



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

ABSORCIÓN BIFOTÓNICA EN NANOCRISTALES CON TRANSFERENCIA DE  
ENERGÍA A HEMICIANINAS EN FORMA DE AZIDA PARA CONVERSIÓN A UNA  
ESPECIE FLUORESCENTE

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. LUIS GUTIERREZ ARZALUZ

DR. JORGE PEÓN PERALTA  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE 2018



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**ABSORCIÓN BIFOTÓNICA EN NANOCRISTALES CON TRANSFERENCIA DE ENERGÍA A HEMICIANINAS EN FORMA DE AZIDA PARA CONVERSIÓN A UNA ESPECIE FLUORESCENTE**

**TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**M. en C. LUIS GUTIÉRREZ ARZALUZ**

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



Ciudad de México, septiembre 2018.

# Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias Químicas, por permitirme pertenecer a esta gran familia.

Al Dr. Jorge Peón Peralta por permitirme pertenecer a su grupo y por todas sus enseñanzas y consejos para el desarrollo de este y otros proyectos.

Al CONACyT por la beca otorgada (257981) para la realización de mis estudios de doctorado. Y por el apoyo a los proyectos de ciencia básica 220392 y Fronteras de la ciencia 179.

A PAPIIT-UNAM por el apoyo al proyecto IN212814. A los recursos de supercómputo del proyecto LANCAD-UNAM-DGTIC-210.

Al Dr. Fernando Cortés Guzmán por estar siempre presente y dispuesto a ayudar de más de una manera y en más de una ocasión.

A los integrantes del comité tutor, el Dr. Mayo Villagrán Muniz y la Dra. Norma Angélica Macías Ruvalcaba por su apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

A los integrantes del jurado:

Dra. Alicia Negrón Mendoza

Dr. José Ignacio Jiménez Mier y Terán

Dr. Miguel Antonio Costas Basín

Dr. Carlos Amador Bedolla

Dr. Mayo Villagrán Muniz

por sus comentarios y aportaciones que enriquecieron en gran medida este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Rafael López, Jesús Rodríguez, Andrés Arroyo, César Guarín, Andrea Cadena, Beatriz González, Mario González; por su compañía en estos años.

A mi familia por su apoyo incondicional durante todo este camino.

A mis amigos por acompañarme en este periodo de mi vida.

A los técnicos de laboratorio: I.Q. Luis Velasco Ibarra y Dr. Francisco Javier Pérez Flores de espectrometría de masas, M. en C. Lucía del Carmen Márquez Alonso y M. en C. Everardo Tapia Mendoza por los análisis HPLC-MS.

*A mis padres, a mis hermanas y a mis abuelos.*

*Este proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Espectroscopía Láser del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Jorge Peón Peralta.*

La publicación derivada de los estudios doctorales es:

Gutiérrez-Arzaluz, L., López-Arteaga, R., Cortés-Guzmán, F., Peon, J. (2017) *Nitrated Fluorophore Formation upon Two-Photon Excitation of an Azide with Extended Conjugation*. J. Phys. Chem. B, 121, 9910-9919.

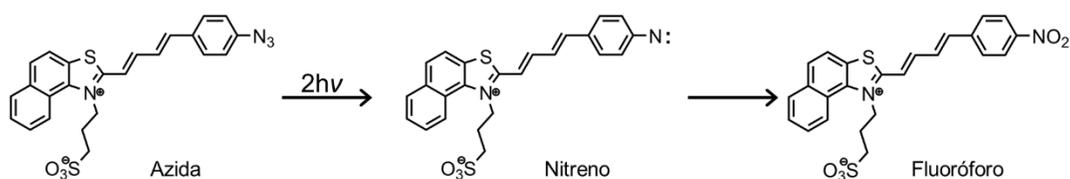
Los resultados de este trabajo se presentaron en:

- *“Two-Photon induced Azide Fluorogen Conversion”*. The 13th Femtochemistry Conference. Cancún, México. 2017. Póster.
- *“Conversión de un Fluorógeno tipo Azida inducida por Absorción Bifotónica”*. Ultrafast Optics School and the Optics, Photonics and Upcoming Methods & Applications Conference. Cdmx, México. 2017. Póster.
- Simposios internos del Instituto de Química de la UNAM los años 2014-2017.

# Resumen

El uso de compuestos fotoactivables como marcadores fluorescentes ha sido explorado en los últimos años. Variables como la longitud de onda empleada y el tipo de fuente de radiación necesaria están relacionadas con la estructura molecular del fluorógeno. Así, el desarrollo e implementación de nuevos sistemas capaces de realizar transformaciones después de absorber luz, resulta de gran interés. Algunos retos por superar en este ámbito son lograr un mayor control espacial y la selectividad de la transformación.

En este trabajo se diseñó y estudió un fluorógeno basado en un esqueleto de hemicianina con un grupo azida unido a un sistema con conjugación extendida capaz de llevar a cabo una transformación inducida por la absorción simultánea de dos fotones. El compuesto 2-(4-(4-azidofenil)buta-1,3-dien-1-il)-1-(1-sulfonato)propilnafto[1,2-*d*]tiazolio (hCy-N<sub>3</sub>) que se sintetizó y evaluó en este estudio fue diseñado para generar una especie fluorescente después de liberar N<sub>2</sub> mediante una ruptura fotoinducida del grupo azida. El nitreno entonces generado reacciona con moléculas en el medio dando lugar a una molécula altamente fluorescente. En este sistema, el fluoróforo obtenido es la especie con un grupo nitro (-NO<sub>2</sub>), formado a partir de reacciones con O<sub>2</sub> disuelto en el medio.



*Hemicianina en forma de azida estudiada.*

La capacidad de la azida para generar una especie fluorescente fue probada usando un láser continuo de 405 nm para inducir la transformación. La generación del fluoróforo y la desaparición de la azida fueron monitoreadas por medio de espectroscopía de fluorescencia y absorción, respectivamente. La cantidad de molécula transformada puede ser controlada mediante el tiempo o la intensidad de irradiación. Al no apreciar una acumulación significativa de la especie fluorescente irradiando con otra

fente de 460 nm, se encontró una participación de estados electrónicos excitados superiores ( $S_n, n > 1$ ) en el proceso de disociación fotoquímica del grupo azida. Este resultado fue apoyado con estudios computacionales que muestran al estado  $S_2$  como disociativo para el enlace  $-N-N_2$ . El papel de estados excitados superiores en la ruptura del grupo azida también explican el rendimiento de obtención del fluoróforo de  $1.4 \times 10^{-4}$ , debido a la competencia cinética entre otros canales de desactivación del estado  $S_2$ .

La especie fluorescente generada posterior a la fotodisociación del grupo azida fue identificada como la forma nitrada empleando la técnica de conteo de fotones individuales correlacionados en tiempo. También se logró comprobar la formación del compuesto mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas. La molécula en su forma nitro presenta un rendimiento de fluorescencia atípicamente alto ( $\Phi_F = 0.7$ ) en comparación con otros compuestos nitroaromáticos ( $\Phi_F < 10^{-4}$ ). Este inusual comportamiento fue explicado con el modelado computacional de la molécula. Para ésta, el compuesto en su forma nitro el canal de desactivación de cruce entre sistemas, muy común en compuestos aromáticos nitrados, está desfavorecido o prohibido por la falta de coincidencia energética de un triplete receptor,  $T_n$ , con el estado emisor ( $S_1$ ). Además, se encontró la generación de un estado con carácter de transferencia de carga en la molécula después de absorber radiación. Este estado es estabilizado por el disolvente, disminuyendo aún más la posibilidad de una desactivación no radiativa hacia un estado triplete.

La transformación de hCy- $N_3$  mediante la absorción simultánea de dos fotones se comprobó empleando un láser de pulsos con duración de femtosegundos centrada en 800 nm. Esto se corroboró al observar una dependencia cuadrática de la cantidad de moléculas fluorescentes generadas como función de la intensidad de la irradiación. Dicho fenómeno tiene la ventaja de permitir un alto control espacial (del orden de un femtolitro) y temporal de la conversión. Además, permite uso de fuentes de radiación en el infrarrojo cercano, menos perjudiciales para tejidos y células.

Finalmente, la presencia de nanocristales o puntos cuánticos (QDs) de sulfuro de cadmio como antenas bifotónicas fue evaluada respecto a su capacidad de incrementar

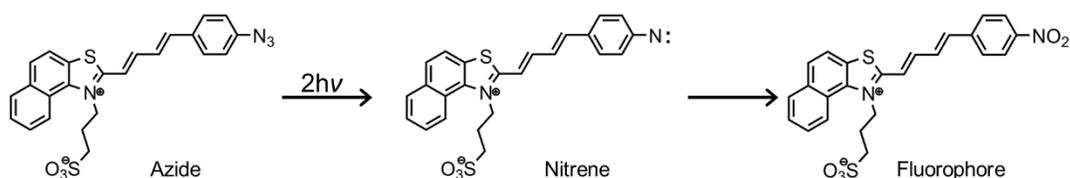
la absorción no-lineal del sistema. Debido a su alto coeficiente de absorción bifotónica, los QDs son capaces de incrementar el rendimiento de disociación de hemicianinas en forma de azida ancladas a su superficie al transferir la energía absorbida. El aumento en la producción de la especie fluorescente en el sistema punto cuántico/azida fue del doble comparado con hCy-N<sub>3</sub> aislada bajo las mismas condiciones de irradiación. El fluoróforo generado en este caso es el mismo que en los experimentos anteriores, el compuesto nitrado.

El sistema presentado en este trabajo brinda un modelo de moléculas orgánicas pequeñas capaces de funcionar como fluorógenos activados mediante absorción de dos fotones empleando luz en el infrarrojo cercano. La eficiencia en la conversión de esta molécula aumenta hasta el doble al unirse a puntos cuánticos de CdS que desempeñan el papel de antenas bifotónicas. Los resultados del estudio de la hemicianina en forma de azida ofrecen una pauta para el diseño de marcadores fotoactivables con un gran control temporal y espacial en tres dimensiones utilizando fuentes de radiación láser pulsada en el infrarrojo cercano comercialmente disponibles.

# Abstract

Photoactivatable compounds as fluorescent probes have been explored in the last years. There are some design variables as used wavelength and the adequate irradiation source are closely related to fluorogen chemical structure. Thus, the development and implementation of new molecular systems capable of undergoing a transformation upon light absorption are appealing. Some challenges to overcome in this field are the achievement of better spatial control in the sample or biological tissue, and the enhancement of selectivity for the transformation.

In the present work, we studied an aromatic hemicyanic azide-based fluorogen. This molecule can undergo a transformation upon two-photon absorption. The synthesized compound: 2-(4-(4-azidophenyl)buta-1,3-dien-1-yl)-1-(1-sulfonate)propyl naphtho[1,2-d]thiazolium (hCy-N<sub>3</sub>), was designed to yield a fluorescent species after N<sub>2</sub> release caused by the photocleavage of azide group bond. The resulting intermediaries nitrene can then easily react with the surrounding molecules to yield a highly fluorescent molecule. In this study, the attained fluorophore was the species with the nitro group, generated from reactions with dissolved oxygen in the medium.



*Hemicyanine based aromatic azide studied in this work.*

The potential of this system to generate a fluorophore as a function of irradiation time was tested using a continuous wave laser at 405 nm to induce the transformation. The fluorophore appearance and the azide decrease were monitored by fluorescence and absorption spectroscopy, respectively. The amount of molecular transformation can be controlled through the irradiation time or intensity. The irradiation at a longer wavelength (460 nm) has non-significant accumulation for the fluorescent species. Thus, it was found that upper excited states (S<sub>n</sub>, n > 1) are involved in azide photodissociation. This result was supported by computational studies showing the S<sub>2</sub> state as a

dissociative state for the  $-N-N_2$  bond. The role of this state in the azide bond breaking also explains the fluorophore production yield of  $1.4 \times 10^{-4}$ , due to kinetic competition between  $S_2$  deactivation pathways and the dissociation.

The photochemically obtained fluorescent species was identified as the respective nitro compound through the time-correlated single photon counting technique. The formation of the nitro molecule was also confirmed by high-performance liquid chromatography coupled with a mass spectrometer. The nitro species exhibits an atypically high fluorescence yield ( $\Phi_F = 0.7$ ) compared to other nitroaromatic compounds ( $\Phi_F < 10^{-4}$ ). This uncommon behaviour was explained by computational modelling of the nitro molecule. For this species, the intersystem crossing deactivation path is hindered or forbidden due to the lack of a receiver triplet,  $T_n$ , with equivalent energy with respect to the emissive state. Also, a charge transfer state formation in the nitro form upon irradiation was found. This state is stabilized by interactions with the solvent, diminishing the chance of a non-radiative deactivation to a triplet state.

The hCy- $N_3$  transformation through non-linear excitation was demonstrated with femtosecond pulsed laser radiation at 800 nm to induce the  $-N-N_2$  cleavage. This was corroborated by analysing the quadratic dependence of generated fluorophores as a function of irradiation intensity. Two-photon absorption allows for high spatial and temporal control for the transformation. It also permits the use of near-infrared irradiation sources that are less harmful to cells and tissues.

Finally, the presence of sulphide cadmium quantum dots as two-photon absorption antennas was tested. Due to their large two-photon absorption cross-section, quantum dots can increase the azide group dissociation yield for the molecules attached to their surface by transferring the energy absorbed by the nanocrystal. The increase in the fluorophore production yield for the quantum dot/azide system was 1.8 times compared to the hCy- $N_3$  alone under same irradiation conditions. The fluorescent species obtained in this case was the same as in previous experiments: the nitrated compound.

The system in this work gives a new model for small organic molecules able to work as fluorogens activated through non-linear excitation using near-IR light sources.

The conversion efficiency for this molecule doubles when is attached to CdS quantum dots used as two-photon absorption antennas. The results obtained with the azide offer a guideline for the design of photoactivatable probes getting high temporal and spatial three-dimension control utilizing commercially available laser sources.

# Contenido

---

Resumen .....	iv
Abstract .....	vii
1. Introducción.....	1
2. Hipótesis y Objetivos .....	7
2.1. Hipótesis .....	7
2.2. Objetivo General.....	7
2.2.1. Objetivos Específicos .....	7
3. Antecedentes .....	9
3.1. Estados electrónicamente excitados .....	9
3.1.1. Absorción de radiación .....	9
3.1.2. Procesos fotofísicos .....	17
3.1.3. Transformaciones químicas en estados excitados .....	22
3.1.4. Competencia cinética .....	24
3.2. Fluorógenos y fluoróforos.....	26
3.2.1. Fluorógenos tipo azida.....	28
3.2.2. Compuestos polimetínicos hemicianina.....	33
3.2.3. Compuestos nitroaromáticos.....	34
3.3. Puntos cuánticos.....	36
3.3.1. Características físicas.....	36
3.3.2. Propiedades ópticas de los puntos cuánticos .....	38
3.3.3. Transferencia resonante de energía.....	39
3.4. Radiación láser.....	45
3.4.1. Pulsos ultracortos.....	47
3.5. Métodos Computacionales .....	48
3.5.1. Teoría de funcionales de la densidad.....	48
3.5.2. Teoría de funcionales de la densidad dependiente del tiempo .....	53
4. Metodología.....	59
4.1. Diseño del sistema .....	59
4.2. Métodos computacionales.....	61

4.2.1. Cálculos en el estado basal .....	61
4.2.2. Cálculos en el estado excitado .....	62
4.3. Síntesis del fluorógeno (hCy-N <sub>3</sub> ).....	63
4.4. Espectroscopía de absorción y fluorescencia .....	64
4.5. Tiempos de decaimiento radiativos .....	64
4.6. Fotodisociación de la hemicianina en forma de azida .....	67
4.6.1. Conversión monofotónica .....	67
4.6.2. Conversión bifotónica.....	69
4.7. Fotoconversión del sistema punto cuántico-hemicianina.....	69
4.7.1. Conversión inducida por transferencia de energía .....	69
5. Resultados y Discusión .....	71
5.1. Estudios teóricos.....	71
5.1.1. Energía de excitación y transiciones electrónicas .....	71
5.1.2. Superficies de energía potencial.....	73
5.2 Espectroscopía estática .....	76
5.2.1 Absorción.....	76
5.2.2 Emisión .....	78
5.3 Espectroscopía con resolución temporal.....	82
5.4 Transformación de hCy-N <sub>3</sub> fotoinducida .....	85
5.4.1 Transformación monofotónica .....	85
5.4.2 Transformación bifotónica.....	88
5.5 Caracterización de los Fotoproductos.....	91
5.5.1 Tiempos de vida de fluorescencia.....	92
5.5.2 Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas .....	95
5.5.3 Rendimiento de la producción del fluoróforo.....	99
5.6 Fototransformación del sistema Punto cuántico-Azida.....	101
5.6.1 Formación del complejo punto cuántico/fluorógeno .....	101
5.6.2 Transformación bifotónica con transferencia de energía .....	103
5.6.3 Influencia de la concentración de puntos cuánticos.....	105
6. Conclusiones.....	108
Referencias .....	112

Apéndice 1.	Oscilador de Ti:Zafiro.....	121
Apéndice 2.	Síntesis y Caracterización.....	126
Apéndice 3.	Espectros de masas de hCy-N <sub>3</sub> irradiada.....	129
Anexo:	Artículos publicados.....	135

# 1. Introducción

---

La posibilidad de emplear la radiación electromagnética como fuente de energía para controlar procesos moleculares es de gran interés debido a sus potenciales aplicaciones. Una de las principales ventajas es el grado de control que se obtiene al utilizar luz con características adecuadas. Al irradiar una molécula se pueden inducir cambios en su estructura química relacionados con la nueva distribución electrónica y geométrica en estados electrónicos excitados a los que se accede.<sup>1-3</sup> Estos cambios, reversibles o irreversibles, tienen aplicaciones como sensores,<sup>4,5</sup> marcadores biológicos,<sup>6-8</sup> interruptores moleculares,<sup>9-11</sup> dispositivos de almacenamiento de información,<sup>12,13</sup> liberación selectiva de fármacos<sup>14,15</sup> y más recientemente, como modelos artificiales de neuronas.<sup>16</sup>

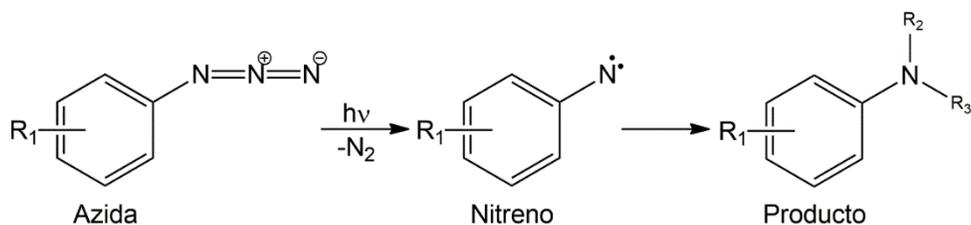
En los últimos años se ha explorado el control de las transformaciones fotoinducidas a través de variaciones en las estructuras moleculares.<sup>10,17,18</sup> Ciertas variables como cambios en las longitudes de onda de absorción y emisión, o la adición o eliminación de canales de desactivación de los estados excitados, pueden ser manipulados por modificaciones discretas en las moléculas.<sup>6,11,19</sup> Estas propiedades en conjunto con la selección de la longitud de onda y la intensidad de las fuentes de irradiación brindan una gran posibilidad de controlar cambios específicos provocados por interacción con la luz.

Uno de los principales campos de aplicación de este tipo de sistemas es la generación *in situ* de marcadores fluorescentes fotoactivables.<sup>20-23</sup> Éstas son moléculas que al modificar su estructura química cambian drásticamente sus propiedades luminiscentes.<sup>20,24-26</sup> Este tipo de sistemas es empleado en técnicas de microscopía de fluorescencia de súper-resolución<sup>7,18,27-29</sup> debido a la necesidad de detectar y localizar emisores individuales. Al controlar que sólo una pequeña cantidad de las moléculas sufran una transformación al mismo tiempo, la separación entre ellas permite diferenciar la luz que emiten unas de la que emiten otras. Mediante ciertos esquemas matemáticos, la posición del emisor puede determinarse con una precisión de decenas de nanómetros,

lo cual es un orden de magnitud mejor que en la microscopía óptica limitada por difracción.<sup>3,30,31</sup>

Hoy en día existe una variedad de marcadores empleados en microscopía de súper-resolución, cada uno presenta ventajas y desventajas. Los más populares son las cianinas Cy5, Cy7 y Alexa647,<sup>9,32</sup> colorantes enjaulados como fluoresceína y rodamina Q,<sup>25,33</sup> además de algunas proteínas fluorescentes.<sup>25</sup> Las principales desventajas se deben al uso de agentes químicos<sup>34-36</sup> o diferencias de potencial<sup>37</sup> para inducir la transformación. Estos métodos de activación tienen un control espacial muy limitado en comparación con el uso de fuentes de luz.<sup>27</sup> Otra importante limitación de estas moléculas para su empleo en medios celulares o en tejidos es la longitud de onda necesaria para la activación, regularmente en la región del ultravioleta cercano.<sup>38-41</sup> El uso de este intervalo de longitudes de onda puede causar daño en las células o tejidos, autofluorescencia de componentes celulares, poca penetración en el medio, entre otros efectos no deseados.<sup>10,27</sup>

Otro grupo de moléculas capaces de realizar este tipo de transformaciones y que han sido empleadas en el esquema de microscopía de súper-resolución son los fluorógenos tipo azida precursores de compuestos “push-pull” (donador y aceptor de electrones unidos por un puente con enlaces dobles conjugados).<sup>42-44</sup> Las moléculas empleadas poseen una forma “obscura” la cual es convertida a una fluorescente después de ser irradiadas. Las azidas aromáticas (ver Fig. 1.1) son moléculas que llevan a cabo la ruptura fotoinducida del enlace  $-N-N_2$  dando lugar a un intermediario nitreno, una especie muy reactiva.<sup>45</sup> La fotoquímica de las azidas aromáticas ha sido estudiada ampliamente,<sup>40,45-49</sup> se conocen los productos más comunes de las reacciones del nitreno después de la fotodisociación (ver sección 3.2.1). Entre estos productos existen moléculas altamente fluorescentes.<sup>40,50,51</sup> Al ser moléculas orgánicas pequeñas, la síntesis y la variación de la estructura de estos fluorógenos es relativamente sencilla. Esta ventaja permite explorar modificaciones en su estructura que repercuten en su fotoquímica y fotofísica.



**Fig. 1.1.** Conversión fotoinducida de una azida aromática.

A pesar de todas las ventajas del uso de azidas aromáticas como fluorógenos, aún existen algunas características que se busca mejorar. El control en tres dimensiones de la transformación resulta de gran interés tanto en aplicaciones relacionadas con microscopía de super-resolución como en terapéuticas. Poder acceder a diferentes planos de la muestra permite generar imágenes en tres dimensiones en microscopía y atacar un blanco biológico específico con precisión de decenas de nanómetros.

Una manera de conseguir esto es llevando a cabo la disociación del grupo azida con luz de longitudes de onda mayores. La limitante de generar sistemas que se disocian con luz visible es la inestabilidad y sensibilidad de éstos,<sup>52</sup> lo que dificulta su uso práctico. Pero esta condición también se puede alcanzar mediante excitación no-lineal o absorción bifotónica (2PA, por sus siglas en inglés). En este proceso, una molécula absorbe dos fotones de manera simultánea.<sup>12,53-55</sup> La energía total suministrada a la especie es igual a la suma de la energía de los fotones involucrados. Como una consecuencia del fenómeno, la longitud de onda empleada para promover la fotodisociación se encuentra en la región del infrarrojo cercano (NIR), superando muchas de las limitaciones inherentes al uso de luz UV.<sup>56,57</sup> Sin embargo, la absorción bifotónica tiene requerimientos intrínsecos como la necesidad de una alta densidad espacial y temporal de fotones, moléculas con una gran cantidad de enlaces  $\pi$  conjugados y en algunos casos, es necesario que exista un nivel electrónico con una energía similar a la de uno de los fotones empleados.<sup>53,5859,60</sup>

La gran mayoría de las moléculas fotoactivables no poseen buenos coeficientes de absorción bifotónica por sí mismas, los valores típicos de sección transversal de absorción bifotónica para estos interruptores fotoactivados es de 1–5 GM. Esta baja probabilidad para llevar a cabo absorción no-lineal se debe a que el diseño de estos

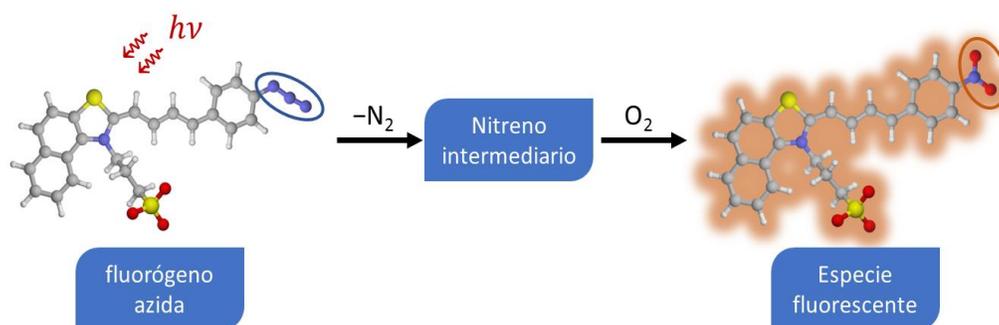
fluorógenos ha estado dirigido a mejorar el rendimiento de la transformación (isomerización, rotación, ruptura, etc.) y no a convertirlos en absorbedores bifotónicos.

Una forma de incrementar la capacidad del sistema de absorber bifotónicamente es extendiendo la conjugación electrónica del sistema. La inclusión de dobles enlaces conjugados o anillos aromáticos sencillos o fusionados ha mostrado estar relacionada con un aumento de las propiedades bifotónicas de los sistemas. Otra modificación a la estructura molecular que beneficia esta propiedad es la inclusión de grupos electrodonadores o electroattractores en los extremos de los sistemas  $\pi$ -conjugados.<sup>61</sup> Sin embargo, algunas de estas modificaciones pueden afectar el rendimiento de las transformaciones fotoinducidas al punto de incluso inhibirlas totalmente.

Otra manera de brindar una alta probabilidad de absorción bifotónica a los fluorógenos sin alterar sus capacidades de foto activación es agregar un fragmento que cumpla las funciones de antena.<sup>57,60</sup> En este esquema la antena se encarga de absorber los dos fotones simultáneamente y después transferir la energía obtenida del proceso al fragmento que se transformará. Algunos ejemplos de antenas bifotónicas han sido conseguidos con sistemas orgánicos altamente conjugados,<sup>60</sup> complejos metálicos basados en anillos de porfirina,<sup>57</sup> nanopartículas<sup>62</sup> y nanocristales.<sup>58,63</sup>

Los puntos cuánticos exhiben grandes ventajas de entre las opciones de antenas bifotónicas antes mencionadas. Los nanocristales o puntos cuánticos (QDs, por su acrónimo en inglés '*Quantum Dots*') son sales de semiconductores de dimensiones nanométricas (2-10 nm de radio).<sup>64-66</sup> Tales dimensiones les confieren propiedades ópticas tales como espectros de absorción y emisión entonables con el tamaño de la partícula<sup>67,68</sup> y espectros de emisión con bandas delgadas e intensas.<sup>64</sup> Además, los QDs poseen elevados coeficientes de absorción bifotónica ( $10^4$  GM) en comparación con los de moléculas orgánicas (10-400 GM) o compuestos organometálicos ( $10^2-10^3$  GM).<sup>69-73</sup> La naturaleza del material los hace altamente resistentes a la fotodegradación,<sup>32,74</sup> y permite la adsorción de moléculas en su periferia.<sup>32,75</sup> Otra propiedad que posiciona a los puntos cuánticos como excelentes antenas es que pueden transferir energía eficientemente a estas especies unidas electrostáticamente a su superficie.<sup>76-79</sup>

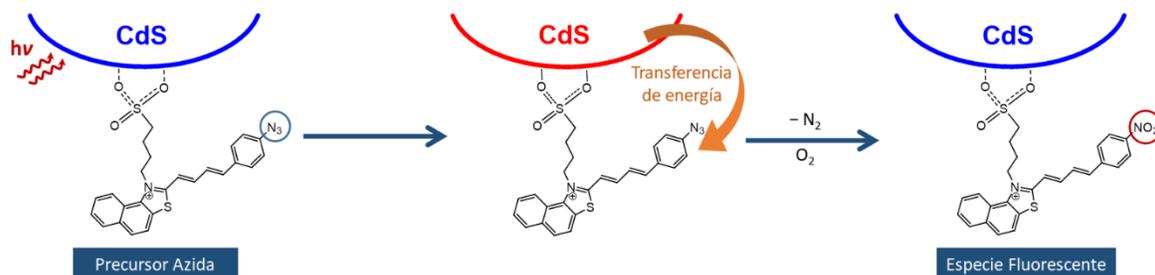
En este estudio se diseñó, sintetizó y evaluó un fluorógeno tipo azida aromática el cual lleva a cabo una transformación fotoinducida para convertirse en una especie nitrada fluorescente (ver Fig. 1.2). La molécula empleada presenta ventajas sobre otros esquemas de fotoconversión de azidas aromáticas al exhibir propiedades de absorción bifotónica por sí misma.



**Fig. 1.2.** Transformación del fluorógeno tipo azida de este estudio por la absorción de dos fotones.

Además, la molécula presentada en este trabajo posee un grupo sulfonato ( $-SO_3^-$ ) que puede ser usado como manera de anclaje a la superficie de especies como puntos cuánticos. El uso de QDs en este trabajo como antenas, incrementando la probabilidad de llevar a cabo absorción bifotónica y así aumentar la eficiencia del proceso de disociación mediante transferencia resonante de energía.<sup>59,75,80</sup> El grupo  $-SO_3^-$  también contribuye a aumentar la solubilidad de la molécula en medios polares, haciendo más fácil su entrada en ambientes fisiológicos.

Esta tesis presenta un esquema de excitación indirecta desde QDs a un fluorógeno tipo azida. La energía necesaria para la conversión del precursor se obtiene a través de la transferencia de energía desde la antena que previamente ha absorbido dos fotones (ver Fig. 1.3). La importancia de desarrollar nuevos esquemas de fototransformación, en particular a través de excitaciones bifotónicas, para generar fluoróforos como éste expande las herramientas en áreas relacionadas con imagenología y en la generación de nuevos materiales. Dichas herramientas permiten incrementar la capacidad de localizar y limitar la transformación en volúmenes muy pequeños con un control tridimensional absoluto de la posición donde se desea que se lleve a cabo.



**Fig. 1.3.** Transformación del sistema nanocristal/azida inducido por absorción bifotónica y transferencia de energía.

El trabajo de esta tesis se presenta en el desarrollo de seis capítulos. En el primero se presentó un panorama general de los compuestos activados por la interacción con luz, se describió el sistema motivo de esta investigación y el esquema para inducir su transformación. En el segundo apartado se plantea la hipótesis en torno a la que se desarrolla este trabajo y se definen los objetivos del mismo. En el capítulo 3 se establecen los conceptos teóricos necesarios para entender mejor el modelo de fotoactivación propuesto en este trabajo y los resultados obtenidos. El cuarto capítulo describe los métodos y técnicas empleados en el diseño, síntesis y evaluación de la hemicianina en forma de azida y del compuesto punto cuántico/azida como fluorógenos activados bifotónicamente. Así, en el capítulo 5 se presentan los resultados obtenidos del modelado del sistema y de los experimentos realizados. En este apartado también se realiza una interpretación de los datos obtenidos experimentalmente y los encontrados por cálculos computacionales para, en conjunto, explicar la fotoquímica y fotofísica de las moléculas involucradas en el proceso. Por último, el sexto capítulo engloba las conclusiones a las que se llegaron en esta tesis y sus implicaciones en futuras investigaciones.

## 2. Hipótesis y Objetivos

---

### 2.1. Hipótesis

Tras la absorción de dos fotones el precursor de hemicianina con un grupo azida llevará a cabo una transformación en el estado excitado, dando origen a una especie fluorescente.

La unión del fluorógeno azida a nanocristales o puntos cuánticos de sulfuro de cadmio incrementará la cantidad de fotoproducto generado por transferencia de energía desde éstos.

La posibilidad de excitar bifotónicamente estos sistemas permite el uso de fuentes de luz en el infrarrojo cercano. Además, el fenómeno brinda un control espacial muy alto, lo que permite su activación selectiva en diferentes planos de la muestra en volúmenes que pueden llegar a ser del orden de femtolitros.

### 2.2. Objetivo General

Sintetizar y evaluar una molécula altamente conjugada basada en una hemicianina con un grupo funcional azida como fluorógeno fotoactivable mediante absorción simultánea de dos fotones y determinar la influencia de puntos cuánticos de CdS como antenas en el rendimiento de la transformación inducida bifotónicamente.

Como fue mencionado anteriormente, la gran ventaja de este tipo de sistemas es la posibilidad de realizar absorción bifotónica que debido a la alta densidad de fotones necesaria, puede ser controlada en tres dimensiones.

#### 2.2.1. Objetivos Específicos

- Sintetizar la hemicianina en forma de azida con grupos capaces de anclarse al nanocristal (sulfonato).

- Obtener espectros de absorción y emisión para la molécula con forma azida y los intermediarios en la síntesis, así como sus respectivos rendimientos de fluorescencia.
- Evaluar el efecto de diferentes longitudes de onda de excitación en la conversión monofotónica de la hemicianina en forma de azida.
- Determinar el efecto del tiempo de irradiación en la conversión inducida monofotónicamente.
- Comprobar la conversión de la hemicianina en forma de azida mediante absorción bifotónica observando la formación del fluoróforo como función de la intensidad de radiación.
- Caracterizar el fotoproducto fluorescente final de la disociación del grupo azida.
- Obtener los sistemas con las hemicianinas en forma de azida ancladas a los puntos cuánticos de CdS.
- Demostrar la transformación de la hemicianina en forma de azida debido a una transferencia de energía desde los puntos cuánticos después de una excitación bifotónica.
- Medir el aumento en el rendimiento de la transformación inducida por la absorción simultánea de dos fotones en presencia de puntos cuánticos de CdS.

## 3. Antecedentes

---

En este capítulo se abordarán los conceptos necesarios para comprender los fenómenos que se presentan en estados electrónicamente excitados, relevantes en el funcionamiento del sistema estudiado en este trabajo. Los modelos teóricos establecidos para explicar la promoción de una molécula a un estado electrónico de mayor energía y las diferentes rutas de desactivación que puede presentar dicho estado serán abordados. También se describirán el tipo de especies involucradas en este estudio como lo son los fluorógenos, las azidas aromáticas y los puntos cuánticos. Además, se explicará el fenómeno de transferencia resonante de energía, presente en el complejo punto cuántico-fluorógeno motivo de este estudio. Finalmente, se abordarán métodos computacionales para modelar los sistemas estudiados con el fin de explicar su comportamiento o predecir sus propiedades.

### 3.1. Estados electrónicamente excitados

Los procesos estudiados en este trabajo tienen lugar en los estados electrónicos excitados de las moléculas. Para comprender mejor cómo se accede a estos estados y fenómenos como las transformaciones inducidas por absorción de luz o de emisión, es necesario conocer una descripción de ellos.

#### 3.1.1. Absorción de radiación

El primer proceso en la dinámica de estados excitados es la interacción del sistema con la radiación mediante el proceso de absorción de luz. Una molécula puede ser promovida desde el estado electrónico basal a un estado electrónico excitado al absorber un fotón. Una condición necesaria es que el cambio de energía en la molécula y la frecuencia de la luz debe estar relacionada mediante:

$$h\nu = E_f - E_i, \quad (3.1)$$

donde  $E_f$  y  $E_i$  son las energías del estado excitado y basal, respectivamente. Además, la molécula debe tener una interacción con el campo electromagnético. Para la mayoría

de las especies, el componente magnético del campo puede ser ignorado ya que las transiciones generadas por él son, en general, mucho más débiles ( $10^5$  veces) que las transiciones del dipolo eléctrico. Así, sólo se considera la interacción del vector de campo eléctrico  $\mathbf{E}$  y el dipolo eléctrico de la molécula.<sup>2</sup>

La absorción de luz puede ser explicada en términos de la teoría de perturbaciones dependiente del tiempo. Si se tiene una molécula en un estado estacionario inicial, descrito por la función de onda  $\Psi_i$ , que cumple con:<sup>81</sup>

$$\hat{H}_0 \Psi_i = E \Psi_i. \quad (3.2)$$

Si el sistema es perturbado al ser expuesto a la luz, el vector eléctrico de la luz induce fuerzas oscilatorias en las partículas cargadas de la molécula. De esta manera, el operador Hamiltoniano  $\hat{H}_0$  ya no describe la energía del sistema, tiene que ser reemplazado por  $(\hat{H}_0 + \hat{H}')$  donde  $\hat{H}'$  es el operador de la perturbación que considera el efecto de la radiación.

Las funciones propias de  $(\hat{H}_0 + \hat{H}')$  serán diferentes de la función de onda inicial  $\Psi_i$  y también serán dependientes del tiempo. Así:

$$(\hat{H}_0 + \hat{H}') \Psi(x, t) = E \Psi(x, t). \quad (3.3)$$

Estas nuevas funciones de onda pueden ser construidas en términos de las funciones de onda del sistema no perturbado:

$$\Psi(x, t) = \sum a_k(t) \Psi_k, \quad (3.4)$$

donde los coeficientes  $a_k(t)$  de cada término proporcionan la dependencia temporal.

El efecto de la perturbación puede ser pensado como una combinación lineal de las funciones de onda iniciales del sistema con todas las otras posibles funciones de onda. En otras palabras, el estado inicial evoluciona con el tiempo a otros estados. Si la perturbación es removida después de un tiempo  $t$ , habrá una probabilidad de que el sistema se encuentre en un estado final  $\Psi_f$  diferente del inicial. Esta probabilidad está dada por el cuadrado del coeficiente  $a_f(t)$  de la ecuación (3.4). Este coeficiente nos in-

dica la contribución de cada estado en la función de onda total en un tiempo determinado. En otras palabras, nos da información acerca de la evolución temporal del sistema desde el estado basal a los estados excitados después de la perturbación. Además, nos indica cómo ese estado excitado transita por otros estados en su camino de regreso al estado basal.

El coeficiente  $a_f(t)$  es proporcional al momento dipolar de transición:

$$[a_f(t)]^2 = \frac{8\pi^3}{3h^2} \langle \Psi_f | \hat{\mu} | \Psi_i \rangle^2 \rho(\nu_{fi}) t \quad (3.5)$$

donde  $\rho(\nu_{fi})$  es la densidad de radiación por unidad de volumen a la frecuencia  $\nu_{fi}$  correspondiente a la transición,  $t$  es el tiempo y  $\hat{\mu}$  es el operador de momento dipolar,

$$\hat{\mu} = e \sum \mathbf{r}_j, \quad (3.6)$$

donde  $e$  es la carga del electrón y  $\mathbf{r}_j$  es el vector de distancia desde el  $j$ -ésimo electrón al centro de la carga positiva de la molécula.

