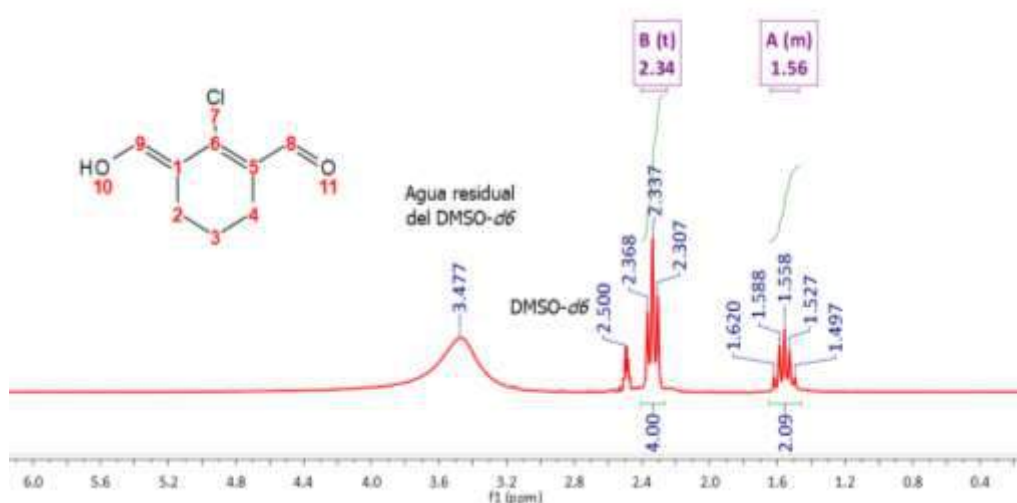
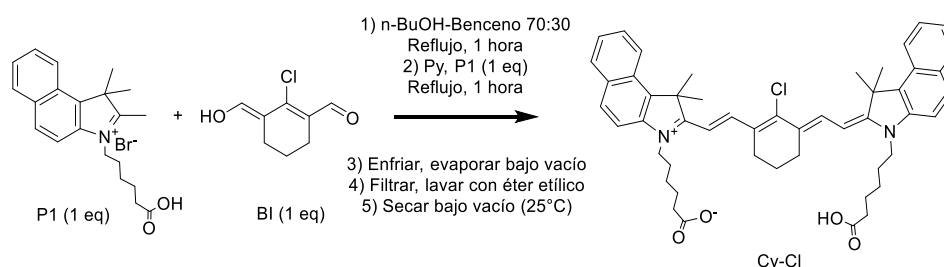


Figura 4-3. Espectro de RMN ¹H del bisaldehído insaturado **BI** (200 MHz, solvente Dimetilsulfóxido-d₆). Se muestran la señal principal del DMSO y el agua residual que contiene este solvente.

4.2.1.2.3 Reacción de condensación para obtener Cy-Cl

Como se mencionó en la sección 4.2.1.2, la síntesis del precursor **Cy-Cl** se realiza a partir de **BI** y **P1** (Esquema 4-4).

En el Esquema 4-9 se muestran las condiciones experimentales utilizadas en el laboratorio. Dichas condiciones fueron desarrolladas por Narayanan y Patonay en 1995²⁸, quienes exploraron la síntesis de heptametincianinas variadas, simétricas y asimétricas.



Esquema 4-9. Síntesis de **Cy-Cl** llevada a cabo de acuerdo a las condiciones de Narayanan²⁸. El rendimiento obtenido fue de 49%.

Se utiliza una mezcla de los solventes *n*-butanol y benceno en proporción 70:30, y según los autores, se debe eliminar el agua que genera la reacción de condensación mediante el uso de una trampa de Dean-Stark.²⁸ De acuerdo a nuestra escala de trabajo, optamos por utilizar tamices moleculares de 4 Å para atrapar el agua que la reacción generase, con la posibilidad de aumentar el rendimiento de las reacciones de condensación en un 10%.^{30,33}

Las principales ventajas del método de Narayanan son:

- Se trata de un método que no utiliza catálisis, a diferencia de los métodos que utilizan acetato de sodio como catalizador^{26,34,35} y etanol anhidro como solvente. En ausencia de catálisis, la reacción de formación del

intermediario hemicianina (el producto de reacción de una molécula de **P1** y una molécula de **BI**) es lenta, lo que hace a este método muy adecuado para la síntesis de tricarbocianinas asimétricas. No se acumula hemicianina en exceso, que puede dar el producto simétrico en grandes cantidades.

- b) No requiere pasos repetidos de purificación, a diferencia de los métodos que utilizan catálisis.
- c) Se obtienen rendimientos moderados (50-70%) y la reacción es escalable a los gramos.

El grado de avance de la reacción puede monitorearse de forma sencilla pues reactivos y productos presentan diferentes colores característicos: amarillo para el bisaldehído y verde oscuro para la tricarbocianina simétrica formada. El producto crudo se obtuvo por evaporación a presión reducida (arrastres con tolueno para eliminar la piridina como un azeótropo) y posterior resuspensión en éter etílico frío. Luego de secado bajo vacío a temperatura ambiente, el sólido se observó de color bronce. Sin embargo, si se lo disolvía en algún solvente, el color era un verde intenso.

La purificación se realizó por una columna de exclusión por tamaño (*Sephadex*) utilizando metanol como eluyente. Las principales impurezas de la síntesis se corresponden con precursor alquilado (**P1**) sin reaccionar y con productos de oxidación de la cianina clorada. Si bien no fue posible aislar algún producto de oxidación, de acuerdo a lo reportado por Narayanan, la sustitución de Cl por el oxígeno del agua sería responsable de la formación de esta impureza.²⁸

En la Figura 4-4 se muestra el espectro de RMN-¹H de **Cy-Cl**. Entender las señales de los protones de esta molécula resultó clave para avanzar en la interpretación de los espectros de moléculas derivadas de este precursor

versátil. Se tienen tres señales características de la familia de las tricarbocianinas.

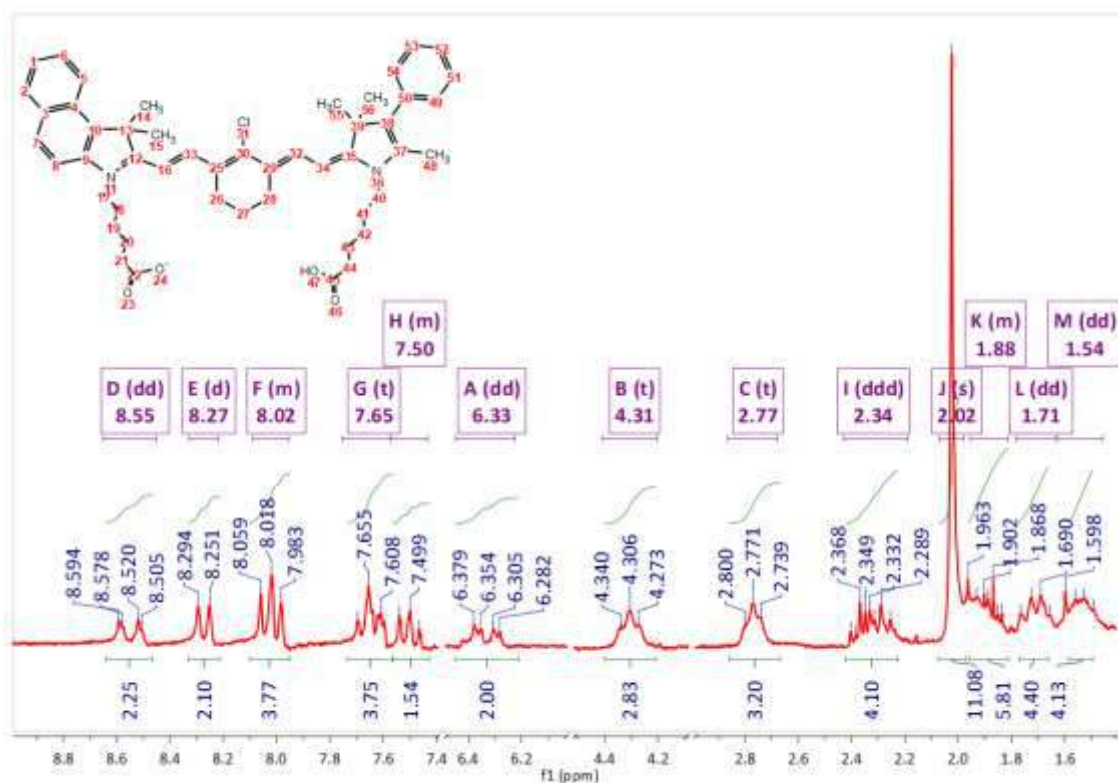


Figura 4-4. Espectro de RMN ^1H de **Cy-CI** (500 MHz, solvente MeOD- d_4).

Antes que nada identificamos las señales correspondientes a los H de los dobles enlaces de la cadena polimetínica, las señales diagnósticas de la molécula. Los protones H16 y H34 se corresponden con la señal A a 6,33 ppm (J 14,7 Hz) que está en el rango típico para H metínicos de cadenas poliénicas de 6,0-6,5 ppm. Asimismo, tenemos la señal D a 8,55 ppm (J 14,6 Hz), que se corresponde con H33 y H32 (8,0-8,5 ppm es el rango típico). Estas señales se pueden reconocer en forma sencilla: son dos dobles dobletes con una constante de acoplamiento escalar grande, correspondiente a un doble enlace con configuración trans ($J_{\text{Trans}} \approx 14\text{Hz}$).

Por otra parte, tenemos la señal B característica (triplete, 4,31 ppm) que se corresponde con los hidrógenos de los metilenos unidos a nitrógeno

cuaternario del indol, en línea con lo explicado en la sección 4.2.1.2.1 para el precursor alquilado **P1**.

4.2.2 Síntesis del derivado N-sustituido

4.2.2.1 Antecedentes y motivación

Hasta 2005, la mayoría de las tricarbocianinas de NIR estaban basadas en los derivados oxigenados y azufrados de un precursor tricarbocianina clorada. Dichos derivados eran en muchos casos químicamente inestables y presentaban pequeños corrimientos de Stokes (~25 nm). Con estas limitaciones en mente, Gao y colaboradores reportaron en 2005 la síntesis y caracterización de nuevas heptametincianinas en las cuales el cloro de la posición *meso* se había reemplazado con un nitrógeno de una amina.³⁶ El enlace C-N en la posición central se convirtió en un paradigma para la transferencia de carga intramolecular (ICT). Los derivados resultantes mostraban un desplazamiento hipsocrómico de las longitudes de onda de absorción y grandes corrimientos de Stokes (~150 nm). Como vimos en el Capítulo 1, las sondas de NIR con N en la posición *meso* son superiores a las cianinas comunes para el uso en microscopía de fluorescencia debido al mínimo solapamiento entre el espectro de absorción y de emisión.³⁶

En 2006, Lee *et al.* reportaron la síntesis de heptametincianinas solubles en agua por la reacción de Suzuki-Miyaura.³⁷ Así, introdujeron un enlace C-C en la posición *meso* de la estructura cromofórica de forma muy robusta. Dichas sondas resultaron más fotoestables comparadas con los derivados oxigenados (ariléter y alquiléter) y tiolados (ariltioéter y alquiltioéter), también comparadas con los aminados (arilamino).

En cuanto a la capacidad sensora de las tricarbocianinas, podemos decir que se han desarrollado múltiples sensores fluorescentes basados en este tipo

de moléculas para una variedad de cationes inorgánicos, algunos de ellos metales pesados que pueden representar un riesgo para la salud humana y cuyos niveles en aguas y suelos resultan importantes de monitorear, (p. ej. Cu^{2+} ,³⁸ Cd^{2+} ,³⁹ Hg^{2+} ,⁴⁰ y Zn^{2+} ^{18,41,42}).

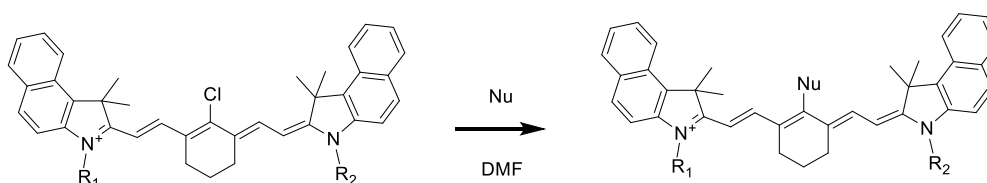
Como ya hemos explicado en la Sección 4.1, otro parámetro que resulta de un interés excepcional en sistemas biológicos es el pH. Se han desarrollado una gran variedad de sensores fluorescentes de pH basados en aminocianinas para su aplicación en microscopía de fluorescencia de células *in vivo*, con especial énfasis en un pH de trabajo de entre 5,0 y 7,5.²¹

En todos los casos, se utiliza como precursor común una cloroheptametincianina que luego es derivatizada con el ionóforo correspondiente mediante un único paso de reacción. Así, se pueden generar librerías de aminocianinas marcadores y/o sensores moleculares fluorescentes activos en la zona NIR del espectro de radiación. En particular, la sustitución del átomo de cloro en la posición *meso* de la cadena de polimetinos por un átomo de nitrógeno conlleva un cambio abrupto en las propiedades ópticas de los fluoróforos.³⁶ Los derivados aminados de tricarbocianinas cloradas presentan, entre otras características, un gran desplazamiento hipsocrómico de las bandas de absorción y un excepcional aumento del corrimiento de Stokes, ambos hechos aprovechados en el desarrollo de nuevas sondas para la cuantificación y marcación específica de analitos en estudios de microscopía de fluorescencia.³⁶ Así, la motivación principal de la síntesis de aminotricarbocianinas de NIR responde a una necesidad de los investigadores para elucidar mecanismos biológicos complejos mediante microscopía de fluorescencia.

4.2.2.2 Estrategia sintética para Cy-PIP y mecanismo de reacción

En este apartado se describirá la síntesis y caracterización de un nuevo sensor fluorescente de pH activo en la zona NIR del espectro electromagnético (**Cy-PIP**).

Como ya dijimos, la versatilidad de intermediarios de tipo **Cy-Cl** permite obtener una familia de compuestos fluorescentes mediante un único paso de reacción. Esta transformación se lleva a cabo mediante el tratamiento de la *meso*-clorotricarbocianina correspondiente **Cy-Cl** con un nucleófilo en dimetilformamida como solvente de reacción (Esquema 4-10).



Esquema 4-10. Obtención de derivados de tricarbocianinas por sustitución del -Cl en la posición *meso*.

Para la síntesis, se siguió el procedimiento descrito por Nagano y colaboradores^{21,30} y como nucleófilo se utilizó *N*-metilpiperazina. Las condiciones de reacción se muestran en la Figura 4-5.

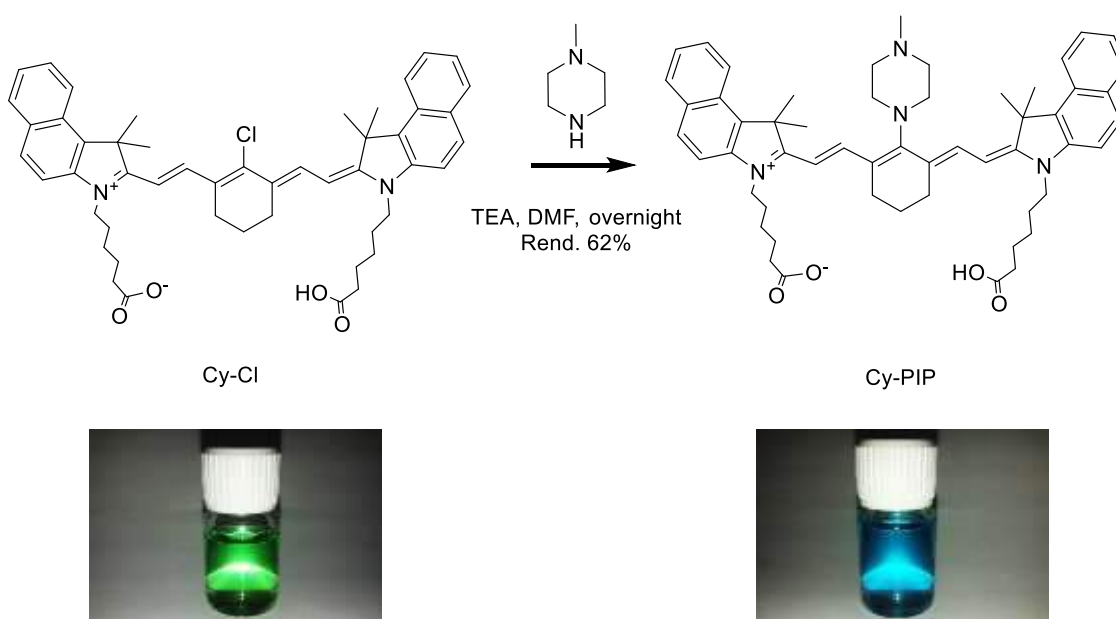
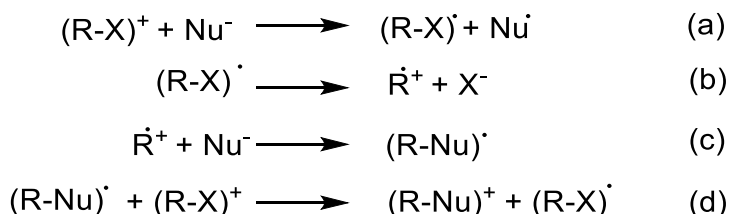


Figura 4-5. Síntesis de la aminotricarbocianina simétrica sensible al pH (**Cy-PIP**).

Se utilizó trietilamina (TEA) para que la forma principal de la *N*-metilpiperazina fuera la especie desprotonada, que es el nucleófilo propiamente dicho en la reacción. Si bien la reacción se monitoreó por cromatografía en placa delgada, a ojo desnudo se puede notar, a medida que avanza la reacción, un cambio de color de verde oscuro a azul oscuro. Finalmente, el sólido azul obtenido se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño (*Sephadex*) y cromatografía en placa preparativa (RP-18).

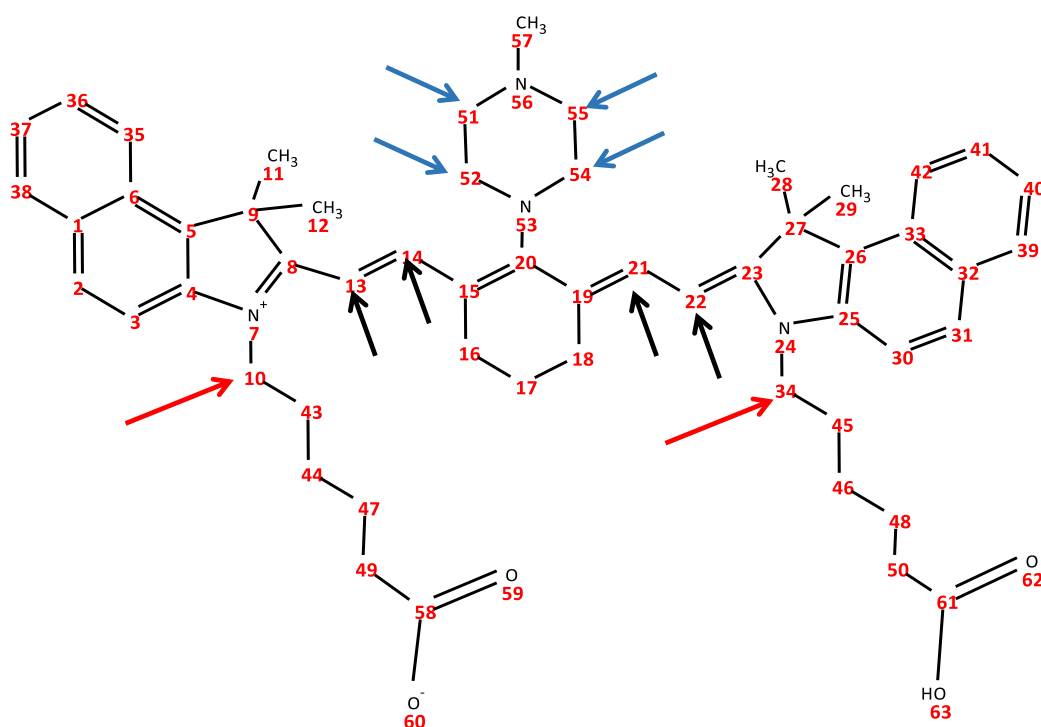
Es interesante entender cuál es el mecanismo por el que ocurre esta reacción. Según lo reportado en literatura, el mecanismo más plausible para estas reacciones es el de Sustitución Nucleofílica Aromática Radicalaria (SRN1).^{27,43} En el Esquema 4-11 se muestra la secuencia de reacciones que se propone da lugar a la reacción. En la Etapa inicial (a) ocurre una transferencia electrónica desde el reactivo (en nuestro caso sería el catión **Cy-Cl**) hacia el nucleófilo (*N*-metilpiperazina), lo que genera un radical libre (R-X). Dicho radical se fragmenta (b) y se elimina el grupo saliente X (Cl en nuestro caso) como un anión. Así, se forma un catión radical R^{•+} que, en la etapa de propagación (c) reacciona con el nucleófilo para dar un nuevo radical (R-Nu)[•]. Finalmente, el nuevo radical reacciona por transferencia electrónica con una molécula de sustrato (**Cy-Cl**) en la etapa (d) para obtener el producto (R-Nu)⁺ y un radical que puede volver a disociarse y entrar en la secuencia de reacciones.



Esquema 4-11. Mecanismo de Sustitución Nucleofílica Aromática Radicalaria. Tomado de Ref.²⁷

4.2.2.3 Caracterización por RMN

Para la caracterización estructural completa de la molécula **Cy-PIP**, se realizaron experimentos de RMN unidimensional (^1H , ^{13}C) y bidimensional (COSY y HSQC). Para facilitar la identificación de las señales características, en el Esquema 4-12 se muestra la estructura de la molécula con todos sus carbonos y heteroátomos numerados.



Esquema 4-12. Estructura química de **Cy-PIP**. Se numeran los carbonos y los heteroátomos a fin de poder hacer referencia a las señales características (marcadas con flechas).

En la Figura 4-6 se muestra el espectro de RMN- ^1H completo de **Cy-PIP** (panel inferior). Arriba, se muestran algunas de las señales características ampliadas, para facilitar el análisis del espectro. Las señales diagnósticas se corresponden con: i) los hidrógenos de la cadena polimetínica, ii) los metilenos unidos al nitrógeno del indol y, iii) los metilenos y metilo de la piperazina.

En primer lugar, las señales a 7,96 ppm (A) y a 6,08 ppm (B) se corresponden con los 4 H de la cadena polimetínica. La señal a 6,08 ppm está asociada a dos de los hidrógenos de la cadena polimetínica, el H13 y el H22. Análogamente, la señal a 7,96 ppm se corresponde con los hidrógenos H21 y H14. Mediante HSQC determinamos que la señal a 7,96 ppm no es un doblete como esperábamos porque corresponde a la superposición de dos señales: la de los H21 e H14 (enlaces dobles) y una señal correspondiente a cuatro hidrógenos aromáticos.

Asimismo, tenemos el triplete a 4,17 ppm (Figura 4-4, ampliación C) que corresponde a los grupos metileno unidos directamente al nitrógeno del indol (4H, 2 H10 y 2 H34). El alto desplazamiento químico de estos metilenos tiene que ver con gran el efecto de desprotección que ejerce el nitrógeno cuaternario del indol parcialmente cargado positivo. Por otra parte, tenemos las señales a 3,79 ppm (2 H52 y 2 H54) y a 2,89 ppm (2 H51 y 2 H55) que se observan en la ampliación D y corresponden a los grupos metileno de la piperazina. Finalmente, en la ampliación E puede verse el triplete asimétrico a 2,59 ppm que está asociado a dos tipos de carbonos diferentes (HSQC, no se muestra el espectro) y, por ende, a dos tipos de protones diferentes. Es probable que la forma del triplete se deba a la superposición de un singulete (metilo -CH₃ de la piperazina, 3 H57) con un triplete (2 grupos metileno del anillo central, 2 H16 y 2 H18).

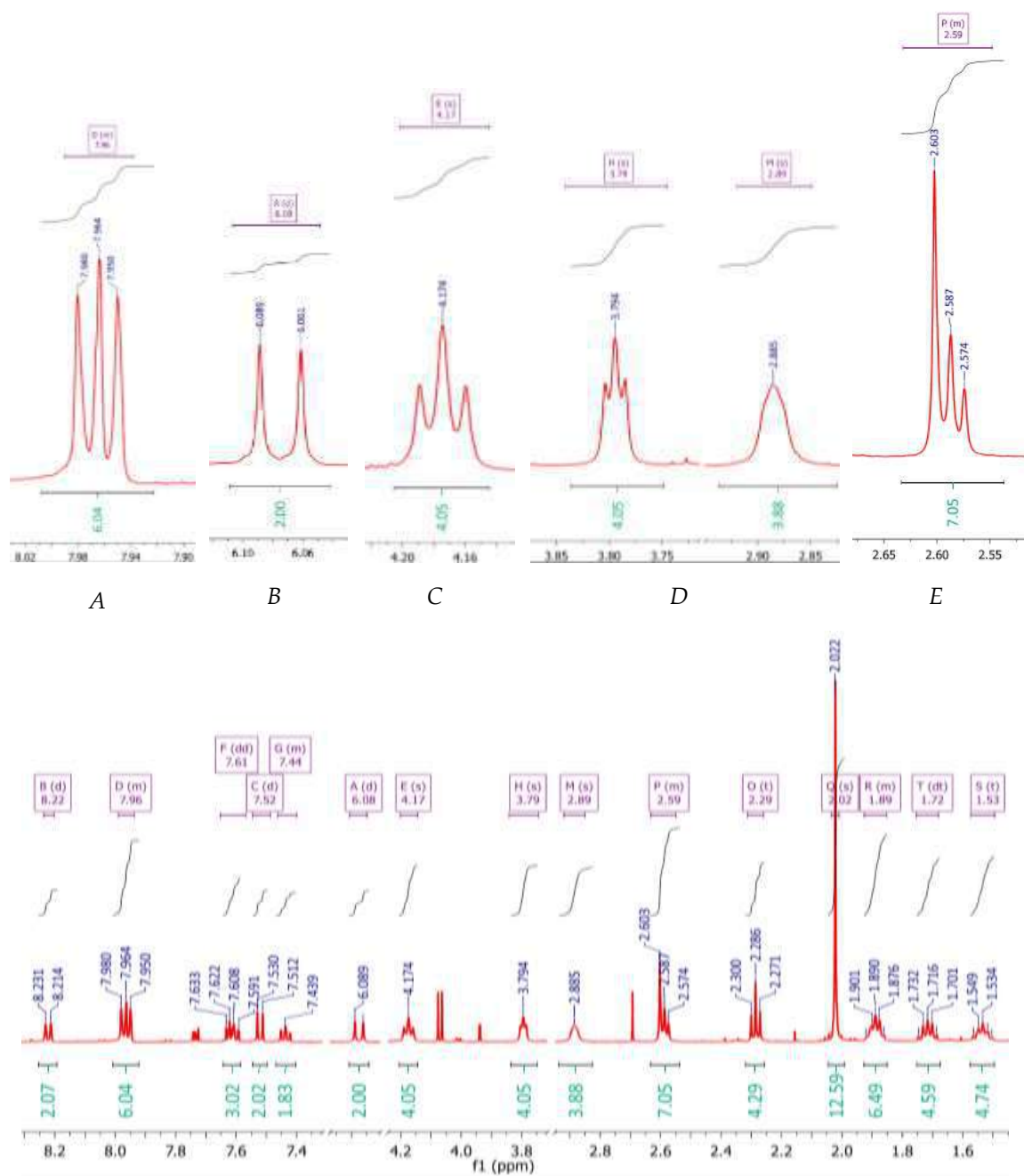


Figura 4-6. RMN ^1H de **Cy-PIP** (500 MHz, solvente MeOD-d_4). Arriba. Ampliaciones de las señales más relevantes. Abajo. Espectro completo en el que se detallan las integraciones obtenidas experimentalmente.

4.3 Caracterización fotofísica de Cy-PIP

4.3.1 Propiedades espectroscópicas de derivados N-sustituidos

Como se explicó en el Capítulo 1 y en la Sección 4.2.2.1, un átomo de nitrógeno en la posición *meso* de la tricarbocianina redonda en un cambio dramático de sus propiedades espectroscópicas. En la Figura 4-7 se muestran los espectros de absorción y emisión del precursor clorado (**Cy-Cl**) y de su derivado N-sustituido (**Cy-PIP**) sintetizados en el laboratorio.

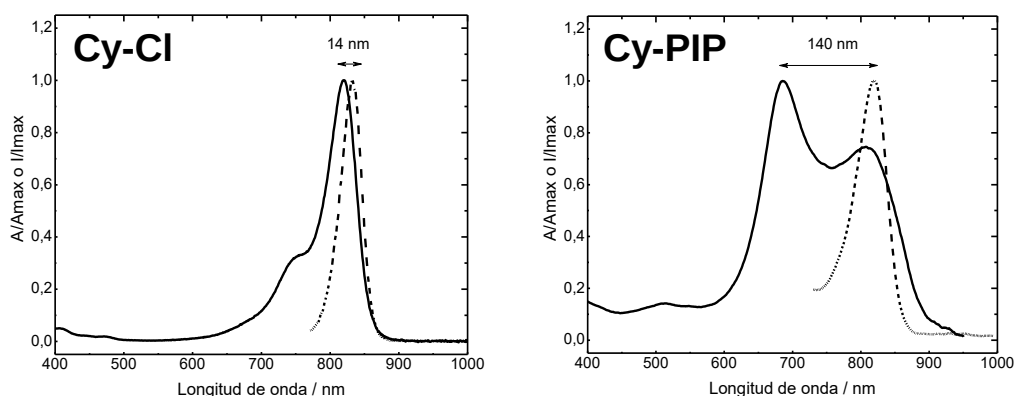


Figura 4-7. (Izq.) Espectros de absorción y emisión de **Cy-Cl** (Exc.: 750 nm) normalizados en sus máximos. (Der.) Espectros de absorción y emisión (Exc. 685 nm) normalizados en sus máximos de la cianina sensora **Cy-PIP**. En ambos casos el solvente es buffer fosfato (PBS) 10 mM pH 7,3 y se utilizan concentraciones de alrededor de 5 μ M de los analitos. La apertura de rendija de excitación y emisión es 20 nm.

En buffer PBS 10 mM, para **Cy-Cl** el máximo de absorción se encuentra a 819 nm y el máximo de emisión a 833 nm. Para **Cy-PIP**, en cambio, el máximo de absorción se halla a 680 nm y el máximo de emisión a 820 nm en solución acuosa a pH 7. Así, el corrimiento de Stokes aumenta considerablemente una vez que se ha sustituido el átomo de Cl por N: pasa de 14 nm en **Cy-Cl** a 140 nm

en **Cy-PIP**, y es uno de los más grandes reportados hasta la fecha de la escritura de esta tesis. Cy3 y Cy5, dos colorantes de tipo cianina cuyo uso en marcación fluorescente está muy extendido, muestran corrimientos de Stokes menores a 20 nm en solución acuosa.⁴⁴

Por otra parte, como se ve en la Figura 4-7 (Der.), **Cy-PIP** muestra un espectro de absorción con dos bandas en buffer PBS a pH 7,30. Se tiene el máximo absoluto a 680 nm y un máximo local a 820 nm.

4.3.2 Efecto de la concentración en el espectro de absorción de Cy-PIP

Una característica importante de las cianinas es que tienen cierta tendencia a formar agregados en solución y en interfaces líquido-sólido y líquido-aire⁴⁵ bajo determinadas condiciones. En este sentido, diversas fuerzas intermoleculares favorecen la formación de estas estructuras supramoleculares (p.ej., las fuerzas entrópicas de las cadenas alquílicas, las fuerzas electrostáticas y de enlace de hidrógeno de los grupos iónicos y polares y, las fuerzas de Van der Waals).^{46,47} Cabe destacar que la tendencia de las moléculas a formar agregados depende tanto de la estructura química del fluoróforo como de propiedades del entorno (pH, fuerza iónica, concentración del cromóforo, polaridad del solvente, concentración de electrolitos y temperatura).

La agregación de los fluoróforos y la consecuente formación de agregados supramoleculares inciden de manera directa sobre sus propiedades fotofísicas y fotoquímicas. Así, los agregados en solución muestran cambios en los espectros de absorción en comparación con su monómero de origen. Como vimos en el Capítulo 1, se han caracterizado dos tipos de comportamientos fotofísicos frente a la agregación: la aparición de bandas a menores longitudes de onda (bandas H)⁴⁸ y de bandas a mayores longitudes de onda (bandas J).⁴⁹ La explicación de estas nuevas bandas se puede lograr a partir de la Teoría de los

excitones moleculares^{50,51}. En particular, las cianinas presentan una gran tendencia a la formación de agregados de tipo J.⁵²

Si bien el objeto de este trabajo de tesis no era el estudio sistemático de la capacidad de formación de agregados de **Cy-PIP**, nos resultó importante determinar si dicha molécula formaba agregados de algún tipo a las concentraciones de trabajo empleadas según la aplicación deseada y establecer un rango seguro para la concentración en el que la molécula se encontrara como monómero.

Así, se realizó un experimento a partir de una solución stock 20 μM de **Cy-PIP** en buffer PBS pH 8,3. A partir de ella, se realizaron diluciones con buffer PBS pH 8,3 para barrer un rango de concentración útil para medidas fotofísicas (de 2 a 18 μM) y se midieron los espectros de absorción de las soluciones.

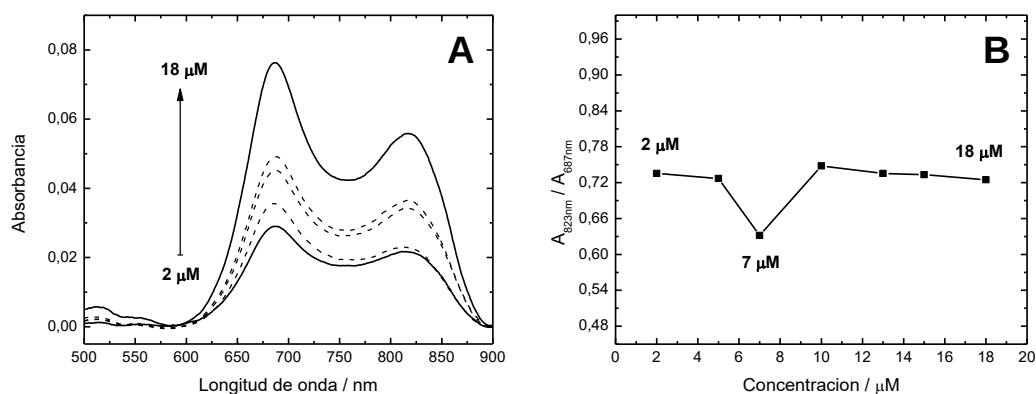


Figura 4-8. (A) Espectros de absorción de **Cy-PIP** en PBS 10 mM pH 8.3. La concentración fue aumentándose gradualmente desde 2 μM (línea llena de menor absorbancia) hasta 18 μM (línea llena de mayor absorbancia); (B) Cociente entre los máximos de absorción a 823 nm y a 687 nm, respectivamente para el rango de concentraciones 2-18 μM de **Cy-PIP** (PBS 10 mM, pH 8.3). La relación de bandas promedio para todo el rango de concentraciones resulta ser $(0,72 \pm 0,04)$.

En la Figura 4-8 A se observa que, al aumentar la concentración, el espectro de absorción de **Cy-PIP** aumenta de manera regular y uniforme; esto

es, las dos bandas de absorción aumentan. Más aún, en la Figura 4-8 B puede apreciarse que la relación de bandas de absorción ($A_{823\text{ nm}}/A_{687\text{ nm}}$) se mantiene prácticamente constante en el intervalo de concentraciones ensayado, a excepción de la concentración de 7 μM . Este resultado nos indica que en el espectro ninguna de las dos bandas puede atribuirse a un agregado, y el mismo se corresponde con el espectro de absorción de **Cy-PIP** monómero. Asimismo, las concentraciones ensayadas son muy bajas para observar la aparición de agregados, normalmente presentes en la escala del milimolar.⁵³ La desviación de la tendencia de la solución 7 μM puede explicarse por problemas con la línea de base: resulta difícil obtener medidas cuantitativas cuando las absorbancias que se miden son tan bajas (menores a 0,01 unidades). Asimismo, los espectros que se presentan han sido suavizados para una mejor apreciación de las bandas de absorción. Cabe aclarar que dicho procedimiento no cambia el resultado de la relación de bandas de absorción.

4.3.3 Influencia del solvente en la fotofísica de Cy-PIP

Como vimos en el Capítulo 1, los parámetros que caracterizan la fluorescencia de una molécula determinada (como puede ser el rendimiento cuántico de fluorescencia) se ven afectados por cualquier proceso que involucre interacciones de la molécula en el estado excitado con su ambiente cercano. Los desplazamientos en la posición de las bandas de absorción y de emisión al cambiar de solvente (solvatocromismo) son evidencias experimentales en los cambios en la energía de solvatación.⁵⁴ En otras palabras, cuando un soluto está rodeado de moléculas de solvente, su estado basal y su estado excitado dependerán de las interacciones soluto-solvente.

Entre las variables que caracterizan el microentorno del fluoróforo tenemos: la polaridad del solvente, la capacidad de formación de enlaces de hidrógeno, el pH, la viscosidad, la temperatura, y la concentración de iones,

entre otros. Resulta importante, entonces, evaluar qué ocurre con los espectros de absorción y de emisión de **Cy-PIP** en los solventes más utilizados en esta tesis como metanol, THF y buffer PBS.

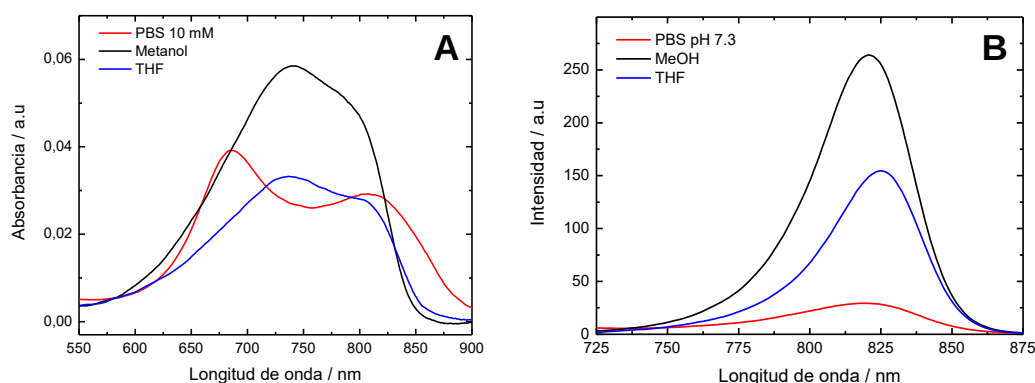


Figura 4-9. Espectros de (A) absorción y (B) de emisión de **Cy-PIP** (5 μ M) en metanol (negro), THF (azul) y buffer PBS 10 mM (rojo).

En la Figura 4-9 A se observa que la forma del espectro de absorción de **Cy-PIP** se ve modificada al pasar de metanol a buffer PBS. En metanol, el espectro es ancho y presenta un máximo de absorción a 750 nm, algo similar a lo que sucede en THF, solvente polar aprótico. En solución acuosa de PBS, en cambio, se resuelven dos bandas, como ya hemos visto en secciones anteriores, una a 680 nm y otra a 820 nm. No está clara la naturaleza de este comportamiento, si bien creemos que la banda de 820 nm no se corresponde con una banda de agregado de tipo J, como vimos en la Sección 4.3.2. Asimismo, se observa una disminución pronunciada de la absorbancia al pasar de metanol a agua, en línea con lo reportado en literatura.⁵⁵

Por otra parte, en la Figura 4-9 B se observa que la emisión de **Cy-PIP** se ve fuertemente influenciada por el solvente: en metanol se observa la mayor intensidad de fluorescencia, el THF es un caso intermedio y, finalmente, en solución acuosa la intensidad de emisión baja a menos del 10% comparado con el valor original en metanol. La dramática influencia en la intensidad de

emisión contrasta con la mínima variación en la posición del máximo de emisión, que en todos los casos se encuentra cercano a 820 nm.

4.3.4 Fotoestabilidad de Cy-PIP en solución acuosa

Una propiedad muy deseable para una sonda fluorescente es que sea fotoestable en el medio en el que se la quiera utilizar.¹⁵ En nuestro caso, **Cy-PIP** se pensó como una sonda NIR para aplicación biológica, lo cual hace fundamental que la molécula sea fotoestable en agua a pH regulado, como los de los compartimientos celulares.

Para testear la fotoestabilidad de **Cy-PIP** en solución acuosa monitoreamos su emisión en el curso de dos horas a temperatura ambiente, en una cubeta aireada y bajo irradiación continua. En la Figura 4-10 se muestran los resultados a pH ácido y básico. Se observa que la intensidad de emisión a 820 nm no cambia apreciablemente a ninguno de los dos pHs ensayados: a pH 5,15 se observa una baja de intensidad de 5%, mientras que a pH 9,47 se observa una disminución de 8%, ambas bajas aceptables para sondas de este tipo. Evidentemente, a pH 5,15 no ocurre una protonación irreversible de la sonda, y era lo que esperábamos ya que no se tiene una monoamina. Más adelante relacionaremos la fotoestabilidad con el comportamiento de los espectros de absorción de la sonda al modificar el pH un experimento de titulación.

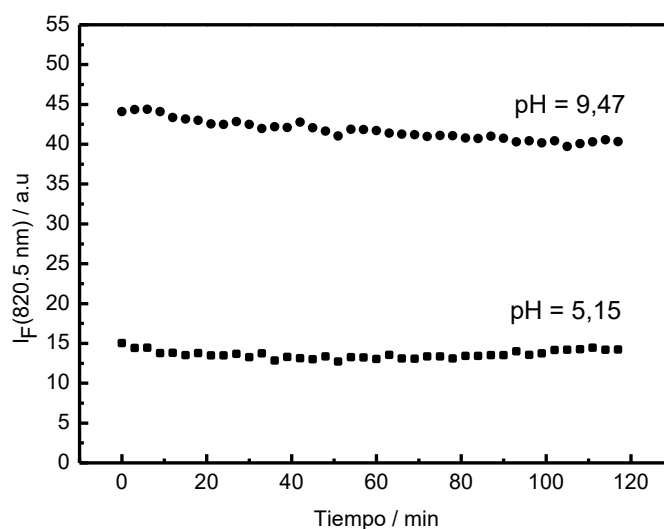


Figura 4-10. Dependencia temporal de la emisión de fluorescencia de **Cy-PIP** a 820,5 nm en buffer PBS 10 mM ($\lambda_{\text{exc}} = 685 \text{ nm}$; slit = 20 nm). Con un (▪) se muestran los resultados a pH ácido de 5,15 y, con un (•) los resultados a pH básico de 9,47.

En la Figura 4-10 se observa que la emisión de **Cy-PIP** a pH básico resulta mayor que a pH ácido. La modulación de la emisión de fluorescencia con el pH del medio que experimenta **Cy-PIP** es la característica distintiva de esta molécula y será el objeto de estudio de secciones posteriores.

4.3.5 Fluorescencia de Cy-PIP resuelta en el tiempo

Un aspecto importante de la fotofísica de los fluoróforos es su tiempo de vida de emisión. Las medidas de tiempo de vida de emisión resultan complementarias a las medidas de estado estacionario e incluso resultan ventajosas por sobre estas últimas, dado que permiten obtener información acerca de velocidades de reacción, procesos intra e intermoleculares. Las medidas de tiempos de vida también proveen un método para estudiar el ambiente local del fluoróforo y, bajo ciertas condiciones los tiempos de vida pueden determinarse con mayor precisión que las medidas de intensidad

(estado estacionario).⁵⁵ En la Figura 4-11 se muestran los ajustes monoexponenciales para el recuento de fotones de emisión de **Cy-PIP** a diferentes pHs en mezclas de metanol-buffer PBS. Dado que las aminotricarbocianinas presentan un bajo rendimiento cuántico de emisión de fluorescencia en agua (del orden de 0,05), debimos utilizar mezclas de metanol y buffer.³⁰ Además, a pH ácido la emisión de **Cy-PIP** se apaga (Sección 4.4.2), lo cual impone una limitación experimental para evaluar el tiempo de vida de la molécula a pHs menores a 7.

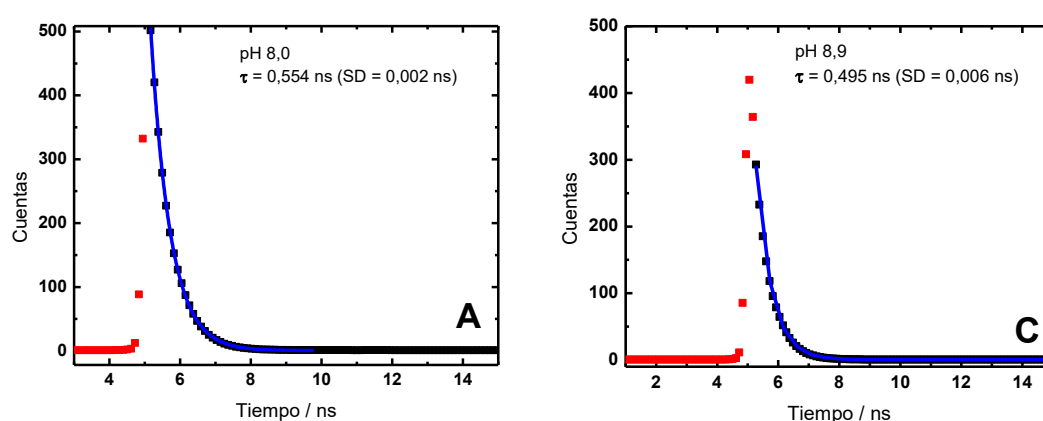


Figura 4-11. Recuento de fotones de emisión de **Cy-PIP** (dye libre) a 820 nm en PBS 10 mM pH 7- Metanol 1:1 ($\lambda_{exc} = 685$ nm). Se muestra en azul la función de ajuste monoexponencial para cada pH ensayado: A) pH 8,1, y C) pH 8,9.

