



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO**  
**EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**ESTUDIO DE LA TRANSFERENCIA DE ENERGÍA INTRAMOLECULAR  
ENTRE UN CROMÓFORO DONADOR Y UNA CIANINA FLUORESCENTE.**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

**Q. ANDRÉS ARROYO PIECK**

TUTOR

**DR. JORGE PEÓN PERALTA**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**

**MÉXICO, D.F., JUNIO DEL 2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Química.

Al CONACyT por la beca otorgada, número de becario: 273459.

Al Dr. Jorge Peón, por todo su apoyo, sus enseñanzas y su interés en mi formación académica.

A los integrantes del jurado:

Dr. Miguel Costas Basín,

Dr. Mayo Villagrán Muniz,

Dra. María del Pilar Carreón Castro,

Dr. Ernesto Rivera García,

Dr. Fernando Cortés Guzman.

por sus comentarios y correcciones que ayudaron a mejorar este trabajo.

A mis compañeros: Gilma Granados, César Guarín, Rafael López, Luis Gutiérrez, Oscar Herrera, Vianey Salas, Jesús Rodríguez.

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Espectroscopia Láser del Instituto de Química de la UNAM.

*A mi familia.*

# Resumen

Es posible modificar las propiedades ópticas de una molécula al cambiar su estructura, modulando su comportamiento y permitiendo diseñar nuevos compuestos para usos específicos. Sin embargo, cada cambio en la estructura suele afectar varias propiedades simultáneamente, por lo que es común que existan dificultades al intentar optimizar una molécula al modificarla, ya que se puede disminuir o perder otra propiedad de interés, o incluso puede llegar a aparecer una propiedad indeseada.

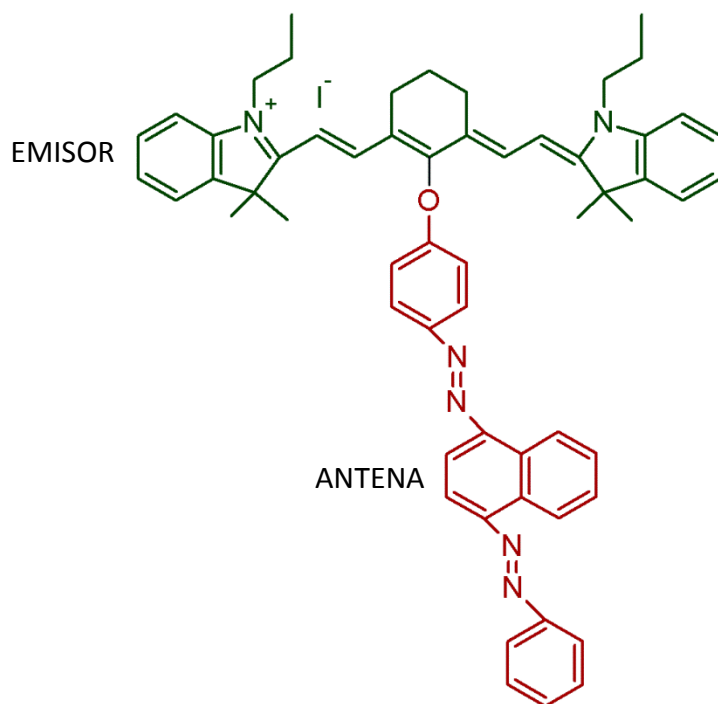
Una forma de ganar grados de libertad en la modificación de los cromóforos es sintetizar estas moléculas de tal forma que presenten subestructuras independientes, cada una responsable de distintas propiedades de interés, permitiendo modificar una propiedad en particular sin afectar a las demás. En específico, nuestro objetivo en este trabajo es modificar la estructura de cianinas que emiten fluorescencia en el infrarrojo cercano uniéndoles otros cromóforos que presenten bandas de absorción en la región del visible sin afectar la emisión en el infrarrojo.

Para que estos nuevos cromóforos funcionen se requiere que la energía se transfiera entre las subestructuras de la molécula, de tal forma que la energía de los fotones absorbidos por una de las subestructuras, la antena, sea transferida de manera no radiativa a otra, el emisor, ya sea de manera directa o a través de subestructuras intermedias. Este cromóforo presentará un pseudo-corrimiento de Stokes, que puede ser de decenas o centenas de nanómetros, dependiendo de las características de los fragmentos de la molécula y el número de los mismos.

Al proceso de agregar bandas de absorción a un emisor por medio de transferencia de energía se le conoce como sensibilización y depende de la distancia entre los cromóforos, su orientación relativa y el traslape espectral entre la emisión de la antena y la absorción del emisor.

En esta tesis se busca que un cromóforo diseñado presente emisión en el infrarrojo y un amplio corrimiento de Stokes, debido a que estas son propiedades útiles en la microscopía de fluorescencia, la cual sería la principal aplicación de los mismos. Ambas propiedades incrementan la sensibilidad en la detección, al tiempo que nos permiten modificar la región de excitación de la muestra.

En el presente estudio se modificó una cianina que absorbe y emite en el infrarrojo, con un máximo de emisión alrededor de 800 nm, uniéndole un cromóforo antena que absorbe en el visible, alrededor de 425 nm. El cromóforo antena usado es interesante debido a que presenta fotoisomerización, lo que nos permite analizar la posibilidad de utilizar antenas que presenten tiempos de vida cortos, así como estudiar los cambios que se presentan en la fotoisomerización de la misma al unirse a la cianina, debido a que esta propiedad puede resultar de interés para otras aplicaciones.



Estructura de la molécula DO-IR sintetizada en este trabajo.

Se comprobó que la molécula sintetizada presenta transferencia de energía intramolecular entre los fragmentos de la misma. Se midieron sus propiedades y se analizaron los cambios que presentan respecto a las propiedades de los reactivos, encontrando que se mantienen las características de interés de ambos fragmentos, con pequeñas variaciones que se pueden atribuir a los cambios en los grupos funcionales al formar el enlace entre ellos.

Por medio de técnicas de espectroscopia con resolución temporal, suma de frecuencias y conteo de fotones individuales, se midió la cinética de la transferencia de energía intramolecular, así como de la desactivación del estado excitado de la antena y el emisor.

La constante de velocidad de la transferencia de energía intramolecular medida fue mayor a  $3.43 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$ , por lo que puede competir cinéticamente con la desactivación de la antena, cuya constante es mayor a  $5 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$ . Esto nos indica que es posible utilizar cromóforos con tiempos de vida muy cortos como antenas, dándonos mayor libertad en la selección de fragmentos útiles en el diseño de moléculas análogas a la sintetizada.

Los resultados obtenidos demuestran que los cromóforos propuestos son viables, incluso cuando existen canales de isomerización en la antena y sirven como base para nuevos estudios que busquen optimizar la sensibilización de la antena con diferentes precursores, así como para ampliar las aplicaciones de estos cromóforos utilizando antenas que funcionen como “switches” moleculares.

## Glosario de Acrónimos y Abreviaturas

$\beta$ -BBO	Beta Borato de Bario
$\Phi_F$	Rendimiento cuántico de fluorescencia
CFD	“Constant Fraction Discriminator”, discriminador de fracción constante
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
DMF	N, N- dimetilformamida
DO13	“Disperse Orange 13”, naranja disperso 13, 4-[4-(fenilazo)-1-naftilazo] fenol
DO-IR	Producto de la reacción entre DO13 y la IR780. Yoduro de 2-[2-[2-[4-[4-(fenilazo)-1-naftilazo] fenoxi]-3-[(1,3-dihidro-3,3-dimetil-1-propil-2H-indol-2-ilideno)etilideno]-1-ciclohexen-1-il]etenil]-3,3-dimethyl-1-propil indol
EET	“Electronic Energy Transfer”, transferencia de energía electrónica
Et <sub>3</sub> N	Trietilamina
FWHM	“Full Width at Half Maximum”, ancho a la mitad del máximo.
H <sup>1</sup> -RMN	Espectro de protón de resonancia magnética nuclear
IR	Infrarrojo
IR780	Yoduro de 2-[2-[2-Cloro-3-[(1,3-dihidro-3,3-dimetil-1-propil-2H-indol-2-ilideno)etilideno]-1-ciclohexen-1-il]etenil]-3,3-dimethyl-1-propil indol
MeOH	Metanol
PGA	“Programable Gain Amplifier”, amplificador de ganancia programable
RMN	Resonancia magnética nuclear
TAC	“Time to Amplitude Converter”, convertidor de tiempo a amplitud
TCSPC	“Time Correlated Single Photon Counting”, conteo de fotones individuales correlacionado en tiempo
UV	Ultravioleta
Vis	Visible



# Índice

1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	4
2.1 General.....	4
2.2 Específicos.....	4
3. Antecedentes.....	5
3.1 Interacción de la Luz con la Materia.....	5
3.2 Procesos de Desactivación de Estados Excitados.....	6
3.2.1 Transferencia de Energía.....	9
3.2.2 Fotoisomerización en Azocompuestos.....	14
3.2.3 Cinética de los Procesos de Desactivación.....	15
3.3 Cianinas.....	17
3.4 Espectroscopia Estática.....	19
3.4.1 Rendimiento de Fluorescencia.....	19
3.5 Espectroscopia con Resolución Temporal.....	20
3.5.1 Generación de Pulsos Ultracortos.....	20
3.5.2 Amplificador Regenerativo.....	24
3.5.3 Generación de Segundo Harmónico.....	27
3.5.4 Resolución de Fluorescencia por Suma de Frecuencias.....	28
3.5.5 Time Correlated Single Photon Counting (TCSPC).....	31
4. Metodología.....	34
4.1 Síntesis del producto DO-IR.....	34
4.2 Espectroscopía Estática.....	35
4.3 Espectroscopía con Resolución Temporal.....	35
5. Resultados y Discusión.....	39
5.1 Síntesis de DO-IR.....	39
5.2 Espectroscopia Estática.....	42

5.2.1 Espectros de Absorción .....	43
5.2.2 Espectros de Fluorescencia .....	46
5.2.3 Rendimientos Cuánticos de Fluorescencia .....	51
5.3 Espectroscopia con Resolución Temporal .....	55
5.4 Transferencia de Energía .....	58
6. Conclusiones .....	62
7. Referencias .....	64

# 1. Introducción

La microscopía óptica es una de las herramientas más importantes de la ciencia. En el área biológica ha tenido un gran impacto, ya que nos ha permitido observar de manera directa y no invasiva los sistemas celulares, ayudándonos a comprender mejor el mundo a nuestro alrededor.

Se han dado grandes avances en la misma, siendo uno de los más importantes el desarrollo de la microscopía de fluorescencia. En esta técnica se excita una muestra, irradiándola con luz para detectar la emisión de las moléculas al regresar a su estado basal. Debido a que la longitud de onda de detección es diferente a la de excitación, las imágenes obtenidas tienen un mejor contraste y una mayor sensibilidad.

Conforme se ha mejorado la técnica, se ha logrado aumentar su sensibilidad, al punto de que es posible detectar moléculas individuales, permitiéndonos observar y medir las propiedades de una sola molécula en contraste con las mediciones que observan un grupo de moléculas de la muestra, donde el resultado obtenido de una medición es un valor promedio del grupo observado. A pesar de la invención de técnicas con mayor resolución, como el uso de los microscopios electrónicos, la microscopía óptica se sigue utilizando por dos razones: no es destructiva y permite marcar selectivamente componentes de las células vivas.

Esta segunda característica es de especial importancia, ya que nos permite estudiar tanto las estructuras y moléculas que componen a las células como los procesos que se llevan a cabo en las mismas. Se pueden incluso utilizar mezclas de cromóforos, en donde cada uno marca un distinto componente celular, para obtener imágenes multicolor al irradiar o detectar selectivamente cada cromóforo, lo que permite dar seguimiento a diversos procesos simultáneamente en una misma célula.

Existen dos clases de fluoróforos utilizados en microscopía de fluorescencia: los intrínsecos y los extrínsecos. Los primeros son moléculas presentes en las células, como es el caso del aminoácido triptófano, cuyo grupo indol es el fluoróforo principal de las proteínas.

Los extrínsecos son moléculas que se agregan a la muestra para marcar componentes celulares que no emiten fluorescencia por sí mismos, como son las membranas y las bases del ADN. Estos deben ser estables en el medio celular y no interferir con los procesos que se estudian.

Entre los fluoróforos extrínsecos utilizados destacan las cianinas. Estas moléculas orgánicas son cromóforos sintéticos, por lo que es posible modificar su estructura de acuerdo a los reactivos utilizados para modular sus propiedades ópticas, así como el tipo de componentes celulares a los que se unen, con lo que se ha logrado marcar de manera selectiva secuencias específicas de ADN y proteínas.

Entre las cianinas que se han sintetizado se encuentran algunas que absorben y emiten en el infrarrojo cercano, donde la mayoría de las moléculas presentes en las células no absorben, lo que mejora la sensibilidad de la técnica y disminuye el ruido de fondo en las imágenes obtenidas. En éstas se presenta el problema de que el corrimiento de Stokes es de alrededor de 20 nm, dependiendo el solvente, por lo que los filtros utilizados para que la luz del haz de excitación no llegue al detector también absorben una parte de la fluorescencia emitida por las cianinas.

Debido a que las bandas de absorción y emisión dependen de la energía relativa entre el estado excitado y el estado basal de una molécula, estas dos características no pueden ser modificadas por separado. Para solucionar esto se puede utilizar la transferencia de energía entre un cromóforo que absorba en la región deseada y uno que emita en la región de interés, teniendo en cuenta que el espectro de emisión del primero debe traslaparse con el espectro de absorción del segundo.

Para asegurar que ambos cromóforos se encuentran en la misma región de la muestra y a una distancia que permite que la transferencia de energía sea eficiente, se puede sintetizar una molécula a partir de los cromóforos elegidos donde estos se encuentren enlazados. Esta nueva molécula presentará una banda de absorción que se puede modular de acuerdo con los reactivos utilizados y un pseudo-corrimento de Stokes que permitirá filtrar la luz de excitación sin disminuir la señal de la fluorescencia.

Este acercamiento al problema nos presenta la posibilidad de utilizar como antena un cromóforo que presente propiedades adicionales, como puede ser la fotoisomerización que presenta la antena utilizada en este estudio. Esta propiedad puede ser aprovechada en diversas aplicaciones como son los “switches” moleculares, puertas lógicas y microscopía de super-resolución.

Entre los cromóforos que absorben en la región entre 300 y 500 nm se encuentran compuestos con un grupo funcional  $R-N=N-R'$  capaces de fotoisomerizar de manera reversible y que se degradan poco, por lo que son útiles en aplicaciones donde se requieren varios ciclos de isomerización. Su desventaja es que presentan un bajo rendimiento cuántico de fluorescencia, un factor que influye en la eficiencia de la transferencia de energía. Este fenómeno se debe a que la desactivación de sus estados excitados por el canal de fotoisomerización es muy rápida, lo que en principio podría incluso evitar que existiera transferencia de energía por competencia cinética.

El uso de un cromóforo fotoisomerizable como precursor para la molécula propuesta en este estudio nos permite demostrar que este tipo de antenas pueden transferir energía hacia las cianina, así como calcular la eficiencia y constante de velocidad del proceso para comprobar que las moléculas sintetizadas presentan esta propiedad, junto con las bandas de absorción en el visible y el pseudo-corrimiento de Stokes de la fluorescencia.

## 2. Objetivos

### 2.1 General

Sintetizar una molécula formada por una cianina que emite fluorescencia en el infrarrojo cercano y un cromóforo antena cuyas bandas de absorción se encuentren en el espectro visible, para demostrar la existencia de transferencia de energía intramolecular entre los dos fragmentos y un pseudo-corrimiento de Stokes de varios cientos de nanómetros, así como estudiar la cinética de los procesos involucrados. Se considerará el caso en que el cromóforo antena tiene canales de decaimiento (isomerización) que ocurren en paralelo con el de transferencia de energía.

### 2.2 Específicos

- Sintetizar una molécula modelo que nos permita estudiar el fenómeno de interés, a partir de una cianina que emite en el infrarrojo y un cromóforo que absorbe en la región del visible.
- Optimizar el método de síntesis y la purificación, ya que las aplicaciones requieren de un alto grado de pureza en el producto.
- Caracterizar los compuestos sintetizados por RMN, análisis elemental y espectrometría de masas para demostrar la obtención del producto deseado.
- Obtener los espectros de absorción del producto para comprobar que éste presenta bandas de absorción en el visible y que los fragmentos se comportan como cromóforos independientes.
- Obtener los espectros de fluorescencia para demostrar que existe transferencia de energía y un pseudo-corrimiento de Stokes en el producto.
- Comparar y analizar los cambios en las propiedades del producto y los reactivos, con el fin de utilizar esta información en el diseño de otros cromóforos.
- Calcular el rendimiento de la transferencia de energía y su constante de velocidad cinética por medio de la teoría de Förster, para comparar los resultados predichos con los experimentales.
- Determinar los tiempos de vida de los reactivos y el producto para conocer la dinámica del proceso de transferencia de energía y su competencia con la fotoisomerización de la antena.

### **3. Antecedentes**

En esta sección se presentan el marco teórico del trabajo en el que se abordan de manera breve los principales temas relacionados con el mismo.

Se exponen los conceptos necesarios para comprender los procesos de desactivación de las moléculas excitadas, siendo de principal importancia en este estudio la transferencia de energía. Se incluye también un apartado acerca de la cinética de estos procesos para comprender mejor la competencia entre los mismos y su influencia en las propiedades del producto final.

Se revisan aspectos relacionados con las técnicas de espectroscopia con resolución temporal utilizadas en el este estudio para analizar la cinética de los procesos estudiados, sobre todo acerca del funcionamiento de los arreglos ópticos y los equipos utilizados, la obtención de los datos experimentales en ambas técnicas y el proceso de análisis de los mismos.

Además se presentan las moléculas elegidas para sintetizar el cromóforo modelo utilizado en este estudio, así como las razones por las que se escogieron las mismas.

#### **3.1 Interacción de la Luz con la Materia**

Tanto los estudios realizados en este trabajo como las aplicaciones de la molécula sintetizada requieren de que una onda electromagnética interactúe con la muestra para excitarla, de tal forma que podamos aprovechar la energía absorbida por la misma, por lo que se hablará brevemente de esta interacción y de los procesos de desactivación de las moléculas excitadas.

Cuando una molécula interactúa con una onda electromagnética se produce una perturbación dependiente del tiempo sobre las cargas de la misma, es decir, sus núcleos y electrones. Esta interacción puede inducir transiciones entre diferentes estados cuánticos del sistema si la energía de los fotones de la onda con la que se irradia es igual a la diferencia de energía entre dos de estos estados.

Podemos obtener la probabilidad de transición entre dos estados de una molécula con la teoría de perturbaciones dependiente del tiempo si despreciamos el campo magnético y la dependencia espacial de la onda electromagnética, dando como resultado la siguiente ecuación:<sup>1</sup>

$$P_{i \rightarrow f}(t) = \frac{|E_0|^2 |\langle \Psi_f | \hat{\mu} | \Psi_i \rangle|^2 (\sin^2[(\omega_{if} - \omega)t/2])}{\hbar^2 (\omega_{if} - \omega)^2} \quad (3.1)$$

Donde  $E_0$  es la amplitud del campo eléctrico,  $\hat{\mu}$  es el operador del momento dipolar eléctrico,  $\langle \Psi_f | \hat{\mu} | \Psi_i \rangle$  es el momento dipolar de transición,  $\omega_{if}$  es la energía entre los estados expresada como frecuencia angular,  $\omega$  es la frecuencia angular de la onda incidente,  $t$  es el tiempo, y  $\Psi_f$  y  $\Psi_i$  son las funciones de onda de los estados inicial ( $i$ ) y final ( $f$ ) del sistema.

Esta fórmula indica que la probabilidad de transición aumenta con el cuadrado de la amplitud del campo eléctrico y el cuadrado del tiempo, pero debe tomarse en cuenta que sólo puede aplicarse cuando la probabilidad de transición es pequeña, mucho menor a la unidad. El momento dipolar de transición es importante en la transferencia de energía debido a que la posición relativa de los momentos dipolares de los cromóforos influye en eficiencia del proceso y es diferente para cada una de las transiciones dentro de una misma molécula.

Cuando una molécula absorbe un fotón y pasa del estado basal a un estado electrónico excitado cambian sus propiedades físicas y su reactividad. Este estado de mayor energía tiende a regresar al estado basal, disipando la energía en exceso a través de diversos canales fotofísicos y fotoquímicos.

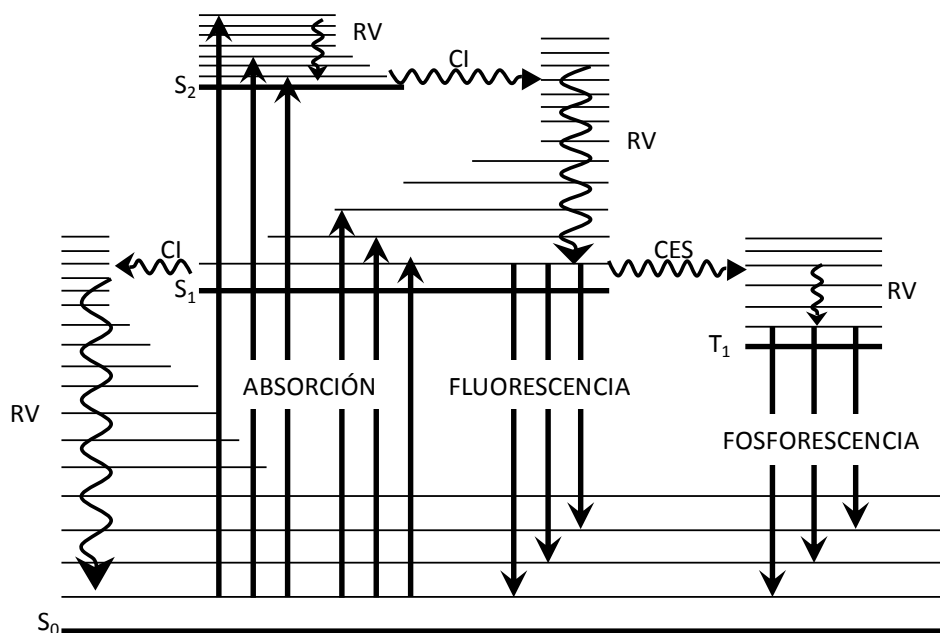
### 3.2 Procesos de Desactivación de Estados Excitados<sup>1-4</sup>

La emisión de fluorescencia, la transferencia de energía y la fotoisomerización son canales de desactivación de moléculas excitadas, y compiten cinéticamente entre ellos, lo que implica que existe una cierta probabilidad de que una molécula regrese al estado basal por cada uno de estos procesos por cada evento de excitación. Debido a que se hablará de ellos durante la discusión y las conclusiones es importante mencionarlos.