De acuerdo con la aproximación de Born-Oppenheimer, la absorción de luz sucede en una escala de tiempo mucho más breve que la escala de tiempo de los movimientos nucleares. De esta forma, la función de onda total  $\Psi$  puede ser factorizada en una función de onda electrónica  $\psi$  y una función de onda nuclear (vibracional)  $\theta$ . Así, el momento dipolar de transición (MDT) está dado por

$$MDT = \int \psi_f \theta_f \hat{\mu} \psi_i \theta_i d\tau. \quad (3.7)$$

Como el operador de momento dipolar se considera independiente de las coordenadas nucleares, opera sólo para las funciones de onda electrónicas. La ecuación (3.7) puede ser escrita de la forma:

$$MDT = \int \psi_f \hat{\mu} \psi_i d\tau_e \int \theta_f \theta_i d\tau_N. \quad (3.8)$$

Con una aproximación más,  $\psi$  puede ser factorizada en un producto de funciones de onda de un electrón  $\phi_i$  (orbitales) y su función de espín correspondiente  $\sigma_i$ . Los orbitales son los mismos en ambos estados y se considera que la transición involucra sólo un electrón. El momento dipolar de transición entonces se expresa,

$$MDT = \int \phi_f \hat{\mu} \phi_i d\tau_e \int \sigma_f \sigma_i d\tau_s \int \theta_f \theta_i d\tau_N. \quad (3.9)$$

El primer término es conocido como el momento dipolar de transición electrónico ( $\mu_{if}$ ), cuyo valor depende de la simetría y traslape de los orbitales iniciales y finales. El segundo término es la integral de espín, cuyos valores dependen de los estados de espín inicial y final del electrón promovido. El tercer término, la integral de traslape de las funciones de onda inicial y final de las vibraciones nucleares, es la base del principio de Franck-Condon.

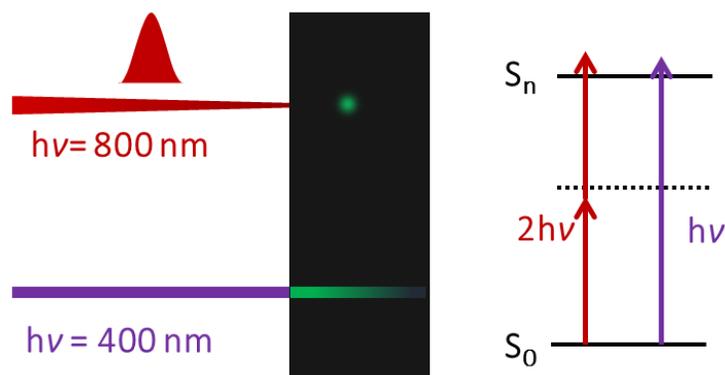
Cada uno de estos términos contribuye al valor de  $a_f(t)$  y la solución de cada una de las ecuaciones propone reglas de selección relacionadas con la probabilidad de que la transición se lleve a cabo. El valor de los coeficientes  $a_f(t)$  determinará la probabilidad del sistema de absorber un fotón para llegar a un estado excitado y rapidez de que éste migre a otros estados y la probabilidad para que cada uno de estos fenómenos suceda. En el trabajo desarrollado en esta tesis, una manera de observar la influencia de estos coeficientes es mediante los tiempos de decaimiento de los estados excitados de las diferentes especies involucradas en el proceso y principalmente en el rendimiento de la transformación fotoinducida del fluorógeno tipo azida aromática, motivo de este estudio.

### 3.1.1.1. Absorción bifotónica

Uno de los propósitos del estudio aquí presentado es el diseño de un sistema capaz de sufrir una transformación con un alto control espacial y temporal. Una forma de lograr esto es mediante la absorción simultánea de dos fotones.

Regularmente, en el proceso de interacción luz-materia, una molécula absorbe un fotón, siendo promovida a un estado electrónico excitado. Pero con intensidades de luz lo suficientemente altas, como las obtenidas mediante fuentes láser, una molécula puede absorber dos o incluso más fotones de manera simultánea. La probabilidad de que estos procesos multifotónicos sucedan es considerablemente menor al aumentar el número de fotones requeridos por unidad de volumen y unidad de tiempo.

En el caso de la excitación bifotónica (Fig. 3.1), un primer fotón excita a la molécula a un estado virtual, si otro fotón llega a la molécula dentro del tiempo de la primera interacción ( $\sim 10^{-16}$  s) puede ser absorbido. Tanto el estado inicial ( $S_0$ ) como el final ( $S_n$ ) son “reales”. Los dos fotones pueden tener frecuencias iguales o diferentes y la suma de sus energías es igual a la diferencia de energía entre los estados basal y excitado.<sup>2</sup> La excitación simultánea puede ser usada para acceder a estados excitados prohibidos por simetría, porque para la absorción bifotónica, las transiciones  $g \rightarrow g$  y  $u \rightarrow u$  están permitidas.<sup>81</sup> En los procesos de excitación con dos fotones, la probabilidad de absorción de los éstos por la molécula depende cuadráticamente de la intensidad de la luz. Como resultado de esta dependencia, si un material es excitado bifotónicamente, se obtiene una alta resolución espacial debido a que el efecto decrece muy rápidamente desde el centro del haz hacia su periferia.<sup>54,57</sup> Esta propiedad es explotada en varias aplicaciones como terapia fotodinámica, estereolitografía, holografía, principalmente.<sup>12,53,59,82</sup>



**Fig. 3.1.** Esquema del proceso de absorción bifotónica comparado con el de absorción monofotónica. El fenómeno monofotónico (izquierda abajo) se da en todo el camino óptico del haz de irradiación, mientras que la absorción bifotónica (izquierda arriba) sólo ocurre en el foco del haz de luz láser pulsada. En el diagrama de Jablonski simplificado (derecha), estado virtual es mostrado con líneas punteadas.

La descripción matemática del fenómeno fue desarrollada por Maria Göpper-Mayer<sup>55</sup> y parte de considerar la polarización de los materiales en función del campo eléctrico:

$$P = P^{(1)} + P^{(2)} + P^{(3)} + \dots = \epsilon_0 (\chi^{(1)} \mathbf{E} + \chi^{(2)} \mathbf{E}^2 + \chi^{(3)} \mathbf{E}^3 + \dots), \quad (3.10)$$

donde  $P^{(i)}$  es la polarización (momento dipolar por unidad de volumen) de  $i$ -ésimo orden,  $\epsilon_0$  la constante dieléctrica en el vacío,  $\mathbf{E}$  es el campo eléctrico y  $\chi^{(i)}$  es la susceptibilidad de orden  $i$ . Las susceptibilidades de diferentes ordenes están involucradas en fenómenos como:<sup>83</sup>

- $\chi^{(1)}$ : propiedades de óptica lineal.
- $\chi^{(2)}$ : generación de segundo armónico, suma de frecuencias, rectificación óptica, efecto optoeléctrico.
- $\chi^{(3)}$ : generación de tercer armónico, refracción no-lineal, absorción bifotónica, efecto Raman estimulado, mezcla de cuatro ondas, esparcimiento Brillouin.

Como puede observarse en la (3.10), la polarizabilidad de primer orden está afectada por el campo eléctrico y la susceptibilidad de primer orden, sólo se requiere de una frecuencia,  $\omega$ , para describir la interacción. En el caso de  $P^{(2)}$ , al tener dependencia de  $\mathbf{E}^2$ , se requiere de una frecuencia adicional, igual o diferente, para describir la interacción. La resultante en este caso será una tercera frecuencia involucrada con el valor de la suma de las dos frecuencias anteriores. Finalmente, el caso de las polarizaciones de tercer orden, como las que se involucran en el proceso de absorción bifotónica, al requerir de  $\mathbf{E}^3$ , necesitan de 3 frecuencias, iguales o diferentes, que entren en juego. Además, aparece una cuarta frecuencia como resultante.<sup>83</sup>

Para un proceso en el cual los dos fotones absorbidos poseen la misma energía, a una frecuencia específica  $\omega$ , el coeficiente de absorción bifotónica es proporcional a la parte imaginaria de  $\chi^{(3)}$ :

$$\alpha_2(\omega) = \frac{3\omega}{2n^2c^2\epsilon_0} \text{Im}(\chi^3(-\omega; \omega, -\omega, \omega)), \quad (3.11)$$

donde  $n$  es el índice de refracción,  $c$  es la velocidad de la luz. Para caracterizar la absorción bifotónica de moléculas individuales, se define la sección transversal de absorción bifotónica,  $\delta_{2PA}(\omega)$  como:

$$\delta_{2PA}(\omega) = \frac{\hbar\omega\alpha_2}{N} = \frac{3\hbar\omega^2}{2n^2c^2\epsilon_0N} \text{Im}(\chi^{(3)}(-\omega; \omega, -\omega, \omega)), \quad (3.12)$$

donde  $\hbar$  es la constante de Planck reducida y  $N$  es el número de moléculas por unidad de volumen. Esta magnitud está dada en unidades Goppert-Mayer (GM) en honor a la descubridora del fenómeno. Los GM equivalen a  $1 \times 10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{fotón}^{-1} \cdot \text{molécula}^{-1}$ .

En 1971 Orr y Ward desarrollaron la aproximación de suma sobre los estados para obtener  $\chi^{(3)}$ .<sup>84</sup> En el caso de absorción bifotónica, tres estados son suficientes para describir la transición: el estado basal ( $i$ ), el estado final ( $f$ ) y un estado intermedio ( $e$ ). Se considera que las transiciones  $i \leftrightarrow e$  y  $e \leftrightarrow f$  están permitidas por el momento dipolar de transición eléctrico  $\mu_{ie}$  y  $\mu_{ef}$  son diferentes de cero. La transición  $i \leftrightarrow f$  está prohibida  $\mu_{if} = 0$ .

Si se considera luz linealmente polarizada:<sup>84</sup>

$$\begin{aligned}
 \chi^{(3)}(2PA) = \frac{2N}{3! \varepsilon_0} & \left\{ \frac{\mu_{ie} \Delta\mu \Delta\mu \mu_{ei}}{(\Omega_{ei} - \hbar\omega)(\Omega_{ei} - 2\hbar\omega)(\Omega_{ei} - \hbar\omega)} \right. \\
 & + \left. \frac{\mu_{if} \Delta\mu \Delta\mu \mu_{fi}}{(\Omega_{ei}^* - \hbar\omega)(\Omega_{ei} - 2\hbar\omega)(\Omega_{ei} - \hbar\omega)} \right\} \\
 & + \frac{2N}{3! \varepsilon_0} \left\{ \frac{\mu_{ie} \bar{\mu}_{ef} \bar{\mu}_{fe} \mu_{ei}}{(\Omega_{ei} - \hbar\omega)(\Omega_{fi} - 2\hbar\omega)(\Omega_{ei} - \hbar\omega)} \right. \\
 & + \left. \frac{\mu_{ie} \bar{\mu}_{ef} \bar{\mu}_{fe} \mu_{ei}}{(\Omega_{ei}^* - \hbar\omega)(\Omega_{fi} - 2\hbar\omega)(\Omega_{ei} - \hbar\omega)} \right\} \\
 & - \frac{2N}{3! \varepsilon_0} \left\{ \frac{\mu_{ie} \mu_{ei} \mu_{ie} \mu_{ei}}{(\Omega_{ei} - \hbar\omega)(\Omega_{fi} - \hbar\omega)(\Omega_{ei} - \hbar\omega)} \right. \\
 & + \left. \frac{\mu_{ie} \mu_{ei} \mu_{ie} \mu_{ei}}{(\Omega_{ei} - \hbar\omega)(\Omega_{fi}^* - \hbar\omega)(\Omega_{ei} - \hbar\omega)} \right\}
 \end{aligned} \tag{3.13}$$

donde  $\mu_{jk}$  son los momentos dipolares de transición entre los estados  $j$  y  $k$ ,  $\Delta\mu$  es la diferencia entre los dipolos permanentes,  $\Omega_{jk} = \hbar\omega_{jk} - i\Gamma_{jk}$  y  $\Omega_{jk}^* = \hbar\omega_{jk} + i\Gamma_{jk}$ .  $\Gamma_{jk}$  es el ancho de banda de la transición.

A partir de la ecuación (3.13) podemos diferenciar tres grupos de componentes. Los primeros dos son llamados términos dipolares, son diferentes de cero si  $\Delta\mu \neq 0$ . Si consideramos la condición de resonancia:

$$\text{Im} \left( \chi^{(3)}(2PA_D) \right) = \frac{N\mu_{ie}^2 \Delta\mu^2}{3! \varepsilon_0 \Gamma_{ei}} \frac{(\hbar\omega_{ei})^2}{\left[ \left( \frac{\hbar\omega_{ei}}{2} \right)^2 + \Gamma_{ei}^2 \right]^2}. \quad (3.14)$$

Cuando  $\Delta\mu \neq 0$ , el término dipolar contribuye a la absorción bifotónica. En el caso de moléculas centrosimétricas,  $\Delta\mu = 0$ .

Lo términos tercero y cuarto son llamados de absorción bifotónica, que involucran los tres estados. Si consideramos la condición de resonancia para la absorción de dos fotones de la misma longitud de onda,  $\hbar\omega = \hbar\omega_{fi}/2$ , y suponiendo una banda de absorción estrecha,  $\Gamma_{ei} \ll [\hbar(\omega - \omega_{fi}/2)]/2$ , se tiene:

$$\text{Im} \left( \chi^{(3)}(2PA_T) \right) = \frac{4N\mu_{ie}^2 \mu_{ef}^2}{3! \varepsilon_0 \Gamma_{fi}} \frac{1}{\left( \hbar\omega_{ei} - \frac{\hbar\omega_{fi}}{2} \right)^2}. \quad (3.15)$$

Los últimos dos términos de la ecuación (3.13) son conocidos como términos negativos. No contribuyen a la absorción bifotónica si la energía del fotón está lejos del límite de la absorción de un fotón. En transiciones cercanas contribuye y se relaciona con la saturación virtual, desfavoreciendo la transición.

Así,  $\delta_{2PA}(\omega)$ , incluyendo los términos dipolar y de absorción de dos fotones se presenta:

$$\delta_{2PA}(\omega) = \frac{1}{5c^2 \hbar n^2 \varepsilon_0^2} \frac{(\hbar\omega)^2}{(\hbar\omega_{ei} - \hbar\omega)^2 + \Gamma_{ei}^2} \times \left[ \frac{|\mu_{ei}|^2 |\Delta\mu|^2 \Gamma_{ei}}{(\hbar\omega_{ei} - 2\hbar\omega)^2 + \Gamma_{ei}^2} + \frac{|\mu_{ei}|^2 |\mu_{ef}|^2 \Gamma_{fi}}{(\hbar\omega_{fi} - 2\hbar\omega)^2 + \Gamma_{fi}^2} \right]. \quad (3.16)$$

Los espectros de absorción bifotónica típicamente tienen varias bandas que corresponden a diferentes estados finales pero el mismo estado intermedio.

Aspectos importantes que se deben de considerar en el diseño de sistemas con buenas propiedades de absorción bifotónica de acuerdo con esta descripción matemática son:<sup>85</sup>

- Aumentar el valor de los momentos dipolares de transición: Esto puede ser logrado aumentando la longitud de los puentes  $\pi$ , introduciendo grupos donadores o aceptores de electrones. En moléculas centrosimétricas, aumentando la diferencia entre los momentos dipolares permanentes.
- Maximizar los términos resonantes: Se consigue al acercarse a la energía de resonancia entre el estado basal e intermedio. Si el estado intermedio se encuentra cerca de la mitad de energía del estado final, se consigue una condición de doble resonancia.
- Reducir el ancho de banda de la transición de absorción monofotónica ( $\Gamma_{ei}$ ).

El primer punto es sencillo de conseguir al diseñar la molécula con las características mencionadas. Los otros dos puntos requieren de un mejor conocimiento del sistema molecular y los espectros de absorción característicos para la familia de compuestos a los que pertenece la molécula a probar. Algunos de estos grupos con formas de las bandas espectrales conocidas son las cianinas,<sup>86</sup> escuaraminas,<sup>87</sup> porfirinas,<sup>61</sup> entre otras.

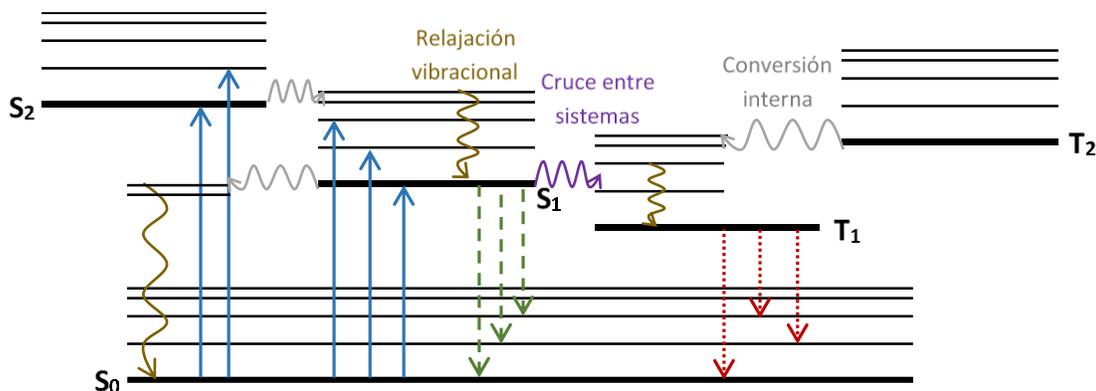
El diseño de moléculas con altas secciones transversales de absorción bifotónica ha tenido un auge importante debido a la gran gama de herramientas sintéticas con las que se cuenta hoy en día. Cada vez es más sencillo crear moléculas más complejas y con grupos funcionales orientados en posiciones específicas.

### 3.1.2. Procesos fotofísicos

Después de absorber luz, el estado electrónicamente excitado generado es un sistema de alta energía y fuera del equilibrio, por esta razón su desactivación sucede rápidamente. Cuando el sistema se encuentra en solución, la energía en exceso del sistema es eliminada mediante varios canales, a través de estados vibroelectrónicos de la misma molécula de regreso al estado basal (procesos fotofísicos), o con la formación de otras especies (procesos fotoquímicos; ver sección 3.1.3). Todas estas rutas de desactivación son realizadas con diferente eficiencia dependiendo de la velocidad característica de cada proceso. Dicho lo anterior, se puede inferir que todas las moléculas presentan estos canales de desactivación en mayor o menor medida y conocer las velocidades a las

que estos diferentes procesos suceden permite entender la compleja dinámica de los estados excitados de la especie en cuestión. Además, el diseño de nuevas moléculas con procesos controlados por la absorción de luz como la azida en forma de hemicianina de este estudio, requiere tomar en cuenta estos canales que compiten con el de la disociación.

Los procesos fotofísicos pueden a su vez ser divididos en radiativos o no radiativos. Una forma de esquematizar este proceso es mediante un diagrama de Jablonski (Fig. 3.2).<sup>2,88</sup> En este diagrama se muestran los estados electrónicos singletes ( $S_n$ ), tripletes ( $T_n$ ) y sus respectivos niveles vibracionales. Los procesos que involucran la absorción o emisión de un fotón, incluida la absorción, son mostrados con flechas rectas. Los procesos en los que no involucran radiación son indicados con flechas onduladas.



**Fig. 3.2.** Diagrama de Jablonski de fenómenos fotofísicos relevantes. Absorción (flechas azules), relajación vibracional, conversión interna, cruce entre sistemas, fluorescencia (flechas verdes guiones) y fosforescencia (flechas rojas puntos).

La absorción de un fotón generalmente da lugar a un estado excitado en un nivel vibracional elevado. En solución, las moléculas excitadas vibracionalmente tienden a disipar esa energía en exceso por interacciones con moléculas de disolvente a su alrededor hasta llegar al estado vibracional de menor energía ( $v = 0$ ) dentro del mismo estado electrónico. Este proceso se conoce como relajación vibracional. Las constantes cinéticas típicas de este proceso en solución son  $10^{13} \text{ s}^{-1}$ . La relajación vibracional es el proceso de desactivación más rápido en el estado excitado, por esta razón todos los procesos, físicos o químicos suceden desde estados excitados vibracionalmente en equilibrio.<sup>1</sup>

Las transiciones no radiativas ocurren entre niveles vibracionales isoenergéticos de diferentes estados electrónicos. Como no existe un cambio en la energía total del sistema, no hay emisión de fotones en el proceso y se representan como líneas horizontales onduladas en el diagrama de Jablonski. Los procesos de desactivación no radiativos pueden ser entre estados de igual o diferente multiplicidad de espín, son llamados conversión interna y cruce entre sistemas, respectivamente (Fig. 3.2).

La constante cinética para las transiciones no radiativas isoenergéticas está dada por la regla de oro de Fermi:

$$k_{nr} = \left(\frac{2\pi}{\hbar}\right) \langle \phi_f \sigma_f | \hat{H}' | \phi_i \sigma_i \rangle^2 \sum_n \langle \theta_{f,n} | \theta_{i,0} \rangle^2 \quad (3.17)$$

donde  $\hat{H}'$  es una perturbación adecuada que promueve la transición.<sup>2</sup> El acoplamiento entre el estado vibracional del estado electrónico de partida,  $\theta_{i,0}$ , y el de los estados vibracionales superiores de algún estado receptor,  $\theta_{f,n}$ , al ser cada vez más próximos entre sí, pueden aproximarse a un cuasi-continuo e integrar esas probabilidades en una densidad de estados a la energía respectiva ( $\rho(E)$ ) que considera todas las contribuciones en un intervalo de energías. Considerando también  $H_{fi}$  como el elemento de matriz que acopla los estados inicial y final, la ecuación de la regla de oro de Fermi se reduce:

$$k_{nr} = \left(\frac{2\pi}{\hbar}\right) |H_{fi}|^2 \rho(E) \quad (3.18)$$

Uno de los canales de desactivación no radiativos con los que compete la fotodisociación de la hemicianina en forma de azida es la conversión interna. Como se mencionó anteriormente, la ruptura del enlace N-N<sub>2</sub> se da en el estado S<sub>2</sub>, por lo que la conversión al estado S<sub>1</sub> es la limitante principal del proceso. Para la conversión interna,  $\hat{H}'$  es el operador de energía cinética nuclear  $\hat{H}_{ci}$ .<sup>89</sup>

$$\hat{H}_{ci} = \hat{H}_e + \hat{T}_N = \hat{H}_e - \sum_k \frac{\hbar^2}{2\mu_k} \frac{\partial^2}{\partial R_k^2} \quad (3.19)$$

donde  $\hat{H}_e$  es el hamiltoniano electrónico,  $\hat{T}_N$  es la parte nuclear de la energía cinética,  $\mu_k$  es la masa del núcleo  $k$  y  $R_k$  sus coordenadas.

El elemento de matriz  $\langle \phi_f | \hat{H}_{ci} | \phi_i \rangle$  es diferente de cero si  $\phi_f$  y  $\phi_i$  pertenecen a la misma representación irreducible.<sup>90</sup> La conversión interna entre estados excitados superiores ( $S_n \rightsquigarrow S_1$ ,  $T_n \rightsquigarrow T_1$ ) es extremadamente rápida, usualmente con constantes cinéticas de alrededor de  $10^{12} \text{ s}^{-1}$ .<sup>1,2</sup> Esta rapidez ocasiona que los procesos radiativos o transformaciones químicas sucedan desde el estado excitado de menor energía ( $S_1$ ). Este fenómeno se conoce como Regla de Kasha.<sup>91</sup>

Otro fenómeno de desactivación no radiativa importante en la comprensión del sistema de estudio es el cruce entre sistemas debido a la predisposición de los compuestos aromáticos nitrados de desactivarse de esta manera. El fluoróforo obtenido como resultado de este estudio es un compuesto nitroaromático que no cumple con esta característica, pero es importante comprender los factores para que el cruce entre sistemas sea eficiente o no. En este caso,  $\hat{H}'$  es el operador espín-orbita ( $\hat{H}_{SO}$ ):<sup>92</sup>

$$\hat{H}_{SO} = \frac{1}{2m_e^2 c^2} \sum_l \sum_i \frac{Z_l^{eff}}{r_{il}^3} \hat{l}_i \cdot \hat{s}_i \quad (3.20)$$

Donde  $\hat{l}_i$  es el operador de momento angular y  $\hat{s}_i$  es el operador de espín, ambos para el electrón  $i$ ;  $Z_l^{eff}$  es la carga nuclear efectiva del núcleo  $l$ ,  $m_e$  la masa del electrón en reposo,  $c$  la velocidad de la luz y  $r_{il}$  es la posición del electrón  $i$  respecto al núcleo  $l$ .

En moléculas orgánicas, los estados excitados de baja energía frecuentemente resultan de las transiciones  $n \rightarrow \pi^*$  o  $\pi \rightarrow \pi^*$ , por lo tanto, tienen un papel importante en el cruce entre sistemas. Para este proceso no radiativo, las reglas de El-Sayed rigen si las transiciones son permitidas o prohibidas:<sup>92</sup>

$$\begin{aligned} {}^1(n, \pi^*) &\leftrightarrow {}^3(\pi, \pi^*), & {}^3(n, \pi^*) &\leftrightarrow {}^1(\pi, \pi^*) \\ {}^1(n, \pi^*) &\leftrightarrow {}^3(n, \pi^*), & {}^1(\pi, \pi^*) &\leftrightarrow {}^3(\pi, \pi^*) \end{aligned}$$

Sin embargo, incluso los procesos prohibidos pueden ocurrir, aunque con una constante cinética menor. Esto se debe a acoplamiento vibracionales. El cruce entre sistemas entre estados los excitados ( $S_1 \rightsquigarrow T_n$ ), es moderadamente rápido con constantes de  $10^9$ – $10^8 \text{ s}^{-1}$ .<sup>1</sup>

Los procesos de desactivación radiativos involucran la emisión de un fotón. Ya que en esta tesis se estudió un sistema capaz de transformarse de una forma no emisiva a una emisiva, la descripción de los canales de desactivación radiativos resulta importante. Los procesos de absorción y emisión también pueden ser estudiados en términos de los coeficientes de Einstein. Tomando en cuenta que el equilibrio térmico las poblaciones en los dos estados electrónicos no puede ser igual, se introduce el concepto de emisión espontánea, descrita por:

$$A_{21} = \frac{64\pi^4\nu_{21}^3}{3hc^3} \langle \Psi_2 | \hat{\mu} | \Psi_1 \rangle^2 \quad (3.21)$$

donde  $\nu$  es la frecuencia de la transición. En este caso, las reglas de selección mencionadas anteriormente siguen siendo válidas para la emisión.<sup>2</sup>

Las desactivaciones radiativas pueden clasificarse de acuerdo con la multiplicidad de los estados involucrados en la transición. Se llama *fluorescencia* a la emisión permitida por espín, por ejemplo, de un estado  $S_1$  a un  $S_0$ . El término fosforescencia aplica para las emisiones prohibidas por la regla de selección de espín como la que ocurre desde un estado  $T_1$  al  $S_0$ .

Cada uno de los procesos mencionados anteriormente exhibe constantes de rapidez características. Las transiciones prohibidas por espín generalmente tienen constantes mucho menores que las de los procesos en los que intervienen estados de igual multiplicidad:<sup>89</sup>

- Conversión interna:  $10^{14}$ – $10^{12}$  s<sup>-1</sup>.
- Cruce entre sistemas:  $10^6$ – $10^8$  s<sup>-1</sup>.
- Fluorescencia:  $10^8$ – $10^{10}$  s<sup>-1</sup>.
- Fosforescencia:  $10^3$ – $1$  s<sup>-1</sup>.

Cada uno de estos procesos puede ser representado en el diagrama de Jablonski (Fig. 3.2) que considera una sola especie química. Todos estos procesos suceden a la par de canales de desactivación fotoquímicos que cambian la identidad de la molécula. La

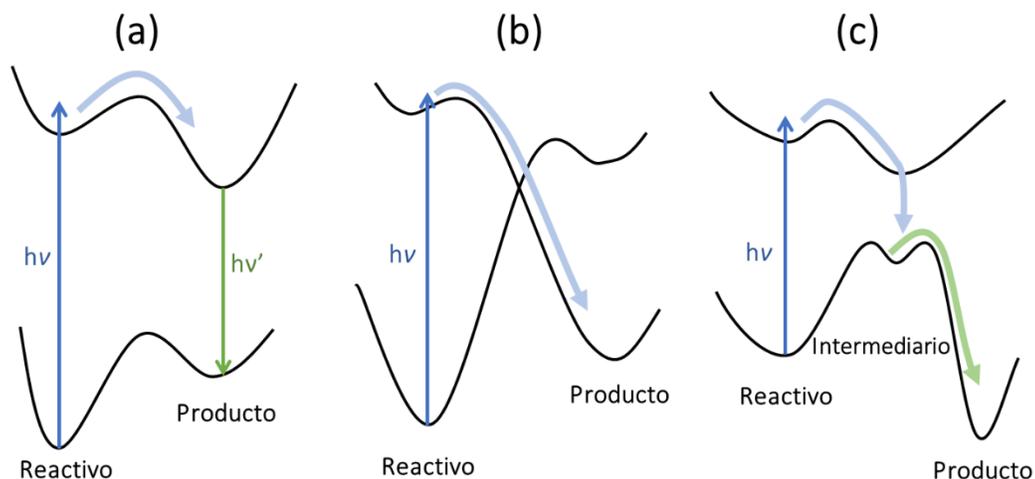
probabilidad de que ocurran dependerá de los valores para las constantes de rapidez de cada uno.

### 3.1.3. Transformaciones químicas en estados excitados

Como fue mencionado anteriormente, en este trabajo se busca diseñar y probar una molécula capaz de realizar un cambio en su estructura química después de ser irradiada. En este trabajo, la azida aromática obtenida es capaz de convertirse en otra especie en el estado excitado al romperse el enlace  $-N-N_2$ . Las reacciones fotoquímicas son otro canal de desactivación que tiene el estado excitado en el que la energía absorbida es empleada para romper, formar o rotar enlaces.

Los estados excitados pueden llegar a desactivarse también por una variedad de procesos químicos, con cambios en la estructura o en la composición de la especie que absorbió energía. Debido a que los estados excitados poseen una alta energía, se espera que posean una reactividad mayor a la de sus estados basales correspondientes. Este cambio está asociado con las diferencias en la estructura electrónica entre ambos estados. Vale la pena pensar a los estados excitados como especies químicas diferentes, con una reactividad específica.<sup>89</sup> Esta reactividad está también influida por la forma de las superficies de energía potencial de los estados electrónicos excitados, que generalmente presentan barreras energéticas más pequeñas que los estados basales respectivos.

Las reacciones fotoquímicas pueden ser representadas a través de las superficies de energía potencial que describan el cambio de energía en el sistema como función de un cambio en las coordenadas nucleares. Representaciones en dos dimensiones de estas superficies (Fig. 3.3) permiten visualizar las desactivaciones radiativas y no radiativas, además de la evolución de la fotorreacción de reactivos a productos.<sup>2</sup>



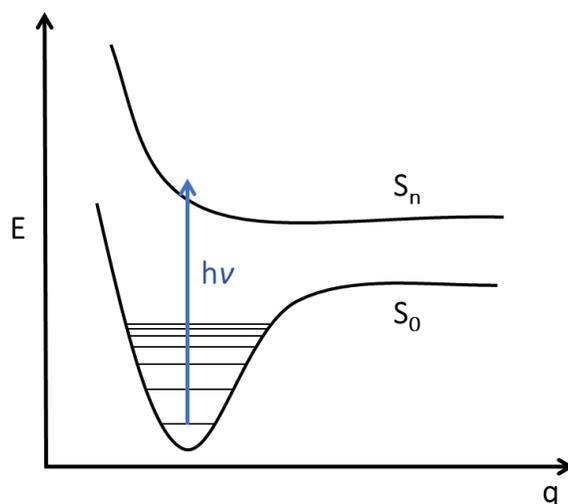
**Fig. 3.3.** Tres tipos de reacciones fotoquímicas.

En el ejemplo anterior (Fig. 3.3) se esquematizan tres casos importantes de fotorreacciones:

- Reacciones que se completan en el estado excitado. Pueden seguirse por la emisión del fotoproducto. Este tipo de reacciones son llamadas adiabáticas. Entre ellas se encuentran las transferencias de protones intramoleculares, formaciones de enlaces y las disociaciones.
- Reacciones que comienzan en el estado excitado y terminan en el producto en estado basal por el cruce entre las dos superficies (intersección cónica). En estas reacciones diabáticas o no adiabáticas, no se puede observar el intermediario en el estado excitado. Dentro de este tipo de reacciones se encuentran el cambio de espín en complejos de Fe(II) o las fotoisomerizaciones cis-trans.
- Reacciones que forman un intermediario en el estado basal. Radicales libres formados o pares zwitterionicos que retienen gran parte de la energía de excitación son ejemplos de estas reacciones.

Las fotorreacciones de interés en este trabajo se encuentran en el caso a), las fotodisociaciones directas. En este tipo de procesos, la excitación electrónica redistribuye la densidad electrónica de orbitales moleculares enlazantes a regiones de anti-enlace en la molécula. Esto ocasiona que las repulsiones entre los núcleos involucrados aumenten. Posteriormente, la molécula evoluciona en la superficie de energía potencial

del estado excitado (ver Fig. 3.4), modificando su geometría para minimizar la energía del sistema. En muchas moléculas se llega a un mínimo en esta superficie, desde donde pueden llevarse a cabo procesos como los mencionados en el apartado anterior. Sin embargo, en estados excitados disociativos este mínimo no existe o es muy poco profundo, ocasionando que la molécula evolucione en la coordenada de enlace hasta llegar a la disociación completa.<sup>89</sup>



**Fig. 3.4.** Curvas de energía potencial del estado basal y excitado para una molécula que se fotodisocia.

Generalmente se requiere de energías altas para llegar a estos estados electrónicos disociativos. Pero moléculas con gran tensión estructural como ciclobutenos,<sup>93</sup> espiropiranos<sup>94</sup> y diaryletenos<sup>95</sup> tienen estados excitados disociativos de baja energía. Otro grupo de moléculas con esta propiedad son ozono o las azidas aromáticas.<sup>45</sup>

### 3.1.4. Competencia cinética

A partir de la información que se ha detallado en los apartados anteriores, es posible comprender que los procesos de desactivación de los estados excitados son diversos y suceden simultáneamente. Todos estos fenómenos suceden en escalas de tiempo muy variadas que van desde las decenas de femtosegundos hasta los microsegundos. El conocer y comprender las constantes cinéticas de cada uno de los procesos y como compiten unas con otras, nos permite diseñar sistemas en los cuales alguna de estos canales de desactivación sea favorecido o prohibido.

En términos generales, se abordaron tres tipos de procesos de desactivación del estado excitado: desactivación no radiativa, desactivación radiativa y reacción química. Sus constantes de rapidez específicas y la competencia cinética entre ellas resulta de vital importancia para determinar el comportamiento del estado excitado de una molécula.<sup>2</sup> Como se verá más adelante, en el sistema presentado en esta tesis, la competencia entre los diferentes canales de desactivación definen la eficiencia con la que el proceso de fotólisis del grupo azida se llevará a cabo. Además, el análisis cinético resulta de gran importancia en la determinación de las propiedades fluorescentes del fotoproducto generado.

Un estado excitado decaerá de acuerdo con una cinética de primer orden con un tiempo de vida  $\tau$  característico, dado por la ec:

$$\tau = \frac{1}{k_{rad} + k_{nr} + k_{fq} + \dots} = \frac{1}{\sum_i k_i} \quad (3.22)$$

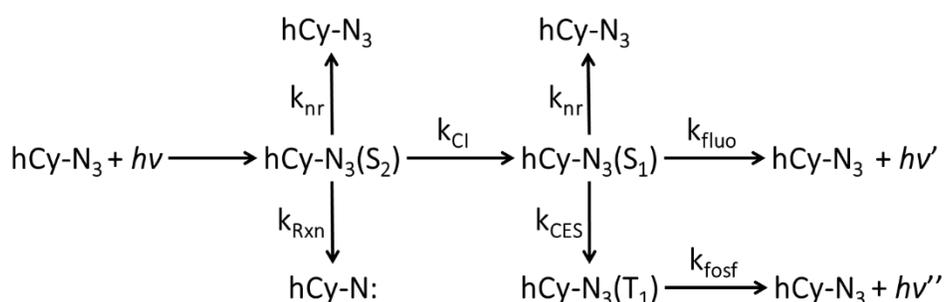
donde  $k_i$  representan las constantes de rapidez cinéticas para los diferentes procesos de desactivación. El tiempo de vida del estado excitado representa el tiempo requerido para reducir el número de moléculas en el estado excitado a  $1/e$  de su valor inicial y puede ser determinado experimentalmente siguiendo el decaimiento de alguna cantidad proporcional al número de moléculas en el estado excitado como la fluorescencia.

La probabilidad de cada proceso de desactivación está relacionada con su constante cinética. Para cada proceso, el rendimiento de ese fenómeno particular ( $\Phi_i$ ) está definido como la relación entre el número de moléculas que realizan el proceso  $i$  y el número de fotones absorbidos. En este caso,  $\Phi_i$  es proporcional a la constante cinética del proceso y su relación con el resto de las canales de desactivación:

$$\Phi_i = \frac{k_i}{k_{rad} + k_{nr} + k_{fq} + \dots} = \frac{k_i}{\sum_j k_j} \quad (3.23)$$

La determinación de estos rendimientos requiere la medición de los productos: fotones emitidos, concentración de nuevas especies, etc. y el número de fotones absorbidos inicialmente. Para estas mediciones se debe emplear alguna fuente de luz monocromática para evitar la contribución de otros fenómenos en la determinación.

La dinámica completa de los estados excitados considera los diferentes canales de desactivación de la molécula (Fig. 3.5). Así, en principio, el comportamiento real de una molécula en el estado excitado es resultado de un sistema complejo de procesos que suceden de manera paralela y consecutiva que compiten entre sí. La rapidez extrema de algunos procesos como la conversión interna o la duración muy larga de otros como el cruce entre sistemas, hace que la descripción pueda simplificarse en gran medida. En muchos casos, una evaluación de los factores que afectan la cinética del proceso en un estado electrónico en particular da la posibilidad de explicar y en algunos casos predecir el comportamiento fotofísico y fotoquímico de los sistemas.



**Fig. 3.5.** Representación esquemática del proceso de desactivación de los estados excitados de hCy-N<sub>3</sub>.

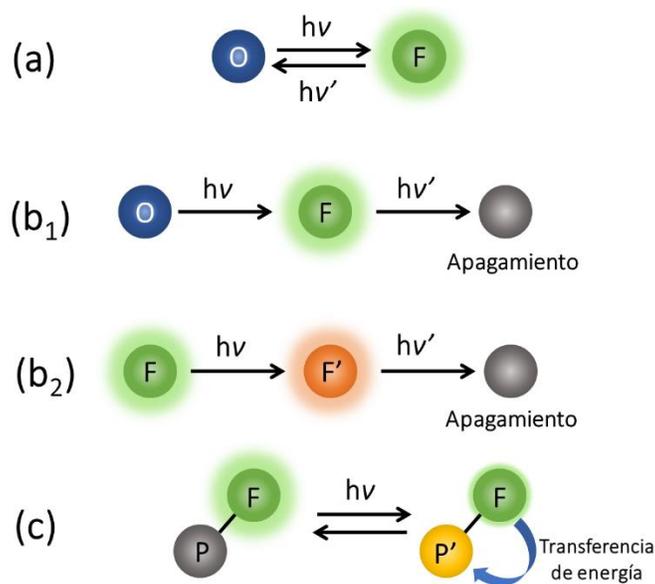
### 3.2. Fluorógenos y fluoróforos

El objetivo principal de este trabajo es la obtención de una azida aromática o sistema compuesto con un punto cuántico que sea convertido de una especie con un bajo rendimiento de fluorescencia a otra con buenas propiedades emisivas. Las especies capaces de llevar a cabo este tipo de transformaciones son conocidas como fluorógenos. Estas especies precursoras pueden ser activadas mediante mecanismos muy diversos como factores químicos como pH, agentes oxidantes, enzimas o la unión a algún analito. Otro grupo de fluorógenos son activados por medios físicos como corrientes eléctricas o radiación electromagnética.

Los fluorógenos transformados por la absorción de luz resultan relevantes debido al control obtenido mediante esta activación por la posibilidad de modular la longitud de onda de excitación y el área de irradiación. Estos interruptores fotoinducidos

fueron concebidos originalmente para su uso en dispositivos ópticos de almacenamiento de datos, pero han tenido una gran relevancia en otros campos como microscopía de fluorescencia, en particular en aplicaciones de microscopía de super-resolución.<sup>85</sup>

El diseño de las moléculas debe procurar maximizar el rendimiento de esta transformación. La mayor cantidad de fotones empleados resultará en la obtención de la especie fluorescente, con lo que se requerirán potencias menores en la fuente de luz. Los fluorógenos pueden exhibir transiciones de la forma no fluorescente a la fluorescente de forma reversible o irreversible como se muestra en la Fig. 3.6.<sup>10</sup>



**Fig. 3.6.** Tipos de fluorógenos: (a) fotoconvertibles, (b) fotoactivables y (c) por transferencia de energía a una especie fotocromática.