En la Tabla 4-2 se recopilan los datos de tiempos de vida de fluorescencia producto de los ajustes mono-exponenciales.

Tabla 4-2. Recopilación de los tiempos de vida de fluorescencia de **Cy-PIP** a distintos pHs alcalinos.

pH	τ / ns
8,0	$0,554 \pm 0,002$
8,3	$0,492 \pm 0,001$
8,9	$0,495 \pm 0,006$

Podemos ver que los tiempos de vida de fluorescencia se mantienen prácticamente constantes en el pequeño rango de pH ensayado, y son tiempos característicos muy rápidos. Estos resultados sugieren que habría una única especie emisiva, con un tiempo de vida de fluorescencia de ~0,5 ns.

4.4 Cy-PIP y su capacidad sensora de pH

4.4.1 Dependencia de la absorbancia con el pH

En la Figura 4-12 A se muestran los espectros de absorbancia de **Cy-PIP** en función del pH. Estos datos se obtuvieron a partir de la titulación de una solución de **Cy-PIP** (5 μ M) con NaOH y HCl tal como se describe en el Capítulo 3. Se observa que la absorción de nuestra molécula de interés disminuye a medida que el pH se hace más ácido, en sus dos bandas de absorción. Si bien la baja de la absorción al acidificar ha sido reportada en moléculas similares³⁰, en este caso no se distingue un corrimiento batocrómico al acidificar, como reportan la mayoría de los autores.²¹ Resulta importante destacar que espectro de absorción de **Cy-PIP** no muestra un punto isobéstico definido y, si se tiene en cuenta la estructura de la molécula, se puede pensar en la existencia de varias especies ácido-base dependientes del pH que están aportando al espectro de absorción (Se tiene el grupo $-\text{COOH}$ como ácido débil y la *N*-metilpiperazina como base).

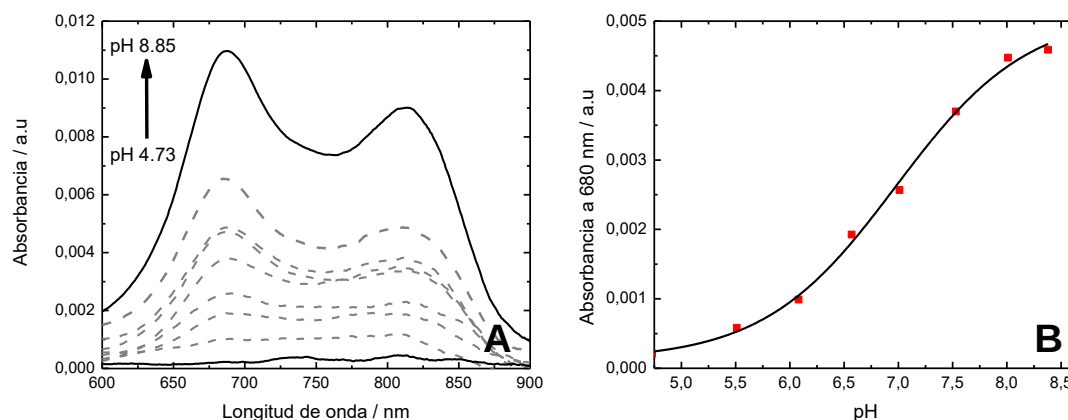


Figura 4-12. (A) Espectros de absorción de **Cy-PIP** (5 μ M, PBS 10 mM) en el rango de pH 8,85-4,73. (B) Curva de Absorbancia (680 nm) versus pH. El pKa calculado para **Cy-PIP** es de (6,9 $\pm$ 0,1).

En la Figura 4-12 B se muestra la curva de pK_a de **Cy-PIP** que proviene del ajuste de los puntos obtenidos mediante una función de Henderson-Hasselbach, como se vio en el Capítulo 3. El pK_a así obtenido fue de (6,9 $\pm$ 0,1).

4.4.2 Dependencia de la emisión con el pH

La emisión de fluorescencia de **Cy-PIP** a 820 nm cambia marcadamente cuando se titula en el rango de pH de 3,8-10,9, en un procedimiento análogo al descrito para la titulación por absorbancia. En la Figura 4-13 se muestran los espectros obtenidos, junto con la curva de pK_a que resulta del ajuste realizado tal como se explicita en el Capítulo 3.

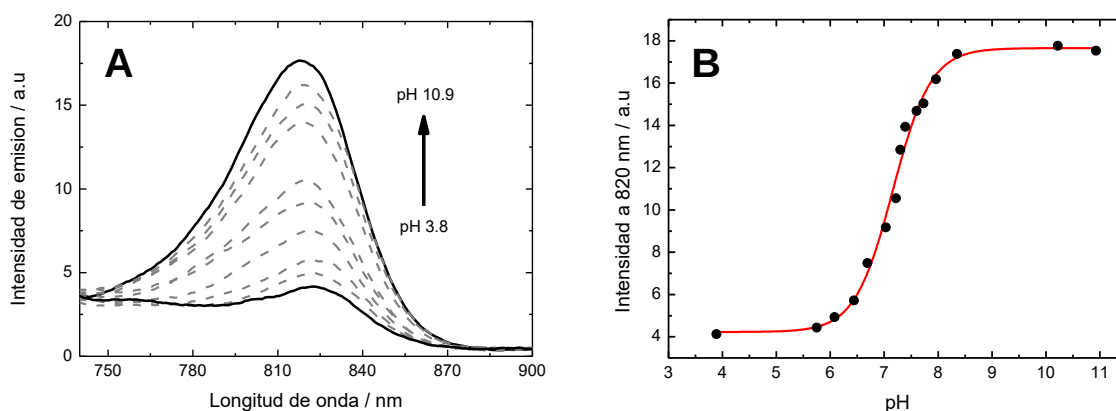


Figura 4-13. (A) Espectro de emisión de **Cy-PIP** (5 μ M) en buffer PBS 10 mM, rango de pH 3,9-10,9. (B) Intensidad de fluorescencia a 820 nm en el mismo rango de pH (Excitación 680 nm). El pK_a obtenido fue de (7,1 $\pm$ 0,1).

El pK_a obtenido por fluorescencia es de 7,1, muy de acuerdo con el valor de 6,9 obtenido por absorbancia. Ambos valores se encuentran en el rango de pH fisiológico, lo cual hace a **Cy-PIP** un sensor molecular de pH atractivo para aplicaciones biológicas.

4.5 Discusión

4.5.1 Estrategia sintética de Cy-PIP

En la Sección 4.2 nos ocupamos de analizar la estrategia sintética para **Cy-PIP**. El paso de N-alkilación de 1,1,2-trimetilbenzo[e]indol con ácido 6-bromohexanoico por la vía de las microondas resultó una mejora sustancial, pues permitió obtener un producto de una pureza considerable y con buen rendimiento (95%), en una reacción que sólo duraba dos horas, a diferencia de la vía térmica por la que no fue posible realizar la reacción. Es decir que la baja reactividad del precursor benzoindol frente a la alquilación puede ser superada utilizando la vía de las microondas. En cuanto a la sustitución del Cl en la

posición *meso* de la tricarbocianina por *N*-metilpiperazina, podemos decir que se obtuvo un rendimiento (62%) mayor que el reportado para reacciones similares.³⁰

4.5.2 Propiedades fotofísicas de Cy-PIP

De acuerdo a los resultados expuestos en la Sección 4.3.1, en comparación con el precursor clorado, los espectros de absorción y emisión del derivado *N*-sustituido resultan más anchos, pierden resolución y no mantienen una relación especular entre sí. Este comportamiento está en línea con lo reportado por otros autores para aminotricarbocianinas estructuralmente similares.³⁶ En estas aminocianinas, la longitud de onda del máximo de absorción sufre un gran desplazamiento hipsocrómico, normalmente desde los ~800 nm a la región de los ~650 nm. Por su parte, el espectro de emisión no sufre cambios tan pronunciados, sino que hay bajos corrimientos al azul (de 30-40 nm). En suma, cuando se tiene un nitrógeno en la posición *meso*, los corrimientos de Stokes aumentan notablemente, de 10 nm en precursores clorados a ~140 nm en derivados *N*-sustituídos. Cabe aclarar que si el sustituyente es un átomo de oxígeno o un átomo de azufre, estos cambios no se observan y las tricarbocianinas oxigenadas y sulfonadas poseen corrimientos de Stokes comparables a los del precursor clorado.³⁰

Una explicación posible del aumento sustancial en el corrimiento de Stokes tiene que ver con un mecanismo de tipo ICT (transferencia intramolecular de carga), como explicamos en el Capítulo 1. El análisis de los espectros de absorción y emisión de la aminotricarbocianina **Cy-PIP** (Figura 4-7), tal como reportan Gao y colaboradores³⁶, permite observar que no existe una relación de simetría entre ellos. Por ejemplo, los anchos de pico a media altura son diferentes. Esta observación apuntaría a que existe un cambio en la

geometría entre las especies que absorben y que emiten energía, algo usual en los procesos de transferencia de carga.⁵⁶

Si bien **Cy-PIP** no tiene a sus grupos -COOH conjugados con el sistema π , la observación experimental de los espectros nos lleva a pensar en la ICT como un mecanismo posible para dicha molécula, que explicaría el gran corrimiento de Stokes.

Por otra parte, estudiamos el efecto de la concentración (Sección 4.3.2) en el espectro de absorción (en buffer PBS) de **Cy-PIP** con el objeto de detectar si había agregación en el rango de trabajo ensayado (2-18 μM). A medida que se aumentaba la concentración, y en todo el rango ensayado, se observó que el espectro de absorción aumentaba de forma regular y uniforme. Más aún, la relación experimental de bandas de absorción ($A_{823\text{ nm}}/A_{687\text{ nm}}$) se mantiene prácticamente constante en el intervalo de concentraciones ensayado. En suma, los resultados indicarían que ninguna de las dos bandas puede atribuirse a un agregado, y el espectro observado es el espectro de absorción de **Cy-PIP** monómero.

Kimura y colaboradores llevaron a cabo un trabajo en el que estudiaron de forma sistemática el efecto de la concentración de una sonda de tipo tiacarbocianina en solución acuosa en las propiedades ópticas del sistema.⁵³ A la vez, utilizaron diferentes técnicas experimentales para caracterizar las especies supramoleculares obtenidas (agregados de tipo H y J). Por espectroscopía de absorción UV-visible, a una concentración de 1 μM observaron el espectro típico de la especie monomérica. A 1000 μM observaron la aparición de una banda de absorción a menores longitudes de onda (corrimiento hipsocrómico, banda H). A 4 mM, se agregó al espectro una banda al rojo (corrimiento batocrómico, banda J). Finalmente, a 10 mM, sólo se observa la banda correspondiente al agregado J.⁵³ En nuestro caso, y teniendo el antecedente del trabajo de Kimura, podemos decir que las concentraciones ensayadas (2-18 μM)

son muy bajas para observar la aparición de agregados, normalmente presentes en la escala del milimolar.^{53,57}

Respecto de influencia del solvente en las propiedades fotofísicas (Sección 4.3.3), podemos decir que tanto el espectro de absorción como el espectro de emisión se ven modificados en presencia de diferentes solventes. De acuerdo al orden de polaridad de los solventes ensayados (agua > metanol > THF) y, sobre la base de los espectros presentados, podemos decir que el corrimiento de Stokes aumenta a medida que aumenta la polaridad del solvente. Este comportamiento sugiere que el momento dipolar de **Cy-PIP** en el estado excitado es mayor que en el estado basal.⁵⁴ Asimismo, los solvatocromismos negativos al aumentar la polaridad del solvente (desplazamientos hipsocrómicos en el espectro de absorción) son indicativos de posibles procesos de ICT.³⁶ En particular, el mayor corrimiento de Stokes (140 nm) se observó cuando se utilizaba agua como solvente, lo cual es una ventaja a la hora de diseñar sondas fluorescentes para aplicación en sistemas *in vivo*.⁷ El gran corrimiento de Stokes es decididamente una ventaja en este sentido; sin embargo, también viene acompañado de una baja considerable en la emisión de fluorescencia en comparación con la que se observa en solventes orgánicos.

Por otro lado, una limitación para proyectar la aplicación de sondas fluorescentes de tipo cianina tiene que ver con la fotoestabilidad. La indocianina verde, un colorante aprobado por la FDA para su uso en visualización óptica (*bioimaging*), presenta severos problemas de fotoblanqueo.¹⁵ La baja estabilidad de los fluoróforos de tipo cianina se asocia en general a su reacción con el oxígeno disuelto en solución.⁵⁸ Sin embargo, mediante la encapsulación de ICG en matrices de sílice se ha conseguido mejorar considerablemente la fotoestabilidad.⁵⁹ En el Capítulo 5 retomaremos estas ideas. Por otra parte, la isomerización resulta también una causa de baja fotoestabilidad.³⁰ Para ello, una de las soluciones posibles consiste en rigidizar la estructura de la cianina con un

grupo cíclico en el centro de la cadena de polimetinos, como es el caso de **Cy-PIP** y **Cy-Cl**.

En cuanto a la fotoestabilidad de **Cy-PIP** en solución acuosa (Sección 4.3.4), obtuvimos una baja de 5% en la intensidad de emisión (820 nm) a pH 5,15, mientras que a pH básico de 9,47 la baja fue de 8%, en el lapso de dos horas de irradiación continua. Para sondas derivadas de tricarbocianinas, una disminución de menos de 10% en estas condiciones representa un buen resultado.

Según lo reportado por Nagano y colaboradores, la emisión de una aminotricarbocianina derivada de la metilamina desaparecía por completo cuando se la irradiaba durante una hora a pH 4,73. Paralelamente, en el espectro de absorción se observaba un corrimiento hipsocrómico abrupto de la banda principal. Todo este cambio se producía de forma irreversible.¹⁶ El hallazgo está en línea con los resultados de Descalzo y Rurack, quienes concluyeron que el fenómeno observado a pH ácido tiene que ver con la existencia de dos pasos de protonación, uno de ellos irreversible.⁶⁰ Los autores aportan ejemplos a partir de los cuales concluyen que la reducción de la capacidad donante de electrones del N en la posición *meso* que puede ocurrir por complejación o por protonación debe dar lugar a desplazamientos batocrómicos del espectro de absorción. Más aún, a partir del análisis de los espectros de absorción y emisión de su aminotricarbocianina los autores exponen que, a medida que se acidifica el medio, primero se protona el nitrógeno *meso* de forma reversible (desplazamiento batocrómico en la absorción) y luego se protonan los carbonos metínicos que flanquean la estructura polimetínica, generando una estructura hemicianina que se evidencia como una banda de absorción en el azul (desplazamiento hipsocrómico). Este último paso es irreversible y ocurre a pHs muy ácidos (alrededor de 1).⁶⁰ Para **Cy-PIP**, cuyo nitrógeno *meso* está doblemente sustituido, descartamos una protonación irreversible a pH ácido de 5,15.

4.5.3 Capacidad sensora de pH

Las sondas fluorescentes de la familia de las tricarbocianinas, en comparación con otros fluoróforos, presentan la gran ventaja de absorber y emitir luz en la región del NIR (650-900 nm). A partir de esta característica se han desarrollado una variedad de sensores de biomoléculas (Ca^{2+} , Zn^{2+} , H^+) que aprovechan el cambio en la emisión de las tricarbocianinas en presencia de los analitos.^{21,61,62} Los mecanismos por los que ocurre el cambio en la intensidad de emisión continúan siendo objeto de investigación debido a que no existe un consenso generalizado en cuanto a los fenómenos involucrados en sus respuestas luminescentes.

Como vimos en el Capítulo 1, existen esencialmente tres mecanismos reportados para el sensado de analitos mediante tricarbocianinas: PET (Transferencia electrónica fotoinducida), ICT (Transferencia intramolecular de carga) y FRET (Transferencia de energía por resonancia de Förster). Sólo nos referiremos a PET e ICT, pues las condiciones para FRET no están dadas en nuestros ensayos (la eficiencia de FRET a la concentración empleada es despreciable).⁶³

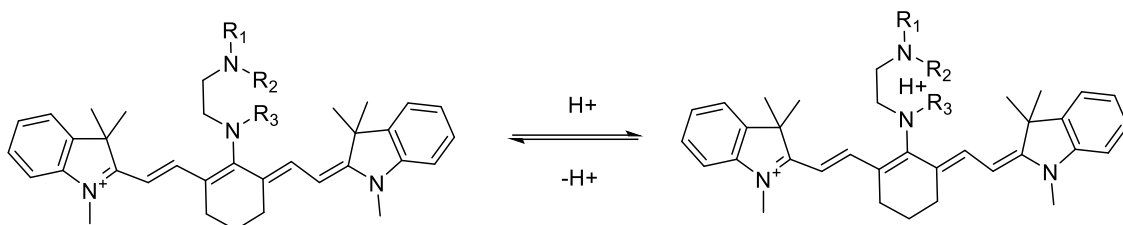
En un mecanismo de tipo PET se tiene un fluoróforo (en nuestro caso una tricarbocianina) unido a un sitio de reconocimiento de analito mediante un grupo espaciador. Los sitios de reconocimiento, de acuerdo a su potencial de reducción en comparación con el de la tricarbocianina, pueden actuar como donantes o aceptores de electrones.^{64,65} Cuando el fluoróforo se comporta como aceptor de electrones se habla de un mecanismo de tipo a-PET, mientras que cuando se comporta como donante de electrones, el mecanismo se refiere como d-PET.

Se han reportado sensores de oxi-tricarbocianinas que operan por a-PET para analitos como Ca^{2+} y NO .^{61,62} En dichos ejemplos los autores observaron

que, en presencia del analito, aumentaba la intensidad de emisión (“off-on”), mientras que el espectro de absorción de la molécula permanecía invariante. Asimismo, en 2014 Sun *et al.* reportaron la síntesis y caracterización fotofísica de una aminotricarbocianina estructuralmente muy similar a **Cy-PIP**, cuya emisión de fluorescencia aumentaba a pH ácido, a la vez que ocurría un desplazamiento batocrómico del espectro de absorción al disminuir el pH.⁶⁶ Los autores explicaron dicho comportamiento proponiendo un mecanismo de tipo a-PET. El comportamiento fotofísico de la sonda de Sun *et al.* coincide con el de la familia de fluoróforos estudiados por Nagano y colaboradores, también estructuralmente similares a **Cy-PIP**.²¹ Sin embargo, las aminotricarbocianinas de Nagano operarían por un mecanismo diferente, de tipo ICT.¹⁵

Por su parte, un mecanismo de sensado de tipo ICT siempre resulta en respuestas autoreferenciadas (*ratiometric*, del inglés) de la propiedad a medir. El ejemplo más claro en este sentido fue aportado por Nagano y colaboradores, quienes sintetizaron una variedad de aminotricarbocianinas que funcionaban como sensores autoreferenciados de pH. Las moléculas experimentaban un desplazamiento batocrómico del espectro de absorción al acidificar, lo cual les permitía excitar a las sondas a dos longitudes de onda diferentes. A su vez, colectaban la emisión para a cada una de las longitudes de onda de excitación, la señal del sensor se expresaba como un cociente de las emisiones, y aumentaba al disminuir el pH.²¹ Esto les permitía incrementar el rango dinámico del sensor a la vez que la respuesta se corregía por las interferencias del medio.⁶⁷ La estrategia para la construcción de estos sensores de pH radica en controlar la habilidad donante de electrones del nitrógeno *meso* mediante protonación-desprotonación del grupo diamino. En condiciones ácidas, el H⁺ puede deslocalizar su carga entre los dos nitrógenos, y se tiene una estructura supramolecular estable, y reversible (Esquema 4-13). Asimismo, se ha reportado un sensor de pH estructuralmente similar a **Cy-PIP** que, en línea con los resultados de Nagano y colaboradores²¹, sufría un desplazamiento batocrómico

en el espectro de absorción al disminuir el pH, pero su intensidad de emisión disminuía.³⁰



Esquema 4-13. Mecanismo de la respuesta a pH de los derivados aminocianina. Se muestra el equilibrio de protonación y desprotonación. Adaptado de Myochin *et al.*²¹

Si bien **Cy-PIP** es estructuralmente muy similar a las moléculas reportadas por los autores a los que nos hemos referido en los párrafos precedentes, su comportamiento fotofísico es diferente. En el caso de **Cy-PIP**, no se observa un desplazamiento batocrómico en el espectro de absorción al aumentar la concentración de H^+ y dicho espectro experimenta una disminución regular y uniforme al disminuir el pH. Sumado a ello, la intensidad de emisión a 820 nm disminuye al disminuir el pH. Así, el comportamiento fotofísico de **Cy-PIP** no puede racionalizarse con un mecanismo estándar de tipo a-PET o ICT.

Recientemente, Samaniego *et al.* reportaron la síntesis y caracterización fotofísica de dos aminoboronolectinas, una de ellas derivada de una aminotricarbocianina muy similar a **Cy-PIP** en estructura.^{20,68} La emisión de las aminoboronolectinas se apagaba a pH ácido, y se prendía a pH básico, al igual que ocurre con **Cy-PIP**. En línea con lo reportado por Zhang *et al.* para carbazoles funcionalizados con ácidos borónicos,^{69,70} Samaniego *et al.* sugieren que podría estar ocurriendo un mecanismo de tipo d-PET en el que la tricarbocianina actuaría como donante de electrones, mientras que el grupo aminoborónico protonado actuaría como aceptor de electrones. Esto explicaría la recuperación de la emisión de la sonda por bloqueo del mecanismo de d-PET

a pH básico. Hasta donde tenemos conocimiento, este mecanismo sólo ha sido reportado para moléculas que contienen sustituyentes ácidos borónicos, con lo cual no podemos aventurarnos a decir que **Cy-PIP** pueda operar por d-PET.

Es claro que el mecanismo de sensado de las aminotricarbocianinas está en discusión en la actualidad. Para **Cy-PIP**, las medidas resueltas en el tiempo podrían sugerir que la única especie emisora de luz es la especie completamente desprotonada. Comparando con los antecedentes reportados a los que nos hemos referido en párrafos precedentes, podemos pensar que la presencia del grupo -COOH en **Cy-PIP** influye en el comportamiento fotofísico del sensor. Por otra parte, es importante destacar que descartamos que el apagamiento de la fluorescencia se deba a la agregación de **Cy-PIP**, pues siempre trabajamos con concentraciones de alrededor de $5\ \mu\text{M}$, a las cuales no se puede hablar de agregación. Así, se deben realizar experimentos adicionales para disponer de evidencias que permitan racionalizar el comportamiento fotofísico de **Cy-PIP** y proponer un posible mecanismo de sensado de pH.

Finalmente, el valor de pK_a de **Cy-PIP** ($7,1 \pm 0,1$) es muy similar al de otros sensores de pH de tipo aminotricarbocianina ya reportados.^{21,30} Esta concordancia en los valores refuerza la hipótesis de Myochin *et al.*, quienes establecieron una correlación entre el valor de pK_a de la diamina y el de la aminotricarbocianina resultante de la sustitución. La *N*-metilpiperazina tiene un pK_a de 7,83 y, según la hipótesis de los autores, se espera un pK_a de una unidad menor para la aminotricarbocianina derivada, es decir, de 6,8.²¹

4.6 Conclusiones

En este capítulo se describieron la síntesis y la caracterización estructural y fotofísica de **Cy-PIP**, una aminotricarbocianina que funciona como sensor molecular de pH. Sus características más destacables son: 1) absorbe y emite luz

en el NIR con un gran corrimiento de Stokes, lo cual evita, por un lado, la autofluorescencia de los tejidos celulares y el daño de los mismos por luz y, por otra parte, favorece la penetración de la luz en los tejidos y minimiza los efectos de filtro interno y de dispersión de luz; 2) el pK_a del sensor se encuentra en un rango de pH relevante desde el punto de vista biológico, con una respuesta rápida y sensible a las fluctuaciones de dicha propiedad; 3) ofrece posibilidad de conjugación a estructuras supramoleculares y a nanomateriales a través del grupo ácido carboxílico en la estructura.

4.7 Referencias

1. Casey, J. R., Grinstein, S. & Orlowski, J. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2010). doi:10.1038/nrm2820
2. Whitten, S. T., Garcia-Moreno E., B. & Hilser, V. J. Local conformational fluctuations can modulate the coupling between proton binding and global structural transitions in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2005). doi:10.1073/pnas.0407499102
3. Tian, L. & Bae, Y. H. Cancer nanomedicines targeting tumor extracellular pH. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **99**, 116–126 (2012).
4. Cheng, Y. *et al.* Perfluorocarbon nanoparticles enhance reactive oxygen levels and tumour growth inhibition in photodynamic therapy. *Nat. Commun.* **6**, 1–8 (2015).
5. Han, J. & Burgess, K. Fluorescent indicators for intracellular pH. *Chem. Rev.* (2010). doi:10.1021/cr900249z
6. Desai, A. S., Chauhan, V. M., Johnston, A. P. R., Esler, T. & Aylott, J. W. Fluorescent nanosensors for intracellular measurements: Synthesis, characterization, calibration, and measurement. *Front. Physiol.* **4** JAN, 1–15 (2014).
7. Schäferling, M. Nanoparticle-based luminescent probes for intracellular sensing and imaging of pH. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **8**, 378–413 (2016).
8. Bashkatov, A. N., Genina, E. A., Kochubey, V. I. & Tuchin, V. V. Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm. *J. Phys. D-Appl. Phys.* (2005).
9. Kunjachan, S., Ehling, J., Storm, G., Kiessling, F. & Lammers, T. Noninvasive Imaging of Nanomedicines and Nanotheranostics:

- Principles, Progress, and Prospects. *Chem. Rev.* **115**, 10907–10937 (2015).
10. Li, F. *et al.* Hydrophilic, upconverting, multicolor, lanthanide-doped NaGdF₄ nanocrystals as potential multifunctional bioprobes. *Chem. - A Eur. J.* **18**, 11641–11646 (2012).
 11. Li, F. *et al.* Microwave-assisted synthesis and up-down conversion luminescent properties of multicolor hydrophilic LaF₃:Ln³⁺ nanocrystals. *Dalt. Trans.* (2013). doi:10.1039/c2dt32295a
 12. Li, F. *et al.* Aqueous phase synthesis of upconversion nanocrystals through layer-by-layer epitaxial growth for in vivo X-ray computed tomography. *Nanoscale* (2013). doi:10.1039/c3nr01530k
 13. Staudinger, C. & Borisov, S. M. Long-wavelength analyte-sensitive luminescent probes and optical (bio)sensors. *Methods Appl. Fluoresc.* **3**, (2015).
 14. Yin, L. *et al.* A dual pH and temperature responsive polymeric fluorescent sensor and its imaging application in living cells. *Chem. Commun.* **48**, 4486–4488 (2012).
 15. Sun, W., Guo, S., Hu, C., Fan, J. & Peng, X. Recent Development of Chemosensors Based on Cyanine Platforms. *Chem. Rev.* **116**, 7768–7817 (2016).
 16. Kiyose, K. *et al.* Molecular design strategies for near-infrared ratiometric fluorescent probes based on the unique spectral properties of aminocyanines. *Chem. - A Eur. J.* **15**, 9191–9200 (2009).
 17. Bonifazi, E. L. *et al.* Versatile supramolecular organogel with outstanding stability toward aqueous interfaces. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 8933–8936 (2014).
 18. Menéndez, G. O., López, C. S., Jares-Erijman, E. A. & Spagnuolo, C. C. A versatile near-infrared asymmetric tricarbocyanine for zinc ion sensing in water. *Photochem. Photobiol.* **89**, 1354–1361 (2013).
 19. Menéndez, G. O., Eva Pichel, M., Spagnuolo, C. C. & Jares-Erijman, E. A.

- NIR fluorescent biotinylated cyanine dye: Optical properties and combination with quantum dots as a potential sensing device. *Photochem. Photobiol. Sci.* **12**, 236–240 (2013).
20. Samaniego Lopez, C., Lago Huvelle, M. A., Uhrig, M. L., Coluccio Leskow, F. & Spagnuolo, C. C. Recognition of saccharides in the NIR region with a novel fluorogenic boronolactin: in vitro and live cell labeling. *Chem. Commun.* **51**, 4895–4898 (2015).
 21. Myochin, T. *et al.* Rational design of ratiometric near-infrared fluorescent pH probes with various pKa values, based on aminocyanine. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 3401–3409 (2011).
 22. Tang, B. *et al.* A Near-Infrared Neutral pH Fluorescent Probe for Monitoring Minor pH Changes : Imaging in Living HepG2 and HL-7702 Cells A Near-Infrared Neutral pH Fluorescent Probe for Monitoring Minor pH Changes : Imaging in Living HepG2 and HL-7702. 3016–3023 (2009). doi:10.1021/ja809149g
 23. Tang, R., Lee, H. & Achilefu, S. Induction of pH sensitivity on the fluorescence lifetime of quantum dots by NIR fluorescent dyes. *J. Am. Chem. Soc.* (2012). doi:10.1021/ja300276s
 24. Flanagan, J. H., Khan, S. H., Menchen, S., Soper, S. A. & Hammer, R. P. Functionalized tricyanocyanine dyes as near-infrared fluorescent probes for biomolecules. *Bioconjug. Chem.* **8**, 751–756 (1997).
 25. Reynolds, G. A. & Drexhage, K. H. Stable Heptamethine Pyrylium Dyes That Absorb in the Infrared. *J. Org. Chem.* **42**, 885–888 (1977).
 26. Makin, S. M.; Boiko, L. I.; Shavrygina, O. A. No Title. *Russ. J. Org. Chem.* **13**, 2440 (1977).
 27. Strekowski, L., Lipowska, M. & Patonay, G. Substitution Reactions of a Nucleofugal Group in Heptamethine Cyanine Dyes. Synthesis of an Isothiocyanato Derivative for Labeling of Proteins with a Near-Infrared Chromophore. *J. Org. Chem.* **57**, 4578–4580 (1992).

28. Narayanan, N. & Patonay, G. A New Method for the Synthesis of Heptamethine Cyanine Dyes: Synthesis of New Near-Infrared Fluorescent Labels. *J. Org. Chem.* **60**, 2391–2395 (1995).
29. Zhang, Z. & Achilefu, S. Synthesis and evaluation of polyhydroxylated near-infrared carbocyanine molecular probes. *Org. Lett.* **6**, 2067–2070 (2004).
30. Menéndez, G. O. *Modulación de las propiedades ópticas de nanocristales semiconductores (Quantum Dots) por modificación superficial: Aplicaciones.* (2012).
31. Vilsmeier, A. & Haack, A. Über die Einwirkung von Halogenphosphor auf Alkyl-formanilide. Eine neue Methode zur Darstellung sekundärer und tertiärer p-Alkylamino-benzaldehyde. *Chem. Ber.* **60**, 119–122 (1927).
32. Marson, C. M. P. R. G. *Synthesis using vilsmeier reagents.* (CRC Press, 1994).
33. Pais, I. R., Nunes, M. J., Reis, L. V., Santos, P. F. & Almeida, P. The synthesis of chloroheptamethinecyanine dyes in the absence of water. *Dye. Pigment.* **77**, 48–52 (2008).
34. Sosnovskii, G. M.; Lugovskii, A. P.; Tischenko, I. G. No Title. *Russ. J. Org. Chem.* **19**, 2143 (1983).
35. Slominski, Yu. L.; Radchenko, I. D.; Popov, S. V.; Tolmachev, A. I. No Title. *Russ. J. Org. Chem.* **19**, 2134 (1983).
36. Peng, X. *et al.* Heptamethine cyanine dyes with a large Stokes shift and strong fluorescence: a paradigm for excited-state intramolecular charge transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 4170–4171 (2005).
37. Lee, H., Mason, J. C. & Achilefu, S. Heptamethine cyanine dyes with a robust C-C bond at the central position of the chromophore. 7862–7865 (2006).
38. Li, P. *et al.* A near-infrared fluorescent probe for detecting copper(II) with high selectivity and sensitivity and its biological imaging applications. *Chem. Commun.* **47**, 7755–7757 (2011).

39. Cheng, T. *et al.* Red-emission fluorescent probe sensing cadmium and pyrophosphate selectively in aqueous solution. *Org. Lett.* **13**, 3656–3659 (2011).
40. Zhu, M. *et al.* Visible Near-Infrared Chemosensor for Mercury Ion Visible Near-Infrared Chemosensor for Mercury Ion. 1133–1136 (2008). doi:10.1021/ol800197t
41. Kiyose, K., Kojima, H., Urano, Y. & Nagano, T. Development of a Ratiometric Fluorescent Zinc Ion Probe in Near-Infrared. **98**, 6548–6549 (2006).
42. Jiang, P. & Guo, Z. Fluorescent detection of zinc in biological systems: Recent development on the design of chemosensors and biosensors. *Coord. Chem. Rev.* **248**, 205–229 (2004).
43. Bunnett, J. F. Aromatic Substitution by the SRN1 Mechanism. *Acc. Chem. Res.* **11**, 413–420 (1978).
44. Southwick, P. L. *et al.* Cyanine dye labeling reagents—carboxymethylindocyanine succinimidyl esters. *Cytometry* **11**, 418–430 (1990).
45. Herz, A. H. Aggregation of sensitizing dyes in solution and their adsorption onto silver halides. *Adv. Colloid Interface Sci.* **8**, 237–298 (1977).
46. Kirstein, S. & Daehne, S. J-aggregates of amphiphilic cyanine dyes: Self-organization of artificial light harvesting complexes. *Int. J. Photoenergy* **2006**, 1–21 (2006).
47. Shapiro, B. I. Molecular assemblies of polymethine dyes. *Russ. Chem. Rev.* **75**, 433–456 (2006).
48. Scheibe, P. D. G. Über die Veränderlichkeit der Absorptionsspektren in Lösungen und die Nebenvalenzen als ihre Ursache. **50**, 212–219 (1937).
49. Jelley, E. E. Spectral Absorption and Fluorescence of Dyes in the Molecular State. *Nature* **138**, 1009–1010 (1936).
50. Kasha, M. Energy Transfer Mechanisms and the Molecular Exciton Model

- for Molecular Aggregates. *Radiat. Res.* **20**, 55–71 (1963).
51. Mcrae, E. G. & Kasha, M. Enhancement of phosphorescence ability upon aggregation of dye molecules [6]. *J. Chem. Phys.* **28**, 721–722 (1958).
 52. Julia.L. Bricks, Yuri.L. Slominskii, I. D. P. and A. P. D. Fluorescent J-aggregates of cyanine dyes: basic research and applications Review. *Methods Appl. Fluoresc.* (2017).
 53. Yao, H., Domoto, K., Isohashi, T. & Kimura, K. In situ detection of birefringent Mesoscopic H and J Aggregates of thiacyanine dye in solution. *Langmuir* **21**, 1067–1073 (2005).
 54. Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. (Wiley-VCH, 2002).
 55. Raghavachari, R. *Near-Infrared Applications in Biotechnology*. (2000).
 56. Gustavsson, T. *et al.* Femtosecond spectroscopic study of relaxation processes of three amino-substituted coumarin dyes in methanol and dimethyl sulfoxide. *J. Phys. Chem. A* **102**, 4229–4245 (1998).
 57. Berlepsch, H. V. & Böttcher, C. Cryo-transmission electron microscopy reveals mesoscopic H- and J-aggregates of near infrared cyanine dyes. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* (2010). doi:10.1016/j.jphotochem.2010.05.025
 58. Wu, X. & Zhu, W. Stability enhancement of fluorophores for lighting up practical application in bioimaging. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 4179–4184 (2015).
 59. Wu, X. *et al.* Constructing NIR silica-cyanine hybrid nanocomposite for bioimaging in vivo: A breakthrough in photo-stability and bright fluorescence with large Stokes shift. *Chem. Sci.* **4**, 1221–1228 (2013).
 60. Descalzo, A. B. & Rurack, K. On the signalling pathways and CuII-mediated anion indication of N-meso-substituted heptamethine cyanine dyes. *Chem. - A Eur. J.* **15**, 3173–3185 (2009).
 61. Ozmen, B. & Akkaya, E. U. Infrared fluorescence sensing of submicromolar calcium: Pushing the limits of photoinduced electron transfer. *Tetrahedron Lett.* (2000). doi:10.1016/S0040-4039(00)01662-2

62. Sasaki, E. *et al.* Highly sensitive near-infrared fluorescent probes for nitric oxide and their application to isolated organs. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 3684–3685 (2005).
63. Corry, B., Jayatilaka, D. & Rigby, P. A flexible approach to the calculation of resonance energy transfer efficiency between multiple donors and acceptors in complex geometries. *Biophys. J.* **89**, 3822–3836 (2005).
64. De Silva, A. P., Moody, T. S. & Wright, G. D. Fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) sensors as potent analytical tools. *Analyst* **134**, 2385–2393 (2009).
65. Daly, B., Ling, J. & De Silva, A. P. Current developments in fluorescent PET (photoinduced electron transfer) sensors and switches. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 4203–4211 (2015).
66. Sun, C. *et al.* A new near-infrared neutral pH fluorescent probe for monitoring minor pH changes and its application in imaging of HepG2 cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **172**, 1036–1044 (2014).
67. Fan, J. *et al.* An ICT-based ratiometric probe for hydrazine and its application in live cells. *Chem. Commun.* **48**, 8117–8119 (2012).
68. Samaniego Lopez, C., Hebe Martínez, J., Uhrig, M. L., Coluccio Leskow, F. & Spagnuolo, C. C. A Highly Sensitive Fluorogenic Probe for Imaging Glycoproteins and Mucine Activity in Live Cells in the Near-Infrared Region. *Chem. - A Eur. J.* **24**, 6344–6348 (2018).
69. Zhang, X. *et al.* Rational design of d-PeT phenylethynylated-carbazole monoboronic acid fluorescent sensors for the selective detection of α -hydroxyl carboxylic acids and monosaccharides. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 17452–17463 (2009).
70. Bull, S. D. *et al.* Exploiting the reversible covalent bonding of boronic acids: Recognition, sensing, and assembly. *Acc. Chem. Res.* (2013). doi:10.1021/ar300130w

5 Nanosensor de pH en el NIR basado en la funcionalización superficial de SiO₂

5.1 Introducción

En el Capítulo 4 describimos la síntesis y la caracterización de un sensor molecular de pH de la familia de las aminotricarbocianinas (**Cy-PIP**). En este capítulo, presentaremos un sensor nanoparticulado de pH derivado de **Cy-PIP** como prototipo de un nano-objeto con aplicación biológica.

Siguiendo la estrategia de inmovilizar colorantes dentro o sobre la superficie de una matriz inerte, las nanopartículas de sílice se revelan como un excelente material de soporte debido a su estabilidad, baja toxicidad y bajo costo de producción. Las nanopartículas de sílice dopadas o funcionalizadas con colorantes en su superficie resultan unos marcadores interesantes para técnicas de visualización (*imaging*) ya que, en muchos casos, aumentan el rendimiento cuántico de fluorescencia de los colorantes y su fotoestabilidad en sistemas biológicos.¹⁻³

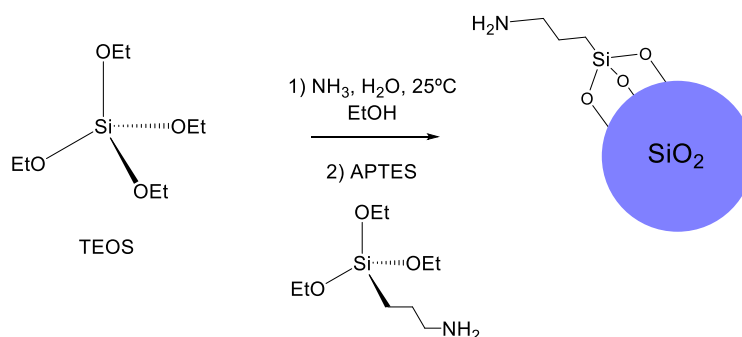
Combinando las excelentes propiedades ópticas de los fluoróforos NIR derivados de tricarbocianinas con la versatilidad de los materiales a base de sílice, obtuvimos un nanosensor de pH con un gran corrimiento de Stokes. El colorante (**Cy-PIP**) lleva una función *N*-metilpiperazina que actúa como aceptor de protones y esa interacción modula su fluorescencia. Además, en este capítulo presentamos la preparación, caracterización y aplicación de este novedoso nanosensor NIR en la detección de cambios de pH en células HeLa (*in vitro* e *in vivo*), como prueba de concepto de su capacidad de detección en un sistema biológico.

5.2 Síntesis de Cy-PIP@SiO₂

En este apartado describiremos la estrategia sintética general que desarrollamos para Cy-PIP@SiO₂ (detalles experimentales en Capítulo 3). Primero se sintetizaron nanopartículas de sílice funcionalizadas con grupos aminopropilo (APTES@SiO₂) y luego se realizó una post-funcionalización de la superficie con **Cy-PIP**.

5.2.1 Síntesis de Nanopartículas de SiO₂ funcionalizadas con APTES

Como ya dijimos, la superficie de las nanopartículas (NP) y coloides de SiO₂ resulta una excelente interfaz para la inmovilización de moléculas.¹ Además, las moléculas basadas en organo-alcoxisilanos constituyen una amplia e interesante biblioteca química para la fácil modificación superficial de materiales derivados de sílice y de óxidos metálicos de transición.⁴ Así, como se muestra en el Esquema 5-1, se sintetizaron nanopartículas de sílice amino-derivada utilizando 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES) de acuerdo con procedimientos estándar reportados.⁵⁻⁷

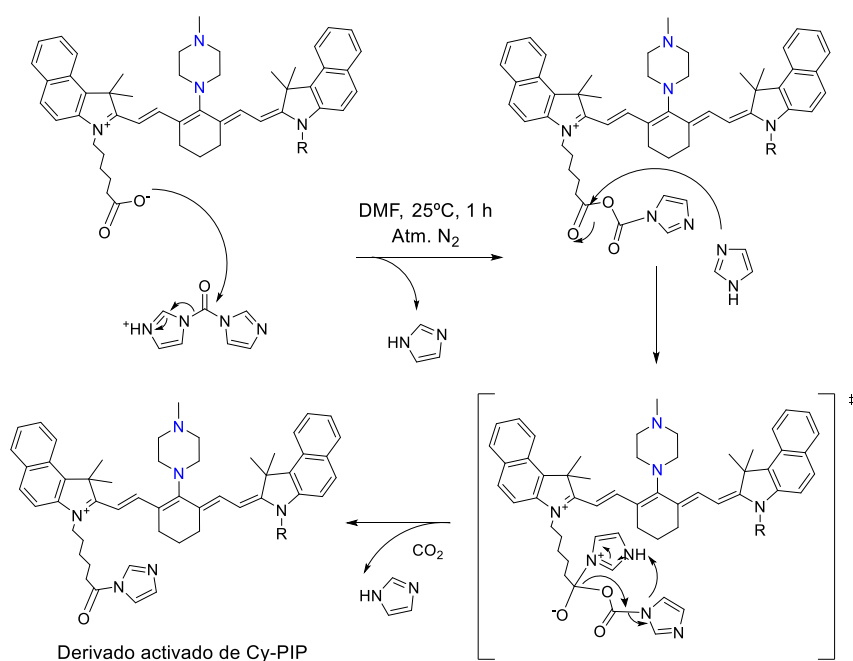


Esquema 5-1. Síntesis de nanopartículas APTES@SiO₂.

En una primera etapa, se obtuvieron semillas de NP de SiO₂ en una dispersión coloidal en etanol, y cinco horas después se adicionó a la reacción una pequeña cantidad de APTES para que pudiera hidrolizarse y condensar con los grupos silanoles de la superficie de las semillas de SiO₂.

5.2.2 Unión de Cy-PIP a APTES@SiO₂

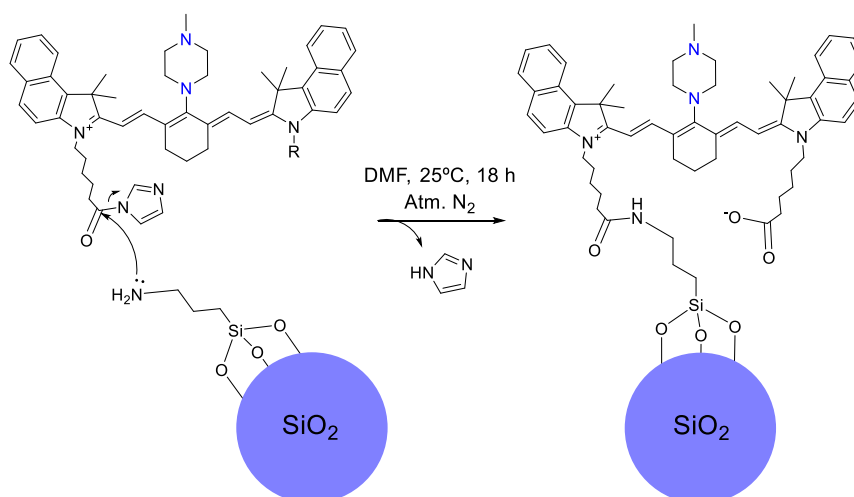
La inmovilización de **Cy-PIP** en la superficie de APTES@SiO₂ se realizó mediante una reacción de acoplamiento con 1,1-carbonildiimidazol (CDI), un procedimiento ampliamente conocido en química orgánica.^{8,9} Se tienen dos etapas: 1) activación de los grupos ácido carboxílico de **Cy-PIP** con CDI (Esquema 5-2) y, 2) reacción del derivado activado de **Cy-PIP** con el grupo amino de la superficie de APTES@SiO₂ (Esquema 5-3).