De acuerdo a la distribución de Boltzmann, prácticamente todas las moléculas se encuentran en el nivel vibracional de menor energía ( $v = 0$ ) para cada uno de sus modos normales, en el estado basal ( $S_0$ ) a temperatura ambiente. Cuando una molécula absorbe un fotón en el intervalo del ultravioleta o el visible pasa a un estado vibracional y electrónicamente excitado, conocido como el estado de Franck-Condon, a partir del cual tenderá a relajarse al estado basal.

Una forma de esquematizar estos procesos es a través de un diagrama de Jablonski:



**Constantes de Velocidad Características:**

- Absorción  $10^{15} s^{-1}$
- Relajación Vibracional (RV)  $10^{12} - 10^{10} s^{-1}$
- Conversión Interna (CI)  $10^{11} - 10^9 s^{-1}$
- Cruce entre sistemas (CES)  $10^{10} - 10^8 s^{-1}$
- Fluorescencia  $10^{10} - 10^7 s^{-1}$
- Fosforescencia  $10^6 - 1 s^{-1}$

Fig. 3.1 Diagrama de Jablonski con los principales procesos fotofísicos.

En el diagrama los estados singuletes se representan con  $S_n$ , donde  $n = 0$  es el basal y  $n > 0$  son los excitados. Los estados tripletes se representan como  $T_n$ , con  $n \geq 1$ . Las líneas horizontales delgadas representan los estados vibracionales.

Los procesos de desactivación se dividen en radiativos y no radiativos. Las transiciones radiativas (flechas rectas) ocurren con la absorción o emisión de un fotón, mientras que en las no radiativas (flechas onduladas) la energía se disipa sin emitir radiación. Entre los procesos más importantes se encuentran:

*Relajación vibracional:* Es una transición no radiativa de un nivel vibracional excitado a uno de menor energía. El exceso de energía es transferido a modos cinéticos de la misma molécula o a moléculas cercanas.

*Conversión interna:* Es una transición no radiativa entre estados electrónicos isoenergéticos con la misma multiplicidad de espín ( $S_n \rightarrow S_m$ ).

*Cruce entre sistemas:* Es una transición no radiativa entre estados electrónicos isoenergéticos con diferente multiplicidad de espín ( $S_n \rightarrow T_m$ ). En principio esta es una transición prohibida por la regla de selección de espín, sin embargo, si el acoplamiento entre el momento magnético orbital y el momento magnético de espín (acoplamiento espín-órbita) es suficientemente grande, estas transiciones pueden ser muy eficientes.

*Fluorescencia:* Es una transición radiativa entre estados electrónicos con la misma multiplicidad de espín. Debido a que la conversión interna entre los singuletes excitados superiores y el primer singulete excitado es muy rápida, esta transición se da (con muy pocas excepciones) a partir de este último ( $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu$ ), lo que se conoce como la regla de Kasha.

*Fosforescencia:* Es una transición radiativa entre estados electrónicos con diferente multiplicidad de espín ( $T_1 \rightarrow S_0 + h\nu$ ). Este proceso también está prohibido por la regla de selección de espín y suele tener una constante cinética menor a la de la fluorescencia.

Existen otros procesos de desactivación como son las transformaciones fotoquímicas, formación de excímeros, formación de complejos excitados, y transferencia de electrones. De especial importancia en este estudio son la transferencia de energía y la fotoisomerización.

### 3.2.1 Transferencia de Energía<sup>2-4</sup>

Este tema es central en el presente estudio, porque es a través de la transferencia de energía que los dos fragmentos de la molécula sintetizada estarán acoplados, y es gracias a este fenómeno que es posible aprovechar las propiedades de ambos en el funcionamiento de la molécula sintetizada como fluoróforo, donde el aceptor realiza la absorción y la cianina la emisión.

La transferencia de energía es una transición de una molécula aceptora A a un estado electrónico de mayor energía a partir de la energía obtenida por la desactivación de una molécula excitada D\*.

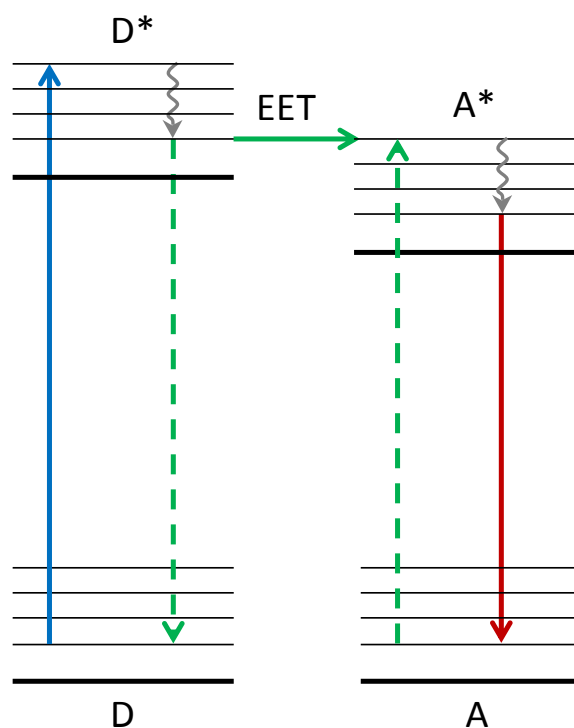


Fig. 3.2 Esquema de la transferencia de energía (EET) entre dos moléculas.

Esta transferencia también puede suceder entre dos fragmentos de una misma molécula cuando los enlaces entre ellos no permiten que se extienda la conjugación, como es el caso del sistema que se propuso para esta tesis. Si existiera conjugación entre los dos fragmentos se comportaría como una unidad, alterando las transiciones electrónicas.

La transferencia de energía electrónica (EET) puede ser radiativa o no radiativa. En el caso radiativo, denominado trivial, el donador emite un fotón que es absorbido por el aceptor, y su eficiencia depende de la concentración de ambos, el rendimiento cuántico de fluorescencia del donador y el solapamiento entre el espectro de emisión del donador y el espectro de absorción del aceptor.

El caso no radiativo es más complejo, ya que requiere que exista interacción entre el donador y el aceptor. Esta interacción puede ser coulombica (formulada por Förster), o de intercambio (formulada por Dexter). En un proceso de EET, el estado inicial del par donador-aceptor ( $D^* + A$ ) y el estado final del mismo ( $D + A^*$ ) pueden ser descritos de manera aproximada tomando en cuenta sólo las funciones de onda  $\Psi_j$  de los electrones involucrados en las transiciones de ambos cromóforos, marcados con las etiquetas (1) y (2).

$$\Psi_i = \frac{1}{\sqrt{2}} [\Psi_{D^*}(1)\Psi_A(2) - \Psi_{D^*}(2)\Psi_A(1)] \quad (3.3)$$

$$\Psi_f = \frac{1}{\sqrt{2}} [\Psi_D(1)\Psi_{A^*}(2) - \Psi_D(2)\Psi_{A^*}(1)] \quad (3.4)$$

El segundo término entre los corchetes garantiza que las funciones de onda sean antisimétricas al intercambio de los electrones que participan en la transferencia de energía.

El acoplamiento entre el estado inicial y el final del sistema está descrito por el elemento matricial de interacción:

$$\langle \Psi_f | \hat{V} | \Psi_i \rangle = V_C + V_{in} \quad (3.5)$$

$$\hat{V} = \frac{e^2}{\epsilon r_{12}} \quad (3.6)$$

En donde  $V$  es la perturbación del hamiltoniano total,  $r_{12}$  es la distancia entre los electrones y  $\epsilon$  es la constante dieléctrica del medio. El primer término es la interacción Coulombica ( $V_C$ ) y el segundo término es la interacción de intercambio ( $V_{in}$ ).

$$V_C = \frac{1}{\sqrt{2}} \langle \Psi_{D^*}(1) \Psi_A(2) | \hat{V} | \Psi_D(1) \Psi_{A^*}(2) \rangle \quad (3.7)$$

$$V_{in} = -\frac{1}{\sqrt{2}} \langle \Psi_{D^*}(1) \Psi_A(2) | \hat{V} | \Psi_D(2) \Psi_{A^*}(1) \rangle \quad (3.8)$$

### 3.2.1.1 Formulación de Förster<sup>2-5</sup>

La interacción Coulómbica  $V_C$  puede expandirse en la suma de varios términos: dipolo-dipolo, dipolo-cuadrupolo, etc. Debido a que la interacción dipolo-dipolo es dominante en las transiciones permitidas, el operador Coulómbico puede aproximarse a:

$$\hat{V}_C^{d-d} \approx \frac{\vec{M}_D \cdot \vec{M}_A}{|\vec{R}|^3} - \frac{3(\vec{M}_D \cdot \vec{R})(\vec{M}_A \cdot \vec{R})}{|\vec{R}|^5} \quad (3.9)$$

Donde  $\vec{M}_D$  y  $\vec{M}_A$  son los operadores del momento dipolar de las transiciones  $D \rightarrow D^*$  y  $A^* \rightarrow A$ , y  $\vec{R}$  es la distancia entre donador y aceptor.

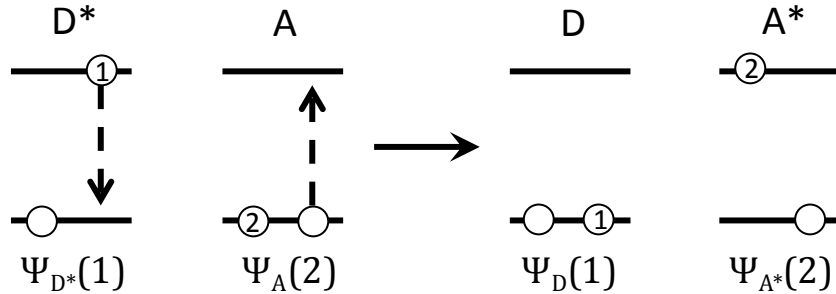


Fig. 3.3 Representación esquemática del mecanismo Coulómbico de EET.

Förster derivó una ecuación para la constante de velocidad de la EET en términos de cantidades espectroscópicas medibles por interacción dipolo-dipolo:

$$k_{EET}^{d-d} = \frac{9000 \ln 10}{128\pi^5 n^4 N_A \tau_D R^6} \Gamma^2 \Phi_D J_{d-d} \quad (3.10)$$

Donde  $n$  es el índice de refracción del medio,  $\Phi_D$  el rendimiento cuántico de fluorescencia del donador,  $\tau_D$  el tiempo de vida de  $D^*$ ,  $N_A$  el número de Avogadro y  $J_{d-a}$  es la integral de solapamiento entre el espectro de fluorescencia normalizado del donador  $\overline{F}_D(\bar{\nu})$  y el espectro de absorción del aceptor expresado en coeficientes de extinción:

$$J_{d-a} = \int_0^\infty \frac{\overline{F}_D(\bar{\nu})\epsilon_A(\bar{\nu})d\bar{\nu}}{\bar{\nu}^4} \quad (3.11)$$

$\Gamma$  es un parámetro que depende de la orientación relativa de los momentos de transición del donador y el aceptor. Para configuraciones aleatorias tiene un valor de  $\Gamma^2 = 2/3$ , y se puede calcular con la fórmula:

$$\Gamma(\theta_D, \theta_A, \theta_{DA}) = \cos \theta_{DA} - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A \quad (3.12)$$

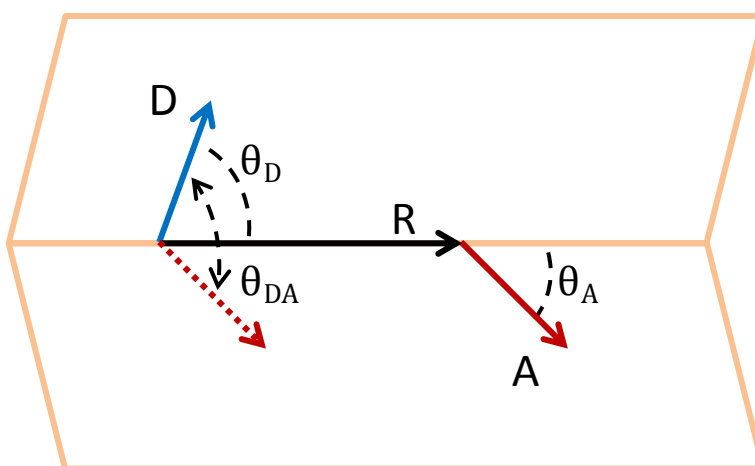


Fig. 3.4 Ángulos involucrados en el cálculo del factor de orientación entre los dipolos de transición de D y A.

Para que la interacción Coulómbica sea el factor dominante en la transferencia de energía se requiere que el traslape orbital entre el donador y el aceptor sea despreciable, de tal forma que los electrones del sistema puedan ser asignados sin ambigüedad al donador y al aceptor. Se requiere además considerar dipolos puntuales, es decir, que la distancia  $R$  debe ser mayor que los vectores de los momentos dipolares.

### 3.2.1.2 Formulación de Dexter<sup>4, 6</sup>

Cuando existe interacción entre los orbitales del donador y el aceptor, o en transiciones de momento dipolar prohibidas donde la interacción Coulómbica es despreciable, se debe considerar la interacción de intercambio.

La Regla de Oro de Fermi calcula la constante de velocidad de la transición de un estado cuántico a un continuo de estados:

$$k_T = \left(\frac{2\pi}{\hbar}\right) V^2 \rho \quad (3.13)$$

En donde  $k_T$  es la constante de velocidad de la transición,  $\rho$  es la densidad de estados en el sistema receptor y  $V$  es el elemento matricial del operador de perturbación.

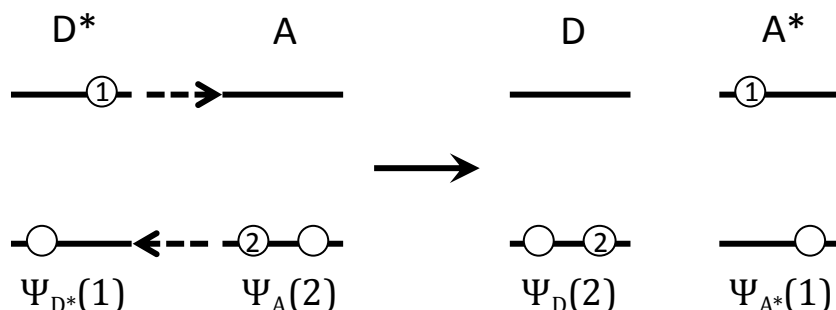


Fig. 3.5 Representación esquemática del mecanismo de intercambio de EET.

Sustituyendo en la ecuación anterior el término matricial de intercambio y asumiendo que se tienen orbitales hidrogenoides se obtiene para la constante de velocidad de la transferencia de energía por el mecanismo de intercambio:

$$k_{EET}^{in} = \left(\frac{2\pi}{\hbar}\right) K J_{in} \exp\left(-\frac{2R}{L}\right) \quad (3.14)$$

Donde  $R$  es la distancia entre donador y aceptor,  $L$  es una constante relacionada con el promedio de los radios de los orbitales moleculares del estado inicial y final del sistema donador-aceptor,  $K$  es un parámetro que no se puede obtener de medidas espectroscópicas relacionados con la interacción de los orbitales del donador y el aceptor,  $J_{in}$  es la integral de solapamiento entre el espectro de emisión normalizado del donador  $\overline{F}_D(\bar{\nu})$  y el espectro de absorción normalizado del aceptor  $\epsilon_A(\bar{\nu})$ , definido como:

$$J_{in} = \int_0^{\infty} \bar{F}_D(\bar{\nu}) \epsilon_A(\bar{\nu}) d\bar{\nu} \quad (3.15)$$

En este caso el espectro de absorción del aceptor se encuentra normalizado y la magnitud de  $J_{in}$  depende sólo de la forma de las líneas espectrales y no de sus intensidades, por lo que esta teoría puede aplicarse a transiciones prohibidas tipo singulete-triplete.

### 3.2.2 Fotoisomerización en Azocompuestos<sup>2</sup>

Este proceso de desactivación del estado excitado se encuentra presente en uno de los fragmentos de la molécula sintetizada y es de interés debido a que permitiría el uso de la misma en diversas aplicaciones como interruptores o “switches” moleculares. Es importante analizar cambios en el proceso de fotoisomerización entre el reactivo y el producto, así como su competencia cinética con otros procesos presentes en la molécula sintetizada, principalmente la transferencia de energía.

La fotoisomerización es la transición entre dos isómeros del estado basal de una molécula a través de un estado electrónico excitado de la misma.

Los azocompuestos son moléculas con al menos un enlace doble entre dos nitrógenos, los cuales presentan una isomerización Z-E. Presentan propiedades de interés como:<sup>7-9</sup>

- Isomerización reversible (térmicamente o con luz).
- Baja fotodegradación, por lo que son útiles en aplicaciones donde se requiere un gran número de ciclos de isomerización.
- Cambios en las bandas de absorción entre los isómeros, que permite en algunos casos iluminar de manera cuantitativa sólo uno de ellos.
- Absorción en la región del visible (350-550 nm).
- Modulación de propiedades ópticas al modificar los sustituyentes en los anillos aromáticos.



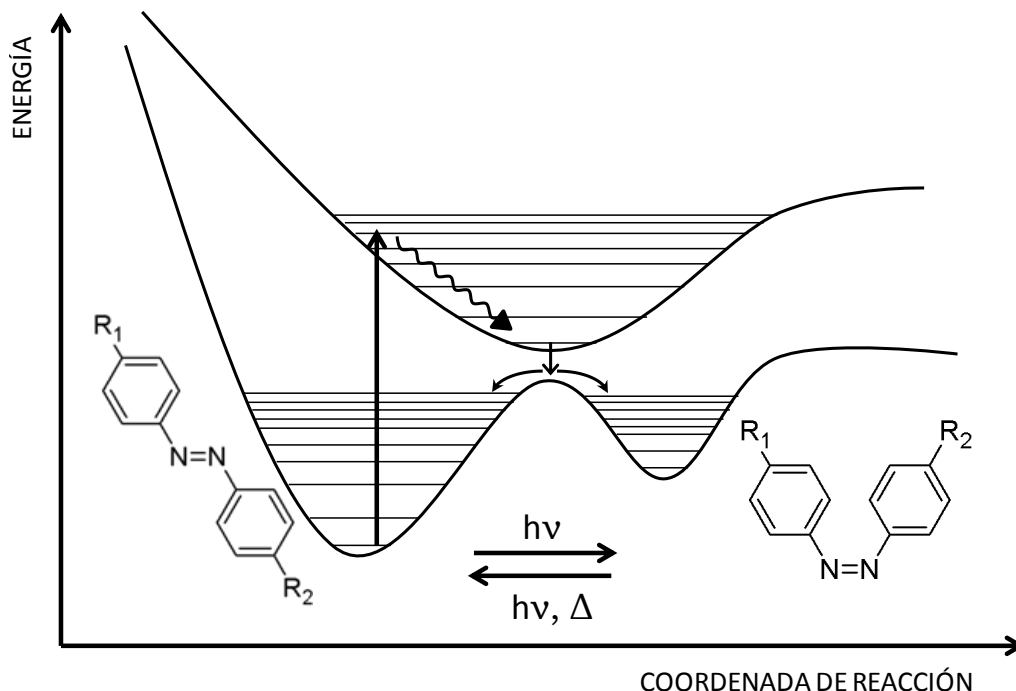


Fig. 3.6 Esquema de la fotoisomerización de un enlace azo.

Existe una gran variedad de cromóforos comerciales que presentan enlaces azo en su estructura, entre los que se encuentra el naranja disperso 13 (DO13) utilizado en este trabajo. Se escogió esta molécula debido a que presenta un grupo fenol útil en la síntesis del producto final, un coeficiente de extinción molar mayor a  $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  en el intervalo de 400 a 450 nm, así como una buena estabilidad al ser irradiado con luz.<sup>10-11</sup>

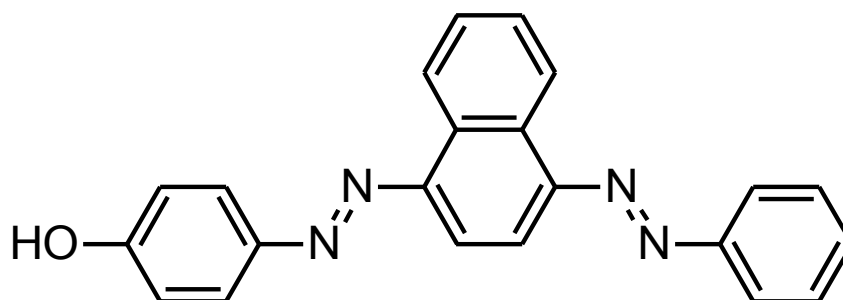


Fig. 3.7 Estructura del DO13.

### 3.2.3 Cinética de los Procesos de Desactivación<sup>2, 12</sup>

Todos los canales de desactivación presentes en una molécula compiten cinéticamente entre ellos y determinan el tiempo de vida de las moléculas, así como la eficiencia de los procesos involucrados.