Algunos mecanismos de conversión son:

- Fluorógenos fotoconvertibles: son activados reversiblemente entre el estado fluorescente (F) y el no fluorescente (O). Este grupo incluye espiropiranos y moléculas con fotoisomerizaciones cis-trans. En este caso, es deseable que los espectros de absorción de ambas especies se encuentren en regiones diferentes del espectro para poder controlar el sentido de la transformación.

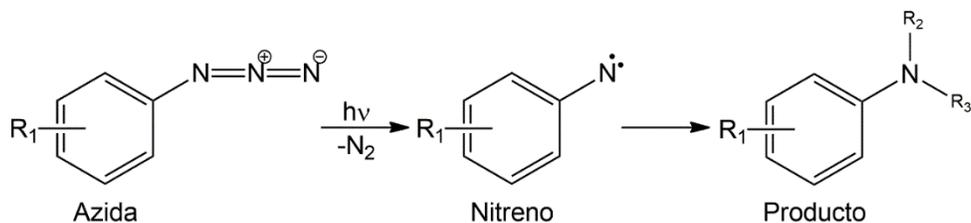
- b) Fluorógenos fotoactivables: ( $b_1$ ) son activados irreversiblemente a un estado fluorescente (F) o ( $b_2$ ) a una especie con emisión en una región diferente del espectro electromagnético (F'). En el primer caso, también es deseable que los espectros de emisión del fluorógeno y el fluoróforo sean diferenciables con el fin de activar la transformación o realizar una lectura de la fluorescencia de manera independiente. Para el segundo escenario, también se busca que los espectros de emisión aparezcan en regiones diferentes y que no haya traslape entre los espectros de absorción y emisión de una y otra especie. Algunos ejemplos de este tipo de fluorógenos son las azidas aromáticas, fluoróforos enjaulados como cumarinas y fluoresceínas.
- c) Sistemas activados por transferencia resonante de energía en los que un fluoróforo (F) cede la energía absorbida a un compuesto fotocromático capaz de transformarse (P). En este caso sí se busca que el espectro de emisión del donador se traslape con el del aceptor de energía para hacer el proceso de transferencia más eficiente.

Los fluorógenos fotoactivables una vez convertidos a su forma brillante pueden presentar fenómenos de apagamiento también causados por la luz absorbida. El apagamiento está dictado por una competencia cinética entre varios canales de desactivación del estado excitado. La extinción de la fluorescencia puede implicar otra transformación fotoquímica ahora del fluoróforo, habitualmente por la generación de especies muy reactivas como radicales libres.<sup>53</sup>

### 3.2.1. Fluorógenos tipo azida

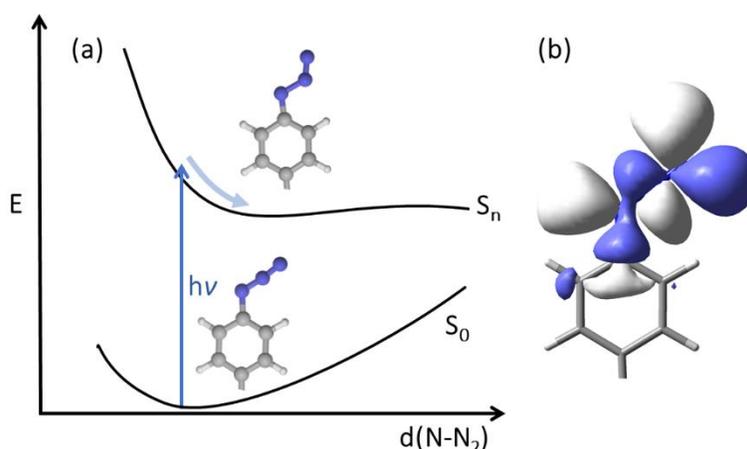
Un grupo particular de moléculas que llevan a cabo una transformación química después de absorber radiación y que sirvieron de modelo para la molécula estudiada en este trabajo son las azidas, especies que contienen el grupo  $-N=N^{\oplus}=N^{\ominus}$ .<sup>45</sup> De entre ellas, las azidas aromáticas (Fig. 3.7) generan un gran interés por su mayor estabilidad térmica respecto a sus contrapartes alifáticas, lo que facilita su manipulación y su aplicación.<sup>46</sup> Además, los productos obtenidos de estas reacciones pueden resultar en especies fluorescentes, a partir de las azidas que regularmente no lo son.<sup>50</sup> La fotoquímica de estas

especies resulta influenciada por las propiedades electrónicas de la molécula,<sup>40</sup> los grupos funcionales presentes en ella<sup>96,97</sup> y los productos obtenidos dependen del medio en el que se encuentra.<sup>45</sup>



**Fig. 3.7.** Fototransformación de una azida aromática. R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> = alquilo, arilo, H, O.

Después de absorber un fotón, la molécula es promovida a un estado excitado con un carácter disociativo. La transición responsable involucra a los orbitales moleculares  $\pi$  y  $\sigma^*$  presentes en los tres átomos de nitrógeno. Esta transición debilita el enlace entre los átomos de nitrógeno R-N-N<sub>2</sub>, donde R es el anillo aromático (Fig. 3.8). Este hecho es conocido como predisiociación. Posteriormente el sistema evoluciona en esa superficie de energía potencial disociativa para dar lugar al respectivo nitreno R-N: y a una molécula de nitrógeno N<sub>2</sub>.<sup>40</sup>



**Fig. 3.8.** Esquema de las curvas de energía potencial de las azidas al fotodisociarse (a) y orbital  $\sigma^*$  involucrado la transición.

Esta evolución en la superficie de energía potencial genera cambios geométricos importantes en el grupo azida además del alargamiento del enlace N-N<sub>2</sub>. Por lo general el estado disociativo presenta un mínimo poco marcado en el cual el ángulo formado por los tres átomos de nitrógeno cambia de ser prácticamente 180° a reducirse hasta 140-120° como se muestra en la Fig. 3.8. Esta geometría sugiere la posterior disociación

de la azida ya que coloca al fragmento  $N_2$  listo para ser liberado como una molécula de nitrógeno gaseoso.

El nitreno generado es una especie muy reactiva, análogo a un carbeno. El átomo de nitrógeno posee sólo 5 electrones de valencia, lo que lo convierte en un electrófilo.<sup>45</sup> De estos electrones en el átomo de N en la molécula, dos se encuentran en orbitales *p* degenerados, lo que permite que los nitrenos puedan presentar multiplicidad singulete o triplete. Después de la fotólisis de la azida, el nitreno generado conserva la multiplicidad singulete y rápidamente pierde energía en forma de calor para después llevar a cabo transformaciones desde su estado singulete o triplete. Las temperaturas elevadas favorecen las reacciones del nitreno intermediario en estado singulete, mientras que las bajas temperaturas están asociadas a reacciones con el nitreno triplete.

La variedad de productos generados a partir del nitreno es vasta y como se mencionó, depende del medio en el que se realice la disociación del grupo azida. Los productos más comunes encontrados para reacciones de nitrenos aromáticos en solución se muestran en la Fig. 3.9. Estas reacciones van desde expansiones en el anillo aromático para producir cetenimidias (**1**) en disolventes como pentano o hexano a temperatura ambiente a partir del nitreno singulete. También desde este estado se pueden producir reacciones de inserción con disolventes como alcoholes para general oximas (**2**) y *O*-alquil u *O*-aril oximas. Los nitrenos también pueden abstraer dos átomos de hidrógeno del disolvente, para generar aminas aromáticas (**3**). Si el nitreno logra estabilizarse hasta su forma triplete antes de reaccionar, se pueden formar dímeros que llevan a la obtención de azocompuestos (**4**). Finalmente, el estado triplete del nitreno también puede reaccionar con  $O_2$  disuelto en el medio y generar los compuestos nitro (**5**) o nitroso (**6**) respectivos.<sup>45</sup>

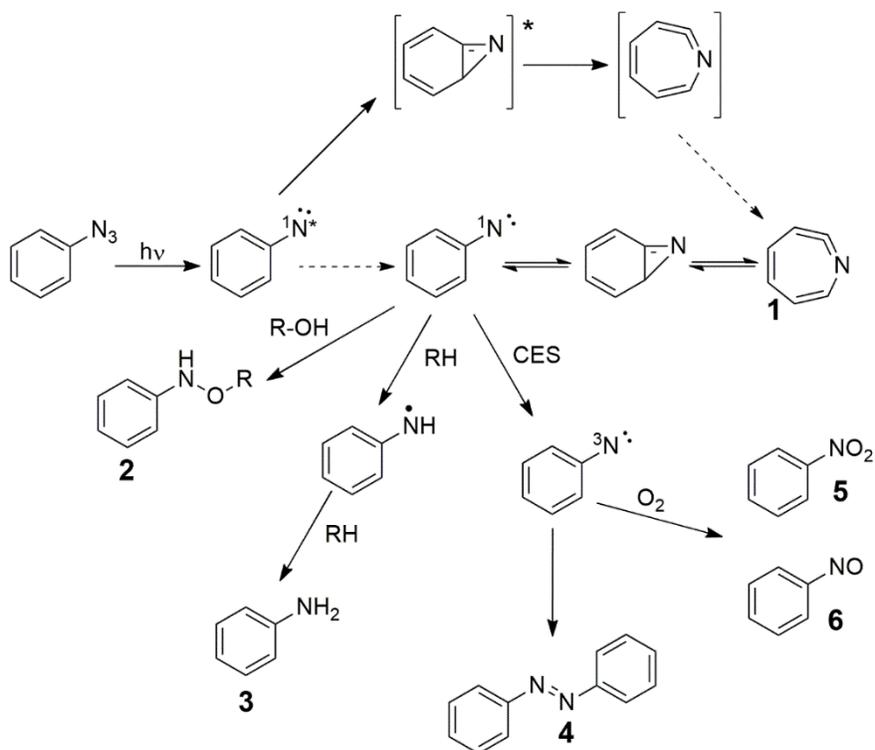


Fig. 3.9. Fotoquímica de las azidas aromáticas en solución.

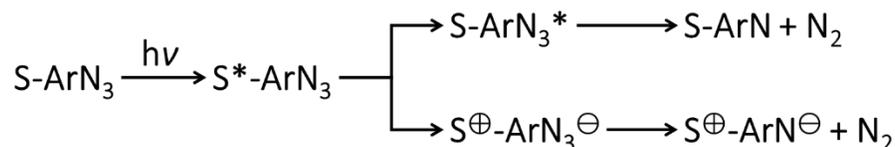
Como puede observarse, los nitrenos pueden brindar una amplia gama de productos y la proporción entre ellos puede ser controlada, hasta cierto punto, con el medio de reacción. Otro parámetro que se ha buscado modificar es que esta transformación se lleve a cabo al irradiar con luz en el visible. La mayoría de las azidas aromáticas estudiadas tienen bandas de absorción en el UV cercano.<sup>46</sup> Al aumentar la conjugación del sistema se obtiene un corrimiento batocrómico de la banda de absorción de las azidas, que puede llegar hasta longitudes de onda en el intervalo del visible. Sin embargo, un aumento en la conjugación del sistema causa una disminución en el rendimiento de la fotólisis del grupo azida. Estudios teóricos y experimentales previos para el rendimiento de fotodisociación de azidas aromáticas neutras ( $\Phi$ ) y cargadas ( $\Phi_{+1}$ ) han establecido límites en la cantidad de electrones en orbitales  $\pi$  conjugados para que el sistema sea fotoactivo.<sup>38,39</sup> Un resumen de estos resultados se muestra en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1.** Efecto del tamaño del sistema  $\pi$  y la carga en el rendimiento de fotodisociación de azidas aromáticas.

Tamaño del sistema $\pi$	$6e^-$	$14e^-$	$22e^-$	$\geq 26e^-$
Rendimiento	$\Phi, \Phi_{+1} > 0.5$	$\Phi, \Phi_{+1} > 0.1$	$\Phi > 0.1$ $\Phi_{+1} < 0.01$	$\Phi, \Phi_{+1} < 0.01$
Efecto de la carga	$\Phi > \Phi_{+1}$	$\Phi \sim \Phi_{+1}$	$\Phi \gg \Phi_{+1}$	$\Phi \sim \Phi_{+1}$

Esta información debe de ser considerada en el diseño de sistemas fotoactivables con el grupo azida, como el caso del fluorógeno hCy-N<sub>3</sub> diseñado. El sistema contiene 20 e<sup>-</sup>  $\pi$ , que de acuerdo con la Tabla 3.1, permite que presente fotodisociación de ser irradiado.

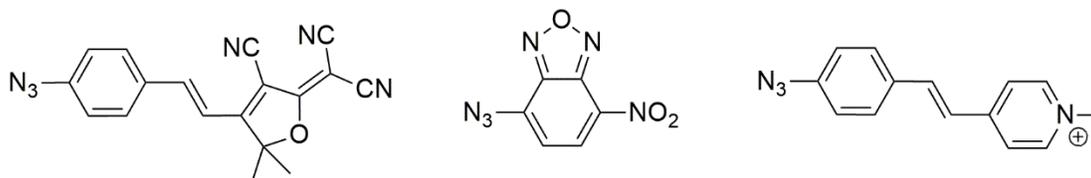
Otra aproximación para aumentar la sensibilidad de las azidas a ser disociadas por luz visible es el uso de sensibilizadores (S), que pueden actuar por transferencia de energía o transferencia de electrones (Fig. 3.10). En ambos casos se consigue la degradación de la azida.<sup>40</sup> Sin embargo, los productos finales después de la disociación pueden ser diferentes para cada mecanismo de sensibilización.

**Fig. 3.10.** Uso de sensibilizadores (S) para promover la disociación de azidas aromáticas (ArN<sub>3</sub>) por transferencia de energía (arriba) o transferencia de carga (abajo).

Este es uno de los esquemas planteados en este trabajo para conseguir la disociación de la azida, mediante transferencia de energía desde un punto cuántico. La diferencia principal es que el QD además de ceder la energía absorbida, será excitado bifotónicamente presentando una elevada sección transversal, presentando las ventajas ya mencionadas para este modelo de absorción.

Es importante mencionar que sistemas basados en azidas aromáticas precursoras de compuestos donador-aceptor han comenzado a ser explorados como fluorógenos.<sup>42</sup> Ejemplos de estos sistemas se muestran en la Fig. 3.11. Las especies obtenidas

principalmente en estos casos son las especies aminas que presentan una alta fluorescencia.



**Fig. 3.11.** Algunas azidas aromáticas empleadas como fluorógenos.

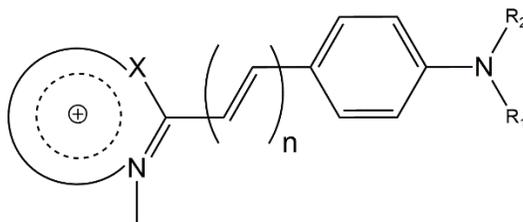
También se han encontrado derivados nitrados a partir de la fotólisis de azidas, este tipo de compuestos tiende a ser especies oscuras al igual que las azidas. En estos casos se ha empleado la enzima nitroreductasa para producir una reducción del grupo nitro a su forma fluorescente amina.<sup>51</sup> La enzima tiene otra ventaja adicional, la dependencia de NADH o FADH como cofactores. Estas formas reducidas se encuentran en grandes concentraciones en células cancerosas,<sup>98</sup> con lo que el fluorógeno se convierte además de un marcador en microscopia, en un sensor para este tipo de células.

Sin embargo, el uso de estos fluorógenos azida aún está limitado por la energía de la radiación necesaria para su transformación además de la falta de control en tres dimensiones de su activación. El sistema hCy-N<sub>3</sub>/QD pretende saldar esas deficiencias. El composito propuesto en este trabajo presenta una alta probabilidad de absorber dos fotones de manera simultánea debido al punto cuántico que funge de antena (ver sección 3.3). Esta propiedad brinda la posibilidad de su uso en medios biológicos. La radiación absorbida por el punto cuántico se encuentra en el infrarrojo cercano, donde los tejidos y células son transparentes. La dependencia cuadrática del coeficiente de absorción bifotónica con la intensidad de irradiación (ver sección 3.1.1.1) ocasiona que la transformación sólo suceda en el foco de un haz enfocado. Esto permite acceder selectivamente a diferentes planos en la muestra y poder realizar una reconstrucción tridimensional de la muestra. Estas propiedades presentes en el sistema diseñado son de gran utilidad en el marco de la microscopía de super-resolución.

### 3.2.2. Compuestos polimetínicos hemicianina

Uno de los compuestos obtenidos de la fotólisis de azidas aromáticas es la amina aromática respectiva (Fig. 3.9). En el caso de la molécula hCy-N<sub>3</sub>, la forma amina

(hCy-NH<sub>2</sub>) pertenece a una familia de moléculas denominadas hemicianinas. La forma general de las hemicianinas se muestra en la Fig. 3.12. Son moléculas asimétricas con un anillo aromático con un átomo de nitrógeno cuaternizado en un extremo y una amina aromática en el otro, unidas por una cadena de átomos de carbono con dobles enlaces conjugados que resultan en un sistema con un número par de electrones  $\pi$  donde los electrones del nitrógeno del grupo amina también participan en la conjugación. El anillo con el átomo de nitrógeno puede contener otros heteroátomos como oxígeno y azufre.<sup>99</sup>



**Fig. 3.12.** Estructura general de las hemicianinas. X = S, O, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

Debido a esta conjugación extendida, las hemicianinas poseen buenas propiedades tanto para absorber luz como para fluorescer. Este tipo de moléculas ha sido empleada ampliamente como marcadores biológicos o colorantes debido a su solubilidad en medios polares. También se ha encontrado que son sensibles al pH o a la presencia de iones metálicos, con lo cual también se han utilizado como sensores colorimétricos.

### 3.2.3. Compuestos nitroaromáticos

En la molécula diseñada y estudiada en este trabajo, el fotoproducto fluorescente generado mayoritariamente fue la especie nitro respectiva, es por ello importante hablar brevemente de las propiedades fotofísicas de este tipo de moléculas. Los estados excitados de los compuestos nitroaromáticos tienden a realizar cruces entre sistemas ultrarrápidos del orden de decenas de femtosegundos. Esta desactivación tan eficiente ocasiona que muchos de estos compuestos no presenten fluorescencia significativa ( $\Phi_F < 10^{-4}$ ).<sup>51,100</sup> El cruce entre sistemas es un proceso prohibido por la regla de selección de espín, el comportamiento de este tipo de moléculas es explicado debido a la contribución del término de acoplamiento espín-orbita en el hamiltoniano de la regla de oro de Fermi (sección 3.1.2).

El cruce entre sistemas involucra cambios en el momento angular de espín y el momento angular orbital de manera que el momento angular total es conservado. Por ello, las transiciones en las que sólo cambia el momento angular de espín están prohibidas.<sup>92</sup> Si los orbitales que participan en la transición están localizados en el mismo átomo, existe una posibilidad de que el acoplamiento espín-orbita tenga un valor importante. Esto da lugar a las reglas de El-Sayed antes mencionadas (sección 3.1.2). En la Fig. 3.13 se muestran dos tipos de transiciones para compuestos nitroaromáticos.

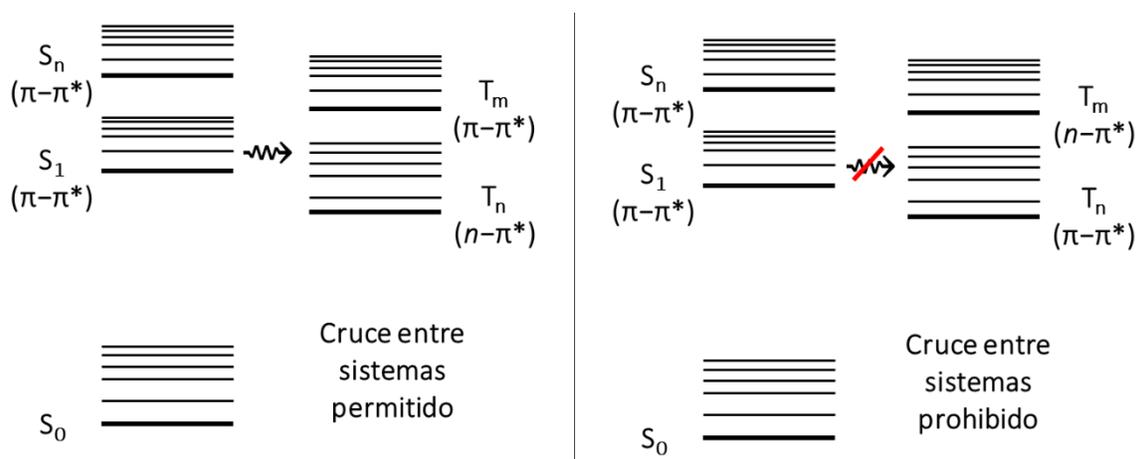


Fig. 3.13. Diagrama de los estados involucrados en cruces entre sistemas.

Algunas de las aplicaciones de los compuestos nitroaromáticos es como precursores de especies fluorescentes por reducciones selectivas que convierten a los compuestos en sus formas aminas fluorescentes o que al modificar la estructura electrónica liberan fluoróforos enjaulados. Estas transformaciones selectivas pueden ser llevadas a cabo por enzimas en presencia de ciertos cofactores como NADH y FADH.<sup>51</sup>

En la literatura existen ejemplos de compuestos nitroaromáticos que presentan fluorescencia, en la mayoría de estos casos, este comportamiento inusual es explicado por la falta de un triplete receptor con el carácter adecuado para cumplir con las reglas de Al-Sayed.<sup>101,102</sup> La ausencia o mejor dicho, falta de coincidencia energética de este triplete ocurre en compuestos del tipo donador-aceptor, cuya excitación tiende a generar estados emisivos que son estabilizados por el medio, disminuyendo su energía en comparación con el triplete antes mencionado (Fig. 3.13).<sup>103,104</sup>

### 3.3. Puntos cuánticos

Uno de los materiales capaces de absorber más de un fotón de manera simultánea y además de transferir esta energía a especies a su alrededor son los puntos cuántico o nanocristales semiconductores.<sup>69,76</sup> Estas características los hacen ideales como antenas bifotónicas. En este estudio se emplearon puntos cuánticos de CdS para incrementar el rendimiento de fotodisociación del grupo azida por absorción de dos fotones.

Un punto cuántico (QD por sus siglas en inglés, Quantum Dot) es un semiconductor inorgánico de dimensiones nanométricas (2-10 nm). Su composición varía de acuerdo con las propiedades emisivas y de absorción que se deseen, pero en general son sales (calcogenuros) de metales de transición simples o mixtas. Entre los más usados se encuentran: CdSe, CdTe, CdS, ZnS, ZnSe, PbS, PbSe, principalmente. Entre los puntos cuánticos con una cubierta se encuentran: ZnS/CdSe, PbSe/Te, CdSe/CdTe, entre otros.<sup>64</sup>

Las propiedades de estos puntos cuánticos provienen precisamente de su tamaño, al ser tan pequeños presentan fenómenos de confinamiento cuántico que los diferencian de un semiconductor en bulto. Éstos se caracterizan porque sus propiedades ópticas y electrónicas dependen de su tamaño. El confinamiento cuántico sucede cuando las partículas tienen un tamaño por debajo del radio de Bohr del excitón generado, así que éste se encuentra confinado espacialmente. El radio de Bohr es característico para cada material y es una medida de la extensión de la función de onda del excitón en el arreglo cristalino. El valor del radio de Bohr para CdSe es 6 nm, mientras que para CdS es de 2.8 nm.<sup>2</sup>

#### 3.3.1. Características físicas

Para conservar su estructura nanométrica, los puntos cuánticos requieren de surfactantes o tensoactivos que eviten la aglomeración de las partículas, con lo que se perderían las propiedades adquiridas por el confinamiento cuántico. Generalmente estos estabilizantes cuentan en uno de sus extremos con grupos capaces de anclarse a la superficie del punto cuántico mediante diversos tipos de interacciones y una forma de

proteger estéricamente al punto cuántico<sup>64</sup>. En la Tabla 3.2 se muestran los surfactantes más comunes en puntos cuánticos.<sup>65</sup>

**Tabla 3.2.** Principales recubrimientos de puntos cuánticos semiconductores.

<b>Estrategia de recubrimiento</b>	<b>Mecanismo de interacción</b>	<b>Ejemplos</b>
Tiolados	Enlace dativo tiol	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácidos mercaptocarbónicos</li> <li>• Etilenglicoles tioalquilados</li> </ul>
Sulfonatos y carboxilatos	Interacciones electrostáticas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Derivados de ácidos grasos</li> </ul>
Capa de silanos o dendrímeros	Capa entrecruzada	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mercaptoprilsilanoles</li> <li>• Dendrímeros de aminas</li> </ul>
Interacciones hidrofóbicas	Interacciones hidrofóbicas/hidrofílicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Micelas de fosfatidicolina</li> <li>• Polímeros de ácido acrílico modificados</li> </ul>
Fosfinas funcionalizadas	interdigitación	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Posfinas oligoméricas</li> </ul>
Polímeros anfifílicos	Interacciones hidrofóbicas/hidrofílicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polímeros anfifílicos de tres bloques</li> </ul>
Sacáridos anfifílicos	Interacciones hidrofóbicas/hidrofílicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sacáridos anfifílicos</li> </ul>

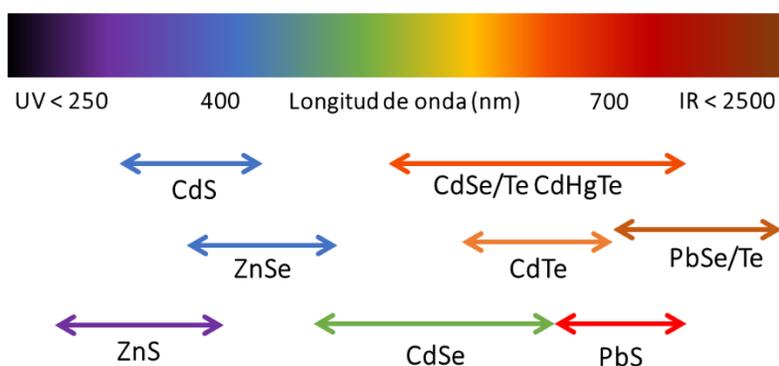
Además de especies sintéticas, los puntos cuánticos también pueden estar rodeados de proteínas o péptidos que cumplen las mismas funciones. Los surfactantes también pueden modificar la solubilidad del punto cuántico al cambiar los grupos funcionales externos.<sup>73</sup>

Los puntos cuánticos han sido empleados como marcadores biológicos *in vitro* e *in vivo*, debido a su tamaño pueden interactuar con células o tejidos. Como fue mencionado, el recubrimiento del QD además de promover la solubilidad de la partícula en el medio fisiológico, puede prevenir la toxicidad de estas.<sup>74</sup> Los nanocristales estabilizados electrostáticamente tienden a ser más pequeños que los estabilizados estéricamente, lo que permite el uso de los primeros en aplicaciones biológicas. Los QDs estabilizados estéricamente pueden ser muy grandes para entrar en células, pero son menos sensibles a efectos del pH o fuerza iónica.<sup>73</sup>

### 3.3.2. Propiedades ópticas de los puntos cuánticos

Para que el sistema azida/QD funcione eficientemente como fluorógeno es necesario que la transferencia de energía desde el punto cuántico a la azida suceda de forma eficiente. Un parámetro para que esto suceda es lograr que la emisión del punto cuántico se traslape con la absorción de la azida. Por ello es importante conocer las variables que afectan la absorción y emisión de puntos cuánticos. Las propiedades ópticas de los puntos cuánticos son controladas por el material del que están constituidos, el tamaño de la partícula y su distribución (dispersión) y la química de su superficie, en especial los enlaces que favorecen el decaimiento no radiativo. Entre estas propiedades se encuentran la posición espectral, el ancho de las bandas de absorción y emisión, el desplazamiento de Stokes, el coeficiente de absorptividad molar y el rendimiento de fluorescencia.<sup>73</sup>

Los intervalos de emisión para puntos cuánticos de diferente composición aparecen en Fig. 3.14. La gran variedad en la composición de los puntos cuánticos cubre por completo el espectro visible y parte del infrarrojo y del ultravioleta. Esta gran versatilidad brinda una amplia gama de aplicaciones para los nanocrisales que van desde marcadores biológicos hasta dispositivos electrónicos.<sup>79,105</sup>



**Fig. 3.14.** Intervalos de emisión para las principales especies de puntos cuánticos semiconductores

Los puntos cuánticos suelen tener absorciones que incrementan gradualmente en longitudes de onda más cortas a su primera banda excitónica y sus emisiones son estrechas y simétricas (20-30 nm). La longitud de onda de absorción y emisión de los puntos cuánticos puede ser modificada al cambiar el tamaño de la nanopartícula. En general, QD con un radio mayor absorben y emiten en longitudes de onda mayores. El

ancho en la banda de emisión depende principalmente de la dispersión en los tamaños de los QDs.<sup>80</sup> En este trabajo se emplearon puntos cuánticos de CdS, debido a la longitud de onda de emisión de los mismo más cercana al UV,<sup>75</sup> necesaria para activar a la hemicianina en forma de azida.

Otra propiedad relevante de los puntos cuánticos es su alta probabilidad de realizar absorción bifotónica o multifotónica.<sup>59</sup> Se han realizado una gran cantidad de estudios midiendo las secciones transversales de absorción bifotónica ( $\delta_{2PA}$ ) para puntos cuánticos de CdS, CdSe, ZnS, PbS. Todos ellos presentan valores de  $\delta_{2PA}$  entre  $10^4$ – $10^5$  GM, considerablemente mayores a los de las moléculas orgánicas que llegan a presentar valores entre  $1$ – $10^3$  GM.<sup>61</sup> La morfología de los puntos cuánticos también influye en la probabilidad de absorción bifotónica. Se ha encontrado que, en general, las formas esféricas presentan valores mayores que las elipsoidales. Un caso particular lo conforman los nanorodillos, en los que se prefiere la absorción de tres fotones.<sup>106</sup>

Los puntos cuánticos de CdS poseen valores de sección transversal de absorción bifotónica de entre  $10^3$  a  $10^5$  GM, en particular los puntos cuánticos que emiten alrededor de 410 nm como los empleados en este trabajo reportan una  $\delta_{2PA} = 10^4$  GM a 800 nm.<sup>107</sup> Al contar con una longitud de onda de activación en el infrarrojo cercano, pueden ser excitados de manera selectiva en medios celulares y tejidos, donde este tipo de radicación tiene una gran penetrabilidad comparada con luz visible.

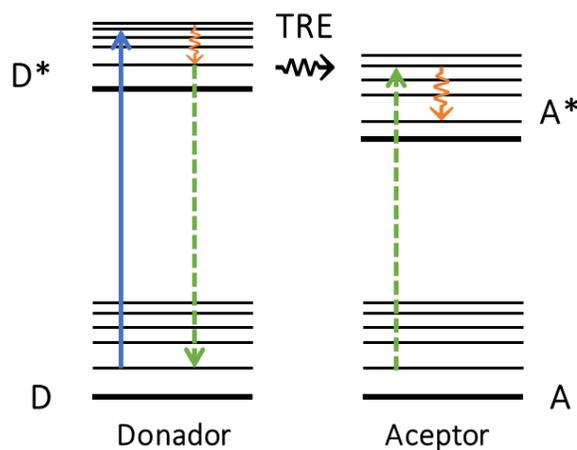
Además de buenos coeficientes de absorción monofotónicos y bifotónicos, rendimientos de emisión elevados con bandas finas, los puntos cuánticos poseen una alta fotorresistencia. Comúnmente los QDs pueden llevar a cabo miles de ciclos de excitación sin degradarse a diferencia de las moléculas orgánicas. Estas especies también poseen un fenómeno en el en el cual es conocido como “titileo”. En este caso, los puntos cuánticos son atrapados en un estado oscuro por cierto tiempo (ms–s), lo que disminuye su rendimiento de luminiscencia.<sup>10</sup>

### 3.3.3. Transferencia resonante de energía

Como fue mencionado anteriormente, las excitaciones electrónicas pueden darse de manera directa o a través de un grupo auxiliar (antena). Los puntos cuánticos han sido

explotados exitosamente como donadores en transferencia resonante de energía (TRE) con moléculas orgánicas como aceptores, debido a una emisión que puede ser modulada para traslaparse con la banda de absorción del aceptor. En nuestro sistema, la transferencia resonante de energía ocurre con el punto cuántico actuando como donador de energía y la hemicianina en forma de azida tiene el papel de aceptor de energía.

Existen evidencias que señalan que los puntos cuánticos son capaces de transferir energía a moléculas orgánicas en un mecanismo de interacciones dipolo-dipolo o multipolo-multipolo. Esto se comprobó estudiando la dependencia de la eficiencia de la transferencia en función de la temperatura<sup>108,109</sup> En esta aproximación (Fig. 3.15), una especie aceptora (A) accede a un estado electrónico excitado utilizando la energía obtenida de la desactivación de una molécula donadora excitada (D). Para el caso de la transferencia resonante de energía (TRE), no hay fotones emitidos o absorbidos involucrados en el proceso, la interacción entre las especies involucradas son acoplamientos electrostáticos entre los dipolos de las especies. Esta aproximación se conoce como la formulación de Förster.<sup>76,81</sup>



**Fig. 3.15.** Esquema para la transferencia resonante de energía entre un donador (D) y un aceptor (A).

La descripción matemática para la transferencia de energía comienza definiendo dos funciones de onda para los estados inicial y final del sistema. El primero con el donador excitado y el aceptor en estado basal y en la segunda la energía ya ha migrado teniendo un aceptor excitado y un donador desactivado.

$$\Psi_i = \Psi_{D(e)} \Psi_{A(b)} \quad (3.24)$$

$$\Psi_f = \Psi_{D(b)} \Psi_{A(a)} \quad (3.25)$$

Mientras ambas moléculas no interactúen, el Hamiltoniano total del sistema será igual a la suma de los hamiltonianos individuales:

$$\hat{H} = \hat{H}_D + \hat{H}_A. \quad (3.26)$$

En este caso, ambas funciones de onda son funciones propias del hamiltoniano total y los dos estados tienen la misma energía,  $E_D + E_A$ . Esto significa que son estados estacionarios y que la excitación no tiende a migrar de una especie a otra de manera espontánea.

La función de onda del sistema también puede ser escrita de la manera:

$$\Psi = C_D \Psi_D + C_A \Psi_A \quad (3.27)$$

donde  $C_i$  es la probabilidad de que la molécula  $i$  esté excitada.  $|C_D|^2 + |C_A|^2 = 1$ . Estos coeficientes permanecerán con valores de 1 o 0 en el sistema sin interactuar.

Cuando se permite que las moléculas interactúen entre sí, un nuevo término se agrega al Hamiltoniano:

$$\hat{H} = \hat{H}_D + \hat{H}_A + \hat{H}_{DA}. \quad (3.28)$$

Esta perturbación permite que el sistema se mueva entre  $\Psi_i$  y  $\Psi_f$ . Esto se conoce como transferencia de energía resonante.

Considerando que a  $t = 0$ ,  $C_D = 1$  y  $C_A = 0$ , la rapidez con que la excitación cambia del donador al aceptor,

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} = -\frac{i}{\hbar} \mathbf{H}_{DA} e^{\frac{i(E_f - E_i)t}{\hbar}}, \quad (3.29)$$

donde  $E_i$  y  $E_f$  son las energías de  $\Psi_i$  y  $\Psi_f$  y  $\mathbf{H}_{DA}$  es el elemento de matriz de la interacción  $\langle \Psi_f | \hat{H}_{DA} | \Psi_i \rangle$ . Para encontrar la probabilidad de que la excitación aparezca en A después de un intervalo corto de tiempo ( $\tau$ ), se tiene que obtener  $C_A(\tau)$  integrando (3.45) desde  $t = 0$  hasta  $\tau$ .

Si  $\mathbf{H}_{DA}$  es independiente del tiempo, integrando en tiempos tempranos:

$$C_2(\tau) = \mathbf{H}_{DA} \frac{1 - e^{\frac{i(E_f - E_i)\tau}{\hbar}}}{E_f - E_i}. \quad (3.30)$$

A partir de (3.30) se puede deducir que  $|C_A(\tau)|^2$  tiene una magnitud significativa sólo cuando  $|E_f - E_i|$  tiende a cero. Este se conoce como condición de resonancia.

Considerando que en una gran cantidad de pares D-A, las diferencias de energía serán ligeramente diferentes y que se pueden acceder a muchos diferentes estados vibracionales de  $\Psi_f$ , se llega a una ecuación análoga a la Regla de oro de Fermi para la constante cinética de la transferencia de energía:

$$k_{TER} = \frac{2\pi}{\hbar} \int_{-\infty}^{\infty} |\mathbf{H}_{DA}|^2 \rho_f(E_i) \rho_i(E_i) dE_1. \quad (3.31)$$

El elemento de matriz puede escribirse separando la parte electrónica ( $\phi_i$ ) de la nuclear ( $\theta_i$ ):

$$\begin{aligned} \mathbf{H}_{DA} &= \langle \Psi_{D(e)} \Psi_{A(b)} | \hat{H}_{DA} | \Psi_{D(b)} \Psi_{A(a)} \rangle \\ &= \langle \phi_{D(e)} \phi_{A(b)} | \hat{H}_{DA} | \phi_{D(b)} \phi_{A(a)} \rangle \langle \theta_{D(e)} \theta_{A(b)} | \theta_{D(b)} \theta_{A(a)} \rangle \\ &= \mathbf{H}_{DA(el)} \langle \theta_{D(e)} \theta_{A(b)} | \theta_{D(b)} \theta_{A(a)} \rangle. \end{aligned} \quad (3.32)$$

En esta aproximación el Hamiltoniano de interacción es la interacción Coulombica.

$$\begin{aligned} \mathbf{H}_{DA(el)} &= \langle \phi_{D(e)} \phi_{A(b)} | \hat{H}_{DA} | \phi_{D(b)} \phi_{A(a)} \rangle \\ &\approx \left( \frac{f^2}{n^2} \right) \iint \phi_{D(e)}^* \phi_{A(b)}^* \frac{e^2}{r_{21}} \phi_{D(b)} \phi_{A(a)} dr_1 dr_2, \end{aligned} \quad (3.33)$$

donde  $e$  es la carga del electrón,  $r_{12}$  es la distancia entre el electrón 1 (en D) y el electrón 2 en (A), los parámetros de integración  $dr_1$  y  $dr_2$  son las coordenadas de los electrones. El factor  $(f^2/n^2)$  representa una aproximación del efecto del campo local y el apantallamiento dieléctrico en un medio con índice de refracción  $n$ .