Esquema 5-2. Etapa de activación de **Cy-PIP** con 1,1-carbonildiimidazol (CDI) en DMF.

La etapa de activación se llevó a cabo en solución y, para la etapa siguiente, se realizó el agregado de esta solución (que contenía el derivado COOH activado de **Cy-PIP**) a una dispersión de APTES@SiO₂ en DMF.

Como se explicitó el Capítulo 3, la cantidad de **Cy-PIP** de partida se calculó en exceso respecto de la cantidad estimada (a partir de consideraciones sobre el tamaño de las NP) de sitios aminopropilo en la superficie (Relación **Cy-PIP**-Amino (NP) 500:1). Por otra parte, cabe aclarar que los esquemas muestran la reacción de un único grupo –COOH de **Cy-PIP** sólo a modo ilustrativo. No descartamos que ambos grupos –COOH de la molécula se activen con CDI, ya que Cy-PIP es simétrica.



Esquema 5-3. Reacción del derivado activado de **Cy-PIP** con APTES@SiO₂ en DMF.

5.3 Caracterización del nuevo material

5.3.1 Morfología y tamaño

En la Figura 5-1 se muestra una micrografía de FE-SEM de Cy-PIP@SiO₂, en la que puede verse que la morfología de las NP es esférica. Mediante el

tratamiento de la imagen de acuerdo al procedimiento descrito en el Capítulo 3, se calculó un diámetro de (89 ± 13) nm.

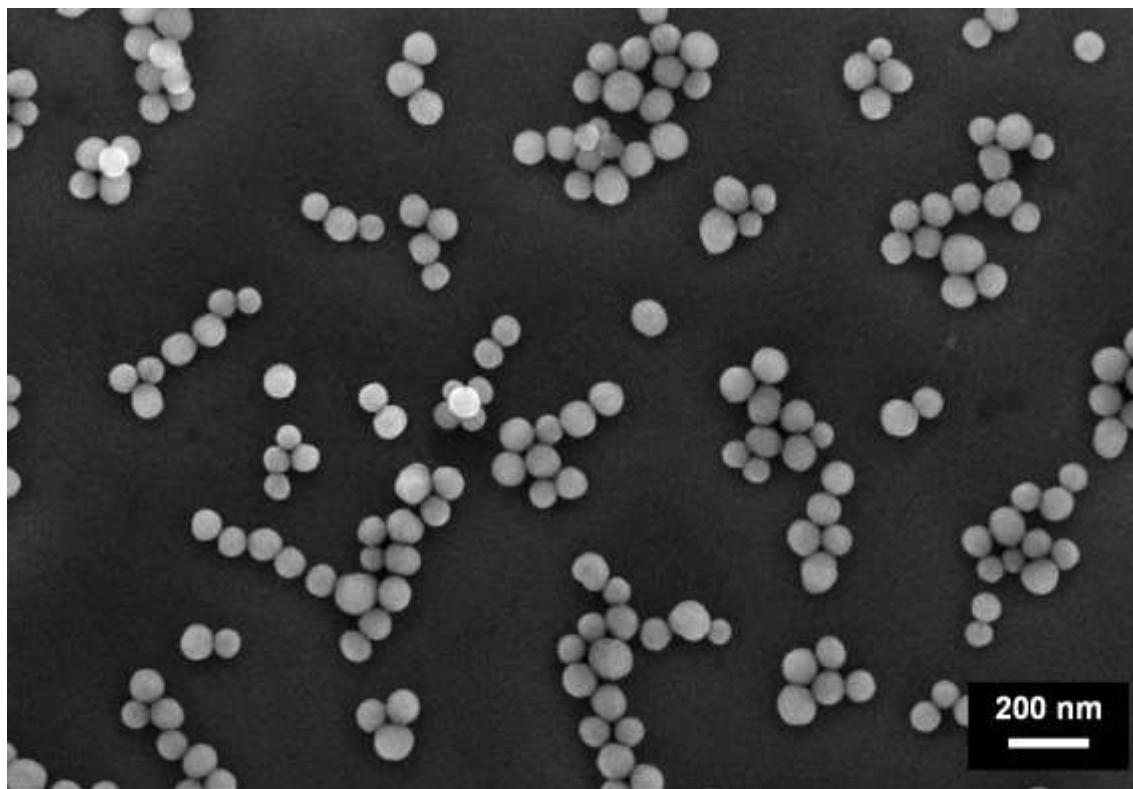


Figura 5-1. Micrografías de FE-SEM de las nanopartículas Cy-PIP@SiO₂. Sobre la imagen se calculó el tamaño de las nanopartículas, que resultó ($N = 150$) en un diámetro = (89 ± 13) nm.

Para evaluar la estabilidad de las nanopartículas en medios de PBS a distintos pHs, suspensiones de Cy-PIP@SiO₂ se trataron con soluciones de PBS 20 mM de pH 5, 7 y 9,5 durante 10 minutos, 1 hora y 3 horas. Mediante SEM se determinó que tanto la forma como el tamaño de las nanopartículas para todos los pHs y tiempos no presentaban cambios significativos.

Por otra parte, con el objeto de medir el diámetro hidrodinámico de las partículas y en pos de comparar con el valor obtenido por SEM, se realizaron medidas de DLS (Figura 5-2). El diámetro hidrodinámico promedio en agua resultó de (152 ± 1) nm ($N=4$ medidas). Se observa que el diámetro experimental promedio obtenido por DLS es mayor que el obtenido por SEM.

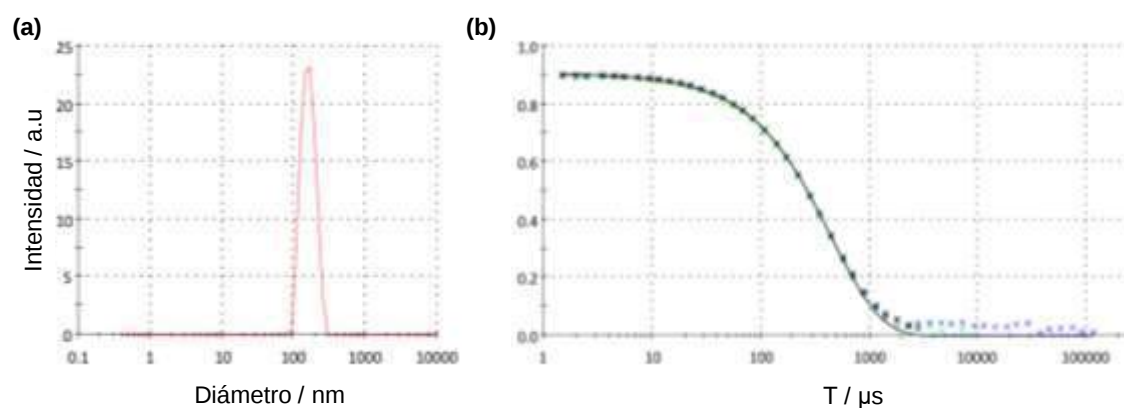


Figura 5-2. Medidas de DLS a 90° de una dispersión acuosa de Cy-PIP@SiO₂ a 25,0°C.

(a) Distribución de tamaño por intensidad, diámetro hidrodinámico = (152 ± 1) nm, $N = 4$ medidas independientes; (b) Función de correlación y su ajuste, $N = 4$.

5.3.2 Espectroscopia infrarroja (FTIR)

La espectroscopia FTIR constituye una herramienta para detectar la presencia de grupos químicos diagnósticos que forman parte del material. En la Figura 5-3 se muestran los espectros de (a) una sílice control de tipo Stöber, (b) APTES@SiO₂ y, (c) Cy-PIP@SiO₂.

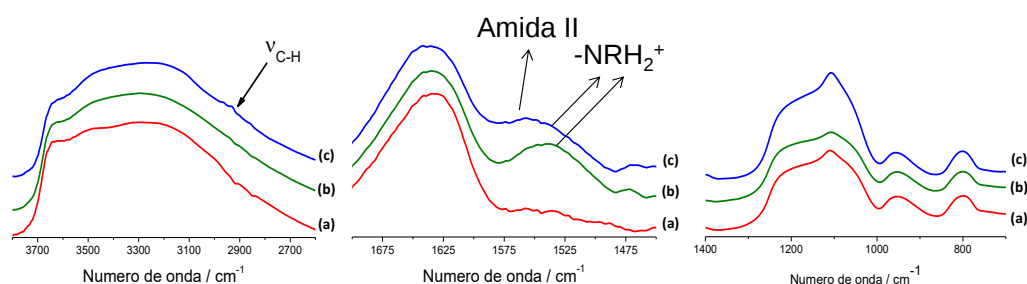


Figura 5-3. Espectros FTIR (DRIFTS) de (a) SiO₂ control de tipo Stöber, (b) APTES@SiO₂ y, (c) Cy-PIP@SiO₂. El espectro completo se ha dividido en regiones a fin de facilitar la visualización de las bandas. Los espectros están desplazados en el eje "y" de absorbancia.

Los espectros FTIR de las nanopartículas de SiO₂ (a) y sus derivados funcionalizados (b) y (c) muestran una banda intensa a 3600-3100 cm⁻¹ que se

corresponde con las vibraciones de estiramientos de O-H. En todos los casos, se observa una banda ancha característica a $1100\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ que se asocia a las vibraciones típicas de Si-O y O-Si-O. Los films de SiO₂ sintetizados por un método sol-gel sin tratamiento de calcinación posterior exhiben un pico muy notorio a 3400 cm^{-1} correspondiente al estiramiento O-H del agua adsorbida a la superficie, que interactúa por puente de hidrógeno.¹⁰⁻¹³ Sumado a ello, la región de $3800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ incluye los estiramientos O-H de los silanoles (SiOH aislados a 3750 cm^{-1} , SiOH geminales a 3742 cm^{-1} y SiOH vecinales entre 3720 y 3520 cm^{-1}).

La sílice de tipo Stöber y la sílice funcionalizada superficialmente por reacciones posteriores (*post-grafting*), dependiendo de la densidad de grupos, puede o no mostrar las bandas características de los alifáticos $\nu(\text{C-H})$ a $2900\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$.^{13,14} Así, en el espectro (c) podemos distinguir las bandas alifáticas características entre 2900 y 2800 cm^{-1} , a diferencia del espectro (a), por lo que dichas señales deben estar asociadas a la presencia de Cy-PIP en la superficie de la sílice. En el caso de APTES@SiO₂ (b), las bandas alifáticas mencionadas apenas se distinguen, lo que nos habla de un grado de funcionalización mucho menor que en otro tipo de materiales, por ejemplo, óxidos mesoporosos.

Las aminas primarias protonadas ($-\text{NRH}_2^+$) tienen absorciones medias a fuertes cerca de 1600 cm^{-1} y 1500 cm^{-1} debido a las vibraciones de deformación simétricas y asimétricas.¹⁴ Estas bandas se ven claramente en el espectro (b) de APTES@SiO₂, entre 1580 y 1480 cm^{-1} . En el espectro (c) aparecen estas bandas $-\text{NRH}_2^+$, pero se superponen a una banda asociada a la absorción característica fuerte de las amidas secundarias en fase sólida (banda amida II, deformación N-H y vibraciones de estiramiento C-N) a $1570\text{-}1515\text{ cm}^{-1}$.¹⁴ Las vibraciones de estiramiento del grupo carbonilo C=O (banda amida I) no pueden distinguirse debido a la fuerte y ancha banda de vibración del agua cerca de 1643 cm^{-1} . Ni las bandas amina primaria $-\text{NRH}_2^+$ ni la banda de amida II están presentes en el espectro (a) de SiO₂ control, a diferencia de lo que pasa con las nanopartículas

funcionalizadas. Toda esta información sugiere que Cy-PIP se ha unido a APTES@SiO₂ NP a través de un enlace amida.

Por otra parte, cabe destacar que no se observó en el espectro (c) una banda a $\sim 1725\text{ cm}^{-1}$ que indicaría la vibración de estiramiento del C=O del –COOH de **Cy-PIP**.

5.4 Emisión de fluorescencia en estado estacionario

En la Figura 5-4 se muestran los espectros de emisión normalizados (en metanol) para **Cy-PIP** (colorante libre) y Cy-PIP@SiO₂. El máximo de emisión en metanol del colorante libre está a 820 nm mientras que, para el colorante anclado en la superficie de las nanopartículas, se encuentra en 825 nm. El desplazamiento del máximo de emisión es muy pequeño, lo que podría sugerir que la superficie, el menos en esta configuración de la unión de la molécula a la superficie, no ejerce influencia significativa en las propiedades fotofísicas del colorante.

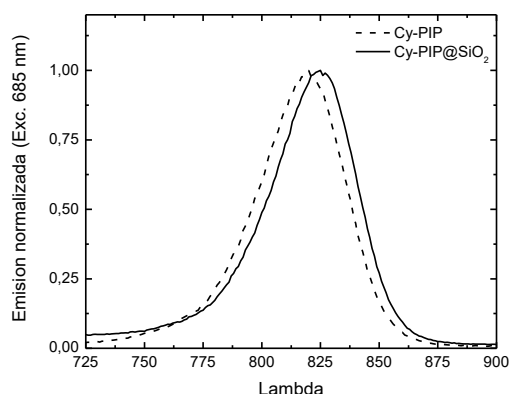


Figura 5-4. Espectros de emisión normalizados en metanol de Cy-PIP (solución $2,5 \cdot 10^{-5}\text{ M}$, línea ----) y Cy-PIP@SiO₂ (línea llena); λ_{exc} : 685 nm, apertura de rendija: 20 nm.

5.5 Cy-PIP@SiO₂ y su rol como nanosensor fluorescente de pH

La emisión de fluorescencia de Cy-PIP@SiO₂ a 820 nm cambia marcadamente cuando se titula en el rango de pH de 3 a 9, en un procedimiento análogo al descrito para la titulación de la sonda libre **Cy-PIP** (Capítulo 4). En la Figura 5-5 se muestran los espectros obtenidos, junto con la curva de pK_a que resulta del ajuste realizado tal como se explica en el Capítulo 3. Cabe aclarar que no se ensayaron pHs mayores a 9 para evitar complicaciones por la disolución de la sílice a esos pHs.¹⁵

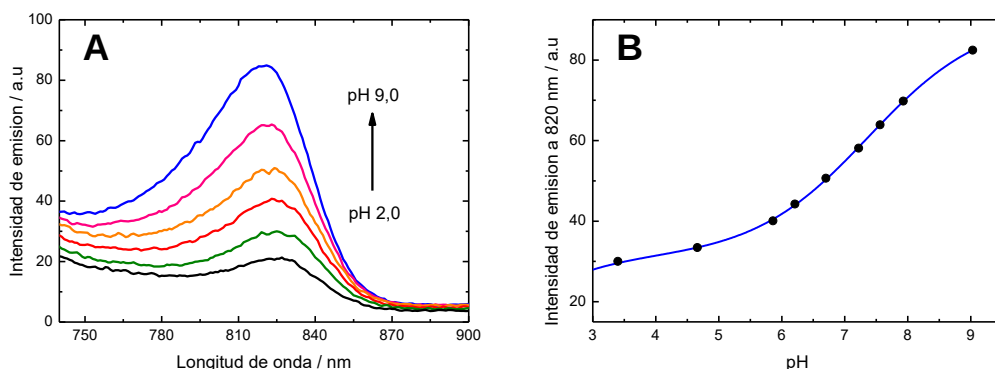


Figura 5-5. (A) Espectro de emisión de Cy-PIP@SiO₂ en buffer PBS 10 mM, rango de pH 2-9; excitación 680 nm. (B) Intensidad de fluorescencia a 820 nm, rango de pH 3-9; excitación 680 nm. El pK_a obtenido a partir del ajuste fue de (7,40±0,01).

El pK_a obtenido por fluorescencia es de 7,4, muy cercano al valor de 7,1 que se obtuvo para el colorante libre (Capítulo 4). Ambos valores se encuentran en un rango de pH común de medios biológicos (ej. células), lo cual hace a Cy-PIP@SiO₂ un nanosensor de pH atractivo para aplicaciones en este sentido.

5.6 Aplicación: Detección de pH en células HeLa *in vivo* e *in vitro*

En esta sección presentaremos los resultados obtenidos en experimentos de internalización de Cy-PIP@SiO₂ en células HeLa (células de cáncer de cuello de útero, Capítulo 3).

5.6.1 Estudios por microscopía confocal de fluorescencia

Con el fin de evaluar la absorción (*uptake*) e internalización del nanosensor Cy-PIP@SiO₂, las células HeLa fueron tratadas durante 1 hora con una suspensión acuosa de nanopartículas. Seguidamente, dichas células fueron lavadas con buffer PBS para eliminar todo resto de nanopartículas que no hubieran sido internalizadas, luego incubadas durante diferentes lapsos de tiempo (1, 2, 3 y 4 horas) a 37°C en medios de cultivo y, finalmente, fijadas con paraformaldehído al 5% p/v para su posterior observación (materiales y métodos en el Capítulo 3). En la Figura 5-6 se muestran las imágenes de las células HeLa obtenidas por microscopía confocal a distintos tiempos de incubación con Cy-PIP@SiO₂. Los núcleos se marcaron con el colorante DAPI (λ_{exc} 405 nm) y Cy-PIP se excitó con un láser de 633 nm.

Se observa que las nanopartículas Cy-PIP@SiO₂ efectivamente se internalizaron en las células ya que, para el primer tiempo de observación (1 hora de incubación) se localizan dispersas alrededor del núcleo (puntos rojos en la Figura 5-6). Asimismo, al observar las imágenes a distintos tiempos se puede ver que las NP se fueron agrupando progresivamente en la región perinuclear. A las 4 horas de incubación se continuó observando un patrón puntuado con localización perinuclear, lo que sugiere que la viabilidad celular no se vio afectada durante el tiempo del experimento.

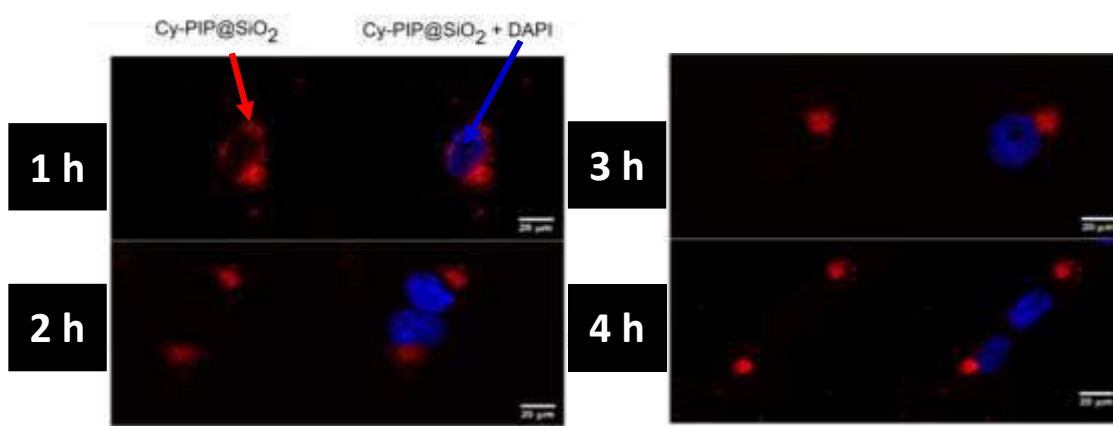


Figura 5-6. Imágenes de células HeLa obtenidas en un microscopio de fluorescencia confocal a diferentes tiempos luego de incubación con el nanosensor Cy-PIP@SiO₂. El núcleo celular fue teñido con DAPI (azul, λ_{exc} 405 nm) y la excitación de Cy-PIP se realizó con un láser a 633 nm, colectando la emisión con un filtro APC-H7.

5.6.2 Estudios por citometría de flujo

Para evaluar cuantitativamente la respuesta del nanosensor a las fluctuaciones de pH en células vivas, se realizó un experimento de citometría de flujo en las mismas condiciones descritas para la microscopía confocal (Sección 5.6.1) en cuanto a concentraciones y tiempos de incubación.

En la Figura 5-7 se muestran los resultados del experimento de citometría en forma de patrones de puntos de dispersión de luz lateral (SSC, *side scatter*) y frontal (FSC, *forward scatter*), que se muestran en color azul. Asimismo, en color verde se indican aquellos puntos que presentan fluorescencia a (780 ± 30) nm. Típicamente, en cada experimento para cada tiempo de incubación (1, 2, 3 y 4 horas), se analizó la intensidad de fluorescencia de $5 \cdot 10^4$ células. Además, células no tratadas con Cy-PIP@SiO₂ se utilizaron como referencia (Figura 5-7 A) para establecer la “compuerta de fluorescencia” (*gating*) y así poder luego realizar el tratamiento de datos en forma de histogramas. También se realizó un

experimento control en el que no se utilizaron células pero sí una suspensión de nanopartículas Cy-PIP@SiO₂ (Figura 5-7 F).

En primer lugar, al comparar el control de células HeLa con los tratamientos con Cy-PIP@SiO₂ a distintos tiempos en la Figura 5-7, se observa que el patrón de puntos azul determinado por las dispersiones de luz frontal y lateral se conserva. Esto sugiere que, durante el tiempo que duró el experimento, no se observaron diferencias en el tamaño, la forma o la granulosidad de las células. El control de Cy-PIP@SiO₂ (Figura 5-7 F) muestra otro patrón de puntos en regiones de bajo FSC y SSC en comparación con las células HeLa control, como se esperaba para nanopartículas de tamaño menor a 200 nm.

En cuanto a la fluorescencia a (780±30) nm, en la Figura 5-7 A se puede ver que existen puntos verdes en el patrón de puntos de las células HeLa control, lo cual indicaría una cierta auto-fluorescencia de los componentes celulares. Sin embargo, para los tratamientos con nanopartículas a todos los tiempos de incubación se observó una mayor densidad de coloración verde en el patrón de puntos (B, C, D y E) en comparación con las células HeLa control (A). Esta observación apunta a la internalización de Cy-PIP@SiO₂ en las células HeLa, como se observó mediante Microscopía confocal de fluorescencia.

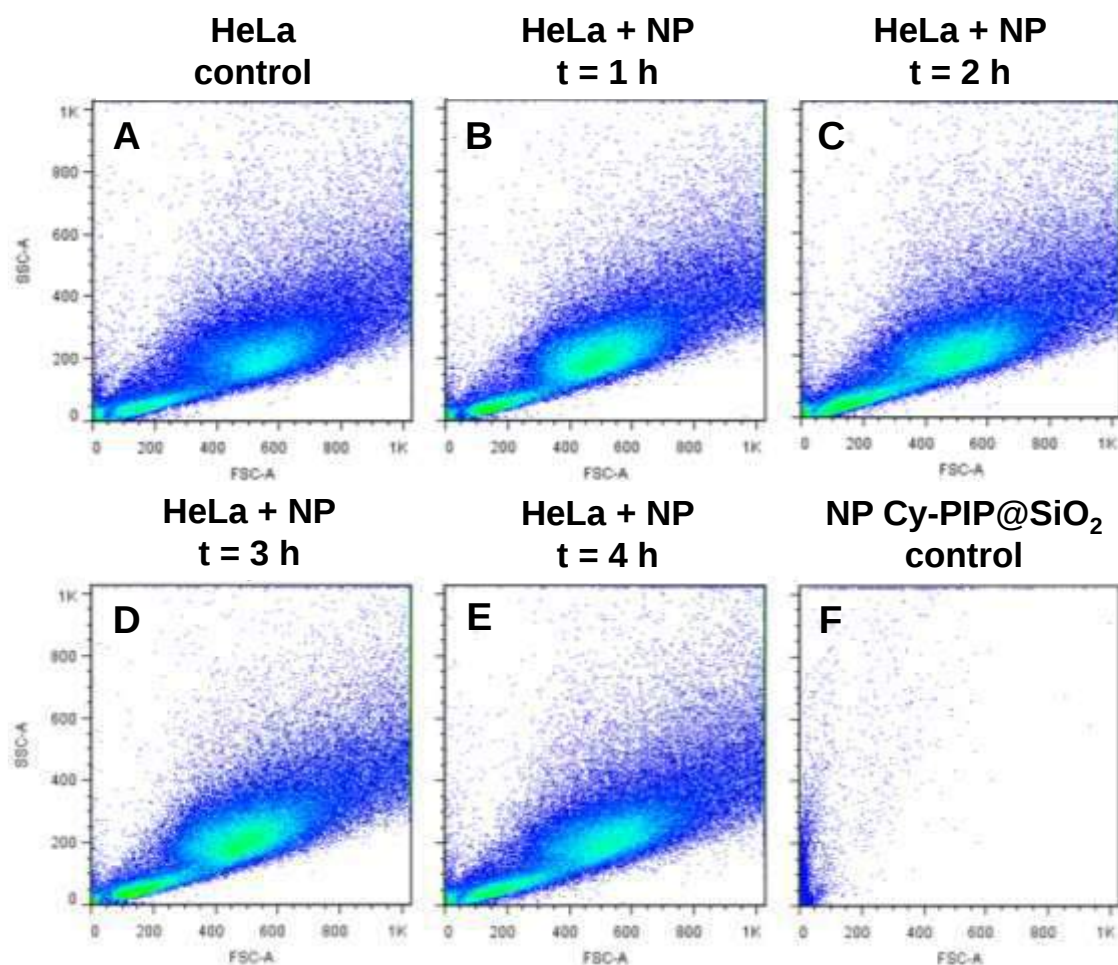


Figura 5-7. Medidas correlacionadas o gráficos de puntos (azul) de luz dispersa frontal (FSC, forward scatter) y luz dispersa lateral (SSC, side scatter), junto con la emisión de fluorescencia (verde).

Excitación: 488 nm para FSC y SSC, 633 nm para emisión de fluorescencia. Observación: 530/30 nm para FCS y SSC, 780/60 para la emisión de fluorescencia.

Por otra parte, en la Figura 5-8 se muestran los resultados de los experimentos de citometría a distintos tiempos de incubación en forma de histogramas. En ellos se grafica el número de eventos (medido en cuentas) en función de la intensidad de fluorescencia (IF). Para cada histograma se determinó la intensidad de fluorescencia promedio de la población analizada y se estableció un porcentaje de la población celular de la muestra que presentaba mayor intensidad de fluorescencia que la IF promedio (fluorescencia positiva).

Como se ve en la Figura 5-8, el porcentaje de fluorescencia positiva va disminuyendo conforme aumenta el tiempo de incubación: pasa de 20,8 % para

1 hora de incubación a 6,2% para 4 horas de incubación. Esto significa que la población celular más fluorescente (con fluorescencia positiva) se reduce en un 70% al cabo de 4 horas. Sumado a ello, la intensidad de fluorescencia promedio va disminuyendo significativamente conforme transcurre el tiempo, hasta reducirse a un 40% de su valor original.

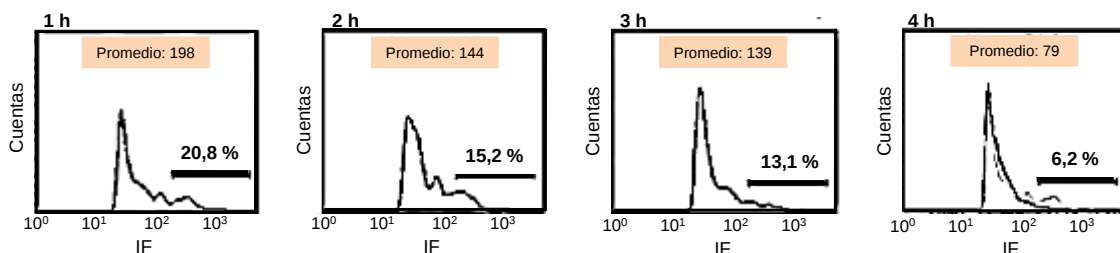


Figura 5-8. Histogramas creados a partir del análisis de los datos de citometría para cada tiempo de incubación (1, 2, 3 y 4 horas). Se grafica el número de eventos (Cuentas) versus la intensidad de fluorescencia (IF) y se indica el promedio para esta última propiedad. También se muestra el porcentaje de eventos con fluorescencia mayor que el promedio (fluorescencia positiva).

5.7 Discusión

5.7.1 Cy-PIP@SiO₂: caracterización y capacidad sensora de pH

En cuanto a la morfología de las nanopartículas, SEM reveló que las nanopartículas Cy-PIP@SiO₂ tienen una forma esférica con un diámetro de (89±13) nm. A su vez, por DLS se determinó un radio hidrodinámico de (152±1) nm. El hecho de que en DLS se midan diámetros hidrodinámicos hace entendible y esperable que se obtengan mayores valores para el diámetro por esta técnica en comparación con SEM. Sin embargo, no descartamos que pudieran estar ocurriendo procesos de hinchamiento (*swelling*) de las nanopartículas en solución, que llevarían a diámetros experimentales mayores. En este sentido, Costa *et al.* demostraron por diferentes técnicas de

caracterización de materiales que existen diferencias significativas en cuanto al hinchamiento de nanopartículas de tipo Stöber de diferentes tamaños en solventes como agua y etanol.¹⁶ Así, en el trabajo de Costa *et al.*, las partículas más pequeñas (22 nm por SEM) presentaron un mayor incremento en su diámetro que las más grandes (118 nm por SEM) al cambiarse el solvente.¹⁶ Por otra parte, Škvarla *et al.* utilizaron microscopía de fuerza atómica (AFM) para determinar el radio de nanopartículas de sílice y propusieron la existencia de una capa elástica de gel en la superficie de sílice coloidal. Entonces, las nanopartículas, una vez dispersas en soluciones acuosas, resultarían más grandes de lo que en verdad son.¹⁷

Por otro lado, como describen Pfeifer *et al.*, las propiedades físico-químicas de las nanopartículas coloidales (NP) se ven influenciadas por su entorno local y este entorno, al experimentar interacciones con la superficie, tiene un impacto diferente al que puede tener el medio continuo o "*bulk*". En particular, las concentraciones locales de iones cerca de la superficie de las nanopartículas son diferentes de las de la solución *bulk* y esto está íntimamente relacionado con la carga superficial.¹⁸ Por ejemplo, si la superficie es mayormente negativa, la concentración local de iones positivos será mayor. En este contexto, los fluoróforos ion-sensibles emergen como una estrategia factible para investigar las concentraciones de iones cerca de la superficie de las NP. Estos fluoróforos generalmente cambian su intensidad de emisión en función de la concentración del ión respectivo / analito y el ejemplo más destacado de esta tesis es **Cy-PIP**, un sensor molecular de pH. Sin embargo, resulta conveniente disponer de algún tipo de referencia interna para realizar medidas relativas (*rationetric sensing*)¹⁹⁻²³ y no de intensidades absolutas, como veremos en el Capítulo 7. Si los colorantes sensibles a iones se unen a la superficie de las NP mediante grupos químicos espaciadores (por ejemplo, ADN^{24,25}, o derivados de PEG^{19,26,27}) de distinta longitud, se tiene la posibilidad de estudiar el perfil de concentración de iones alrededor de las NP. Zhang *et al.*

estudiaron la influencia de la carga superficial de nanopartículas de oro recubiertas con polímeros cargados negativos en la capacidad sensora de pH del conocido colorante SNARF.²⁷ El colorante se unió a las nanopartículas recubiertas mediante espaciadores de tipo PEG de diferente longitud. Los autores mostraron que, a medida que aumentaba la longitud del espaciador, el pK_a del fluoróforo se movía hacia valores más altos que los del colorante libre. Según el modelo de Debye-Hückel, la concentración de iones de signo contrario atraídos a la superficie (en este caso, los H^+) decae radialmente con la distancia hasta llegar a la concentración de la solución *bulk* a largas distancias. En este sentido, el pH local cerca de las NP es menor que el de la solución *bulk*. En términos del SNARF, si el espaciador es lo suficientemente largo (6-8 nm para un PEG de 10 kDa), el pH sentido se corresponde con el de la solución *bulk*. Por el contrario, si el espaciador tiene una longitud menor a 1 nm (PEG 0,1 kDa), la concentración local de H^+ que sensa el SNARF es mayor, el pH local disminuye respecto del pH de la solución *bulk* y, por lo tanto, el pK_a observado para la sonda es mayor que el de la sonda libre.²⁷ Es decir, la sonda cerca de la superficie de la nanopartícula (cargada negativa) puede protonarse a un pH de solución *bulk* más alcalino que la sonda libre porque la concentración local de H^+ es mayor.

En la Sección 5.5 vimos que Cy-PIP@SiO₂ se comporta como un nanosensor de pH en buffer PBS, con un pK_a de 7,4. Este valor es ligeramente mayor al hallado para el pK_a de **Cy-PIP** sonda libre, de 7,1 (Capítulo 4). Si bien la concordancia entre los valores de pK_a de la sonda libre y anclada a la superficie es buena, el antecedente de Zhang *et al.* nos lleva a pensar que el corrimiento hacia un pK_a más alcalino se deba a la influencia de la superficie.²⁷ **Cy-PIP** está unido a la superficie de las nanopartículas mediante un grupo aminopropilo cuya longitud es menor a 1 nm, lo que hace que esté muy cerca de la superficie y su entorno local sea probablemente más ácido que el de la solución *bulk*. También, se observó (Sección 5.4) que el espectro de emisión de

Cy-PIP@SiO₂ presenta un pequeño corrimiento batocrómico (5 nm) respecto de Cy-PIP libre en metanol, lo cual podría estar relacionado con una pequeña influencia de la superficie sobre la fotofísica de **Cy-PIP**.

5.7.2 Internalización y capacidad sensora de pH de Cy-PIP@SiO₂ en células HeLa

Diversos estudios han reportado que las nanopartículas inorgánicas con diámetros menores de 100 nm tienden a mostrar una mayor eficiencia de penetración en tumores que NP más grandes.²⁸ Aun así, partículas más grandes, de alrededor de 200 nm, también pueden ser internalizadas a menor velocidad por células HeLa.²⁹ En la Sección 5.6 presentamos los resultados de los ensayos de internalización de Cy-PIP@SiO₂ en células HeLa *in vitro*. Por microscopía de fluorescencia confocal determinamos que una hora de incubación con la suspensión de nanopartículas (4 µg/ml) alcanza para que ocurra internalización. A la hora de observación las nanopartículas se vieron ubicadas alrededor del núcleo celular. Luego de 4 horas de tratamiento, las nanopartículas se observaron en la región perinuclear, y la morfología de los núcleos de las células no se vio alterada. Complementariamente, por citometría de flujo pudimos evaluar el comportamiento del nanosensor *in vivo*, una vez internalizado en las células. Durante el tiempo que duró el experimento (4 horas de incubación fue el tiempo más largo), el patrón de puntos de dispersión (SSC y FSC) no se vio afectado ni mostró diferencias respecto del ensayo control de células HeLa sin NP, lo cual dio la pauta de que tanto el tamaño (dado por la dispersión frontal, FSC) como la forma, la granulosidad y la estructura (dadas por la dispersión lateral, SSC) de las células no se vio afectada durante la exposición a Cy-PIP@SiO₂.³⁰ Este hallazgo es consistente con las observaciones de microscopía confocal y nos indica que, a las concentraciones de trabajo, no se puede hablar de toxicidad biológica de las nanopartículas.

Por otra parte, se conoce que la endocitosis está implicada en varios procesos celulares importantes como el metabolismo de proteínas y lípidos, la presentación de antígenos y la homeostasis energética.^{31,32} El proceso de endocitosis detecta y regula la interacción entre una célula y su ambiente externo, y así permite el ingreso de materiales extracelulares a las células. Por ejemplo, la degradación y el reciclado de receptores transmembrana mediante endocitosis regula la sensibilidad de las células a ciertos ligandos específicos.^{33,34} Durante la endocitosis, la acidificación progresiva resulta esencial para diferentes aspectos de varias funciones bioquímicas y fisiológicas de las células.³⁵ En nuestro caso, los experimentos de citometría de flujo permitieron establecer que tanto la intensidad de fluorescencia promedio como el porcentaje de células con fluorescencia positiva van disminuyendo considerablemente conforme aumenta el tiempo de incubación. Estas observaciones son consistentes con el mecanismo por el cual la fusión endosoma-lisosoma conduce a una drástica caída del pH dentro del compartimiento celular.³⁶

5.8 Conclusiones

Utilizando métodos sintéticos (in)orgánicos asequibles y versátiles pudimos construir un nanosensor altamente biocompatible con capacidad sensora de pH. El nanosensor Cy-PIP@ SiO₂ conserva las características fotofísicas salientes de **Cy-PIP** como su gran corrimiento de Stokes y su emisión de fluorescencia en NIR que se ve modulada por la concentración de protones en el medio. El pK_a de Cy-PIP@SiO₂ (7,4) se encuentra en el rango más relevante a monitorear desde el punto de vista biológico (6 a 8) y la respuesta del nanosensor a los cambios de pH en células vivas brindó la posibilidad de seguir el proceso de endocitosis celular, con una toxicidad no detectable en las condiciones del ensayo.

Esta plataforma de sensores establece un punto de partida prometedor para lograr un bio-nanosensor de pH de alto rendimiento. La flexibilidad de la superficie y la estructura de la SiO₂, en términos de su modificación química, ofrece una amplia gama de posibilidades en cuanto a la fijación de sondas complementarias y/o ligandos específicos para dirigir la nanosonda de forma controlada al sitio deseado. Más aún, como veremos en el Capítulo 7, la plataforma de Cy-PIP@SiO₂ puede ser modificada a fin de incluir otros fluoróforos en la estructura de las nanopartículas y así lograr respuestas autoreferenciadas de pH (*ratiometric sensing*) o marcado con biomoléculas relevantes (ej. ácido fólico).

5.9 Referencias

1. Caltagirone, C., Bettoschi, A., Garau, A. & Montis, R. Silica-based nanoparticles: A versatile tool for the development of efficient imaging agents. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 4645–4671 (2015).
2. Chinen, A. B. *et al.* Nanoparticle Probes for the Detection of Cancer Biomarkers, Cells, and Tissues by Fluorescence. *Chemical Reviews* **115**, 10530–10574 (2015).
3. Korzeniowska, B., Nooney, R., Wencel, D. & McDonagh, C. Silica nanoparticles for cell imaging and intracellular sensing. *Nanotechnology* **24**, (2013).
4. Bordoni, A. V., Lombardo, M. V. & Wolosiuk, A. Photochemical radical thiol-ene click-based methodologies for silica and transition metal oxides materials chemical modification: A mini-review. *RSC Advances* **6**, (2016).
5. Stöber, W., Fink, A., Bohn, E. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *J. Colloid Interface Sci.* **26**, 62–69 (1968).
6. Badley, R. D., Ford, W. T., Mценroe, F. J. & Assinks, R. A. Surface Modification of Colloidal Silica. *Langmuir* **6**, 792–801 (1990).
7. Van Blaaderen, A. & Vrij, A. Synthesis and Characterization of Colloidal Dispersions of Fluorescent, Monodisperse Silica Spheres. *Langmuir* **8**, 2921–2931 (1992).
8. Wuts, P. G. M. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis: Fifth Edition*. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis: Fifth Edition* **9781118057**, (2014).
9. Montalbetti, C. A. G. N. & Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **61**, 10827–10852 (2005).
10. Almeida, R. M., Pantano, C. G. & Rui, M. A. Structural investigation of silica gel films by infrared spectroscopy. *J. Appl. Phys.* **68**, 4225–4232

(1990).

11. Sacks, Michael D., Tseng, S.-Y. Preparation of SiO₂ Glass from Model Powder Compacts: II, Sintering. *J. Am. Ceram. Soc.* **67**, 532–537 (1984).
12. Burneau, A., Ckdex, F. V. L. N., Gallas, J. P. & Lavalley, J. C. Comparative Study of the Surface Hydroxyl Groups of Fumed and Precipitated Silicas . 2 . Characterization by Infrared Spectroscopy of the Interactions with Water. 1364–1372 (1990).
13. Marchena, H., Granada, M., Bordoni, A. V, Williams, F. J. & Wolosiuk, A. Journal of Solid State Chemistry Organized thiol functional groups in mesoporous core shell colloids. **187**, 97–102 (2012).
14. George Socrates. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*. (Wiley-VCH, 2004).
15. Rimer, J. D., Trofymuk, O., Navrotsky, A., Lobo, R. F. & Vlachos, D. G. Kinetic and thermodynamic studies of silica nanoparticle dissolution. *Chem. Mater.* **19**, 4189–4197 (2007).
16. Costa, C. A. R., Leite, C. A. P. & Galembeck, F. Size Dependence of Stöber Silica Nanoparticle Microchemistry. *J. Phys. Chem. B* **107**, 4747–4755 (2003).
17. Škvarla, J. & Škvarla, J. An identification of the soft polyelectrolyte gel-like layer on silica colloids using atomic force and electron microscopy. *Ultramicroscopy* **181**, 97–106 (2017).
18. Pfeiffer, C. *et al.* Interaction of colloidal nanoparticles with their local environment: The (ionic) nanoenvironment around nanoparticles is different from bulk and determines the physico-chemical properties of the nanoparticles. *Journal of the Royal Society Interface* **11**, (2014).
19. Riedinger, A. *et al.* Ratiometric optical sensing of chloride ions with organic fluorophore-gold nanoparticle hybrids: A systematic study of design parameters and surface charge effects. *Small* **6**, 2590–2597 (2010).
20. Arduini, M., Mancin, F., Tecilla, P. & Tonellato, U. Self-organized

- fluorescent nanosensors for ratiometric Pb²⁺ detection. *Langmuir* **23**, 8632–8636 (2007).
21. Page, L. E., Zhang, X., Jawaide, A. M. & Snee, P. T. Detection of toxic mercury ions using a ratiometric CdSe/ZnS nanocrystal sensor. *Chem. Commun.* **47**, 7773–7775 (2011).
 22. Doussineau, T., Smaïhi, M. & Mohr, G. J. Two-dye core/shell zeolite nanoparticles: A new tool for ratiometric pH measurements. *Adv. Funct. Mater.* **19**, 117–122 (2009).
 23. Ali, Z. *et al.* Multifunctional nanoparticles for dual imaging. *Anal. Chem.* (2011). doi:10.1021/ac103261y
 24. Obliosca, J. M., Wang, P. C. & Tseng, F. G. Probing quenched dye fluorescence of Cy3-DNA-Au-nanoparticle hybrid conjugates using solution and array platforms. *J. Colloid Interface Sci.* **371**, 34–41 (2012).
 25. Díaz, J. A., Grever, D. M. & Gibbs-Davis, J. M. Tuning ratios, densities, and supramolecular spacing in bifunctional DNA-modified gold nanoparticles. *Small* **8**, 873–883 (2012).
 26. Zhang, F. *et al.* Polymer-coated nanoparticles: A universal tool for biolabelling experiments. *Small* **7**, 3113–3127 (2011).
 27. Zhang, F. *et al.* Ion and pH sensing with colloidal nanoparticles: influence of surface charge on sensing and colloidal properties. *Chemphyschem* **11**, 730–735 (2010).
 28. Wilhelm, S. *et al.* Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature Reviews Materials* **1**, (2016).
 29. Dos Santos, T., Varela, J., Lynch, I., Salvati, A. & Dawson, K. A. Quantitative assessment of the comparative nanoparticle-uptake efficiency of a range of cell lines. *Small* **7**, 3341–3349 (2011).
 30. Shapiro, H. *Practical Flow Cytometry*, 4th edition. (Wiley, 2003).
 31. Maxfield, F. R. & McGraw, T. E. Endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 121–132 (2004).

32. Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D. L. & Ballabio, A. Signals from the lysosome: A control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 283–296 (2013).
33. Mukherjee, S., Ghosh, R. N. & Maxfield, F. R. Endocytosis. *Physiol. Rev.* **77**, 760–790 (1997).
34. Huotari, J. & Helenius, A. Endosome maturation. *EMBO Journal* **30**, 3481–3500 (2011).
35. Casey, J. R., Grinstein, S. & Orlowski, J. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2010). doi:10.1038/nrm2820
36. Wang, C. *et al.* Investigation of endosome and lysosome biology by ultra pH-sensitive nanoprobe. *Advanced Drug Delivery Reviews* **113**, 87–96 (2017).

6 Nanopartículas de SiO₂ modificadas con azul de metileno y potencial aplicación en terapia fotodinámica

6.1 Introducción

En este capítulo se reporta la síntesis y caracterización de una variedad de nanomateriales que encapsulan en su matriz azul de metileno (MB, por las palabras inglesas *methylene blue*). Como abordamos en el Capítulo 1, el MB es una molécula derivada de las fenotiazinas que posee las siguientes características: i) está aprobada por la FDA (*Food and Drug Administration*) para su uso en humanos como tratamiento para la metahemoglobinemia;¹ ii) absorbe y emite luz en la región del NIR, a la vez que tiene un alto rendimiento de producción de ¹O₂; iii) es catiónico, lo que permite su encapsulación en NP de SiO₂ mediante interacciones electrostáticas y, iv) es de bajo costo.