Debido a que la antena de la molécula sintetizada presenta tanto el canal de fotoisomerización como el de transferencia de energía, la eficiencia de esta última depende de las constantes de velocidad de ambos procesos, por lo que resulta importante medirlos.

La velocidad a la que una molécula excitada regresa a su estado basal se expresa por medio de la ecuación:

$$-\frac{d[A^*]}{dt} = (k_1 + k_2 + \dots + k_n)[A^*] \quad (3.16)$$

donde  $[A^*]$  es la concentración de moléculas en el estado excitado y  $k_i$  son las constantes de velocidad de los procesos de desactivación.

Es importante notar que no todos los procesos de desactivación se encuentran presentes en todas las moléculas, y que un proceso puede tener una constante de velocidad varios órdenes de magnitud mayor que el resto, dominando el comportamiento de una molécula.

Integrando la ecuación anterior, podemos conocer  $[A^*]$  a cualquier tiempo:

$$[A^*] = [A^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_T}\right) \quad (3.17)$$

donde  $[A^*]_0$  es la concentración de moléculas en el estado excitado a tiempo cero y  $\tau_T$  es el tiempo de vida del estado excitado, definido como:

$$\tau_T = \frac{1}{(k_1 + k_2 + \dots + k_n)} \quad (3.18)$$

La intensidad de la fluorescencia  $I_F$  al tiempo  $t$  de una molécula después de ser excitada con un pulso de luz es proporcional a la concentración instantánea de moléculas excitadas  $[A^*]$ , donde el factor de proporcionalidad es la constante de velocidad radiativa  $k_F$ :

$$I_F(t) = k_F[A^*] = k_F[A^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_T}\right) \quad (3.19)$$

Midiendo la intensidad de fluorescencia de una muestra a diferentes tiempos después de la excitación es posible obtener el tiempo de decaimiento del estado excitado de las moléculas. Cuando el único proceso de desactivación es la fluorescencia, el decaimiento es monoexponencial y se tiene:

$$\tau_T = 1/k_F \quad (3.20)$$

### 3.3 Cianinas

Es importante hablar de las propiedades de las cianinas debido a que son éstas la principal razón del uso de las mismas como reactivos en este estudio, ya que es de interés que el fluoróforo sintetizado herede estas propiedades.

Estas moléculas son una familia de compuestos orgánicos que pertenecen al grupo de los polimetinos. Se caracterizan por tener un número impar de metinos y un número par de electrones en su estructura, la cual presenta una carga positiva repartida en toda la cadena y los aromáticos terminales.

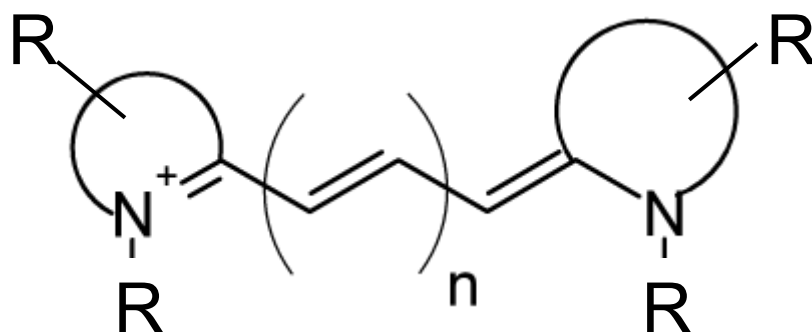


Fig. 3.8 Estructura general de una cianina.

Se escogió como emisor fluorescente a una cianina debido a que estos cromóforos son muy utilizados en microscopía de fluorescencia por sus propiedades ópticas: altos coeficientes de extinción molar, absorción en el visible e infrarrojo y sus rendimientos cuánticos de fluorescencia.<sup>13</sup>

Su síntesis permite modificar su estructura para modular sus propiedades ópticas,<sup>14-15</sup> añadir grupos polares para mejorar su solubilidad así como grupos funcionales con la capacidad de marcar selectivamente secuencias de ADN,<sup>15</sup> proteínas,<sup>16-17</sup> y células cancerígenas.<sup>18</sup>

Además de su uso en microscopía de fluorescencia convencional, las cianinas han sido utilizadas en microscopía de super-resolución debido a que permiten obtener imágenes con una mayor resolución que las proteínas fluorescentes debido al elevado número de fotones emitidos por ciclo de activación.<sup>19</sup> Esto resulta de interés debido a que abre la posibilidad de que fluoróforos análogos al sintetizado en este estudio sirvan también en microscopía de super-resolución.

Se han realizado muchos estudios para optimizar sus propiedades modificando los sustituyentes en los anillos aromáticos y las cadenas alifáticas de los nitrógenos en las cianinas, por lo que estos sitios suelen ser utilizados para aumentar su solubilidad en agua, evitar la asociación entre moléculas y funcionalizar las cianinas para ser selectivas al ADN o proteínas.<sup>3, 20</sup> Debido a esto, en este trabajo se buscó unir las antenas a las cianinas en la cadena de metinos para que las otras posiciones queden libres y la funcionalización propuesta sea complementaria a las mencionadas.

Para lograr los objetivos de este estudio se requiere partir de cianinas que emiten en el infrarrojo y permitan sustituir una posición en la cadena de metinos. La cianina IR780 se utiliza en microscopía debido a que absorbe y emite en el infrarrojo cercano, donde la mayoría de las moléculas presentes en las células no absorben, lo que mejora la sensibilidad del método y la penetración de la radiación.<sup>18, 21</sup>

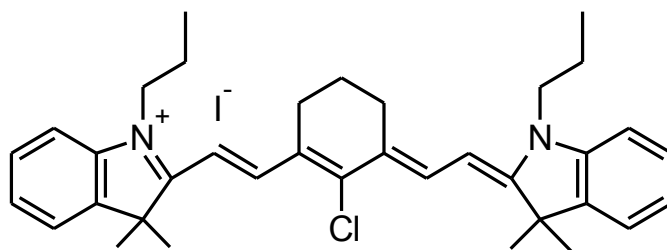


Fig. 3.9 Estructura de la IR780.

Se escogió para el sistema modelo ya que su ruta de síntesis permite elegir los aromáticos terminales y las cadenas alifáticas unidas a los nitrógenos, dándonos la posibilidad de modular sus propiedades a través de cambios estructurales para obtener una familia de cianinas a las que se les pueden unir antenas por sustitución nucleofílica en el anillo presente en la cadena de metinos.<sup>14</sup>

### 3.4 Espectroscopia Estática

Los espectros de absorción, emisión y excitación nos permiten medir las propiedades ópticas de la molécula sintetizada, como son las bandas de absorción y emisión, el coeficiente de extinción molar y el rendimiento cuántico de fluorescencia

Nos permiten además comparar y analizar los cambios que existen en estas propiedades entre los reactivos utilizados y los fragmentos en el producto, así como confirmar la existencia de la transferencia de energía intramolecular.

Se le denomina estática debido a que la señal es registrada en una escala de tiempo varios órdenes de magnitud mayor a la escala en la que se llevan a cabo los procesos de absorción y emisión de luz, por lo que se obtiene un promedio de todos los eventos ocurridos durante la medición.

#### 3.4.1 Rendimiento de Fluorescencia<sup>2-4</sup>

Este parámetro es importante para el cálculo de la eficiencia de la transferencia de energía en la molécula, y nos da información acerca de la intensidad de fluorescencia que puede ser detectada en microscopía.

El rendimiento de fluorescencia, también llamado rendimiento cuántico de fluorescencia ( $\Phi_F$ ), es la fracción de moléculas en el estado fluorescente  $S_1$  que regresan al estado  $S_0$  emitiendo un fotón, definido por:

$$\phi_F = \frac{k_r^S}{k_r^S + k_{nr}^S} \quad (3.21)$$

Donde  $k_r^S$  es la constante de velocidad radiativa y  $k_{nr}^S$  es la suma de las constantes de velocidad de los procesos no radiativos.

El rendimiento cuántico de fluorescencia es la relación entre el número de fotones emitidos y el número de fotones absorbidos por una muestra. Una forma de medirlo es comparando la intensidad integrada de una muestra con la de un estándar de rendimiento cuántico conocido, con la relación:

$$\phi = \phi_r * \frac{I OD_R n^2}{I_R OD n_R^2} \quad (3.22)$$

Donde  $\Phi$  es el rendimiento cuántico de fluorescencia, I es la intensidad integrada, OD es la densidad óptica, n es el índice de refracción del solvente y el subíndice R se refiere al estándar. Esta expresión asume que ambas soluciones fueron excitadas a la misma longitud de onda y que la densidad óptica era menor a 0.08, para evita efectos de frente de celda, reabsorción e interacciones moleculares.

### 3.5 Espectroscopia con Resolución Temporal

Para poder analizar la dinámica de los procesos de absorción, emisión, transferencia de energía y fotoisomerización requerimos de técnicas espectroscópicas con resolución temporal de femto y picosegundos, escalas temporales en la que suceden dichos procesos. En el presente estudio se utilizaron dos técnicas, la Resolución de Fluorescencia por Suma de Frecuencias y el conteo de fotones individuales correlacionado en tiempo.

A continuación se hablará de aspectos técnicos necesarios para las mediciones en estas escalas de tiempo, de los equipos utilizados, la generación de pulsos ultracortos y los procesos de óptica no lineal que se utilizan.

#### 3.5.1 Generación de Pulsos Ultracortos<sup>22</sup>

Un láser puede funcionar en régimen de onda continua (cw) cuando la radiación de salida es constante, o puede funcionar en régimen de pulsos, lo que se logra por tres métodos: vaciado de cavidad, Q-switching y amarre de modos. Este último es el que utilizamos en nuestro laboratorio.

##### 3.5.1.1 Amarre de Modos

En una cavidad óptica, la luz se comporta como una onda estacionaria. Un modo longitudinal es una onda cuya longitud de onda  $\lambda$  cumple con:

$$L = n \frac{\lambda}{2} \quad (3.23)$$

donde  $L$  es la longitud de la cavidad y  $n$  es un número entero. Una onda que no cumple con este requisito interfiere destructivamente consigo misma y su intensidad tiende a cero.

En la cavidad pueden coexistir un gran número de modos longitudinales, y la onda resultante es la suma de todos estos modos. Cuando la fase de los modos longitudinales es aleatoria, se observa una onda con máximos y mínimos aleatorios pero periódicos. Cuando todos los modos longitudinales se encuentran en fase, se observa un pulso que va de un lado a otro de la cavidad.

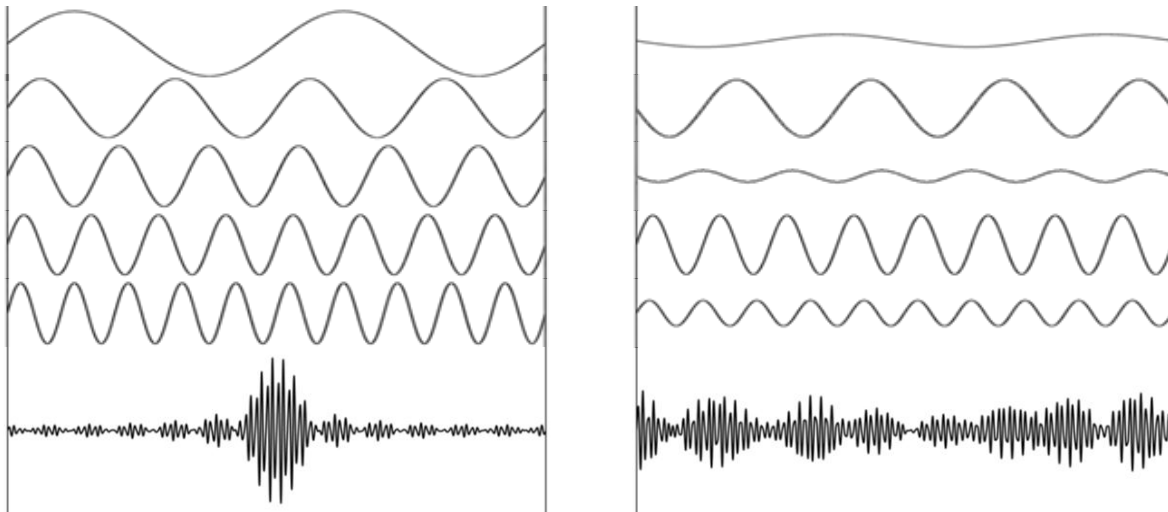


Fig. 3.10 Onda obtenida por la interacción de 25 modos longitudinales en fase (izq.) y fuera de fase (der.).

La intensidad y duración de estos pulsos dependen de la cantidad de modos longitudinales que se encuentran en fase en la cavidad. Para lograr pulsos con duración de femtosegundos se requieren aproximadamente 100 000 modos longitudinales.

La técnica de amarre de modos consiste en forzar que las ondas generadas en el medio activo de un láser entren en fase, lo que puede lograrse por medio del efecto Kerr.

### 3.5.1.2 Efecto Kerr<sup>22</sup>

El autoenfoco de Kerr es un proceso de óptica no lineal y se debe a que el índice de refracción  $n$  de un material, como el medio activo del láser, depende de la intensidad de la luz de acuerdo a la ecuación:<sup>23</sup>

$$n = n_0 + n_2 I \quad (3.24)$$

donde  $n_0$  es el índice de refracción lineal del medio,  $I$  es la intensidad de la luz y  $n_2$  es el coeficiente no lineal del índice de refracción. Cuando una onda con un perfil de intensidad gaussiano atraviesa un medio Kerr, siente un índice de refracción mayor en el centro que en las orillas y debido a que la velocidad de la propagación de la luz es menor en el centro, se obtiene un colapso de los frentes de onda. La curvatura autoinducida en los frentes de onda es equivalente a la existencia de un lente en el medio y se reduce el ancho del perfil de intensidad.

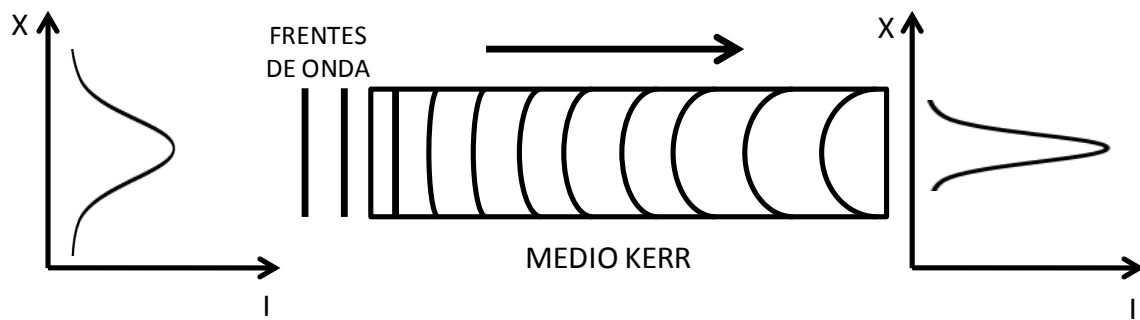


Fig 3.11 Proceso de autoenfoco al atravesar un medio Kerr.

Se puede diseñar la cavidad óptica de tal forma que funcione de manera óptima cuando existe una lente extra en la misma, dada por el autoenfoco de Kerr. Al colocar una apertura física en la cavidad se bloquea la radiación que no ha sido enfocada por su baja intensidad, dejando pasar las ondas más intensas hacia los espejos. El proceso se repite en cada vuelta, modulando la fase de los modos longitudinales presentes en la cavidad hasta lograr el amarre de modos.

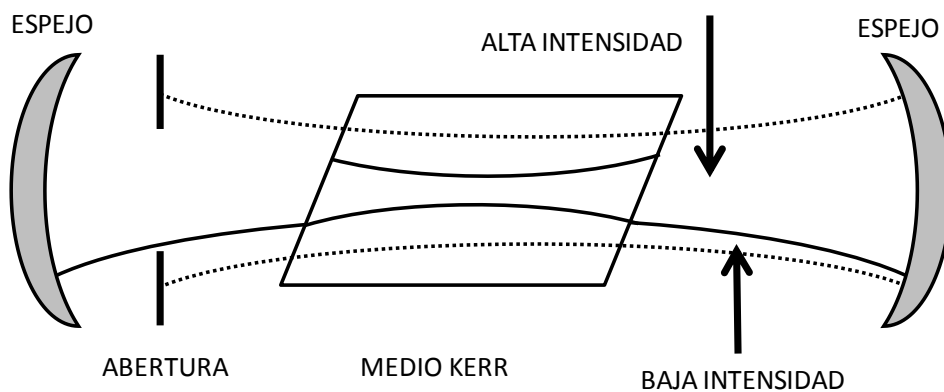


Fig. 3.12 Cavidad óptica con autoenfoco de Kerr.



Los modos longitudinales que forman el pulso no tiene la misma intensidad. Presentan una distribución gaussiana respecto a una onda central ( $\omega_0$ ), cuya FWHM es la duración temporal del pulso.

### 3.5.1.3 Dispersión de Retardo de Grupo (GDD)

Cuando el pulso atraviesa un material, la fase de cada de cada uno de sus modos longitudinales (llamados componentes espectrales cuando la onda electromagnética ya no se comporta como onda estacionaria) se retrasa en función de su frecuencia, lo que se conoce como Dispersión de Retardo de Grupo (GDD). Debido a esto, los modos de menor frecuencia salen del material antes que los modos de mayor frecuencia, aumentando la duración del pulso, lo que se conoce como GDD positiva.

Esto sucede en el medio activo de un láser, y es necesario compensar la GDD+ para obtener pulsos ultracortos. Esto se logra haciendo que los modos longitudinales recorran caminos ópticos diferentes cuya distancia es función de su longitud de onda. Utilizando dos prismas y un espejo se pueden obtener GDD- que compensen el paso por el medio activo, variando la separación entre los prismas ( $L_{sep}$ ) y la distancia recorrida en los mismos ( $L_{mat}$ ), donde  $c$  es la velocidad de la luz,  $\lambda_0$  es la longitud de onda central y  $n$  el índice de refracción.

$$GDD = -\frac{4L_{sep}\lambda_0^3}{2\pi c^2} \left( \frac{d^2n}{d\lambda^2} \right)_{\lambda_0} + \frac{L_{mat}\lambda_0^3}{2\pi c^2} \left( \frac{d^2n}{d\lambda^2} \right)_{\lambda_0} \quad (3.25)$$

### 3.5.1.4 Oscilador Ti:Zafiro<sup>22</sup>

Es el láser de estado sólido más utilizado para producir pulsos ultracortos por su emisión modulable, entre 700 y 900 nm. Este sistema es el que se utiliza en nuestro laboratorio para realizar las mediciones.

El medio activo es un cristal de zafiro,  $Al_2O_3$ , dopado con iones  $Ti^{3+}$ . En un cristal típico, aproximadamente el 0.1% de los átomos de aluminio son reemplazados por átomos de titanio. Su máximo de absorción se encuentra en el intervalo de 480-540 nm, por lo que puede ser bombeado por un láser de 527 nm.

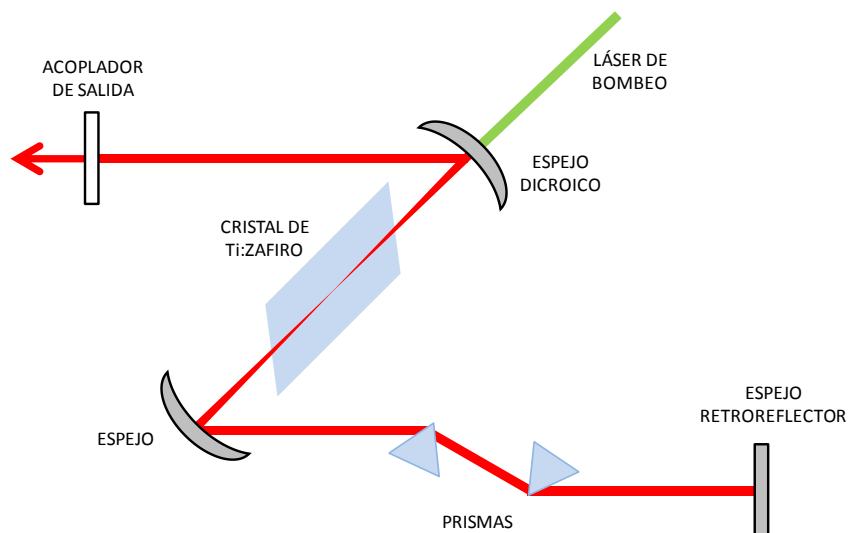


Fig. 3.13 Esquema de un Oscilador de Ti:Zafiro

El láser de bombeo atraviesa el espejo dicroico y es enfocado en el cristal de Ti:Zafiro, excitando moléculas que regresan al estado basal por emisión espontánea. Parte de esta emisión es atrapada entre los dos espejos, pasando varias veces por el medio activo hasta lograr la inversión de población y el amarre de modos.

Los prismas de la cavidad compensan el paso de los pulsos por el cristal, manteniendo el ancho temporal del pulso. El acoplador de salida permite que los pulsos escapen de la cavidad, obteniendo un haz láser pulsado.

### 3.5.2 Amplificador Regenerativo<sup>22</sup>

Los pulsos obtenidos del oscilador de Ti:Zafiro no tiene la energía suficiente para ser utilizados en los experimentos y requieren ser amplificados para obtener los datos experimentales obtenidos en la medición de los tiempos de vida de las moléculas de este estudio.

Para evitar dañar el medio de ganancia durante la amplificación, es necesario expandir los pulsos en tiempo. La expansión temporal de los pulsos corresponde a inducir en ellos una cantidad importante de dispersión de retraso de grupo con signo positivo (GDD+). Esta GDD+ se puede obtener con un par de rejillas de difracción en configuración antiparalela y un telescopio invertido entre ellas, donde la distancia entre las rejillas y las lentes ( $s_n$ ) es menor a la distancia focal ( $f$ ) y los lentes se encuentran separados por el doble de la distancia focal.