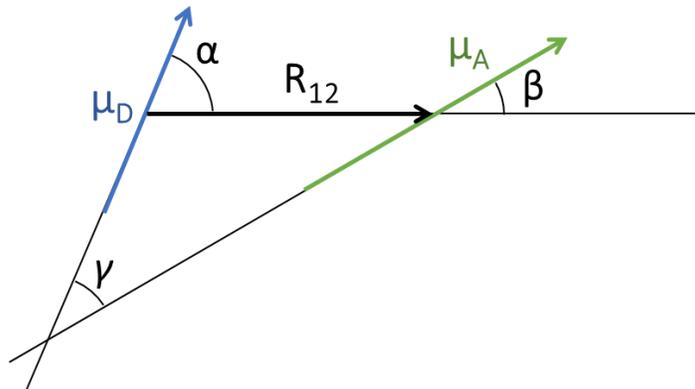
Ya que en  $H_{DA(el)}$  las contribuciones más importantes son las dipolo-dipolo, el operador de interacción puede ser representado con el operador dipolo-dipolo para dipolos puntuales:

$$\hat{V}_{DA} = \frac{f^2}{n^2} [(\hat{\mu}_D \cdot \hat{\mu}_A) |\mathbf{R}_{AD}|^{-3} - 3(\hat{\mu}_D \cdot \mathbf{R}_{DA})(\hat{\mu}_A \cdot \mathbf{R}_{AD}) |\mathbf{R}_{AD}|^{-5}], \quad (3.34)$$

donde  $\hat{\mu}_D$  y  $\hat{\mu}_A$  son los operadores de dipolo para los electrones en las molécula y  $\mathbf{R}_{AD}$  es el vector entre el centro de los dos dipolos (Fig. 3.16). Bajo esta aproximación, el elemento de matriz  $H_{DA(el)}$  se convierte en:

$$\begin{aligned} H_{DA(el)} &= \frac{f^2}{n^2} \left( \frac{\langle \phi_{D(e)} | \hat{\mu}_D | \phi_{D(b)} \rangle \cdot \langle \phi_{A(b)} | \hat{\mu}_A | \phi_{A(a)} \rangle}{|\mathbf{R}_{AD}|^3} \right. \\ &\quad \left. - 3 \frac{(\langle \phi_{D(e)} | \hat{\mu}_D | \phi_{D(b)} \rangle \cdot \mathbf{R}_{AD}) \cdot (\langle \phi_{A(b)} | \hat{\mu}_A | \phi_{A(a)} \rangle \cdot \mathbf{R}_{AD})}{|\mathbf{R}_{AD}|^5} \right) \\ &= \frac{f^2}{n^2} [\sqrt{D_{eb(D)}} \sqrt{D_{eb(A)}} (\cos \gamma - 3 \cos \alpha \cos \beta) |\mathbf{R}_{AD}|^{-3}] \\ &= \frac{f^2}{n^2} [\sqrt{D_{eb(D)}} \sqrt{D_{eb(A)}} \kappa |\mathbf{R}_{AD}|^{-3}] \end{aligned} \quad (3.35)$$

Aquí,  $D_{eb(D)}$  y  $D_{eb(A)}$  son las fuerzas de dipolo las transiciones,  $\gamma$  es el ángulo entre los dos dipolos de transición,  $\alpha$  y  $\beta$  son los ángulos entre los dipolos de transición y el vector  $\mathbf{R}_{AD}$ .  $\kappa = (\cos \gamma - 3 \cos \alpha \cos \beta)$ .



**Fig. 3.16.** Vector de distancia entre los dos dipolos de transición del donador y del aceptor.

El factor de orientación  $\kappa$  puede tomar valores entre  $-2$  y  $+2$  dependiendo de los ángulos, para moléculas orientadas aleatoriamente el valor es  $2/3$ ;  $H_{DA(el)}$  puede ser positivo, negativo o cero.

Por otra parte, si ponderamos de la población de los niveles vibracionales representados por las funciones de onda nucleares ( $\theta_i$ ) de acuerdo con una distribución de Boltzman apropiada, obtenemos los factores de Franck-Condon ponderados térmicamente ( $\Theta_i$ ). Considerando la emisión del donador:

$$D_{21(D)}\Theta_D(E)q_D(E)dE = \left( \frac{3\hbar c^3\Phi_D}{32\pi^3 n f^2 \tau_D} \right) \frac{F_D(\nu)\nu^3}{\int F_D(\nu)d\nu} \quad (3.36)$$

donde  $\Phi_D$  es el rendimiento de fluorescencia del donador,  $\tau_D$  el tiempo de vida de fluorescencia del donador y  $F_D$  es la constante cinética de fluorescencia a la frecuencia  $\nu$ .

Para el espectro de absorción del aceptor se tiene:

$$D_{21(A)}\Theta_A(E)q_A(E) = D_{21(A)}\Theta_A(E) \frac{q_A(\nu)}{h} = \frac{1}{h} \left( \frac{3000 \ln(10) n h c}{8\pi^3 f^2 N_a} \right) \frac{\epsilon_A(\nu)}{\nu}. \quad (3.37)$$

Sustituyendo las expresiones para  $H_{DA(el)}$  (3.51) y los espectros de emisión (3.52) y absorción (3.53) en  $k_{TRE}$  (3.47), resulta:

$$k_{TRE} = \frac{2\pi f^4}{\hbar n^4} \kappa^2 |R_{AD}|^{-6} \left( \frac{3000 \ln(10) n h c}{8\pi^3 f^2 N_a h} \right) \left( \frac{3\hbar c^3\Phi_D}{32\pi^3 n f^2 \tau_D} \right) \frac{\int F_D(\nu)\epsilon_A(\nu)\nu^{-4}d\nu}{\int F_D(\nu)d\nu}. \quad (3.38)$$

Agrupando las constantes finalmente tenemos:

$$k_{TRE} = \left( \frac{9000 \ln(10) \kappa^2 c^4 \Phi_D}{128\pi^5 n^4 N_a \tau_D} \right) |R_{AD}|^{-6} J, \quad (3.39)$$

donde  $J$  es la integral de traslape entre el espectro de absorción del aceptor y el de emisión del donador. Es muy importante notar que el tratamiento de Förster termina incluyendo variables que pueden ser determinadas experimentalmente. Esta aproximación representa un punto de encuentro entre las mediciones experimentales y el tratamiento mecánico-cuántico.

En la actualidad se han estudiado otras aproximaciones más detalladas para modelar la transferencia de energía desde puntos cuánticos; sin embargo, la aproximación

de Förster resulta un modelo simple pero de gran utilidad y tiene una buena concordancia con los resultados experimentales obtenidos con moléculas orgánicas como aceptores.<sup>110</sup>

Para obtener TREs eficientes, se debe evitar que la banda de absorción de ambas especies se traslape y así evitar reabsorción. Otro aspecto que considerar es la distancia entre el punto cuántico y la molécula, principalmente por las moléculas de recubrimiento que pueden influir en aumentar la distancia entre el donador y aceptor.

### 3.4. Radiación láser

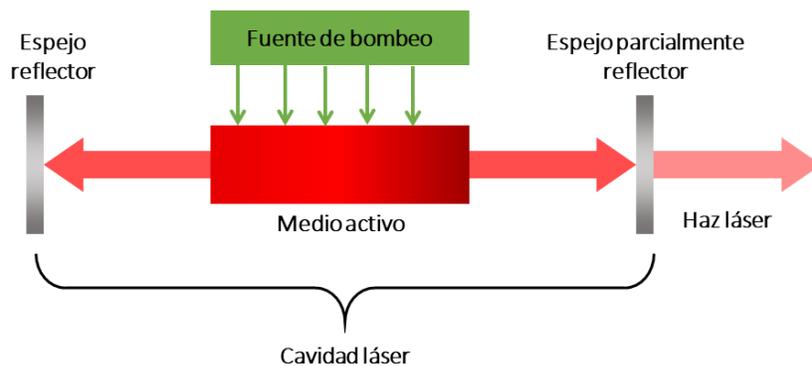
En este trabajo se emplearon diversas fuentes de radiación, entre las que destacan los láseres. En láser empleado para promover las transformaciones monofotónicas fue elegido debido a su energía de excitación y la posibilidad de controlar su potencia. Otro láser usado fue uno de pulsos en femtosegundos en el proceso de excitación bifotónica, ya que era capaz de cumplir el requerimiento de proveer de una alta densidad de fotones tanto espacial como temporalmente. A continuación, se describen las generalidades del funcionamiento de este tipo de sistemas, primero el caso continuo y posteriormente en de la generación de pulsos ultracortos.

El término láser proviene del acrónimo inglés *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, y como el nombre lo indica, es un dispositivo que consigue aumentar la intensidad de un haz de radiación electromagnética a partir del fenómeno de emisión estimulada. Las principales características de la radiación láser son la direccionalidad, la monocromaticidad, la coherencia y la intensidad.

Para la generación de luz láser se requiere de:<sup>89</sup>

- Fuente de bombeo: Fuente externa de energía que incide sobre el medio de ganancia, puede ser una lámpara, otro láser, el paso de una corriente eléctrica.
- Cavidad resonante: Delimitada por dos espejos donde se coloca el medio activo.
- Medio de ganancia o activo: Se encarga de aumentar la intensidad de la radiación, en él se lleva a cabo el fenómeno de inversión de la población.

El principio de funcionamiento es esquematizado en la Fig. 3.17. El material activo es colocado en una cavidad delimitada por dos espejos, uno totalmente reflejante y otro parcialmente. La fuente de bombeo excita el material activo, provocando la inversión de población necesaria. Una vez que esta condición es alcanzada, cualquier fotón emitido por el material causará emisión estimulada en el material desde las especies excitadas en su vecindad. Los espejos permiten que los fotones generados recorran la cavidad y amplifiquen la emisión estimulada.<sup>2</sup>

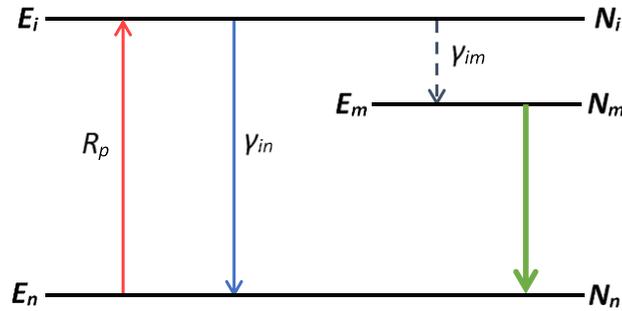


**Fig. 3.17.** Componentes básicos de un sistema láser.

Para que el efecto láser suceda, es necesario que exista una inversión de la población, que se refiere a la existencia de un número mayor de átomos o moléculas en un estado energético superior que en el estado inferior.

Para generar la inversión de la población se necesita de una fuente que proporcione la energía para llevar al sistema a un estado de mayor energía desde donde suceda la emisión estimulada. Este proceso es imposible de llevarse a cabo en un sistema de dos niveles, por lo que se requiere de un sistema con un mayor número de niveles energéticos.<sup>111</sup>

Para explicar el proceso de bombeo óptico y la inversión de la población se considera un sistema de tres niveles mostrado en la Fig. 3.18, en el que existe un nivel  $E_i$ , con energía mayor a los niveles  $E_m$  y  $E_n$  de la transición láser.



**Fig. 3.18.** Diagrama de las transiciones en un sistema láser de tres niveles.  $E_i$  es la energía del estado  $N_i$ ,  $E_m$  es la energía del estado  $N_m$ ,  $E_n$  es la energía del estado  $N_n$ ,  $R_p$  es la transición al estado superior,  $\gamma_{in}$  es la constante de rapidez de la transición  $i-n$ ,  $\gamma_{im}$  es la constante de rapidez de la transición  $i-m$ .

Para que la inversión de la población ocurra entre los niveles involucrados en la emisión láser,  $n$  y  $m$ , al llevar al sistema a un estado  $N_i$ , la velocidad de desactivación al estado superior del láser,  $\gamma_{im}$ , debe ser mayor que la del estado inferior,  $\gamma_{in}$ . Además, la transición  $N_m \rightarrow N_n$  debe ser lenta, de esta manera se asegura que siempre existan átomos o moléculas en el nivel  $N_m$ , induciendo la inversión de la población en este par de niveles.

### 3.4.1. Pulsos ultracortos

Como fue mencionado, una condición para que la absorción bifotónica se lleve a cabo es la presencia de una alta densidad de fotones, una manera de lograr esta condición es mediante el uso de fuentes de luz pulsadas. Entre más breves sean los pulsos, la concentración de fotones es mayor.

Cuando el proceso de bombeo de un láser se lleva a cabo de manera constante, se obtiene una salida de radiación continua, y funciona en un régimen de onda continua (cw). Si el bombeo es intermitente, después de alcanzar la inversión de la población, el láser se descarga rápidamente y el proceso se repite, entonces el láser funciona en un régimen de pulsos (p).<sup>89</sup>

Es posible transformar un láser de onda continua en uno pulsado y también reducir la duración de los pulsos de un láser ya pulsado. Para esto se utilizan principalmente tres métodos:<sup>89,111</sup>

- Vaciado de la cavidad

- Conmutación de pérdidas (Q-switching)
- Amarre de modos (mode-locking): Consiste en provocar la interferencia constructiva de un gran número de modos de radiación que oscilan con la misma fase en el interior de la cavidad. Se logran pulsos ultracortos con duraciones de picosegundos e incluso llegando a decenas de femtosegundos. Hasta ahora esta es la única técnica capaz de generar pulsos tan breves.

El sistema utilizado para generar los pulsos ultracortos utilizados en los experimentos realizados en este trabajo fue un Oscilador de Titanio:Zafiro. Un análisis detallado de funcionamiento se encuentra en el Apéndice 1.

### 3.5. Métodos Computacionales

En este trabajo también se realizaron cálculos computacionales para estudiar el comportamiento de azida aromática y su propensión a la disociación en estados excitados a través del análisis del cambio en la densidad electrónica y el estudio de las superficies de energía potencial. También se explicó el alto rendimiento de fluorescencia de la forma nitro con un análisis del orden energético de sus estados electrónicos excitados singulete y triplete; además de los orbitales de Kohn-Sham involucrados en las transiciones hacia los estados mencionados.

En este trabajo se realizaron cálculos empleando la teoría de funcionales de la densidad (DFT) y su versión dependiente del tiempo (TDDFT). A continuación, se explican ambas teorías con las que se obtuvo información del estado basal (DFT) y estados excitados (TDDFT) de las moléculas mencionadas.

#### 3.5.1. Teoría de funcionales de la densidad

Hohenberg y Kohn probaron un teorema que establece que para moléculas con estados basales no degenerados, la energía, la función de onda y las demás propiedades electrónicas son determinadas únicamente por la densidad electrónica de ese estado  $\rho_0(x,y,z)$  por lo que se puede decir que la energía del estado basal  $E_0$  es un funcional de la densidad electrónica.<sup>112</sup>

$$E_0 = E_0[\rho_0]. \quad (3.40)$$

Si se considera el Hamiltoniano de una molécula de  $n$  electrones se tiene:

$$H = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \nabla_i^2 + \sum_{i=1}^n v(\mathbf{r}_i) + \sum_j \sum_{i>j} \frac{1}{r_{ij}}, \quad (3.41)$$

donde el valor  $v(\mathbf{r}_i)$  es la energía potencial entre el electrón  $i$  y los núcleos, que depende de las coordenadas ( $\mathbf{r}$ ) del electrón  $i$  y de las coordenadas nucleares. Pero al utilizar el teorema de Borhn-Oppenheimer,  $v(\mathbf{r}_i)$  sólo depende de las coordenadas electrónicas, lo que se conoce como el potencial externo que actúa sobre el electrón  $i$ , ya que tiene un origen externo al sistema de electrones.

Una vez que se establece el potencial externo  $v(\mathbf{r}_i)$  y el número de electrones  $n$  en el sistema, se puede determinar la función de onda y la energía de la molécula al solucionar la ecuación de Schrödinger.

Hohenberg y Kohn demostraron que la densidad electrónica contiene toda la información necesaria para describir al sistema.

Dado que el Hamiltoniano es la suma de la energía cinética y la energía potencial se tiene que:

$$E = \bar{T} + \bar{V}_{ne} + \bar{V}_{ee}. \quad (3.42)$$

Cuando se introduce el teorema de Hohenberg y Kohn, se encuentra que todos estos términos son dependientes de la densidad, por lo que se llega a la ecuación siguiente:

$$E_0 = E_v[\rho_0] = \bar{T}[\rho_0] + \bar{V}_{ne}[\rho_0] + \bar{V}_{ee}[\rho_0], \quad (3.43)$$

en donde  $E_v$  es la energía que depende del potencial externo. De la última ecuación se conoce la cantidad  $\bar{V}_{ne}[\rho_0]$ , pero no las cantidades  $\bar{T}[\rho_0] + \bar{V}_{ee}[\rho_0]$ . Cada una de las cantidades son propiedades promedio obtenidas de la densidad electrónica.

$$E_0 = E_v[\rho_0] = \int \rho_0(\mathbf{r})v(\mathbf{r})d\mathbf{r} + \bar{T}[\rho_0] + \bar{V}_{ee}[\rho_0]. \quad (3.44)$$

Sin embargo, otro teorema propuesto por Hohenberg y Kohn establece que se puede encontrar la energía molecular empleado el método variacional mediante la siguiente expresión:

$$\int \rho_0(\mathbf{r})v(\mathbf{r})d\mathbf{r} + \bar{T}[\rho_0] + \bar{V}_{ee}[\rho_0] \geq E_v[\rho_0]. \quad (3.45)$$

En principio, se puede calcular la energía sin que se requiera el cálculo de la función de onda; no obstante, el teorema aquí analizado no indica cómo calcular  $E_0$  a partir de solamente  $\rho_0$  cuando se conoce el funcional  $E_v[\rho]$ . Con la finalidad de resolver este problema Kohn y Sham propusieron un método.

Kohn y Sham consideran un sistema de referencia ficticio (descrito por la letra  $S$ ) y denominado sistema no interactuante de  $n$  electrones, los cuales experimentan el mismo potencial externo  $v_s(\mathbf{r}_i)$  que es una cantidad elegida de tal manera que la densidad sea igual a la densidad electrónica exacta de la molécula en estudio; es decir:  $\rho_s = \rho_0$  mientras que el hamiltoniano del sistema de partículas no interactuantes tiene la forma.

$$H_s = \sum_{i=1}^n \left[ -\frac{1}{2} \nabla_i^2 + v_s(\mathbf{r}_i) \right] = \sum_{i=1}^n h_i^{ks}, \quad (3.46)$$

en donde  $h_i^{ks}$  es el hamiltoniano de Kohn-Sham de un electrón.

Como el sistema de referencia  $S$  está formado de partículas no interactuantes, es posible separar el efecto de cada una y, se obtiene una función de onda del sistema de referencia en el estado basal  $\psi_{x,0}$ , donde la parte espacial  $h_i^{ks}(\mathbf{r}_i)$  de cada orbital es función propia del hamiltoniano  $h_i^{ks}$ , que depende sólo de un electrón. Con esto es posible obtener la ecuación de valores propios siguiente:

$$h_i^{ks} \theta_i^{ks} = \varepsilon_i^{ks} \theta_i^{ks}, \quad (3.47)$$

en donde  $\varepsilon_i^{ks}$  es la energía del orbital de Kohn Sham.

Considerando el sistema de referencia se pueden definir las diferencias entre este sistema y el sistema real como:

$$\Delta T[\rho] = T[\rho] - T_s[\rho]. \quad (3.48)$$

De la misma manera se establece la diferencia siguiente:

$$\Delta V_{ee}[\rho] = V_{ee}[\rho] - \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_2)}{r_{1,2}} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2, \quad (3.49)$$

donde  $r_{1,2}$  es la distancia entre los puntos  $\mathbf{r}_1(x_1, y_1, z_1)$  y  $\mathbf{r}_2(x_2, y_2, z_2)$ , mientras que la cantidad correspondiente a la doble integral es la expresión clásica para la repulsión electrostática entre los electrones, si se consideran sumergidos en una distribución de carga continua con densidad electrónica  $\rho$ . La integración sobre  $d\mathbf{r}_1$  y la multiplicación por  $\frac{1}{2}$  produce la energía de repulsión total. De esta manera es posible escribir la siguiente expresión:

$$E_v[\rho] = \int \rho_0(\mathbf{r})v(\mathbf{r})d\mathbf{r} + T_s[\rho] + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_2)}{r_{1,2}} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 + \Delta T[\rho] + \Delta V_{ee}[\rho]. \quad (3.50)$$

En esta ecuación los funcionales  $\Delta T[\rho] + \Delta V_{ee}[\rho]$  no se conocen y es en este punto en donde dichas cantidades se incluyen en la definición de un nuevo funcional, el funcional de energía de intercambio y correlación de la siguiente manera:

$$E_{xc}[\rho] = \Delta T[\rho] + \Delta V_{ee}[\rho]. \quad (3.51)$$

La energía de intercambio y correlación  $E_{xc}$  contiene los términos siguientes: la energía de correlación cinética, la energía de intercambio y la energía de correlación coulombica. De esta manera se puede reescribir el funcional de la forma siguiente:

$$E_v[\rho] = \int \rho_0(\mathbf{r})v(\mathbf{r})d\mathbf{r} + T_s[\rho] + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_2)}{r_{1,2}} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 + E_{xc}[\rho]. \quad (3.52)$$

Los tres primeros términos pueden ser evaluados a partir de la densidad electrónica y en ellos se encuentran contribuciones de la energía del estado basal. Sin embargo, el cuarto término no puede evaluarse con la misma facilidad.

Para poder resolver completamente estas ecuaciones se necesita, primero, determinar la densidad electrónica del estado basal y, dado que la densidad electrónica del sistema de referencia se define como la densidad electrónica de la molécula real en su estado basal, se tiene que  $\rho_0 = \rho_s$ .

La densidad electrónica para un sistema de  $n$  partículas que se expresa como un determinante de Kohn-Sham de espín-orbitales se obtiene por la siguiente relación:

$$\rho = \rho_0 = \sum_{i=1}^n |\theta_i^{ks}|^2, \quad (3.53)$$

$$\int \rho_0(\mathbf{r}) v(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = - \sum_{\alpha} \frac{\rho(\mathbf{r}_1)}{\mathbf{r}_{1\alpha}} d\mathbf{r}_1. \quad (3.54)$$

Ahora bien, la ecuación (3.54) puede evaluarse si se cuenta con la densidad electrónica, el término  $T_s$  es la energía cinética del sistema de electrones no interactuantes con una función de onda  $\psi_s$ , igual a un determinante de Slater de orbitales de Kohn-Sham ortonormales, por lo que se tiene:

$$T_s[\rho] = -\frac{1}{2} \langle \psi_s | \sum_{\alpha} \nabla_i^2 | \psi_s \rangle, \quad (3.55)$$

$$T_s[\rho] = -\frac{1}{2} \sum_i \langle \theta_i^{ks}(1) | \nabla^2 | \theta_i^{ks}(1) \rangle, \quad (3.56)$$

Utilizando la parte espacial de los espín-orbitales se obtiene la expresión (3.56), de esta manera se puede reescribir la ecuación (3.52) de la forma siguiente:

$$E_0 = - \sum_{\alpha} Z_{\alpha} \int \frac{\rho(\mathbf{r}_1)}{\mathbf{r}_{1,\alpha}} d\mathbf{r}_1 + \frac{1}{2} \sum_i \langle \theta_i^{ks}(1) | \nabla^2 | \theta_i^{ks}(1) \rangle + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(\mathbf{r}_1)\rho(\mathbf{r}_2)}{\mathbf{r}_{1,2}} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 + E_{xc}[\rho]. \quad (3.57)$$

Así es posible determinar  $E_0$  a partir de la densidad, siempre y cuando se puedan encontrar los orbitales de Kohn-Sham  $\theta_i^{ks}$  y se conozca el funcional  $E_{xc}$ .

Los orbitales de Kohn-Sham  $\theta_i^{ks}$  son los orbitales para el sistema ficticio de electrones no interactuantes y no tienen un significado físico, su utilidad es la de permitir que la densidad molecular exacta del estado basal pueda ser calculada.

Los orbitales de Kohn-Sham se obtienen siguiendo el teorema de Hohenberg y Kohn que propone que la energía del estado basal se puede encontrar por el método varia-

cional; es decir, cambiando la densidad con el fin de minimizar  $E_v[\rho]$ , lo que es equivalente a variar los orbitales  $\theta_i^{ks}$  para determinar la densidad y satisfacer el sistema de ecuaciones siguiente:

$$\left[ -\frac{1}{2}\nabla_i^2 - \sum \frac{Z_\alpha}{r_{i,\alpha}} + \int \frac{\rho(r_2)}{r_{1,2}} dr_2 + V_{xc} \right] \theta_i^{ks} = \varepsilon_i^{ks} \theta_i^{ks}. \quad (3.58)$$

El potencial de intercambio y correlación  $V_{xc}$  es la derivada del funcional de la energía de intercambio y correlación  $E_{xc}$ :

$$V_{xc} = \frac{\delta E_{xc}[\rho(\mathbf{r})]}{\delta \rho(\mathbf{r})}. \quad (3.59)$$

En este punto el problema que se presenta es que el funcional  $E_{xc}[\rho]$  no se conoce.

### 3.5.2. Teoría de funcionales de la densidad dependiente del tiempo

Una vez abordada la Teoría de Funcionales de la Densidad, se explica la aproximación dependiente del tiempo de esta teoría. Esta teoría es capaz de estudiar fenómenos como la interacción de la materia con una perturbación dependiente del tiempo como la radiación electromagnética.

La teoría de funcionales de la densidad dependiente del tiempo parte del teorema de Runge-Gross,<sup>113</sup> en el cual se generaliza el teorema de Hohenberg-Kohn<sup>114</sup> ahora para densidades y potenciales dependientes del tiempo. Demostraron que la densidad electrónica dependiente del tiempo  $\rho(\mathbf{r},t)$  determina el potencial externo dependiente del tiempo  $V(\mathbf{r},t)$ , una correspondencia uno a uno en el sistema. Esto implica que, conociendo la densidad del sistema, el potencial externo queda determinado y así todas las propiedades del sistema.<sup>115</sup>

Otra condición es establecer la existencia de un principio variacional análogo al teorema de Hohenberg-Kohn. Si la función de onda dependiente del tiempo  $\Psi(\mathbf{r},t)$  es solución de la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo cuando  $\Psi(\mathbf{r},t_0) = \Psi(\mathbf{r})$ , entonces la función de onda corresponde a un punto estacionario en la integral de acción  $A[\rho]$  que es funcional de la densidad electrónica.

$$A[\rho] = \int_{t_0}^{t_1} dt \left\langle \Psi[\rho](\mathbf{r}, t) \left| i \frac{\partial}{\partial t} - \hat{H}(\mathbf{r}, t) \right| \Psi[\rho](\mathbf{r}, t) \right\rangle. \quad (3.60)$$

A partir de ella se puede obtener la densidad electrónica por medio de la ecuación de Euler, en la cual la integral de acción es estacionaria respecto a la densidad

$$\frac{\delta A[\rho]}{\delta \rho(\mathbf{r}, t)} = 0. \quad (3.61)$$

Por otro lado, la integral de acción para el sistema puede dividirse en dos partes, una independiente al potencial externo  $B[\rho]$  y otra dependiente de él:

$$A[\rho] = B[\rho] - \int_{t_0}^{t_1} dt \int d^3\mathbf{r} \rho(\mathbf{r}, t) v(\mathbf{r}, t), \quad (3.62)$$

donde

$$B[\rho] = \int_{t_0}^{t_1} dt \left\langle \Psi[\rho](\mathbf{r}, t) \left| i \frac{\partial}{\partial t} - \hat{T}(\mathbf{r}) - \hat{V}_{ee}(\mathbf{r}) \right| \Psi[\rho](\mathbf{r}, t) \right\rangle. \quad (3.63)$$

Por otro lado, el funcional puede ser escrito como

$$A_S[\rho] = B_S[\rho] - \int_{t_0}^{t_1} dt \int d^3\mathbf{r} \rho(\mathbf{r}, t) v_{ext}(\mathbf{r}, t). \quad (3.64)$$

Tomando una analogía con las ecuaciones de Kohn-Sham independientes del tiempo, se establece un sistema de electrones no interactuantes dependientes del tiempo con un potencial externo  $v_{KS}(\mathbf{r}, t)$ , tal que la densidad  $\rho_s(\mathbf{r}, t)$  es igual a la densidad electrónica exacta del sistema interactuante real  $\rho(\mathbf{r}, t)$ .

El sistema no interactuante de Kohn-Sham satisface la ecuación:

$$i \frac{\partial}{\partial t} \theta_i^{KS}(\mathbf{r}, t) = \left[ -\frac{\nabla^2}{2} + v_{KS}(\mathbf{r}, t) \right] \theta_i^{KS}(\mathbf{r}, t), \quad (3.65)$$

donde  $\theta_i^{KS}$  corresponde a los orbitales de Kohn-Sham del sistema no interactuante, a partir de los cuales se puede encontrar la densidad del sistema real de acuerdo con:

$$\rho(r, t) = \sum_{i=1}^N |\theta_i^{KS}(\mathbf{r}, t)|^2. \quad (3.66)$$

Análogo al estado basal,  $v_{KS}$  se descompone en tres términos:

$$v_{KS}(\mathbf{r}, t) = v_{ext}(\mathbf{r}, t) + \int d^3 \frac{\mathbf{r}' \rho(\mathbf{r}', t)}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} + v_{XC}(\mathbf{r}, t), \quad (3.67)$$

$v_{ext}(\mathbf{r}, t)$  es el campo externo dependiente del tiempo, el segundo término es el potencial de Hartree dependiente del tiempo describiendo la interacción de distribuciones de carga eléctricas clásicas, mientras que el tercer término es el potencial de correlación e intercambio.

Sustituyendo (3.67) en (3.65), tomando en cuenta el punto estacionario ( $t_0$ ) se obtienen las ecuaciones de Kohn-Sham dependientes del tiempo:

$$i \frac{\partial}{\partial t} \theta_i^{KS}(\mathbf{r}, t) = \left[ -\frac{\nabla^2}{2} + v_{ext}(\mathbf{r}, t) + \int d^3 \frac{\mathbf{r}' \rho(\mathbf{r}', t)}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} + \frac{\delta A_{XC}[\rho]}{\delta \rho(\mathbf{r}, t)} \right] \theta_i^{KS}(\mathbf{r}, t) \quad (3.68)$$

Para poder obtener las energías de excitación y las fuerzas de oscilador correspondientes, se emplea el análisis de respuesta lineal de las ecuaciones dependientes del tiempo (3.68). En el caso que la perturbación dependiente del tiempo es pequeña, no es necesario resolver las ecuaciones completamente, lo que permite obtener resultados con un menor costo computacional.

Hoy en día existe una amplia variedad de funcionales de la densidad, cada uno con sus pros y contras. Algunos de ellos han sido diseñados para modelar ciertas interacciones o fenómenos de manera precisa. En el caso de las energías de excitación electrónica y propiedades de moléculas en estados electrónicos excitados, algunos de los funcionales comúnmente empleados son PBE0, SVN5, LC-LYP,  $\tau$ HCTH-hyb.<sup>116-118</sup> Esta clase de funcionales presenta buenos resultados en comparación con datos experimentales. Sin embargo, otras características que se deben de tomar en cuenta además de la precisión son el costo computacional y la descripción del fenómeno.

En este trabajo se decidió emplear el funcional híbrido CAM-B3LYP,<sup>116</sup> en el que se implementa el método de atenuación Coulómbico. El funcional CAM-B3LYP ha sido ampliamente usado en el cálculo de estados excitados, dando muy buenos resultados para moléculas polimetínicas cargadas como las que son estudiadas en este trabajo.<sup>119</sup> Su uso en conjunto con modelos de disolvente implícito ha dado muy buenos resultados en la determinación de energías de excitación y propiedades de estados electrónicos

excitados (errores  $\sim 5\%$  respecto al experimento). La principal diferencia con su predecesor B3LYP es que la funcional toma en cuenta interacciones a largo alcance para el potencial de intercambio. Estas características le permiten describir mejores polarizaciones encadenas largas, excitaciones empleando TDDFT dando una mejor descripción a estados de Rydberg y excitaciones con carácter de transferencia de carga.

El funciona CAM-B3LYP consiste en una interacción de intercambio a corto alcance de 0.19 Hartree-Fock (HF) y 0.81 de Becke (B88). En el intervalo de largo alcance, tiene un 0.65 de HF y un 0.35 de B88. La región intermedia está descrita por una función de error estándar con un parámetro de 0.33.

En este modelo, las interacciones a largo alcance se modelan con el potencial de intercambio con la forma:<sup>116</sup>

$$\frac{1}{r_{12}} = \frac{1 - \text{erf}(\mu r_{12})}{r_{12}} + \frac{\text{erf}(\mu r_{12})}{r_{12}}. \quad (3.69)$$

El primer término toma en cuenta las interacciones a corto alcance y el segundo corresponde a las de largo alcance. La clave es que en este esquema la interacción de intercambio DFT es incluida en el primer término y las interacciones de intercambio orbital-orbital- de largo alcance se describen con una integral de intercambio complementaria.

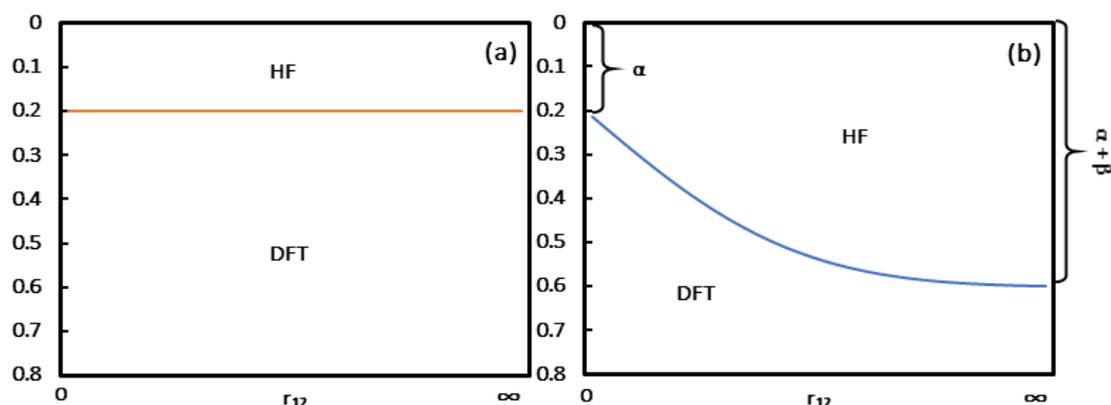
Generalizando la ecuación con dos parámetros se tiene:

$$\frac{1}{r_{12}} = \frac{1 - [\alpha + \beta \cdot \text{erf}(\zeta r_{12})]}{r_{12}} + \frac{\alpha + \beta \cdot \text{erf}(\zeta r_{12})}{r_{12}} \quad (3.70)$$

donde  $0 \leq \alpha + \beta \leq 1$ ,  $0 \leq \alpha \leq 1$  y  $0 \leq \beta \leq 1$ ; erf es la función error,  $r_{12}$  son las coordenadas del electrón y  $\zeta$  es un parámetro que determina la contribución de cada parte. Este método de atenuación Coulómbico incorpora un parámetro más en la aproximación de B3LYP para la energía de intercambio:

$$E_X = (1 - \alpha)E_X^{Slater} + \alpha E_X^{HF} + c^{B88} \Delta E_X^{B88} \quad (3.71)$$

donde se observa que el valor de  $\alpha$  en la ecuación es 1 y el de  $\beta$  es 0. Al agregar un nuevo parámetro se aumenta la flexibilidad del sistema en los regímenes de corto y largo alcance, permitiendo una mejor descripción del sistema. En la Fig. 3.19 se observa el cambio en la contribución del intercambio de Hartree-Fock (HF) en función de la distancia.



En el estudio realizado la influencia del disolvente es de gran importancia, no sólo porque los experimentos fueron realizados en solución, sino que en este tipo de moléculas (cargadas y con conjugación extendida) el disolvente tiene un papel importante en la energía de excitación y la dinámica de los estados excitados. La aproximación empleada para estudiar el disolvente en este trabajo fue el modelo de polarización del continuo (PCM, por sus siglas en inglés). El modelo busca representar el disolvente como campo reactivo que responde a la densidad electrónica del soluto y no como moléculas individuales. Al realizar esta consideración, los cálculos son menos costosos desde el punto de vista computacional.<sup>120</sup>

Los medios continuos para modelar disolventes describen los diferentes grados de libertad de las partículas que lo constituyen como funciones de distribución. Los modelos de polarización continua son un acercamiento intermedio entre un modelo electrónico para una molécula y un modelo continuo para un gran número de moléculas.

Para el cálculo de la energía libre de la solución el sistema es considerado un sistema ideal con un líquido puro en equilibrio respecto a condiciones de temperatura

y presión, y un número adecuado de electrones y núcleos no interactuantes para describir al soluto con energía cinética cero.<sup>120</sup> La energía libre de la solución resulta entonces:

$$G_{sol} = G_{el} + G_{rep} + G_{dis} + G_{cav} + G_{tm}, \quad (3.72)$$

donde  $G_{el}$  es la energía libre electrostática,  $G_{rep}$  la energía libre de repulsión,  $G_{dis}$  la energía libre de dispersión,  $G_{cav}$  la energía libre de la generación de la cavidad y  $G_{tm}$  es la energía libre del movimiento térmico. Todas estas energías son calculadas a partir de modelos de funciones de partición del sistema.

El disolvente juega un papel importante en la estabilización del sistema, en el caso del sistema “push-pull” de la forma nitro obtenida de la fotoconversión de la azida, donde el disolvente se encarga de estabilizar el estado excitado, disminuyendo su energía. Es por eso que considerar un modelo de disolvente es de gran importancia en el modelado de moléculas polares o sensibles al medio.

Este tratamiento del disolvente como un medio continuo permite realizar cálculos computacionales de manera más rápida y con resultados más cercanos a los valores experimentales.<sup>121</sup> Por esta razón, este modelo fue elegido para calcular geometrías y energías de la molécula cuando se encuentra en solución.

## 4. Metodología

---

Como pudo observarse en el capítulo anterior (sección 3.2), para que un compuesto pueda ser un fluorógeno fotoactivado eficiente debe de cumplir con características espectrales y una dinámica de sus estados excitados en la que la transformación química sea favorecida. Estas propiedades están estrechamente ligadas a la estructura química de la molécula. Si a éstas agregamos los requerimientos para obtener coeficientes de absorción bifotónica considerables, el diseño molecular se convierte en un reto. En este apartado se abordará la lógica empleada al proponer un sistema que pueda actuar como un fluorógeno tipo azida aromática y que además presente una alta probabilidad de realizar absorción de dos fotones.

Así mismo, en el capítulo se describirán los recursos empleados para definir al sistema con el uso de cálculos computacionales. También se abordará el esquema de síntesis del sistema elegido y la caracterización espectroscópica del producto y los intermediarios. Además, se detallarán los experimentos que demuestren su capacidad para transformarse en una especie fluorescente mediante la absorción de luz, tanto de manera monofotónica como bifotónica. Finalmente, se expondrán los estudios de transformación de la hemicianina en forma de azida por transferencia de energía desde puntos cuánticos de CdS empleados para aumentar la capacidad de absorción no lineal del sistema.

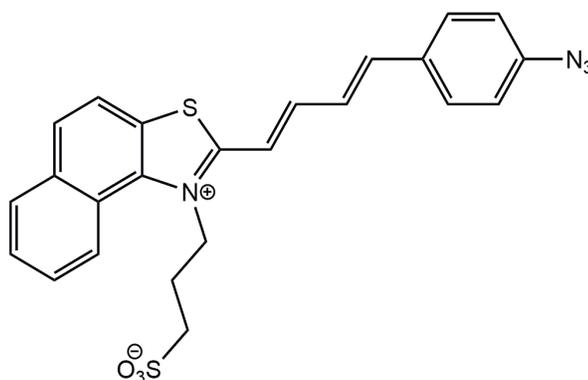
### 4.1. Diseño del sistema

Un fluorógeno debe contar con un grupo capaz de transformarse después de absorber radiación electromagnética con energía suficiente. Las azidas tienen esta capacidad de transformación al disociarse después de ser irradiadas, liberando  $N_2$ . Si además están unidas a una estructura adecuada con anillos aromáticos y grupos electrodonadores o electroattractores y dobles enlaces conjugados; pueden dar origen a fotoproductos altamente fluorescentes. La presencia de este sistema  $\pi$ -conjugado también contribuye al aumento en la probabilidad de absorción bifotónica.