En este capítulo presentaremos dos estrategias para incluir MB dentro de la matriz de SiO₂. En un caso se trabajó con una modificación de la síntesis de Stöber y, por otra parte, se hizo uso de microemulsiones inversas para obtener NP de SiO₂ dopadas con MB. Se detallarán las propiedades fotofísicas de cada uno de los sistemas sintetizados y, con el objeto de contribuir en el campo de la nanomedicina, se establecerá su potencial aplicación para terapia fotodinámica por producción de oxígeno singulete. Finalmente, se relacionarán las propiedades fotofísicas y la producción de oxígeno singulete con las variables de síntesis.

6.2 Caracterización de nanopartículas dopadas con MB

6.2.1 Nanopartículas de tipo Stöber (MB@SiO₂-ST)

6.2.1.1 Introducción

Como dijimos, el MB es una molécula catiónica. Esa carga positiva permanente favorece las interacciones electrostáticas con las superficies de sílices, que se hallan cargadas negativamente. De hecho, este principio de interacción electrostática para inmovilizar colorantes catiónicos en superficies con cargas fijas aniónicas ha sido ampliamente utilizado en química de materiales.²⁻⁴

6.2.1.2 Caracterización del material MB@SiO₂-ST

Se obtuvieron NP de forma esférica mediante una modificación del conocido método de Stöber⁵ utilizando el protocolo descrito en el Capítulo 3. Llamaremos MB@SiO₂-ST a las partículas sintetizadas por este método. Durante el crecimiento de las NP de SiO₂, el fluoróforo queda atrapado en la matriz debido a las interacciones electrostáticas que operan entre MB (cargado positivo) y los oligómeros de sílice (cargados negativos). Se probaron dos relaciones molares silicio-MB, a saber: 1 molécula de MB / 500 átomos de Si (MB@SiO₂-ST-1) y, 1 molécula de MB / 5000 átomos de Si (MB@SiO₂-ST-2). Cabe destacar que el colorante se adicionó al comienzo de la síntesis, con lo cual se estima que la encapsulación ocurrió en todo el volumen de las NP. En la Figura 6-1 se puede apreciar el aspecto de ambas suspensiones etanólicas de NP, antes y después de centrifugarlas. Se ve que MB@SiO₂-ST-1, como esperábamos, es de color azul intenso, mientras que MB@SiO₂-ST-2 resultó celeste. Además, a ojo

desnudo los sobrenadantes de la centrifugación no poseen coloración azul, lo cual sugiere que no existe una liberación apreciable de colorante, como veremos.

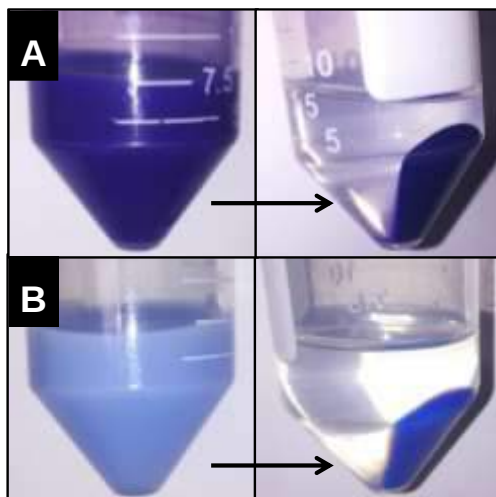


Figura 6-1. NP (A) MB@SiO₂-ST-1 y (B) MB@SiO₂-ST-2 en suspensión de etanol y luego de una centrifugación (5000 rpm, 20 minutos).

Más adelante, en la Sección 6.3.1.1, presentaremos la caracterización por espectroscopia UV-visible de las NP y los sobrenadantes que se muestran en la Figura 6-1.

6.2.1.2.1 Morfología y tamaño

En la Figura 6-2 se pueden ver las micrografías de FE-SEM obtenidas para las NP MB@SiO₂-ST-2. Se observa que tienen una forma esférica, con un diámetro promedio de 181 ± 11 nm. Por otra parte, con el objeto de medir diámetro hidrodinámico de las partículas y compararlo con el valor obtenido por SEM, se realizaron medidas de DLS (Figura 6-3). El diámetro hidrodinámico promedio en etanol resultó de 201 ± 7 nm (índice de polidispersión, PDI = 0,049). Se observa que el diámetro experimental promedio obtenido por DLS es mayor que el obtenido por SEM.

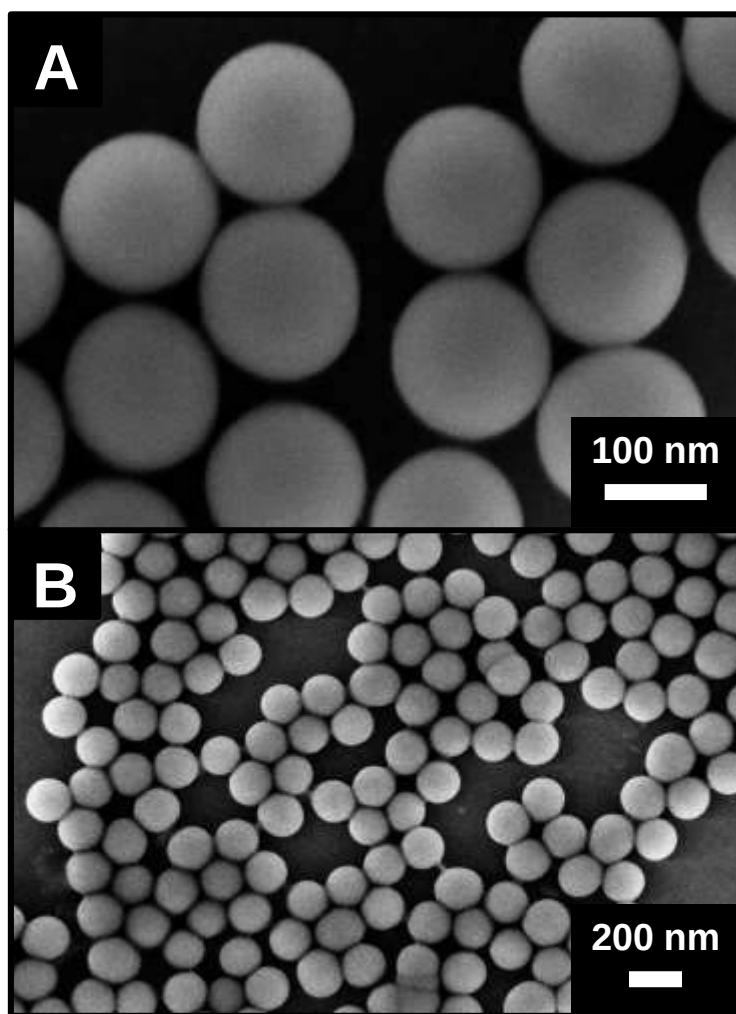


Figura 6-2. Micrografías de FE-SEM de las NP MB@SiO₂-ST-2 (1:5000). Sobre la imagen (B) se calculó el tamaño de las NP, que resultó ($N = 100$) en un diámetro = (181 ± 11) nm.

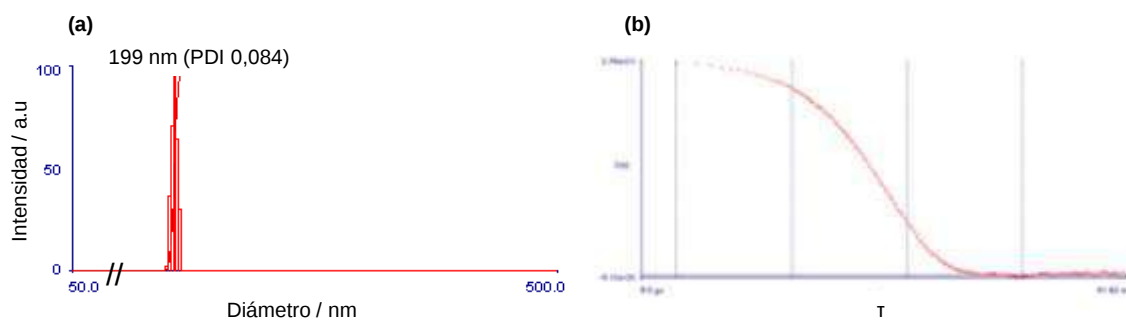


Figura 6-3. Medidas de DLS a 90° de una dispersión etanólica de MB@SiO₂-ST-2 a 25.2°C. El diámetro hidrodinámico calculado a partir de la medición a ángulo variable fue de (201 ± 7) nm (30 a 150°, cada 10°) con un PDI promedio de 0,049; (a) Distribución de tamaño por intensidad para 90°, se muestra el tamaño promedio y el PDI para esta medida; (b) Función de correlación para 90°.

Para las NP con 1 molécula de MB cada 500 átomos de silicio (MB@SiO₂-ST-1) se realizó un tratamiento análogo de las micrografías de FE-SEM (Figura 6-4), y se obtuvo un tamaño de (135 ± 15) nm.

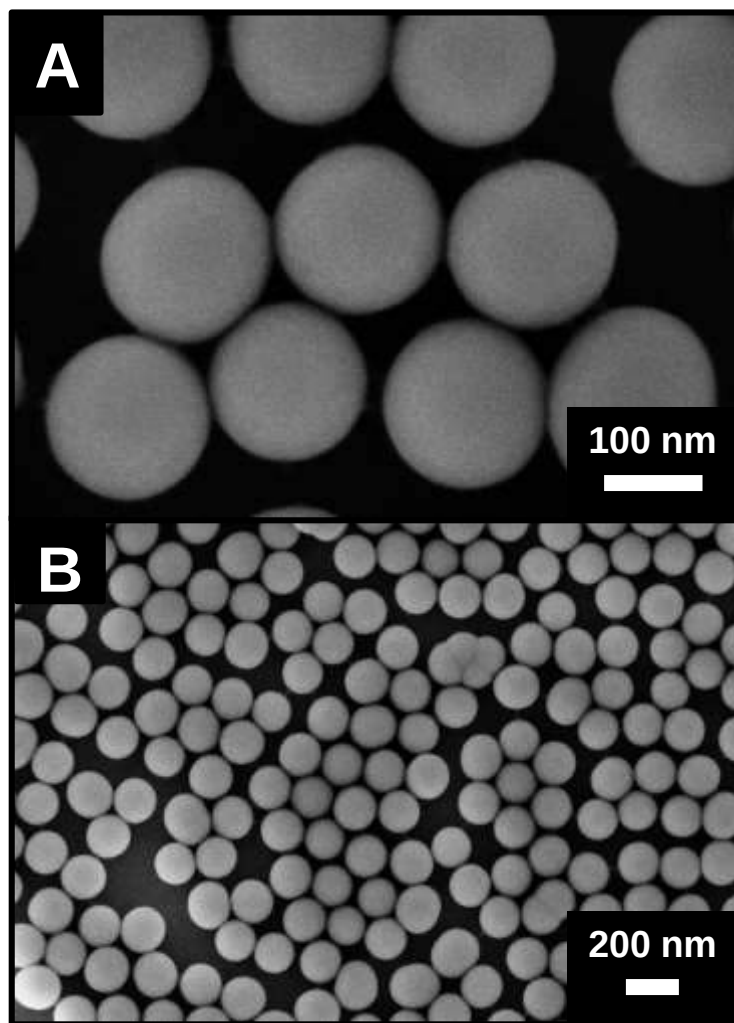


Figura 6-4. Micrografías de FE-SEM de las NP MB@SiO₂-ST-1 (1:500); Sobre la imagen (B) se calculó un diámetro ($N = 100$) de (135 ± 15) nm.

Por otra parte, las medidas de DLS (Figura 6-5) arrojaron un diámetro hidrodinámico de (213 ± 9) nm (PDI 0,080).

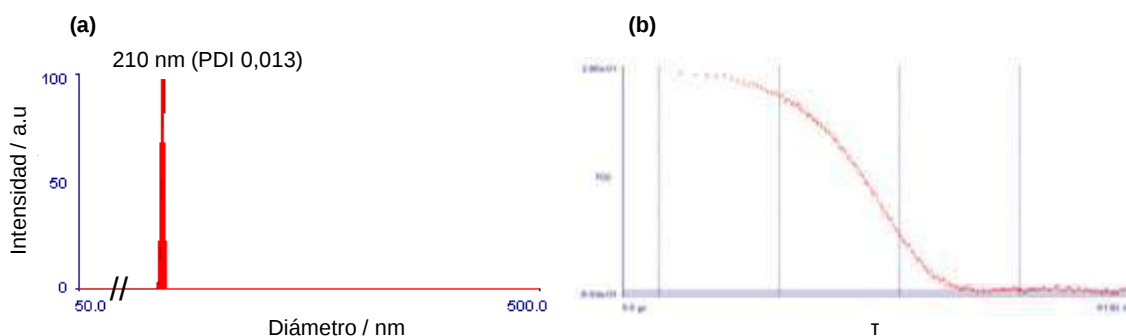


Figura 6-5. Medidas de DLS a 90° de una dispersión etanólica de MB@SiO₂-ST-1 a 25.2°C. El diámetro hidrodinámico calculado a partir de la medición a ángulo variable fue de (213 ± 9) nm (30 a 150° , cada 10°) con un PDI promedio de 0,080; (a) Distribución de tamaño por intensidad para 90° , se muestra el tamaño promedio y el PDI para esta medida; (b) Función de correlación para 90° .

6.2.2 Nanopartículas por Micromemulsión Inversa

6.2.2.1 Introducción

Como ya abordamos en los Capítulos 1 y 3, los métodos de emulsiones inversas para sintetizar NP de sílice consisten en ofrecer nanogotas de agua como reactores en los que ocurre la hidrólisis y condensación del alcoxisilano del que se desee partir. La mayor limitación de este método para desarrollar materiales luminiscentes de sílice reside en que el colorante con el que se quiere dopar el material debe ser soluble en agua en una buena proporción, dado que toda la química ocurre en las nanogotas de agua.¹ Así, se prefieren los colorantes solubles en agua, en muchos casos catiónicos, como el azul de metileno.

6.2.2.2 Caracterización del material MB@SiO₂-ME

Como se indicó en el Capítulo 3, se realizaron síntesis de microemulsión inversa (con un $R = 10$) por co-hidrólisis de dos alcoxisilanos: TEOS y HDTMOS,

en distintas proporciones, y luego se depositó (*one-pot*) una capa de TEOS para darle buena dispersabilidad a las NP en solventes próticos. De esta manera, se obtuvieron NP de tipo núcleo-cáscara (del inglés, *core-shell*), en las cuales el núcleo era parcialmente hidrofóbico (dado que contenía HDTMOS) en mayor o menor grado y la cáscara era hidrofílica (sólo TEOS). Por otra parte, y en una variante de la síntesis, se depositó una cáscara que contenía grupos amino, a través del uso de APTES como alcoxisilano. Para los núcleos se probaron esencialmente tres relaciones molares de TEOS-HDTMOS: 1:3, 2:2 y, 3:1 (Síntesis 1, 2 y 3, respectivamente). En una exploración inicial se observó que concentraciones inferiores a 10^{-6} M de MB no resultaban en un dopado detectable por absorción UV-visible. Así, se trabajó en concentraciones superiores (10^{-4} M, típicamente).

Para facilitar la lectura de los resultados, recordemos que MB@SiO₂-ME hace referencia a NP sintetizadas por microemulsión inversa. Luego se agrega una referencia numérica (1, 2 o 3) dependiendo de la proporción de los diferentes silanos en el núcleo. Así, MB@SiO₂-ME-2 se refiere a una proporción 2:2 TEOS-HDTMOS. Si además las cáscaras provienen de una funcionalización con APTES, la nomenclatura será MB@SiO₂-ME-2-NH₂.

El colorante se adicionó una vez formada la emulsión y previo al agregado de los silanos. Sin embargo, el MB tiene carácter catiónico y su solubilidad en ciclohexano es escasa, con lo cual se estima que la mayor parte del colorante se encuentra solubilizado en las gotas de agua de la microemulsión inversa. Luego de agregados los silanos y el amoníaco, comienzan las reacciones de hidrólisis y condensación de los alcoxisilanos en las gotas de agua y el MB se encapsula en la matriz. Cuando se añade el silano para depositar la cáscara hidrofílica (TEOS o APTES), aún queda MB en la fase acuosa, con lo cual es razonable que el colorante se encapsula tanto en el núcleo como en la cáscara de las NP, es decir, en todo el volumen del objeto. En la Figura 6-6 se puede apreciar el aspecto de dos suspensiones etanólicas de NP

distintas ($\text{MB@SiO}_2\text{-ME-1}$ y $\text{MB@SiO}_2\text{-ME-1-NH}_2$), antes y después de centrifugarlas. La diferencia de color tiene que ver principalmente con la concentración de NP suspendidas. A ojo desnudo puede verse que los sobrenadantes de la centrifugación no poseen coloración azul.

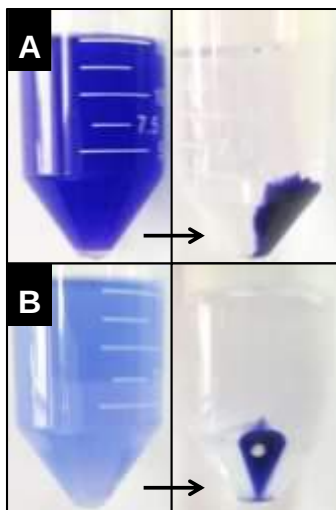


Figura 6-6. NP (A) $\text{MB@SiO}_2\text{-ME-1}$ y (B) $\text{MB@SiO}_2\text{-ME-1-NH}_2$ en suspensión de etanol y luego de una centrifugación (7500 rpm, 30 minutos).

En la Sección 6.3.2.1, presentaremos la caracterización por espectroscopia UV-visible de las NP que se muestran en la Figura 6-6.

6.2.2.2.1 Morfología y tamaño de $\text{MB@SiO}_2\text{-ME}$

6.2.2.2.1.1 Nanopartículas “hidrofílicas”: $\text{MB@SiO}_2\text{-ME-3}$

En la Figura 6-7 se muestran las micrografías de FE-SEM de las NP con proporción 3:1 de TEOS-HDTMOS. Dichas partículas, al contener menor proporción de silano hidrofóbico, son las que presentaron mayor carácter hidrofílico y esto explica su mejor dispersabilidad en agua en comparación con $\text{MB@SiO}_2\text{-ME-2}$ y 1. La forma es esférica desde la etapa de síntesis de los

núcleos, y se calcula un crecimiento promedio de 8 nm para la cáscara de sílice, con un tamaño de nanopartícula núcleo-cáscara final de (50 ± 4) nm.

Cabe destacar que por medidas de DLS no se obtuvieron diámetros hidrodinámicos que estuvieran en línea con el resultado de SEM. Siempre se obtuvieron valores del orden de los 200 nm, lo que nos sugiere que los sistemas en suspensión se encuentran formando agregados de más de una partícula. Si bien SEM no es una técnica por la cual se pueda evaluar agregación, en las imágenes de la Figura 6-7 puede distinguirse que las partículas no se encuentran formando una monocapa como sí ocurre con MB@SiO₂-ST (Figura 6-2 y Figura 6-4), sino que se acumulan en varias capas, unas encima de las otras. Por estas razones, se decidió no utilizar DLS como una técnica de caracterización rutinaria del tamaño de los sistemas preparados por microemulsión inversa.

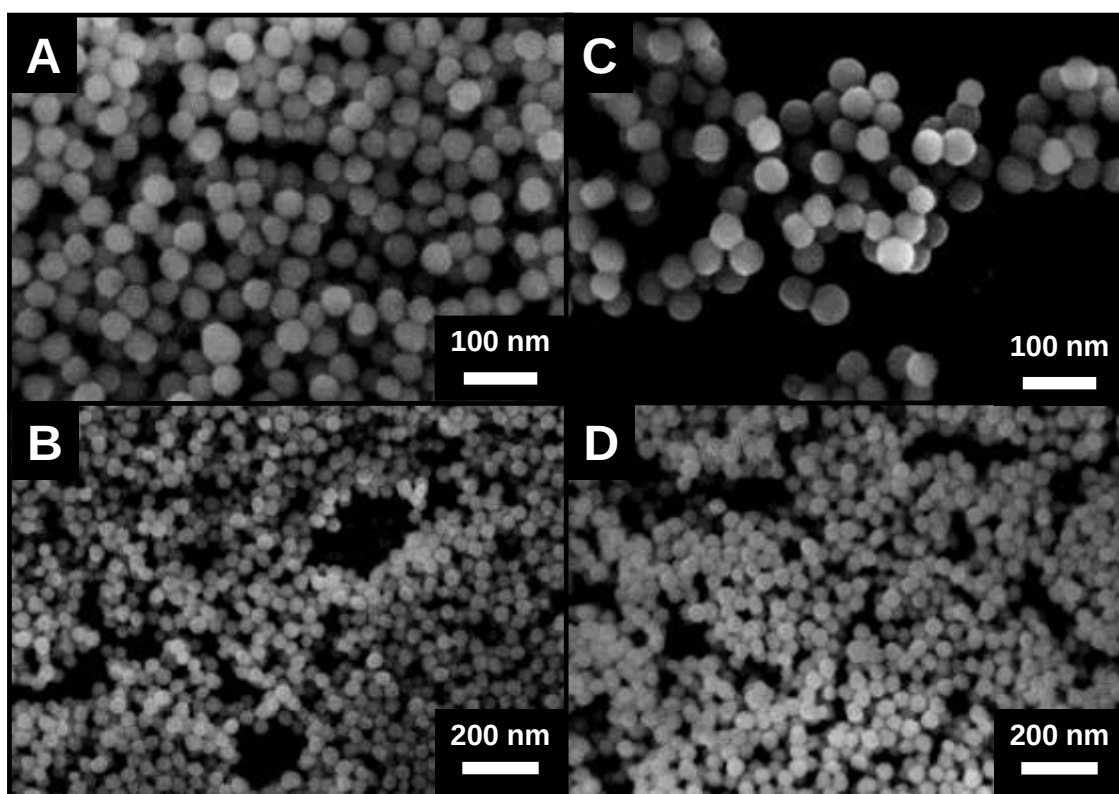


Figura 6-7. Micrografías de FE-SEM de las NP MB@SiO₂-ME-3; (A) y (B) corresponden a las NP núcleo y (C) y (D) a las NP núcleo-cáscara. Los diámetros medidos son: Núcleo (N=100): (42 ± 3) nm, núcleo-cáscara (N=100): (50 ± 4) . El crecimiento promedio es de 8 nm (SD 7 nm).

6.2.2.2.1.2 Hidrofobicidad intermedia: MB@SiO₂-ME-2

Cuando se utilizan iguales proporciones de TEOS y HDTMOS para la síntesis del núcleo se obtienen partículas de forma esférica, con un tamaño final de (55±3) nm, como se muestra en la Figura 6-8. El crecimiento promedio de núcleo a núcleo-cáscara es de 7 nm y la forma de las NP es esférica.

Para esta proporción 2:2 de TEOS-HDTMOS en el núcleo se puso a punto una síntesis de varios pasos en un solo reactor (*one-pot*), que incluía como último paso la funcionalización con aminopropiltriethoxisilano (APTES) tal y como se describe en el Capítulo 3. Se observó que el crecimiento de la cáscara resultaba menor (en general, un 50% menor) cuando se usaba APTES en comparación con las NP control en las que se utilizaba TEOS. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la incerteza en la determinación del crecimiento de la cáscara de sílice es del orden del valor promedio, con lo cual el valor informado es sólo una estimación que nos da una idea de que el crecimiento en diámetro es siempre menor al 10% del diámetro original.

Las NP MB@SiO₂-ME-2 se midieron por DLS a ángulo variable (agua milliQ) y se obtuvo un valor de (165±27) nm (PDI 0,288). El valor alto de PDI indica que la muestra no es monodispersa y, muy probablemente, existan agregados de diferentes tamaños (de dos o más partículas). Nuevamente, estos resultados están en línea con la decisión ya mencionada de no utilizar DLS como una técnica de caracterización de rutina del tamaño de las NP sintetizadas por microemulsión.

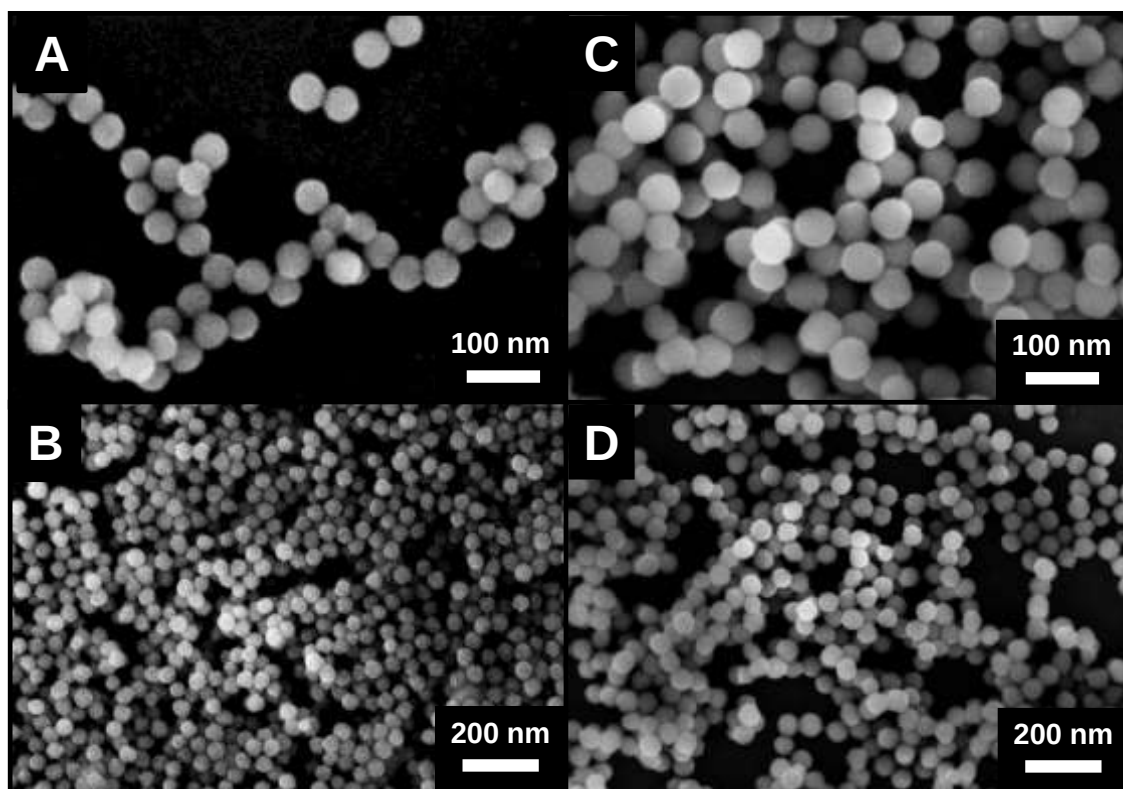


Figura 6-8. Micrografías de FE-SEM de las NP MB@SiO₂-ME-2. (A) y (B) son imágenes de NP núcleo, (C) y (D) son imágenes de NP de tipo núcleo-cáscara que se han originado a partir de los núcleos mostrados en (A) y (B). Los tamaños calculados son ($N = 100$): (48 ± 3) nm para los núcleos y (55 ± 3) nm para los núcleo-cáscara, con un crecimiento promedio de 7 nm de la cáscara de sílice (SD 6 nm).

6.2.2.2.1.3 Nanopartículas “hidrofóbicas”: MB@SiO₂-ME-1

En la Figura 6-9 (A y B) se muestran las micrografías de FE-SEM para las NP núcleo-cáscara de mayor carácter hidrofóbico en el núcleo. Asimismo, se observan las imágenes de MB@SiO₂-ME-1-NH₂ (Figura 6-9 C y D). En todos los casos la forma es esférica y se observa que las NP se distribuyen en forma de cúmulos. En este caso, la funcionalización con aminos (MB@SiO₂-ME-1-NH₂) resultó en partículas ligeramente más grandes que las NP control con cáscara de sílice (MB@SiO₂-ME-1): (55 ± 5) versus (51 ± 6) nm, respectivamente, a diferencia de lo ocurrido para las NP con proporción 2:2 (Sección 6.2.2.2.1.2). Sin embargo, no dispusimos de un número considerable de ensayos con proporción 1:3 en el

núcleo y funcionalización con APTES en la cáscara de forma de poder establecer una tendencia en cuanto al crecimiento de esta última.

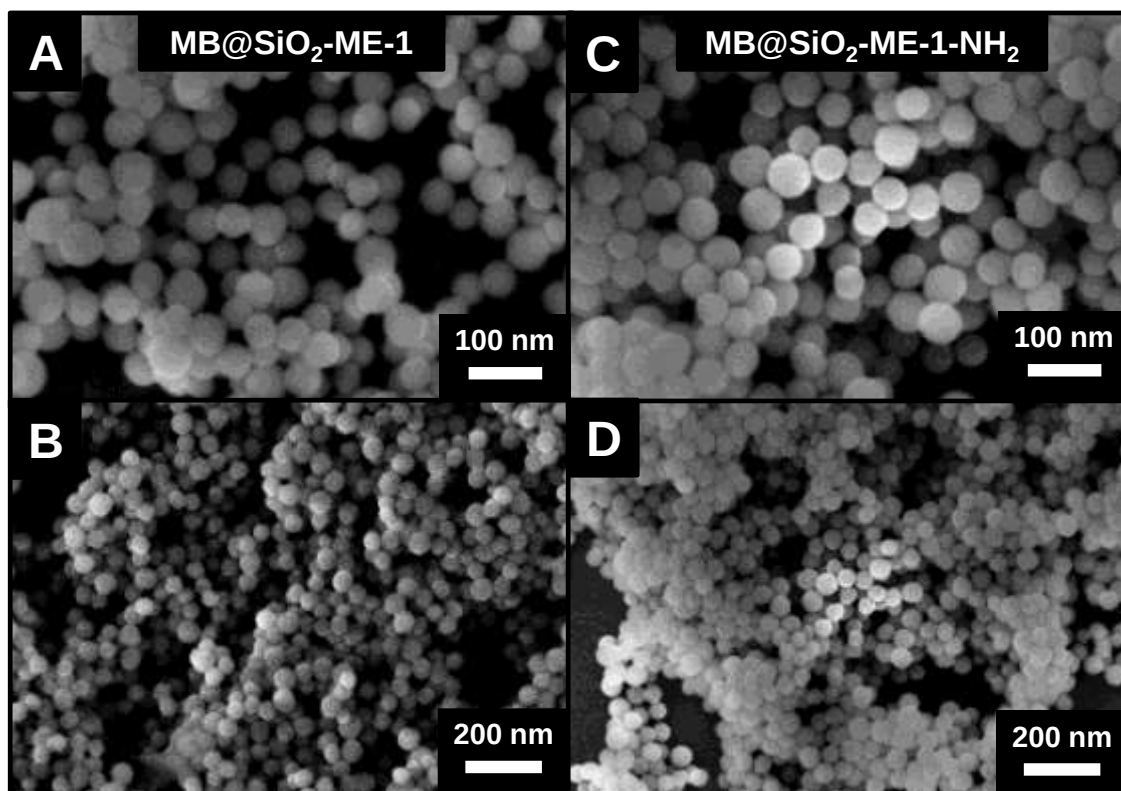


Figura 6-9. Micrografías de FE-SEM de las NP MB@SiO₂-ME-1. (A) y (B) son imágenes de NP núcleo-cáscara con cáscara de TEOS y, (C) y (D) son imágenes de NP de tipo núcleo-cáscara con cáscara de APTES. Los tamaños calculados son ($N = 100$): (51 ± 6) nm para los MB@SiO₂-ME-1 y (55 ± 5) nm para MB@SiO₂-ME-1-NH₂.

6.2.2.2.2 Potencial zeta

Para estudiar la funcionalización con grupos aminopropilo vía microemulsión inversa, se evaluó la carga superficial (potencial zeta) de las NP con MB. En la Figura 6-10 se observan los puntos medidos para MB@SiO₂-ME-2 y MB@SiO₂-ME-2-NH₂, a diferentes pHs.

Como muestra la Figura 6-10, la carga superficial de MB@SiO₂ se convierte en más negativa a medida que se incrementa el pH, con un punto

isoelectrico de entre 3 y 4. Este comportamiento se relaciona con la disociación de los grupos silanoles, como ya ha sido reportado en literatura.⁶⁻⁸ Por su parte, la carga superficial de la sílice modificada con aminopropilo se convierte en positiva por debajo de pH 6,7 (punto isoelectrico) debido a la protonación de los grupos amino de la superficie. La inversión de la carga superficial que se da al funcionalizar con aminos podría indicar que la mayoría de los grupos silanoles originales se han convertido en grupos aminopropilo.⁸

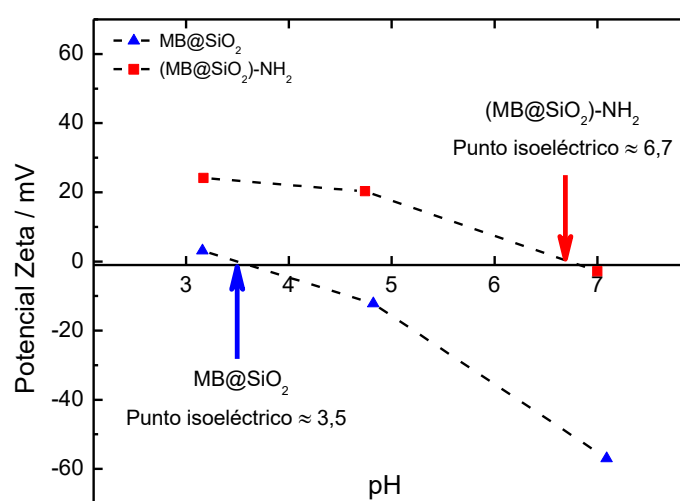


Figura 6-10. Potencial zeta (carga superficial) de NP MB@SiO₂-ME-2 y MB@SiO₂-ME-2-NH₂. Se utilizó KCl 10 mM como electrolito soporte y se titularon las suspensiones acuosas con soluciones acuosas diluidas de HCl y NaOH.

6.2.2.2.3 Espectroscopia FTIR

La presencia de azul de metileno en las NP puede ser evaluada por espectroscopia FTIR. En la Figura 6-11 se muestran los espectros de una sílice control SiO₂ (sin dopar con MB) y una sílice de tipo MB@SiO₂-ME-2.

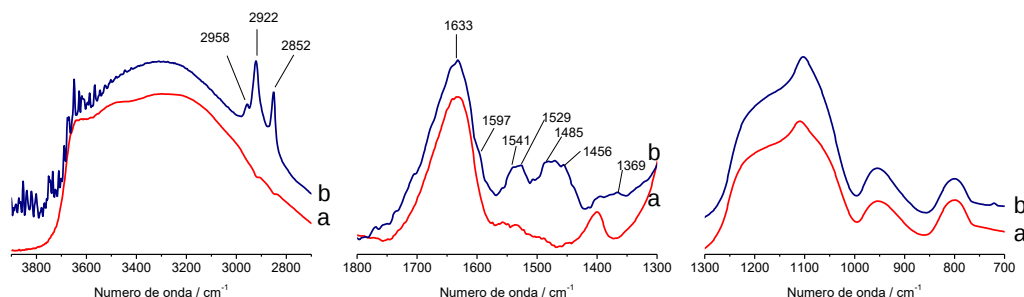


Figura 6-11. Espectros FTIR (DRIFTS) de; (a) SiO_2 control de tipo Stöber y (b) $\text{MB@SiO}_2\text{-ME}$. El espectro completo se ha dividido en regiones a fin de facilitar la visualización de las bandas. Los espectros están desplazados en el eje “y” de absorbancia, que no se explicita.

Los espectros de FTIR de las NP de SiO_2 y $\text{MB@SiO}_2\text{-MB-2}$ muestran una banda intensa a $3600\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ que se corresponde con las vibraciones de estiramientos de O-H. En ambos casos, se observa una banda ancha característica a $1100\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ que se asocia a las vibraciones típicas de Si-O y O-Si-O. Los films de SiO_2 sintetizados por un método sol-gel sin tratamiento de calcinación posterior exhiben un pico muy notorio a 3400 cm^{-1} correspondiente al estiramiento O-H del agua adsorbida a la superficie, que interactúa por puente de hidrógeno.⁹⁻¹² Asimismo, la región de $3800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ incluye los estiramientos O-H de los silanoles (SiOH aislados a 3750 cm^{-1} , SiOH geminales a 3742 cm^{-1} y SiOH vecinales entre 3720 y 3520 cm^{-1}).

En el espectro (b) podemos distinguir las bandas alifáticas características entre 2900 y 2800 cm^{-1} , a diferencia del espectro (a), por lo que dichas señales deben estar asociadas a la presencia de MB en la estructura de la sílice.¹³ Más específicamente, los picos a 2922 y 2852 cm^{-1} pertenecen a las vibraciones simétricas en el $-\text{CH}_3$ del grupo dimetilamino del MB. Análogamente, el pico a 2958 cm^{-1} proviene de las vibraciones asimétricas en el mismo metilo.

Asimismo, los picos en la región de $3550\text{-}3450\text{ cm}^{-1}$ se asocian a las vibraciones de los grupos OH unidos que interactúan con los monómeros de MB o toman un rol en la formación de agregados de tipo H. Así, estas bandas,

que se observan en el espectro (b), dan cuenta del MB atrapado en la matriz de sílice.¹³

De acuerdo a resultados reportados en literatura, los espectros de soluciones de azul de metileno que han sido llevadas a seco resultan diferentes de los espectros de las moléculas libres y los hidratos de MB. Las diferencias más notorias se dan para concentraciones iniciales de 10^{-4} y 10^{-3} M de MB, con una importante contribución de los agregados H.¹³ La región entre 1700 y 1300 cm^{-1} es la más importante para identificar las bandas de MB que están presentes en el espectro (b) y no están presentes en SiO_2 (a). En primer lugar, tenemos la señal débil a 1633 cm^{-1} que es compatible con las vibraciones $\text{C}=\text{N}^+$ de los grupos dimetilamino. Esta señal aparece montada sobre la banda vibracional del agua cerca de 1643 cm^{-1} , que está presente en ambos tipos de NP, control y con MB. Luego, se puede ver un hombro a 1597 cm^{-1} asociado a las vibraciones heterocíclicas $\text{C}=\text{C}$ y $\text{C}=\text{N}$ y un grupo de señales entre 1441 y 1529 cm^{-1} vinculadas con las vibraciones de estiramiento de $\text{C}-\text{C}$ y $\text{C}-\text{N}$. Finalmente, entre 1485 y 1456 cm^{-1} tenemos las señales de las vibraciones $\text{C}=\text{S}^+$ y, a 1369 cm^{-1} las vibraciones de estiramiento debidas tanto a $\text{C}-\text{N}$ como a $\text{C}=\text{S}^+$ del heterociclo.¹³

6.3 Caracterización fotofísica de las nanopartículas

En esta sección veremos cómo son los espectros de absorción y emisión de estos sistemas, y qué revelan acerca de los mismos. Se hará hincapié en las diferencias más salientes en los espectros de absorción de acuerdo al tipo de síntesis empleado para producir las NP.

6.3.1 MB@SiO₂-ST

6.3.1.1 Espectroscopia UV-visible

6.3.1.1.1 Espectros de absorción y estado de agregación del colorante

Como se describió en el Capítulo 3, luego de la síntesis y posterior purificación de las NP, se deben medir sus espectros UV-visible para tener información acerca del estado de agregación del MB encapsulado en la matriz de sílice (Figura 6-12), en comparación con el que presenta el MB en solución.

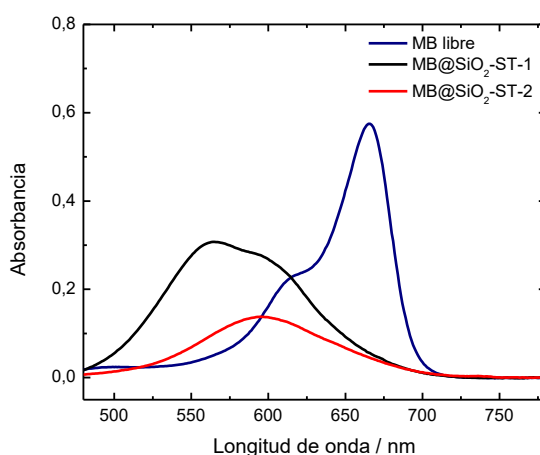


Figura 6-12. Espectros de absorción en DMF de: solución de azul de metileno $1,5 \cdot 10^{-5}$ M (azul), suspensión de NP MB@SiO₂-ST-1 (0,87 mg/ml, negro) y MB@SiO₂-ST-2 (8,46 mg/ml, rojo). Los espectros se han corregido a los efectos de eliminar el efecto de la dispersión de luz de las NP.

En la Figura 6-12 puede verse que el MB libre presenta un máximo de absorción en DMF a 655 nm, con un hombro a 614 nm. Como vimos en el Capítulo 1, el monómero de MB presenta un espectro de absorción en etanol con un máximo a 660 nm y un hombro a 610 nm.¹⁴ El dímero, por su parte, tiene un máximo a 605 nm y una segunda banda cerca de 690 nm, y todo el espectro es mucho menos intenso que el del monómero.¹⁵⁻¹⁷ El espectro de MB libre que se ve en la Figura 6-12 debe ser entonces el resultado de la superposición de los

espectros del dímero y del monómero, aunque en la concentración empleada la proporción de dímero es muy baja y, por tanto, mayormente se trata del espectro del monómero. En el caso de las NP, se observa que los espectros presentan un corrimiento hipsocrómico respecto del espectro del monómero, lo cual sugiere que el azul de metileno encapsulado mediante el método de Stöber en la sílice se encuentra mayormente agregado. El espectro de MB@SiO₂-ST-2 presenta un máximo de absorción efectivo a 595 nm que muy probablemente se deba a la superposición de los espectros del dímero y del monómero. En el caso de MB@SiO₂-ST-1, el máximo absoluto se encuentra a 560 nm, con una segunda banda alrededor de 595 nm. Nuevamente, observamos que en MB@SiO₂-ST-1 se tiene un espectro complejo, resultado de la suma de diferentes especies de MB encapsuladas: monómero en muy pequeña proporción, dímero y agregados superiores (banda a 560 nm).

Para estimar el orden de magnitud de la cantidad de monómero presente en las NP, tal y como se describió en el Capítulo 3, se utilizó el ϵ de azul de metileno en etanol a 654 nm ($40700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) reportado por Taniguchi *et al.*¹⁸ y, por supuesto, los datos de los espectros de la Figura 6-12. Los resultados se informan en la Tabla 6-1.

Tabla 6-1. Cantidad de MB monómero presente en las NP MB@SiO₂-ST estimada a partir de los espectros de absorción en DMF.* Se utilizó el peso molecular de C₁₆H₁₈ClN₃S·3 H₂O (373.85).

	Conc. Np / g/L	A (654 nm)	Conc. MB mon / M	Moles MB mon / 100 g NP	% m/m MB* en las NP
MB@SiO ₂ @ST-1	0,87	0,081	$1,98 \cdot 10^{-6}$	$2,3 \cdot 10^{-4}$	0,09
MB@SiO ₂ @ST-2	8,46	0,061	$1,50 \cdot 10^{-6}$	$1,8 \cdot 10^{-5}$	0,007

Resulta ilustrativo comparar los valores estimados de MB monómero presente en las NP (Tabla 6-1) con los valores obtenidos en el caso de que todo

el colorante adicionado se hubiera incorporado a la matriz de sílice como monómero. En la Tabla 6-2 se muestra la comparación de los % m/m.

Tabla 6-2. Estimación de la cantidad de MB incorporada como monómero en MB@SiO₂-ST respecto de la cantidad inicial de MB utilizada en las síntesis.

	% m/m MB* en las NP	% m/m teórico	% MB incorporado como monómero
MB@SiO ₂ @ST-1	0,09	1,25	7,2
MB@SiO ₂ @ST-2	0,007	0,13	5,4

Los valores sugieren, como esperábamos, que la proporción de MB incorporada como monómero en las NP de tipo Stöber siempre es menor al 10% de la cantidad inicial. Del restante $\approx 90\%$, parte se incluye en las NP como dímeros y agregados superiores a la vez que la mayor proporción se pierde en la solución etanólica (después se elimina como sobrenadante).

6.3.1.1.2 Liberación de MB de la matriz de SiO₂

Para evaluar la liberación de colorante de los coloides, como se explicó en el Capítulo 3, se midieron las absorbancias de los sobrenadantes de centrifugación que se observan en la Figura 6-1. Cabe destacar que los sobrenadantes de centrifugación se obtuvieron a partir de partículas ya purificadas, que habían sido guardadas en suspensión etanólica durante un año, protegidas de la luz.

En la Figura 6-13 se muestran los espectros de absorción de los sobrenadantes etanólicos. Dichos espectros muestran una forma que da cuenta de una mezcla de especies de azul de metileno: se tienen fundamentalmente dímeros y agregados de tipo H, y, suponemos, una pequeña proporción de monómero que no se llega a resolver como banda. Probablemente en el

sobrenadante de centrifugación queden algunos oligómeros de SiO₂ y MB que den origen a los espectros de la Figura 6-13, ya que no se observa resuelto el espectro de MB monómero libre.