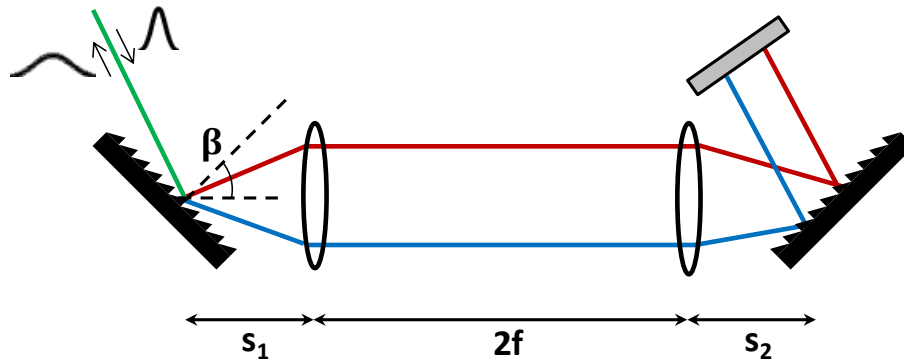


Fig. 3.14 Esquema de un expensor temporal de pulsos.

$$GDD = \frac{4\pi^2 c}{\omega_0^3 d^2 \cos^2 \theta} (2f - s_1 - s_2) \quad (3.26)$$

donde  $\omega_0$  es la frecuencia angular central del pulso,  $d$  es el número de rejillas por centímetro y  $\theta$  es el ángulo de difracción de la frecuencia central.

Los pulsos expandidos temporalmente son atrapados en la cavidad del amplificador mediante dispositivos optoelectrónicos, pasando varias veces por el medio de ganancia para ser amplificado.

Una vez que el pulso tiene la energía requerida, se saca de la cavidad hacia un compresor temporal, que también utiliza rejillas de difracción para generar GDD- de acuerdo a la ecuación:

$$GDD = -\frac{8\pi^2 c}{\omega_0^3 d^2} \cdot 1 - \left[ \sin \alpha - \left( \frac{\lambda_0}{d} \right) \right]^{-\frac{3}{2}} L_g \quad (3.27)$$

Donde  $\omega_0$  es la frecuencia angular central del pulso,  $d$  es el número de rejillas por centímetro,  $\alpha$  es el ángulo de incidencia respecto a la normal,  $L_g$  es la distancia entre las rejillas y  $\lambda_0$  es la longitud de onda central del pulso.

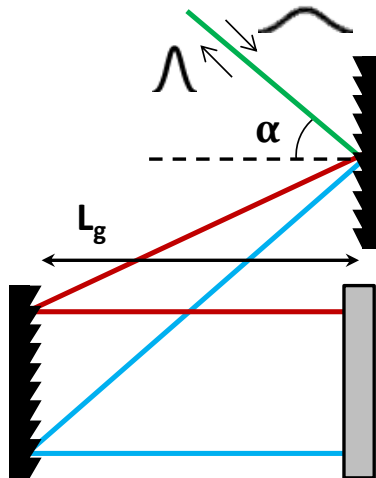


Fig. 3.15 Esquema de un compresor temporal de pulsos.

A continuación se describe el proceso de amplificación (figura 3.16):

1. Se introduce un pulso perpendicular al plano del diagrama al reflejarlo en el cristal de Ti:Zafiro con el ángulo de Brewster. La celda Pockels PC1 (inicialmente apagada) no cambia la polarización del pulso, pero gira  $90^\circ$  al atravesar 2 veces el plato de ondas de  $\lambda/4$ . Este cambio de polarización permite que el pulso atraviese el medio de ganancia, amplificándose. El pulso atraviesa el polarizador POL y la celda Pockels PC2 (apagada) para llegar al espejo M2 y ser reflejado.
2. La celda Pockels CP1 es encendida antes del regreso del pulso. Este atraviesa dos veces la celda y el plato de ondas de  $\lambda/4$ , por lo que el cambio en su polarización es nulo y el pulso queda atrapado en la cavidad del amplificador, aumentando su intensidad en cada vuelta.
3. Una vez que el pulso tiene la intensidad deseada, se enciende la celda Pockels PC2, por lo que el pulso cambia su polarización en  $90^\circ$  al pasar dos veces por PC2, cuando viaja del medio de ganancia al espejo M2 y de regreso, y es reflejado por el polarizador, saliendo de la cavidad hacia el compresor.

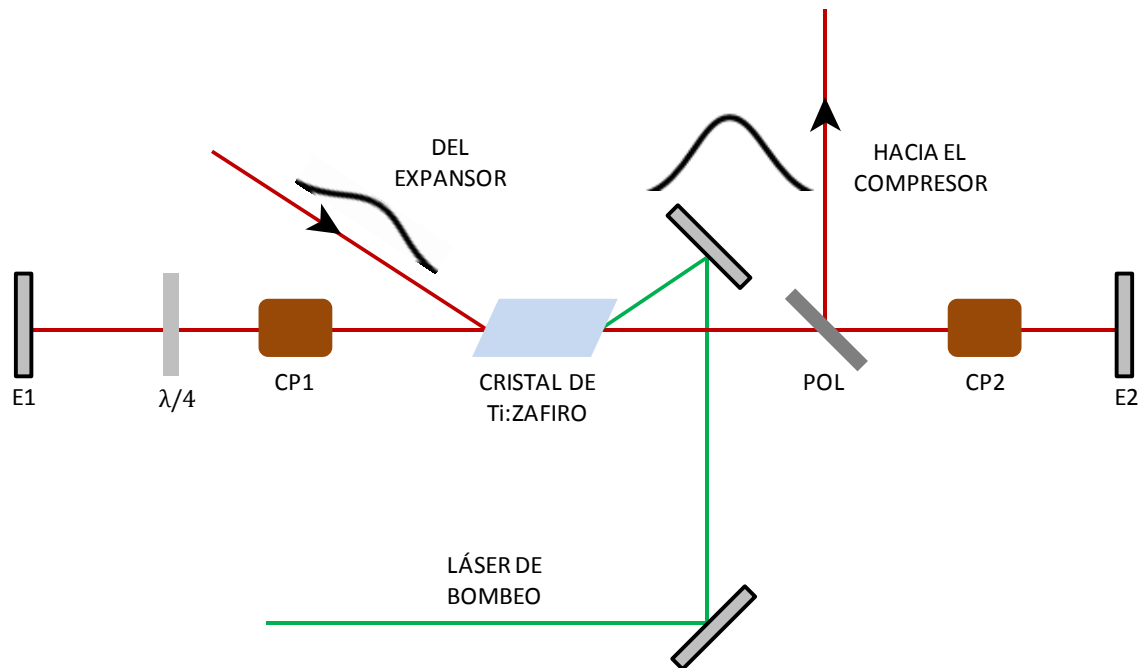


Fig. 3.16 Esquema del amplificador regenerativo.

### 3.5.3 Generación de Segundo Harmónico<sup>24</sup>

En el presente estudio se requiere utilizar longitudes de onda de excitación diferentes a las obtenidas en el oscilador de Ti:Zafiro, por lo que es necesario hacer uso de efectos de óptica no lineal para obtener pulsos de luz de 400 nm, con los que sí es posible excitar la sección antena del sistema propuesto.

Al aplicar un campo eléctrico (como el de una onda electromagnética) sobre un material dieléctrico sus moléculas ganan momento dipolar eléctrico, y se dice que el material se encuentra polarizado. Cuando la polarización  $P$  no varía linealmente con la intensidad del campo eléctrico  $E$  se puede describir con una expansión de Taylor:

$$P = \epsilon_0 (\chi^{(1)} E + \chi^{(2)} E^2 + \chi^{(3)} E^3 + \dots + \chi^{(n)} E^n) \quad (3.28)$$

donde  $\epsilon_0$  es la permitividad del vacío, y  $\chi^{(n)}$  es la susceptibilidad de  $n$ -ésimo orden. La generación del segundo armónico, tercer armónico y la suma de frecuencia son fenómenos de óptica no lineal de segundo orden, descritos por el segundo término de la ecuación anterior. El más común es la generación del segundo armónico, descrito a continuación. Cuando una onda plana dada por:

$$E_{\omega}(x, t) = E \exp(i(\omega t - kx)) + E \exp(-i(\omega t - kx)) \quad (3.29)$$

se propaga por un medio no lineal se produce una polarización  $P_{2\omega}$  a la frecuencia del segundo armónico de la onda inicial. Los dipolos eléctricos inducidos emiten una nueva onda electromagnética:

$$E_{2\omega}(x, t) = E_{2\omega} \exp(i(2\omega t - k_{2\omega}x)) \quad (3.30)$$

La propagación de las ondas en el espacio depende del índice de refracción del medio, el cual es función de la longitud de onda de la misma:

$$|\vec{k}| = \frac{n(\omega_i)\omega_i}{c} \quad (3.31)$$

en donde  $\vec{k}$  es el vector de propagación,  $n(\omega_i)$  es el índice de refracción de una onda con frecuencia angular  $\omega_i$ , y  $c$  es la velocidad de la luz. Debido a la diferencia de frecuencia entre la onda inicial y la generada, estas no viajan a la misma velocidad dentro del medio, por lo que la onda generada en el punto  $x = l$  no se encuentra en fase con la generada en el punto  $x = l + \Delta l$ , a menos que se cumpla la condición de ajuste de fases:

$$k_{\omega_1+\omega_2} = k_{\omega_1} + k_{\omega_2} \quad (3.32)$$

Para que esto se cumpla, el índice de refracción que siente la onda generada debe ser igual al que siente la onda inicial. Esto se logra con un cristal birrefringente, como el beta borato de bario ( $\beta$ -BBO), en donde un eje del cristal (eje extraordinario) tiene un índice de refracción diferente a los otros dos (eje ordinario), y es posible igualar el índice de refracción que sienten dos ondas de diferente frecuencia y polarización al variar el ángulo del cristal respecto a la polarización del pulso.

### 3.5.4 Resolución de Fluorescencia por Suma de Frecuencias<sup>3, 22, 24</sup>

Esta técnica permite medir el tiempo de vida de las muestras una vez que han sido excitadas por los pulsos de luz ultracortos. Se utilizó en este estudio para medir el tiempo de vida de la antena, necesario para calcular la eficiencia de la transferencia de energía. A continuación se explica el proceso por el cual se obtienen los datos experimentales.

Este es un método inicio-prueba que consiste en dividir el pulso que sale del amplificador en un pulso de inicio y un pulso de prueba. El pulso de inicio es utilizado para excitar la muestra, ya sea de manera directa o modificando su longitud de onda, y recorre un camino óptico diferente al pulso de prueba, el cual llega con un retraso  $\Delta t$  que depende de la diferencia en distancia  $\Delta x$  entre los dos caminos ópticos:

$$\Delta t = \frac{\Delta x}{c} \quad (3.33)$$

La fluorescencia emitida por la muestra excitada es recolectada por un par de espejos parabólicos y enfocada en un cristal de óptica no lineal junto con el pulso de prueba, donde se lleva a cabo el fenómeno de suma de frecuencias, y se obtiene un pulso cuya intensidad es detectada.

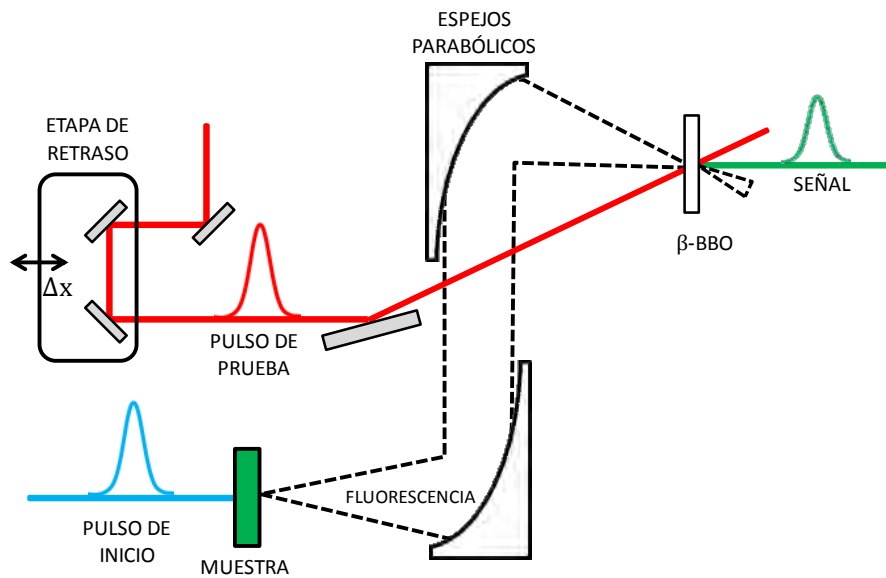


Fig. 3.17 Esquema de la técnica de suma de frecuencias.

Debido a que los haces no son colineales, la suma es sobre los vectores de onda  $\vec{k}_i$ , con el ajuste de fases dado por:

$$\vec{k}_{suma} = \vec{k}_{fluo} + \vec{k}_{prueba} \quad (3.34)$$

La muestra emite en varias longitudes de onda, cada una de las cuales tiene un vector de propagación  $\vec{k}_{fluo}$  diferente en función de su frecuencia, por lo que el ajuste de fases se da para una sola longitud de onda de la fluorescencia a la vez, dependiendo del ángulo  $\theta$  del cristal de óptica no lineal, que nosotros podemos ajustar.

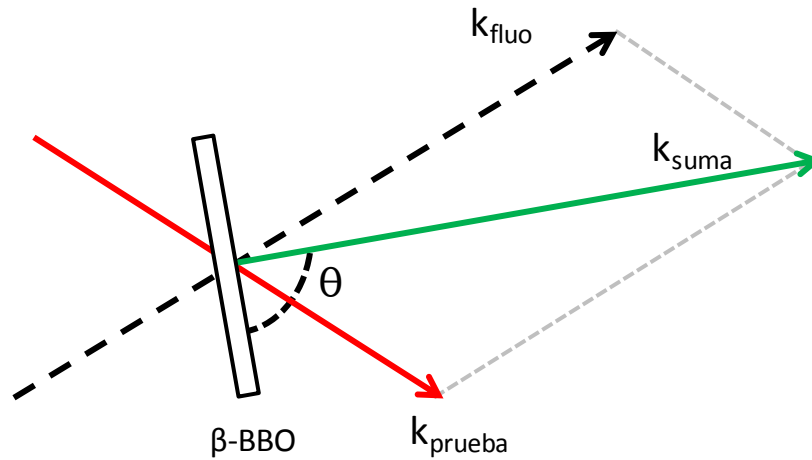


Fig. 3.18 Suma de los vectores de onda

La intensidad de la señal obtenida de la suma de frecuencias depende de la intensidad del pulso de prueba, que es constante, y de la intensidad de la fluorescencia, que decae exponencialmente. Graficando esta intensidad con respecto al retraso del pulso de prueba es posible reconstruir el decaimiento de la fluorescencia, con lo que podemos obtener el tiempo de vida del estado excitado y las constantes de velocidad de los procesos de desactivación del mismo.

### 3.5.4.1 Análisis de las Señales<sup>3</sup>

Una vez obtenidos los datos experimentales, es necesario analizarlos para obtener el tiempo de vida de los cromóforos y sus constantes de velocidad, que se requieren para la medición de la eficiencia de la transferencia de energía.

La señal obtenida de la suma de frecuencias  $I_S$  es la convolución de tres funciones: el pulso de inicio  $I_I$ , el pulso de prueba  $I_P$  y el decaimiento exponencial de la fluorescencia:

$$I_S = \int_{-\infty}^{\infty} \left\{ \int_{-\infty}^{\infty} I_I \cdot I_P(t - t') dt' \right\} \cdot e^{-\frac{t-t_r}{\tau}} dt \quad (3.35)$$



Donde  $t$  y  $t'$  son variables auxiliares y la integral interna es la correlación cruzada del pulso de inicio con el de prueba.

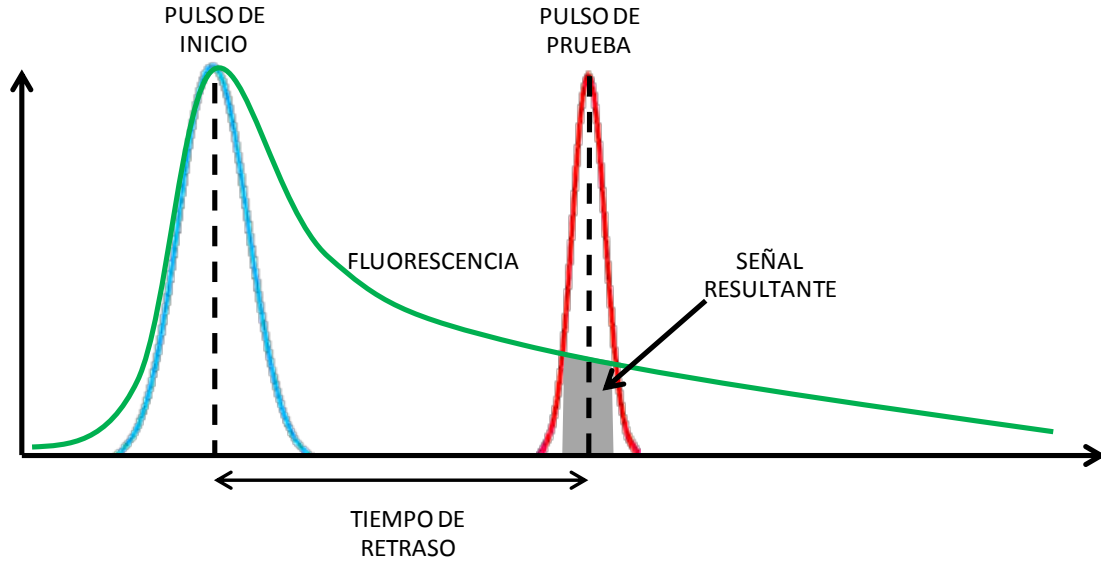


Fig. 3.19 Evolución temporal de la intensidad de la fluorescencia.

Para obtener los tiempos de vida del decaimiento  $\tau$ , se resuelve la forma analítica de la integral:

$$I_S = \frac{1}{2} c \left[ 2 - \operatorname{erfcc} \left( t_r \left( \frac{\sqrt{\ln 16}}{\Delta t} - \Delta t \frac{b}{2\sqrt{\ln 16}} \right) \right) \right] e^{\frac{\Delta t^2 \cdot b^2}{4 \ln 16}} \cdot e^{-bt_r} \quad (3.36)$$

Donde  $\Delta t = FMHW_{cc}$  es el ancho a la mitad del pico de una gaussiana obtenida experimentalmente de la función de respuesta del equipo,  $b$  es el inverso del tiempo de decaimiento,  $c$  es la amplitud del decaimiento exponencial,  $t_r = t_r' - t_0$ , y  $\operatorname{erfcc} = 2/\sqrt{\pi} \int e^{-x^2} dx$  es una función de error complementaria.

### 3.5.5 Time Correlated Single Photon Counting<sup>3,25</sup> (TCSPC)

Es una técnica que permite la medición de tiempos de vida de estados excitados desde unos cientos de picosegundos hasta milisegundos y complementa a la de suma de frecuencias. En este trabajo se utiliza para medir el decaimiento de la fluorescencia de la molécula sintetizada.

La muestra es excitada utilizando un láser pulsado y se mide el tiempo transcurrido entre este pulso y la detección de un fotón. Esta información se guarda en un histograma donde el eje Y representa el número de fotones detectados con esa diferencia de tiempo y el eje X representa la diferencia de tiempo entre la excitación y la detección, el cual se encuentra dividido en intervalos de tiempo que van de un tiempo  $t_k$  a  $t_k + \Delta t$ , donde  $\Delta t$  es el ancho del canal de medición.

Las condiciones se ajustan para que sólo uno de cada cien fotones emitidos por la muestra sea detectado, debido a que sólo se puede medir el primer fotón que llega al detector. Si se aumenta el número de fotones detectados existe una acumulación preferencial en tiempos tempranos, y se miden tiempos más cortos que los reales.

El procedimiento es el siguiente (figura 3.20):

1. Cuando el láser emite un pulso de luz manda una señal eléctrica que pasa por un discriminador de fracción constante (CFD), el cual mide con precisión la llegada del pulso. La señal llega a un convertidor de tiempo a amplitud (TAC), un capacitor que acumula carga en función del tiempo, y da la señal de inicio.
2. El pulso de luz excita la muestra y esta emite fluorescencia. Un segundo canal detecta un fotón de la fluorescencia, manda una señal eléctrica que pasa por otro CFD y llega al TAC, dando la señal de parar.
3. La carga acumulada en el TAC, proporcional al tiempo transcurrido entre la excitación y la emisión, llega a un amplificador de ganancia programable (PGA).
4. La señal amplificada llega a un convertidor analógico a digital, y se guarda como un evento.
5. Esto se repite muchas veces para obtener un histograma del decaimiento.

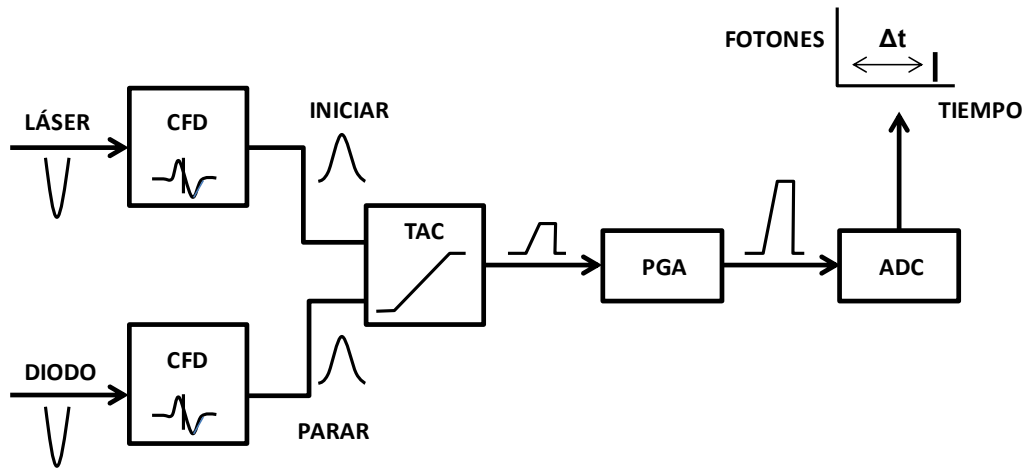


Fig. 3.20 Esquema de la electrónica usada en TCSPC.