Con la ayuda de estudios computacionales es posible también conocer, con cierto grado de certidumbre, la naturaleza de un sistema propuesto antes de llevar a cabo su síntesis en el laboratorio. Por esta razón el modelado y cálculo de las propiedades del sistema ideado también fueron realizados como será descrito en la siguiente sección.

En el diseño del sistema se considera que el cromóforo tenga propiedades asociadas a la excitación no-lineal; también es posible considerar agregar una antena bifotónica al fluorógeno para mejorar su capacidad de absorción bifotónica. Considerando la necesidad de mantener a la azida y a la antena muy próximas entre sí para lograr transferir eficientemente la energía absorbida, se debe elegir la manera de mantener ambos fragmentos unidos. En este estudio se eligieron puntos cuánticos de sulfuro de cadmio como antenas bifotónicas de acuerdo con las características mencionadas en la sección 3.3. La forma de mantener a la azida cerca de la antena para favorecer la transferencia de energía es mediante atracción electrostática entre ellas.<sup>73,76</sup> Para favorecer la asociación, se eligió al grupo sulfonato, debido a su alta afinidad con puntos cuánticos que contienen Cd.<sup>64,73,75,76,109</sup>

Teniendo todo esto en cuenta, un sistema que cumple con las características de poseer un grupo capaz de fototransformarse en un fluoróforo, con una estructura altamente conjugada que favorezca la absorción en longitudes de onda mayores y una manera de anclarse a puntos cuánticos es la 2-(4-(4-azidofenil)buta-1,3-dien-1-il-(3-sulfonato)propilnafto[1,2-*d*]tiazolio, que será nombrada en este trabajo como hCy-N<sub>3</sub> (Fig. 4.1).



**Fig. 4.1.** Hemicianina en forma de azida hCy-N<sub>3</sub>.

El segundo fragmento del sistema lo componen los nanocristales que servirán para aumentar la probabilidad de absorción bifotónica, transfiriendo la energía absorbida a la molécula hCy-N<sub>3</sub>. Para elegir adecuadamente a estos cristales, es necesario conocer el espectro de absorción de la azida. Uno de los requerimientos para que la transferencia de energía se lleve a cabo es el traslape entre el espectro de emisión del donador y el de absorción del aceptor (sección 3.3.3). La versatilidad de los puntos cuánticos permite tener una amplia gama de longitudes de onda de absorción y emisión.

## 4.2. Métodos computacionales

Estudios realizados por Budyka<sup>38,39,122</sup> señalan que al aumentar la cantidad de electrones  $\pi$  en el sistema, las azidas pueden perder sus facultades para fotodisociarse. Con el fin de tratar de predecir la capacidad de la molécula diseñada (hCy-N<sub>3</sub>) para sufrir una ruptura del enlace -N-N<sub>2</sub> del grupo azida al ser irradiada, se modelaron el estado basal y los primeros estados excitados de las principales especies involucradas. Estas especies fueron la forma azida (hCy-N<sub>3</sub>), nitro (hCy-NO<sub>2</sub>) y amina (hCy-NH<sub>2</sub>). La selección se realizó de acuerdo a los posibles fotoproductos de la disociación de azidas aromáticas en medios polares y próticos.<sup>42,51</sup> Todos los cálculos computacionales presentados en este estudio fueron realizados con la paquetería Gaussian 09®.<sup>123</sup>

### 4.2.1. Cálculos en el estado basal

Para conocer las geometrías de las tres especies involucradas, se realizaron optimizaciones de las geometrías de las moléculas hCy-NO<sub>2</sub>, hCy-NH<sub>2</sub> y hCy-N<sub>3</sub>. Con el propósito de verificar que las geometrías encontradas anteriormente se tratan de mínimos en la superficie de energía potencial, se realizaron cálculos de las frecuencias vibracionales asociadas a las conformaciones encontradas.

El nivel de teoría empleado para obtener las geometrías de equilibrio y energías de las moléculas involucradas fue un método basado en la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT), con el funcional CAM-B3LYP,<sup>116</sup> y el conjunto base de Pople 6-311++G(d,p).<sup>124</sup> Además, se consideró el disolvente como un campo continuo reactivo empleando el modelo PCM (sección 3.5) para describir metanol.<sup>120</sup>

#### 4.2.2. Cálculos en el estado excitado

Como fue mencionado anteriormente, la interacción de la materia con radiación electromagnética suficientemente energética puede generar estados electrónicamente excitados (ver sección 3.1). Por esta razón fue necesario también el cálculo de las propiedades de los sistemas al sufrir perturbaciones de este tipo. De esta manera es posible estudiar el comportamiento de la molécula hCy-N<sub>3</sub> y su capacidad para fototransformarse. Una vez obtenidas las geometrías de las tres especies en estado basal, se procedió a realizar cálculos de sus estados excitados empleando la Teoría de Funcionales de la Densidad Dependiente del tiempo (TDDFT, ver sección 3.5.2).

En este segundo conjunto de cálculos el funcional utilizado fue también CAM-B3LYP y el conjunto base 6-311++G(d,p). Para el cálculo de las energías de excitación se utilizó el modelo PCM para considerar el efecto del disolvente (metanol) empleando la aproximación del estado específico implementada en Gaussian 09.<sup>121</sup> Con este funcional y metodología combinados se han encontrado muy buenos resultados en la descripción de las energías de excitación y emisión de moléculas cargadas tipo hemicianinas y cianinas con errores menores al 5 % respecto a los datos experimentales.<sup>112,119</sup>

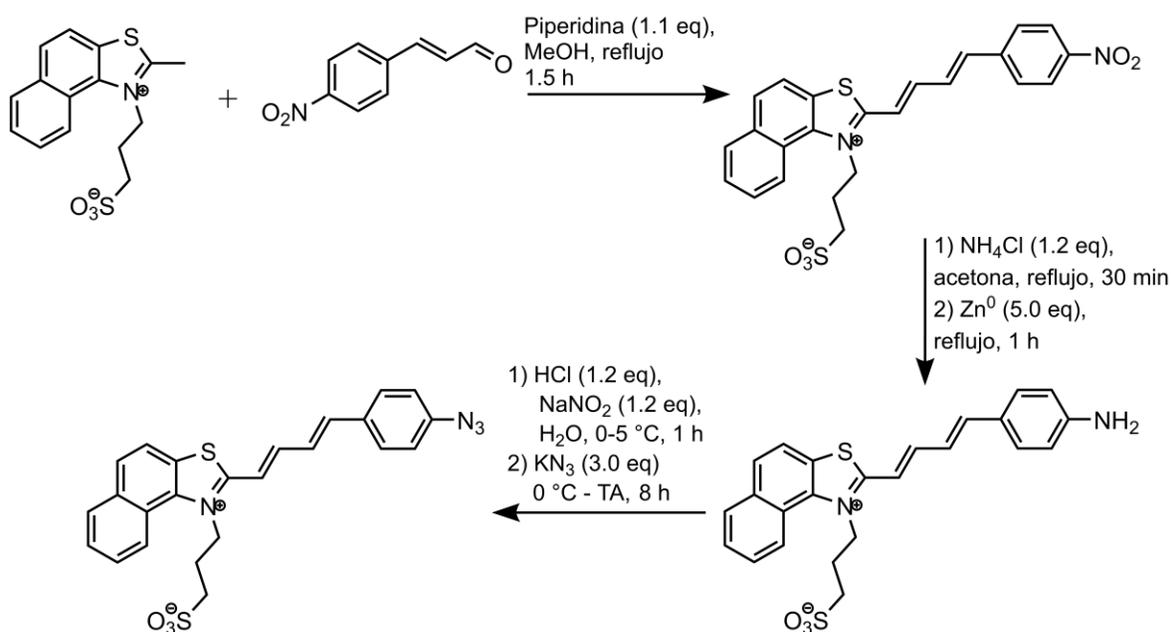
Con el fin de localizar la transición electrónica responsable de dar origen al estado disociativo del grupo azida, se calcularon las energías de excitación verticales de los primeros estados excitados singulete (S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub>). La transición que da lugar al estado disociativo involucra una transición ( $\pi \rightarrow \sigma_{NN}^*$ ) localizada en el grupo azida.<sup>38,39,45,97</sup> Posteriormente se calcularon las curvas de energía potencial para los estados basal (S<sub>0</sub>), S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub> para la coordenada del enlace -N-N<sub>2</sub> del grupo azida como manera de corroborar el estado disociativo encontrado.

Para las moléculas hCy-NH<sub>2</sub> y hCy-NO<sub>2</sub> se calcularon también las energías de excitación en metanol. En el caso de la especie nitro también se encontró la energía de excitación de los estados electrónicos singuletes y tripletes excitados con el fin de identificar el orden de las transiciones y los orbitales involucrados en estas.

### 4.3. Síntesis del fluorógeno (hCy-N<sub>3</sub>)

Una vez que las características necesarias del sistema han sido determinadas y los estudios computacionales sugieren su factibilidad como fluorógeno, se procedió a sintetizar el sistema de la hemicianina en forma de azida hCy-N<sub>3</sub> (Fig. 4.1). Para conseguirlo, se emplearon metodologías ligeramente modificadas respecto a publicaciones anteriores para otras hemicianinas y azidas.

La obtención de la molécula hCy-N<sub>3</sub> se llevó a cabo una síntesis de tres pasos que se muestra en la Fig. 4.2. El primero es un acoplamiento tipo Knoevenagel,<sup>99</sup> obteniendo un compuesto altamente conjugado con un grupo nitro (hCy-NO<sub>2</sub>), seguido de una reducción de dicho grupo para obtener la especie con grupo amina (hCy-NH<sub>2</sub>).<sup>125</sup> Finalmente, un acoplamiento con sales de diazonio fue realizado para obtener la azida respectiva.<sup>42,50</sup> Los detalles de cada uno de los pasos de síntesis y la caracterización de los productos se presentan en el Apéndice 2.



**Fig. 4.2.** Síntesis de la hemicianina en forma de azida hCy-N<sub>3</sub>.

#### 4.4. Espectroscopía de absorción y fluorescencia

Una vez obtenida la molécula deseada (hCy-N<sub>3</sub>) y los demás intermediarios (hCy-NO<sub>2</sub> y hCy-NH<sub>2</sub>) es necesario conocer sus características espectrales en el intervalo del ultravioleta-visible, que es la región del espectro electromagnético con energía suficiente para generar estados electrónicamente excitados de este conjunto de moléculas. Conocer las longitudes de onda de los máximos y la forma de los espectros de absorción y emisión brindan pautas acerca de las fuentes de radiación a emplear y las posibles aplicaciones del sistema. Además, esta información resulta necesaria para elegir el tipo de puntos cuánticos adecuados para realizar la transferencia de energía de manera eficiente.

Los espectros de absorción fueron obtenidos en un espectrofotómetro Cary 50 de Varian. En este mismo equipo se realizaron las determinaciones de los coeficientes de absorptividad molar de las especies. Para el caso de los espectros de emisión y determinación de rendimientos de fluorescencia ( $\Phi_F$ ), se empleó un fluorímetro Cary Eclipse de Varian. Los  $\Phi_F$  fueron determinados comparándolos con un estándar:

$$\Phi_F = \Phi_{F_{Est}} \frac{I}{I_{Est}} \frac{OD_{Est}}{OD} \frac{n^2}{n_{Est}^2}. \quad (4.1)$$

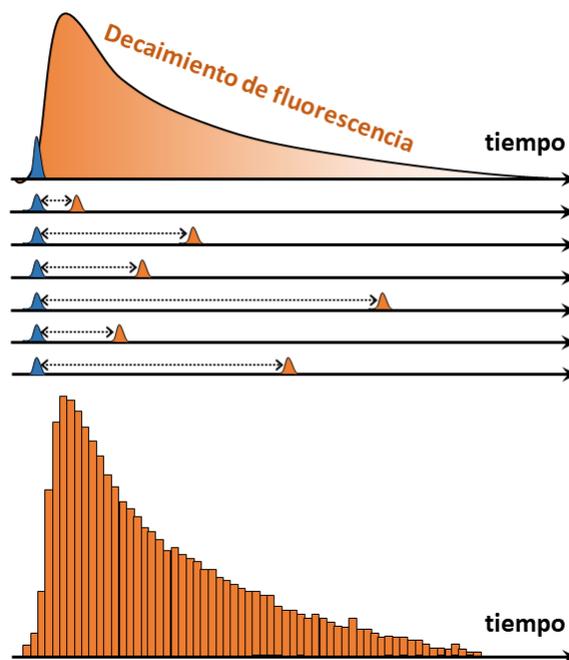
Donde  $\Phi_{F_{Est}}$  es el rendimiento de fluorescencia del estándar,  $I$  e  $I_{Est}$  son las intensidades de fluorescencia integradas de la muestra y el estándar,  $OD$  y  $OD_{Est}$  son las densidades ópticas de la muestra y el estándar, y  $n$  y  $n_{Est}$  son los índices de refracción. Para hCy-N<sub>3</sub> y hCy-NO<sub>2</sub> se empleó Rodamina 6G ( $\Phi_F = 0.93$ ),<sup>126</sup> mientras que para hCy-NH<sub>2</sub> se eligió Azul Nilo A ( $\Phi_F = 0.27$ ).<sup>127</sup> Todos los espectros para cada una de las especies fueron medidos en soluciones de metanol en celdas de cuarzo de 1 cm.

#### 4.5. Tiempos de decaimiento radiativos

Otra de las propiedades importantes para caracterizar a las especies derivadas de he-micianina es conocer sus tiempos de vida de fluorescencia. Estos datos resultan útiles para determinar las potenciales aplicaciones de los posibles productos generados después de la irradiación de hCy-N<sub>3</sub>. Para este propósito se empleó la técnica de conteo de fotones individuales correlacionados en tiempo (TCSPC, por sus siglas en inglés).<sup>128</sup>

para analizar las especies hCy-NO<sub>2</sub> y hCy-NH<sub>2</sub>, que son los fotoproductos más comunes en la disociación de azidas aromáticas en solución.<sup>38,40,44,45,51,122,129-132</sup>

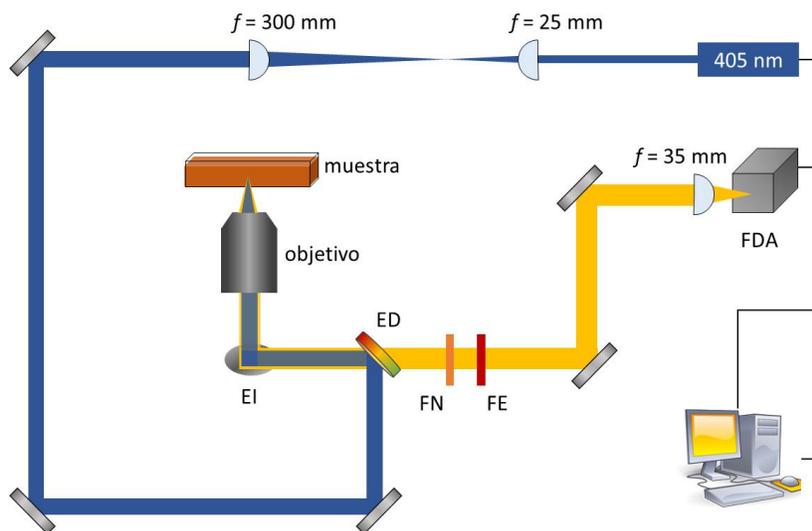
Brevemente, la técnica consiste en excitar a la muestra con un pulso de luz de picosegundos, tiempo después la muestra emite un fotón. El tiempo de arribo de este fotón es registrado. El proceso es repetido un gran número de ocasiones consiguiendo un histograma con la distribución de los tiempos de decaimiento de la muestra (Fig. 4.3).<sup>128,133</sup> Una condición importante en esta técnica es que debe de detectarse no más de un fotón por cada 100 eventos de excitación. Esto se debe a que cuando se registran una mayor proporción de eventos de detección, el histograma obtenido está sesgado a tiempos de decaimiento cortos.



**Fig. 4.3.** Principio de la técnica de TCSPC.

En este estudio, los tiempos de vida mediante la técnica TCSPC fueron obtenidos en un arreglo para un microscopio confocal de imagen por tiempo de vida de fluorescencia (FLIM, por sus siglas en inglés) diseñado y construido en nuestro grupo de investigación (ver Fig. 4.4). El sistema consiste en un láser pulsado de 405 nm (LDH-D-C-405, 403 nm, 54 ps FWHM, PicoQuant) que es enfocado a una celda de cuarzo de 1 cm

mediante un objetivo con  $f = 6.1 \text{ mm}$  y AN 0.25. La fluorescencia recolectada pasa a través de un espejo dicróico (ED) de paso de longitud de onda larga de  $485 \text{ nm}$ , un filtro Notch (FN) de  $405 \text{ nm}$  y un filtro emisión (FE) de paso de longitud de onda larga de  $425 \text{ nm}$ , con el fin de eliminar luz remanente de la excitación. Posteriormente, la fluorescencia es enfocada a un fotodiodo de avalancha (FDA) de  $50 \mu\text{m}$  (PD-050-CTE, Micro Photon Devices). El controlador del láser (PDL-800-D, PicoQuant) y el FDA fueron conectados a una tarjeta para TCSPC (PicoHarp 300, PicoQuant). La intensidad del láser fue controlada para obtener menos del 1 % de eventos de detección a una frecuencia de repetición de  $10 \text{ MHz}$ . La función de respuesta instrumental (IRF) fue determinada empleando Allura Red recristalizado en metanol como estándar (Sigma-Aldrich). Los datos de los experimentos fueron ajustados usando el software SymphoTime 64 (PicoQuant) mediante el algoritmo de iteración numérico de Levenberg-Marquardt.<sup>134</sup>



**Fig. 4.4.** Arreglo óptico para la determinación de los tiempos de vida mediante la técnica TCSPC. ED, espejo dicróico; EI, espejo; FN, filtro Notch; FE, filtro de emisión; FDA, fotodiodo de avalancha.

## 4.6. Fotodisociación de la hemicianina en forma de azida

Uno de los objetivos de este estudio es demostrar la capacidad de la azida ( $\text{hCy-N}_3$ ) para sufrir una disociación al ser irradiada y posteriormente generar un fluoróforo. Para comprobar este fenómeno se llevaron a cabo experimentos con fuentes de luz de diferentes longitudes de onda e intensidades. Cada una de las fuentes permite acceder a diferentes estados electrónicos o esquemas de excitación (monofotónico o bifotónico).

### 4.6.1. Conversión monofotónica

Para corroborar que la azida  $\text{hCy-N}_3$  es susceptible de sufrir una transformación fotoinducida y generar una especie fluorescente se realizaron experimentos empleando longitudes de onda de irradiación para producir transiciones a estados electrónicos excitados. En los experimentos se estudió además la influencia del tiempo de irradiación y la longitud de onda de excitación en el rendimiento de fotoconversión.

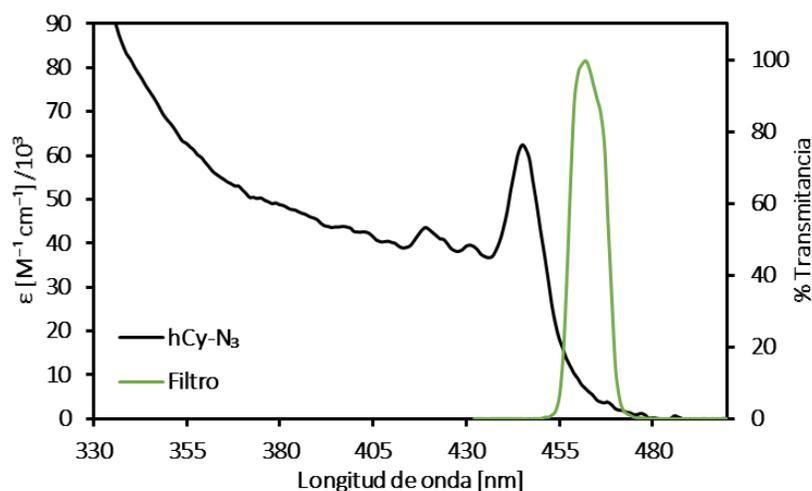
Para observar el efecto del tiempo de irradiación en la degradación de la azida, un conjunto de soluciones de  $\text{hCy-N}_3$  (2 mL,  $10^{-6}$  M) fueron irradiadas con un láser continuo de 405 nm (PicoQuant LDH-D-C-405) con una potencia promedio de 15 mW variando los tiempos de exposición a 1, 2, 5, 10, 30, 60 y 90 min. Estos tiempos corresponden a los valores de energía depositada al sistema de 0.8, 2.1, 4.2, 8.4, 25, 50 y 75 J, respectivamente. Para esta estimación se tomó en cuenta la reflectancia de la celda. Se tomaron espectros de absorción y emisión para cada tiempo de irradiación.

Además, se realizaron experimentos para determinar la influencia del oxígeno disuelto en las soluciones en los productos finales de las posibles reacciones del nitreno fotogenerado ( $\text{hCy-N}\cdot$ ). Se efectuaron experimentos con muestras burbujeadas con argón por 10 min con el mismo láser continuo de 405 nm, una potencia de 15 mW. También se variaron los tiempos de irradiación de 1 a 90 min.

Por otro lado, para observar el rendimiento de la fotoconversión como función de la longitud de onda de irradiación, se llevaron a cabo experimentos con una fuente

de luz adicional. Se consideró que, para los experimentos a longitudes de onda diferentes, existiera el mismo flujo de fotones. El objetivo de este estudio es esclarecer el papel de estados excitados superiores en la fotodisociación del grupo azida de hCy-N<sub>3</sub>.

Para los experimentos alrededor de 460 nm, se irradiaron soluciones de hCy-N<sub>3</sub> (absorbancia de 0.08 a 460 nm) en una celda de cuarzo de 1 cm. Se emplearon 3.2  $\mu$ W de una fuente de luz blanca estabilizada (SLS201L, THORLABS) con un filtro de paso de banda centrado en 460 nm para lograr acceder sólo al primer estado excitado de la hemicianina en forma de azida. La Fig. 4.5 muestra cómo la luz transmitida por el filtro sólo puede lograr transiciones al estado electrónico excitado de más baja energía. El haz de salida fue enfocado a la celda con un lente de  $f = 50$  mm. La potencia del haz fue medida después del filtro, en la distancia focal. Las muestras fueron irradiadas por 1, 2, 5, 10 y 30 minutos. Se tomaron espectros de absorción y emisión antes y después de cada experimento.



**Fig. 4.5.** Comparación entre el espectro de absorción de hCy-N<sub>3</sub> y el filtro de paso de banda a 460 nm que permite la excitación sólo del estado S<sub>1</sub>.

En el caso de la irradiación con una fuente de 405 nm, las soluciones de hCy-N<sub>3</sub> (absorbancia = 0.08 a 405 nm) en una celda de cuarzo de 1 cm, fueron irradiadas con 3.6  $\mu$ W de un láser de onda continua de 405 nm (LDH-D-C-405, PicoQuant), variando el tiempo de irradiación de 1, 2, 5, 30 y 60 minutos. Los espectros de absorción y emisión fueron tomados para cada tiempo de irradiación.

#### 4.6.2. Conversión bifotónica

Uno de los intereses de este estudio es que el un fluorógeno tipo azida diseñado sea capaz de sufrir una transformación mediante absorción bifotónica. Este esquema de excitación brinda ventajas en el control espacial de la misma y la energía de la fuente de irradiación (ver sección 3.1.1.1).

Con el propósito de estudiar la transformación de hCy-N<sub>3</sub>, inducida por una absorción simultánea de dos fotones, se llevaron a cabo experimentos en la región del infrarrojo cercano. Un conjunto de soluciones de 2 mL hCy-N<sub>3</sub> 10<sup>-6</sup> M en metanol se irradiaron por 2 minutos en una celda de cuarzo de 1 cm con un láser de Ti:Zafiro (790 nm) con pulsos ultracortos (150 fs) variando la intensidad del haz (10<sup>5</sup> – 10<sup>7</sup> W·cm<sup>-2</sup>). El láser fue enfocado en la muestra por un microscopio de objetivo con NA 0.25 y f = 6.1 mm. La intensidad instantánea fue controlada con un filtro de densidad neutral variable. La intensidad del haz de excitación fue medida antes y después de cada experimento. Se tomaron los espectros de absorción y emisión correspondientes a cada una de las potencias de irradiación.

#### 4.7. Fotoconversión del sistema punto cuántico-hemicianina

Una forma de inducir o incrementar la capacidad del sistema de absorber dos fotones es mediante la inclusión de una antena. En el caso de la hemicianina en forma de azida de este estudio las especies que funcionan como absorbentes bifotónicos son puntos cuánticos (Quantum Dots, QDs) semiconductores de sulfuro de cadmio.

Se realizaron experimentos para evaluar los QDs de CdS como antenas bifotónicas aumentando la eficiencia en la producción de la especie fluorescente. Este proceso está derivado de la transferencia de energía desde el QD a hCy-N<sub>3</sub>, que provoca la disociación del enlace azida y la generación del nitreno hCy-N·, antes mencionado.

##### 4.7.1. Conversión inducida por transferencia de energía

Como se mostró en la sección 3.3.3, uno de los factores que más influyen en la eficiencia de la transferencia de energía es la distancia entre los momentos dipolares de transición

de las especies involucradas. Tomando esto en cuenta, el primer paso para emplear los QDs de CdS como antenas bifotónicas es lograr que la molécula a la que se quiere transferir la energía, en este caso la hCy-N<sub>3</sub>, se encuentre cerca de éstos.

El grupo sulfonato considerado en el diseño de la hemicianina en forma de azida permite que la molécula sea capaz de anclarse en la superficie de los puntos cuánticos desplazando algunos de los ligantes nativos.

Una vez confirmada la unión de la molécula con el punto cuántico, se procedió a estimar el incremento en la eficiencia de la producción del fluoróforo en presencia del QD. Para este fin, soluciones de 2 mL de hCy-N<sub>3</sub> ( $10^{-6}$  M) con puntos cuánticos de CdS ( $6.15 \times 10^{-7}$  M) adquiridos en MKNano Inc. fueron irradiadas por 1 min con un láser de Ti:Zafiro pulsado de femtosegundos (150 fs, 800 nm) enfocado con un objetivo de microscopio (0.25 NA,  $f = 6.1$  mm) variando la intensidad entre  $10^5$ – $10^7$  W·cm<sup>-2</sup> con ayuda de un filtro de densidad neutral variable. Previo a realizar los experimentos de irradiación, las soluciones se mantuvieron en la oscuridad por 20 min para alcanzar el equilibrio de asociación QD-CdS/hCy-N<sub>3</sub>. Las condiciones de irradiación (lente objetivo, agitación, tipo de celda) fueron las mismas que en los experimentos de excitación bifotónica de hCy-N<sub>3</sub> (sección 4.6.2).

Por último, variar la proporción entre QD-CdS y hCy-N<sub>3</sub> puede llevar a un aumento en la obtención del fotoproducto fluorescente, además del aumento en la probabilidad de absorción de dos fotones gracias a los puntos cuánticos. Para encontrar la relación óptima se preparó un conjunto de soluciones de hCy-N<sub>3</sub> (2 mL)  $1.6 \times 10^{-6}$  M con diferentes concentraciones de QD-CdS que fueron de  $2.6 \times 10^{-8}$  a  $5.3 \times 10^{-7}$  M, además de una muestra blanco en ausencia de puntos cuánticos. Estas soluciones fueron irradiadas con un láser pulsado de femtosegundos enfocado en una celda de cuarzo de 1 cm por 1 min a  $2.2 \times 10^6$  W·cm<sup>-2</sup>. Todas las soluciones fueron conservadas en la oscuridad por 20 min antes de ser irradiadas para alcanzar el equilibrio de asociación QD-CdS/hCy-N<sub>3</sub>. La duración de los pulsos láser, la longitud de onda central y el objetivo del microscopio fueron las mismas que en los experimentos anteriores.

## 5. Resultados y Discusión

---

En el capítulo anterior se describieron los métodos empleados para estudiar a la hemicianina en forma de azida hCy-N<sub>3</sub> y al sistema formado por ésta con puntos cuánticos (QDs) de CdS. Con los experimentos descritos se busca evaluar su viabilidad como fluoróforos activados mediante excitación bifotónica. En este apartado se expondrán los resultados de dichos experimentos y de los estudios computacionales realizados, se ahondará en las implicaciones de estos resultados y la relación entre ellos.

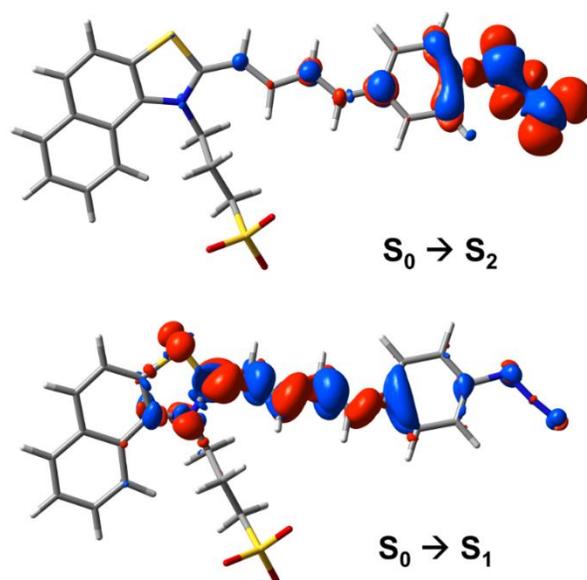
### 5.1. Estudios teóricos

Como fue mencionado anteriormente, el modelado computacional de la hemicianina en forma de azida y sus transiciones a estados electrónicos excitados brindan una guía para conocer la capacidad de la molécula diseñada para efectuar una transformación inducida por la absorción de luz. Estudios teóricos previos de azidas aromáticas han establecido un límite en la capacidad de estas moléculas para sufrir fotodisociación conforme al número de electrones  $\pi$  presentes en enlaces conjugados de estos sistemas.<sup>38</sup> Para azidas aromáticas cargadas como la del presente trabajo, este límite está establecido en 20 electrones  $\pi$ .<sup>122,129</sup> Esta es una de las razones por las que un estudio teórico previo del sistema resulta de gran utilidad.

#### 5.1.1. Energía de excitación y transiciones electrónicas

Después de realizar la optimización de la geometría de hCy-N<sub>3</sub> en estado basal, se calcularon las energías de las transiciones electrónicas que dan origen a los estados electrónicamente excitados y se analizaron los orbitales involucrados en ellas. Estos cálculos dan información relacionada con la existencia de un estado que promueve la disociación del enlace azida en la molécula. Estudios anteriores realizados por los grupos de Budyka,<sup>38,40</sup> Platz<sup>46,49,135</sup> y Hadad<sup>41,97</sup> establecen que esta transición involucra los orbitales  $\sigma$  y  $\pi^*$  localizados en los átomos de nitrógeno del grupo azida.

En la Fig. 5.1 se muestran las diferencias de densidades electrónicas para las transiciones que dan origen a los dos primeros estados excitados singulete. Los resultados muestran que la primera transición permitida es al singulete  $S_1$  ( $f = 2.17$ ) y tiene una energía de 2.82 eV. Al observar la Fig. 5.1 (abajo) notamos que se trata de una transición de tipo  $\pi-\pi^*$ . Los cambios en la densidad electrónica ocurren principalmente en el puente polimetínico entre los anillos aromáticos. De acuerdo con los estudios citados previamente, este tipo de transición no da origen al estado disociativo buscado.



**Fig. 5.1.** Diferencia de densidades electrónicas para las transiciones a los estados excitados  $S_1$  y  $S_2$ . Los valores de las isosuperficies son +0.002 u.a. para el color rojo y -0.002 u.a. para el color azul. El nivel de teoría TDDFT/CAM-B3LYP/6-311G++(d,p) con metanol PCM.

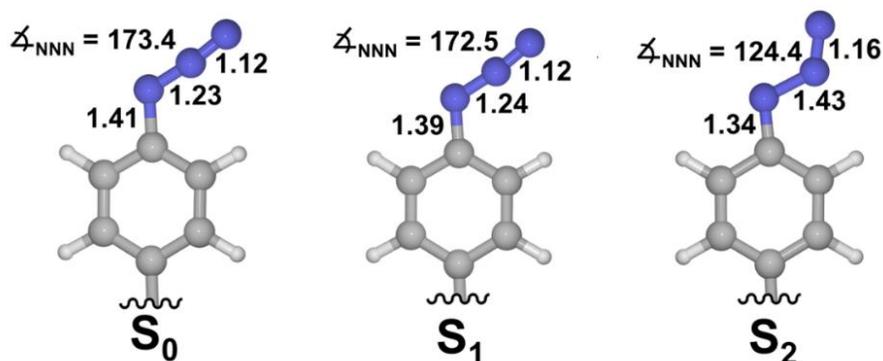
Por otra parte, para la transición al estado  $S_2$  se obtuvo una energía de 3.95 eV ( $f = 0.060$ ). El análisis de las diferencias de densidades electrónicas de la Fig. 5.1 indica que en este caso la transición está localizada en el grupo azida. Notamos una disminución de la densidad electrónica a lo largo del eje de enlace entre los átomos de nitrógeno y una concentración en regiones de antienlace. Esta evidencia indica que, desde el punto de vista de los cálculos teóricos, el estado que propicia la ruptura del enlace  $-N-N_2$  es el  $S_2$ , a diferencia de un gran número de azidas aromáticas reportadas cuyo estado disociativo es el  $S_1$ .<sup>40,46</sup>

La participación de un estado electrónico excitado superior en la disociación del grupo azida involucra una dinámica del estado excitado donde además del canal fotoquímico, también existe una competencia con otros canales de desactivación como la conversión interna.<sup>96</sup>

### 5.1.2. Superficies de energía potencial

En busca de un análisis más a fondo del papel del estado  $S_2$  en la fotoquímica de la molécula hCy-N<sub>3</sub> se realizaron optimizaciones de las estructuras en los estados excitados  $S_1$  y  $S_2$  con el fin de observar cambios geométricos. Estos cambios también ocurren principalmente en el grupo azida al encontrarse en un estado excitado proclive a la disociación del grupo azida.<sup>41,97</sup> Los parámetros a analizar serán las distancias de enlace C-N entre el anillo aromático y el grupo azida, y N-N<sub>2</sub>. Otro parámetro que tiene un gran cambio es el ángulo formado por los átomos de nitrógeno del grupo azida.<sup>40</sup>

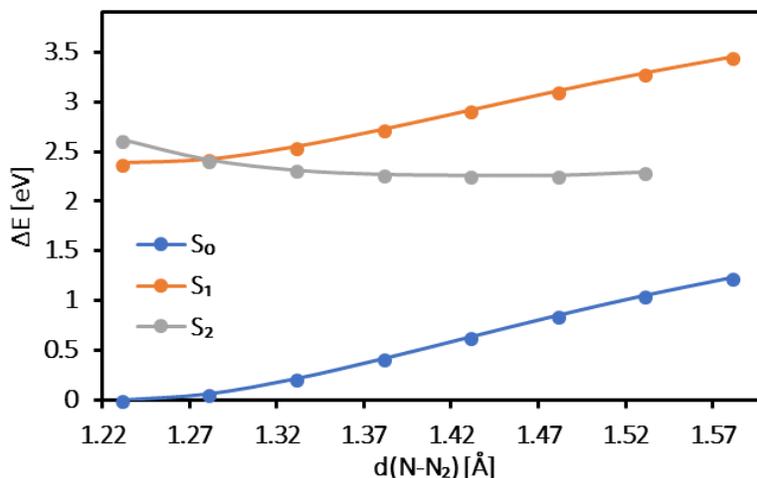
En la Fig. 5.2 se muestran los resultados de las optimizaciones geométricas de los estados electrónicos antes mencionados. En el estado basal, el ángulo formado por los tres átomos de nitrógeno es de 173 °, similar a estudios previos para azidas aromáticas.<sup>38,97</sup> En el estado  $S_1$  este ángulo y las distancias de enlace C-N y N-N<sub>2</sub> se conservan prácticamente sin cambios, indicando una poca participación del grupo azida en la relajación del estado excitado hacia el mínimo en su superficie de energía potencial. Por el contrario, la geometría optimizada del estado  $S_2$  muestra importantes cambios en estos parámetros. El ángulo  $\angle_{\text{NNN}}$  disminuye hasta 124 ° y la distancia C-N disminuye ligeramente de 1.41 Å a 1.34 Å. Además, la distancia entre los átomos de nitrógeno N-N<sub>2</sub> aumenta considerablemente, yendo de 1.23 Å hasta 1.43 Å.



**Fig. 5.2.** Detalle del grupo azida en las estructuras optimizadas para los estados basal ( $S_0$ ) y primer ( $S_1$ ) y segundo ( $S_2$ ) singletes excitados al nivel TDDFT/CAM-B3LYP/6-311G++(d,p) con metanol PCM. Los ángulos y distancias de enlace se presentan en grados [°] y angstroms [Å], respectivamente.

Los cambios mostrados por el grupo azida en el estado  $S_2$  sugieren un debilitamiento del enlace N-N<sub>2</sub> a la par de un fortalecimiento del enlace C-N, según los cambios en las distancias de enlace y en el ángulo antes mencionado. Estas diferencias encontradas para las geometrías optimizadas en los diferentes estados electrónicos también apuntan al estado  $S_2$  como precursor de la liberación de N<sub>2</sub> y la generación del nitreno hCy-N: que dará origen a la especie fluorescente.

Por último, la Fig. 5.3 muestra las curvas de energía potencial de los estados  $S_0$ ,  $S_1$  y  $S_2$  en función de la distancia de enlace N-N<sub>2</sub>. Este cálculo fue realizado para tener un acercamiento a la evolución energética de la hemicianina en forma de azida durante las primeras etapas del proceso de disociación después de ser llevada al primer o segundo estado singlete excitado. Se puede observar que para el estado basal la energía del sistema aumenta al aumentar la distancia entre los átomos de nitrógeno donde sucederá la ruptura. Este incremento indica la energía que se requiere para llevar a cabo la disociación en ese estado electrónico.



**Fig. 5.3.** Curvas de energía potencial para hCy-N<sub>3</sub> en los estados S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub> a lo largo del enlace N-N<sub>2</sub>. El nivel de teoría empleado fue TDDFT/CAM-B3LYP/6-311G++(d,p), PCM: metanol.

Para este conjunto de cálculos el estado S<sub>1</sub> una vez más muestra una gran similitud con el basal. Los cambios en energía para el primer singulete excitado también muestran una desestabilización del sistema al provocado por una mayor separación entre los átomos que conforman el enlace N-N<sub>2</sub> de la azida. Esta tendencia, al igual que en el caso del estado S<sub>0</sub>, indican una preferencia del sistema por permanecer con el grupo azida unido. Contrariamente a lo mostrado por los estados S<sub>0</sub> y S<sub>1</sub>, el estado S<sub>2</sub> manifiesta una disminución de la energía al incrementar la distancia de enlace en el grupo azida. Un cambio de esta naturaleza revela que se está llegando a una conformación más estable al debilitar el enlace N-N<sub>2</sub>. Una vez más se corrobora la predisposición del sistema a disociar el grupo azida en el estado S<sub>2</sub>.

Un punto importante que destacar a partir de las curvas de energía potencial de la Fig. 5.3 es que existe un punto de cruce entre los estados S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub> al alcanzar una distancia de 1.28 Å para el enlace estudiado. Este cruce indica una alta probabilidad de llevar a cabo una conversión interna entre los estados involucrados. Dicha transición no radiativa podría influir en la eficiencia del proceso de disociación del grupo azida.