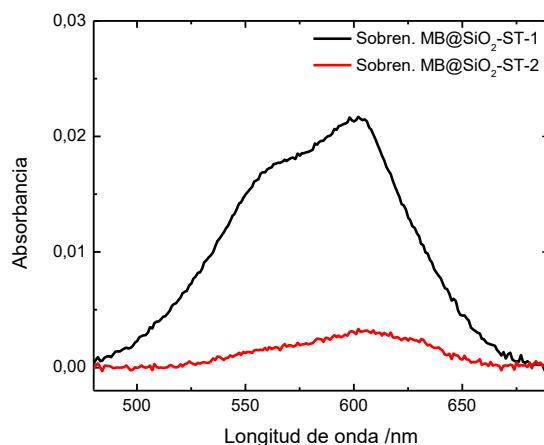


Figura 6-13. Espectros de absorción de los sobrenadantes etanólicos de centrifugación (5000 rpm, 20 minutos) de (A) MB@SiO₂-ST-1 (negro) y (B) MB@SiO₂-ST-2 (rojo). El volumen total de cada batch y, por tanto, de los sobrenadantes, es de 7,5 ml.

Asimismo, la forma de las curvas es muy similar a la de las NP que les dieron origen (Figura 6-12), pero las absorbancias son bajas (menores a 0,02). Si se calcula el porcentaje que representa el dímero en las NP respecto de lo que representa en los sobrenadantes, se obtienen los resultados de la Tabla 6-3.

Tabla 6-3. Estimación de la cantidad de MB dímero liberado en los sobrenadantes de MB@SiO₂-ST luego de un año de almacenamiento en etanol. Las absorbancias se evaluaron a 597 nm y no se necesitó conocer el ϵ del dímero a 597 nm porque se realizó una medida relativa.

Muestra	Moles MB dímero / ϵ (dímero) Mol.M.cm	% de MB dímero
MB@SiO ₂ -ST-1	$1,12 \cdot 10^{-1}$	100
Sobrenadante de MB@SiO ₂ -ST-1	$1,59 \cdot 10^{-4}$	0,2
MB@SiO ₂ -ST-2	$7,05 \cdot 10^{-3}$	100

Sobrenadante de MB@SiO ₂ -ST-2	$2,06 \cdot 10^{-5}$	0,3
---	----------------------	-----

De acuerdo a los resultados, el porcentaje que representa el dímero en los sobrenadantes es menor al 1% del colorante atrapado en la matriz de SiO₂, luego de un año de almacenamiento en suspensión etanólica. Así, se corrobora que la liberación de colorante de las matrices de sílice hacia la solución no es significativa.

6.3.1.1.3 Efecto del pH en el espectro de absorción

Como vimos en la Sección 6.2.2.2.2, la carga superficial de las partículas se ve afectada por su funcionalización, lo que origina un cambio en el punto isoeléctrico. Así, cuando el pH disminuye, es de esperar que aumente la proporción de grupos silanoles que se encuentran protonados, disminuyendo la carga negativa de la partícula. Esto podría afectar, en principio, a la interacción electrostática entre MB y la matriz de sílice y, en consecuencia, a la agregación del MB en la matriz.

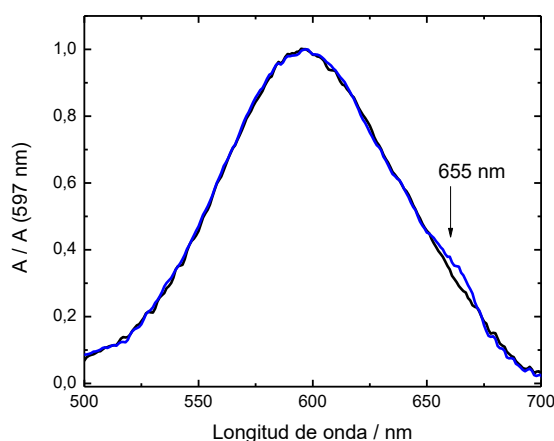


Figura 6-14. Espectros de absorción normalizados a 597 nm de una suspensión de NP MB@SiO₂-ST-2. En línea negra se muestra el espectro en DMF y, en línea azul el espectro en una mezcla de DMF y ácido acético.

En la Figura 6-14 se observan los espectros de absorción normalizados de las NP MB@SiO₂-ST-2, en DMF y en una mezcla de DMF y ácido acético. Se observa que, a partir de 650-655 nm, aparece un hombro en el espectro que podría sugerir cierto aumento de MB monómero en las partículas. En el caso de MB@SiO₂-ST-1, no se pudo individualizar este hombro y, muy probablemente ese resultado tenga que ver con la gran proporción de agregados H superiores incluidos en las NP (Figura 6-12), y que son muy difíciles de revertir.

6.3.1.2 Espectroscopia de fluorescencia

Para evaluar la capacidad de emitir luz de las NP se midieron sus espectros de fluorescencia. En la Figura 6-15 se muestran los resultados para las NP MB@SiO₂-ST-1. En primer lugar, se evaluó la apertura de rendija de emisión y excitación para lograr una buena señal. A partir de 1 mm de apertura se obtuvieron buenas señales, con altas relaciones señal/ruido. También se evaluó cómo la longitud de onda de excitación influye en la señal de emisión obtenida: cuando se excita desde 580 a 620 nm, la intensidad de emisión va aumentando, mientras que al pasar de 620 a 630 nm, la intensidad de emisión disminuye. Este comportamiento está de acuerdo con el espectro de absorción obtenido para las NP (Figura 6-12). El máximo de emisión determinado en DMF en estas condiciones se ubica cerca de los 650 nm.

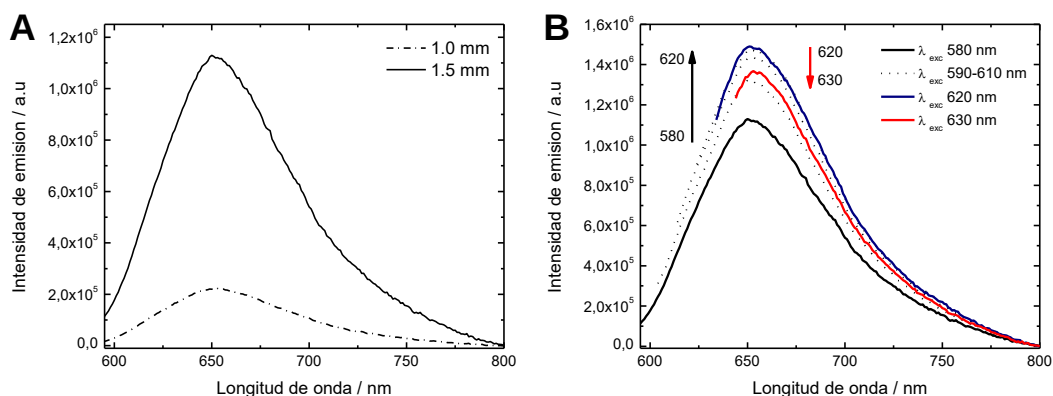


Figura 6-15. Espectros de emisión de MB@SiO₂-ST-1 (DMF) medidos con una absorbancia a 597 nm de 0,144. (A) Diferentes aperturas de rendijas de excitación y emisión: 1,0 mm y 1,5 mm; (B) Barrido de longitudes de onda de excitación: de 580 a 630 nm con una apertura de rendijas de 1,5 mm.

En la Figura 6-16 A se muestran los espectros de excitación y emisión normalizados para MB@SiO₂-ST-1. Se observa que el máximo del espectro de excitación está en 615 nm y, en el espectro de emisión, a 650 nm. Los espectros de excitación y emisión de las NP MB@SiO₂-ST-2 (Figura 6-16 B) son muy similares a los obtenidos para MB@SiO₂-ST-1.

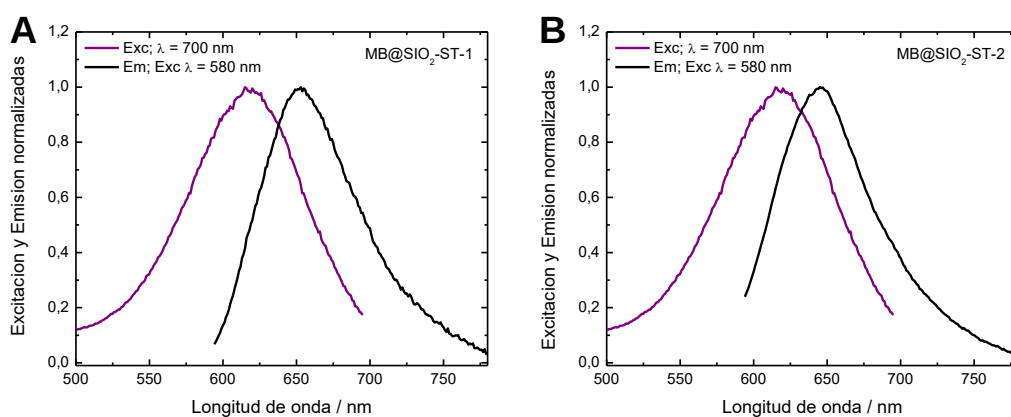


Figura 6-16. Espectros de excitación y emisión en DMF normalizados en su máximo de: (A) MB@SiO₂-ST-1 y (B) MB@SiO₂-ST-2. Apertura de rendija: 1,5 mm.

Por otra parte, cabe destacar que el máximo de emisión de las NP se encuentra corrido al azul respecto del colorante libre en solución: de 680 nm

para MB libre en DMF, pasamos a 650 nm para MB incluido en las NP. Este resultado puede tomarse como evidencia de la inclusión del MB en la matriz de sílice, que ofrece un entorno diferente al de la DMF.¹⁹

6.3.2 MB@SiO₂-ME

6.3.2.1 Espectroscopia UV-Visible

Si bien cuando abordemos la producción de oxígeno singlete de las NP (Sección 6.4.2) se podrán apreciar los espectros de absorción en cada caso, aquí resumiremos las diferencias salientes entre los espectros de los distintos sistemas. Existen esencialmente dos tipos de espectros de absorción para las NP de tipo MB@SiO₂-ME.

- i. Aquellos en los cuales el máximo absoluto se halla a 640-650 nm y aparece una nueva banda al azul, cerca de los 520 nm, de menor intensidad.
- ii. Aquellos en los cuales el máximo absoluto se encuentra a aproximadamente 570 nm, con un hombro cerca de los 640-650 nm.

Sólo un caso de NP de tipo MB@SiO₂-ME-1 (TEOS-HDTMOS 1:3) dio NP con el espectro **i** y se las llamó MB@SiO₂-ME-1-¹O₂. Como se verá en la Sección 6.4.2.1, fueron las únicas que resultaron en un alto rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete. Asimismo, las NP MB@SiO₂-ME-1-NH₂ resultaron en un espectro del tipo **ii**.

Por su parte, las NP MB@SiO₂-ME-2 y MB@SiO₂-ME-3 dieron siempre espectros del tipo **ii**. En la Figura 6-17 se comparan los espectros de absorción

normalizados de dos sistemas representativos de tipo **i** (MB@SiO₂-ME-1-¹O₂) e **ii** (MB@SiO₂-ME-2-B) con el espectro del azul de metileno libre.

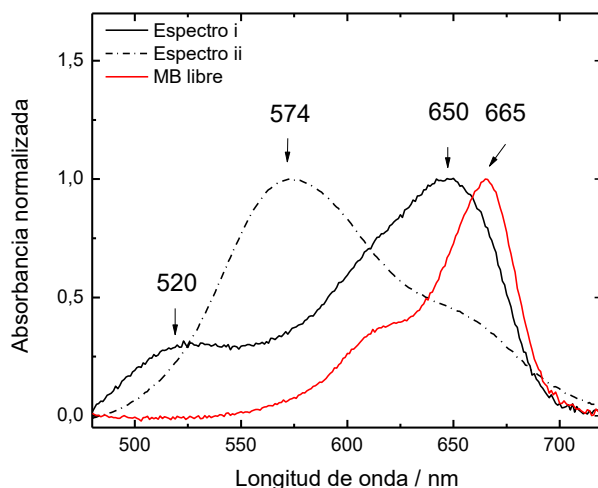


Figura 6-17. Espectros de absorción representativos de nanopartículas sintetizadas por microemulsión. Se indican con una flecha las longitudes de onda de las bandas principales.

En definitiva, los espectros de la Figura 6-17 sugieren que por microemulsión se pueden obtener sistemas con MB en distintos estados de agregación: el espectro **ii** es representativo de un sistema con una presencia dominante de MB en forma de agregados, mientras que el espectro **i** se corresponde con MB principalmente como monómero. Más adelante hablaremos de la banda secundaria a 520 nm.

6.3.2.2 Espectroscopia de fluorescencia

En la Figura 6-18 se presentan los espectros de excitación y emisión de las NP cuyo espectro de absorción abordamos en la Sección 6.3.2.1 precedente. Se puede ver que la forma de los espectros de emisión es la misma para los dos tipos de NP y, si bien no se muestran los resultados aquí, resulta idéntica a la forma de los espectros de emisión de todas las partículas sintetizadas por

microemulsión, cuyo máximo se encuentra en torno a los 650 nm. En cuanto a los espectros de excitación, se ve una única diferencia entre las NP: para las MB@SiO₂-ME-1-¹O₂ se ve una banda poco intensa de excitación cerca de los 500 nm (ver Figura 6-18 A), además de la banda principal a 633 nm, mientras que para MB@SiO₂-ME-2-B sólo se observa la banda principal a 640 nm. Esto podría sugerir que la banda a 520 nm del espectro de absorción de MB@SiO₂-ME-1-¹O₂ (espectro de tipo **i**) se corresponde con una especie que puede ser excitada y emitir luz.

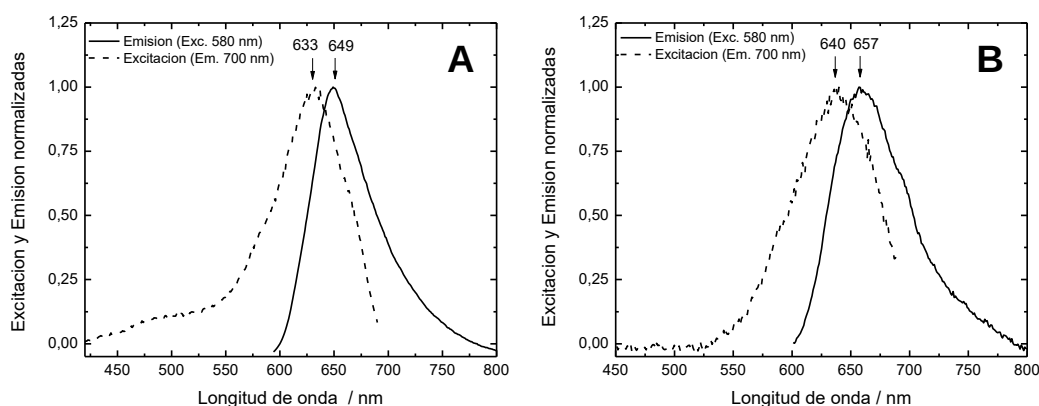


Figura 6-18. Espectros de excitación (línea punteada) y de emisión (línea llena) de (A) MB@SiO₂-ME-1-¹O₂ y (B) MB@SiO₂-ME-2-B. Se indican con una flecha los máximos de los espectros en cada caso.

Para estudiar el carácter emisor de la banda a 520 nm del espectro de absorción de tipo **i**, se realizó un experimento en el que las NP MB@SiO₂-ME-1-¹O₂ se excitaron a diferentes longitudes de onda en forma secuencial, y se colectó su emisión en estado estacionario. En la Figura 6-19 se observa que el espectro de emisión se va corriendo hacia el rojo a medida que se excita a mayores longitudes de onda. Concretamente, los resultados parecieran sugerir que existen al menos dos especies emisoras en las NP: una a 570 nm asociada a la banda de 520 nm del espectro de absorción de tipo **i**, y una proveniente del

monómero, con una emisión máxima a alrededor de 640-650 nm (y una absorción cercana a 650 nm en el espectro **i**).

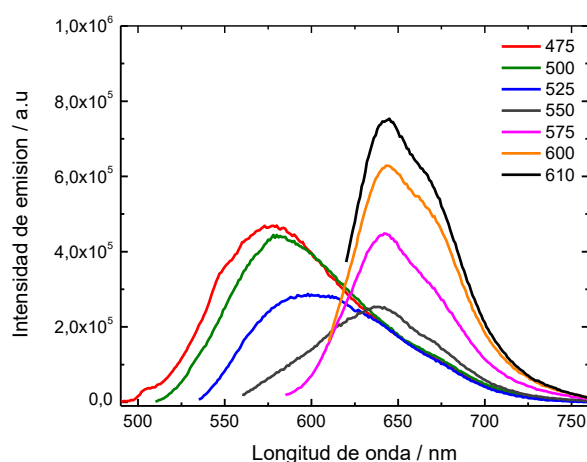


Figura 6-19. Espectros de emisión de MB@SiO₂-ME-1-¹O₂ para distintas longitudes de onda de excitación, de 475 a 610 nm.

6.3.2.2.1 Anisotropía de fluorescencia

Con el objeto de evaluar la inmovilización del colorante en la matriz de sílice, medimos la anisotropía del colorante libre y en las NP MB@SiO₂-ME-2. En la Figura 6-20 se puede observar que la anisotropía de las NP, en el rango de 660 a 775 nm es mayor que la del MB libre. En particular, para 665 nm resulta de 0,134 para MB en MB@SiO₂-ME-2, mientras que el valor desciende a 0,040 para MB libre. El hecho de que el colorante en las NP presente una mayor anisotropía que cuando está libre en solución nos da la pauta de que está unido a la matriz de sílice.

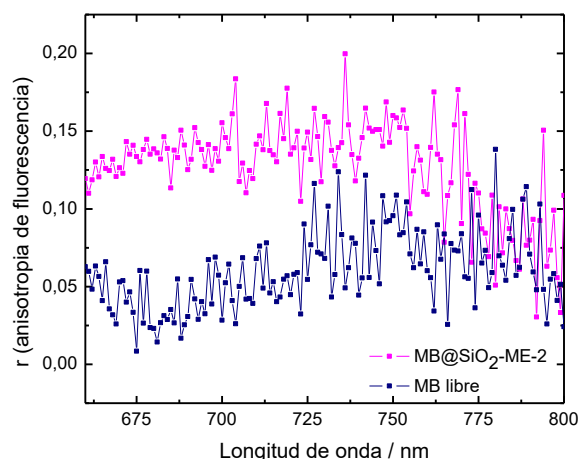


Figura 6-20. Anisotropía de fluorescencia de MB@SiO₂-ME-2 y MB libre en DMF. λ_{ex} 610 nm.

6.4 Generación de oxígeno singulete

En este apartado se presentan los resultados de capacidad de generación de oxígeno singulete de los sistemas descritos previamente. Todos los detalles experimentales de la fotólisis se pueden encontrar en el Capítulo 3 de esta tesis. En primer lugar, se abordan los sistemas de tipo Stöber. Luego se presentan los resultados de una variedad de sistemas sintetizados por microemulsión. Aún contando con los mismos materiales (SiO₂ y MB), veremos que las diferentes estrategias de síntesis serán determinantes en cuanto a su capacidad de generación de oxígeno singulete.

6.4.1 Nanopartículas MB@SiO₂-ST

En la Figura 6-21 se muestran los espectros de DPBF y de MB@SiO₂-ST-1 que se obtuvieron en un experimento de fotólisis para medir la generación de oxígeno singulete. Esencialmente, se observa que en el tiempo total de irradiación (520 s), tanto el espectro de DPBF como el de las NP permanecen casi invariantes. Dicho resultado indica que el azul de metileno encapsulado en la matriz de MB@SiO₂-ST-1 (que está mayormente agregado como dímero y

agregados H superiores) no es susceptible de foto degradación. Asimismo, la producción de $^1\text{O}_2$ debe ser menor que la detectable por la técnica empleada.

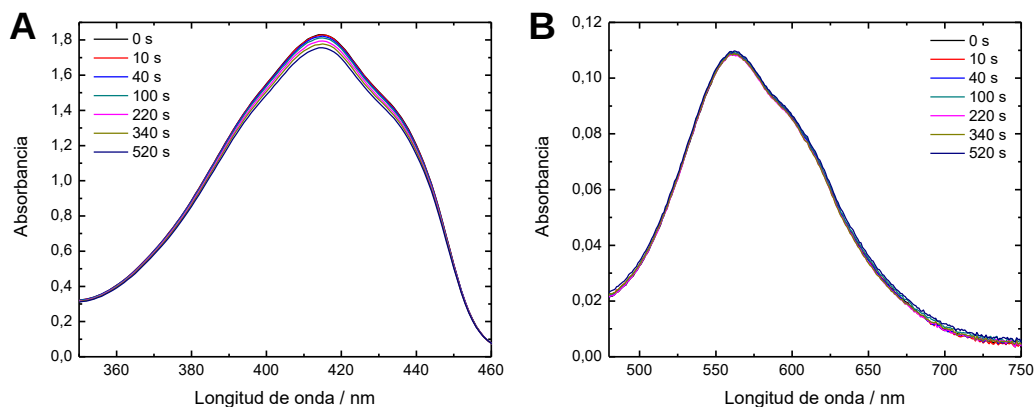


Figura 6-21. Medición de la generación de oxígeno singlete en DMF de MB@SiO₂-ST-1 mediante la reacción con DPBF. (A) Espectros del DPBF desde 0 a 520 segundos de irradiación; (B) Espectros de MB@SiO₂-ST-1 desde 0 a 520 segundos de irradiación.

Al evaluar las NP MB@SiO₂-ST-2 (Figura 6-22) se observó un comportamiento similar al anterior. Tanto el espectro del DPBF como el de las NP presentan una variación muy pequeña y podemos decir que la generación de $^1\text{O}_2$ no es medible por esta técnica, a la vez que la matriz de sílice protege al azul de metileno (que se encuentra en forma de dímero mayoritariamente) de la degradación por luz.

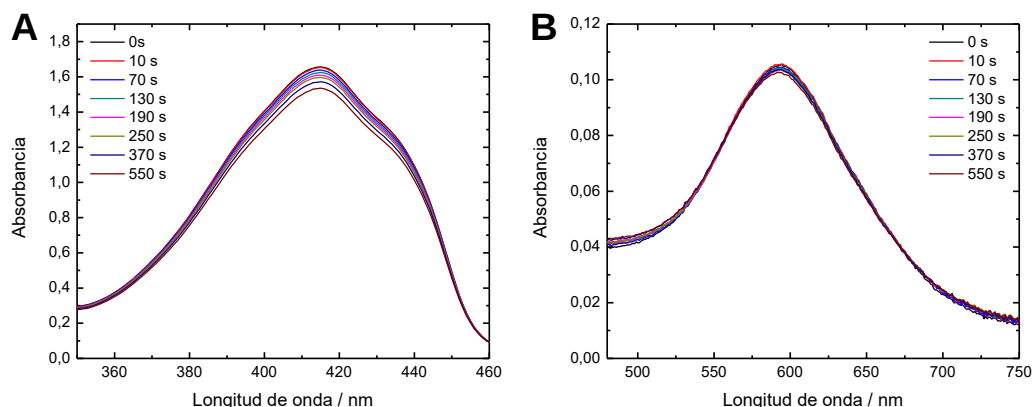


Figura 6-22. Medición de la generación de oxígeno singlete en DMF de MB@SiO₂-ST-2 mediante la reacción con DPBF. (A) Espectros del DPBF desde 0 a 550 segundos de irradiación; (B) Espectros de MB@SiO₂-ST-2 desde 0 a 550 segundos de irradiación.

Como se dijo en el Capítulo 3, en cada experimento de fotólisis se incluye un control de azul de metileno libre en solución, a partir del cual se calcula el rendimiento cuántico relativo de cada muestra. En la Figura 6-23 se muestran los resultados obtenidos para el control de azul de metileno. A partir de estos resultados, y como se espera, es evidente que el DPBF disminuye rápidamente (en sólo 35 segundos) su absorbancia cuando se fotoliza al MB en solución aireada. Este comportamiento viene acompañado de una disminución en la absorbancia del MB en el tiempo (Figura 6-23 B). Esto sugiere que el MB libre se está degradando fotoquímicamente, lo cual no ocurre en las NP con MB ocluido (Figura 6-21 y Figura 6-22). En particular, al evaluar la absorbancia a 665 nm del MB en el experimento, se observa una disminución que ajusta a un decaimiento mono exponencial (Figura 6-24).

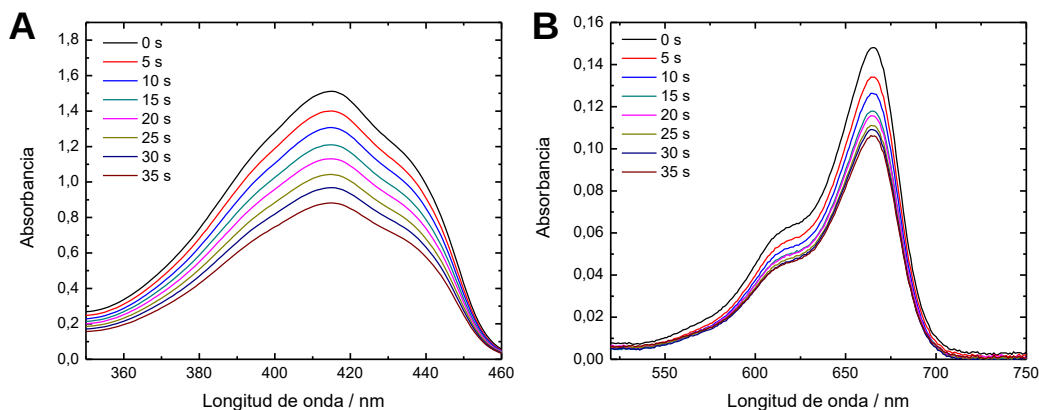


Figura 6-23. Control de la generación de oxígeno singlete en DMF de MB molécula libre mediante la reacción con DPBF. (A) Espectros del DPBF desde 0 a 35 segundos de irradiación; (B) Espectros de MB molécula libre desde 0 a 35 segundos de irradiación.

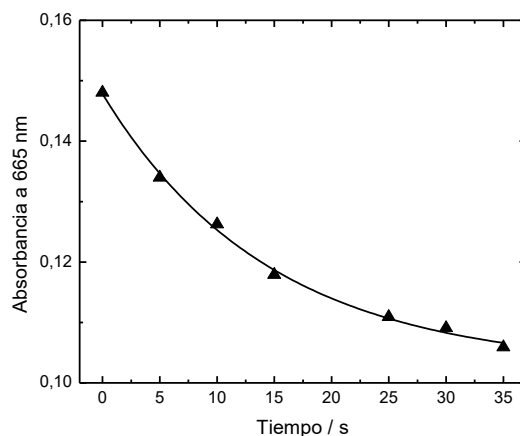


Figura 6-24. Decaimiento de la absorbancia a 665 nm del MB libre en DMF, al ser irradiado en las condiciones del experimento, de 0 a 35 segundos. Se muestra el ajuste mono exponencial obtenido a partir de los datos experimentales. $y = A_1 \cdot \exp(-x/t_1) + y_0$, donde $t_1 = 14,54$ s ($SD = 1,22$ s).

Al evaluar cómo evolucionan las absorbancias a 415 nm en el tiempo de cada experimento se obtienen las curvas de la Figura 6-25. En el caso de las NP se han ajustado rectas y, en el caso del MB libre, los datos experimentales se han ajustado con una función cuadrática (la cinética deja de ser de orden cero porque hay foto degradación del MB libre, lo cual se observó en todos los experimentos control de MB libre realizados). Las pendientes de las rectas correspondientes a las NP ($\sim 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) resultaron dos órdenes de magnitud

menores que la pendiente a tiempo cero del decaimiento cuadrático de la absorbancia del DPBF en presencia de MB libre ($\sim 10^{-2} \text{ s}^{-1}$). Esta información nos vuelve a dar la pauta de que la producción de $^1\text{O}_2$ no es significativa en estos sistemas según el método que estamos empleando para medirla.

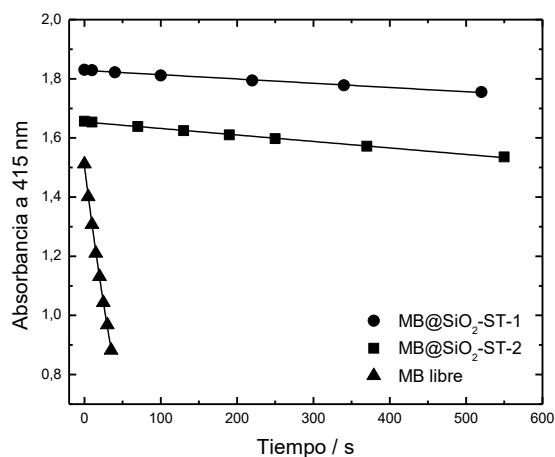


Figura 6-25. Comparación de las absorbancias a 415 nm versus tiempo para los tres sistemas medidos en el experimento: MB@SiO₂-ST-1, MB@SiO₂-ST-2 y MB molécula libre en solución. Se muestran los ajustes realizados: para las NP se trata de funciones lineales, mientras que para MB libre se trata de una función cuadrática. Rectas $y = m \cdot x + b$: i) MB@SiO₂-ST-1: $m = -1,44\text{E-}4 \text{ s}^{-1}$ ($SD = 4,83\text{E-}6 \text{ s}^{-1}$), ii) MB@SiO₂-ST-2: $m = -2,19\text{E-}4 \text{ s}^{-1}$ ($SD = 3,93\text{E-}6 \text{ s}^{-1}$). Polinomio de grado dos $y = b_1 \cdot x + b_2 \cdot x^2 + c$: MB: $b_1 = -0,02078 \text{ s}^{-1}$ ($SD = 6,05\text{E-}4 \text{ s}^{-1}$), $b_2 = 8,70\text{E-}5 \text{ s}^{-2}$ ($SD = 1,66\text{E-}5 \text{ s}^{-2}$).

Por otra parte y, en línea con lo que venimos diciendo, en la Figura 6-26 se muestran las absorbancias a 415 nm versus tiempo para MB@SiO₂-ST-2 (A) y para MB libre (B), cada experimento con su control previo al agregado de la muestra. Para MB@SiO₂-ST-2 (Figura 6-26 A) se observa que la pendiente previo al agregado de las NP es la misma que luego de la adición. Dicho comportamiento hace explícito que el sistema no genera una cantidad medible de $^1\text{O}_2$ (por esta razón no se informa un valor de Φ_Δ). En contraposición, el MB libre sí produce un quiebre abrupto en la pendiente y, por tanto, sí produce $^1\text{O}_2$ en cantidades significativas, como se espera. Para el sistema NP MB@SiO₂-ST-1 se obtuvieron resultados similares (no mostrados). El valor de la pendiente para

este sistema puede verse en la Figura 6-25, y es la misma antes y después del agregado.

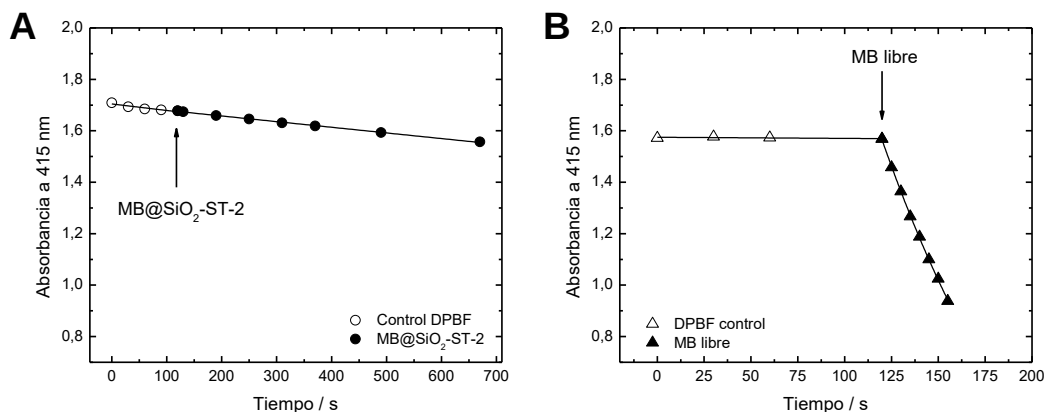


Figura 6-26. Absorbancias tomadas a 415 nm en el experimento de generación de oxígeno singlete, versus tiempo. Se muestran las medidas previas al agregado del analito y se indica con una flecha el momento del agregado. (A) Resultados para las NP MB@SiO₂-ST-2, con los respectivos ajustes lineales previo al agregado y posterior al agregado; (B) Resultados para MB molécula libre, con los respectivos ajustes: el previo al agregado se ajustó a una función lineal y, el posterior al agregado se ajustó a una función cuadrática.

Por otra parte, cabe destacar que los controles de la absorbancia del DPBF previos al agregado de cada muestra son esenciales para validar cada medida. De esta manera, si la pendiente previa al agregado de analito es muy pequeña nos aseguramos de que el DPBF es estable en las condiciones de la fotólisis y cualquier baja de su absorbancia vendrá dada por su reacción con el ¹O₂ generado en presencia del analito correspondiente.

6.4.2 Nanopartículas MB@SiO₂-ME

Como ya vimos, por microemulsión inversa se pueden obtener una variedad de materiales con diferentes propiedades ópticas. En particular, con diferentes espectros de absorción de luz. En esta sección, nos ocuparemos de la

generación de $^1\text{O}_2$ de dichos sistemas, para más adelante discutir y racionalizar su comportamiento y su potencial aplicación a sistemas reales.

6.4.2.1 MB@SiO₂-ME-1

Para las NP con el núcleo de carácter más hidrofóbico (MB@SiO₂-ME-1, TEOS-HDTMOS 1:3) pudimos ver que, para distintos lotes de partículas sintetizadas en las mismas condiciones, el rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2$ variaba sustancialmente. Así, se obtuvieron partículas con una excelente capacidad de generación de $^1\text{O}_2$ y partículas en las que no se pudo medir un rendimiento cuántico de generación de $^1\text{O}_2$. Más tarde, en la Sección 6.5, discutiremos las posibles causas de dicho comportamiento.

En esta sección sólo mostraremos dos casos: i) MB@SiO₂-ME-1- $^1\text{O}_2$, NP que producen $^1\text{O}_2$ en grandes cantidades y ii) MB@SiO₂-ME-1-NH₂, NP en las que la cáscara se depositó a partir de aminopropiltrietoxisilano.

6.4.2.1.1 MB@SiO₂-ME-1- $^1\text{O}_2$

En la Figura 6-27 A se puede observar la disminución pronunciada en el espectro de absorción del DPBF a medida que transcurre el tiempo de irradiación. En sólo 40 segundos se tiene una disminución de aproximadamente 30 % de la absorbancia a 415 nm y, como veremos, se puede anticipar que la producción de $^1\text{O}_2$ será elevada. En la Figura 6-27 B se observan los espectros de las NP en función del tiempo. Dichos espectros se corresponden con los de tipo i (Sección 6.3.2.1). Están compuestos principalmente por dos bandas: una banda con un máximo a 640-650 nm y una banda al azul, centrada cerca de 515 nm. También se esboza un hombro al azul de la banda de 640 nm, cerca de 610 nm.

Desde ya, estos espectros no coinciden con ninguno de los obtenidos para las NP MB@SiO₂-ST.

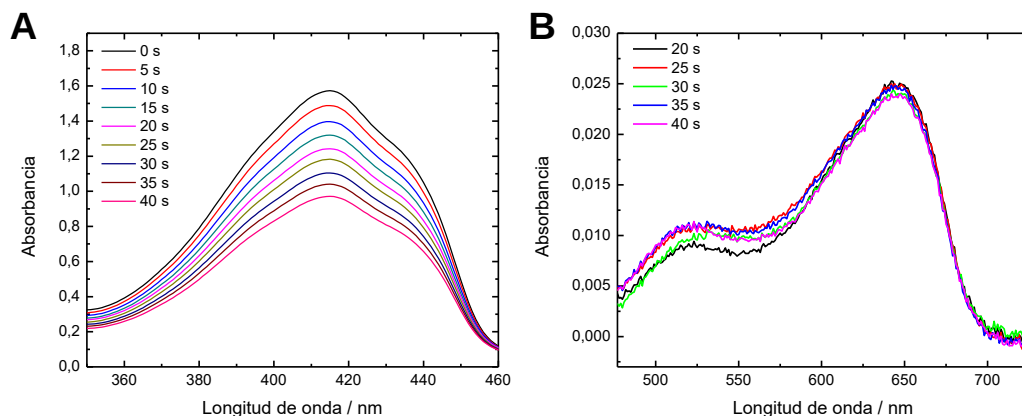


Figura 6-27. Medición de la generación de oxígeno singlete en DMF de MB@SiO₂-ME-1-¹O₂ mediante la reacción con DPBF. (A) Espectros del DPBF desde 0 a 40 segundos de irradiación; (B) Espectros de MB@SiO₂-ME-1-¹O₂ desde 20 a 40 segundos de irradiación.

Asimismo, en la Figura 6-27 B se ve que los espectros correspondientes a las NP se midieron con absorbancias muy bajas para tener tiempo de medir un buen decaimiento de la absorbancia del DPBF. Esto conllevó una baja relación señal-ruido y, por ello, para los cálculos de Φ_{Δ} que veremos a continuación se utilizó el espectro promedio en el tiempo del experimento.

En la Figura 6-28 se comparan las absorbancias de DPBF a 415 nm para las NP y para el control de MB libre. En el caso de MB@SiO₂-ME-1-¹O₂, se pudo ajustar la cinética a una función lineal, mientras que para el MB libre, como ya vimos, se requirió un polinomio de grado dos. En principio, esta diferencia nos habla de la ausencia de foto-degradación del colorante en las NP, en contraste con lo que pasa cuando se encuentra el MB libre en solución.

A partir de los valores de las pendientes o de las pendientes a tiempo cero (para el caso del MB libre), de las intensidades de luz absorbidas y, para un total de 4 experimentos independientes, tal como se explicó en el Capítulo 3, se

pudo determinar un valor de rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete de $\Phi_{\Delta} = (0.44 \pm 0.07)$.

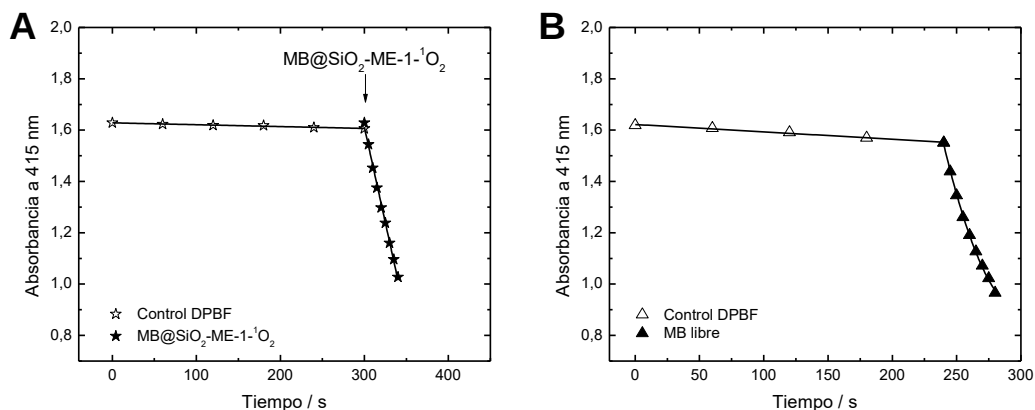


Figura 6-28. Absorbancias tomadas a 415 nm en el experimento de generación de oxígeno singlete, versus tiempo. Se muestran las medidas previas al agregado del analito y se indica con una flecha el momento del agregado. (A) NP MB@SiO₂-ME-1-¹O₂; (B) Resultados para MB molécula libre.

6.4.2.1.1.1 Control de generación de ¹O₂ en suspensión desgasada de MB@SiO₂-ME-1-¹O₂

Para corroborar que la foto-reacción de producción de ¹O₂ está mediada por oxígeno, se realizó un experimento en el que se midió la producción de ¹O₂ de la suspensión de MB@SiO₂-ME-1-¹O₂ en solución aireada y, por otra parte, en suspensión desgasada con argón durante 30 minutos (Figura 6-29).

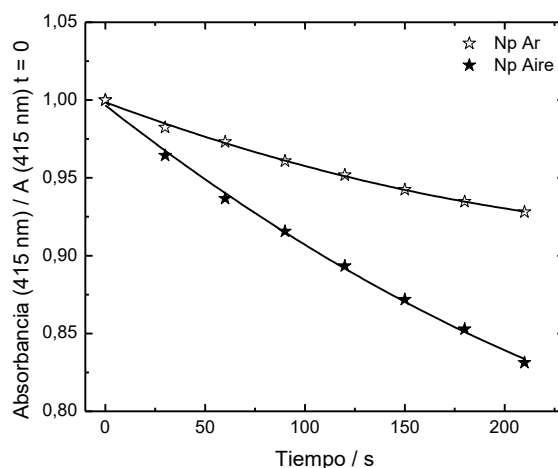


Figura 6-29. Absorbancias en DMF a 415 nm (normalizadas a tiempo cero) versus tiempo de: MB@SiO₂-ME-1-¹O₂ desgasada con argón durante 30 minutos (estrella vacía) y MB@SiO₂-ME-1-¹O₂ aireada (estrella llena).

Los resultados muestran que, en ambos casos se observa cierta foto degradación del colorante, pues se necesitó elegir polinomios de grado dos para ajustar las cinéticas. Al comparar las pendientes a tiempo cero de las NP en suspensión aireada y en suspensión burbujeada con argón, se observa que desplazar el oxígeno con argón disminuye la velocidad de la reacción. Sin embargo, los rendimientos cuánticos de formación de ¹O₂ resultan altos en ambos casos: 0,46 para MB@SiO₂-ME-1-¹O₂ en aire y, 0,12 para las NP en argón. En la Sección 6.5 interpretaremos estos resultados en conjunto con el resto de los resultados.

6.4.2.1.2 MB@SiO₂-ME-1-NH₂

En la Figura 6-30 A se muestran los espectros de las NP a diferentes tiempos de irradiación.

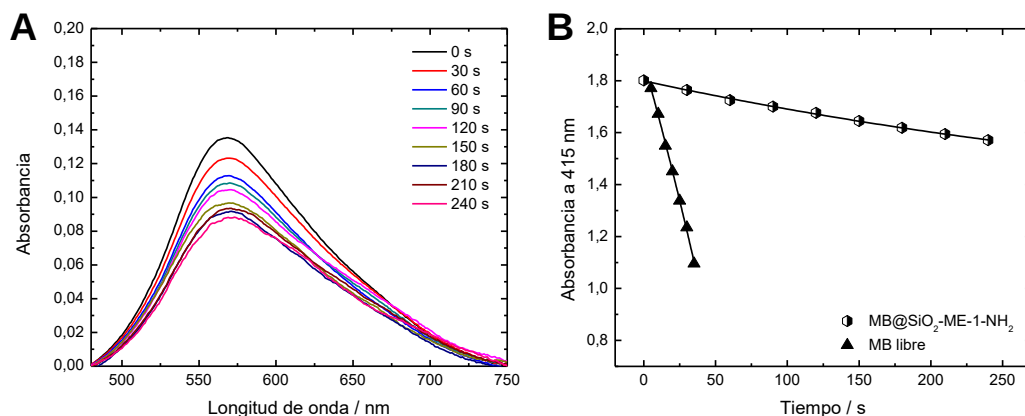


Figura 6-30. Medición de $^1\text{O}_2$ en DMF. (A) Espectros de absorción de las NP MB@SiO₂-ME-1-NH₂ a diferentes tiempos de irradiación: desde 0 a 240 segundos. (B) Absorbancia a 415 nm versus tiempo de irradiación para las NP y el control de MB libre. En ambos casos los datos experimentales se han ajustado a polinomios de grado dos.

En este caso, el espectro de absorción UV/Vis apunta a la formación de agregados de MB en la matriz de SiO₂ (único máximo a 567 nm, espectro de tipo ii) y, por otra parte, se observa una disminución de absorción de luz con el tiempo. Se deduce entonces que, en este sistema, el MB experimenta cierta fotodegradación. En la Figura 6-30 B se puede observar que la pendiente a tiempo cero de la cinética de formación de $^1\text{O}_2$ asociada a las NP es mucho menor que la del MB libre control. Así, se obtuvo para este sistema un $\Phi_{\Delta} = (0.015 \pm 0.005)$.

6.4.2.2 MB@SiO₂-ME-2

En el caso de las NP MB@SiO₂-ME-2 (iguales proporciones de TEOS y HDTMOS en el núcleo) pudimos ver que, para distintos lotes de partículas sintetizadas en las mismas condiciones, el rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2$ variaba, pero siempre se mantenía por debajo de 1.5%. Aquí mostraremos los dos casos más representativos: i) MB@SiO₂-ME-2-A, NP que producen $^1\text{O}_2$ en cantidades pequeñas pero medibles y, ii) MB@SiO₂-ME-2-B, un

sistema que ejemplifica el caso de NP sintetizadas por microemulsión que no producen cantidades medibles de $^1\text{O}_2$.