El histograma obtenido es la convolución del decaimiento de la intensidad de la fluorescencia y la función de respuesta del equipo. Si tomamos el pulso de excitación como una serie de funciones  $\delta$  con diferentes amplitudes tenemos:

$$N_t = \int_0^t L_{t'} I_{(t-t')} dt' \quad (3.37)$$

Donde  $N_t$  es la intensidad medida al tiempo  $t$ ,  $L_{t'}$  es la intensidad de cada función  $\delta$  de excitación hasta el tiempo  $t$  y  $dt'$  es el ancho del canal de medición.

La función de respuesta del equipo se puede obtener al medir un cromóforo cuyo tiempo de vida sea menor a la duración del pulso de excitación.

Una vez que se realiza la convolución se obtiene una regresión exponencial para obtener el tiempo de vida del estado excitado.

## 4. Metodología

### 4.1 Síntesis del producto DO-IR

Esta síntesis se realizó en atmósfera de nitrógeno. El acetonitrilo y el DMSO fueron utilizados directo del contenedor (Aldrich, HPLC), el DMF se secó y destiló previamente.

El DO13 se purificó por cromatografía en una columna de sílica con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  como eluyente. El NaH suspendido en aceite y la IR780 se utilizaron directo del frasco. La  $\text{Et}_3\text{N}$  se secó y destiló antes de ser utilizada.

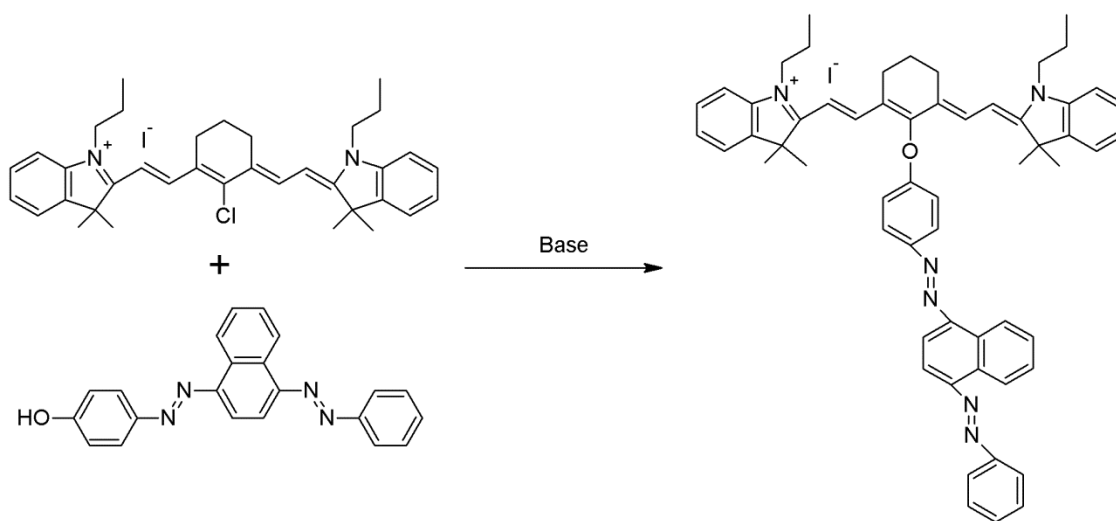


Fig. 4.1 Reacción de formación del producto DO-IR.

El mecanismo de reacción es de adición eliminación por sustitución nucleofílica, favorecido en medios polares. La base se agrega para formar la sal del fenol en el reactivo DO13 y favorecer el ataque al carbono de la cianina IR780.

Las condiciones de la reacción se variaron para disminuir el número de subproductos de la misma y mejorar su rendimiento. Los parámetros estudiados fueron:

- Solvente: DMF, DMSO, ACN.
- Temperatura: 20-25°C, 50°C, 100°C.
- Base: Sin base, NaH,  $\text{KCO}_3$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ .

El producto se purificó por cromatografía en una columna de sílica utilizando como sistema  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ .

La caracterización se llevo a cabo por:

- RMN: Equipo Jeol Eclipse 300MHz, en  $\text{CDCl}_3$  utilizando TMS como referencia.
- Análisis Elemental: Elementar modelo Vario Micro Cubepor, por pirólisis utilizando sulfanilamida como estándar.
- Espectrometría de masas: Jeol, JMS AX-505 HA, por la técnica de FAB+, y utilizando 3-nitrobencil alcohol como matriz.

## 4.2 Espectroscopía Estática

Todas las medidas se realizaron a  $\approx 20$  °C en metanol grado HPLC (Aldrich), utilizando una celda de cuarzo de 1 cm.

Los espectros de absorción se obtuvieron con un espectrofotómetro Cary 50 (Varian), el cual cuenta con una lámpara de Xenon que permite mediciones en un intervalo de 190-1100nm, diodos de silicon como detectores y un ancho de banda de 1.5 nm. Los espectros de emisión y excitación se obtuvieron con un fluorímetro Cary Eclipse (Varian), el cual cuenta con una lámpara de destello de Xenon, un monocromador para la excitación y uno para la emisión, un photomultiplicador que funciona en el intervalo de 200-900 nm. Se utilizó una apertura de 5 nm en la excitación y la emisión.

Para los espectros de fluorescencia se utilizaron soluciones con una densidad óptica menor a 0.08 en los máximos, para evitar efectos de frente de celda y reabsorción. La concentración de las muestras es del orden de  $10^{-5}$  M, para evitar interacciones intermoleculares.

## 4.3 Espectroscopía con Resolución Temporal

El equipo utilizado en el laboratorio sigue los principios presentados en los antecedentes. Consta de un oscilador de Ti:Zafiro alimentado por un láser continuo de 527 nm, el cual genera pulsos de 150 fs de duración, 300 mW de potencia, y longitud de onda central de 800 nm, a una frecuencia de 100 MHz.

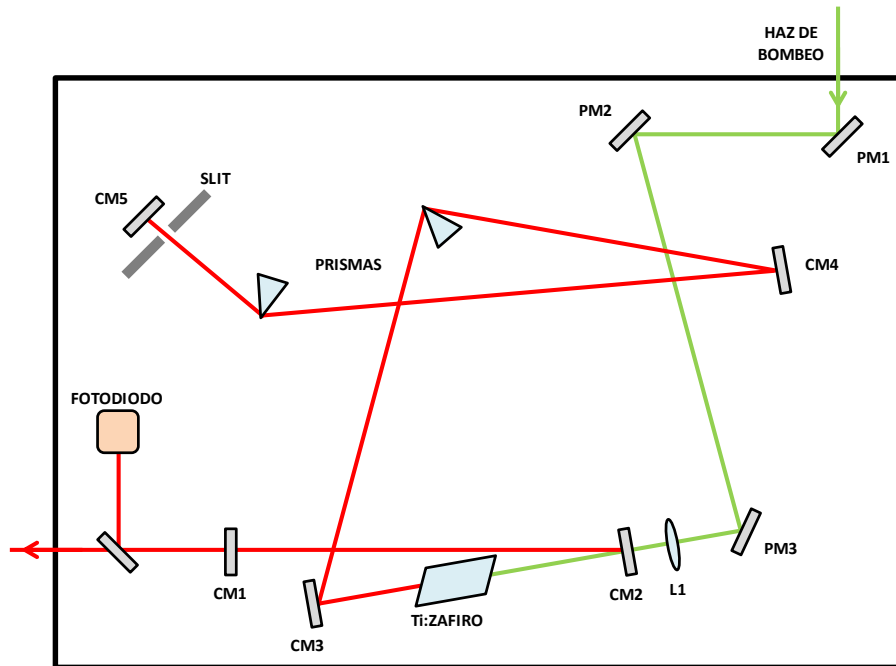


Fig. 4.2 Esquema del oscilador Ti:Zafiro utilizado en los experimentos, donde PM son los espejos del pulso de prueba, CM los de la cavidad y L un lente.

Los pulsos del oscilador entran a un amplificador regenerativo, del cual salen a una frecuencia de 1 KHz, con una potencia de 650 mW.

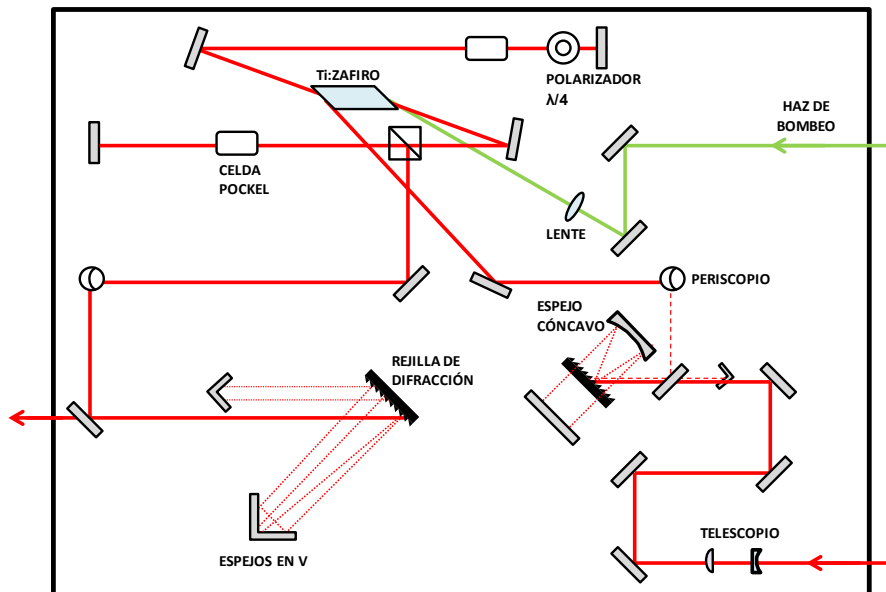


Fig. 4.3 Esquema del amplificador regenerativo utilizado en los experimentos.

El haz que sale del oscilador se divide en dos: el pulso de prueba y el de inicio. Este último es enfocado en cristales de para generar su segundo armónico, cuya intensidad se regula con un filtro de densidad neutra para excitar a la muestra ( $\approx 2$  mW). El retardo del pulso de prueba se controla con una platina automatizada.

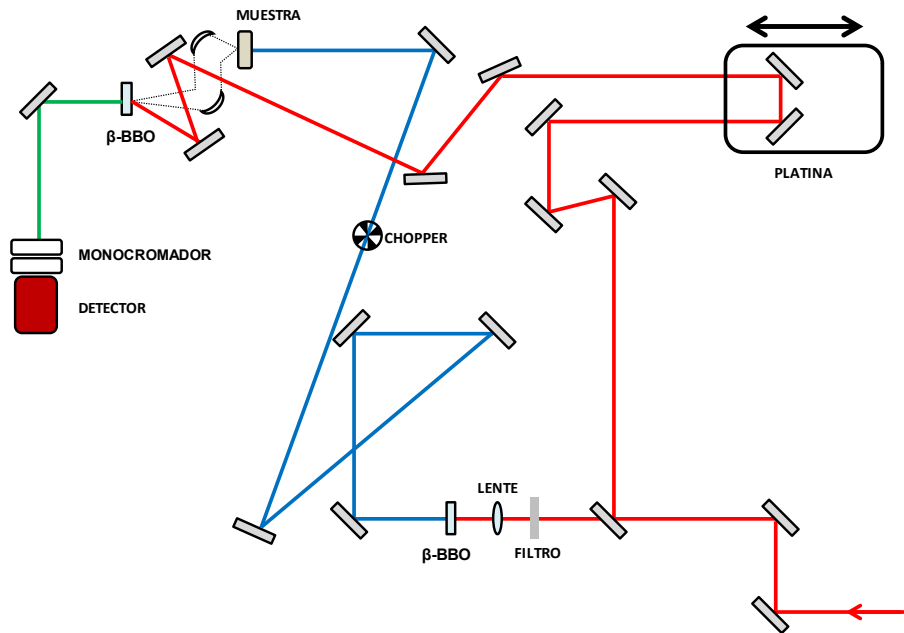


Fig. 4.4 Esquema de la óptica utilizada para la técnica de Resolución Temporal por suma de Frecuencias.

La técnica de TCSPC utiliza un láser pulsado de picosegundos con una longitud de onda de emisión de 403 nm y un diodo de avalancha como detector, los cuales están conectados al equipo Pico Harp 300, el cual mide el tiempo transcurrido entre los pulsos de excitación y la detección de fluorescencia para formar el histograma, como se describe en los antecedentes.

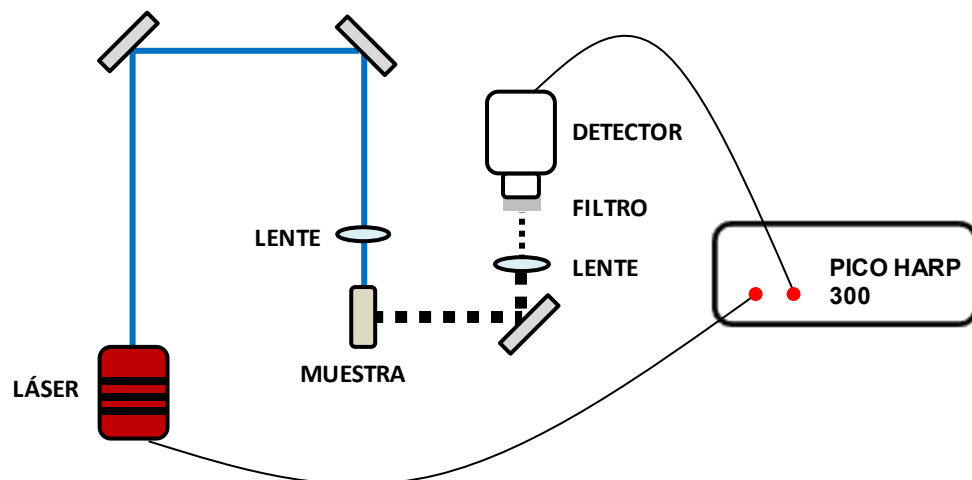


Fig. 4.5 Esquema de técnica de TCSPC.

Eligiendo filtros adecuados en la entrada del detector podemos medir la fluorescencia en las longitudes de onda de interés.

La función de respuesta del equipo se obtuvo con la cianina 2QC5, cuyo tiempo de vida es de 10 ps en metanol.<sup>26</sup>



## 5. Resultados y Discusión

### 5.1 Síntesis de DO-IR

Se realizó la síntesis del producto marcado como DO-IR a partir de la cianina IR780 y el cromóforo DO13, siguiendo condiciones en las que se favorezca la sustitución del átomo en la posición meso de la cianina por el grupo fenolato del DO13 desprotonado, donde se utiliza hidruro de sodio como base.<sup>27</sup> Después de 24-36 horas de reacción a temperatura ambiente se tomaron placas cromatográficas que mostraban una gran cantidad de productos de la reacción, los cuales eran difíciles de separar debido a su R.F. El producto se encontraba en la mezcla en una proporción pequeña, mientras que la cianina de partida reaccionaba casi por completo y no se podía recuperar, perdiendo una gran cantidad de reactivo. Este mismo comportamiento se dio utilizando DMSO como disolvente. Si no se utiliza base en la reacción se obtiene una cantidad mínima del producto deseado, desapareciendo los subproductos formados por el uso del NaH.

Se han reportado reacciones en la cadena de metinos de cianinas similares a la IR780,<sup>28-29</sup> lo por lo que es posible que el ataque nucleofílico de la sal del DO13 formada en el medio de reacción no se da solamente en el carbono unido al cloro sino también en otras posiciones en la cadena, lo que puede explicar la gran cantidad de subproductos de reacción, limitando la formación del producto deseado. A esto se suma otro factor. Aunque el uso de hidruro de sodio en DMF es común en síntesis, se ha reportado que el DMF reacciona con NaH<sup>30</sup> formando sales que podrían reaccionar con la cianina en el medio de reacción.

Para comprobar estas hipótesis se buscó una base diferente para utilizar en la reacción, la cual no reaccionara con DMF, fuera más débil que el NaH y que no fuera nucleofílica. Se encontró reportado el uso de trietilamina para llevar a cabo sustituciones en la IR780.<sup>21</sup>

Se llevó a cabo la reacción de formación de producto DO-IR en las mismas condiciones pero utilizando la trietilamina como base. Ésta se agregó en exceso, 5:1 con respecto a la cianina, y se dejó la reacción con agitación por 24 horas. Tras este periodo se tomaron placas cromatográficas en las que se veían solamente reactivos sin reaccionar y un solo producto, lo que confirma que el problema era el uso del NaH.

La reacción puede llevarse a cabo utilizando acetonitrilo como solvente con buenos rendimientos. El carbonato de potasio puede ser utilizado como base sin que aparezcan subproductos, pero el rendimiento obtenido es menor que al utilizar la trietilamina.

El producto fue separado de los reactivos por cromatografía en una columna de sílica gel, obteniendo el reactivo puro y recuperando los reactivos sin reaccionar.

El producto se precipitó con éter de la mezcla utilizada en la cromatografía para su purificación, obteniendo un polvo rojo cobrizo, con brillo metálico, que descompone por arriba de los 170 °C.

El rendimiento de la reacción fue de entre 20 y 30% tras 36 horas de reacción a temperatura ambiente. La presencia de reactivos sin reaccionar indicaba una reacción incompleta, por lo que se buscó mejorar el rendimiento. Se realizó otra reacción donde se aumentó la temperatura del DMF a 50 °C, con lo que se obtuvieron rendimientos mayores al 80 % tras 24 horas de reacción.

Para confirmar la formación del producto deseado, se llevó a cabo la caracterización por RMN, espectrometría de masas, análisis elemental y espectroscopia UV-vis. De esta última se hablara en la siguiente sección.

La espectrometría de masas muestra un pico base en el valor del ión molecular,  $m/z$  856, el cual corresponde al valor teórico de la cianina unida a la antena. Se observa también un pico en  $m/z$  428, correspondiente al dicatión de la molécula, un fenómeno observado en compuestos poliaromáticos.

El análisis elemental confirmó la formación del producto:

	%C	%H	%N
<b>Teóricos</b>	70.86	6.05	8.55
<b>Experimentales</b>	71.64	6.12	8.43

Tabla 5.1 Resultados del análisis elemental.

A continuación se presentan los espectros de  $H^1$ -RMN de los reactivos y el producto, marcando los principales picos utilizados en la identificación del producto.

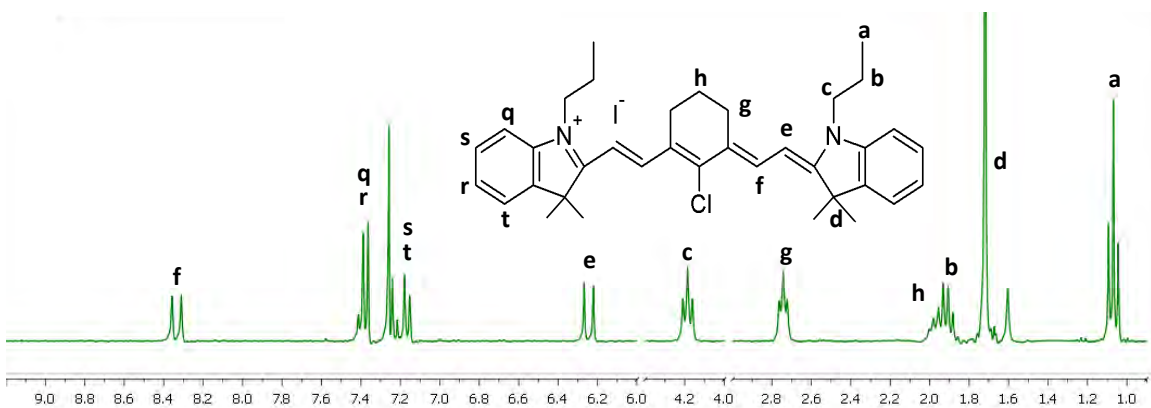
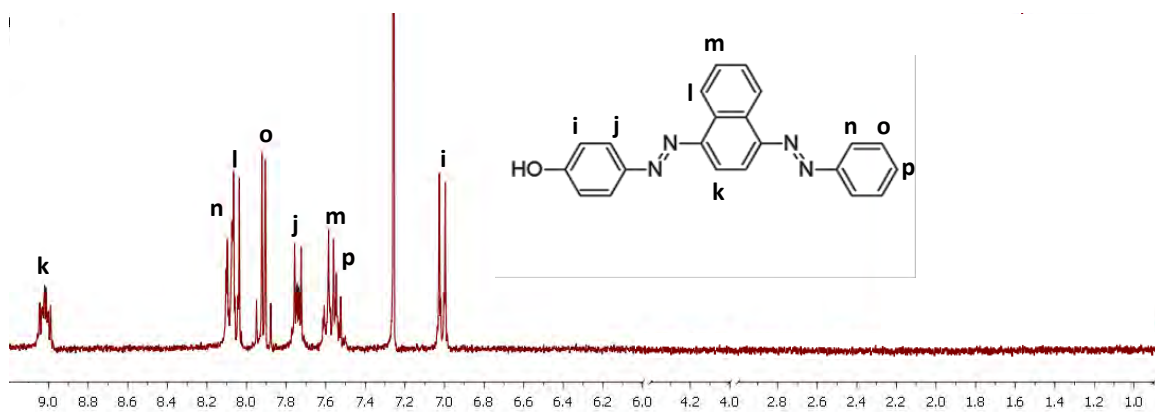
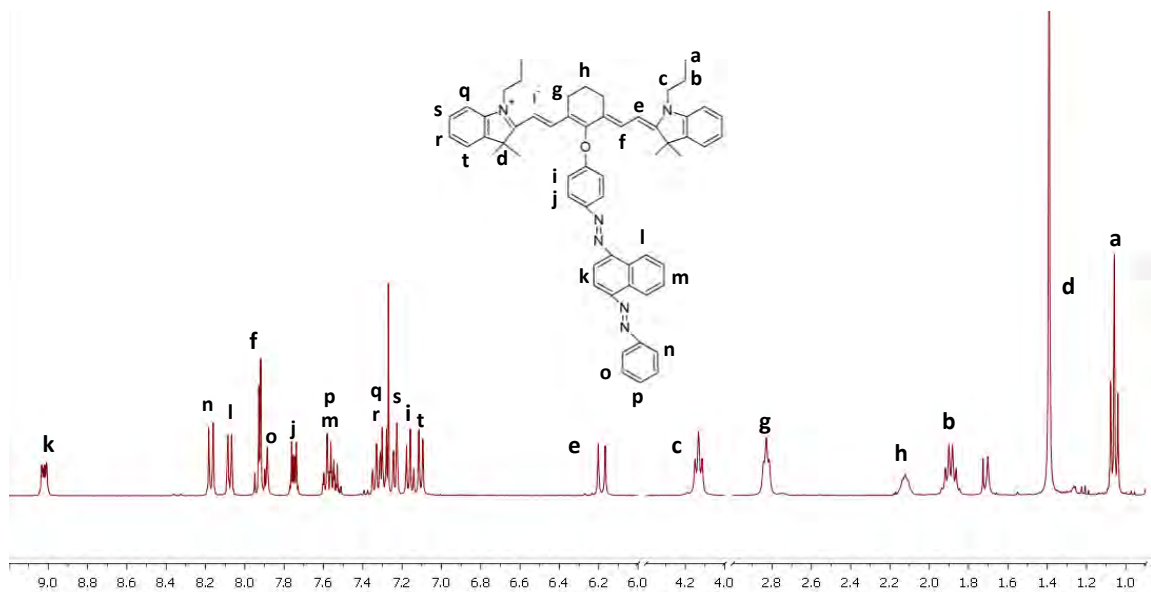


Fig. 5.1 Espectros de RMN de IR780 (abajo), DO13 (en medio) y DO-IR (arriba).