Los estudios teóricos presentados en este apartado señalan la necesidad de acceder a estados electrónicos superiores, en particular al S<sub>2</sub>, para lograr la ruptura del grupo azida y la formación del nitreno. Estos estudios tendrán que ser corroborados

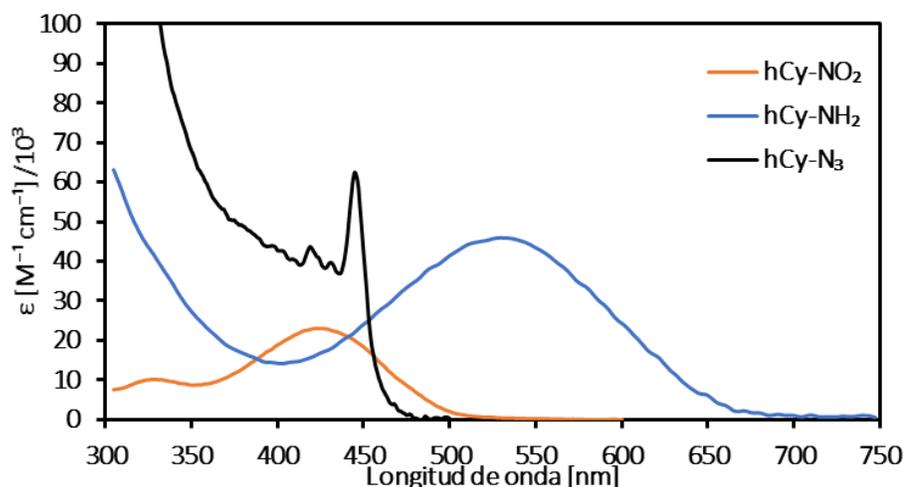
por experimentos que demuestren el rol del segundo singulete excitado como estado disociativo (ver sección 5.4.1).

## 5.2 Espectroscopía estática

Una vez que se ha encontrado e identificado el estado excitado que conlleva la ruta fotoquímica de disociación, se realizó la síntesis de la azida aromática y la posterior caracterización espectroscópica de la misma que se muestra en el Apéndice 2. Es importante mencionar que la azida obtenida es fotoestable, por lo que su descomposición por radiación es poca. Sin embargo, su almacenamiento requiere de cuidados como la presencia de un gas inerte o conservarla a temperaturas no superiores a 45 °C. Posteriormente se realizaron estudios de las propiedades fotofísicas del sistema hCy-N<sub>3</sub> y las especies intermedias relevantes (hCy-NH<sub>2</sub> y hCy-NO<sub>2</sub>). Conociendo datos como los espectros de absorción y emisión en el UV-visible y la eficiencia de la fluorescencia es posible diseñar de manera adecuada las pruebas donde se estudie la fotoquímica del sistema.

### 5.2.1 Absorción

Los espectros de absorción de la hemicianina en forma de azida (hCy-N<sub>3</sub>) y las especies hCy-NO<sub>2</sub> y hCy-NH<sub>2</sub> en metanol se muestran en la Fig. 5.4. Se puede observar que la molécula azida presenta una banda en 445 nm con un coeficiente de absorción molar ( $\epsilon$ ) de alrededor de  $6.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . La banda se muestra definida y pierde intensidad súbitamente en longitudes de onda mayores hasta desaparecer en 475 nm. Esta información nos indica la longitud de onda de la radiación necesaria para inducir la transformación de la molécula. Esta energía debe corresponder a luz con una longitud de onda menor que los 475 nm para promover una transición electrónica. Es importante recordar que también será necesario acceder a estados electrónicos excitados superiores para comprobar la influencia de estos estados en la fotoquímica de la azida hCy-N<sub>3</sub>.



**Fig. 5.4.** Espectros de absorción de las especies nitro (hCy-NO<sub>2</sub>), amina (hCy-NH<sub>2</sub>) y azida (hCy-N<sub>3</sub>) en metanol.

Al conocer esta información además de elegir de manera adecuada la fuente de radiación que provocará el cambio, también es la guía fundamental para seleccionar los puntos cuánticos ideales para activar al sistema por transferencia de energía. Tanto la longitud de onda de emisión de los QDs elegidos debe coincidir con la energía necesaria para causar la transformación deseada. Así, los puntos cuánticos adecuados deben presentar una longitud de onda en una región menor de los 475 nm.

Por otra parte, el espectro de las especies amino y nitro (posibles productos finales después de la disociación de la azida) muestran bandas con máximos de absorción con una gran separación. La especie nitro tiene su máximo en 430 nm, con un  $\epsilon$  de  $2.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Esta banda tiene un ancho a la mitad del máximo (FWHM) de 80 nm, valor común para moléculas orgánicas.<sup>1,89</sup> En el caso de la forma amina, el máximo en la primera banda de absorción se localiza en 530 nm con un FWHM de 140 nm y un coeficiente de absorción molar de  $4.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , para el máximo.

Las diferencias en las longitudes de onda de absorción entre las especies hCy-NO<sub>2</sub> y hCy-NH<sub>2</sub> resulta útil para para la excitación selectiva de alguna se estas moléculas. Esto permite aislar en cierta medida las propiedades fotofísicas de cada una de ellas. Esta misma propiedad resulta útil para su localización en técnicas de microscopía al poder excitar selectivamente a las diferentes moléculas.

Un resultado adicional de los estudios teóricos realizados fue el cálculo de las energías de transición para las tres moléculas analizadas en este trabajo. Los resultados mostrados en la Tabla 5.1 indican que los errores obtenidos son menores al 5 % respecto al valor encontrado experimentalmente. Esto nos brinda confianza respecto a los resultados teóricos obtenidos relacionados con el proceso de absorción como los presentados en la sección 5.1.1 o los que se expondrán en secciones posteriores de este capítulo.

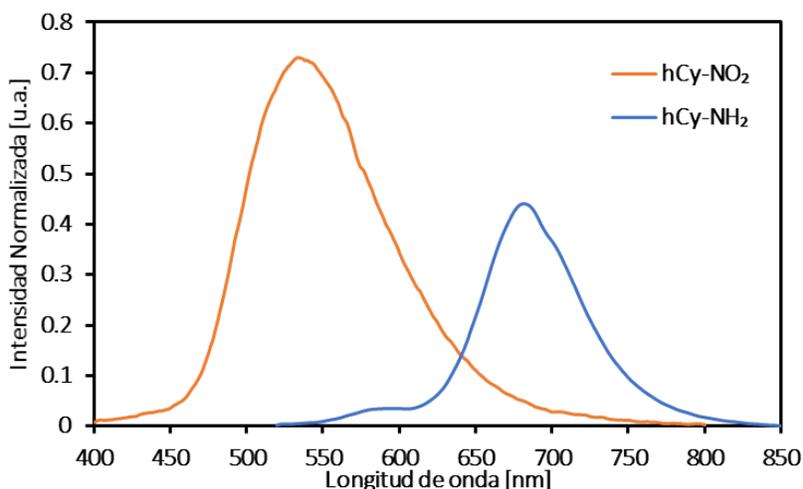
**Tabla 5.1.** Energías calculadas y experimentales para la primera transición electrónica.

	<b>Calculado (eV)</b>	<b>Experimental (eV)</b>	<b>% Error</b>
hCy-NO <sub>2</sub>	2.99	2.95	1.4
hCy-NH <sub>2</sub>	2.54	2.43	4.5
hCy-N <sub>3</sub>	2.82	2.78	1.4

Los resultados obtenidos con los espectros de absorción de las moléculas hCy-N<sub>3</sub>, hCy-NO<sub>2</sub> y hCy-NH<sub>2</sub> indican diferencias importantes en la forma y localización de las bandas de absorción de las diferentes especies. Estas diferencias implican la posibilidad de emplear diferentes fuentes de luz para excitarlas. Este esquema donde interviene el uso de diversas longitudes de onda de irradiación puede ser empleado para la activación del fluorógeno y la posterior detección de las moléculas fluorescentes generadas. Este es un esquema de excitación similar al usado en técnicas de microscopía de súper-resolución<sup>17,27</sup> y en dispositivos de almacenamiento de información.<sup>5,12</sup>

## 5.2.2 Emisión

Como ha sido mencionado, el objetivo de este trabajo es obtener un fluorógeno a partir de una transformación fotoinducida. El producto deseado es una especie altamente fluorescente. De los posibles fotoproductos de la disociación de azidas (ver sección 3.2.1) los más probables, en las condiciones de este trabajo, son la forma nitro (hCy-NO<sub>2</sub>) y la forma amino (hCy-NH<sub>2</sub>),<sup>42,45</sup> mostrados en la Fig. 4.2. De los espectros de emisión de estas especies (Fig. 5.5) puede observarse que hCy-NO<sub>2</sub> muestra una banda con un máximo en 520 nm, mientras que la hCy-NH<sub>2</sub> presenta su máximo en 685 nm. La forma azida no muestra emisión significativa.



**Fig. 5.5.** Espectros de fluorescencia de los derivados nitro y amina en metanol.  $\lambda_{exc} = 390$  nm.

Con la información proporcionada por los espectros es posible notar que ambas especies exhiben un gran corrimiento de Stokes respecto a su absorción. La forma hCy-NO<sub>2</sub> presenta un corrimiento de 114 nm, mientras que la amina tiene un desplazamiento de 150 nm. Para ambas moléculas un desplazamiento de Stokes de más de 100 nm evidencia una gran estabilización del estado emisivo, ya sea por un cambio geométrico o interacción más favorable con el disolvente. En el caso del metanol, al ser un disolvente polar, la interacción con moléculas más polares en el estado excitado que en el estado basal se mejorará. Una posible explicación del fenómeno es la generación de estados de transferencia de carga intramoleculares al absorber radiación. La presencia de estos estado es común en moléculas de tipo donador- $\pi$ -aceptor o donador- $\pi$ -donador como las moléculas en este estudio.<sup>2,119</sup>

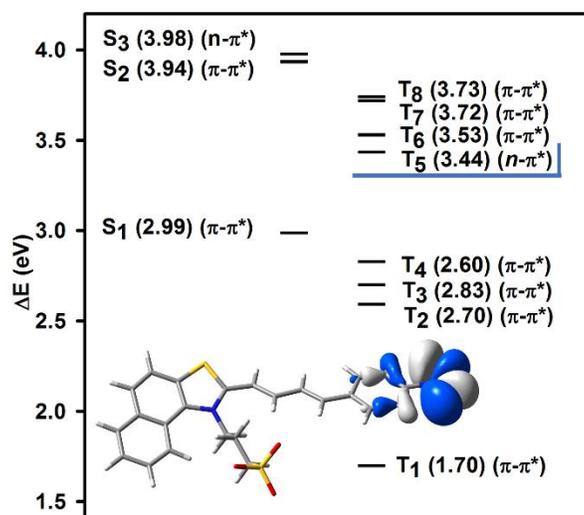
Al igual que en el caso de los espectros de absorción (Fig. 5.4) las bandas de emisión de las moléculas en forma nitro y amina se encuentran lo suficientemente alejadas como para lograr aislarlas mediante el uso de filtros. La relevancia de diferenciar ambas emisiones radica en la capacidad para identificarlas como fotoproductos una vez realizados los experimentos de fotodisociación.

Otro parámetro importante en la fluorescencia además de la longitud de onda a la que se localiza el máximo es la eficiencia en el proceso. Los valores de los rendimientos de fluorescencia ( $\Phi_F$ ) encontrados para las tres especies en soluciones de metanol

fueron 0.42 para hCy-NH<sub>2</sub>, 0.73 para hCy-NO<sub>2</sub> y  $1 \times 10^{-3}$  para hCy-N<sub>3</sub>. Los espectros en la Fig. 5.5 muestran las intensidades relativas de las especies fluorescentes.

Es importante notar el valor atípicamente alto para el rendimiento de fluorescencia de la especie nitro. De hecho, resulta ser un cromóforo excelente respecto a sus propiedades espectroscópicas como sus longitudes de onda de absorción y emisión. Los compuestos nitroaromáticos, después de ser excitados electrónicamente, suelen realizar un cruce entre sistemas muy eficiente hacia un triplete receptor. Este canal de desactivación predomina sobre la fluorescencia ya que sucede en escalas de tiempo del orden de decenas de femtosegundos.<sup>101,136,137</sup> Sin embargo, existen algunos casos en los que el cruce entre sistemas se encuentra desfavorecido por la falta de coincidencia energética entre el estado S<sub>1</sub> con algún estado vibracional de dicho triplete receptor.<sup>103,104,137</sup> Para este tipo de moléculas, la transición que da origen a dicho triplete debe involucrar un orbital molecular no enlazante localizado en el grupo nitro, y un orbital  $\pi$  de antienlace.<sup>101,138</sup> Uno de los factores que permiten que estas transiciones entre estados de diferente multiplicidad en moléculas orgánicas se lleven a cabo está dado por las reglas de El-Sayed<sup>92</sup> abordadas en la sección 3.2.3 de esta tesis.

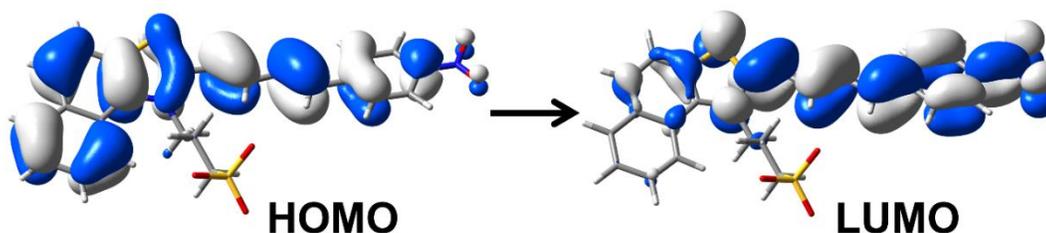
Para entender este comportamiento en la molécula hCy-NO<sub>2</sub> se realizaron cálculos computacionales de las energías para acceder a estados electrónicos excitados. Se estudió el orden y carácter de las transiciones a los diferentes estados singulete y triplete. La Fig. 5.6 muestra un diagrama con las transiciones verticales a estados excitados de la especie nitrada. Es posible observar cómo la transición que da origen al estado S<sub>1</sub> aparece a 2.99 eV y tiene un carácter ( $\pi$ - $\pi^*$ ). Tomando a este estado como emisivo, el triplete receptor debe ser producto de una transición desde un orbital molecular de no enlace ( $n$ ) a uno de tipo  $\pi^*$  para que el cruce entre sistemas esté permitido. El triplete de menor energía que cumple esta condición es el T<sub>5</sub>, marcado en la figura en color azul.



**Fig. 5.6.** Orden y carácter de las transiciones que dan origen a los estados excitados en hCy-NO<sub>2</sub>. Las energías están dadas en eV. Se muestra el orbital *n* en el grupo nitro de la molécula.

Este triplete ( $n-\pi^*$ ) tiene una energía de 3.44 eV, superior a la del estado S<sub>1</sub> por cerca de 0.5 eV. Esta diferencia energética entre los estados apropiados a llevar a cabo el cruce entre sistemas hace que el canal de desactivación resulte bloqueado. Los tripletes con menor energía (T<sub>1</sub>-T<sub>4</sub>) presentan transiciones del tipo ( $\pi-\pi^*$ ) por lo que un cruce entre sistemas para acceder a estos estados desde el S<sub>1</sub> también está prohibido. Al tener este canal bloqueado, la molécula hCy-NO<sub>2</sub> puede permanecer tiempo suficiente en el estado emisor y desactivarse de manera radiativa.

Como complemento asociado al análisis anterior, se realizó una inspección de los orbitales moleculares involucrados en la excitación vertical desde el estado basal al primer singulete excitado. La transición involucra los orbitales HOMO y LUMO de la molécula, mostrados en la Fig. 5.7. De la imagen se advierte que el HOMO está distribuido en toda la molécula. Por otro lado, el LUMO, que resulta poblado después de la transición, sólo contribuye en una región de la especie hCy-NO<sub>2</sub>.



**Fig. 5.7.** Orbitales moleculares HOMO y LUMO para la molécula hCy-NO<sub>2</sub> al nivel de teoría TDDFT/B3LYP/6-311G++(d,p), PCM: metanol.

Con el análisis de la forma de los orbitales moleculares que participan en la transición a  $S_1$ , puede concluirse que este estado presenta cierto carácter de transferencia de carga. Estudios realizados por nuestro grupo de investigación mostraron que estos estados son estabilizados en disolventes polares como los empleados en este estudio.<sup>103,104</sup> La estabilización del estado emisivo aumenta la diferencia energética con el triplete ( $n-\pi^*$ ) y aumenta el tiempo de vida de este estado.

Los resultados teóricos que muestran la formación de un estado de transferencia de carga complementan la información obtenida con los espectros de emisión experimentales (Fig. 5.5). El desplazamiento de Stokes encontrado y la anchura de la banda de fluorescencia concuerdan con la observación de un estado de transferencia de carga intramolecular.<sup>139,140</sup>

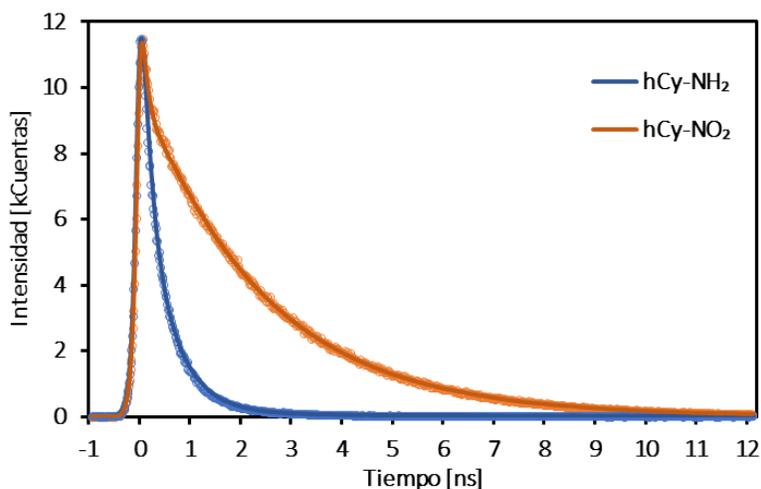
Los experimentos de espectroscopía estática de absorción y emisión dieron información valiosa acerca de las fuentes de luz necesarias para llevar a cabo los experimentos de fotodisociación de la azida aromática. Además, se establecieron diferencias espectrales importantes entre sus posibles fotoproductos para así facilitar su identificación. También se comprobó la importancia de los resultados del modelado teórico de los estados excitados para explicar el comportamiento de la forma nitro y predecir longitudes de onda de absorción de las tres especies con errores pequeños.

### 5.3 Espectroscopía con resolución temporal

Los espectros de absorción y fluorescencia obtenidos sirven también como base para un estudio de otros parámetros de la emisión de las especies  $hCy-NO_2$  y  $hCy-NH_2$ . El tiempo de vida de fluorescencia es una característica distintiva de cada molécula. Conocer el tiempo de vida de las moléculas fluorescentes en este estudio proporciona información no sólo como medio de identificación de estas, también da miras de posibles usos de las mismas.

Los datos de los decaimientos de fluorescencia de las moléculas emisivas en este estudio se presentan en la Fig. 5.8. Para estos experimentos se empleó un láser de 405 nm como fuente de excitación. Las diferencias entre ambas moléculas son distinguibles a simple vista, la especie  $hCy-NH_2$  presenta un decaimiento más rápido que el

de la especie nitrada. Los tiempos de vida del estado excitado obtenidos del ajuste de los datos muestran que ambas moléculas poseen un decaimiento biexponencial. La forma hCy-NH<sub>2</sub> exhibe tiempos de decaimiento  $\tau_1 = 0.13 \pm 0.01$  ns, y  $\tau_2 = 0.56 \pm 0.02$  ns. Para el caso de la forma hCy-NO<sub>2</sub>, los tiempos de vida de fluorescencia hallados fueron  $\tau_1 \leq 0.07$  ns y  $\tau_2 = 2.11 \pm 0.03$  ns. En esta última molécula, el tiempo de vida corto es demasiado breve para ser resuelto por el equipo, por lo que sólo se tiene un límite superior dado por la función de respuesta del equipo.

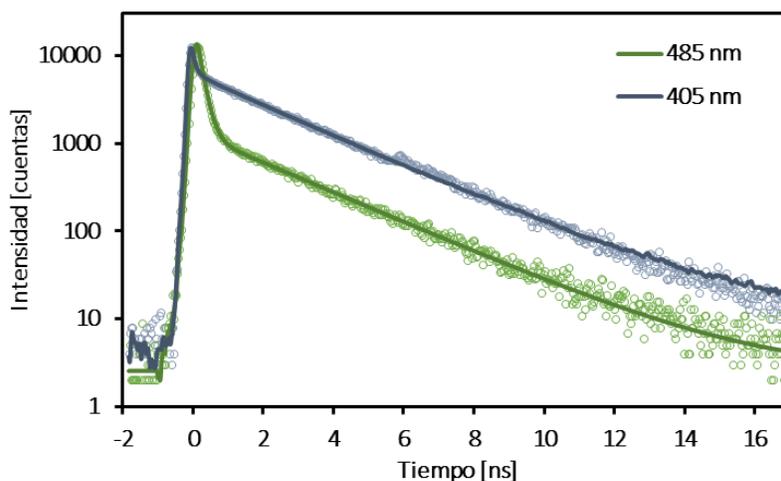


**Fig. 5.8.** Mediciones de TCSPC para la especie nitro (hCy-NO<sub>2</sub>) y amina (hCy-NH<sub>2</sub>). Los ajustes biexponenciales se muestran como líneas sólidas. La  $\lambda_{exc} = 405$  nm,  $\lambda_{det}$  (hCy-NO<sub>2</sub>) = 520 nm,  $\lambda_{det}$  (hCy-NH<sub>2</sub>) = 700 nm.

Otra conclusión importante derivada de las mediciones de TCSPC es, una vez más, el uso de una técnica como herramienta para diferenciar las dos especies fluorescentes entre sí. Esta metodología cuenta con la ventaja adicional de poder analizar la presencia de cada una de las moléculas incluso en una mezcla empleando filtros que limiten la longitud de onda de la detección de la emisión y además corroborando la identidad de la especie a través de sus tiempos de vida de fluorescencia característicos.

Otra característica importante derivada del análisis de TCSPC en la molécula hCy-NO<sub>2</sub> fue la influencia de la longitud de onda de excitación en contribución de cada uno de los tiempos de decaimiento. En la Fig. 5.9 se muestran los datos para el decaimiento de la especie nitrada después de ser excitada con fuentes de 405 nm y 485 nm.

Es importante notar que los dos conjuntos de datos presentan decaimientos biexponenciales. Las líneas de los ajustes para ambos histogramas revelan estas dos etapas. También es posible notar la similitud entre las pendientes de los decaimientos, indicativo de compartir un tiempo de vida de fluorescencia semejante.



**Fig. 5.9.** Decaimientos de fluorescencia de la forma nitro (hCy-NO<sub>2</sub>) por TCSPC con diferentes longitudes de onda de excitación. Los ajustes biexponenciales se muestran como líneas sólidas.

Los ajustes realizados para las dos condiciones de excitación (Tabla 5.1) revelan que los tiempos de vida de fluorescencia son muy cercanos y que la principal diferencia entre ellos su amplitud en cada caso. Al excitar con 485 nm el coeficiente del componente de tiempo corto contribuye en mayor medida al decaimiento total comparado con la excitación a 405 nm, del 91.0% al 95.5%. De manera complementaria, la componente de tiempo largo tiene una amplitud menor al irradiar con 485 nm. Este tipo de comportamiento ha sido observado anteriormente en sistemas con una gran cantidad de dobles enlaces conjugados como compuestos polimetínicos<sup>141</sup>, ácidos grasos<sup>142</sup> y en carotenoides.<sup>143</sup> Esta influencia de la longitud de onda de excitación en la amplitud de los tiempos de decaimiento en los sistemas mencionados se explica por la presencia de diferentes isómeros en el estado basal. Los isómeros son producidos por el giro en los enlaces sencillos presentes en las cadenas polimetínicas. La variedad estructural en el estado basal lleva tener poblaciones de moléculas con longitudes de onda de absorción diferentes.

**Tabla 5.2.** Valores para los ajustes de las funciones de decaimiento de la señal de fluorescencia de hCy-NO<sub>2</sub> con TCSPC.

$\lambda_{\text{exc}}$	%A <sub>1</sub>	$\tau_1$ [ns]	%A <sub>2</sub>	$\tau_2$ [ns]
405 nm	91.0	$\leq 0.07$	9.0	$2.16 \pm 0.01$
485 nm	95.5	$0.16 \pm 0.04$	4.5	$2.45 \pm 0.01$

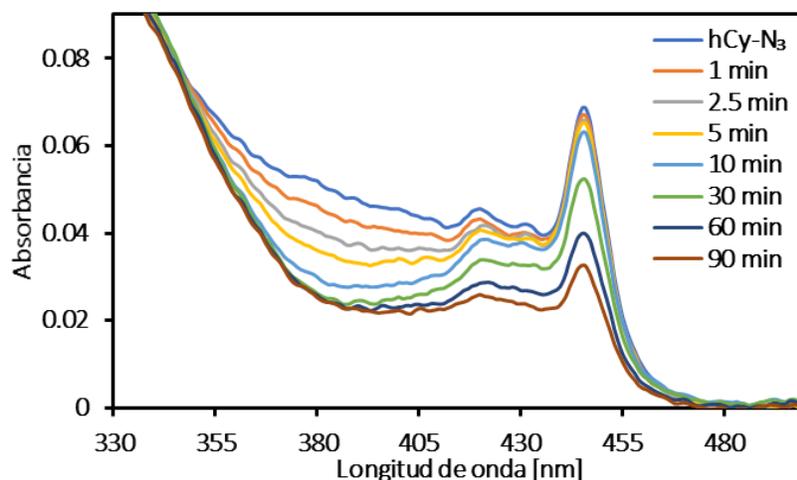
## 5.4 Transformación de hCy-N<sub>3</sub> fotoinducida

Una vez que las propiedades fotofísicas de las especies involucradas han sido caracterizadas, es importante demostrar que la molécula obtenida es capaz de transformarse al ser irradiada y además generar una especie fluorescente. Los estudios previos, tanto teóricos como experimentales, contribuyeron para establecer las condiciones necesarias para evaluar a la molécula hCy-N<sub>3</sub> como fluorógeno e identificar el producto fluorescente obtenido.

### 5.4.1 Transformación monofotónica

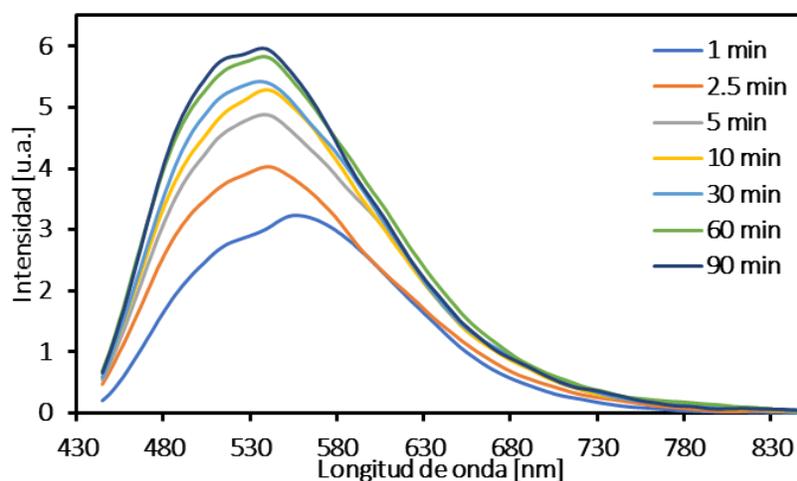
La demostración de la conversión de hCy-N<sub>3</sub> a una especie fluorescente fue demostrada empleando un láser continuo de 405 nm como fuente de irradiación y variando el tiempo de exposición a éste. La evolución de la transformación se muestra en los espectros de absorción y emisión de la Fig. 5.10 y Fig. 5.11, respectivamente.

En el espectro de absorción (Fig. 5.10) puede observarse la desaparición progresiva de la forma azida al disminuir la intensidad su la banda de absorción característica en función del tiempo de irradiación. La intensidad de la banda de absorción tiene una disminución importante en tiempos tempranos y más moderada al llegar a 60 o 90 min. Esto se puede deber a la generación de especies que también absorben la luz de 405 nm y funcionan como pantalla para hemicianina en forma de azida.



**Fig. 5.10.** Espectros de absorción para soluciones de hCy-N<sub>3</sub> en MeOH irradiadas a diferentes tiempos con un láser de 405 nm.

Un cambio igual de importante aparece en los espectros de fluorescencia obtenidos para cada tiempo de irradiación (ver Fig. 5.11). En este caso notamos la aparición de una banda con un máximo en 530 nm. Esta banda aumenta su intensidad al incrementar el tiempo de radiación. El comportamiento observado corresponde con la generación de una especie fluorescente, con lo que se prueba que la molécula hCy-N<sub>3</sub> es precursora de un fluoróforo. También se observa un cambio importante en los primeros minutos de irradiación de la solución de la forma azida que parece ser menos marcado en tiempos de irradiación mayores.



**Fig. 5.11.** Espectros de emisión para soluciones de hCy-N<sub>3</sub> en MeOH irradiadas a diferentes tiempos con un láser de 405 nm. La  $\lambda_{exc} = 430$  nm.

Los cambios observados para ambos espectros de absorción y emisión manifiestan una relación entre la cantidad de hemicianina en forma de azida que desaparece con la irradiación y la de la especie fluorescente generada. Este resultado indica que la especie fluorescente generada se obtiene a partir de la disociación del grupo azida de hCy-N<sub>3</sub> y la posterior reacción del nitreno intermediario. Como fue mencionado, los cambios menos marcados en tiempos mayores para ambos casos pueden ser ocasionados por absorción de especies generadas con la ruptura del enlace azida e incluso de la misma especie fluorescente generada.

Una vez comprobada la capacidad de la azida para convertirse en una especie fluorescente al ser irradiada, se buscó evidencia experimental de la participación de estados electrónicos excitados superiores en la ruptura del enlace N-N<sub>2</sub>. Esto con el fin de corroborar los resultados de los estudios teóricos sobre la disociación de la hemicianina en forma de azida (ver sección 5.1). Para lograr esta verificación, se irradiaron soluciones de hCy-N<sub>3</sub> con luz de diferentes longitudes de onda, buscando acceder al primer estado excitado o a estados excitados superiores. En los experimentos se empleó el mismo flujo de fotones y probabilidades de absorción iguales. Para acceder al estado S<sub>1</sub> se irradió con una longitud de onda de 460 nm (ver sección 4.6.1) y para estados superiores 405 nm.

Los resultados de la irradiación a 460 nm y 3.2 μW en la Fig. 5.12(a) muestran que no hay un cambio significativo en los espectros de emisión de la muestra después ser irradiada por 60 min. Dichos resultados marcan la ausencia de transformación bajo estas condiciones de irradiación. Por el contrario, al irradiar soluciones de hemicianina en forma de azida con 405 nm y 3.6 μW (Fig. 5.12(b)) se observa un incremento en la intensidad de fluorescencia al aumentar el tiempo de exposición a la fuente de luz. Este resultado confirma que existe una energía de excitación mínima necesaria para inducir la transformación y que esta energía es superior a la que se requiere para llegar al estado S<sub>1</sub>. Siguiendo esta idea, la ruptura del grupo azida es iniciada en un estado electrónico que se encuentra energéticamente por arriba del primer singulete excitado.

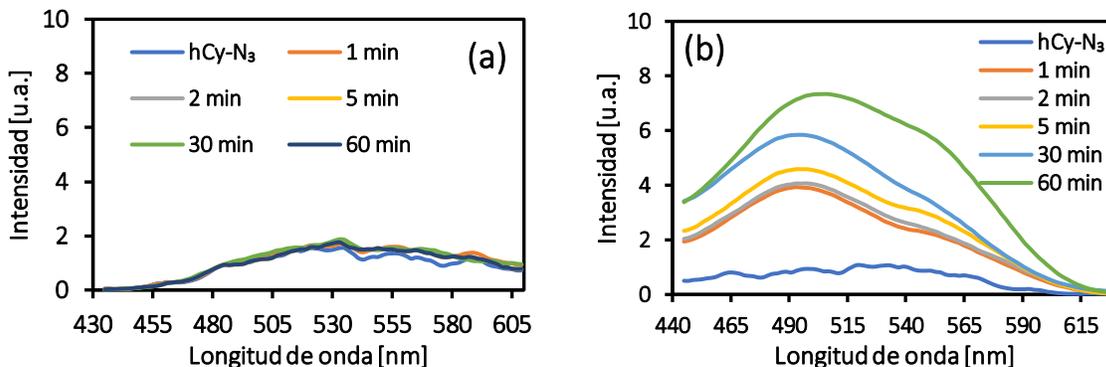


Fig. 5.12. Espectros de emisión para soluciones de hCy-N<sub>3</sub> en MeOH irradiadas a 460 nm (a) y a 405 nm (b) por diferentes tiempos. La  $\lambda_{exc} = 430$  nm.

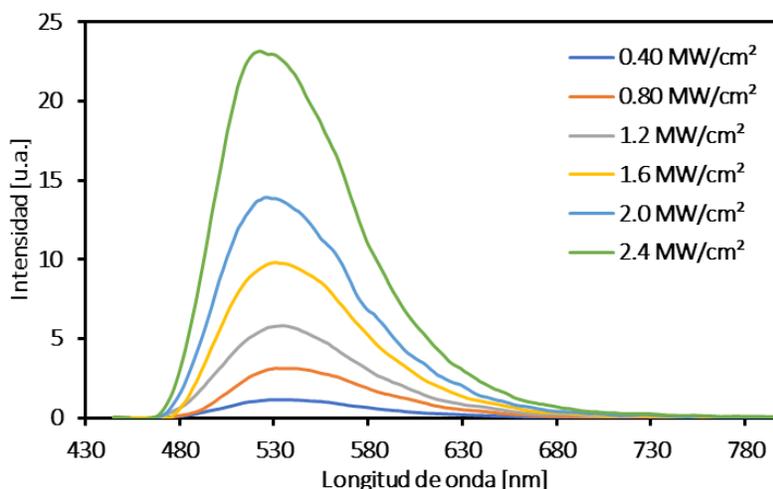
La irradiación de la muestra con fuentes de luz que promueven una excitación monofotónica demostró la capacidad de la molécula hCy-N<sub>3</sub> de ser empleada como fluorógeno. La cantidad de fluoróforo producido está directamente relacionada con la desaparición de la forma azida. La magnitud de la transformación inducida con estas fuentes de luz puede ser controlada mediante el tiempo de irradiación, a mayor tiempo, mayor transformación fotoinducida. Otro hallazgo importante mostrado en esta sección fue la dependencia de la transformación de hCy-N<sub>3</sub> en función de la longitud de onda de excitación. Con este último resultado se confirma que en esta molécula la disociación del grupo azida es promovida desde estados electrónicos excitados superiores.

#### 5.4.2 Transformación bifotónica

Los experimentos de la sección anterior demostraron que es posible inducir una transformación en la hemicianina en forma de azida al absorber un fotón con energía adecuada. Sin embargo, uno de los objetivos principales de este estudio es lograr inducir la transformación de hCy-N<sub>3</sub> por absorción bifotónica. En esta sección se analizan los resultados de la excitación no-lineal de la azida aromática.

Los espectros de emisión mostrados en la Fig. 5.13 fueron obtenidos después de irradiar soluciones de la hemicianina en forma de azida variando la potencia de un láser de 800 nm con pulsos de femtosegundos. Una vez más se observa la aparición e incremento de una banda de emisión, lo que comprueba que es posible inducir la transformación de hCy-N<sub>3</sub> empleando una fuente en el infrarrojo cercano. El espectro de la especie

emisiva presenta un máximo en 530 nm al igual que en los espectros de la especie obtenida por absorción monofotónica, la forma del espectro también tiene un máximo en 520 nm. Esta similitud entre los espectros plantea la obtención del mismo fotoproducto con ambas fuentes de luz. La principal diferencia es que esta vez los incrementos están relacionados con la intensidad (irradiancia) de la radiación empleada, a mayor intensidad empleada, mayor intensidad de fluorescencia obtenida.

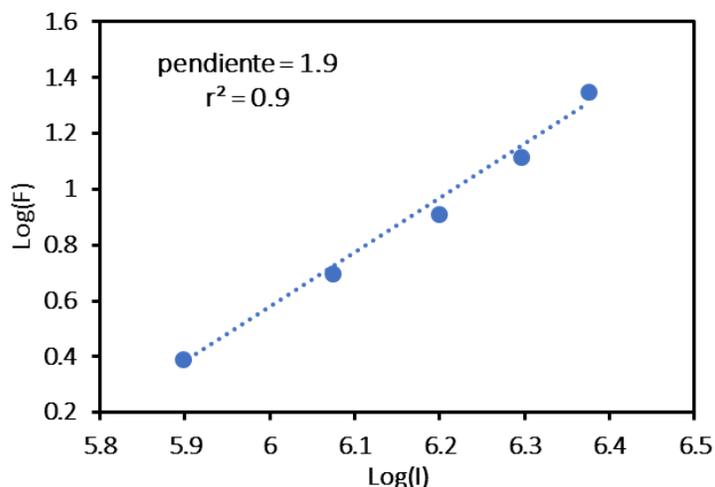


**Fig. 5.13.** Espectros de emisión de soluciones de hCy-N<sub>3</sub> irradiadas con un láser pulsado de 800 nm con diferentes intensidades. La  $\lambda_{exc} = 430$  nm.

La obtención de la especie fluorescente al emplear una fuente centrada en 800 nm implica un proceso de excitación no-lineal ya que la molécula no muestra bandas de absorción a longitudes mayores a 470 nm (ver Fig. 5.4). Además, se comprobó que la disociación se induce al llegar a estados excitados superiores. Esto implica necesariamente la absorción de más de un fotón para lograr proporcionar al sistema la energía necesaria para causar la fototransformación.

En capítulos anteriores se expuso la dependencia cuadrática del proceso de excitación bifotónica con la intensidad de la radiación empleada (ver sección 3.1.1.1).<sup>55</sup> Un análisis de la naturaleza del proceso de absorción inducido por el láser pulsado de 800 nm se presenta en la Fig. 5.14. En este gráfico se presenta el logaritmo de la intensidad integrada de la fluorescencia obtenida como función del logaritmo de la intensidad de irradiación empleada. La elección de la fluorescencia del fotoproducto como

respuesta se debe a la relación directa que se observó entre la desaparición de la especie azida y la generación del fluoróforo. Además, la fluorescencia es una técnica más sensible y selectiva que la absorción.



**Fig. 5.14.** Gráfico log-log que relaciona la cantidad de fotoproducto generado como función de la intensidad de la radiación empleada.

El gráfico log-log nos permite conocer el número de fotones involucrados en el proceso.<sup>61</sup> En la Fig. 5.14 se puede observar una relación directamente proporcional entre los logaritmos de los parámetros antes mencionados. La pendiente obtenida de la regresión lineal de los datos indica que se trata de un proceso que intervienen dos fotones.<sup>60,144</sup> Con esta información podemos asegurar que el proceso de disociación de hCy-N<sub>3</sub> se lleva a cabo por absorción bifotónica empleando una fuente de radiación pulsada de 800 nm.

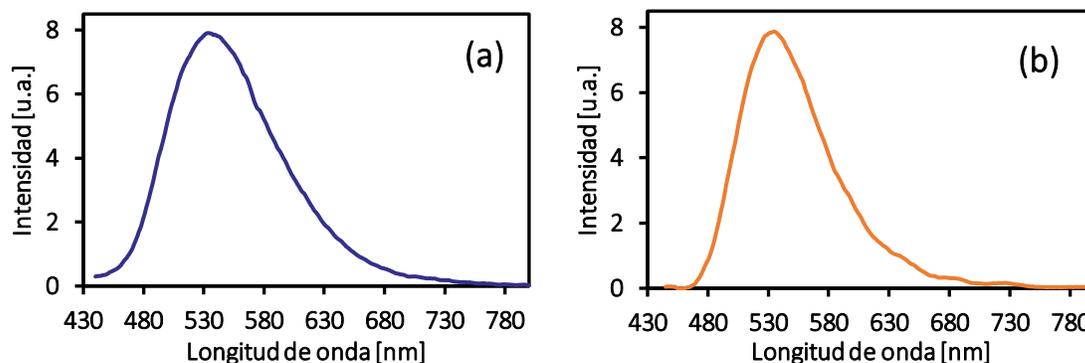
De esta manera, es posible afirmar que la molécula hCy-N<sub>3</sub> tiene una probabilidad considerable de absorber dos fotones de manera simultánea. Este proceso deriva en la ruptura del enlace N-N<sub>2</sub> y la posterior obtención de un producto fluorescente. El que la hemicianina en forma de azida aquí estudiada sea capaz de llevar a cabo una transformación inducida de bifotónicamente implica que es posible controlar con gran precisión espacial este cambio. Este nivel de control es originado por la dependencia cuadrática de la probabilidad de absorción bifotónica con la intensidad de la radiación antes mencionada.