6.4.2.2.1 MB@SiO₂-ME-2-A

En la Figura 6-31 A se puede apreciar la disminución en la absorbancia del DPBF en el lapso de 5 minutos de irradiación acumulada, una vez que se han agregado las NP MB@SiO₂-ME-2-A. En paralelo, se observa (Figura 6-31 B) que el espectro de las NP no cambia durante el tiempo que dura el experimento. Eso nos da la pauta de que el MB encapsulado en dichas NP (la mayor parte está agregado pero se observa un hombro de monómero) es foto estable en las condiciones del experimento.

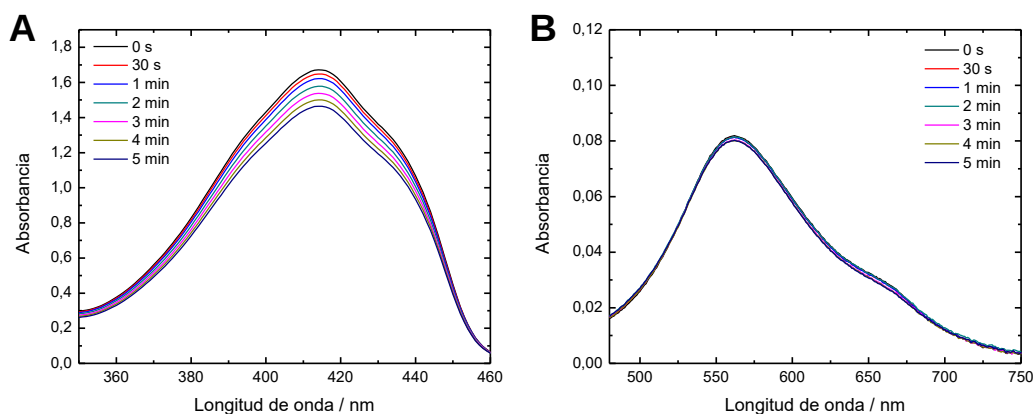


Figura 6-31. Medición de la generación de oxígeno singlete en DMF de MB@SiO₂-ME-2-A mediante la reacción con DPBF. (A) Espectros del DPBF desde 0 a 5 minutos de irradiación; (B) Espectros de MB@SiO₂-ME-2-A desde 0 a 5 minutos de irradiación.

Asimismo, a partir de los decaimientos de la absorbancia del DPBF a 415 nm que se muestran en la Figura 6-32 y, con el procedimiento descrito en el Capítulo 3, se pudo calcular un valor de $\Phi_{\Delta} = (0.015 \pm 0.002)$.

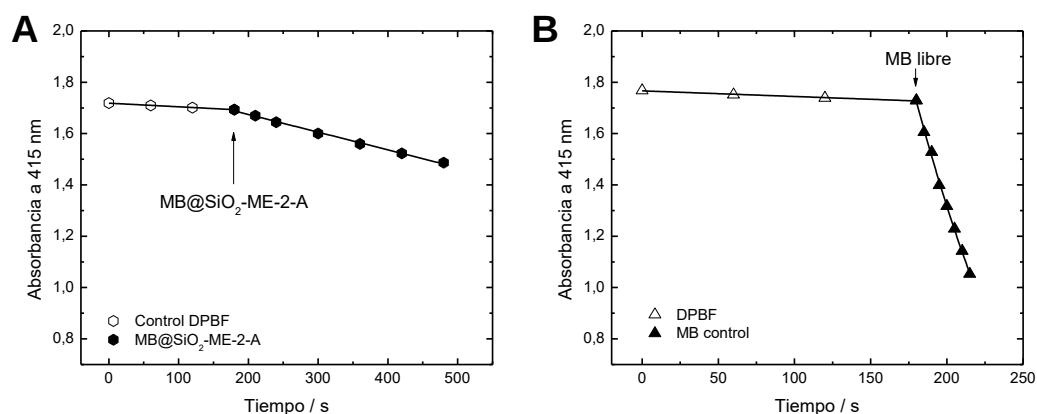


Figura 6-32. Absorbancias tomadas a 415 nm en el experimento de generación de oxígeno singulete, versus tiempo. Se muestran las medidas previas al agregado del analito y se indica con una flecha el momento del agregado. (A) Resultados para las NP MB@SiO₂-ME-2-A, con los respectivos ajustes lineales previo al agregado y posterior al agregado; (B) Resultados para MB molécula libre, con los respectivos ajustes: el previo al agregado se ajustó a una función lineal y, el posterior al agregado se ajustó a una función cuadrática.

6.4.2.2.2 MB@SiO₂-ME-2-B

En este caso, la Figura 6-33 muestra que el MB encapsulado no presenta foto-degradación, a la vez que el espectro del DPBF permanece invariante en el transcurso del experimento.

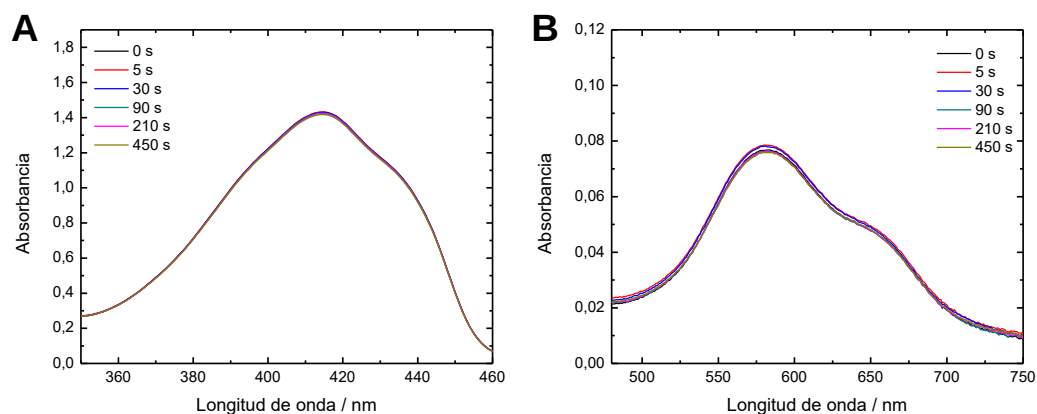


Figura 6-33. Medición de la generación de oxígeno singlete en DMF de MB@SiO₂-ME-2-B mediante la reacción con DPBF. (B) Espectros del DPBF desde 0 a 450 segundos de irradiación; (B) Espectros de MB@SiO₂-ME-2-B desde 0 a 450 segundos de irradiación.

También se observa que el agregado de las NP en cuestión no modifica la pendiente en la Figura 6-34 A, a diferencia de lo que ocurre con el MB libre (Figura 6-34 B). Así, aquí no hay producción medible de ¹O₂.

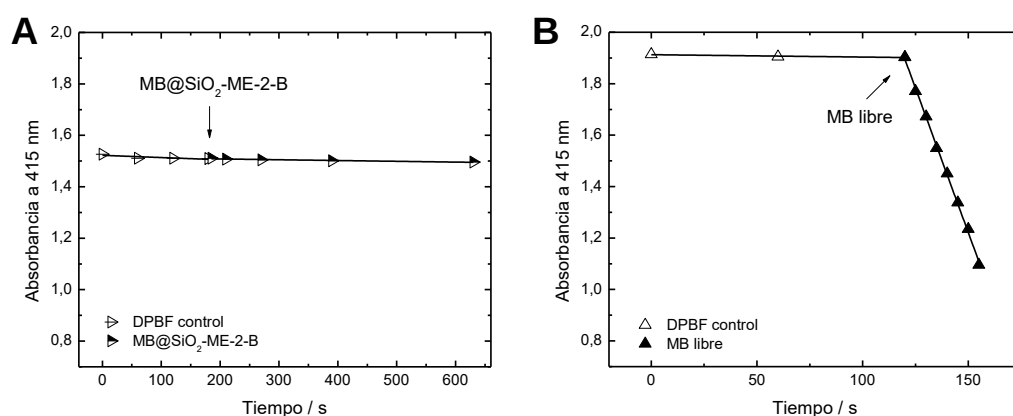


Figura 6-34. Absorbancias tomadas a 415 nm en el experimento de generación de oxígeno singlete, versus tiempo. Se muestran las medidas previas al agregado del analito y se indica con una flecha el momento del agregado. (A) Resultados para las NP MB@SiO₂-ME-2-B, con los respectivos ajustes lineales previo al agregado y posterior al agregado; (B) Resultados para MB molécula libre, con los respectivos ajustes: el previo al agregado se ajustó a una función lineal y, el posterior al agregado se ajustó a una función cuadrática.

6.4.2.3 MB@SiO₂-ME-3

De acuerdo a la Figura 6-35 y Figura 6-36 podemos decir que estas NP no generan una cantidad medible de ¹O₂ en la fotólisis y el MB es foto estable en la matriz de sílice mientras dura el experimento.

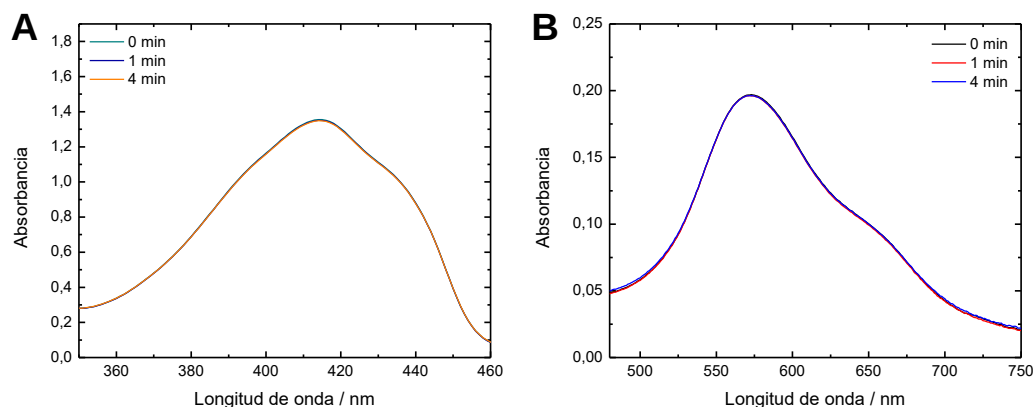


Figura 6-35. Medición de la generación de oxígeno singlete en DMF de MB@SiO₂-ME-3 mediante la reacción con DPBF. (A) Espectros del DPBF desde 0 a 4 minutos de irradiación; (B) Espectros de MB@SiO₂-ME-3 desde 0 a 4 minutos de irradiación.

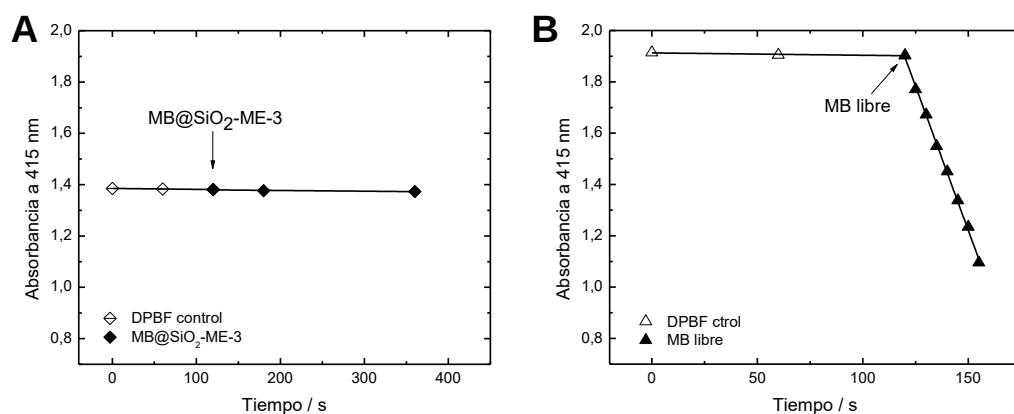


Figura 6-36. Absorbancias tomadas a 415 nm en el experimento de generación de oxígeno singlete, versus tiempo. Se muestran las medidas previas al agregado del analito y se indica con una flecha el momento del agregado. (A) Resultados para las NP MB@SiO₂-ME-3, con los respectivos ajustes lineales previo al agregado y posterior al agregado; (B) Resultados para MB molécula libre, con los respectivos ajustes: el previo al agregado se ajustó a una función lineal y, el posterior al agregado se ajustó a una función cuadrática.

6.4.3 Rendimiento cuántico de emisión de MB@SiO₂-ME

Tal y como se detalló en el Capítulo 3, se calculó el rendimiento cuántico de fluorescencia de las NP referido al azul de metileno libre. Se obtuvo un valor

máximo de $\Phi_F = 0,0145$ para MB@SiO₂-ME-1-¹O₂ ($\lambda_{ex} = 580$ nm), la muestra con mayor contenido de MB monómero, comparable con el valor reportado para MB en etanol ($\Phi_F = 0,04$).¹⁸

6.5 Discusión

6.5.1 Caracterización de los materiales MB@SiO₂

6.5.1.1 Morfología y tamaño

Las NP sintetizadas por una modificación del método de Stöber resultaron esféricas, con tamaños de entre 100 y 200 nm determinados por SEM. Asimismo, el diámetro obtenido por DLS resultó siempre mayor al obtenido por SEM. Las diferencias en los diámetros de NP y coloides que arrojan estas dos técnicas son comunes y se pueden atribuir a las distintas composiciones de las partículas (de metales, de óxidos o poliméricas) que, en última instancia, definen la química superficial en la interfase.²⁰ Recientemente, Škvarla *et al.* utilizaron microscopía de fuerza atómica (AFM) para determinar el radio de NP de sílice y propusieron la existencia de una capa elástica de gel en la superficie de sílice coloidal que hace que los objetos, una vez dispersos en soluciones acuosas, resulten más grandes de lo que en verdad son.²¹ Esta hipótesis está en línea con los mayores diámetros que obtuvimos para las NP de Stöber por DLS (NP en suspensión), en comparación con SEM. En lo que respecta a los índices de polidispersión (PDI), para ambas proporciones de colorante encapsulado, resultaron bajos, lo cual indica que las NP sintetizadas por modificación del método de Stöber presentan una buena monodispersión en tamaño.

En cuanto a las NP obtenidas por el método de microemulsión inversa, podemos decir que, sin importar la relación molar de TEOS y HDTMOS, para la

misma cantidad de silano total se obtienen partículas núcleo de entre 40 y 50 nm y, luego, partículas finales núcleo-cáscara de entre 50 y 60 nm. En estudios sistemáticos con varios tipos de surfactantes, Bagwe *et al.* establecieron que el tamaño de las NP sintetizadas por microemulsión inversa es función principalmente de la relación molar agua/surfactante (R) y de la relación molar surfactante/co-surfactante (Q). De esta manera, a mayor R y Q, mayor será el tamaño de las NP.²² En todas las síntesis de MB@SiO₂-ME reportadas en esta tesis se trabajó con una R = 10, con lo cual se obtuvo una reproducibilidad marcada en el tamaño de todas las NP. Por otra parte, si bien la morfología es esférica, las partículas en suspensión se presentan formando agregados, lo cual se observó mediante medidas de DLS, cuyos resultados siempre arrojaron un alto PDI.

6.5.1.2 Carga superficial

La funcionalización superficial con grupos amino se pudo corroborar por potencial zeta. Tal es así que se observó que el punto isoeléctrico (IEP) de la sílice modificada con aminos se desplazaba hacia 6,7, mientras que el correspondiente a la sílice control se encontraba aproximadamente en 3,5. Este resultado está en línea con el reportado por Palma *et al.*, con un IEP de 6,2 para sílice modificada con APTES.⁸ Wu *et al.*, por su parte, reportan la síntesis y caracterización de sílice modificada con APTES (150 nm de diámetro) e informan un IEP de 8,7²³, superior al nuestro. Es muy factible que la diferencia sea producto de una funcionalización incompleta de la superficie de nuestras NP, en comparación con las reportadas por Wu *et al.*²³

6.5.1.3 Identificación de azul de metileno por espectroscopia FTIR

Como vimos en la Sección 6.2.2.2.3, por espectroscopia FTIR pudimos determinar la presencia de azul de metileno en las NP pues se evidenciaron, además de las bandas características de la sílice, las bandas diagnósticas del MB. La región entre 1700 y 1300 cm^{-1} resultó la más importante para identificar las bandas de MB, en correspondencia con lo reportado por Ovchinnikov *et al.*¹³

6.5.2 Caracterización fotofísica y generación de oxígeno singlete

6.5.2.1 Síntesis y estado de agregación del colorante

A pesar de su carga neta positiva, el MB tiende a formar agregados, tanto en solución acuosa como en superficies, (p.ej. celulosa).¹⁷ El efecto de las interfaces cargadas (sistemas coloidales o interfaces sólidas) en la agregación del colorante es ampliamente conocido.^{24–32}

Aquí, desde el punto de vista de la síntesis, y teniendo en cuenta los espectros de absorción explorados, podemos decir que cuando se usan síntesis de tipo Stöber, el MB se incluye en la matriz fundamentalmente como dímero o como agregados superiores. El medio de Stöber, sumado a la interacción electrostática entre MB y los oligómeros de la sílice, redundo en la encapsulación de grupos de moléculas. Por otro lado, cuando empleamos microemulsiones inversas de TX-100/ciclohexano/hexanol/agua, el MB se solubilizó en las nanogotas de agua y, si bien se obtuvieron espectros en los que el máximo de absorción había sufrido un corrimiento hipsocrómico (de 665 nm para MB libre a 550-650 nm para MB encapsulado), en la mayoría de los casos se detecta la presencia de un hombro a 650 nm en los espectros Uv/Vis correspondiente a cierta población de MB monómero anclado en las NP (ver Figs 6.27B, 6.32B, 6.34B y 6.36B).

De acuerdo a los resultados reportados por Deng *et al.*, la presencia de un núcleo hidrofóbico en las NP aumenta la foto-estabilidad del colorante e impone una barrera física para el acceso de moléculas desactivantes (*quenchers*).³³ En nuestro caso, en la mayoría de las síntesis por microemulsión en las que se empleó la co-hidrólisis de TEOS y el silano hidrofóbico HDTMOS, las NP no dieron producción apreciable de $^1\text{O}_2$. Esto puede deberse a dos factores: 1) la agregación del MB, que resulta en especies no fotoactivas y/o 2) cierta barrera difusional o cinética que aísla a los monómeros existentes (núcleo hidrofóbico).

6.5.2.2 Espectros de absorción UV-visible y generación de $^1\text{O}_2$

Hemos mostrado que las propiedades fotofísicas de las NP, en particular los espectros de absorción UV-visible, son la llave para predecir si los sistemas serán o no productores de $^1\text{O}_2$ al irradiarlos con luz. En la Figura 6-37 se comparan los espectros de absorción representativos de los sistemas reportados. Básicamente se tienen dos grupos de NP que no producen oxígeno singlete: el grupo de MB@SiO₂-ME-2-B y MB@SiO₂-ME-3 (espectro de tipo ii) y las NP MB@SiO₂-ST-1 y 2. Todos los casos en los que el espectro UV/Vis presentaba un máximo entre 550 y 600 nm y, a veces, con un hombro de MB monómero a ~650 nm, no dieron producción significativa de $^1\text{O}_2$. Como vimos en la Sección 6.4.2.1.2, tenemos el caso especial de las NP aminadas, que dieron un rendimiento cuántico % de producción de $^1\text{O}_2$ de 1,5%. En la mayoría de los casos reportados aquí, ya sea de Stöber o de microemulsión, la producción de $^1\text{O}_2$ fue menor al 1.5%, o no detectable, y el MB encapsulado en la matriz resultó ser siempre fotoestable. Por otra parte, se estudió el caso de las NP MB@SiO₂-ME-1- $^1\text{O}_2$ en las que, como se ve en la Figura 6-37, el MB encapsulado en la matriz resulta en un espectro de absorción UV/Vis con dos bandas características (espectro tipo i): una muy notoria, cerca de 650 nm, que se

corresponde con el monómero encapsulado (corrimiento hipsocrómico respecto del monómero libre en solución) y otra cerca de 520 nm. Creemos que la presencia de una gran cantidad de MB inmovilizado en forma de monómero en estas NP es la responsable del alto Φ_{Δ} obtenido (0,44 encapsulado versus 0,52 para el colorante libre). En este sistema en particular aún coexiste una parte del colorante en forma de agregados (espectro ancho alrededor de 600 nm, Figura 6-37, curva roja).

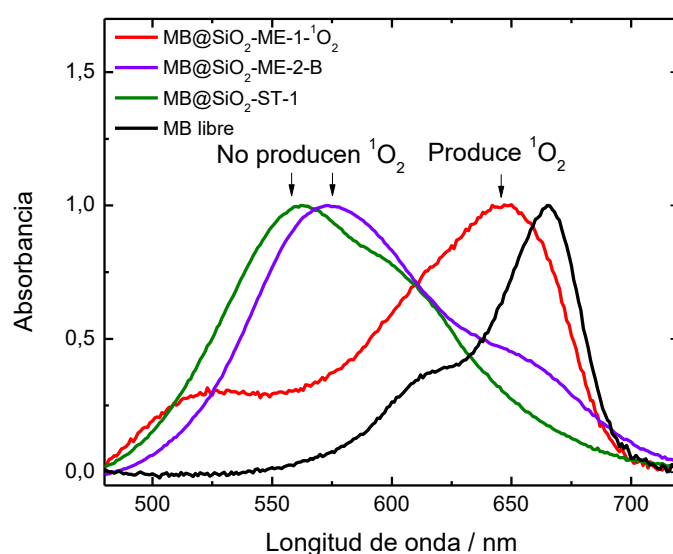


Figura 6-37. Espectros de absorción (normalizados) representativos de los sistemas reportados.

Según lo reportado por Pramanick *et al.*, el azul de metileno interactúa fuertemente con las moléculas del surfactante en microemulsiones inversas que utilizan TX-100.³⁴ En particular, estudiaron el comportamiento fotofísico del MB en sistemas micelares de emulsión inversa de ciclohexano-hexanol-agua-TX-100. Observaron que a medida que aumentaban la concentración de TX-100, y sobrepasaban la CMC de TX-100 en el sistema ($1,09 \cdot 10^{-3}$ M), se producía un cambio del color de la solución de azul a rosado, a la vez que en el espectro de absorción aparecía una nueva banda a 520 nm. Más aún, observaron la aparición de un punto isobéstico a 558 nm que les indicó la formación de un complejo MB-TX-100 de estequiometría 1:1. Por debajo de la CMC la banda de

520 nm no se observaba.³⁴ En las condiciones de nuestros experimentos, los controles de procesos previos al agregado de los silanos evidenciaron un sistema de microemulsión en el que la banda de 520 nm era detectable. Al final del proceso, sólo las NP MB@SiO₂-ME-1-¹O₂ evidenciaron también la banda de 520 nm (Figura 6-37).

En cuanto a la naturaleza de la interacción entre MB y TX-100 para formar el complejo, lo primero que podemos descartar es que sea de tipo electrostático ya que TX-100 es un surfactante neutro. Se ha reportado la interacción entre algunos colorantes catiónicos (fenosafranina, rodamina B, fucsina y cristal violeta) y TX-100 a través de un mecanismo de transferencia de carga fotoquímico en el cual TX-100 actúa como donante de electrones, mientras que MB actúa como aceptor.³⁵ Asimismo, el anillo bencénico del TX-100 podría donar un electrón π al MB, las moléculas de colorante se encontrarían atrapadas en las micelas inversas y esta interacción donante-aceptor de electrones sería responsable del cambio de color de la solución.³⁶ Por otra parte, se ha propuesto una interacción de tipo hidrofóbica para la formación del complejo MB-TX-100 en emulsiones inversas de ciclohexano/agua.³⁴

Limin Qi *et al.* emplearon el MB como sonda de polaridad para estudiar el microambiente de micelas inversas de TX-100/ciclohexano/hexanol/agua.³⁷ En este sentido, el MB es escasamente soluble en ciclohexano y muy soluble en las nanogotas de agua de la emulsión. De esta manera es altamente sensible al estado del agua en el núcleo de la gota, lo cual lo convierte en una molécula adecuada para reportar la polaridad del núcleo polar de la micela. En su trabajo, los autores lograron establecer que existen tres tipos de agua presentes en el núcleo de la micela: i) el agua unida primaria, que interactúa directamente con los grupos polares del TX-100 para formar una capa de hidratación primaria, ii) el agua unida secundaria, que se asocia menos intensamente a los grupos polares del TX-100 y, iii) el agua libre terciaria o “agua del *pool*”, que está lejos del TX-100, en el centro de la micela.³⁷ El equilibrio de complejación

del MB con el TX-100 se ve afectado por la cantidad (y el tipo) de agua presente en la micela. Cuando la cantidad de agua es tal que ya existe agua secundaria ($R=1,8$) y terciaria ($R=5,3$), el equilibrio de complejación MB-TX-100 se ve afectado y se desplaza hacia la formación de MB libre.³⁷ En nuestro caso, se trabajó con un $R = 10$ y, de acuerdo al espectro de la emulsión inversa previo al agregado de los silanos, la banda de complejo era muy minoritaria respecto de la banda de MB libre, en línea con la existencia de aguas secundarias y terciarias.

Por otra parte, cuando se burbujeó la suspensión de MB@SiO₂-ME-1-¹O₂ con argón, se buscó desplazar el aire para probar que la foto-reacción está mediada por oxígeno y no ocurriría en ausencia del mismo. Sin embargo, este punto no se logró verificar ya que, si bien la producción de ¹O₂ de la suspensión desgasada fue menor que la de la suspensión aireada, no fue nula. Este comportamiento podría atribuirse a la presencia de oxígeno molecular fisisorbido en la superficie de las NP, tal como se ha observado para otros materiales.³⁸

Un punto importante para agregar a esta discusión se encuentra referido a la utilización de micelas inversas como "nanoreactores" donde ocurren múltiples eventos químicos en un espacio altamente confinado. En particular, la síntesis de NP de SiO₂ empleando microemulsiones inversas involucra, necesariamente, un proceso de hidrólisis-condensación de los alcóxidos dentro (o en la interfase) de estas micelas. Simultáneamente, ocurren los procesos de adsorción/inmovilización de la sonda de MB dentro de la matriz compuesta de SiO₂/surfactante. En este contexto, variables como la temperatura, orden de agregado de los reactivos, nivel de agitación o presencia de iones dentro del "pool" acuoso inciden ya sea en la forma, nivel de condensación o porosidad de las NP sintetizadas.³⁹⁻⁴¹ Si bien no hemos encarado en esta Tesis un estudio sistemático de todas estas variables, aparentemente, la síntesis en condiciones de TEOS:HDTMOS 1:1 a temperaturas menores a 25°C resulta en NP de SiO₂

que no registran MB inmovilizado como monómero. Consecuentemente, tal como habíamos evaluado en Figura 6-37, esto implica que no habrá producción de $^1\text{O}_2$. Un ejemplo de este tipo de NP son las MB@SiO₂-ME-1-B. Si bien poseen igual proporción de TEOS-HDTMOS que las MB@SiO₂-ME-1- $^1\text{O}_2$, no evidenciaron producción de $^1\text{O}_2$ (Figura 6-38).

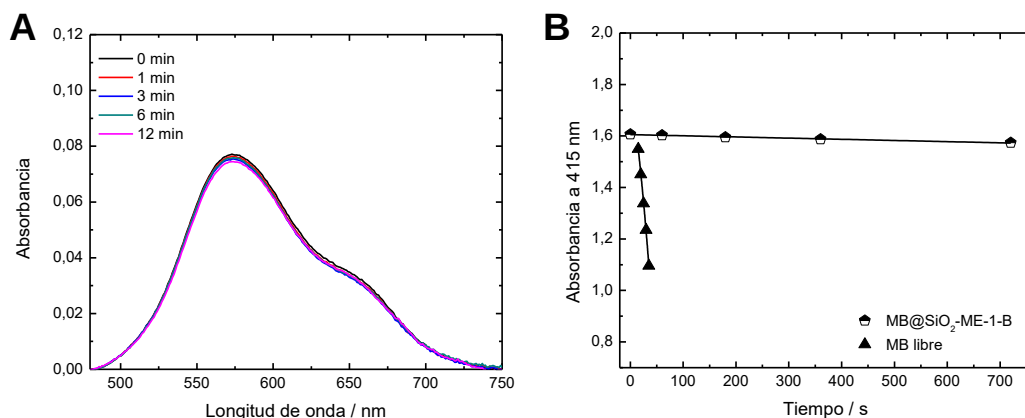


Figura 6-38. Medición de $^1\text{O}_2$ en DMF. (A) Espectros de absorción de las NP MB@SiO₂-ME-1-B a diferentes tiempos de irradiación: desde 0 a 12 minutos. (B) Absorbancia a 415 nm versus tiempo de irradiación para las NP (ajusta a función lineal) y el control de MB libre (ajusta a polinomio de grado dos).

Dado que la temperatura afecta las velocidades de hidrólisis-condensación de alcóxidos en procesos sol-gel⁴², suponemos que será relevante en la competencia entre diferentes eventos simultáneos, más específicamente en la generación o estabilización de especies monoméricas de MB dentro de la matriz de SiO₂. Esta hipótesis refuerza la necesidad de analizar en detalle las interacciones de MB/SiO₂/surfactante en las micelas inversas. A pesar de que esto excede el marco de la presente Tesis, hemos establecido ciertas herramientas de análisis para avanzar en esta dirección y generar estructuras nanoparticuladas con colorantes productores de oxígeno singlete.

Por último, el Φ_{Δ} de MB@SiO₂-ME-1- $^1\text{O}_2$, 0.44 ± 0.07 , resultó muy alto en comparación con otros sistemas reportados. Tada *et al.* reportan un valor de Φ_{Δ}

$\Phi_{\Delta} = 0.03 \pm 0.02$ para NP con núcleo de magnetita y cáscara de sílice.⁴³ Este es un valor que está en el orden de los obtenidos para algunos de nuestros sistemas sintetizados por microemulsión $\Phi_{\Delta} = 0.015 \pm 0.005$ para las NP aminadas MB@SiO₂-ME-1-NH₂ y $\Phi_{\Delta} = 0.015 \pm 0.002$) para las MB@SiO₂-ME-2-A. No es casual que los espectros de absorción UV-visible reportados por Tada *et al.* sean similares a los de MB@SiO₂-ME-1-NH₂ y MB@SiO₂-ME-2-A, en los que se observa un corrimiento hipsocrómico de la banda de absorción respecto del colorante libre, lo cual da la pauta de una agregación notoria del MB. Asimismo, Yu *et al.* reportaron un rendimiento de al menos la mitad del de MB libre ($\Phi_{\Delta} \sim 0.25$) para NP híbridas Au@polímero-MB.⁴⁴

6.5.2.3 Emisión de luz

El máximo de emisión de todas las NP que incluían MB se encontró corrido al azul respecto del colorante libre en solución: de 680 nm para MB libre en DMF a ~ 650 nm para MB incluido en las NP. Este resultado puede tomarse como evidencia de la inclusión del MB en la matriz de sílice, que ofrece un entorno diferente al de la DMF. Este corrimiento hipsocrómico es característico de los fenómenos de “rigidocromismo”.^{19,45–47} Por su parte, medidas de anisotropía de fluorescencia dieron la pauta de que el colorante efectivamente está inmovilizado en la matriz de sílice.

En todos los casos, y aun cuando la mayor parte del colorante se encontrase agregado (como es el caso de MB@SiO₂-ST), se pudo detectar emisión de fluorescencia. Las NP MB@SiO₂-ME-1-¹O₂ con mayor proporción de monómero fueron las más fluorescentes ($\Phi_F = 0.0145$), a la vez que fueron las mayores productoras de ¹O₂.

Los espectros de emisión de las NP MB@SiO₂-ME-1-¹O₂ a diferentes longitudes de onda de excitación (Figura 6-19) revelaron que existen dos especies emisivas de MB en las NP. De acuerdo a lo discutido en la Sección

6.5.2.2, podemos decir que esas dos especies se corresponderían con el complejo MB-TX-100 y con el monómero de MB.

6.6 Conclusiones

Se estudiaron dos estrategias sintéticas para encapsular azul de metileno en matrices de sílice y se logró establecer una correlación muy marcada entre el espectro de absorción UV-visible de las NP y el estado de agregación del colorante en la matriz. Así, dichos espectros sirven como una herramienta de predicción de la capacidad de generación de $^1\text{O}_2$ de las NP. Cuando se trabajó en microemulsión inversa y con una mayor proporción de silano hidrofóbico en el núcleo se observó que, en determinadas condiciones, se pueden obtener partículas en las que la mayor proporción de MB se encuentra como monómero, y una parte se halla en forma de complejo con TX-100, inmovilizado en la matriz. La inmovilización provocó un corrimiento hipsocrómico de la banda de emisión, en línea con lo reportado para otros sistemas.¹⁹ Dichas NP dieron un $\Phi_{\Delta} = (0.44 \pm 0.07)$. Este valor es muy alto en relación a otros materiales reportados, y al MB molécula libre (0.52). Por ello, estas NP ofrecen una plataforma excelente para pensar en su aplicación en PDT en células *in vitro* e *in vivo*.

Por otra parte, vimos que todos los sistemas reportados presentan emisión de fluorescencia en DMF, lo cual los hace a todos aplicables en principio a detección por microscopías confocal de fluorescencia. La mayoría de los sistemas reportados, a la vez de presentar emisión de fluorescencia, tienen una baja capacidad de generación de $^1\text{O}_2$ (como máximo 1.5 %). Así, estos sistemas pueden pensarse como buenos candidatos para construir nano-objetos más complejos que lleven en su superficie otras moléculas de interés (sensores fluorescentes como Cy-PIP, por ejemplo, o moléculas con

receptores específicos abundantes en células tumorales, por ejemplo ácido fólico).

6.7 Referencias

1. Rampazzo, E., Genovese, D., Palomba, F., Prodi, L., Zaccheroni, N. NIR Fluorescent Dye Doped Silica Nanoparticles for in vivo imaging, sensing and theranostic. *Methods Appl. Fluoresc.* **6**, 022002 (2018).
2. Wang, X. D. *et al.* Preparation of reversible colorimetric temperature nanosensors and their application in quantitative two-dimensional thermo-imaging. *Anal. Chem.* **83**, 2434–2437 (2011).
3. Arduini, M. *et al.* Turning fluorescent dyes into Cu(II) nanosensors. *Langmuir* **21**, 9314–9321 (2005).
4. *Colloids and Colloid Assemblies: Synthesis, Modification, Organization and Utilization of Colloid Particles.* (Wiley-VCH, 2004).
5. Stöber, W., Fink, A., Bohn, E. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *J. Colloid Interface Sci.* **26**, 62–69 (1968).
6. Kneuer, C. *et al.* Silica nanoparticles modified with aminosilanes as carriers for plasmid DNA. *Int. J. Pharm.* **196**, 257–261 (2000).
7. Lee, C. H., Park, S. H., Chung, W., Kim, J. Y. & Kim, S. H. Preparation and characterization of surface modified silica nanoparticles with organo-silane compounds. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **384**, 318–322 (2011).
8. Pálmai, M. *et al.* Preparation, purification, and characterization of aminopropyl-functionalized silica sol. *J. Colloid Interface Sci.* **390**, 34–40 (2013).
9. Almeida, R. M., Pantano, C. G. & Rui, M. A. Structural investigation of silica gel films by infrared spectroscopy. *J. Appl. Phys.* **68**, 4225–4232 (1990).
10. Sacks, Michael D., Tseng, S.-Y. Preparation of SiO₂ Glass from Model

- Powder Compacts: II, Sintering. *J. Am. Ceram. Soc.* **67**, 532–537 (1984).
11. Burneau, A., Ckdex, F. V. L. N., Gallas, J. P. & Lavalley, J. C. Comparative Study of the Surface Hydroxyl Groups of Fumed and Precipitated Silicas . 2 . Characterization by Infrared Spectroscopy of the Interactions with Water. 1364–1372 (1990).
 12. Marchena, H., Granada, M., Bordoni, A. V, Williams, F. J. & Wolosiuk, A. Journal of Solid State Chemistry Organized thiol functional groups in mesoporous core shell colloids. **187**, 97–102 (2012).
 13. Ovchinnikov, O. V *et al.* Vibrational Spectroscopy Manifestation of intermolecular interactions in FTIR spectra of methylene blue molecules. *Vib. Spectrosc.* **86**, 181–189 (2016).
 14. Lewis, G. N., Goldschmid, O., Magel, T. T. & Bigeleisen, J. Dimeric and Other Forms of Methylene Blue: Absorption and Fluorescence of the Pure Monomer. *J. Am. Chem. Soc.* **65**, 1150–1154 (1943).
 15. Antonov, L., Gergov, G., Petrov, V., Kubista, M. & Nygren, J. UV-Vis spectroscopic and chemometric study on the aggregation of ionic dyes in water. *Talanta* **49**, 99–106 (1999).
 16. Ohline, S. M., Lee, S., Williams, S. & Chang, C. Quantification of methylene blue aggregation on a fused silica surface and resolution of individual absorbance spectra. *Chem. Phys. Lett.* **346**, 9–15 (2001).
 17. Rodriguez, H. B. & Roman, E. S. Energy Transfer Among Dyes on Particulate Solids. *Photochem. Photobiol.* (2006). doi:10.1562/2005-07-08-RA-609
 18. Taniguchi, M. & Lindsey, J. S. Database of Absorption and Fluorescence Spectra of >300 Common Compounds for use in PhotochemCAD. *Photochem. Photobiol.* **94**, 290–327 (2018).
 19. Mirenda, M. *et al.* Temperature response of luminescent tris(bipyridine)ruthenium(II)-doped silica nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **392**, 96–101 (2013).

20. Eaton, P. *et al.* A direct comparison of experimental methods to measure dimensions of synthetic nanoparticles. *Ultramicroscopy* **182**, 179–190 (2017).
21. Škvarla, J. & Škvarla, J. An identification of the soft polyelectrolyte gel-like layer on silica colloids using atomic force and electron microscopy. *Ultramicroscopy* **181**, 97–106 (2017).
22. Rahul P. Bagwe, Chaoyong Yang, Lisa R. Hilliard, and W. T. Optimization of Dye-Doped Silica Nanoparticles Prepared Using a Reverse Microemulsion Method. *Langmuir* **20**, 8336–8342 (2004).
23. Wu, Z., Xiang, H., Kim, T., Chun, M. S. & Lee, K. Surface properties of submicrometer silica spheres modified with aminopropyltriethoxysilane and phenyltriethoxysilane. *J. Colloid Interface Sci.* **304**, 119–124 (2006).
24. Herz, A. H. Aggregation of sensitizing dyes in solution and their adsorption onto silver halides. *Adv. Colloid Interface Sci.* **8**, 237–298 (1977).
25. Chen, Y., Urano, T., Karatsu, T., Takahara, S. & Tokumaru, K. Effect of aggregates on the photochemical behavior of Rose Bengal peroxybenzoate initiator in PMMA film. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 2233–2237 (1998).
26. Law, K. Y. Effect of dye aggregation on the photogeneration efficiency of organic photoconductors. *J. Phys. Chem.* **92**, 4226–4231 (1998).
27. del Monte, F. & Levy, D. Identification of Oblique and Coplanar Inclined Fluorescent J-Dimers in Rhodamine 110 Doped Sol-Gel-Glasses. *J. Phys. Chem. B* (1999). doi:10.1021/jp991491g
28. Del Monte, F., Mackenzie, J. D. & Levy, D. Rhodamine fluorescent dimers adsorbed on the porous surface of silica gels. *Langmuir* (2000). doi:10.1021/la000540+
29. Bernik, D., Tymczyszyn, E., Daraio, M. E. & Negri, R. M. Fluorescent Dimers of Merocyanine 540 (MC540) in the Gel Phase of Polyisocyanate Liposomes. *70*, 40–48 (1999).

30. Kikteva, T., Star, D., Zhao, Z., Baisley, T. L. & Leach, G. W. Molecular Orientation, Aggregation, and Order in Rhodamine Films at the Fused Silica/Air Interface. *J. Phys. Chem. B* **103**, 1124–1133 (1999).
31. Das, S. & Kamat, P. V. Can H-Aggregates Serve as Light-Harvesting Antennae? Triplet–Triplet Energy Transfer between Excited Aggregates and Monomer Thionine in Aersol-OT Solutions. *J. Phys. Chem. B* (1999). doi:10.1021/jp983816j
32. Severino, D., Helena, C., Dino, S. & Mauricio, S. Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue. **77**, 459–468 (2003).
33. Deng, T., Li, J. S., Jiang, J. H., Shen, G. L. & Yu, R. Q. Preparation of near-IR fluorescent nanoparticles for fluorescence- anisotropy-based immunoagglutination assay in whole blood. *Adv. Funct. Mater.* (2006). doi:10.1002/adfm.200600149
34. Pramanick, D. & Mukherjee, D. Molecular interaction of methylene blue with triton X-100 in reverse micellar media. *J. Colloid Interface Sci.* (1993). doi:10.1006/jcis.1993.1166
35. K. K. Rohatgi-Mukherjee, R. C. and B. B. B. Molecular Interaction of Phenosafranin with Surfactants and Its Photogalvanic Effect. *J. Colloid Interface Sci.* **106**, (1985).
36. Fendler, J. H. Interactions and Reactions in Reversed Micellar Systems. *Acc. Chem. Res.* **9**, 153–161 (1976).
37. Qi, L. & Ma, J. Investigation of the microenvironment in nonionic reverse micelles using methyl orange and methylene blue as absorption probes. *J. Colloid Interface Sci.* (1998). doi:10.1006/jcis.1997.5228
38. Llansola Portoles, M. J. *et al.* Silicon nanoparticle photophysics and singlet oxygen generation. *Langmuir* (2010). doi:10.1021/la100980x
39. Arriagada, F. J. & Osseo-Asare, K. Synthesis of Nanosize Silica in a Nonionic Water-in-Oil Microemulsion: Effects of the Water/Surfactant

- Molar Ratio and Ammonia Concentration. *J. Colloid Interface Sci.* **211**, 210–220 (1999).
40. Arriagada, F. J. & Osseo-Asare, K. Controlled hydrolysis of tetraethoxysilane in a nonionic water-in-oil microemulsion: a statistical model of silica nucleation. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **154**, 311–326 (1999).
 41. Yao, L., Xu, G., Dou, W. & Bai, Y. The control of size and morphology of nanosized silica in Triton X-100 based reverse micelle. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **316**, 8–14 (2008).
 42. Brinker, C. J. & Scherer, G. W. *Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing*. (Academic Press, 1990).
 43. Tada, D. B. *et al.* Methylene blue-containing silica-coated magnetic particles: A potential magnetic carrier for photodynamic therapy. *Langmuir* **23**, 8194–8199 (2007).
 44. Yu, J., Hsu, C. H., Huang, C. C. & Chang, P. Y. Development of therapeutic au-methylene blue nanoparticles for targeted photodynamic therapy of cervical cancer cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 432–441 (2015).
 45. Van Houten, J. & Watts, R. J. Temperature Dependence of the Photophysical and Photochemical Properties of the Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) Ion in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 4853–4858 (1976).
 46. Matsui, K. & Momose, F. Luminescence Properties of Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) in Sol-Gel Systems of SiO₂. *Chem. Mater.* **9**, 2588–2591 (1997).
 47. Innocenzi, P., Kozuka, H. & Yoko, T. Fluorescence Properties of the Ru(bpy)₃²⁺ Complex Incorporated in Sol-Gel-Derived Silica Coating Films. *J. Phys. Chem. B* (1997). doi:10.1021/jp970004z

7 Nanopartículas de SiO₂ con más de una sonda fluorescente

7.1 Introducción

En capítulos anteriores mostramos que **Cy-PIP** es una molécula con emisión fluorescente sensible al pH (Capítulo 4) y que Cy-PIP@SiO₂ conserva su capacidad sensora, incluso en contextos biológicos, lo cual resulta de gran relevancia ya que el pH intracelular juega un rol muy importante en los procesos celulares (Capítulo 5).

Como vimos en el Capítulo 1, las células están lejos de ser "cubetas" óptimas para realizar estudios espectroscópicos y existen problemas importantes cuando se quieren cuantificar señales ópticas en dichos sistemas. Las complicaciones se deben a múltiples factores: variaciones en la longitud del camino óptico y en las concentraciones locales de las sondas fluorescentes, la dispersión de la luz que ocurre en las células, la variación en la intensidad de la iluminación y el fotoblanqueo de sondas durante el experimento.^{1,2} Sumado a ello, las mencionadas variaciones ocurren no sólo dentro de una única célula, sino también entre células diferentes de una misma población. Además, el factor tiempo también juega un papel importante debido a la naturaleza dinámica de las células vivas.¹

La mayoría de estos problemas pueden ser minimizados e incluso superados realizando medidas de absorbancia^{3,4} o de fluorescencia⁵⁻⁷ a dos longitudes de onda en forma simultánea de manera que resulten medidas autoreferenciadas (*ratiometric measurements*, del inglés). La espectroscopía de fluorescencia que utiliza cocientes de emisión a dos longitudes de onda (de una

o más sondas) requiere que el colorante sea diferencialmente sensible en una de las longitudes de onda de emisión al parámetro de interés (la concentración de Ca^{2+} o de H^+ , por ejemplo). La emisión a la otra longitud de onda puede ser insensible (por ejemplo, cuando hay un punto isosbético o, cuando se coloca una sonda cuya emisión no varía con la propiedad a medir), mucho menos sensible, o sensible en la dirección opuesta en comparación con la emisión a la otra longitud de onda. Es la relación de los cambios en la emisión en cada longitud de onda lo que define la respuesta del sensor. Y, como la emisión se origina en el mismo volumen de muestra, la relación (cociente de emisiones) se normaliza para la longitud de la trayectoria óptica, la concentración local de la sonda, la intensidad de la iluminación y el fotoblanqueo.¹ Así, no se requieren los espectros de emisión completos pues la proporción de las medidas a las dos longitudes de onda refleja los cambios espectrales de todo el sistema de acuerdo a los cambios en la propiedad a medir.