En el producto se pueden observar los protones correspondientes a los aromáticos de la antena y la cianina. Se puede apreciar el desplazamiento de los protones **i** a causa de la pérdida de la funcionalidad tipo fenólico y la formación del enlace éter. Los protones **k** de la antena son importantes debido a que se encuentran lejos del resto de los aromáticos, lo que permite integrarlos de manera inequívoca para comparar con los protones **e** de la cianina y confirmar la formación del producto, donde la antena y el emisor se encuentran en proporción de 1:1.

Los protones **e**, **f**, **g** y **h** de la cianina presentan un corrimiento en el producto por la sustitución del cloro en la molécula sintetizada. El desplazamiento de los protones **d** puede ser explicado considerando la anisotropía de los anillos aromáticos. Si consideramos que el anillo de la antena se encuentra perpendicular al plano de la cianina, los metilos quedan por encima y por debajo del plano de este anillo y su desplazamiento químico se mueve a campo alto.

Además de confirmar la identidad del producto, los espectros de RMN nos dan información de la configuración de la cianina. El desplazamiento de los protones **d** nos indica la posición relativa de los fragmentos de la molécula, los cuales son planos debido a la aromaticidad. Así mismo, nos confirma que la cadena de la cianina se encuentra en posición trans, la cual suele ser la más estable. El pequeño desplazamiento presentado por los protones **a**, **b** y **c** nos permite confirmar lo anterior, y se debe principalmente al cambio en la carga de la molécula por la sustitución del cloro.

## 5.2 Espectroscopia Estática

Se tomaron los espectros de absorción, emisión y excitación del producto como parte de su caracterización y para medir las propiedades ópticas del mismo, que son el principal interés de este estudio. Se obtuvieron también los espectros de los reactivos utilizados para poder comparar sus propiedades con las del producto y analizar los cambios en las mismas. Esto es importante para el diseño de nuevos cromóforos análogos al sintetizado (ver resultados).

## 5.2.1 Espectros de Absorción

El espectro de absorción nos permite definir algunas propiedades ópticas de la nueva molécula, relacionar la energía relativa de algunas de sus transiciones, además de confirmar la formación del producto. Es importante notar la presencia de las bandas de absorción de ambos reactivos originales, lo que indica que la conjugación en la molécula no se extiende a través del enlace éter como se esperaba, permitiendo que los dos fragmentos en el producto actúen como cromóforos independientes.

La banda de absorción del producto en la región entre 300 y 500 nm presenta la forma general de la banda del DO13, con modificaciones en la misma que coinciden con las bandas de absorción de los estados superiores de la IR780 que se encuentran en esa región del espectro.

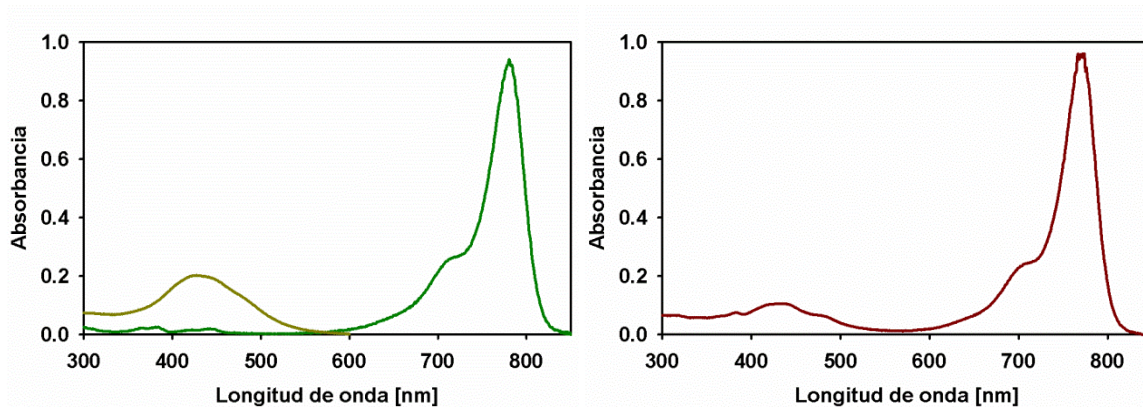


Fig. 5.2 Espectros de absorción de DO13 (naranja), IR780 (verde) y DO-IR (rojo).

Entre 600 y 850 nm la forma del espectro del producto coincide con la banda de la IR780, excepto por el desplazamiento de su máximo a 770 nm, un cambio de 10 nm hacia longitudes de onda ligeramente menores. Este cambio se debe a la sustitución del cloro de la cianina, lo que debe modificar la distribución de la carga en la cianina.

La banda de absorción que se encuentra entre 600 y 720 nm se debe a la estructura vibracional de la cianina y presenta la misma forma en el reactivo y el producto, lo que nos permite suponer que los modos vibracionales de la cianina no se ven afectados de manera importante por la sustitución del cloro o la presencia de la antena.

Estos espectros, junto con los demás análisis, confirman la formación de un enlace entre la antena y el emisor. Para poder comparar mejor los cambios presentes entre los espectros del producto y los reactivos, y obtener más información acerca de los mismos, se prepararon soluciones de concentración conocida para medir los coeficientes de extinción molar de las moléculas.

A continuación se presentan los espectros de absorción en función del coeficiente de extinción molar para la región comprendida entre 250 y 600 nm. Se muestran los espectros de los reactivos, así como la suma algebraica de ambos, para comparar con el espectro del producto obtenido.

En la región entre 480 a 600 nm podemos observar que la suma de los espectros de los reactivos y el espectro del producto tienen coeficientes de extinción molar similares, como corresponde al caso de contener dos fragmentos moleculares que interactúan débilmente. A menores longitudes de onda el espectro del producto presenta un coeficiente de extinción ligeramente menor, resultado del cambio en los grupos funcionales de los fragmentos de la molécula al unirse.

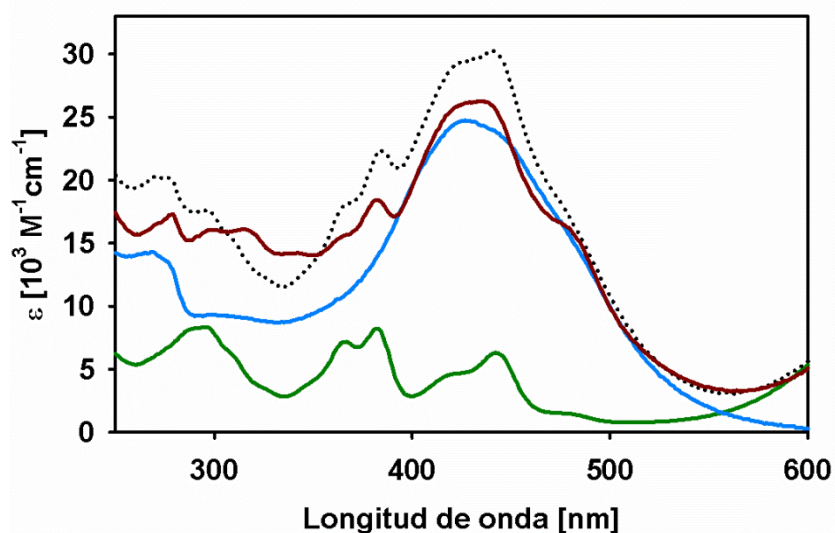


Fig. 5.3 Espectros de absorción en coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de DO13 (azul), IR780 (verde) y del producto de interés, "DO-IR" (rojo) y la suma de reactivos (punteada).

Es importante notar que la primera transición ubicada en la sección de la antena tiene una energía de transición cercana a las pequeñas bandas de la sección cianina, las cuales están asignadas a transiciones vibroelectrónicas entre el estado  $S_0$  y los estados  $S_2$ ,  $S_3$ ,  $S_4$  en moléculas del tipo de la IR-780.<sup>31</sup>

En el espectro del producto es notoria la presencia de las bandas de la cianina con máximos en 380 nm y 480 nm, en contraste con las bandas de 290 nm y 440 nm, cuya contribución al espectro del producto es un tanto menos notoria. Esto puede deberse a la orientación de los momentos dipolares de transición de los estados excitados de la cianina,<sup>31</sup> de tal forma que los cambios en el coeficiente de extinción debido al cambio estructural de la cianina es diferente para cada banda de absorción.

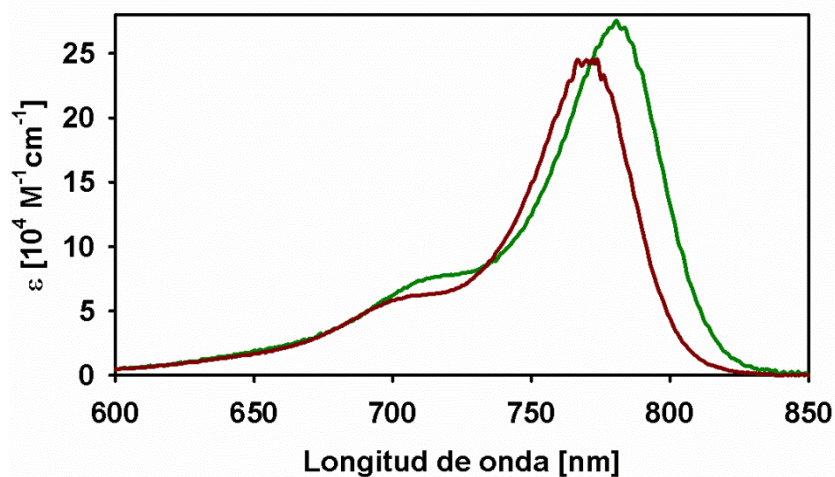


Fig. 5.4 Espectros de absorción en coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de IR780 (verde) y DO-IR (rojo).

La antena no presenta absorción arriba de los 600 nm, por lo que los cambios en esta región se deben solamente a los efectos de la sustitución en los estados excitados localizados en la cianina, lo que facilita su interpretación, además de que refuerza el sentido modular del diseño de la DO-IR.

Además del desplazamiento a menores longitudes de onda mencionado anteriormente, el máximo de la banda de absorción en el producto tiene un coeficiente de extinción molar de aproximadamente  $2.45 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , 10% menor al coeficiente de extinción reportado para el reactivo ( $2.74 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )<sup>14</sup>.

## 5.2.2 Espectros de Fluorescencia

Los espectros de emisión del producto muestran una banda de emisión el límite superior de la zona del visible (o inicio del infrarrojo cercano), con un máximo en 790 nm, 10 nm menor que la banda de emisión de la IR780. Este resultado va de acuerdo con el desplazamiento de la banda de absorción y confirma que la emisión detectada es la del producto deseado.

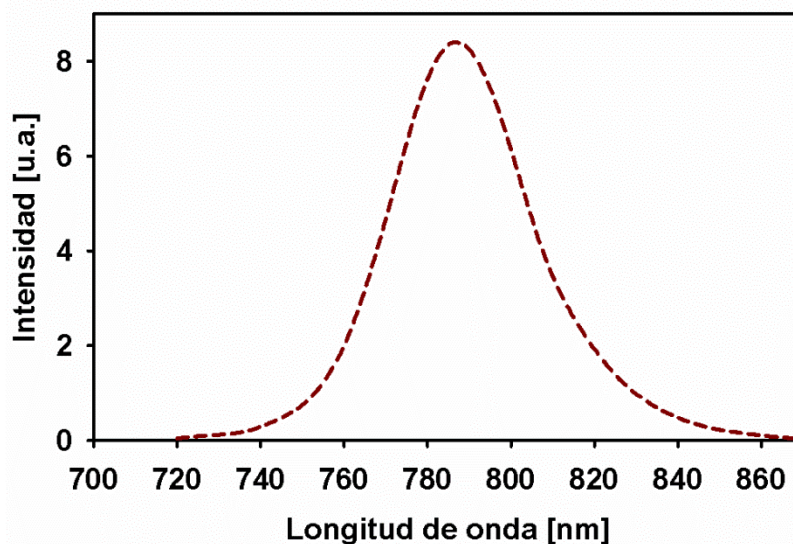


Fig. 5.5 Espectro de emisión de DO-IR excitando a 425 nm.

A continuación se describen los espectros de excitación de la muestra detectando en el máximo de emisión del producto y variando la longitud de onda de la luz de excitación. Este espectro es de especial importancia ya que nos permite demostrar la existencia de transferencia de energía entre la antena y la cianina al comparar el mismo con el espectro de absorción.



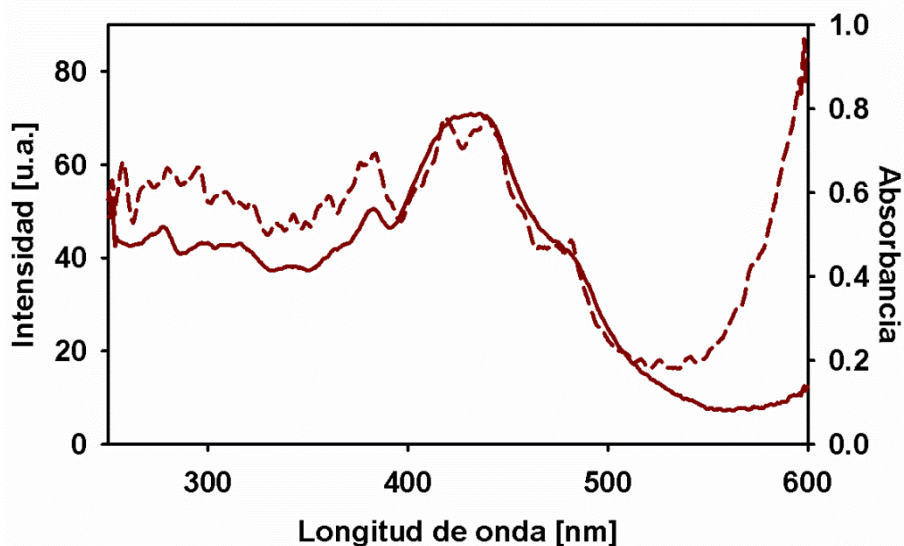


Fig. 5.6 Espectros de DO-IR de absorción (línea continua) y excitación detectando a 790 nm (línea punteada). Las escalas de las variables indicadas en los ejes verticales han sido ajustadas para poder comparar las señales relativas de los espectros de absorción y de excitación.

Como podemos notar, la forma general del espectro coincide en longitudes de onda menores a 500 nm. Debido a que la antena no emite en 790 nm, su contribución a la emisión en esa región sólo puede darse si transfiere energía a la cianina. En longitudes de onda mayores, a partir de aproximadamente 540 nm, se excita de manera directa al primer estado excitado de la molécula (es decir, una excitación directa en la transición centrada en la cianina), por lo que la señal del espectro de excitación se eleva rápidamente.

La diferencia entre las “formas” de los espectros de excitación y de absorción, es decir, las diferencias en la intensidad relativa de las señales a diferentes longitudes de onda de cada espectro, indica que eficiencia de la formación del estado fluorescente del sistema, del cual se detecta la emisión, no es independiente de la longitud de onda de excitación. Otra manera de decir lo anterior es la siguiente: en el espectro de la Fig. 5.6 se está graficando la señal de emisión a 790 nm, producida desde el primer estado excitado asociado al fragmento cianina, como función de la longitud de onda del haz de excitación, el cual forma diferentes tipos de estados electrónicos al excitar en diferentes regiones del espectro.

Dado que la señal medida es mayor a 600 nm que a 430 nm (lo cual es contrario a la absorbancia de la molécula, la cual es mayor a 430 nm que a 600 nm), puede afirmarse que el proceso de formación del estado emisor cuando se excita a 600 nm es más eficiente que cuando se excita a 430 nm. Sólo si la señal de emisión coincidiera en los espectros normalizados de la Figura 5.6, la eficiencia de formación del estado fluorescente sería la misma, independientemente de la longitud de onda con la que se produce la excitación, la cual puede darse en diferentes estados de distinta naturaleza.

Esta última observación puede tener múltiples orígenes. Uno de ellos corresponde a la posibilidad que la conversión interna de estados excitados superiores ( $S_n$  con  $n > 1$ ) ubicados en la cianina no sea 100% eficiente. Es decir, que no todos los estados excitados superiores asociados al cromóforo cianina, se relajen por conversión interna hasta el estado fluorescente, sino que existan canales que compitan con la conversión interna y limiten la formación del estado fluorescente a partir de estados superiores.

Para confirmar esta observación, se pueden normalizar los espectros de excitación y de absorción del cromóforo IR780 (que carece de la antena), en la banda de absorción del estado  $S_1$ , para comparar la intensidad de fluorescencia que se detecta cuando la excitación del primer estado excitado es directa y cuando es a través de los estados superiores por conversión interna.

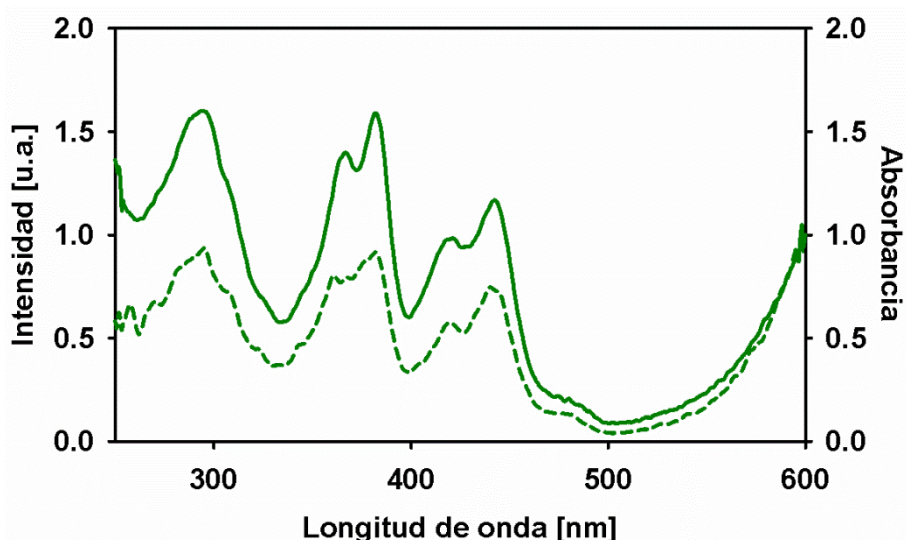


Fig. 5.7 Espectros de IR780 de absorción (línea continua) y excitación detectando a 800 nm (línea punteada) normalizados a 600 nm.

Dicho experimento se resume en la gráfica de la Fig. 5.7, en la cual se presenta el espectro de excitación de la IR780, detectando la emisión de su primer singulete excitado, el estado fluorescente. Podemos notar que la intensidad detectada es menor en la región de absorción de los estados superiores, lo que indica que efectivamente la conversión interna de los estados superiores al estado fluorescente en estas moléculas no tiene una eficiencia del 100%, y que parte de la energía absorbida se disipa por otros canales. Esto se ha reportado para otras cianinas, donde se ha comprobado que sus estados excitados superiores tienen tiempos de vida del orden de picosegundos, según se reporta en estudios previos de nuestro grupo de investigación.<sup>32</sup>

Una vez que hemos comprobado que esto es intrínseco de la cianina utilizada como reactivo y no depende de la presencia de la antena, podemos realizar el mismo procedimiento para la molécula sintetizada, normalizando su espectro de emisión y el de absorción en la zona de 600 nm.