## 5.5 Caracterización de los Fotoproductos

Como se pudo observar en la sección anterior, la hemicianina en forma de azida hCy-N<sub>3</sub> es susceptible de sufrir una disociación inducida por la absorción tanto de uno (405 nm) como de dos fotones (800 nm). Además, el nitreno generado en la disociación es capaz de reaccionar para generar una especie fluorescente. El siguiente paso es identificar este producto generado con el fin de conocer el tipo de molécula producida, sus propiedades químicas y entender el mecanismo por el cual la especie hCy-N: generó al fluoróforo. Conociendo estos datos es posible proponer modificaciones posteriores que mejoren ciertas propiedades del sistema.

De acuerdo con estudios anteriores, se conocen los posibles productos de la fotodisociación de azidas (sección 3.2.1).<sup>45</sup> A partir de esta información, una primera aproximación muy general es analizar el espectro de emisión de la especie obtenida y compáralo con las de posibles especies generadas. Los fotoproductos más probables en medios próticos y en presencia de oxígeno disuelto en el medio son las formas amina y nitro debido a abstracciones de átomos de hidrógeno del disolvente o a reacciones con el oxígeno molecular disuelto.

En el caso de la hemicianina en forma de azida de este estudio, se observó que independientemente del tipo de excitación (monofotónica o bifotónica), el producto fluorescente obtenido es el mismo. En la Fig. 5.15(a) se muestra el espectro de emisión de la especie fluorescente obtenida por la fotodisociación de hCy-N<sub>3</sub>. El espectro tiene su máximo en 530 nm para ambos casos y el ancho de la banda a la mitad del máximo varía entre 90–100 nm. De los espectros de emisión de hCy-NH<sub>2</sub> y hCy-NO<sub>2</sub> (ver Fig. 5.5), notamos que la emisión de la amina se encuentra en otra región del espectro comparada con el fotoproducto (680 nm), hay una diferencia de 150 nm respecto a la emisión del fotoproducto. Esto nos dice que la especie fluorescente generada mayoritariamente después de la irradiación no corresponde a hCy-NH<sub>2</sub>.



**Fig. 5.15.** Espectro de emisión del fotoproducto generado por la irradiación de hCy-N<sub>3</sub> (a) y espectro de emisión de hCy-NO<sub>2</sub> (b). La  $\lambda_{exc} = 430$  nm.

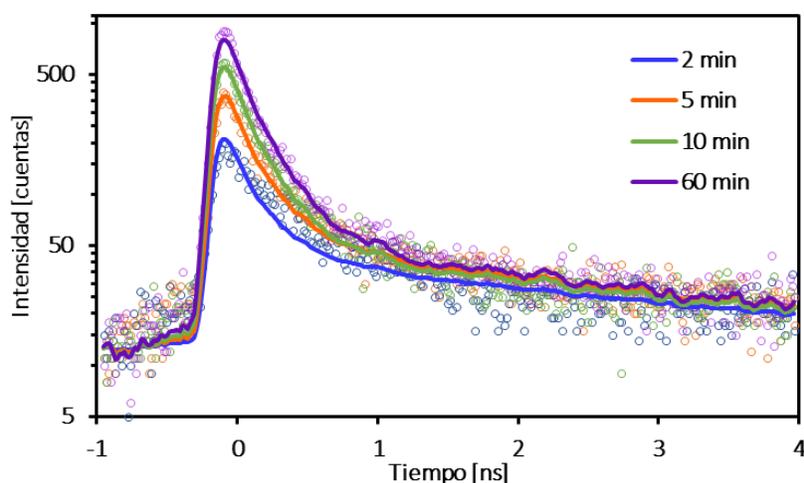
De manera contraria, al comparar el espectro de emisión de la especie fluorescente generada y el de la forma nitro (Fig. 5.15(b)), notamos una coincidencia en el máximo en la longitud de banda de emisión. Asimismo, la forma de ambas bandas muestra similitudes importantes. El ancho de la banda de emisión de hCy-NO<sub>2</sub> es de 83 nm, también cercano a la del fotoproducto.

Esta comparación nos da un punto de partida y ayuda a descartar a hCy-NH<sub>2</sub> como producto final de la fotodisociación. Sin embargo, esta información no es suficiente para asignar una identidad a la especie fluorescente encontrada. Es necesario realizar análisis más detallados que nos muestren propiedades particulares del producto fluorescente y así como la presencia o ausencia de otros productos que no presenten fluorescencia.

### 5.5.1 Tiempos de vida de fluorescencia

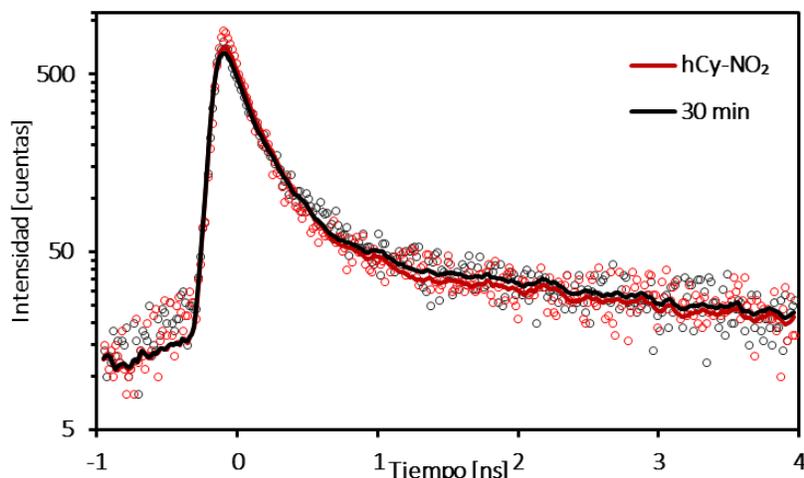
Después de los experimentos de irradiación y determinar los espectros de absorción y fluorescencia estáticos de las soluciones después de ser irradiadas, se buscó una forma de corroborar la identidad de la especie fluorescente. A partir de estos espectros se pudo descartar a la forma amina como producto principal de la reacción y se propone a la forma nitro como posible fotoproducto por la similitud en sus espectros de fluorescencia. Una manera de discernir entre dos especies que tienen espectros de fluorescencia similares es analizando sus tiempos de vida de fluorescencia, que tienen valores característicos para cada molécula a pesar de emitir en la misma región del espectro.

La Fig. 5.16 muestra los datos obtenidos por TCSPC para soluciones de hCy-N<sub>3</sub> irradiadas con un láser de 405 nm por diferentes intervalos de tiempo. Se aprecia que la intensidad de la señal crece al aumentar el tiempo de irradiación. Esto es congruente con los datos encontrados en los espectros de emisión estáticos. Un mayor número de cuentas registradas en el experimento para el mismo tiempo de integración es sinónimo de una mayor cantidad de moléculas emisivas. Otra característica común de esta medición con los experimentos estáticos es que este incremento en el número de cuentas es muy marcado en los primeros intervalos de irradiación, pero al llegar a 60 min, este aumento es menor en proporción. La explicación para este comportamiento es la misma que se expuso en la sección 5.2, después de cierto tiempo de irradiación a 405 nm, el o los fotoproductos generados también absorben parte de esa luz, disminuyendo el número de fotones disponibles para promover la transformación de hCy-N<sub>3</sub>.



**Fig. 5.16.** Decaimientos de fluorescencia de soluciones de hCy-N<sub>3</sub> irradiadas con un láser de 405 nm a diferentes tiempos. Los ajustes biexponenciales se muestran como líneas sólidas. La  $\lambda_{exc} = 485$  nm y la  $\lambda_{det} = 520$  nm.

Al comparar los datos del decaimiento de fluorescencia de una solución de hCy-N<sub>3</sub> irradiada por 30 min y un estándar de hCy-NO<sub>2</sub> (Fig. 5.17), puede observarse una gran similitud entre la forma de los ajustes de ambos conjuntos de datos (líneas sólidas). Además de poseer bandas de emisión similares, los decaimientos de fluorescencia de ambas especies son prácticamente idénticos. Un análisis visual permite asignar un decaimiento del estado emisor también similar para ambas especies.



**Fig. 5.17.** Comparación entre los decaimientos de fluorescencia de una solución de hCy-N<sub>3</sub> irradiada con un láser de 405 nm por 30 min y un estándar de hCy-NO<sub>2</sub>. Los ajustes biexponenciales se muestran como líneas sólidas. La  $\lambda_{exc} = 485$  nm y la  $\lambda_{det} = 520$  nm.

Los datos de las figuras anteriores fueron ajustados a decaimientos biexponenciales que se muestran en la Tabla 5.3. Puede observarse que, al aumentar el tiempo de irradiación, los valores de los tiempos de decaimiento de las soluciones irradiadas se aproximan a los del estándar de hCy-NO<sub>2</sub> hasta coincidir en ambas componentes ( $\tau_1 \leq 0.07$  ns y  $\tau_2 = 2.40$  ns). Como se observó en las mediciones anteriores, el tiempo de vida  $\tau_1$  es demasiado breve y el valor está limitado por la función de respuesta del equipo. Este acercamiento gradual puede ser ocasionado por las bajas concentraciones de fotoproducto a tiempos tempranos, que, para el mismo tiempo de integración de la señal, se obtiene una menor señal y aumenta así la incertidumbre en el ajuste como se observa en la tabla.

**Tabla 5.3.** Valores para los ajustes de los tiempos de vida de fluorescencia de soluciones de hCy-N<sub>3</sub> irradiadas y hCy-NO<sub>2</sub> con TCSPC.

	<b>A<sub>1</sub> [kCnts]</b>	<b><math>\tau_1</math> [ns]</b>	<b>A<sub>2</sub> [kCnts]</b>	<b><math>\tau_2</math> [ns]</b>
5 min	$2.30 \pm 0.40$	$\leq 0.07$	$0.076 \pm 0.004$	$2.76 \pm 0.26$
10 min	$2.69 \pm 0.26$	$\leq 0.07$	$0.041 \pm 0.003$	$2.84 \pm 0.11$
30 min	$4.47 \pm 0.15$	$\leq 0.07$	$0.066 \pm 0.003$	$2.40 \pm 0.06$
60 min	$6.25 \pm 0.18$	$\leq 0.07$	$0.071 \pm 0.004$	$2.40 \pm 0.08$
hCy-NO <sub>2</sub>	$4.29 \pm 0.02$	$\leq 0.07$	$0.068 \pm 0.001$	$2.40 \pm 0.05$

Con el análisis de TCSPC es posible demostrar que la especie fluorescente obtenida de la fotodisociación de  $\text{hCy-N}_3$  es la especie nitro,  $\text{hCy-NO}_2$ . Como fue mencionado, este producto puede ser generado a partir de reacciones del nitreno con oxígeno disuelto en el medio. Estudios de azidas precursoras de compuestos donador-aceptor muestran que en medios próticos como agua o metanol, la generación de la especie nitro puede estar favorecida.<sup>42,51</sup> En este caso, las particularidades de la forma nitro como su alto rendimiento de fluorescencia permitieron identificarla de manera relativamente sencilla. El que esta especie sea el fluoróforo que se produce en mayor medida invita a realizar estudios de la fototransformación en ausencia de  $\text{O}_2$  disuelto en la solución para tratar de controlar los productos finales de la fotodisociación de la hemicianina en forma de azida.

### 5.5.2 Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas

Finalmente, una vez comprobado que el único producto que presenta fluorescencia en el intervalo del visible obtenido de la fotodisociación de la molécula  $\text{hCy-N}_3$  es la especie nitrada, se buscaron y caracterizaron otros posibles productos. La técnica empleada para realizar esta caracterización fue cromatografía de líquidos acoplada a un espectrómetro de masas (HPLC-MS). La técnica permite separar diversos componentes de la mezcla de reacción e identificar cada uno de ellos de acuerdo con su patrón de fragmentación característico.

Con la finalidad de además analizar la influencia de la presencia de  $\text{O}_2$  en el medio y su relación con la producción de la especie nitro y la especie amina, se analizaron dos conjuntos de soluciones de  $\text{hCy-N}_3$  irradiadas con un láser continuo de 405 nm por diferentes tiempos 30-3600 s. Unas de ellas en las mismas condiciones que en los experimentos anteriores y el otro conjunto fue burbujeado con argón por 10 min para desplazar el oxígeno disuelto. Para cada una de las mezclas de reacción se obtuvo un cromatograma como el mostrado en el Apéndice 3. En cada uno de estos cromatogramas se identificaron los picos importantes, seleccionados de acuerdo con la cantidad presente en la mezcla de reacción. Estas fracciones fueron posteriormente analizadas por espectrometría de masas para relacionar cada uno de estos picos con un posible producto de la disociación de la azida  $\text{hCy-N}_3$ .

La identificación de las especies hCy-N<sub>3</sub>, hCy-NO<sub>2</sub> y hCy-NH<sub>2</sub> se realizó al comparar con un estándar de las moléculas en concentraciones similares. Se observó la correspondencia en el tiempo de retención y el patrón de fragmentación obtenido para cada fracción. Las otras especies encontradas en la mezcla de reacción fueron identificadas empleando la masa encontrada para los iones moleculares de las especies además de encontrar patrones de fragmentación que corresponden a la pérdida de segmentos de estas moléculas.

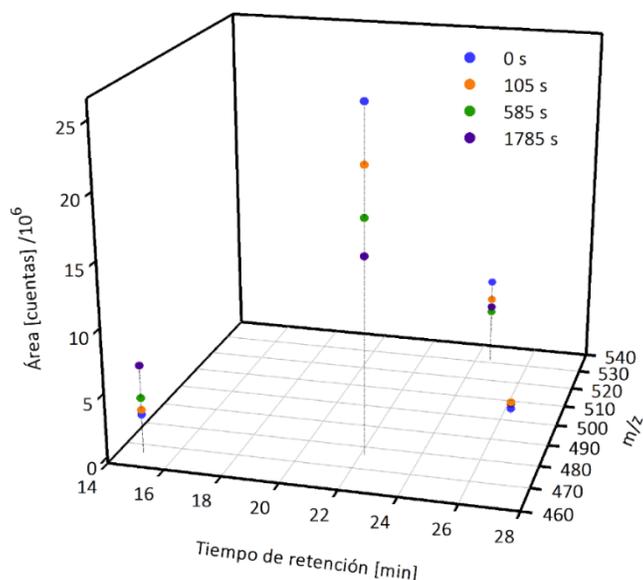
Las especies relevantes con sus respectivos tiempos de retención y relaciones masa/carga de sus iones representativos se muestran en la Tabla 5.4. El pico correspondiente a la molécula hCy-N<sub>3</sub> aparece con un tiempo de retención de 22.1 min con m/z 477 (ion molecular), hCy-NO<sub>2</sub> tiene un  $t_{\text{ret}} = 26.2$  min y se identifica con el ion molecular unido a un ion Na<sup>+</sup> (m/z 503). El pico con tiempo de retención de 14.9 min fue identificado como la especie oxima (hCy-NH-OH) con m/z 466 que corresponde al ion molecular. La especie que aparece a 24.6 min fue asignada como la forma O-metil oxima (hCy-NH-OMe) el valor de m/z 531 está relacionado con el ion molecular unido a un ion K<sup>+</sup>. Este tipo de productos de inserción con el disolvente han sido observados en fotodisociaciones de azidas aromáticas. La forma amina tiene un pico con un tiempo de retención de 19.6 min y tiene una m/z 473 que corresponde a la molécula unida a un ion de Na<sup>+</sup>. Esta especie sólo se produce en cantidades detectables en las soluciones burbujeadas con Ar. Los espectros de masas de cada una de estas especies están contenidos en el Apéndice 3. Existe un pico con tiempo de retención de aproximadamente 32 min, asignado a fragmentos de hCy-N<sub>3</sub> productos de reacciones fotoquímicas, así como de su paso por la columna cromatográfica.

**Tabla 5.4.** Tiempo de retención ( $t_{\text{ret}}$ ) y relación carga-masa (m/z) de las principales especies encontradas en soluciones de hCy-N<sub>3</sub> irradiadas.

	$t_{\text{ret}}$ [min]	m/z
hCy-NH-OH	14.9	466
hCy-NH <sub>2</sub>	19.5	473
hCy-N <sub>3</sub>	22.1	477
hCy-NH-OMe	24.6	531
hCy-NO <sub>2</sub>	26.2	503

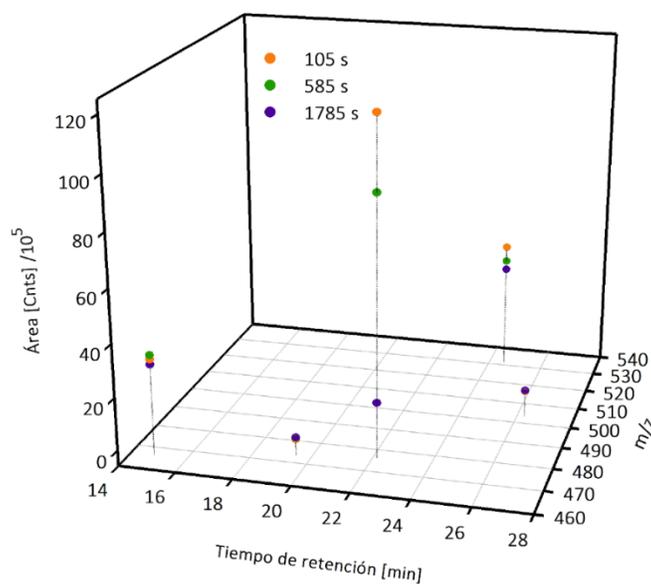
Una vez identificados todos los picos cromatográficos importantes es posible seguir la evolución de la transformación de la hemicianina en forma de azida en función del tiempo de irradiación. Para las soluciones en presencia y ausencia de Ar se analizaron las áreas relativas de los iones antes mencionados para cada tiempo de irradiación. Cabe destacar que estas áreas representan un análisis cualitativo del comportamiento de las diferentes especies. La magnitud de las señales está relacionada con la eficiencia en la detección de cada analito por el equipo.

En la Fig. 5.18 se muestran los resultados de los experimentos sin tratamiento con Ar. Puede notarse una importante disminución en el área del pico de hCy-N<sub>3</sub> en 22.1 min en función del tiempo de irradiación. Por otra parte, la especie oxima (t<sub>ret</sub> = 14.6 min) aparece y tiene un incremento considerable en su área al aumentar el tiempo de irradiación. El pico de la forma hCy-NO<sub>2</sub> con un tiempo de retención de 26.2 min muestra una aparición muy rápida seguida de un aumento en el área al incrementar el tiempo de irradiación. La señal de la especie O-metil oxima (t<sub>ret</sub> = 24.6 min) está presente incluso en la solución sin irradiar y disminuye con la exposición a la luz. Esto sugiere que la especie no es generada como producto final de la fotodisociación, si no que se genera durante su paso por la columna debido a las condiciones de presión a las que es expuesta.



**Fig. 5.18.** Cambio en las áreas de los picos cromatográficos relevantes para soluciones de hCy-N<sub>3</sub> irradiadas a diferentes tiempos. hCy-NH-OH (t<sub>ret</sub> = 14.9 min, m/z 466), hCy-N<sub>3</sub> (t<sub>ret</sub> = 22.1 min, m/z 476), hCy-NH-OMe (t<sub>ret</sub> = 24.6 min, m/z 531), hCy-NO<sub>2</sub> (t<sub>ret</sub> = 26.2 min, m/z 503).

En el caso de las soluciones burbujeadas con Ar, la Fig. 5.19 también muestra la evolución del proceso y el cambio en las cantidades relativas de las especies encontradas. Las tendencias generales son las mismas que las encontradas para las soluciones no tratadas, el pico de la forma azida ( $t_{\text{ret}} = 22.1$  min) disminuye constantemente con el tiempo de irradiación. El comportamiento de las formas hCy-NH-OH ( $t_{\text{ret}} = 14.6$  min) y hCy-NH-OMe ( $t_{\text{ret}} = 24.6$  min) también es similar al mostrado para la anterior serie de experimentos, la cantidad de oxima producida aumenta en función del tiempo de irradiación y la forma O-metil oxima desaparece gradualmente al irradiar las soluciones. Al tener el mismo comportamiento que en el caso anterior, el origen de las formas hCy-NH-OH y hCy-NH-OMe también puede ser explicado con reacciones de inserción del nitreno con el disolvente después de la irradiación o en la columna cromatográfica. La especie nitro también aparece con un pico a tiempo de retención característico para este sistema de 26.2 min cuya área aumenta ligeramente con el tiempo de irradiación. La principal diferencia en este grupo de soluciones es la aparición de un pico a un tiempo de retención de 19.5 min que fue identificado como la especie amina. La intensidad de este pico sólo es detectable después de más de 20 min de irradiación.



**Fig. 5.19.** Cambio en las áreas de los picos cromatográficos relevantes para soluciones de hCy-N<sub>3</sub> burbujeadas con Ar e irradiadas a diferentes tiempos. hCy-NH-OH ( $t_{\text{ret}} = 14.9$  min, m/z 466), hCy-NH<sub>2</sub> ( $t_{\text{ret}} = 19.5$  min, m/z 473), hCy-N<sub>3</sub> ( $t_{\text{ret}} = 22.1$  min, m/z 476), hCy-NH-OMe ( $t_{\text{ret}} = 24.6$  min, m/z 531), hCy-NO<sub>2</sub> ( $t_{\text{ret}} = 26.2$  min, m/z 503).

Los resultados obtenidos mediante la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas revelan una dinámica más compleja para la disociación fotoinducida de la azida hCy-N<sub>3</sub> y las posteriores reacciones del nitreno generado. Se corroboró la presencia de la forma nitro entre los productos de la mezcla de reacción. Esta información, aunada a los análisis anteriores indican que hCy-NO<sub>2</sub> es la especie altamente fluorescente obtenida de la transformación del fluorógeno hCy-N<sub>3</sub>. La otra especie generada significativamente a partir de reacciones con nitreno es la oxima correspondiente (hCy-NH-OH). Sin embargo, este tipo de moléculas no presentan una absorción o fluorescencia significativas en la región del visible.<sup>145</sup> Se confirmó también que es posible la obtención de la especie hCy-NH<sub>2</sub> bajo ciertas condiciones que desfavorezcan la formación de hCy-NO<sub>2</sub>. Este estudio también mostró que es posible modificar el tipo de fotoproductos obtenidos y su distribución al cambiar las condiciones del medio en las que se lleva a cabo la irradiación. Esto muestra la versatilidad de la molécula y da herramientas para su uso también como una especie de sensor.

### 5.5.3 Rendimiento de la producción del fluoróforo

Una vez que hCy-NO<sub>2</sub> fue identificado como el fluoróforo obtenido, se puede determinar el rendimiento en su producción por la transformación fotoinducida de hCy-N<sub>3</sub>. Para lograr este objetivo se realizó una curva de calibración con espectrometría de fluorescencia con un estándar del compuesto nitrado. La fluorescencia fue elegida para cuantificar a la especie debido su sensibilidad y al elevando rendimiento de fluorescencia de la forma nitro que evita interferencias importantes de otras especies presentes en la solución posterior a la irradiación

Posteriormente, se irradiaron soluciones de hCy-N<sub>3</sub> 10<sup>-5</sup> M con un láser continuo de 405 nm por diferentes tiempos y se midieron las intensidades de fluorescencia. El número de fotones absorbidos fue aproximado midiendo la potencia de láser antes y después de la celda con la solución y considerando su longitud de onda.

La cantidad de hCy-NO<sub>2</sub> producida y los fotones absorbidos en cada evento se presentan en la Tabla 5.5. La cantidad de especie nitro incrementa con la cantidad de

fotones absorbidos. A partir de estos datos es posible estimar la proporción de moléculas que se transforman en la forma nitro después de que las moléculas de hCy-N<sub>3</sub> absorben luz.

**Tabla 5.5.** Concentración de hCyNO<sub>2</sub> producido por diferentes tiempos de irradiación.

<b>Tiempo de irradiación [min]</b>	<b>[hCy-NO<sub>2</sub>] [M] / 10<sup>-7</sup></b>	<b>hCy-NO<sub>2</sub> [mol] / 10<sup>-10</sup></b>	<b>Fotones absorbidos [mol] / 10<sup>-6</sup></b>
1	2.0	4.1	0.9
2	2.9	5.9	1.8
10	3.2	6.4	8.9
30	3.4	7.4	26.8

El rendimiento encontrado para este proceso fue de  $\Phi_{\text{Nitro}} = 1 \times 10^{-4}$ . Este valor indica que la cantidad de moléculas fluorescentes generadas por evento de excitación es pequeña. Una explicación para el rendimiento de la obtención de la especie nitro está en el proceso mismo de disociación. Como se explicó antes en este capítulo, el estado electrónico excitado que promueve la disociación es el S<sub>2</sub> (ver sección 5.1). Los estados electrónicos excitados superiores suelen desactivarse por procesos de conversión interna ultrarrápidos (10<sup>-14</sup>–10<sup>-12</sup> s) hasta llegar al estado S<sub>1</sub>.<sup>1,89,91</sup> La posibilidad de que una vez en el estado S<sub>2</sub> hCy-N<sub>3</sub> siga el camino disociativo entra en competencia con la desactivación no radiativa hacia el S<sub>1</sub>. Otro factor que influye es la reactividad del nitrógeno generado con la ruptura del enlace N-N<sub>2</sub>. Esta especie es muy reactiva y poco selectiva, dando origen a diferentes productos como los determinados en la sección anterior por HPLC-MS. No obstante, la magnitud de este rendimiento resulta útil en esquemas que buscan inducir la transformación solamente en unas pocas moléculas a la vez como el caso de la microscopía de súper-resolución, una de las potenciales aplicaciones para las que fue diseñado el sistema.

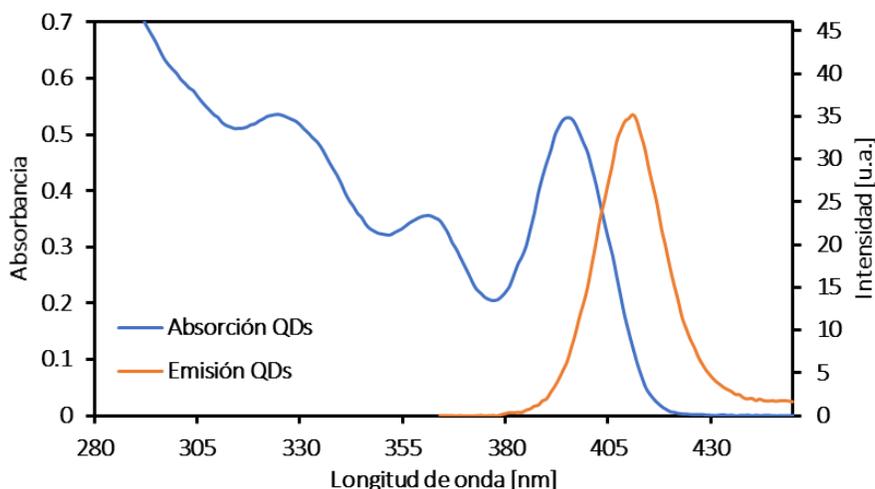
## 5.6 Fototransformación del sistema Punto cuántico-Azida

Con los experimentos y análisis anteriores se ha obtenido información acerca de las propiedades de hCy-N<sub>3</sub> como fluorógeno activado bifotónicamente y de los productos generados por su fotodisociación. Esos resultados sirven como base para cumplir un objetivo importante de este trabajo, la síntesis y formación de un sistema que involucra a una molécula orgánica y un punto cuántico (QD) como antena bifotónica. La elección adecuada del punto cuántico depende de ciertos parámetros dados por la hemicianina en forma de azida. Propiedades como la energía necesaria para inducir la transformación, la afinidad para permanecer unida al nanocrystal y la solubilidad de la molécula definen el tipo de punto cuántico empleado.

La condición más importante (según el mecanismo de Förster) que cumplir para tener una antena que transfiera energía de manera eficiente es que la energía de la emisión de esta especie donadora coincida con la energía de absorción que promueve la transformación de hCy-N<sub>3</sub>. Como ha sido comprobado anteriormente, esta energía corresponde a estados electrónicos excitados superiores de la azida. Tomando como base la longitud de onda de la fuente que ha ocasionado la disociación del enlace N-N<sub>2</sub>, se eligieron puntos cuánticos con bandas de emisión cercanas a 400 nm.

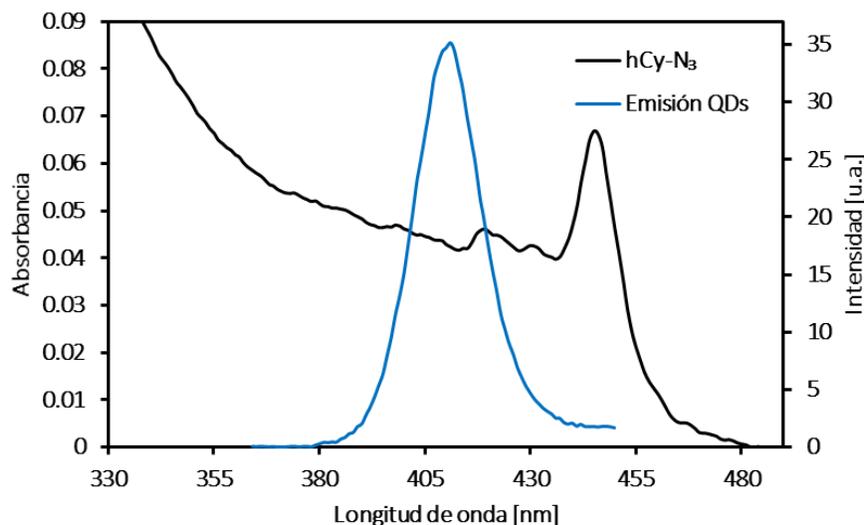
### 5.6.1 Formación del complejo punto cuántico/fluorógeno

De entre la gran cantidad de opciones de QD con las propiedades emisivas mencionadas anteriormente, se eligieron los formados por sulfuro de cadmio (CdS) con un diámetro de 2.5 nm. Otra razón de la elección de este tipo de nanocristales es que poseen coeficientes de absorción bifotónica considerables ( $1 \times 10^4$  GM).<sup>71,107</sup> Los espectros de absorción y emisión de estos QDs aparecen en la Fig. 5.20. La forma del espectro de absorción es característica de puntos cuánticos, presenta una banda de absorción para la primera transición en 396 nm. La estructura del espectro está asociada a transiciones electrónicas a diferentes estados electrónicos. La banda de emisión presenta la estrechez que caracteriza a los QDs con un máximo aparece en 410 nm.



**Fig. 5.20.** Espectros de absorción y emisión de puntos cuánticos de CdS empleados en este estudio. La  $\lambda_{exc} = 360$  nm.

Una comparación entre el espectro de emisión de los QDs de CdS y la de absorción de la azida hCy-N<sub>3</sub> aparece en la Fig. 5.21. El traslape entre de ambos espectros es completo en la región donde se encuentran los estados electrónicos superiores del fluorógeno. Esto, garantiza una buena transferencia de energía al fluorógeno considerando este parámetro.



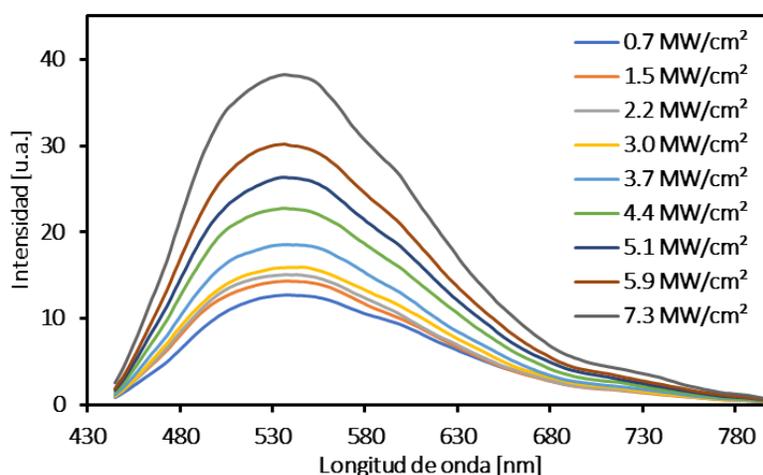
**Fig. 5.21.** Comparación de los espectros de absorción de hCy-N<sub>3</sub> y emisión de los puntos cuánticos de CdS (QDs).

A partir de e los espectros anteriores podemos concluir que el punto cuántico cuenta con bandas de absorción a las que puede accederse mediante absorción bifotónica con una fuente de 800 nm. En cuanto a su espectro de emisión, desde el punto de

vista energético, el QD se sitúa en una condición apta para transferir energía eficientemente a la hCy-N<sub>3</sub>. Empero, otros parámetros deben ser considerados en el proceso, uno de los más importantes es la distancia entre los momentos dipolares de transición de ambas especies. El diseño del fluorógeno también indica que esta condición se cumplirá para las moléculas unidas a la superficie del punto cuántico mediante el grupo sulfonato que pende del átomo de nitrógeno del anillo de naftotiazol (Fig. 4.1).

### 5.6.2 Transformación bifotónica con transferencia de energía

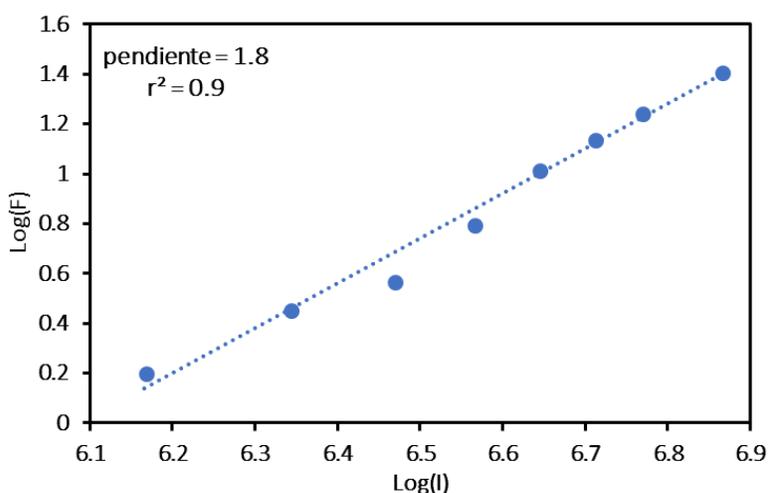
Una vez formados los complejos de hCy-N<sub>3</sub> con los puntos cuánticos de CdS se evaluó la capacidad de éstos de inducir la disociación del enlace azida al ser irradiados con un láser de 800 nm pulsado en femtosegundos. El uso de dicha fuente de luz implica que el proceso tiene lugar por la absorción simultánea de dos fotones. Una vez más, la respuesta empleada para evaluar la reacción fue la fluorescencia de la especie producida. El aumento en la intensidad de los espectros de emisión obtenidos de la irradiación del sistema hCy-N<sub>3</sub>/QD-CdS se muestra en la Fig. 5.22. Para estas condiciones de irradiación existe una relación entre la intensidad de radiación y la especie fluorescente producida. El espectro de fluorescencia observado presenta un máximo en 530 nm al igual que en los experimentos con la molécula hCy-N<sub>3</sub> aislada. La forma de la banda también es similar a la encontrada en la producción de la forma nitro (Fig. 5.13). Posee un máximo cerca de 530 nm. A partir de esta información se puede inferir que en este caso la especie fluorescente obtenida también es la especie nitrada.



**Fig. 5.22.** Espectros de emisión de soluciones de hCy-N<sub>3</sub>/QDs irradiadas con un láser pulsado de 800 nm a diferentes intensidades. La  $\lambda_{exc} = 430$  nm.

El espectro del fluoróforo hCy-NO<sub>2</sub> en la solución con el composito tiene una banda ligeramente más ancha (FWHM 150 nm, contra 110 nm de hCy-NO<sub>2</sub>) que en los experimentos con la azida aislada. Este cambio puede ser ocasionado por la interacción con el punto cuántico y las especies en su periferia. La energía del estado con transferencia de carga generado con la excitación de la forma nitro es sensible a diferencias en el medio.<sup>139,140</sup> Cada molécula estabilizará su estado excitado en mayor o menor medida de acuerdo con sus interacciones con el disolvente, la superficie del punto cuántico y los surfactantes unidos a él. Esta inhomogeneidad energética redundará en emisiones con un mayor intervalo de longitudes de onda.

En este caso, al igual que con la azida aislada, es necesario corroborar que en el proceso de disociación están involucrados dos fotones. El gráfico log-log (Fig. 5.23) muestra una dependencia entre la producción de fluoróforo y la intensidad de la radiación. En este caso, la pendiente obtenida también indica que se trata de un proceso de excitación bifotónica. El valor de la pendiente ligeramente menor a 2 puede deberse a que los puntos cuánticos también presentan varios canales de desactivación del estado excitado además de la transferencia de energía. Estos canales tanto radiativos como no radiativos se encuentran en competencia cinética. Como fue mencionado anteriormente, la eficiencia cada uno de estos canales depende de la constante de rapidez asociada a ellos.



**Fig. 5.23.** Gráfico log-log que relaciona la cantidad de fotoproducto generado como función de la intensidad de la radiación empleada en el sistema hCy-N<sub>3</sub>/QD.

También es importante considerar que el sistema hCy-N<sub>3</sub>/QD-CdS se encuentra en equilibrio dinámico. Si bien hay una tendencia del complejo a permanecer enlazado, en el medio existen QDs sin azida unida y también aparecerán algunos con varias moléculas hCy-N<sub>3</sub> adsorbidas. Una vez más, la distribución de diferentes condiciones para el mismo sistema ocasiona estas variaciones.

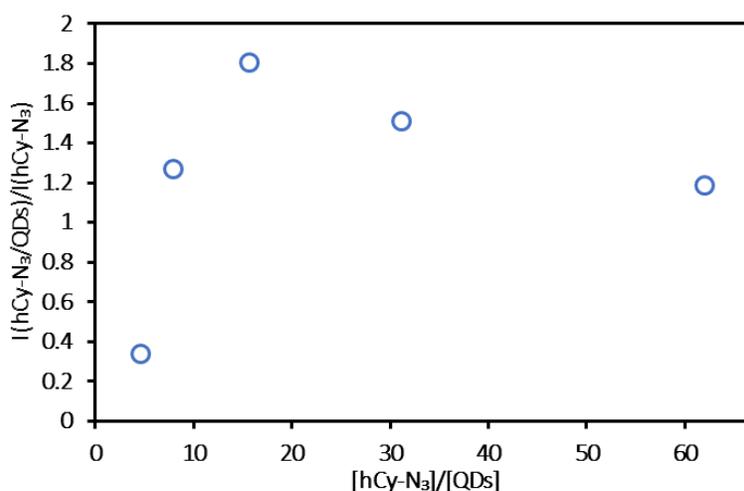
### 5.6.3 Influencia de la concentración de puntos cuánticos

Siguiendo con el planteamiento mencionado en la sección anterior, el complejo formado por la hemicianina en forma de azida y los puntos cuánticos está en un equilibrio de asociación dinámico debido a que la unión entre ambas especies es mediante atracciones electrostáticas.<sup>64,75,146</sup> A pesar de que la fuerza de atracción es grande, el sistema puede formarse y disociarse constantemente. Además, el QD es capaz de asociarse con más de una hemicianina a la vez, debido al número de sitios con átomos de Cd expuestos. Este equilibrio de asociación entre un QD y varias moléculas de hCy-N<sub>3</sub> está regulado por la concentración relativa de ambas especies.