En principio, como vimos en el Capítulo 1, si hablamos de una única molécula, la aproximación más directa para obtener medidas autoreferenciadas viene de la mano del uso de sondas duales “2- λ ”.⁸ En esta aproximación encontramos las siguientes situaciones: a) la sonda se excita a una única longitud de onda y se calcula el cociente de las emisiones a dos longitudes de onda diferentes (*Caso II*, ver Cap.1) o, b) el fluoróforo se excita a dos longitudes de onda, se colectan las emisiones a una única longitud de onda y se calcula el cociente entre ellas (*Caso I*, ver Cap.1). La detección con estas sondas “2- λ ” se sirve de la diferente emisión (a) y/o absorción (b) de la forma protonada y desprotonada de la molécula.

Tal como mencionamos en el Capítulo 1, los derivados de xantenos como el SNARF-1 son ejemplos de sensores moleculares muy utilizados para medidas autoreferenciadas de pH en células.^{9,10} El SNARF-1 presenta un espectro de emisión (λ_{exc} 514 nm) con dos bandas, una a 635 nm y otra a 590 nm, ambas sensibles al pH, lo que permite medir el cociente de intensidades de emisión, de

acuerdo al caso (a). Por su parte, Myochin *et al.* reportaron sensores de pH de la familia de las aminotricarbocianinas que son ejemplos de sensores de autoreferenciados de tipo (b).¹¹ Asimismo, se han reportado nanomateriales con respuestas de fluorescencia autoreferenciadas de tipo (a) para Hg(II)¹² y para pH¹³.

En ciertos casos, algunos fluoróforos útiles para sensar pH muestran sólo un cambio de la intensidad de la fluorescencia debido a la protonación a pH ácido, pero no un cambio en la posición de los máximos de absorción o emisión (caso de **Cy-PIP**). En estos casos, no se puede hablar de un sistema autoreferenciado en términos del enfoque “2- λ ”.⁸ Esta dificultad puede resolverse mediante la adición de un colorante de referencia que sea inerte al pH y pueda excitarse a la misma longitud de onda que la sonda sensible al pH, lo que constituiría el caso (c). Los máximos de emisión del indicador de pH y de la referencia deben estar suficientemente separados para permitir la medición confiable de las dos sondas. Dado que el uso de dos colorantes individuales en células vivas o tejidos no es adecuado, la utilización de sondas de referencia cobra sentido cuando ambos fluoróforos (uno de ellos sensible al pH y el otro insensible a dicha propiedad) pueden ser confinados en un mismo nano-objeto. Xu *et al.* reportaron un ejemplo de sensor dual de tipo (c) en la región visible del espectro electromagnético que consistía en nanopartículas de sílice que encapsulaban en el núcleo [Ru(phen)₃]²⁺ como sonda de referencia y en la superficie estaban funcionalizadas con FITC, una sonda sensible al pH.^{14,15}

Existen, por otro lado, ejemplos de nanomateriales que no pueden incluirse dentro de los casos mencionados. Los materiales así contruidos se pueden agrupar en un cuarto caso (d) y se distinguen de los demás porque sus colorantes inmovilizados se excitan a dos longitudes de onda diferentes y sus emisiones se colectan también en canales diferentes.¹⁶⁻²⁰ Se trata de nanosensores duales, pero no se puede considerar que sean estrictamente autoreferenciados.

Pese al gran crecimiento en el campo de los sensores autoreferenciados, no se han descrito nanosensores de pH con dos sondas fluorescentes que absorban y emitan luz en la región del NIR. Es por ello que los resultados que se presentan en este capítulo están dirigidos a contribuir en el desarrollo futuro de nanosensores autoreferenciados de pH en el NIR.

En este capítulo abordamos dos tipos de sistemas con dos fluoróforos. En primer lugar, describimos la síntesis y caracterización de nanopartículas duales que contienen $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ en el núcleo y **Cy-PIP** en la superficie. Este sistema no es completamente de NIR y, de acuerdo a los casos que hemos desarrollado antes (a-c), no puede considerarse un nanosensor autoreferenciado (*ratiometric*) de pH. Sin embargo, resultó valioso como primera aproximación ya que nos permitió obtener un nanosensor dual (caso d) de pH con dos sondas fluorescentes confinadas en el mismo nano-objeto. **Cy-PIP** le otorga la capacidad sensora de pH, mientras que $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ actúa como referencia interna. En segundo lugar, mostramos resultados preliminares de un nanosistema que incluye azul de metileno (MB) en el núcleo y una molécula derivada de las aminotricarbocianinas (Cy-Test) en la superficie como una prueba de concepto de un sistema nanoparticulado completamente de NIR y que servirá como modelo para la construcción de sensores autoreferenciados de pH en los la sonda sensible a pH sea **Cy-PIP**. El MB molécula libre varía su emisión con el pH en menos de un 5% y, dado que la FDA ha aprobado su uso para el tratamiento de la metahemoglobinemia, se trata de una sonda de referencia atractiva para construir un nanosensor de pH con aplicación biológica.²¹

Por otra parte, se presentan también otros sistemas de SiO_2 que incluyen en su núcleo sondas comerciales de la familia de las rodaminas como ATTO 488 o de la familia de los perilenos como PTCDA, con el objeto de expandir la librería nanomateriales emisivos a los que luego puedan agregarse funciones más complejas.

7.1.1 Sistemas con dos sondas fluorescentes como plataformas para nanosensores de pH

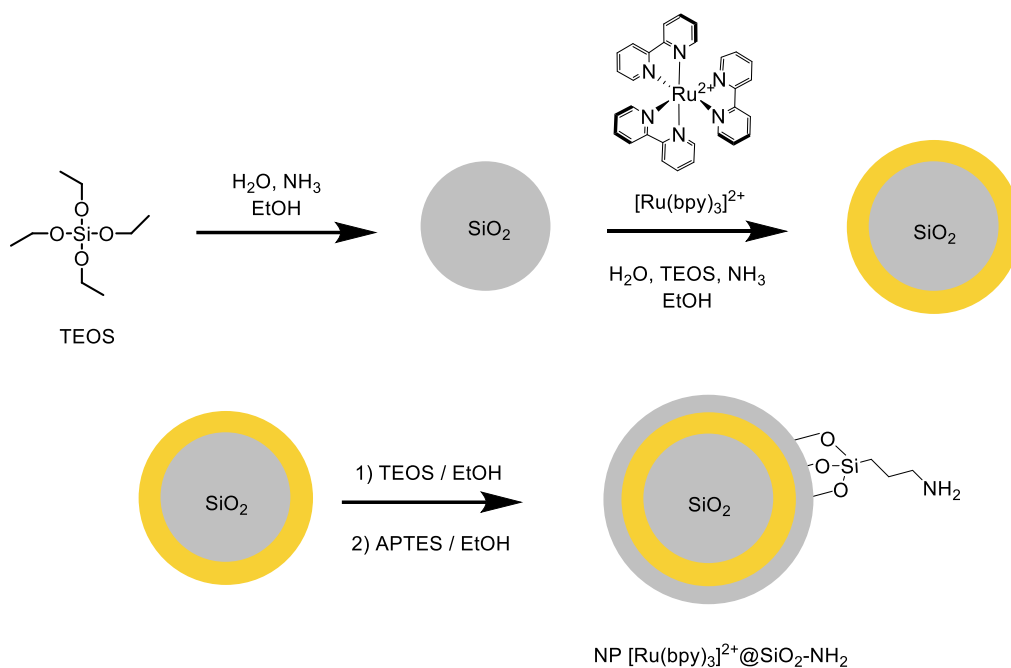
7.1.1.1 Nanopartículas con $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ y Cy-PIP

7.1.1.1.1 Generalidades del sistema

Como ya mencionamos, para fabricar un sensor dual de pH, normalmente se incorporaran en una misma matriz (de sílice en nuestro caso) dos colorantes, uno sensible al pH y otro de referencia. En este enfoque, se prefirió una arquitectura de núcleo/cáscara en la que el colorante de referencia $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ estaba localizado principalmente en el núcleo y el colorante sensible al pH localizado en superficie de la cáscara.

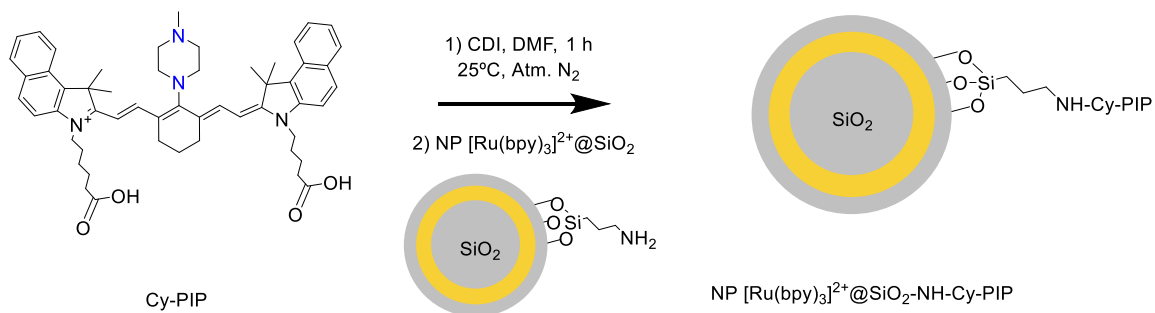
7.1.1.1.2 Síntesis y caracterización del sistema dual

En primer lugar se sintetizaron las semillas de SiO_2 que contenían el colorante de referencia $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ mediante una modificación del método de Stöber²² y sobre la base de las ideas de Matijević y colaboradores.²³ En un primer paso (Esquema 7-1), se obtienen partículas semilla de SiO_2 cuyo tamaño puede ajustarse a través de la elección de los parámetros de síntesis (Capítulo 3). En un segundo paso en el mismo reactor (*one-pot*), las semillas se recubren con una fina capa de sílice que atrapa al fluoróforo debido a las interacciones electrostáticas atractivas entre el $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ y los oligómeros de sílice cargados negativos. Luego se vuelve a depositar una capa fina de sílice y, por último, se agrega APTES al medio de reacción para darle funcionalidad aminopropilo a la superficie de las nanopartículas. Se obtienen así las NP $[Ru(bpy)_3]^{2+}@SiO_2-NH_2$.



Esquema 7-1. Síntesis de nanopartículas de SiO_2 dopadas con $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ y funcionalizadas en la superficie con aminopropiltrietoxisilano (APTES).

Los grupos aminopropilo que funcionalizan la superficie de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+} @ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ se hicieron reaccionar luego con **Cy-PIP** de forma análoga a la descrita en el Capítulo 5 para $\text{Cy-PIP} @ \text{SiO}_2$. En el Esquema 7-2 se puede observar una representación de la estrategia sintética empelada.



Esquema 7-2. Síntesis de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+} @ \text{SiO}_2\text{-NH-Cy-PIP}$ mediante acoplamiento con CDI.

En la Figura 7-1 se presenta una imagen SEM de las nanopartículas finales obtenidas $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}@\text{SiO}_2\text{-NH-Cy-PIP}$. La morfología es esférica, con un diámetro de (166 ± 12) nm.

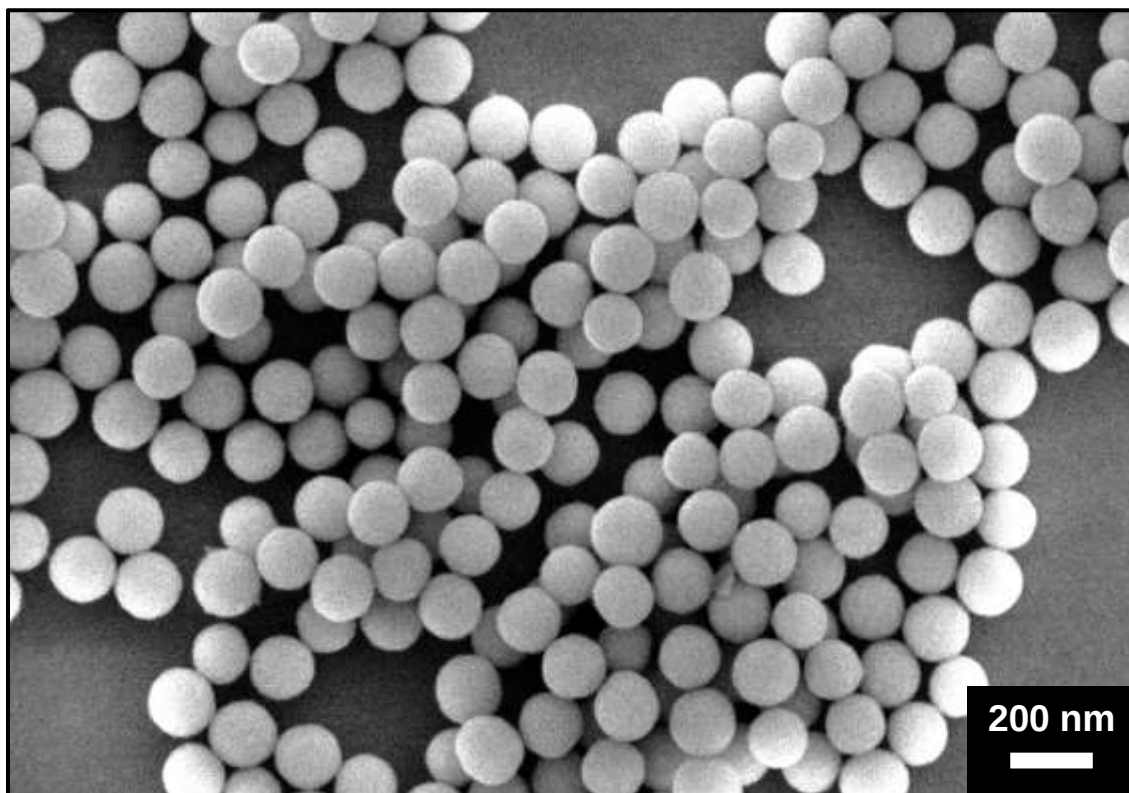


Figura 7-1. Micrografía de FE-SEM de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}@\text{SiO}_2\text{-NH-Cy-PIP}$. El diámetro obtenido por tratamiento de la imagen fue de (166 ± 12) nm, $N=100$ partículas.

7.1.1.1.3 Dependencia de la emisión de fluorescencia de las sondas incluidas con el pH

7.1.1.1.3.1 Comportamiento de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$

En primer lugar, se evaluó la dependencia de la emisión del $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ encapsulado en la matriz de sílice con el pH. En la Figura 7-2 se muestran los espectros de emisión corregidos de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ en PBS a diferentes pHs. El máximo de emisión de las nanopartículas se encuentra en 602-605 nm

(λ_{exc} 460 nm) y se ve que en el rango de pH 8,74-5,68 la intensidad de emisión se mantiene prácticamente constante (la variación porcentual es menor a 3,5 %).

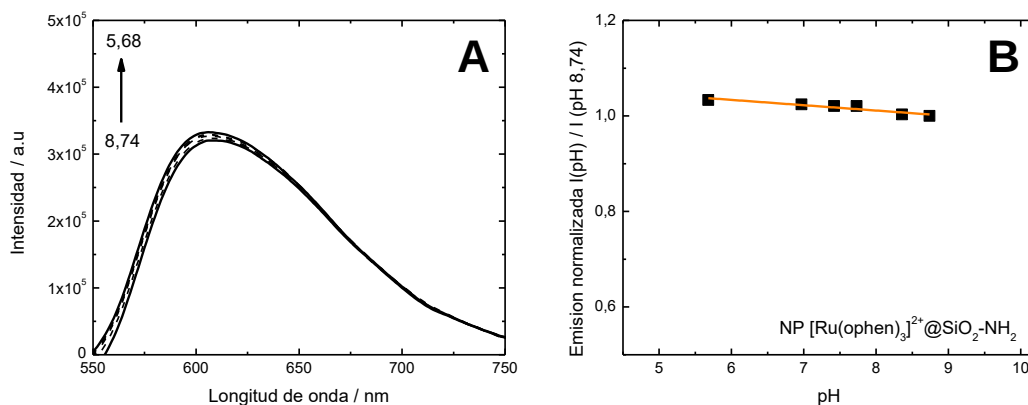


Figura 7-2. (A) Espectros de emisión de las nanopartículas $[Ru(bpy)_3]^{2+}@SiO_2-NH_2$, λ_{exc} : 460 nm; (B) emisión normalizada a 605 nm respecto del punto inicial a pH 8,74. La titulación se llevó a cabo en buffer PBS 10 mM, y se agregaron cantidades muy pequeñas de HCl (aq) para ir disminuyendo el pH, de forma de obtener datos a los pHs: 8,74, 8,36, 7,73, 7,42, 6,97 y 5,68.

En vista de estos resultados, se consideró que el $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ encapsulado en la matriz de sílice puede ser utilizado como referencia interna de pH en un sistema dual con dos fluoróforos.

7.1.1.1.3.2 Comportamiento del sistema dual $[Ru(bpy)_3]^{2+}@SiO_2-NH-Cy-PIP$

Para evaluar la capacidad sensora de las nanopartículas duales se realizaron experimentos de titulación en buffer PBS (Capítulo 3) y se registraron los espectros de emisión para cada pH a dos longitudes de onda de excitación: 460 nm para el $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ y 680 nm para **Cy-PIP**. En la Figura 7-3 pueden observarse los espectros de emisión a los diferentes pHs (rango 8,68-5,77). Como se esperaba de acuerdo a los resultados de la Sección 7.1.1.1.3.1, el espectro de emisión del complejo de rutenio (II) encapsulado en la matriz de

sílice no se ve prácticamente afectado por el cambio de pH, mientras que el espectro de **Cy-PIP** muestra una baja importante en la intensidad de emisión al aumentar la concentración de protones.

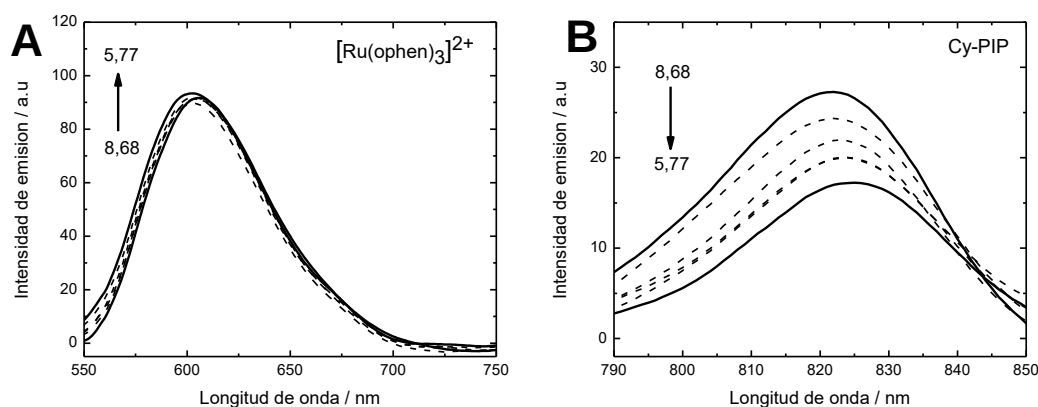


Figura 7-3. Espectros de emisión de las nanopartículas $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}@\text{SiO}_2\text{-NH-Cy-PIP}$ a pH 8,68, 8,0, 7,57, 6,75, 6,29 y 5,77 en PBS 10 mM. (A) λ_{exc} 460 nm para excitar al $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$; (B) λ_{exc} 680 nm para excitar a Cy-PIP.

Si se analizan las intensidades de emisión en sus máximos normalizadas al valor de intensidad para el pH inicial adquirido (el más alcalino, en este caso 8,68), se pueden construir las curvas de titulación de la Figura 7-4. La variación en la intensidad de emisión del $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ fue menor al 3% de pH 8,68 a 5,77, mientras que la variación total de **Cy-PIP** de pH 9,64 a 5,77 resultó de 43%. Además, el pK_a calculado para **Cy-PIP** anclado en las NP $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}@\text{SiO}_2\text{-NH-Cy-PIP}$ resultó de $(7,8 \pm 0,2)$.

Por otra parte, se calculó para cada pH el cociente de las intensidades de emisión en los canales del $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ y de **Cy-PIP**: $I(820 \text{ nm}) / I(605 \text{ nm})$, como se ve en la Figura 7-5. El pK_a obtenido fue de $(8,1 \pm 0,5)$.

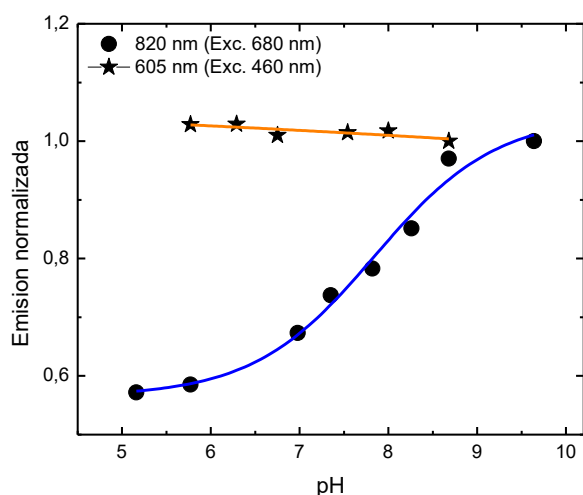


Figura 7-4. Curvas de titulación (PBS 10 mM) de las nanopartículas $[Ru(bpy)_3]^{2+}@SiO_2-NH-Cy-PIP$. Para cada pH (rango 9,64-5,77 para **Cy-PIP** y rango 8,68-5,77 para Ru(II)), se excitó a 460 nm para coleccionar la emisión del $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ a 605 nm y, se excitó a 680 nm para coleccionar la emisión de **Cy-PIP** a 820 nm. Las respuestas se han normalizado al primer pH medido a fin de ser comparadas en el mismo gráfico. Para **Cy-PIP**, se calculó un $pK_a = (7,8 \pm 0,2)$, $R^2 = 0,9759$.

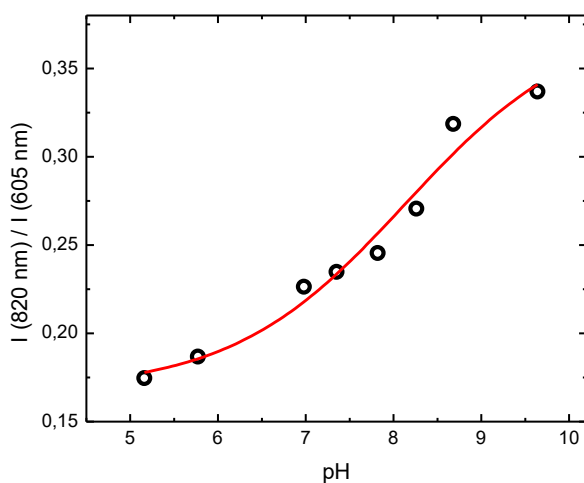


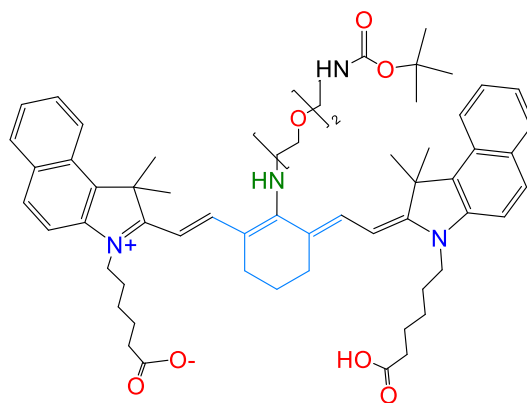
Figura 7-5. Curva de titulación de las nanopartículas $[Ru(bpy)_3]^{2+}@SiO_2-NH-Cy-PIP$ en PBS 10 mM a partir de la intensidad de emisión de **Cy-PIP** referida a la de $[Ru(bpy)_3]^{2+}$: $I(820\text{ nm})/I(605\text{ nm})$. Para cada pH (rango 8,68-5,77) se excitó a 460 nm y a 680 nm. Se calculó un $pK_a(\text{ratio}) = (8,1 \pm 0,5)$, $R^2 = 0,9544$.

7.1.1.2 Nanopartículas con MB y Cy-Test

7.1.1.2.1 Generalidades del sistema

En el Capítulo 6 presentamos la caracterización de nanopartículas que encapsulaban MB en la estructura de la sílice por diversos métodos de síntesis. Vimos que algunos de los sistemas sintetizados no mostraban producción medible de $^1\text{O}_2$ y que, analizando el espectro de absorción de las NP en DMF era posible saber *a priori* si los sistemas tendrían capacidad productora o no. Teniendo estos resultados en cuenta, elegimos uno de los sistemas que no producían $^1\text{O}_2$ (MB@SiO₂-ME-1-B-NH₂) para construir un nano-objeto que llevara, además de MB en el núcleo, una sonda de la familia de las aminotricarbocianinas (Cy-Test) en la superficie, como prueba de concepto de la versatilidad de la matriz de sílice para la multi-funcionalización con moléculas fluorescentes. El hecho de que el MB encapsulado en la matriz no produzca $^1\text{O}_2$ en cantidades medibles es importante para evitar que la otra sonda fluorescente (en este caso Cy-Test) reaccione y se degrade, lo cual comprometería su fotoestabilidad.

Cy-Test fue cedida gentilmente para los experimentos que se reportan en este apartado y sintetizada por el Lic. Javier Abbas para su tesis de doctorado en curso bajo la dirección de la Dra C. Spagnuolo (QO-FCEN). Como se ve en el Esquema 7-3, Cy-Test tiene una estructura muy similar a la de **Cy-PIP**: posee dos grupos ácidos carboxílicos libres para la unión covalente a la superficie aminada mediante una reacción de acoplamiento vía 1,1-carbonildiimidazol, tal y como se describió para la funcionalización de APTES@SiO₂ con **Cy-PIP** (Capítulo 5 y Capítulo 3 para los detalles experimentales).



Esquema 7-3. Estructura de la aminotricarbocianina Cy-Test.

A diferencia de **Cy-PIP**, Cy-Test no presenta capacidad sensora de pH, por lo cual sólo la hemos utilizado como modelo a fin de construir un nano-objeto con dos sondas de NIR. La perspectiva futura es unir **Cy-PIP** a la superficie y así tener un nanosensor autoreferenciado de pH completamente en el NIR.

7.1.1.2.2 Dependencia de MB@SiO₂-ME-1-B con el pH

En primer lugar, dado que la propiedad de interés es el pH, estudiamos la dependencia de la emisión de fluorescencia del MB (sonda de referencia) encapsulado en matrices de sílice. Idealmente se busca que la sonda que se utiliza como referencia no cambie su emisión con el pH en más de un 10%. En la Figura 7-6 se muestra la curva de titulación de las NP MB@SiO₂-ME-1-B en buffer PBS.

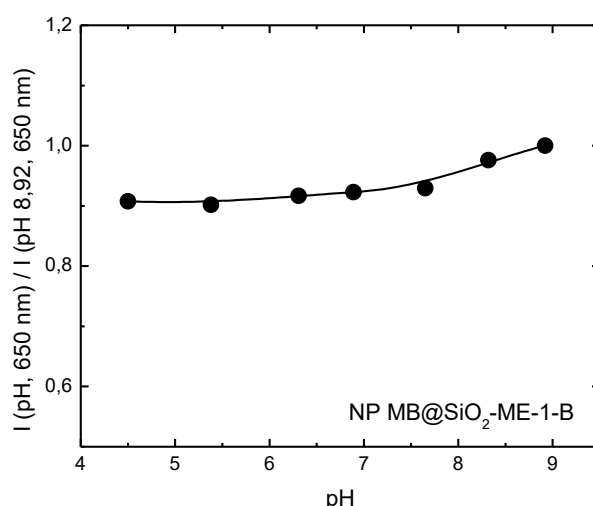


Figura 7-6. Curva de titulación de las nanopartículas núcleo-cáscara MB@SiO₂-ME-1-B en buffer PBS 10 mM. El rango de pH ensayado fue de 8,92 a 4,5. La intensidad de emisión a 650 nm se ha normalizado a pH 8,92.

Se observó que la variación en la intensidad de emisión a 650 nm era de un 9,2 % de pH 8,92 a 4,5. Recordemos también que las NP MB@SiO₂-ME-1-B no producen ¹O₂ en cantidades medibles (Capítulo 6), lo cual es un requisito a la hora de pensar en la unión posterior de otras sondas fluorescentes.

7.1.1.2.3 Caracterización fotofísica de las sondas libres en solución

En primer término, para evaluar la posibilidad de excitar a una única longitud de onda a los dos colorantes, se evaluaron los espectros de absorción y emisión de las especies libres en solución a pH regulado. En la Figura 7-7 se muestran los espectros de absorción y emisión normalizados de MB y Cy-Test en buffer PBS. El MB presenta un máximo de absorción a 665 nm y de emisión a 685 nm (λ_{exc} : 580 nm). Por su parte, Cy-Test presenta un espectro de absorción ancho, típico de las aminotricarbocianinas, con un máximo a 665 nm. El espectro de emisión (λ_{exc} : 690 nm) revela un máximo a 785 nm. Se observa

además que ambas sondas libres en solución pueden ser excitadas a partir de los 580 nm, y 650 nm resultaría una buena longitud de onda de compromiso para pensar en un único canal de excitación. Así, la doble funcionalización de las nanopartículas de SiO₂ se encaró con miras a esta posibilidad.

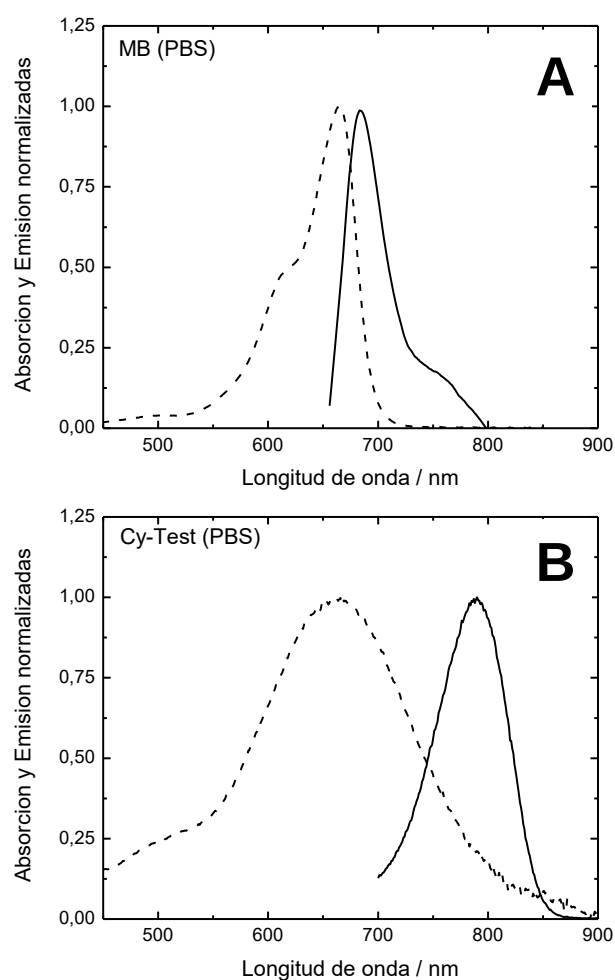
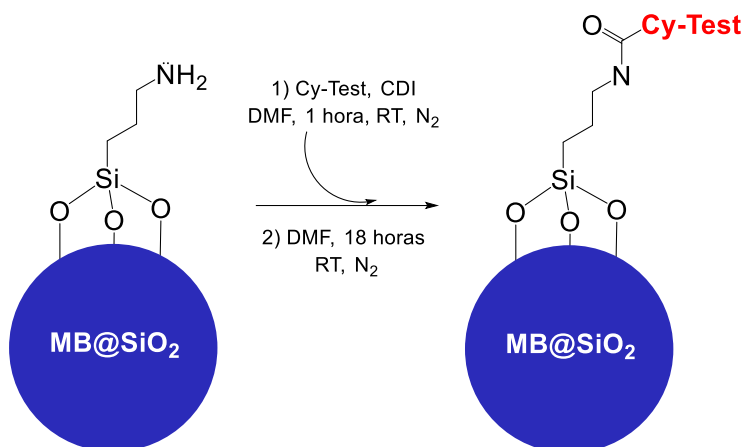


Figura 7-7. Espectros de absorción y emisión en buffer fosfato 10 mM normalizados en sus máximos de las sondas libres: (A) Azul de metileno (MB), λ_{exc} 580 nm, (B) Cy-Test, λ_{exc} 690 nm.

7.1.1.2.4 Síntesis y caracterización del material dual

La síntesis de MB@SiO₂-ME-1-B-NH₂ se realizó por microemulsión inversa (descrita en el Capítulo 3). Como ya mencionamos, la unión de Cy-

Test a la superficie se realizó en forma análoga a lo reportado para **Cy-PIP** en el Capítulo 5. Como se muestra en el Esquema 7-4, se realizó un acoplamiento del ácido carboxílico de Cy-Test con la función aminopropilo de la superficie vía 1,1-cabonildiimidazol (Capítulo 3 para detalles experimentales).



Esquema 7-4. Reacción esquemática de funcionalización de MB@SiO₂-ME-1-B-NH₂ con Cy-Test.

En la Figura 7-8 A se muestran las nanopartículas tipo núcleo MB@SiO₂-ME-1-B y, en la Figura 7-8 B las nanopartículas núcleo-cáscara derivadas ya funcionalizadas con Cy-Test (MB@SiO₂-ME-1-B-NH₂-Cy-Test). Se observa que la morfología, en línea con los resultados del Capítulo 6, es esférica desde la síntesis de los núcleos. El diámetro de los núcleos fue de (54±4) nm, mientras que el de las partículas núcleo-cáscara resultó de (58±5) nm. Así, el crecimiento promedio de la capa de sílice aminada es de 4 nm.

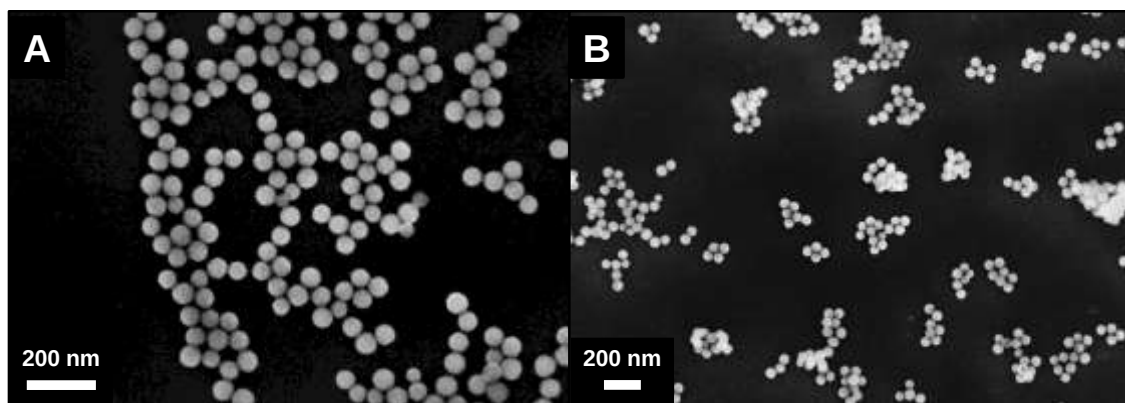


Figura 7-8. Micrografías de FE-SEM de (A) MB@SiO₂-ME-1-B nanopartículas tipo núcleo y (B) MB@SiO₂-ME-1-B-NH₂-Cy-Test tipo núcleo-cáscara. Los diámetros calculados fueron: (A) (54±4) nm y, (B) (58±5) nm, N=100.

En la Figura 7-9 (Izq.) se muestra una representación de las nanopartículas con doble funcionalidad. En la Figura 7-9 (Der.) se muestran los espectros de emisión de las nanopartículas MB@SiO₂-ME-1-B-NH-Cy-Test en metanol. En este caso, y como una prueba preliminar, las nanopartículas se excitaron a 580 nm para adquirir el espectro completo del MB y a 690 nm para tomar el espectro de Cy-PIP.

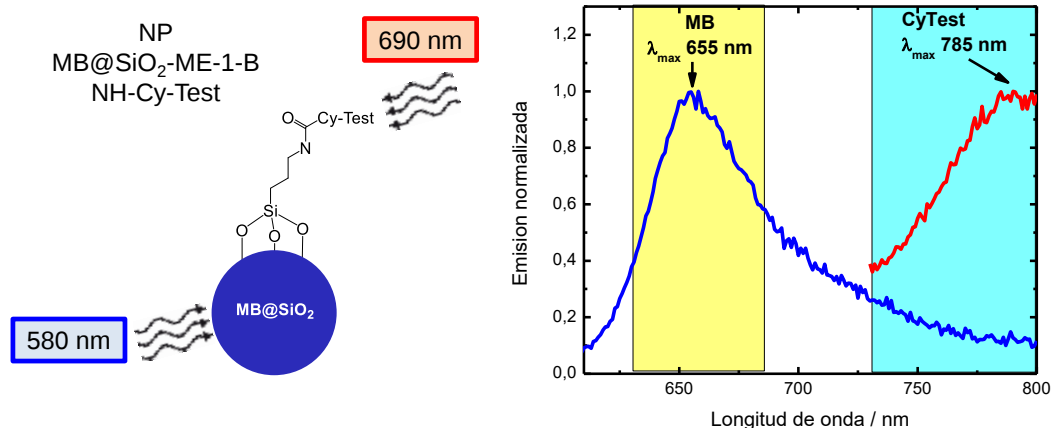


Figura 7-9. (Izq.) Esquema de las nanopartículas MB@SiO₂-ME-1-B-NH-Cy-Test doblemente funcionalizadas: en el núcleo encapsulan MB y en la superficie tienen unida Cy-Test covalentemente. (Der.) Espectros de emisión de las nanopartículas en metanol normalizados en sus máximos a dos

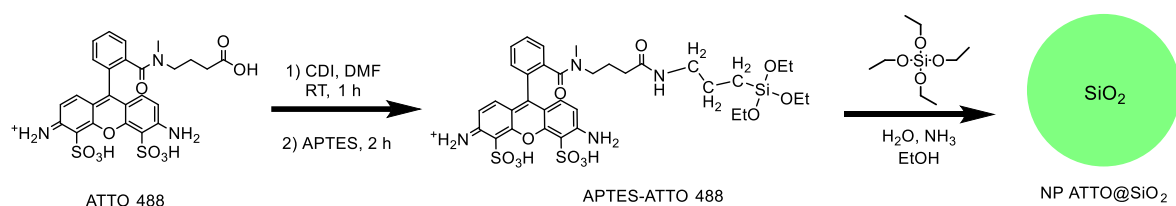
longitudes de onda de excitación: 580 nm para MB y 690 nm para Cy-Test. Rendijas de excitación y emisión: 1,8 mm. Para MB se utilizaron los filtros VG9 (excitación) y RG610 (emisión).

7.1.2 Otros sistemas en estudio: resultados preliminares

Colorantes comerciales como los de la familia de los llamados ATTO y los perilenos que se destacan por su gran fotoestabilidad. Con el objeto de disponer de marcadores fluorescentes de nanopartículas de sílice a distintas longitudes de onda sintetizamos nanopartículas de SiO₂ dopadas con diferentes colorantes. De acuerdo a las propiedades químicas del colorante se eligió un método de síntesis adecuado. Una vez obtenidas las nanopartículas se testeó la dependencia de la emisión del colorante encapsulado con el pH del medio, a fin de establecer su potencial uso como sondas de referencia en sensores de tipo autoreferenciados.

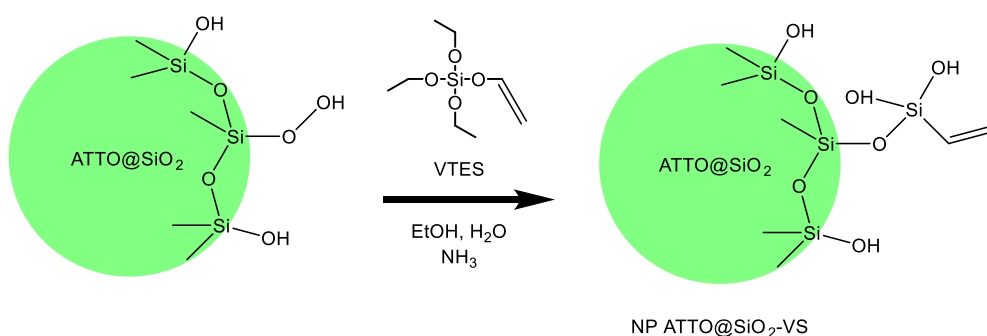
7.1.2.1 ATTO@SiO₂-COOH

Dado que el colorante ATTO 488 (Esquema 7-5) es una molécula orgánica con baja afinidad por la sílice, para obtener las nanopartículas de SiO₂ dopadas con dicha molécula optamos por una estrategia de co-condensación. Concretamente, en un primer paso (Esquema 7-5), a partir de ATTO 488 y APTES se obtuvo el derivado sililado del colorante (APTES-ATTO 488). Luego, el crudo de reacción se agregó a un medio de Stöber y se realizó la co-condensación con TEOS, para dar las NP ATTO@SiO₂ que encapsulaban el colorante (Capítulo 3).



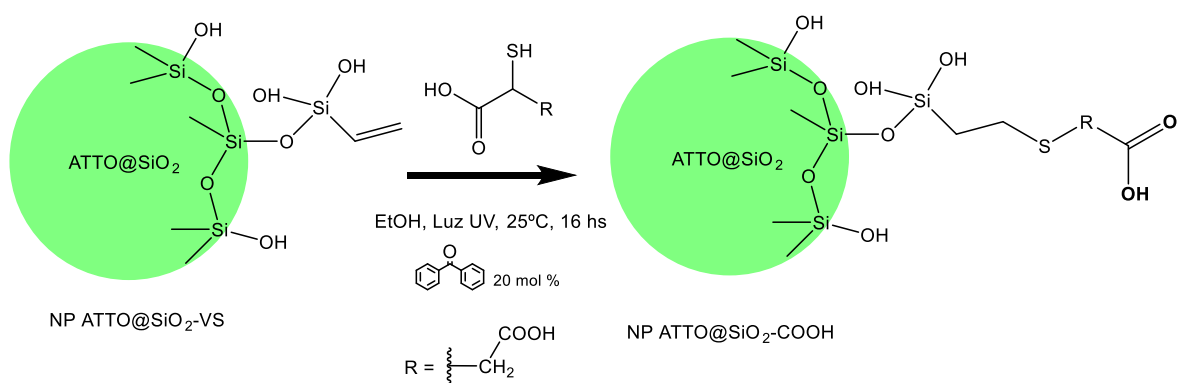
Esquema 7-5. Obtención del derivado silanizado de ATTO 488 (APTES-ATTO 488) y síntesis de NP ATTO@SiO₂ por co-condensación del derivado y TEOS en un medio de tipo Stöber.

El siguiente paso (Esquema 7-6) consistió en la funcionalización superficial de las NP ATTO@SiO₂ con viniltrietoxisilano para obtener las NP ATTO@SiO₂-VS, de acuerdo al protocolo descrito por Penelas *et al.*²⁴. Así, luego de síntesis, las NP se purificaron del amoníaco por destilación.



Esquema 7-6. Funcionalización de NP ATTO@SiO₂ con viniltrietoxisilano (VTES) para obtener NP ATTO@SiO₂-VS.

Una vez purificadas las NP ATTO@SiO₂-VS, se realizó una reacción de tipo “click tiol-eno” sobre la superficie, utilizando ácido mercaptosuccínico como reactivo, benzofenona como iniciador y luz UV.^{24,25} Se trata de una reacción de construcción C-C con la que se logra darle una funcionalidad ácido carboxílico a la superficie, que resulta clave para la buena dispersión de las nanopartículas y la estabilidad de los coloides.²⁴



Esquema 7-7. Reacción de funcionalización superficial con luz UV “click tiol-eno” para dar ATTO@SiO₂-COOH.

En la Figura 7-10 se muestra una micrografía de SEM de las nanopartículas funcionalizadas con ácido mercaptosuccínico, ATTO@SiO₂-COOH. Se observa que la morfología es de tipo esférica, con un diámetro de (84±12) nm.