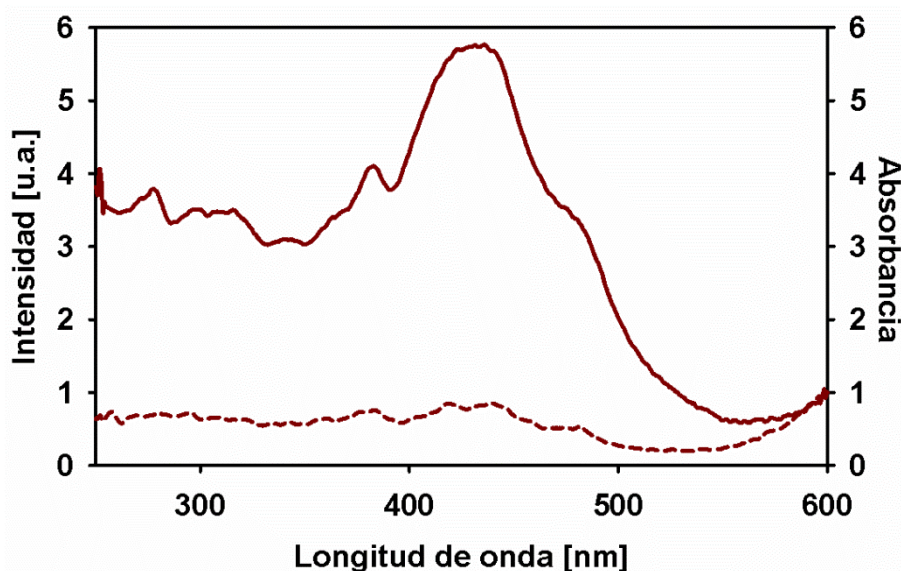


Fig. 5.8 Espectros de DO-IR de absorción (línea continua) y excitación detectando a 790 nm (línea punteada) normalizados a 600 nm.

La diferencia entre la de intensidad de fluorescencia detectada y su espectro de absorción es más marcada en el caso del producto. Esto se debe a dos razones:

1. La antena cuenta con el canal de fotosomerización al ser irradiada, por lo que parte de la energía que absorbe se pierde por este canal que compite con la transferencia de energía.

2. Como se comprobó previamente en la Figura 5.7, la conversión interna de los estados superiores al primer estado excitado de la cianina tampoco es cuantitativa, por lo que parte de la energía que la antena transfiere a estos estados se pierde por los otros canales de desactivación de la cianina.

Estos dos efectos se dan uno tras otro, funcionando como filtros que solo dejan pasar una fracción de la energía absorbida por la antena, por lo que la sensibilización de la cianina es relativamente baja. Parte de esto se debe a que buscamos que la antena precisamente presente otras propiedades de interés (ver introducción sobre aplicaciones en microscopia de super-resolución), pero en principio la intensidad de la fluorescencia detectada puede ser aumentada eligiendo cromóforos que no cuenten con canales de fotoisomerización.

Es de valor comparar los dos espectros de excitación, el de IR780 con el del producto de interés, DO-IR. Estos espectros se presentan en la Fig. 5.9, normalizados o escalados a la longitud de onda de 600 nm.

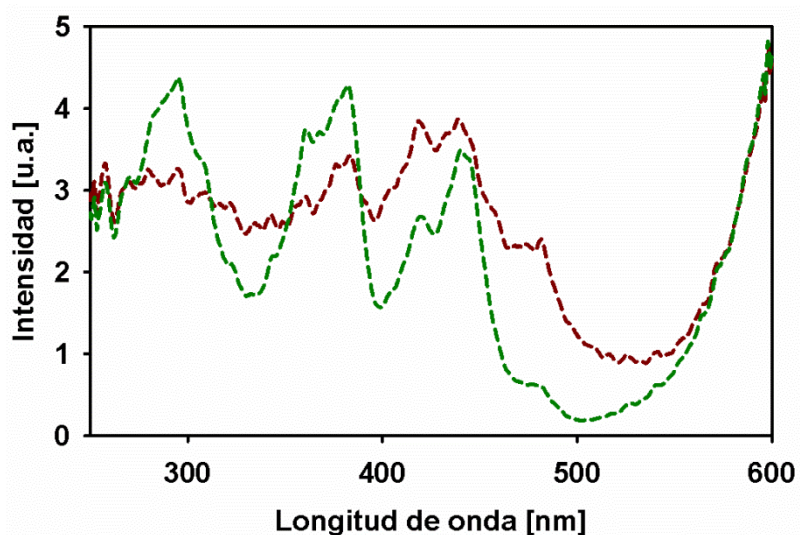


Fig. 5.9 Espectros de excitación de DOIR (rojo) e IR780 (verde) normalizados a 600 nm con respecto a sus coeficientes de extinción.

La intensidad detectada en la región de la banda del primer estado excitado, por encima de 550 nm, es muy similar en ambas moléculas. En longitudes de onda menores podemos observar que la intensidad máxima de los bandos de emisión del producto son menores en el producto, aunque la intensidad total, el área bajo la curva, es mayor en el producto.

La intensidad de fluorescencia detectada para cada longitud de onda de excitación en esta región tiene una contribución de la absorción directa de los estados excitados superiores del emisor y otra que proviene de la transferencia de energía de la antena. Si la contribución de los estados superiores tipo cianina fuera igual en el producto que el reactivo, la intensidad del espectro sería la suma del espectro del reactivo más la contribución de la antena, dando como resultado un espectro que sería mayor al espectro del reactivo en todos los puntos, lo que no sucede. Es de esperar que la intensidad detectada se menor debido a que la absorción de estos estados es menor en el producto, como se comprobó anteriormente con los espectros de absorción.

Hasta ahora, se han realizado comparaciones cualitativas de los espectros de fluorescencia. Para contabilizar la intensidad de la fluorescencia que se debe a la absorción de la antena es necesario calcular los rendimientos de fluorescencia del producto de interés.

### 5.2.3 Rendimientos Cuánticos de Fluorescencia

A continuación se presentan los rendimientos de fluorescencia de los reactivos y del producto calculados en el presente estudio utilizando cumarina 343 como referencia para la medición de la fluorescencia en la región de 400-550 nm y la IR780 para la emisión del producto DO-IR al excitar a 690 nm ( $\Phi_F = 0.076 \pm 0.005$ ).<sup>14</sup>

Se realizaron estas mediciones debido a que los valores obtenidos de las mismas nos permiten comparar de manera cuantitativa la eficiencia de los procesos de desactivación de las moléculas estudiadas, incluyendo la transferencia de energía intramolecular del cromóforo sintetizado.

Molécula	$\lambda_{excitación}$ [nm]	$\lambda_{detección}$ [nm]	$\Phi_F$	$\sigma$
<b>IR780</b>	370	400-550	$8 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-5}$
	400	720-870	0.019	0.002
<b>DO13</b>	370	400-550	$7 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-5}$
	370	400-550	$1 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-5}$
<b>DO-IR</b>	400	720-870	0.007	0.002
	690	720-870	0.071	0.004

Tabla 5.2 Rendimientos cuánticos de los reactivos y el producto

El rendimiento cuántico de fluorescencia del producto (0.071) es ligeramente menor al de la cianina de partida (0.076) cuando se excitan ambas moléculas directamente al estado fluorescente, debido a la sustitución del cloro por la antena.

Podemos observar que el rendimiento cuántico de la cianina IR780 detectando a 800 nm es menor cuando la molécula es excitada en los estados superiores (400 nm), aproximadamente solo un 25% del valor cuando se excita directamente el estado fluorescente. Esto es muy importante ya que nos confirma lo mencionado anteriormente: que si se forma directamente al primer estado excitado se obtiene 4 veces más fluorescencia que al formar los estados superiores.

El rendimiento de fluorescencia del estado  $S_1$  del producto DO-IR es menor que el de la cianina de partida IR780 cuando se excita la molécula a 400 nm. El valor máximo de este rendimiento depende de la eficiencia de la conversión interna de los estados superiores de la cianina, y de ahí disminuye conforme lo hace la eficiencia de la transferencia de energía.

Hay que tener en cuenta que la comparación entre la intensidad de fluorescencia no es un valor que podamos comparar directamente para medir el grado de sensibilización de la cianina, debido a que la cantidad misma de fotones absorbidos depende de varios factores. Por ejemplo, dos antenas que transfieran energía con la misma eficiencia tendrán el mismo rendimiento cuántico de fluorescencia, pero la que tenga el mayor coeficiente de extinción molar absorberá más fotones, dando como resultado una mayor intensidad de fluorescencia. Comparando la intensidad de fluorescencia por unidad de concentración ( $I/C$ ) de las moléculas en la solución podemos obtener una mejor idea de la sensibilización de la cianina. Estas medidas se realizaron por triplicado.

Molécula	$I/C / 10^8$	$\sigma / 10^8$
IR780	9.62	0.23
DO-IR	14.9	0.45

Tabla 5.3 Intensidad de fluorescencia por unidad de concentración excitando a 400 nm y detectando entre 720 y 870 nm.

La intensidad de la fluorescencia emitida por el estado  $S_1$  del producto por unidad de concentración del mismo es 1.55 veces mayor que la de la cianina de partida, confirmando lo observado al comparar los espectros de excitación de ambas moléculas.

En estos mismos espectros notamos que la intensidad de la fluorescencia proveniente de la absorción directa de los estados superiores de la cianina en el producto es menor que en la IR780, por lo que la intensidad de fluorescencia medida proveniente de la absorción de la antena debe ser mayor a la diferencia entre los dos valores de intensidad por unidad de concentración.

Detectando la fluorescencia emitida en la región de 400 a 550 nm la comparación es más complicada debido a que en esta región hay fluorescencia de la antena y del estado  $S_2$  del emisor.

Molécula	$I/C / 10^7$	$\sigma / 10^7$
<b>DO13</b>	2.25	0.43
<b>IR780</b>	1.51	0.07
<b>DO-IR</b>	4.27	0.02

Tabla 5.4 Intensidad de fluorescencia por unidad de concentración excitando a 370 nm y detectando entre 400 y 550 nm.

No podemos calcular la fluorescencia proveniente de la antena o el emisor en el producto de manera aislada, pero podemos observar que la intensidad detectada en el producto es mayor que la suma de las intensidades de los reactivos. Para explicar esto debemos tomar en cuenta que la competencia entre los canales de desactivación de la antena. En el reactivo DO13 la mayor parte de la energía absorbida se pierde por fotoisomerización, como puede apreciarse en su bajo rendimiento cuántico de fluorescencia. Cuando se encuentra como antena en el producto, parte de la energía que absorbe es transferida, disminuyendo el número de moléculas que fotoisomerizan y aumentando la cantidad de fluorescencia detectada de la cianina, lo que es prueba adicional de la existencia del canal de transferencia de energía a los estados excitados superiores de la cianina. Nótese que la evidencia más fuerte en este sentido es la semejanza del espectro de excitación con el de absorción para la DOIR en la zona de la banda asociada a la antena, según se indicó anteriormente.

El aumento en la intensidad de fluorescencia en el producto es útil para su uso en microscopía de fluorescencia, permitiendo mayor sensibilidad en el método. A esto se suma el desplazamiento de Stokes que presenta la molécula, el cual permite el uso de filtros que no dejen pasar el haz de excitación sin absorber emisión de la molécula y reduciendo el ruido de fondo.<sup>3</sup>

Es posible obtener una aproximación de la eficiencia de la transferencia de energía con los valores de los rendimientos de fluorescencia obtenidos. Para esto debemos tomar en cuenta que la intensidad de fluorescencia detectada en la región de interés, 800 nm, proviene del  $S_1$  de la cianina y se puede expresar como la suma de la intensidad de fluorescencia proveniente del canal de transferencia de energía de la antena y del canal de conversión interna de los estados superiores del emisor formados por absorción directa:

$$I_P = I_A + I_E \quad (5.1)$$

Donde  $I$  es la intensidad de fluorescencia total y los subíndices P, A y E se refieren al producto, a la antena y al emisor respectivamente. Sustituyendo la ecuación (3.22) en la (5.1) obtenemos:

$$\frac{I_R}{OD_R \Phi_R} (\Phi_P OD_P) = \frac{I_R}{OD_R \Phi_R} (\Phi_A OD_A + \Phi_E OD_E) \quad (5.2)$$

Donde el subíndice R indica el cromóforo de referencia, OD la absorbancia y  $\Phi$  el rendimiento de fluorescencia. Eliminando los términos iguales en ambos lados de la ecuación y teniendo en cuenta que la absorbancia del producto es la suma de la absorbancia de la antena más la del emisor:

$$\Phi_P OD_A + \Phi_P OD_E = \Phi_A OD_A + \Phi_E OD_E \quad (5.3)$$

Reordenando y despejando podemos obtener una ecuación para calcular el rendimiento de la fluorescencia detectada proveniente de los eventos de absorción en la antena  $\Phi_A$ :

$$\Phi_A = \frac{\left(\frac{OD_A}{OD_E} + 1\right) \Phi_P - \Phi_E}{\frac{OD_A}{OD_E}} \quad (5.4)$$



Donde  $\phi_p$  es el rendimiento de emisión total del producto a 800 nm,  $\phi_E$  es el rendimiento de fluorescencia del emisor una vez formado el estado excitado respectivo (tomando como referencia el rendimiento de la IR780), y  $\frac{OD_A}{OD_E}$  es la relación entre la absorbancia de la antena y la del emisor a la longitud de onda de excitación (de nuevo, tomando como referencia las absorbancias de IR780 y la del DO13 a 400 nm).

El valor de  $\phi_A$  representa el rendimiento de emisión de los casos donde la antena fue responsable de la absorción, y es el producto del rendimiento transferencia de energía  $\phi_{EET}$  por el rendimiento de emisión del estado al cual se transfiere la energía. Es decir:

$$\phi_{EET} = \frac{\phi_A}{\phi_E} \quad (5.5)$$

Se calcula la relación entre las absorbancias  $\frac{OD_A}{OD_E}$  a partir de los espectros de absorción de los reactivos y se asume que el rendimiento cuántico de fluorescencia de los estados superiores de la cianina  $\phi_E$  es igual en el producto y el reactivo. Sustituyendo estos en las ecuaciones anteriores obtenemos un valor de  $\phi_{EET} = 0.28 \pm 0.03$ .

La eficiencia de esta transferencia está en función de su competencia cinética con la fotoisomerización de la antena, y este valor nos indica que la relación entre las constantes de velocidad es de aproximadamente 1:4.

### 5.3 Espectroscopia con Resolución Temporal

Una vez demostrada la existencia de transferencia de energía de la antena hacia la cianina y que la fotoisomerización de la antena compite con el canal de transferencia de energía, debemos caracterizar las escalas de tiempo en las que ocurren estos dos fenómenos.

Para dicha caracterización se utilizó la técnica de resolución de fluorescencia de suma de frecuencias, detectando en la región de 500 nm para medir el tiempo de decaimientos del DO13 libre y unido a la cianina. La figura 5.10 indica la intensidad de fluorescencia en función del tiempo para el experimento donde se excita la DO13 (antena libre) a 400 nm, y se da seguimiento a su fluorescencia a 500 nm.

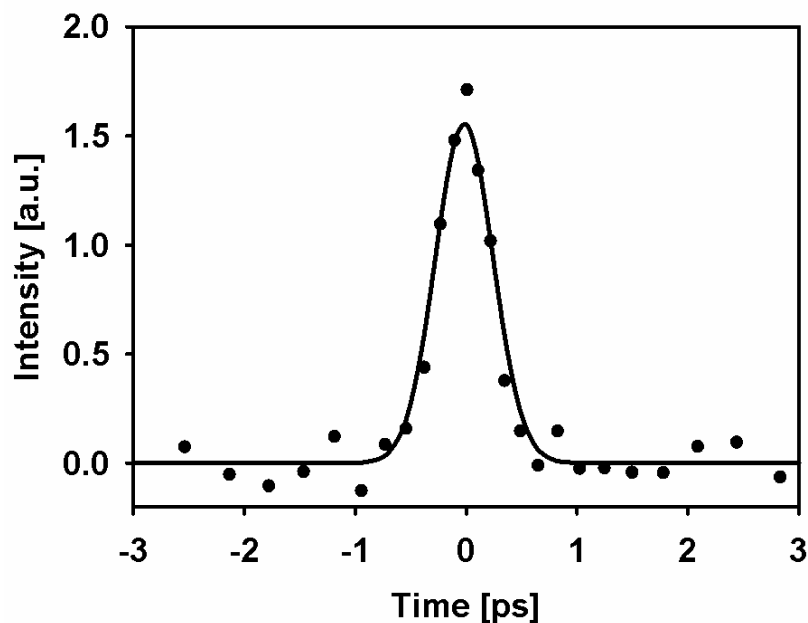


Fig. 5.10 Decaimiento del DO13 excitando a 400 nm y detectando a 500 nm.

El tiempo de vida del estado excitado de la DO13 obtenido de la medición puede caracterizarse como menor a los 200 fs, y es de hecho es menor que la resolución de la técnica, por lo que no podemos dar un valor exacto del mismo sino que se indica el límite superior de su valor (200 fs). Dicho valor para esta molécula no se encuentra reportado en la literatura, pero se puede comparar con el caso del azobenceno, el cual presenta un tiempo de vida del estado excitado es del orden de 170 fs.<sup>33</sup>

Teniendo en cuenta este valor, y de acuerdo a la ecuación (3.18), la constante cinética del decaimiento de la antena es mayor a  $5 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$ .

La figura 5.11 muestra el mismo experimento, pero ahora para el producto DO-IR. Esta traza de intensidad de fluorescencia contra el tiempo nos indica que nuevamente el decaimiento corresponde a un tiempo vida menor a 200 fs.

Debido a que la constante cinética de decaimiento total de la población de estados excitados de la antena es la suma de la constante del proceso de fotoisomerización más la constante asociada al proceso de transferencia de energía, la constante total es mayor o igual a  $5 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$ .

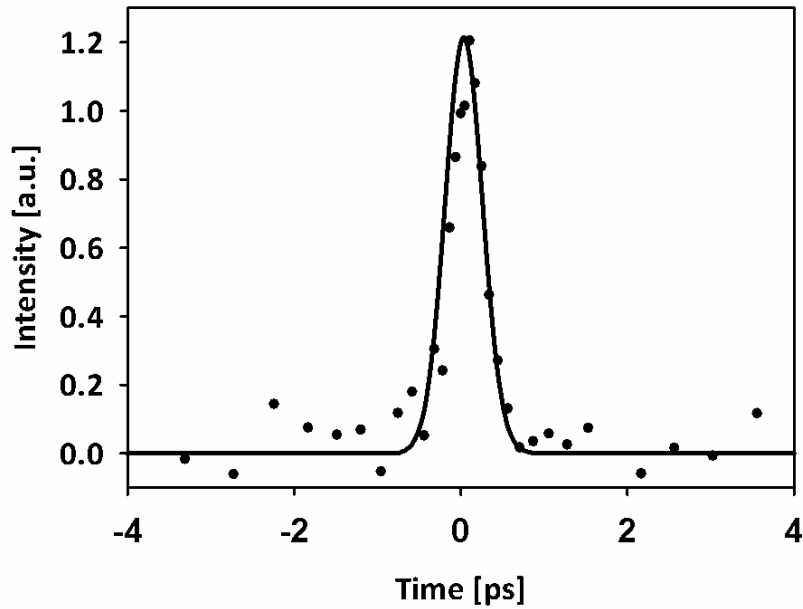


Fig. 5.11 Decaimiento del DO-IR excitando a 400 nm y detectando a 500 nm.

Es posible medir también el decaimiento del estado excitado fluorescente de la cianina, utilizando la técnica de TCSPC, detectando la fluorescencia emitida en la región de 800 nm cuando las moléculas son excitadas en la región de 403 nm. En las gráficas se presenta en línea continua el decaimiento que mejor se ajusta a los datos experimentales, presentados como círculos. Se muestran sólo uno de cada diez puntos obtenidos para que se pueda apreciar mejor la tendencia.

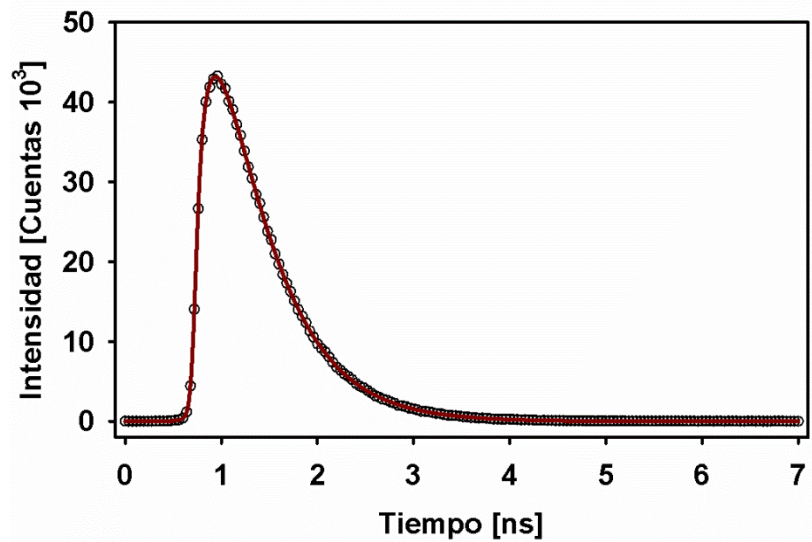


Fig. 5.12 Decaimiento de la intensidad de fluorescencia de IR780 excitando a 403 nm y detectando a longitudes de onda mayores a 780 nm.