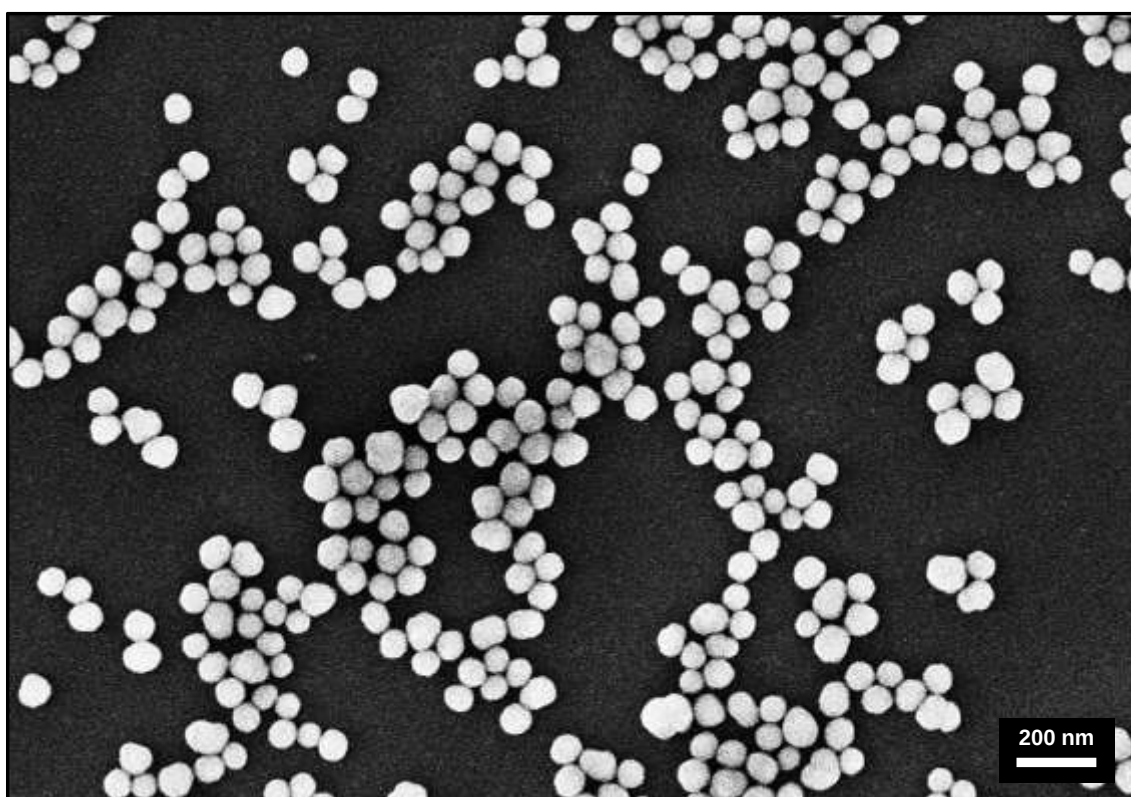


Figura 7-10. Micrografía de FE-SEM de las NP ATTO@SiO₂-COOH. El diámetro obtenido a partir de la imagen fue de (84±12) nm, N = 100.

Por otra parte, se evaluó la fotofísica de las NP ATTO@SiO₂-COOH, en particular la dependencia de su espectro de emisión con el pH del medio. Como puede verse en la Figura 7-11 A, el espectro de las NP en buffer PBS presenta un máximo de emisión a 518 nm para todos los pHs ensayados. En la Figura 7-11 B se observa que la emisión a 518 nm varía un 11% en el rango de pH ensayado, entre pH 5,68 y pH 8,9.

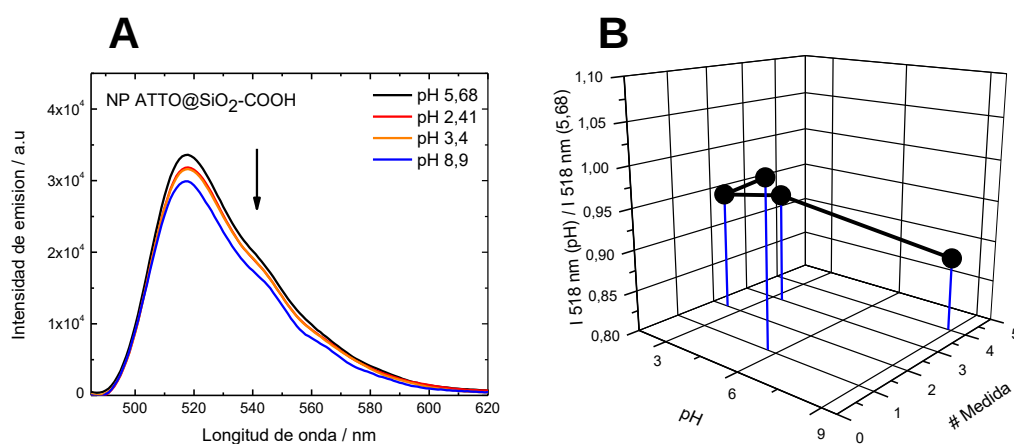
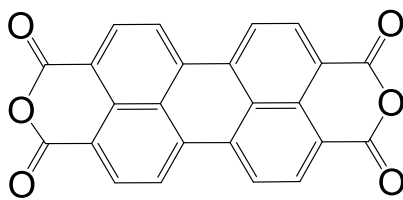


Figura 7-11. (A) Espectros de emisión de NP ATTO@SiO₂-COOH en buffer PBS 10 mM a pH: 5,68, 2,41, 3,4 y 8,9; (B) Dependencia de la emisión de las NP a 518 nm con el pH del medio, y de acuerdo al número de medida realizada.

7.1.2.2 PTCDA@SiO₂

El PTCDA (Perileno-3,4,9,10-tetracarboxílico di-anhídrido) es un colorante de la familia de los perilenos (Esquema 7-8), que se usa comúnmente como precursor en la síntesis de derivados de tipo imida. Dado su carácter hidrofóbico, la síntesis elegida para su encapsulación fue la de microemulsión inversa con co-condensación de TEOS y HDTMOS en iguales proporciones (Capítulo 3).



Esquema 7-8. Estructura del Perileno-3,4,9,10-tetracarboxílico di-anhídrido (PTCDA).

En la Figura 7-12 se muestra una imagen de TEM de las nanopartículas de tipo núcleo/cáscara obtenidas (PTCDA@SiO₂) por microemulsión inversa. El diámetro calculado a partir de varias imágenes fue de (44±7) nm.

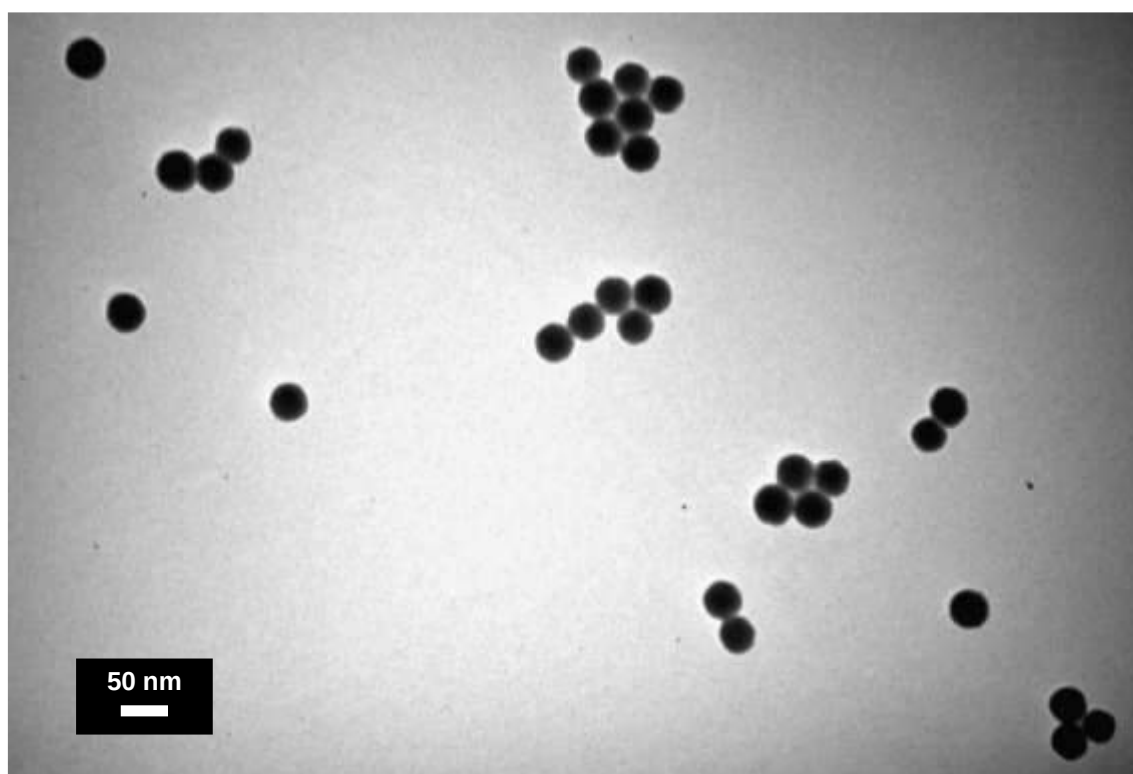


Figura 7-12. Imagen de TEM de NP PTCDA@SiO₂. El diámetro medido fue de (44±7) nm.

En la Figura 7-13 A se observa el espectro de emisión de las nanopartículas PTCDA@SiO₂ en suspensiones de distintos pHs. El máximo de emisión se encuentra a 597 nm y, como se ve en la Figura 7-13 B, la intensidad de emisión a 597 nm varía de pH 8,4 a pH 5,77 en, como máximo, un 2,5% (pH 6,36).

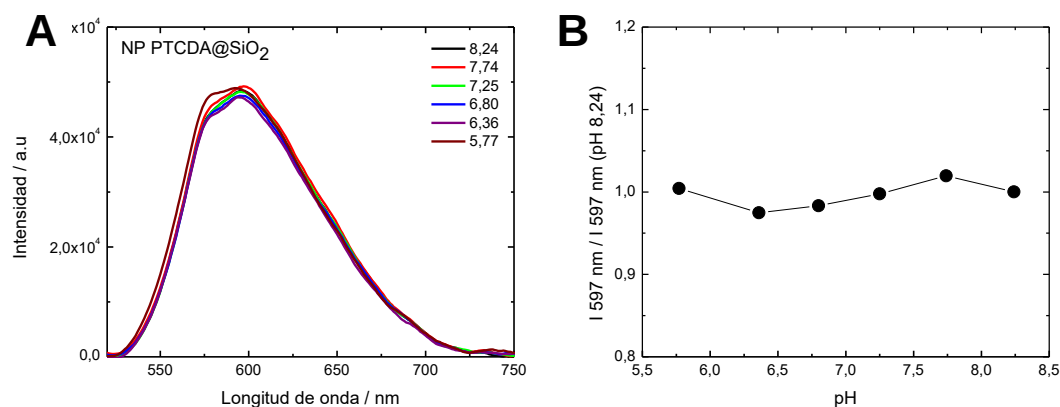


Figura 7-13. (A) Espectros de emisión de NP PTCDA@SiO₂ a distintos pHs (buffer PBS 10 mM); (B) Intensidades de emisión a 597 nm normalizadas a pH 8,24 (pH inicial) versus pH. λ_{exc} 480 nm.

7.2 Discusión

7.2.1 Nanopartículas duales [Ru(bpy)₃]²⁺@SiO₂-NH-CyPIP

En la Sección 7.1.1.1 vimos una forma de construir un nanosensor dual de pH basado en la incorporación de dos fluoróforos en el mismo objeto: [Ru(bpy)₃]²⁺ en lo que llamamos el núcleo de la partícula funciona como sonda de referencia, y **Cy-PIP** en la superficie actúa como sensor de pH.

En primer lugar, en cuanto a las propiedades ópticas de [Ru(bpy)₃]²⁺@SiO₂-NH₂, podemos decir que se observó un corrimiento hipsocrómico en el máximo de emisión (602-605 nm) en comparación con el colorante libre en solución de etanol (610 nm). Según lo reportado por Zhang *et al.*, el tiempo transcurrido entre el inicio de la reacción de Stöber y la adición de la solución del complejo de rutenio (II) se encuentra en íntima relación con las propiedades ópticas de las nanopartículas.²⁶ En concreto, los autores observaron que cuando el complejo se agregaba antes de las tres horas de reacción, se veía un desplazamiento hipsocrómico en el máximo de emisión de las NP respecto

del colorante libre, a la vez que aumentaba la intensidad de emisión con el agregado a las tres horas respecto del agregado a tiempo cero. Contrariamente, si el agregado se realizaba entre las tres y las ocho horas de reacción, ocurría un desplazamiento batocrómico y una baja en la intensidad de emisión respecto del sistema de tres horas de reacción. En nuestro caso, el colorante se agregó a las dos horas de reacción, de acuerdo al protocolo descrito por Mirenda *et al.*, quienes reportaron la síntesis de un nanotermómetro de SiO₂ que encapsulaba [Ru(bpy)₃]²⁺ y sufría un corrimiento hipsocrómico de su máximo de emisión respecto del colorante libre.²⁷ El desplazamiento al azul del máximo de emisión del complejo cuando se encuentra encapsulado la matriz de sílice es una evidencia de que el colorante está incorporado a la matriz, a la vez que puede atribuirse al fenómeno del “rigidocromismo”.²⁷⁻³⁰

Por otra parte, la síntesis de las semillas de sílice dopadas con [Ru(bpy)₃]²⁺ se eligió teniendo en cuenta que si el complejo se adiciona al inicio de la reacción de Stöber, ocurre la incorporación del colorante en forma de agregados, tal y como reportan Descalzo *et al.* para partículas que encapsulan [Ru(ophen)₃]²⁺.³¹ Esto disminuye el brillo de las nanopartículas y su tiempo de vida de fosforescencia, pues ocurre el auto-apagamiento de la emisión de los complejos de Ru(II).³² Sumado a ello, para prever el apagamiento de la emisión de la sonda por oxígeno, luego de la incorporación del colorante, se agregó una fina capa de sílice en la superficie como una primera barrera física al acceso de agentes de apagamiento.²⁷

Es importante destacar que las nanopartículas de sílice de tipo Stöber no pueden pensarse como esferas rígidas e impenetrables.³³ Se trata más bien de estructuras un tanto abiertas que permiten el transporte de iones.^{34,35} El modelo de la doble capa porosa se ha propuesto para tener en cuenta la singular y alta absorción de los contraiones en las interfaces de SiO₂ y agua.^{36,37} Mirenda *et al.* estudiaron el apagamiento del [Ru(bpy)₃]²⁺ inmovilizado en NP de SiO₂ por reacción con el catión orgánico metilviológeno (MV²⁺).²⁷ Determinaron que el

efecto de apagamiento en la intensidad de emisión del $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ era fuertemente dependiente del pH, a diferencia de lo que ocurre en solución, donde el apagamiento es independiente del pH del medio. A pH mayor que el punto isoeléctrico de las NP (aprox. 4), el apagamiento por MV^{2+} aumentaba marcadamente con el pH, lo cual, según los autores, y de acuerdo a la naturaleza electrostática de la adsorción de los iones en las nanopartículas de sílice, explicaría que los iones de carga positiva como MV^{2+} a pH básico logaran atravesar la capa de tipo gel de las nanopartículas. Así, a pH alcalino el apagamiento por MV^{2+} es importante, mientras que a pH ácido el efecto es menor.²⁷ En este sentido, es de esperar que cambiar el pH de la solución en la que están suspendidas las nanopartículas $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ afecte la proporción de grupos silanoles que se encuentran protonados respecto de los desprotonados, pues si las NP son permeables a MV^{2+} , también lo serán a H^+ , un catión muy pequeño. Dado que la interacción entre la matriz de sílice y el complejo de Ru(II) es de tipo electrostático, se espera que a pH más ácido esa interacción sea menor en promedio pues existe una mayor proporción de grupos silanoles protonados. Con ello, la proporción de agregados de complejos de rutenio que estuvieran presentes en la matriz de sílice podría disminuir, y así aumentar la intensidad de emisión en comparación con la que se observaría a un pH más alcalino. En nuestro caso, para las nanopartículas $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ se observó un aumento de 3,5% de la emisión en buffer PBS al disminuir el pH desde 8,74 a 5,68 (Sección 7.1.1.1.3.1).

Por su parte, el sistema dual $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}@\text{SiO}_2\text{-NH-Cy-PIP}$ presentó una variación en la intensidad de emisión del $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ menor al 3% de pH 8,68 a 5,77 al excitar a 460 nm, mientras que la variación total de **Cy-PIP** de pH 9,64 a 5,77 resultó de 43% (λ_{exc} 680 nm). Esto implica que la variación con el pH de la intensidad de emisión de la sonda de referencia representa un 7% respecto de la variación de **Cy-PIP**. Se trata de una variación pequeña y aceptable para este tipo de sistemas duales.

En cuanto al pK_a del nanosensor dual, vimos que era de $(7,8 \pm 0,2)$ si sólo se calculaba utilizando la emisión de **Cy-PIP** a 820 nm, y de $(8,1 \pm 0,5)$ si se utilizaba el cociente de las emisiones a 820 nm y a 605 nm. Ambos son valores mayores que el pK_a para **Cy-PIP** sonda libre (7,1). Como explicamos en el Capítulo 5 para **Cy-PIP@SiO₂** cuyo pK_a fue de 7,4, la superficie cargada de la sílice afecta las concentraciones de iones en sus cercanías. Así, la concentración de H^+ cerca de la superficie es mayor que en la solución *bulk*, dando como resultado que las sondas sensibles a pH puedan protonarse a un pH más alcalino de solución (el pH “efectivo” que perciben es menor).¹³

Por otra parte, en nuestro caso el cálculo del pK_a del sensor mediante el cociente de las emisiones a 820 nm y 605 nm resultó en un valor cercano al calculado sólo con la emisión de **Cy-PIP** a 820 nm. A diferencia del nanosensor de pH en la región visible del espectro electromagnético reportado por Xu *et al.*^{14,15}, nuestro sistema se excita a dos longitudes de onda y se colecta la emisión también a dos longitudes de onda, lo cual trae aparejadas complicaciones experimentales para aplicaciones a detección de pH intracelular. Si bien el sensor dual de pH que sintetizamos no puede considerarse autoreferenciado, **Cy-PIP** le otorga singularidad, ya que se trata de una sonda de diseño, con un gran corrimiento de Stokes y una respuesta fluorescente modulada por el pH que se encuentra completamente en el NIR.

7.2.2 Nanopartículas MB@SiO₂-NH-Cy-Test como plataforma para nanosensores autoreferenciados de pH

Si bien no se muestran los resultados, como primer ensayo control corroboramos que el MB en solución aireada de PBS experimenta una baja menor al 5% en su intensidad de emisión y en su absorbancia al ir de pH básico a ácido. Esa información, sumada al hecho de que el MB es una droga terapéutica aprobada por la FDA para el tratamiento de la

metahemoglobinemia, fue el punto de partida para pensar en la incorporación de MB como una sonda de referencia de pH.

En cuanto a las nanopartículas semilla núcleo-cáscara MB@SiO₂-ME-1-B, vimos que la variación en la intensidad de emisión a 650 nm era de un 9,2 % de pH 8,92 a 4,5. Para tener una idea de los órdenes de magnitud, y dado que la variación de la intensidad de emisión de **Cy-PIP** anclada en la superficie de nanopartículas de SiO₂ es de alrededor de 43% ([Ru(bpy)₃]²⁺@SiO₂-NH-Cy-PIP, Sección 7.1.1.1.3.2), podríamos predecir que la variación en la intensidad de emisión del MB con el pH en las NP duales representaría el 20% de la variación que experimentaría **Cy-PIP** si fuera unida a la superficie. Si bien este valor es alto, se trata de un punto a tener en cuenta y mejorar para el futuro desarrollo del nanosensor. Recordemos también que las NP MB@SiO₂-ME-1-B no producen ¹O₂ en cantidades medibles (Capítulo 6), lo cual es un requisito a la hora de pensar en la unión posterior de otras sondas fluorescentes.

Cabe destacar que las nanopartículas MB@SiO₂ sintetizadas por modificación del método de Stöber y aquellas sintetizadas por microemulsión con mayor carácter hidrofílico (MB@SiO₂-ME-2 y 3), presentaron una gran variación de la intensidad de emisión con el pH (mayor al 10%). Al momento de la escritura de esta tesis, seguimos trabajando en estudiar la influencia de las variables de síntesis en las propiedades fotofísicas finales de la sonda encapsulada. Dichas variables determinan el estado de agregación del colorante, su capacidad de producción de ¹O₂ y su permeabilidad a ciertos analitos. Tal y como reportan Deng *et al.*, el núcleo hidrofóbico de las nanopartículas con mayor proporción de HDTMOS podría comportarse como un obstáculo para el ingreso de iones que afecten la polaridad del medio material en el que está inmerso el MB.³⁸ Esta hipótesis podría explicar que el efecto del pH sobre la intensidad de emisión del MB en las NP con núcleo de carácter más hidrofóbico fuera menor que en el resto de los sistemas estudiados.

De acuerdo a los espectros de las sondas libres en solución de PBS (7.1.1.2.3), pudimos establecer que existe un solapamiento entre los espectros de absorción de MB y Cy-Test y que, entre 600 y 650 nm se puede excitar a ambas sondas a la vez. Luego se colectarían las emisiones del MB a 650 nm y de Cy-Test a 785 nm. La suspensión en buffer PBS de MB@SiO₂-ME-1-B-NH-CyTest no arrojó una intensidad de emisión apreciable al excitar en su máximo de absorción, a diferencia de lo que ocurrió en metanol. Las aminotricarbocianinas, como ya mencionamos en capítulos anteriores, poseen bajos rendimientos cuánticos de emisión en agua, a diferencia de lo que ocurre en solventes orgánicos. Es de esperar que la cantidad de Cy-Test unida a la superficie de las NP hay sido muy poca como para ser detectable en solución acuosa. Esto también es un punto clave a tener en cuenta para la construcción futura del nanosensor de pH con **Cy-PIP**.

7.2.3 Nanopartículas dopadas con fluoróforos comerciales

Los colorantes comerciales de la familia del ATTO son moléculas muy fotoestables, que se usan como alternativas superadoras de las sondas de tipo cianina (Cy3, Cy5) y Alexa para aplicaciones en microscopías confocal y de súper-resolución. En la Sección 7.1.2.1 presentamos resultados preliminares de la síntesis y caracterización fotofísica de nanopartículas que encapsulaban ATTO 488. La estrategia de funcionalización superficial con ácido mercaptosuccínico en un mismo reactor y utilizando luz UV (*one-pot photografting*) de acuerdo al protocolo reportado por Penelas *et al.* resulta muy conveniente ya que permite agregar a la superficie la función -COOH, lo cual aumenta la estabilidad coloidal, a la vez que se minimizan los procesos de agregación y aglomeración durante todos los pasos de síntesis.²⁴ Este aspecto es de suma importancia si las nanopartículas están diseñadas para seguir procesos de agregación/adsorción o funcionan como nanopartículas

fluorescentes. La química de la superficie de las nanopartículas determina su interacción con biomoléculas y su destino biológico (por ejemplo, la formación de la conocida corona proteica).³⁹ Las nanopartículas ATTO488@SiO₂-COOH pueden funcionalizarse con moléculas de interés biológico (ej. ácido fólico) mediante el uso de espaciadores adecuados (de tipo PEG) y con otras sondas fluorescentes por ejemplo **Cy-PIP**. Al momento de la escritura de esta tesis, se continúa trabajando en esta línea de investigación, que implica también el uso de técnicas como Espectroscopía de correlación de fluorescencia para (FCS) seguir procesos celulares en el tiempo.

En cuanto a la respuesta de las nanopartículas con el pH, vimos que la variación era de un 11% entre pH 5,68 y pH 8,9. Dado que se trata de una variación moderada, y que la absorción y la emisión del ATTO 488 se encuentran en la región visible del espectro electromagnético, no se podría construir un nanosensor autoreferenciado de pH (casos a-c) incorporando **Cy-PIP** en la superficie. Por lo tanto, ATTO 488 se piensa más como una sonda fotoestable que permite localizar a las nanopartículas en aplicaciones de microscopía. También ofrecería la posibilidad de construir un nanosensor dual en conjunto con una cianina de la familia de **Cy-PIP** que actuara por un mecanismo de tipo FRET.

Por otra parte, en la Sección 7.1.2.2, vimos que la encapsulación de PTCDA en matrices de sílice por síntesis de microemulsión inversa con un silano hidrofóbico (HDTMOS) es posible, y que las nanopartículas resultantes tienen un máximo de emisión a 597 nm, muy cerca de la región del NIR. Por su parte, la variación de la intensidad de emisión a 597 nm de pH 8,4 a 5,77 resultó menor al 2,5%. Asimismo, de acuerdo al espectro de excitación (no se mostró), las NP PTCDA@SiO₂ pueden ser excitadas hasta a 600 nm, con lo cual se podría pensar en la unión de **Cy-PIP** a la superficie para la construcción de un sensor autoreferenciado de pH.

7.3 Conclusiones

Hemos reportado la síntesis y caracterización de una variedad de nanopartículas de SiO₂ que encapsulan diferentes sondas fluorescentes como plataformas para el desarrollo de nanosensores duales o autoreferenciados de pH. En particular, el sistema que encapsula MB como sonda de referencia y está funcionalizado en la superficie con una molécula derivada de las aminotricarbocianinas (Cy-Test) resulta un punto de partida interesante para la construcción futura de nanopartículas completamente de NIR y autoreferenciadas con el enfoque de utilizar una única longitud de onda de excitación y medir el cociente de la emisiones a dos longitudes de onda (la del MB y la de la cianina).

7.4 Referencias

1. Bright, G. R., Fisher, G. W., Rogowska, J. & Taylor, D. L. Fluorescence ratio imaging microscopy: Temporal and spatial measurements of cytoplasmic pH. *J. Cell Biol.* **104**, 1019–1033 (1987).
2. Grant, R. L. & Acosta, D. Ratiometric measurement of intracellular pH of cultured cells with BCECF in a fluorescence multi-well plate reader. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* **33**, 256–260 (1997).
3. Macdonald, V. W., Keizer, J. H. & Jöbsis, F. F. Spectrophotometric measurements of metabolically induced pH changes in frog skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* **184**, 423–430 (1977).
4. Thomas, J. A., Buchsbaum, R. N., Zimniak, A. & Racker, E. Intracellular pH Measurements in Ehrlich Ascites Tumor Cells Utilizing Spectroscopic Probes Generated in Situ. *Biochemistry* **18**, 2210–2218 (1979).
5. Heiple, J. M. & Lansing Taylor, D. Intracellular pH in single motile cells. *J. Cell Biol.* **86**, 885–890 (1980).
6. Ohkuma, S. & Poole, B. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**, 3327–3331 (1978).
7. Tanasugarn, L., McNeil, P., Reynolds, G. T. & Taylor, D. L. Microspectrofluorometry by digital image processing: Measurement of cytoplasmic pH. *J. Cell Biol.* **98**, 717–724 (1984).
8. Schäferling, M. Nanoparticle-based luminescent probes for intracellular sensing and imaging of pH. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **8**, 378–413 (2016).
9. Seksek, O., Henry-Toulmé, N., Sureau, F. & Bolard, J. SNARF-1 as an intracellular pH indicator in laser microspectrofluorometry: A critical assessment. *Anal. Biochem.* **193**, 49–54 (1991).

10. Golda-VanEeckhoutte, R. L., Roof, L. T., Needoba, J. A. & Peterson, T. D. Determination of intracellular pH in phytoplankton using the fluorescent probe SNARF with detection by fluorescence spectroscopy. *J. Microbiol. Methods* **152**, 109–118 (2018).
11. Myochin, T. *et al.* Rational design of ratiometric near-infrared fluorescent pH probes with various pK_a values, based on aminocyanine. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 3401–3409 (2011).
12. Page, L. E., Zhang, X., Jawaid, A. M. & Snee, P. T. Detection of toxic mercury ions using a ratiometric CdSe/ZnS nanocrystal sensor. *Chem. Commun.* **47**, 7773–7775 (2011).
13. Zhang, F. *et al.* Ion and pH sensing with colloidal nanoparticles: influence of surface charge on sensing and colloidal properties. *Chemphyschem* **11**, 730–735 (2010).
14. Xu, J., Liang, J., Li, J. & Yang, W. Multicolor Dye-Doped Silica Nanoparticles Independent of FRET. **26**, 15722–15725 (2010).
15. Xu, J. *et al.* FITC and [Ru(phen)₃]²⁺ co-doped silica particles as visualized ratiometric pH indicator. *Nanoscale Res. Lett.* **6**, 1–7 (2011).
16. Burns, A., Sengupta, P., Zedayko, T., Baird, B. & Wiesner, U. Core/shell fluorescent silica nanoparticles for chemical sensing: Towards single-particle laboratories. *Small* **2**, 723–726 (2006).
17. Doussineau, T., Smaïhi, M. & Mohr, G. J. Two-dye core/shell zeolite nanoparticles: A new tool for ratiometric pH measurements. *Adv. Funct. Mater.* **19**, 117–122 (2009).
18. Allard, E. & Larpent, C. Core-shell type dually fluorescent polymer nanoparticles for ratiometric pH-sensing. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **46**, 6206–6213 (2008).
19. Hornig, S. *et al.* Biocompatible fluorescent nanoparticles for pH-sensing. *Soft Matter* **4**, 1169–1172 (2008).
20. Schulz, A., Wotschadlo, J., Heinze, T. & Mohr, G. J. Fluorescent

- nanoparticles for ratiometric pH-monitoring in the neutral range. *J. Mater. Chem.* **20**, 1475–1482 (2010).
21. Rampazzo, E., Genovese, D., Palomba, F., Prodi, L., Zaccheroni, N. NIR Fluorescent Dye Doped Silica Nanoparticles for in vivo imaging, sensing and theranostic. *Methods Appl. Fluoresc.* 022002 (2018). doi:<https://doi.org/10.1088/2050-6120/aa8f57>
 22. Stöber, W., Fink, A., Bohn, E. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *J. Colloid Interface Sci.* **26**, 62–69 (1968).
 23. Bele, M., Siiman, O. & Matijević, E. Preparation and flow cytometry of uniform silica-fluorescent dye microspheres. *J. Colloid Interface Sci.* **254**, 274–282 (2002).
 24. Penelas, M. J., Soler-Illia, G. J. A. A., Levi, V., Bordoni, A. V. & Wolosiuk, A. Click-based thiol-ene photografting of COOH groups to SiO₂ nanoparticles: Strategies comparison. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **562**, 61–70 (2019).
 25. Bordoni, A. V., Lombardo, M. V. & Wolosiuk, A. Photochemical radical thiol-ene click-based methodologies for silica and transition metal oxides materials chemical modification: A mini-review. *RSC Advances* **6**, (2016).
 26. Zhang, D. *et al.* Tuning the emission properties of Ru(phen)₃²⁺ doped silica nanoparticles by changing the addition time of the dye during the stöber process. *Langmuir* **26**, 6657–6662 (2010).
 27. Mirenda, M. *et al.* Temperature response of luminescent tris(bipyridine)ruthenium(II)-doped silica nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **392**, 96–101 (2013).
 28. Innocenzi, P., Kozuka, H. & Yoko, T. Fluorescence Properties of the Ru(bpy)₃²⁺ Complex Incorporated in Sol–Gel-Derived Silica Coating Films. *J. Phys. Chem. B* (1997). doi:10.1021/jp970004z
 29. Van Houten, J. & Watts, R. J. Temperature Dependence of the Photophysical and Photochemical Properties of the Tris(2,2'-

- bipyridyl)ruthenium(II) Ion in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 4853–4858 (1976).
30. Matsui, K. & Momose, F. Luminescence Properties of Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) in Sol-Gel Systems of SiO₂. *Chem. Mater.* **9**, 2588–2591 (1997).
 31. Descalzo, A. B., Somoza, C., Moreno-Bondi, M. C. & Orellana, G. Luminescent core-shell imprinted nanoparticles engineered for targeted Förster resonance energy transfer-based sensing. *Anal. Chem.* **85**, 5316–5320 (2013).
 32. López-Gejo, J., Haigh, D. & Orellana, G. Relationship between the microscopic and macroscopic world in optical oxygen sensing: A luminescence lifetime microscopy study. *Langmuir* **26**, 2144–2150 (2010).
 33. Costa, C. A. R., Leite, C. A. P. & Galembeck, F. Size Dependence of Stöber Silica Nanoparticle Microchemistry. *J. Phys. Chem. B* **107**, 4747–4755 (2003).
 34. Walcarius, A., Despas, C. & Bessière, J. Molecular sieving with amorphous monodisperse silica beads. *Microporous Mesoporous Mater.* **23**, 309–313 (1998).
 35. Despas, C., Walcarius, A. & Bessière, J. Influence of the base size and strength on the acidic properties of silica gel and monodispersed silica beads: Interest of impedance measurements for the in situ monitoring of the ionization process. *Langmuir* **15**, 3186–3196 (1999).
 36. Th.F.Tadros, J. L. Adsorption of potential-determining ions at the silica-aqueous electrolyte interface and the role of some cations. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **17**, 267–275 (1968).
 37. Wright, H. J. L., Hunter, R. J. Adsorption at Solid- Liquid Interfaces II. *Aust.J.Chem.* 1191–1206 (1973).
 38. Deng, T., Li, J. S., Jiang, J. H., Shen, G. L. & Yu, R. Q. Preparation of near-IR fluorescent nanoparticles for fluorescence- anisotropy-based

immunoagglutination assay in whole blood. *Adv. Funct. Mater.* (2006).
doi:10.1002/adfm.200600149

39. Silvestri, A. *et al.* Influence of surface coating on the intracellular behaviour of gold nanoparticles: A fluorescence correlation spectroscopy study. *Nanoscale* **9**, 14730–14739 (2017).

8 Conclusiones generales y perspectivas

El presente trabajo de tesis se ha centrado en el desarrollo de nuevos nanomateriales fluorescentes a base de sílice y fluoróforos orgánicos (SiO₂-F NP) para aplicación como agentes de visualización (por ejemplo en microscopías) y como sensores para la detección de pH intracelular. En este sentido, fue necesario desarrollar la ruta de síntesis orgánica de la molécula sensora de pH (Cy-PIP), llevar a cabo las síntesis de las NP de sílice adaptadas de acuerdo a la estrategia de unión proyectada para el/los fluoróforos, realizar la caracterización fotofísica y, en algunos casos, fotoquímica de los materiales y desafiarlos en sistemas biológicos para validar su aplicación. Cabe destacar que, si bien el campo de la síntesis de SiO₂-F NP para aplicaciones teranósticas y de sensado es muy vasto, hay pocos ejemplos de sistemas que se sean capaces de ser excitados con luz de NIR. Por lo tanto, esta tesis se ha enfocado en la construcción de nanosensores de SiO₂-F NP que utilizan luz en esa “ventana biológica” del espectro electromagnético.

En primer lugar, en el Capítulo 4, se describió la síntesis (escala de los cientos de mg) de una nueva aminotricarbocianina simétrica específica con doble funcionalidad (Cy-PIP). Una de sus funciones (N-metilpiperazina) se comporta como el receptor de la molécula y otorga capacidad sensora de pH. La otra función (-COOH) ofrece un sitio de anclado a una superficie, a la vez que aumenta la solubilidad en agua de la molécula. Hemos visto que las tricarbocianinas conforman una familia de fluoróforos muy convenientes no sólo por sus propiedades ópticas sino también porque ofrecen la posibilidad de construir precursores versátiles de síntesis (Cy-Cl) que luego pueden hacerse reaccionar con múltiples nucleófilos para obtener aminotricarbocianinas diferentes. Por lo tanto, se pueden construir diferentes fluoróforos de la misma

familia cambiando la identidad de la amina que se utiliza para sustituir al átomo de cloro en la posición *meso* de la tricarbocianina. Más aún, como perspectiva, se podría generar una librería de aminotricarbocianinas para cada precursor colorado y elegir la molécula adecuada según la aplicación proyectada.

En cuanto a la fotofísica de Cy-PIP, podemos decir que, como está reportado para otras aminotricarbocianinas, Cy-PIP mostró un excepcional corrimiento de Stokes (140 nm) en comparación con su precursor clorado (14 nm), muy probablemente debido a un mecanismo de tipo ICT (Transferencia intramolecular de carga). Este gran corrimiento de Stokes es muy relevante ya que permite disminuir los efectos de la dispersión de luz y facilita la separación de la radiación de excitación y emisión, lo cual resulta clave en técnicas de microscopía de fluorescencia para estudio de sistemas *in vivo*. Por otra parte, se estudió la respuesta fotofísica de Cy-PIP frente a cambios de pH, tanto por absorbancia como por fluorescencia (intensidad de emisión). Los valores de pK_a obtenidos mediante los dos métodos (6,9 por absorbancia y 7,1 por fluorescencia) se encontraron en concordancia entre sí, y dentro de un rango óptimo (6-8) para su aplicación a la detección de pH en sistemas biológicos. Asimismo, si bien se realizó una caracterización exhaustiva de la sonda sensora de pH, no se pudo establecer un mecanismo para su comportamiento frente a los cambios en dicha propiedad. Si bien las medidas de fluorescencia resueltas en el tiempo parecieran indicar que existe una única especie fluorescente (la especie alcalina de la molécula), se deben realizar más experimentos para racionalizar el comportamiento de Cy-PIP frente al pH. Dichos experimentos podrían llevarse a cabo en solventes orgánicos para aumentar el rendimiento cuántico de fluorescencia de Cy-PIP que en solución acuosa es muy bajo, lo cual impone una limitación experimental a los estudios.

El Capítulo 5 estuvo orientado al desarrollo de un nanosensor fluorescente de pH (Cy-PIP@SiO₂). Así, se describió la síntesis de dicho

nanosensor de pH por conjugación directa de Cy-PIP a la superficie de nanopartículas de SiO₂ funcionalizadas con el grupo aminopropilo. Se caracterizó adecuadamente el material y se estableció mediante espectroscopía FTIR que la funcionalización implicó la formación de un enlace amida y la unión covalente de Cy-PIP a la superficie. Por otra parte, se realizó la caracterización fotofísica de Cy-PIP@SiO₂ y se discutió el cambio en las propiedades ópticas al pasar de la molécula libre al material. Se observó un corrimiento batocrómico muy pequeño del espectro de emisión y un pK_a (por fluorescencia) de 7,4, es decir, 0,3 unidades de pH por encima del valor de Cy-PIP libre. Esta diferencia se racionalizó en términos de la presencia de la superficie, que impone un microentorno diferente al fluoróforo. En particular, Cy-PIP se encuentra muy cerca de la superficie de la nanopartícula (cargada negativa), allí la concentración local de H⁺ es mayor que en la solución *bulk* y Cy-PIP anclada a la superficie podría protonarse a un pH de solución *bulk* más alcalino que la sonda libre, lo que redundaría en un valor más alto de pK_a.

En una segunda parte del Capítulo 5 se describió la aplicación del nanosensor de pH Cy-PIP@SiO₂ a un sistema biológico real. Mediante la internalización del nanomaterial en células tumorales HeLa se pudo establecer la potencia de estos materiales para la medición de pH en entornos micro/nanométricos muy complejos. Las mediciones de citometría de flujo permitieron seguir la emisión de la nanosonda en las células HeLa *in vivo*, y observar cómo a medida que evolucionaba el tiempo luego de la internalización, la emisión de la población celular más fluorescente disminuía, en línea con lo esperado para un proceso de fusión endosoma-lisosoma.

Más adelante, en el Capítulo 6, se reportó la síntesis por distintos métodos y la caracterización de una variedad de NP que encapsulaban azul de metileno (MB) en su matriz. MB es un colorante catiónico de NIR, aprobado por la FDA para el tratamiento de la metahemoglobinemia y conocido por su rol como fotosensibilizador (PS). Se estableció que el método de síntesis de las NP

ejerce un rol preponderante en las características fotofísicas y fotoquímicas del colorante. En particular, se observó que si el material tenía una proporción mayoritaria de moléculas de MB en forma de agregados, la producción de $^1\text{O}_2$ estaba limitada y en muchos casos se encontraba por debajo del límite de detección de la medición con el monitor químico DPBF. Uno de los sistemas obtenidos por síntesis en microemulsión inversa con TX-100 como surfactante presentó un excepcional rendimiento cuántico de formación de $^1\text{O}_2$ ($\Phi_{\Delta} = 0,44$). Si bien se deben realizar más ensayos para establecer las condiciones óptimas para el fino control de las propiedades ópticas de las NP (en particular, controlar la proporción de agregados de MB encapsulados), el sistema desarrollado resulta muy prometedor para proyectar aplicaciones en terapia fotodinámica (PDT). Por otra parte, los sistemas que no mostraron producción de $^1\text{O}_2$ fueron adaptados a la construcción de nano-herramientas fluorescentes integradas más complejas, como mencionaremos a continuación.

En vista del conocimiento adquirido en los capítulos anteriores, en el Capítulo 7 se presentaron resultados preliminares de la síntesis y caracterización de plataformas para el desarrollo de nanopartículas fluorescentes avanzadas de SiO_2 ($\text{SiO}_2\text{-F NP}$) y nanosensores autoreferenciados de pH. Las medidas autoreferenciadas resultan ventajosas en comparación con las medidas a una única longitud de onda. Se logró colocar dos sondas fluorescentes en el mismo nano-objeto, mediante la manipulación adecuada de las variables de síntesis.

Uno de los sistemas sintetizados incluyó $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}]$ en el interior de la NP como sonda de referencia de pH y Cy-PIP en la superficie como molécula sensora. La respuesta de estas NP duales como sensor de pH fue buena ya que la sonda de referencia mostró una variación muy pequeña con el pH (7%) en comparación con Cy-PIP. Asimismo, se obtuvo un pK_a de 8,1 (para los cocientes de emisión de Cy-PIP y el complejo de Ru(II) , $I(820\text{nm})/I(605\text{ nm})$). Nuevamente, la superficie jugó un rol preponderante en el pK_a del nanosensor,

como ya habíamos observado para Cy-PIP@SiO₂. Creemos que en este caso la influencia de la superficie es aún mayor porque la densidad de funcionalización con Cy-PIP fue menor (se empleó ~10 veces menos). En este sentido, los estudios de optimización de la cantidad adecuada de Cy-PIP para funcionalizar la superficie estuvieron limitados por la disponibilidad de esta molécula que, si bien posee una síntesis versátil, es de diseño y su construcción y purificación requiere de un tiempo considerable de trabajo.

El otro sistema estudiado en el Capítulo 7 contenía MB en el núcleo de la NP y una aminotricarbocianina (Cy-Test) en la superficie. Dicho sistema constituye una prueba de concepto de la posibilidad del confinamiento de MB y Cy-Test en la misma estructura, como paso previo a la construcción de un nanosensor autoreferenciado de pH con dos fluoróforos de NIR. Como perspectiva, se incluye la unión de Cy-PIP en lugar de Cy-Test a la superficie de las NP y el desafío de dicho sistema para detecciones autoreferenciadas de pH en células.

Si bien se han reportado los resultados más relevantes de esta tesis, el trabajo también incluyó otras líneas de investigación, complementarias a las mostradas. En una estadía de investigación en el CIC biomaGUNE (País Vasco) se abordó la síntesis de polímeros derivados de PEG y ácido fólico (FA), una molécula de relevancia biológica dada la sobre-expresión de sus receptores en células animales tumorales. Estos polímeros se sintetizaron con el fin de ser unidos a SiO₂-F NP y así darle especificidad al nano-objeto para la incorporación en células tumorales en comparación con células sanas, algo muy buscado en terapias para tratamiento de cáncer. También se realizaron experimentos de Espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) para estudiar los fenómenos de agregación de los coloides en membranas celulares. Una perspectiva interesante consiste en integrar en el mismo nano-objeto a base de sílice las diversas funciones a las que nos hemos referido: sonda de referencia de pH, molécula sensora de pH (Cy-PIP), polímeros de PEG y ácido

fólico de diferentes longitudes de cadena, entre otras. Así, se tendría un sistema realmente integrado fluorescente en el NIR, que sentaría las bases para construir una librería de materiales para aplicaciones teranósticas, como se muestra en la Figura 8-1.

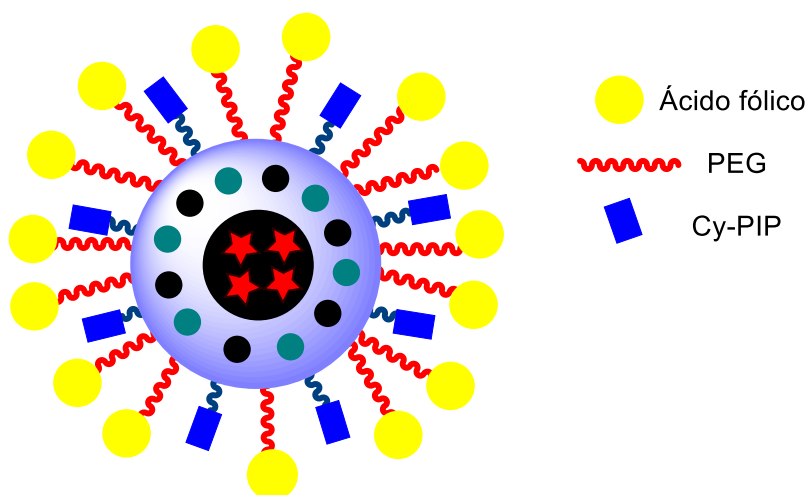


Figura 8-1. Nanopartículas multifuncionales fluorescentes de SiO₂.

Parte del trabajo descrito en esta tesis ha dado lugar a la publicación de un artículo en una revista científica¹ y también se ha compartido con la comunidad científica en cinco Congresos.

1. Toum Terrones, Y. *et al.* A silica supported tricyanocyanine based pH nanosensor with a large Stokes shift and a near infrared fluorescence response: Performance in vitro and in live cells. *J. Mater. Chem. B* (2017). doi:10.1039/c7tb00622e