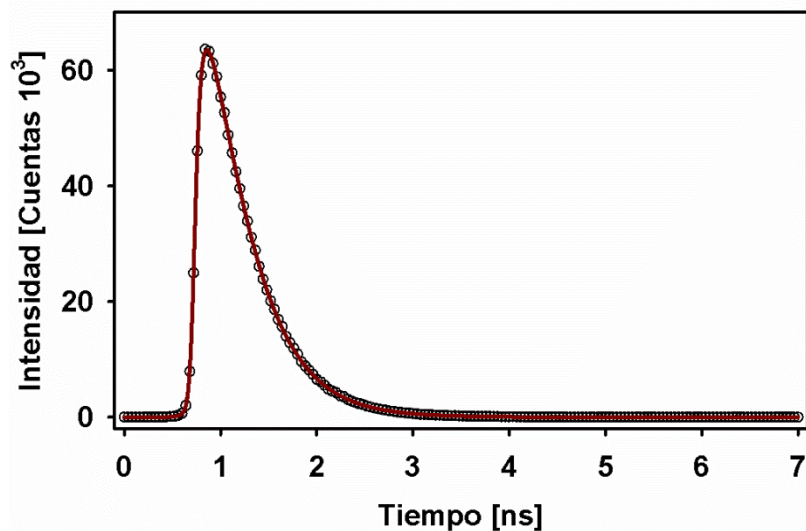


Fig. 5.13 Decaimiento de la intensidad de fluorescencia de DO-IR excitando a 403 nm y detectando a longitudes de onda mayores a 780 nm.

Ambas moléculas presentan decaimientos multiexponenciales debido a su tamaño y múltiples grados de libertad vibracional. Normalizando los factores pre-exponenciales de los decaimientos presentes se encuentra que existe uno que domina el comportamiento de la molécula, con un factor mayor al 0.9, y es este el que se compara entre los compuestos.

El estado emisor de la IR780 tiene un tiempo de vida de  $0.5109 \pm 0.0009$  ns, mientras que el decaimiento del producto DO-IR es de  $0.3659 \pm 0.0007$  ns. Debido a que la presencia de la antena no agrega ningún canal de desactivación que compita con la emisión de fluorescencia en esta región, este cambio debe ser provocado por los mismos factores que afectan el máximo de emisión de la cianina y su coeficiente de extinción, derivados de la sustitución del cloro de su estructura.

## 5.4 Transferencia de Energía

Con las mediciones espectroscópicas obtenidas previamente se puede utilizar la teoría de Förster para estimar la constante de velocidad de la transferencia de energía de la antena a la cianina de acuerdo a una teoría física simple y con ello, contextualizar los resultados anteriormente descritos. Estos valores nos sirven como parámetros para el diseño de cromóforos similares al sintetizado en este trabajo, además de para correlacionar el resultado experimental con una teoría que lo podría describir.

En incisos anteriores se calculó el rendimiento de fluorescencia de los reactivos y el producto, así como el tiempo de vida del estado excitado de la antena. Para utilizar la ecuación (3.10) requerimos conocer el traslape espectral y el factor de orientación relativo entre las moléculas. A continuación se presentan el espectro normalizado de la fluorescencia de la antena y el espectro de absorción de la cianina.

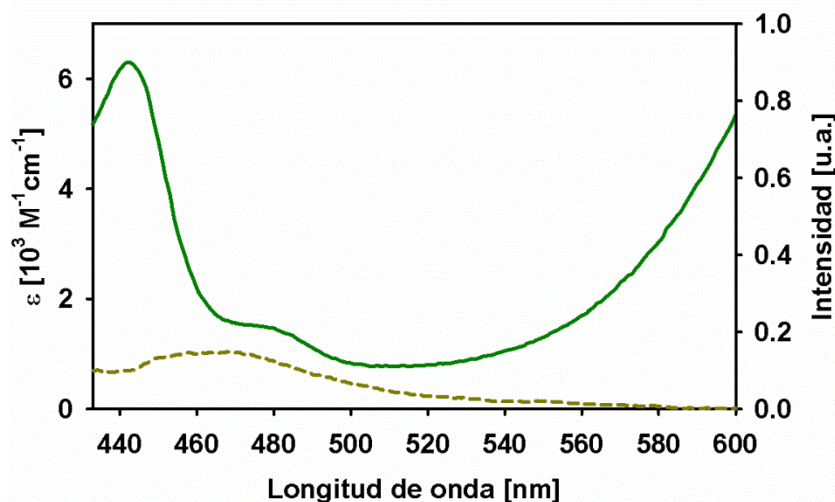


Fig. 5.14 Espectros de absorción de la IR780 (verde) y espectro de emisión normalizado de DO13 (naranja).

Utilizando la ecuación (3.11), se obtiene un valor para el traslape espectral de  $J_{a-a} = 1.18 \times 10^{-14}$ .

El otro factor, la orientación entre los dipolos de transición de los fragmentos, requiere en nuestro caso de que se conozca la geometría de la molécula en el estado basal debido a que la antena y emisor se encuentran unidos covalentemente.

Para estimar las distancias y los ángulos de la ecuación 3.11 se consideró el modelo molecular de la figura 5.15. Tanto la antena como el emisor se corresponden a fragmentos planos debido a la aromaticidad y conjugación extendida en ambos fragmentos. Podemos observar que los enlaces dobles de la cadena de la cianina se encuentran en configuración trans en el modelo. Recordando también que los espectros de RMN indicaban que los metilos unidos al sistema aromático terminal se encontraban por encima del anillo bencénico de la antena, debido al desplazamiento químico de los mismos, podemos observar que la geometría calculada presenta este comportamiento.

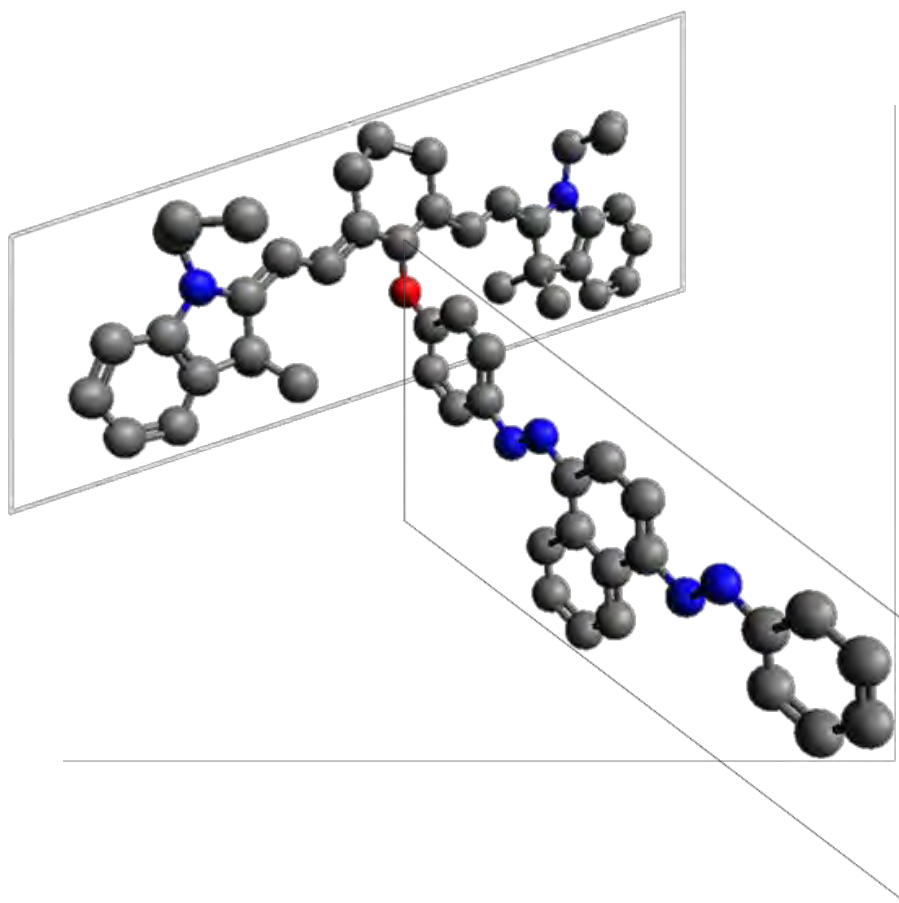


Fig. 5.15 Geometría optimizada del producto DO-IR. El cálculo se realizó empleando el paquete Gaussian 09<sup>34</sup>, con el método PM6 no restringido, con carga +1.

Es importante mencionar que el resultado de la estimación de la constante cinética del proceso de transferencia de energía no es altamente sensible a los detalles del modelo. En particular, variaciones del orden de hasta 10% en las distancias y ángulos que indica el modelo, tienen un efecto de menos del 20% en los resultados predichos por el modelo de Förster en este caso.

El dipolo de transición de la antena se encuentra ubicada a lo largo de esta sección de la molécula,<sup>11</sup> y se puede calcular el ángulo que se forma partir del modelo empleado, obteniendo un valor de  $\theta_D = 14.5^\circ$ .

El dipolo de transición del estado excitado  $S_1$  se encuentra a lo largo de la cadena de la cianina,<sup>35</sup> mientras que los estados superiores deben encontrarse paralelos o perpendiculares al mismo, en el plano de la molécula.

Un estudio realizado en cianinas similares nos arroja datos más precisos de ángulos de los estados excitados superiores de la cianina.<sup>31</sup> Considerando un ángulo de 41° para el dipolo del estado S<sub>2</sub> de la cianina, obtenemos un  $\theta_A = 63.1^\circ$  y un  $\theta_{DA} = 75.1^\circ$ . El factor de orientación calculado es de  $\Gamma^2 = 1.12$ . La aproximación de orientaciones aleatorias ( $\Gamma^2 = 2/3$ ) sería la mejor aproximación en el caso de no conocer los ángulos de los dipolos. Sustituyendo los valores obtenidos en la ecuación (3.10), (3.18) y (3.21) obtenemos:

$\Gamma^2$	$k_{EET} (s^{-1})$	$\tau_{EET} (s)$	Eficiencia %
<b>1.12</b>	$>3.4 \times 10^{12}$	$<2.9 \times 10^{-13}$	40.7
<b>0.66</b>	$>2.0 \times 10^{12}$	$<4.9 \times 10^{-13}$	28.9

Tabla 5.5 Eficiencia, constante de velocidad y tiempo de vida de la transferencia de energía en el producto DO-IR estimados a través de la teoría de Förster.

La eficiencia calculada por este método es muy cercana a la calculada con los rendimientos cuánticos en incisos anteriores. La variación entre los valores se debe a las aproximaciones tomadas en cada uno de los métodos utilizados. La incertidumbre en la medición del rendimiento cuántico del donador es la principal fuente de error en el cálculo de la constante cinética, el cual es del 29%.

La constante de velocidad calculada es del orden de la constante de velocidad de isomerización del DO13 como se había previsto. La magnitud de la misma se debe principalmente a la cercanía entre la antena y el emisor, los cuales se encuentran separados solo por un par de enlaces en el producto. Gracias a esto, es posible que la transferencia de energía compita con la fotoisomerización de la antena. Esta constante puede modificarse alargando la distancia entre los fragmentos de la molécula, cambiando el factor de orientación o el rendimiento cuántico de fluorescencia del donador, lo que permite varias variables de diseño para nuevos cromóforos.

Este valor, junto el tiempo de vida de la antena, son importantes debido a que eficiencia de la transferencia de energía depende de ellos. La constante de velocidad de la fotoisomerización es independiente en cada cromóforo que pueda ser utilizado como antena, por lo que puede ser necesario modular la velocidad de la transferencia en algunos casos. El tiempo de vida de la antena no se vio afectado de manera importante en nuestro estudio, por lo que en principio debe ser posible prever y optimizar la eficiencia de la transferencia de energía desde el diseño de los cromóforos.

## 6. Conclusiones

- Se sintetizó con buenos rendimientos la molécula propuesta, optimizando la metodología empleada. El método propuesto se está utilizando con buenos resultados para sintetizar otros cromóforos similares en el laboratorio del grupo de investigación.
- Las propiedades ópticas de la antena y del emisor en el producto son comparables a las propiedades de los reactivos utilizados. Las pequeñas variaciones observadas pueden asociarse a la modificación de los grupos funcionales al formar el enlace entre las moléculas debido a que estos grupos se encontraban unidos directamente a la parte de las moléculas responsable de su absorción y emisión. Estos cambios y la magnitud medida de los mismos nos sirven como parámetros en el diseño de moléculas análogas e indican que en principio es posible predecir las propiedades del cromóforo sintetizado a partir de las de los precursores.
- Los dos fragmentos se comportan aproximadamente como cromóforos independientes en el producto. Esto se debe a que el enlace éter no permite que haya conjugación entre los mismos, lo que permite que el sistema pueda presentar transferencia de energía intramolecular
- Existe transferencia de energía intramolecular entre los fragmentos de la molécula sintetizada, dando como resultado un pseudo-corrimiento de Stokes de aproximadamente 400 nm, lo que permite el uso de filtros que impidan el paso del haz de excitación sin absorber parte de la fluorescencia de la muestra.
- La transferencia de energía en la molécula se da a los estados excitados superiores del emisor (cianina), dando una mayor libertad al escoger las antenas donadoras de tal forma que absorban en distintas partes del espectro visible. Esto permite obtener una familia de moléculas que emita en la misma región del espectro pero sean excitadas a diferentes longitudes de onda para su uso en imágenes multicolor de fluorescencia.



- Cuando se irradia la muestra en la región de 400 nm la intensidad de la fluorescencia detectada por unidad de concentración en el producto es mayor que en el reactivo. Esto resulta útil en microscopía de fluorescencia, permitiendo una mayor sensibilidad en la técnica.
- La transferencia de energía de la antena al emisor tiene una eficiencia de  $28 \pm 3\%$  en el producto. Debido a esto, es posible aprovechar parte de la energía absorbida por la antena sin evitar que la fotoisomerización de la misma, lo que en principio permitiría aprovechar esta propiedad de la antena en el producto para otras aplicaciones.
- Es posible utilizar como antenas moléculas con rendimientos cuánticos de fluorescencia del orden de  $10^{-4}$  y constantes de velocidad de fotoisomerización de  $5 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$  en la síntesis de cromóforos análogos al obtenido. Esto implica que se cuenta con una mayor selección de precursores para el diseño de estos cromóforos.
- La constante de velocidad de la fotoisomerización de la antena no se modifica de manera significativa en el producto, por lo que es necesario que la constante de la transferencia de energía sea del mismo orden de magnitud. Se debe tener en cuenta la competencia cinética entre los dos procesos para el diseño de nuevos cromóforos que puedan servir como “switches” moleculares, por ejemplo, si se utilizan antenas cuya constante de velocidad de fotoisomerización sea menor a la del compuesto utilizado en el presente estudio, se requerirá modificar la constante de velocidad de la transferencia de energía para evitar un bajo rendimiento de isomerización.
- Se logró sintetizar el cromóforo planteado en los objetivos, el cual nos ha permitido demostrar la transferencia de energía entre un fragmento antena que presenta fotoisomerización al absorber luz visible y un fragmento que emite en el infrarrojo, así como estudiar los parámetros de interés para el diseño de moléculas similares.

## 7. Referencias

1. Requena, A.; Zúñiga, J. *Espectroscopía*. Pearson Prentice Hall: Madrid, 2004
2. Klessinger, M.; Michl, J. *Excited States and Photochemistry of Organic Molecules*. VCH Publishers: USA, 1995
3. Lacowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Third ed.; Springer: New York, 2006
4. Parson, W. W. *Modern Optical Spectroscopy: With Exercises and Examples from Biophysics and Biochemistry*. Springer: 2007
5. Saini, S.; Singh, H.; Bagchi, B. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) in chemistry and biology: Non-Förster distance dependence of the FRET rate. *J Chem Sci* **2006**, *118*, 23-35
6. Dexter, D. L. A Theory of Sensitized Luminescence in Solids. *The Journal of Chemical Physics* **1953**, *21*, 836-850
7. Kienzler, M. A.; Reiner, A.; Trautman, E.; Yoo, S.; Trauner, D.; Isacoff, E. Y. A Red-Shifted, Fast-Relaxing Azobenzene Photoswitch for Visible Light Control of an Ionotropic Glutamate Receptor. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 17683-17686
8. Whitten, D. G.; Wildes, P. D.; Pacifici, J. G.; Irick, G. Solvent and substituent on the thermal isomerization of substituted azobenzenes. Flash spectroscopic study. *Journal of the American Chemical Society* **1971**, *93*, 2004-2008
9. Siewertsen, R.; Neumann, H.; Buchheim-Stehn, B.; Herges, R.; Näther, C.; Renth, F.; Temps, F. Highly Efficient Reversible Z-E Photoisomerization of a Bridged Azobenzene with Visible Light through Resolved S1( $n\pi^*$ ) Absorption Bands. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 15594-15595
10. Kim, H.-B.; Yoshida, S.; Miura, A.; Kitamura, N. Microspectroscopic Analyses of Dye Distribution Characteristics in Single Microcapsules. *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 111-116
11. Ishitobi, H.; Sekkat, Z.; Kawata, S. Ordering of azobenzenes by two-photon isomerization. *The Journal of Chemical Physics* **2006**, *125*, -
12. Mortimer, M.; Taylor, P.; Chemistry, R. S. o.; University, O. *Chemical Kinetics and Mechanism*. Royal Society of Chemistry: 2002
13. Park, J. W.; Kim, Y.; Lee, K.-J.; Kim, D. J. Novel Cyanine Dyes with Vinylsulfone Group for Labeling Biomolecules. *Bioconjugate Chemistry* **2012**, *23*, 350-362
14. Chapman, G.; Henary, M.; Patonay, G. The Effect of Varying Short-Chain Alkyl Substitution on the Molar Absorptivity and Quantum Yield of Cyanine Dyes. *Analytical Chemistry Insights* **2011**, *6*, 29-36
15. Kaloyanova, S.; Trusova, V. M.; Gorbenko, G. P.; Deligeorgiev, T. Synthesis and fluorescence characteristics of novel asymmetric cyanine dyes for DNA detection. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2011**, *217*, 147-156
16. Li, C.; Wang, D.; Dong, H.; Xie, Z.; Hong, H. Proteomics of a toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* DH01: Detection and identification of cell surface proteins using fluorescent labeling. *Chin. Sci. Bull.* **2012**, *57*, 3320-3327
17. Fu, N.; Xiong, Y.; Squier, T. C. Optimized Design and Synthesis of a Cell-Permeable Biarsenical Cyanine Probe for Imaging Tagged Cytosolic Bacterial Proteins. *Bioconjugate Chemistry* **2013**, *24*, 251-259
18. Zhang, C.; Liu, T.; Su, Y.; Luo, S.; Zhu, Y.; Tan, X.; Fan, S.; Zhang, L.; Zhou, Y.; Cheng, T., *et al.* A near-infrared fluorescent heptamethine indocyanine dye with preferential tumor accumulation for in vivo imaging. *Biomaterials* **2010**, *31*, 6612-6617

19. Dempsey, G. T.; Vaughan, J. C.; Chen, K. H.; Bates, M.; Zhuang, X. Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging. *Nat Meth* **2011**, *8*, 1027-1036
20. John, R. A.; Stephen, T. R.; Michael, W. D. Single molecule localization microscopy for superresolution. *Journal of Optics* **2013**, *15*, 094001
21. Yepeng, L.; QiuHong, Y.; Yumei, X.; Shaofeng, D.; Shuang, C.; Forrest, M. L. A sensitive near-infrared fluorescent probe for caspase-mediated apoptosis: Synthesis and application in cell imaging. *Drug Discoveries & Therapeutics* **2011**, *5*, 220-226
22. Abramczyk, H. *Introduction to Laser Spectroscopy*. Elsevier Science: 2005
23. del Coso, R.; Solis, J. Relation between nonlinear refractive index and third-order susceptibility in absorbing media. *J. Opt. Soc. Am. B* **2004**, *21*, 640-644
24. Demtröder, W. *Laser Spectroscopy: Basic Concepts and Instrumentation*. Springer: 2003
25. O'Connor, D. *Time-correlated single photon counting*. Elsevier Science: 1984
26. Sundström, V.; Gillbro, T. Viscosity dependent radiationless relaxation rate of cyanine dyes. A picosecond laser spectroscopy study. *Chemical Physics* **1981**, *61*, 257-269
27. Draney, D.; Lugade, A.; Narayanan, N. Cyanine dyes. Google Patents: 2004.
28. Samanta, A.; Vendrell, M.; Das, R.; Chang, Y.-T. Development of photostable near-infrared cyanine dyes. *Chemical Communications* **2010**, *46*, 7406-7408
29. Yuan, L.; Lin, W.; Zhao, S.; Gao, W.; Chen, B.; He, L.; Zhu, S. A Unique Approach to Development of Near-Infrared Fluorescent Sensors for in Vivo Imaging. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 13510-13523
30. Heseck, D.; Lee, M.; Noll, B. C.; Fisher, J. F.; Mobashery, S. Complications from Dual Roles of Sodium Hydride as a Base and as a Reducing Agent. *The Journal of Organic Chemistry* **2009**, *74*, 2567-2570
31. Fu, J.; Padilha, L. A.; Hagan, D. J.; Van Stryland, E. W.; Przhonska, O. V.; Bondar, M. V.; Slominsky, Y. L.; Kachkovski, A. D. Experimental and theoretical approaches to understanding two-photon absorption spectra in polymethine and squaraine molecules. *J. Opt. Soc. Am. B* **2007**, *24*, 67-76
32. Guarin, C. A.; Villabona-Monsalve, J. P.; López-Arteaga, R.; Peon, J. Dynamics of the Higher Lying Excited States of Cyanine Dyes. An Ultrafast Fluorescence Study. *The Journal of Physical Chemistry B* **2013**, *117*, 7352-7362
33. Schultz, T.; Quenneville, J.; Levine, B.; Toniolo, A.; Martínez, T. J.; Lochbrunner, S.; Schmitt, M.; Shaffer, J. P.; Zgierski, M. Z.; Stolow, A. Mechanism and Dynamics of Azobenzene Photoisomerization. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 8098-8099
34. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A., *et al.* *Gaussian 09*, Revision A.02; Gaussian, Inc.: Wallingford CT, 2009
35. Lepkowicz, R. S.; Cirloganu, C. M.; Przhonska, O. V.; Hagan, D. J.; Van Stryland, E. W.; Bondar, M. V.; Slominsky, Y. L.; Kachkovski, A. D.; Mayboroda, E. I. Absorption anisotropy studies of polymethine dyes. *Chemical Physics* **2004**, *306*, 171-183