La influencia de las asociaciones entre las especies influye directamente en el proceso de transferencia de energía desde el punto cuántico a la azida. Además del traslape entre los espectros de emisión del QD y la energía de los estados superiores de hCy-N<sub>3</sub>, otro factor con un gran impacto en la eficiencia de la transferencia de energía es la distancia entre los momentos dipolares de transición de las moléculas involucradas. De esta manera, la transferencia de energía se dará con una eficiencia mayor en los fluorógenos unidos directamente al punto cuántico.

Tomando en cuenta esta variable en el sistema, se evaluó la influencia de la concentración de QDs de CdS en el rendimiento de producción de hCy-NO<sub>2</sub>. En este conjunto de experimentos se irradiaron soluciones con la misma cantidad de hCyN<sub>3</sub> con diferentes concentraciones de QD-CdS con un láser pulsado centrado en 790 nm y se midió su respectivo aumento en la intensidad de fluorescencia. Se analizó la relación entre la concentración de azidas respecto a la de puntos cuánticos y el aumento en la intensidad de fluorescencia respecto a un blanco con la molécula en ausencia de QDs.

En la Fig. 5.24 se muestran estas relaciones entre las concentraciones de ambas especies y la cantidad relativa de fluoróforo producido. Para concentraciones bajas de QDs (60:1 hCy-N<sub>3</sub>/QD) existe un ligero aumento en la intensidad de fluorescencia de hCy-NO<sub>2</sub>, entre 1.1 y 1.4 veces comparado con la azida aislada. Al seguir incrementando la concentración de puntos cuánticos se alcanza un máximo cuando existen aproximadamente 15 hemicianinas por cada punto cuántico, en este punto el rendimiento en la producción de fluoróforo es 1.8 veces mayor que cuando se tiene la molécula aislada. Por último, al alcanzar un régimen de concentraciones altas de QDs la producción del fluorógeno se abate drásticamente. En regímenes con menos de 5 moléculas de hCy-N<sub>3</sub> por QD hay incluso una menor producción de forma nitro que con la azida aislada.



**Fig. 5.24.** Relación entre la intensidad de fluorescencia de hCy-NO<sub>2</sub> producido por la irradiación (800 nm) del compuesto hCy-N<sub>3</sub>/QDs y la azida aislada en función de la relación entre las concentraciones de hemicianina en forma de azida y puntos cuánticos. La  $\lambda_{exc} = 480$  nm y  $\lambda_{det} = 520$  nm.

Como era esperado, el incremento gradual en la concentración de puntos cuánticos causa una mayor producción de fluorógeno por transferencia de energía debido a las mejores capacidades de absorción bifotónica de los QDs, que hacen que los eventos de excitación no-lineal sean más probables. El que un número muy grande de puntos cuánticos redunde en un decremento en la obtención del fluoróforo puede tener varias causas, una de ellas es que en estas condiciones es más probable que existan puntos cuánticos sin alguna hemicianina adsorbida a la cual ceder su energía, desactivándose por otros canales y ejerciendo un efecto de apantallamiento sobre otros nanocristales.

La evaluación de los sistemas punto cuántico/azida demostró la capacidad del QD como antena bifotónica incrementando la cantidad de fluoróforo generado en comparación con la molécula. También se encontró que en estas condiciones la especie fluorescente obtenida también se trata de la forma nitro, esto indica que ni la fotoquímica ni la reactividad del nitreno se ven modificadas por la presencia del punto cuántico. Por último, se descubrió la importancia de la proporción entre hemicianinas y puntos cuánticos en la producción de hCy-NO<sub>2</sub>.

A lo largo de este capítulo se han analizado las propiedades fotoquímicas y foto-físicas de la hemicianina en forma de azida que fue diseñada en este estudio y del composito formado por esta molécula y puntos cuánticos de sulfuro de cadmio. Con los resultados mostrados aquí se comprobó la capacidad de la molécula hCy-N<sub>3</sub> como fluorógeno y se caracterizaron los productos obtenidos después de la fotodisociación del grupo azida. Estas especies son obtenidas de las reacciones entre el nitreno generado con disolvente o con O<sub>2</sub> disuelto en el medio. Para esta molécula, las reacciones con el nitreno resultan en las formas oxima, nitro y, en pequeñas proporciones, amina. De entre estas modificaciones del grupo azida, la forma nitro es la especie fluorescente que se produce en mayor proporción. El elevado rendimiento de fluorescencia de hCy-NO<sub>2</sub> se explicó mediante estudios computacionales por el bloqueo del canal de desactivación del cruce entre sistemas. Este producto fue obtenido en las diferentes condiciones de irradiación de la molécula aislada y del composito. Los QDs demostraron su función como antenas bifotónicas aumentando la producción del fluoróforo hasta en un 80%. Este estudio abre una posibilidad para diseñar sistemas híbridos molécula-punto cuántico con mejores capacidades para llevar a cabo absorción bifotónica.

## 6. Conclusiones

---

En este último capítulo se presentan las conclusiones a las que se llegaron en esta tesis enfocada al estudio de la evaluación de un sistema azida aromática/punto cuántico como fluorógeno.

Se obtuvo una molécula basada en un esqueleto de hemicianina con un grupo azida (hCy-N<sub>3</sub>) precursor de un compuesto “donador-aceptor” altamente fluorescente. El grupo -N<sub>3</sub> es el responsable de la transformación al disociarse después de la irradiación. El diseño del compuesto también permite su solubilidad en disolventes polares y la unión electrostática a puntos cuánticos (QDs) de CdS.

A partir de los experimentos de conversión monofotónica se encontró que la cantidad de fotoproducto generado puede controlarse con el tiempo o potencia de irradiación. Al aumentar el tiempo de exposición de hCy-N<sub>3</sub> a la radiación UV, se genera una mayor cantidad de la especie fluorescente. La tendencia es la misma al variar la potencia. El rendimiento de la producción del fluoróforo fue de  $1.4 \times 10^{-4}$ , ideal para activar unas pocas moléculas a la vez.

Se comprobó la capacidad de la molécula hemicianina en forma de azida de absorber dos fotones de manera simultánea para acceder a estados electrónicamente excitados. La irradiación de hCy-N<sub>3</sub> con un láser pulsado de 800 nm demostró la dependencia cuadrática de la cantidad de fluoróforo producido en función de la intensidad del láser. La absorción bifotónica presentada por la molécula permite explorar un esquema de fototransformación localizado con una precisión que puede llegar a decenas de nanómetros.

La irradiación de hCy-N<sub>3</sub> a diferentes longitudes de onda (460 nm y 405 nm) demostró la necesidad de acceder a estados excitados superiores para llevar a cabo la disociación del enlace -N-N<sub>2</sub> del grupo azida.

Los estudios computacionales corroboraron al S<sub>2</sub> como estado disociativo de acuerdo con la redistribución de la densidad electrónica ocasionada por la transición

electrónica. Las curvas de energía potencial calculadas también muestran un favorecimiento energético en  $S_2$  con la liberación de  $N_2$ .

La participación de estados superiores en la ruptura del enlace explica el valor del rendimiento de producción de la especie nitro. Además, la condición de llegar a este estado para que la transformación se lleve a cabo brinda una mayor fotoestabilidad a la molécula y permite un manejo más simple de esta.

Con ayuda de los análisis de conteo de fotones individuales correlacionados en tiempo se pudo establecer que la especie fluorescente generada fue la forma nitro ( $hCy-NO_2$ ) debido a la coincidencia en la longitud de onda de emisión y los tiempos de vida de fluorescencia ( $\tau_1 \leq 70$  ps,  $\tau_2 = 2.4$  ns).

Con los resultados de la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas fue posible confirmar la formación de  $hCy-NO_2$  encontrando señales características del compuesto en soluciones de  $hCy-N_3$  irradiadas. Con esto se confirmó que mediante estas técnicas es posible identificar los fotoproductos de la disociación de la azida  $hCy-N_3$ .

Las condiciones del medio afectan la distribución de productos generados después de la irradiación con luz ultravioleta. Además de la forma nitro, otras especies son obtenidas por reacciones con el nitreno después de la ruptura del grupo azida como la forma oxima ( $hCy-NH-OH$ ). En ausencia de oxígeno disuelto en la solución irradiada, la presencia de estos productos aumenta, principalmente la de la especie oxima y la generación de la forma amina ( $hCy-NH_2$ ) en pequeñas proporciones. Estos resultados también dan un indicio de otra manera de controlar el resultado final de la fotodisociación a través de cambios en el entorno de la reacción.

La fluorescencia atípicamente alta de  $hCy-NO_2$  ( $\Phi_F = 0.7$ ) puede explicarse mediante la ausencia del canal de desactivación de cruce entre sistemas. Los estudios computacionales muestran la falta de un triplete aceptor ( $n \rightarrow \pi^*$ ) con energía cercana o ligeramente menor al estado emisor ( $S_1$ ).<sup>103,104,136,137</sup>

La naturaleza “donador-aceptor” del compuesto nitrado promueve la formación de un estado de transferencia de carga tras la excitación electrónica. El metanol, al ser un disolvente polar, logra la estabilización de este estado excitado, disminuyendo la energía del sistema y permitiéndole desactivarse por la emisión de un fotón.

La unión de moléculas de hemicianina en forma de azida a QDs de CdS provoca un aumento en la producción de la especie fluorescente posterior a la excitación bifotónica. La influencia de los puntos cuánticos se observó al comparar el resultado de irradiar soluciones de hCy-N<sub>3</sub> y del compuesto hCy-N<sub>3</sub>/QDs-CdS con un láser pulsado (150 fs, 800 nm).

A partir de estos experimentos se encontró que la relación óptima puntos cuánticos/azida para incrementar la producción de fluoróforo es alrededor de 1:12. Empleando esta proporción se logra un aumento casi dos veces en la obtención del compuesto nitro.

Este trabajo muestra una molécula orgánica pequeña que posee una alta capacidad para llevar a cabo una transformación inducida por excitación no-lineal. Dicho cambio puede ser mejorado al incorporar una antena con mejores capacidades como absorbedor bifotónico.

Las herramientas proporcionadas por el sistema aquí presentado pueden ayudar a superar limitaciones en el uso de fluorógenos como la posibilidad de transformar moléculas en diferentes planos de una muestra biológica, una matriz polimérica e incluso un cristal. El esquema propuesto en esta tesis sirve como modelo para el diseño de mejores fluorógenos formados por sistemas compuestos que puedan ser activados selectivamente tanto espectral como espacial y temporalmente.

El compuesto azida/punto cuántico representa un prototipo como fluorógeno activado bifotónicamente. El sistema hCy-N<sub>3</sub>/CdS-QD motivo de esta tesis puede ser potencialmente empleado como generador de marcadores fluorescentes ya sea en medios biológicos o en materiales como matrices poliméricas. El gran control en tres dimensiones del volumen donde la transformación ocurre, abre la posibilidad de reconstruir imágenes detalladas de estructuras subcelulares.

Además de las ventajas de la localizabilidad de la transformación, la excitación bifotónica brinda la posibilidad de emplear longitudes de onda diferentes para inducir la transformación y la posterior identificación de las moléculas fluorescentes generadas. En el caso de la azida aromática diseñada en este trabajo, ya que la ruptura del enlace sucede en el estado  $S_2$ , se puede emplear una fuente de luz menos energética (longitud de onda mayores a 460 nm) para observar la fluorescencia del compuesto nitro obtenido. Este esquema empleando dos fuentes de luz es usado en dispositivos de almacenamiento de información ópticos teniendo una longitud de onda de escritura y otra de lectura.

Si bien es cierto que el sistema avaluado en este trabajo es un prototipo de un modelo de excitación indirecta, proporciona los elementos constitutivos para la futura síntesis de nuevos compuestos que sigan este esquema. El modelo punto cuántico/azida puede ser implementado no sólo en la obtención de nuevos fluorógenos, sino en la activación de otro tipo de interruptores moleculares. La transferencia de energía desde el punto cuántico puede desencadenar otro tipo de procesos como isomerizaciones, formación de enlaces, entre otros procesos fotoquímicos. La versatilidad y entonación de las propiedades luminiscentes de los puntos cuánticos permite encontrar los adecuados para activar diferentes sistemas moleculares. Esto abre un campo aún mayor para el uso de puntos cuánticos como antenas bifotónicas eficientes.

# Referencias

---

1. Klessinger, M. & Michl, J. *Excited States and Photochemistry of Organic Molecules*. (Wiley-VCH).
2. Balzani, V., Ceroni, P. & Juris, A. *Photochemistry and Photophysics. Concepts, Research, Applications*. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014).
3. Minoshima, M. & Kikuchi, K. Photostable and photoswitching fluorescent dyes for super-resolution imaging. *J. Biol. Inorg. Chem.* **22**, 639–652 (2017).
4. Xue, Y. *et al.* Fluorescent pH-Sensing Probe Based on Biorefinery Wood Lignosulfonate and Its Application in Human Cancer Cell Bioimaging. *J. Agric. Food Chem.* **64**, 9592–9600 (2016).
5. Schoelch, S., Vapaavuori, J., Rollet, F.-G. & Barrett, C. J. The Orange Side of Disperse Red 1: Humidity-Driven Color Switching in Supramolecular Azo-Polymer Materials Based on Reversible Dye Aggregation. *Macromol. Rapid Commun.* **38**, (2017).
6. Guo, T. *et al.* A highly sensitive long-wavelength fluorescence probe for nitroreductase and hypoxia: selective detection and quantification. *Chem. Commun.* **49**, 10820–10822 (2013).
7. Patterson, G., Davidson, M., Manley, S. & Lippincott-Schwartz, J. Superresolution imaging using single-molecule localization. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **61**, 345–367 (2010).
8. Grimm, J. B., Heckman, L. M. & Lavis, L. D. The chemistry of small-molecule fluorogenic probes. *Prog Mol Biol Transl Sci* **113**, 1–34 (2013).
9. Raymo, F. M. Photoactivatable synthetic fluorophores. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 14840–14850 (2013).
10. van de Linde, S. & Sauer, M. How to switch a fluorophore: from undesired blinking to controlled photoswitching. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 1076–1087 (2014).
11. van de Linde, S., Wolter, S., Heilemann, M. & Sauer, M. The effect of photoswitching kinetics and labeling densities on super-resolution fluorescence imaging. *J. Biotechnol.* **149**, 260–266 (2010).
12. Dvornikov, A. S., Walker, E. P. & Rentzepis, P. M. Two-photon three-dimensional optical storage memory. *J. Phys. Chem. A* **113**, 13633–13644 (2009).
13. Mikhailov, I. A., Belfield, K. D. & Masunov, A. E. DFT-based methods in the design of two-photon operated molecular switches. *J. Phys. Chem. A* **113**, 7080–7089 (2009).
14. Velema, W. A., Szymanski, W. & Feringa, B. L. Photopharmacology: beyond proof of principle. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 2178–2191 (2014).
15. Broichhagen, J., Frank, J. A. & Trauner, D. A roadmap to success in photopharmacology. *Acc. Chem. Res.* **48**, 1947–1960 (2015).
16. Gentili, P. L., Giubila, M. S., Germani, R. & Heron, B. M. Photochromic and luminescent compounds as artificial neuron models. *Dyes and Pigments* **156**, 149–159 (2018).
17. Thompson, M. A., Lew, M. D. & Moerner, W. E. Extending microscopic resolution with single-molecule imaging and active control. *Annu. Rev. Biophys.* **41**, 321–342 (2012).

18. Moerner, W. E. W. E. Single-Molecule Spectroscopy, Imaging, and Photocontrol: Foundations for Super-Resolution Microscopy (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **54**, 8067–8093 (2015).
19. Zhu, L., Zhu, M.-Q., Hurst, J. K. & Li, A. D. Q. Light-controlled molecular switches modulate nanocrystal fluorescence. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 8968–8970 (2005).
20. Herner, A., Nikić, I., Kállay, M., Lemke, E. A. & Kele, P. A new family of bioorthogonally applicable fluorogenic labels. *Org. Biomol. Chem.* **11**, 3297–3306 (2013).
21. Davis, Luke D, Chao, Tzu-Yuan, Raines, R. T. Fluorogenic Label for Biomolecular Imaging. *Bioconjug. Chem.* **1**, 252–260 (2010).
22. Chao, T.-Y. & Raines, R. T. Fluorogenic label to quantify the cytosolic delivery of macromolecules. *Mol. Biosyst.* **9**, 339–342 (2013).
23. Han, J., Han, M. S. & Tung, C.-H. A non-toxic fluorogenic dye for mitochondria labeling. *Biochim. Biophys. Acta* **1830**, 5130–5135 (2013).
24. Mizukami, S., Watanabe, S., Akimoto, Y. & Kikuchi, K. No-wash protein labeling with designed fluorogenic probes and application to real-time pulse-chase analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 1623–1629 (2012).
25. Huang, B., Jones, S. A., Brandenburg, B. & Zhuang, X. Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution. *Nat. Methods* **5**, 1047–1052 (2008).
26. Rust, M. J., Bates, M. & Zhuang, X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods* **3**, 793–795 (2006).
27. Yamanaka, M., Smith, N. I. & Fujita, K. Introduction to super-resolution microscopy. *Reprod. Syst. Sex. Disord.* **63**, 177–192 (2014).
28. Huang, B., Bates, M. & Zhuang, X. Super-resolution fluorescence microscopy. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 993–1016 (2009).
29. Klementieva, N. V. *et al.* Intrinsic blinking of red fluorescent proteins for super-resolution microscopy. *Chem. Commun.* **53**, 949–951 (2017).
30. Thompson, M. A., Biteen, J. S., Lord, S. J., Conley, N. R. & Moerner, W. E. in *Single Molecule Tools, Part B: Super-Resolution, Particle Tracking, Multiparameter, and Force Based Methods* **475**, 27–59 (Elsevier, 2010).
31. von Diezmann, A., Shechtman, Y. & Moerner, W. E. Three-Dimensional Localization of Single Molecules for Super-Resolution Imaging and Single-Particle Tracking. *Chem. Rev.* **117**, 7244–7275 (2017).
32. Zhang, Y. & Clapp, A. Overview of stabilizing ligands for biocompatible quantum dot nanocrystals. *Sensors (Basel)* **11**, 11036–11055 (2011).
33. Zhang, H., Feng, G., Guo, Y. & Zhou, D. Robust and specific ratiometric biosensing using a copper-free clicked quantum dot-DNA aptamer sensor. *Nanoscale* **5**, 10307–10315 (2013).

34. Pujari, S. S., Ingale, S. A. & Seela, F. High-density functionalization and cross-linking of DNA: “click” and “bis-click” cycloadditions performed on alkynylated oligonucleotides with fluorogenic anthracene azides. *Bioconjug. Chem.* **25**, 1855–1870 (2014).
35. Acuña, A. U., Álvarez-Pérez, M., Liras, M., Coto, P. B. & Amat-Guerri, F. Synthesis and photophysics of novel biocompatible fluorescent oxocines and azocines in aqueous solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 16704–16712 (2013).
36. Hong, V., Kislukhin, A. A. & Finn, M. G. Thiol-selective fluorogenic probes for labeling and release. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 9986–9994 (2009).
37. Haupt, S., Malik, Z. & Ehrenberg, B. Comparative kinetics of damage to the plasma and mitochondrial membranes by intra-cellularly synthesized and externally-provided photosensitizers using multi-color FACS. *Photochem Photobiol Sci* **13**, 38–47 (2014).
38. Budyka, M. F. & Oshkin, I. V. Theoretic investigation of the size and charge effects in photochemistry of heteroaromatic azides. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **759**, 137–144 (2006).
39. Budyka, M. F. The long-wavelength edge of photosensitivity of aromatic azides. *High Energy Chemistry* **41**, 356–360 (2007).
40. Budyka, M. F. Photochemistry of aromatic azides and nitrenes. *High Energy Chem.* **41**, 176–187 (2007).
41. Kubicki, J. *et al.* Photochemistry of 2-naphthoyl azide. An ultrafast time-resolved UV-vis and IR spectroscopic and computational study. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 9751–9761 (2011).
42. Lord, S. J. *et al.* Azido push-pull fluorogens photoactivate to produce bright fluorescent labels. *J. Phys. Chem. B* **114**, 14157–14167 (2010).
43. Lord, S. J. *et al.* DCDHF fluorophores for single-molecule imaging in cells. *Chemphyschem* **10**, 55–65 (2009).
44. Lord, S. J. *et al.* Azido Push Pull Fluorogens Photoactivate to Produce Bright Fluorescent Labels†.PDF. 14157–14167 (2010).
45. Gritsan, N. & Platz, M. *Photochemistry of Azides: The Azide / Nitrene Interface*. 11–15 (2010).
46. Burdzinski, G. *et al.* Early events in the photochemistry of aryl azides from femtosecond UV/Vis spectroscopy and quantum chemical calculations. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 13402–13411 (2006).
47. Wang, J. *et al.* Early events in the photochemistry of 2-naphthyl azide from femtosecond UV/Vis spectroscopy and quantum chemical calculations: direct observation of a very short-lived singlet nitrene. *J. Org. Chem.* **72**, 7581–7586 (2007).
48. Xue, J., Luk, H. L., Eswaran, S. V., Hadad, C. M. & Platz, M. S. Ultrafast infrared and UV-vis studies of the photochemistry of methoxycarbonylphenyl azides in solution. *J. Phys. Chem. A* **116**, 5325–5336 (2012).
49. Kubicki, J. *et al.* Direct observation of a sulfonyl azide excited state and its decay processes by ultrafast time-resolved IR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 7036–7044 (2012).
50. Lord, S. J. *et al.* A photoactivatable push-pull fluorophore for single-molecule imaging in live cells. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 9204–9205 (2008).

51. Lee, M. K., Williams, J., Twieg, R. J., Rao, J. & Moerner, W. E. Enzymatic activation of nitro-aryl fluorogens in live bacterial cells for enzymatic turnover-activated localization microscopy†. *Chem. Sci.* **42**, 220–225 (2013).
52. Tachikawa, T., Yonezawa, T. & Majima, T. Super-resolution mapping of reactive sites on titania-based nanoparticles with water-soluble fluorogenic probes. *ACS Nano* **7**, 263–275 (2013).
53. Denk, W., Strickler, J. H. & Webb, W. W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* **248**, 73–76 (1990).
54. Albota, M. A., Xu, C. & Webb, W. W. Two-Photon Fluorescence Excitation Cross Sections of Biomolecular Probes from 690 to 960 nm. *Appl. Opt.* **37**, 7352–7356 (1998).
55. Göppert-Mayer, M. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann. Phys.* **401**, 273–294 (1931).
56. Mizrahi, V., DeLong, K. W., Stegeman, G. I., Saifi, M. A. & Andrejco, M. J. Two-photon absorption as a limitation to all-optical switching. *Opt. Lett.* **14**, 1140–1142 (1989).
57. Mongin, O., Sankar, M., Charlot, M., Mir, Y. & Blanchard-Desce, M. Strong enhancement of two-photon absorption properties in synergic “semi-disconnected” multiporphyrin assemblies designed for combined imaging and photodynamic therapy. *Tetrahedron Lett.* **54**, 6474–6478 (2013).
58. Joshi, M. P. *et al.* Energy transfer coupling of two-photon absorption and reverse saturable absorption for enhanced optical power limiting. *Opt. Lett.* **23**, 1742–1744 (1998).
59. Chou, K.-L., Won, N., Kwag, J., Kim, S. & Chen, J.-Y. Femto-second laser beam with a low power density achieved a two-photon photodynamic cancer therapy with quantum dots. *J. Mater. Chem. B* **1**, 4584 (2013).
60. Mao, G.-J. *et al.* High-sensitivity naphthalene-based two-photon fluorescent probe suitable for direct bioimaging of H<sub>2</sub>S in living cells. *Anal. Chem.* **85**, 7875–7881 (2013).
61. Pawlicki, M., Collins, H. A., Denning, R. G. & Anderson, H. L. Two-photon absorption and the design of two-photon dyes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48**, 3244–3266 (2009).
62. Kong, L. *et al.* A self-assembled nanohybrid composed of fluorophore-phenylamine nanorods and Ag nanocrystals: energy transfer, wavelength shift of fluorescence and TPEF applications for live-cell imaging. *Chemistry* **19**, 16625–16633 (2013).
63. Vivas, M. G., Cury, J. F., Schiavon, M. A. & Mendonca, C. R. Two-Photon Absorption of ZnS Quantum Dots: Interpreting the Nonlinear Spectrum. *J. Phys. Chem. C* **117**, 8530–8535 (2013).
64. Medintz, I. L., Uyeda, H. T., Goldman, E. R. & Mattoussi, H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat. Mater.* **4**, 435–446 (2005).
65. Michalet, X. *et al.* Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* **307**, 538–544 (2005).
66. Reimann, S. M. & Manninen, M. Electronic structure of quantum dots. *Rev. Mod. Phys.* **74**, 1283–1342 (2002).

67. Bailey, R. E. & Nie, S. Alloyed semiconductor quantum dots: tuning the optical properties without changing the particle size. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 7100–7106 (2003).
68. de Mello Donegá, C., Hickey, S. G., Wuister, S. F., Vanmaekelbergh, D. & Meijerink, A. Single-Step Synthesis to Control the Photoluminescence Quantum Yield and Size Dispersion of CdSe Nanocrystals. *J. Phys. Chem. B* **107**, 489–496 (2003).
69. Jauffred, L. & Oddershede, L. B. Two-photon quantum dot excitation during optical trapping. *Nano Lett.* **10**, 1927–1930 (2010).
70. Fu, Y., Luo, Y. & Ågren, H. Multiple-photon spectrum of CdS semiconductor quantum dot for bioimaging. *Thin Solid Films* **515**, 842–845 (2006).
71. Han, T. T., Fu, Y. & Ågren, H. Dynamic photon emission from multiphoton-excited semiconductor quantum dots. *J. Appl. Phys.* **103**, 093703 (2008).
72. Drobizhev, M., Makarov, N. S., Rebane, A., de la Torre, G. & Torres, T. Strong Two-Photon Absorption in Push–Pull Phthalocyanines: Role of Resonance Enhancement and Permanent Dipole Moment Change upon Excitation. *J. Phys. Chem. C* **112**, 848–859 (2008).
73. Resch-Genger, U., Grabolle, M., Cavaliere-Jaricot, S., Nitschke, R. & Nann, T. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat. Methods* **5**, 763–775 (2008).
74. Hardman, R. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environ. Health Perspect.* **114**, 165–172 (2006).
75. Peterson, M. D., Jensen, S. C., Weinberg, D. J. & Weiss, E. A. Mechanisms for adsorption of methyl viologen on CdS quantum dots. *ACS Nano* **8**, 2826–2837 (2014).
76. Sadhu, S. & Patra, A. A brief overview of some physical studies on the relaxation dynamics and Förster resonance energy transfer of semiconductor quantum dots. *Chemphyschem* **14**, 2641–2653 (2013).
77. Rogach, A. L., Klar, T. A., Lupton, J. M., Meijerink, A. & Feldmann, J. Energy transfer with semiconductor nanocrystals. *J. Mater. Chem.* **19**, 1208–1221 (2009).
78. Tani, T. *et al.* Energy transfer in hybrid CdSe quantum dots vs. labelled molecular chaperone systems by imaging microscopy. *phys. stat. sol. (c)* **6**, 912–915 (2009).
79. Harris, R. D. *et al.* Electronic Processes within Quantum Dot-Molecule Complexes. *Chem. Rev.* **116**, 12865–12919 (2016).
80. Blaudeck, T. *et al.* Formation principles and ligand dynamics of nanoassemblies of CdSe quantum dots and functionalised dye molecules. *Chemphyschem* **13**, 959–972 (2012).
81. Parson, W. W. Modern optical spectroscopy. (2007).
82. Blanche, P. A. *et al.* Photorefractive polymers sensitized by two-photon absorption. *Opt. Lett.* **27**, 19–21 (2002).
83. Dirk, C. W., Cheng, L.-T. & Kuzyk, M. G. A simplified three-level model describing the molecular third-order nonlinear optical susceptibility. *Int. J. Quantum Chem.* **43**, 27–36 (1992).
84. Orr, B. J. & Ward, J. F. Perturbation theory of the non-linear optical polarization of an isolated system. *Mol. Phys.* **20**, 513–526 (1971).

85. Ogawa, K. & Kobuke, Y. Design of two-photon absorbing materials for molecular optical memory and photodynamic therapy. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 2241–2246 (2009).
86. Hales, J. M. *et al.* Design of polymethine dyes with large third-order optical nonlinearities and loss figures of merit. *Science* **327**, 1485–1488 (2010).
87. Ohta, K., Antonov, L., Yamada, S. & Kamada, K. Theoretical study of the two-photon absorption properties of several asymmetrically substituted stilbenoid molecules. *J. Chem. Phys.* **127**, 084504 (2007).
88. Klessinger, M. & Michl, J. *Excited States and Photochemistry of Organic Molecules*. (Wiley-VCH).
89. ESPECTROSCOPIA, A. Requena Rodriguez, J. Zuñiga. (2004).
90. Aranda, D. *et al.* An MS-CASPT2 study of the photodecomposition of 4-methoxyphenyl azide: role of internal conversion and intersystem crossing. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 7764–7771 (2018).
91. Kasha, M. Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discuss Faraday Soc* **9**, 14 (1950).
92. El - Sayed, M. A. Spin–Orbit Coupling and the Radiationless Processes in Nitrogen Heterocyclics. *Journal of Chemical Physics* **38**, 2834–2838 (1963).
93. Jasinski, J. M., Frisoli, J. K. & Moore, C. B. High vibrational overtone photochemistry of cyclobutene. *The Journal of chemical physics* (1983).
94. Zhou, W. *et al.* Photoisomerization of spiropyran for driving a molecular shuttle. *Org. Lett.* **9**, 3929–3932 (2007).
95. Ohsumi, M., Fukaminato, T. & Irie, M. Chemical control of the photochromic reactivity of diarylethene derivatives. *Chem. Commun.* 3921–3923 (2005). doi:10.1039/b506801k
96. Mandel, S., Liu, J., Hadad, C. M. & Platz, M. S. Study of Singlet and Triplet 2, 6-Difluorophenylnitrene by Time-Resolved Infrared Spectroscopy. 2816–2821 (2005).
97. Vyas, S. *et al.* An ultrafast time-resolved infrared and UV-vis spectroscopic and computational study of the photochemistry of acyl azides. *J Phys Org Chem* **25**, 693–703 (2012).
98. Han, G., Mokari, T., Ajo-Franklin, C. & Cohen, B. E. Caged quantum dots. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 15811–15813 (2008).
99. Jedrzejewska, B., Kabatc, J., Pietrzak, M. & Paczkowski, J. Hemicyanine dyes: synthesis, structure and photophysical properties. *Dyes and pigments* (2003).
100. He, Y., Gahlmann, A., Feenstra, J. S., Park, S. T. & Zewail, A. H. Ultrafast electron diffraction: structural dynamics of molecular rearrangement in the NO release from nitrobenzene. *Chem Asian J* **1**, 56–63 (2006).
101. Plaza-Medina, E. F., Rodríguez-Córdoba, W., Morales-Cueto, R. & Peon, J. Primary photochemistry of nitrated aromatic compounds: excited-state dynamics and NO· dissociation from 9-nitroanthracene. *Journal of Physical Chemistry A* **115**, 577–585 (2011).
102. Zugazagoitia, J. S., Almora-Díaz, C. X. & Peon, J. Ultrafast intersystem crossing in 1-nitronaphthalene. An experimental and computational study. *Journal of Physical Chemistry A* **112**, 358–365 (2008).

103. López-Arteaga, R., Stephansen, A. B., Guarín, C. A., Sølling, T. I. & Peon, J. The influence of push-pull states on the ultrafast intersystem crossing in nitroaromatics. *J. Phys. Chem. B* **117**, 9947–9955 (2013).
104. Collado-Fregoso, E., Zugazagoitia, J. S., Plaza-Medina, E. F. & Peon, J. Excited-state dynamics of nitrated push-pull molecules: the importance of the relative energy of the singlet and triplet manifolds. *Journal of Physical Chemistry A* **113**, 13498–13508 (2009).
105. Zhao, L.-M. *et al.* Photocatalysis with Quantum Dots and Visible Light: Selective and Efficient Oxidation of Alcohols to Carbonyl Compounds through a Radical Relay Process in Water. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **56**, 3020–3024 (2017).
106. Jander, S., Kornowski, A. & Weller, H. Energy transfer from CdSe/CdS nanorods to amorphous carbon. *Nano Lett.* **11**, 5179–5183 (2011).
107. Achtstein, A. W., Hennig, J., Prudnikau, A., Artemyev, M. V. & Woggon, U. Linear and Two-Photon Absorption in Zero- and One-Dimensional CdS Nanocrystals: Influence of Size and Shape. *J. Phys. Chem. C* **117**, 25756–25760 (2013).
108. Dayal, S. *et al.* Observation of non-Förster-type energy-transfer behavior in quantum dot-phthalocyanine conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 13974–13975 (2006).
109. McArthur, E. A., Godbe, J. M., Tice, D. B. & Weiss, E. A. A study of the binding of cyanine dyes to colloidal quantum dots using spectral signatures of dye aggregation. *J. Phys. Chem. C* **116**, 6136–6142 (2012).
110. Meijerink, A. in *Semiconductor nanocrystal quantum dots* (ed. Rogach, A. L.) 277–310 (Springer Vienna, 2008). doi:10.1007/978-3-211-75237-1\_10
111. Abramczyk, H. Introduction to laser spectroscopy. (2005).
112. Laurent, A. D., Adamo, C. & Jacquemin, D. Dye chemistry with time-dependent density functional theory. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 14334–14356 (2014).
113. Gross, E. K. U. & Kohn, W. Time-dependent density-functional theory. *Elsevier*
114. Koch, W. & Holthausen, M. C. *A chemist's guide to density functional theory*. (Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001). doi:10.1002/3527600043
115. Ullrich, C. A. & Yang, Z. A Brief Compendium of Time-Dependent Density Functional Theory. *Braz. J. Phys.* **44**, 154–188 (2014).
116. Yanai, T., Tew, D. P. & Handy, N. C. A new hybrid exchange–correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP). *Chem. Phys. Lett.* **393**, 51–57 (2004).
117. Jacquemin, D., Perpète, E. A., Ciofini, I. & Adamo, C. Assessment of Functionals for TD-DFT Calculations of Singlet-Triplet Transitions. *J. Chem. Theory Comput.* **6**, 1532–1537 (2010).
118. Day, P. N., Nguyen, K. A. & Pachter, R. TDDFT study of one- and two-photon absorption properties: donor- $\pi$ -acceptor chromophores. *J. Phys. Chem. B* **109**, 1803–1814 (2005).
119. Carlotti, B. *et al.* Effect of the  $\pi$  Bridge and Acceptor on Intramolecular Charge Transfer in Push-Pull Cationic Chromophores: An Ultrafast Spectroscopic and TD-DFT Computational Study. *Chemphyschem* **16**, 1440–1450 (2015).

120. Tomasi, J., Mennucci, B. & Cammi, R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev.* **105**, 2999–3093 (2005).
121. Caricato, M. A comparison between state-specific and linear-response formalisms for the calculation of vertical electronic transition energy in solution with the CCSD-PCM method. *J. Chem. Phys.* **139**, 044116 (2013).
122. Budyka, M. F., Biktimirova, N. V., Gavrishova, T. N. & Kozlovskii, V. I. Azido derivative of a hemicyanine dye with high sensitivity to visible light. *Mendeleev Communications* **17**, 159–160 (2007).
123. Frisch, M. J. *et al. Gaussian 09*. (Gaussian, Inc., 2009).
124. Frisch, M. J., Pople, J. A. & Binkley, J. S. Self-consistent molecular orbital methods 25. Supplementary functions for Gaussian basis sets. *J. Chem. Phys.* **80**, 3265 (1984).
125. Alul, H. Reduction of Vinylaromatic Nitro Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 12–13 (1953).
126. Magde, D., Wong, R. & Seybold, P. G. Fluorescence quantum yields and their relation to lifetimes of rhodamine 6G and fluorescein in nine solvents: improved absolute standards for quantum yields. *Photochem. Photobiol.* **75**, 327–334 (2002).
127. Jose, J. & Burgess, K. Benzophenoxazine-based fluorescent dyes for labeling biomolecules. *Tetrahedron* **62**, 11021–11037 (2006).
128. Lakowicz, J. R. & Masters, B. R. Principles of fluorescence spectroscopy. *J. Biomed. Opt.* (2008).
129. Budyka, M. F., Biktimirova, N. V., Gavrishova, T. N., Laukhina, O. D. & Zemtsov, D. B. Photodissociation of 4-azidopyridine and 4-azidoquinoline in neutral and cationic forms. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **173**, 70–74 (2005).
130. Bräse, S. & Banert, K. *Organic azides: Syntheses and applications*. 311–372 (John Wiley, 2010).
131. Brichkin, S. B., Smirnov, V. A., Alfimov, M. V., Naydenova, T. P. & Avramenko, L. F. Photolysis of azides in glassy solutions: spectral and photochemical properties of nitrenes. *Journal of Photochemistry* **12**, 25–30 (1980).
132. Scriven, E. F. V. & Turnbull, K. Azides: their preparation and synthetic uses. *Chem. Rev.* **88**, 297–368 (1988).
133. O'Connor, D. V. & Phillips, D. in *Time-Correlated Single Photon Counting* 36–54 (Elsevier, 1984). doi:10.1016/B978-0-12-524140-3.50006-X
134. O'Connor, D. V. & Phillips, D. in *Time-Correlated Single Photon Counting* 36–54 (Elsevier, 1984). doi:10.1016/B978-0-12-524140-3.50006-X
135. Burdzinski, G. T., Gustafson, T. L., Hackett, J. C., Hadad, C. M. & Platz, M. S. The direct detection of an aryl azide excited state: an ultrafast study of the photochemistry of para- and ortho-biphenyl azide. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 13764–13765 (2005).
136. Plaza-Medina, E. F., Rodríguez-Córdoba, W. & Peon, J. Role of upper triplet states on the photophysics of nitrated polyaromatic compounds: S1 lifetimes of singly nitrated pyrenes. *Journal of Physical Chemistry A* **115**, 9782–9789 (2011).

137. Zugazagoitia, J. S., Collado-Fregoso, E., Plaza-Medina, E. F. & Peon, J. Relaxation in the triplet manifold of 1-nitronaphthalene observed by transient absorption spectroscopy. *J. Phys. Chem. A* **113**, 805–810 (2009).
138. Stewart, G. *et al.* Photochemical reaction of 9-nitro-substituted anthracene-like molecules 9-methyl-10-nitroanthracene and 12-methyl-7-nitrobenz[a]anthracene. *J. Photochem. Photobiol. A. Chem.* **201**, 39–44 (2009).
139. Pavlovich, V. S. Solvatochromism and nonradiative decay of intramolecular charge-transfer excited states: bands-of-energy model, thermodynamics, and self-organization. *Chemphyschem* **13**, 4081–4093 (2012).
140. Grozema, F. C., Berlin, Y. A., Siebbeles, L. D. A. & Ratner, M. A. Effect of electrostatic interactions and dynamic disorder on the distance dependence of charge transfer in donor-bridge-acceptor systems. *J. Phys. Chem. B* **114**, 14564–14571 (2010).
141. Rentsch, S., Rummt, U. W. & Khetchinashwili, D. Comparison of the Photoisomerization and Relaxation Processes Studied by Time Resolved Spectroscopic Methods in Two Polymethine Dyes with the Same Polymethine Chromophor. *Laser Chem.* **7**, 261–270 (1986).
142. Sklar, L. A., Hudson, B. S., Petersen, M. & Diamond, J. Conjugated polyene fatty acids on fluorescent probes: spectroscopic characterization. *Biochemistry* **16**, 813–819 (1977).
143. Zigmantas, D., Hiller, R. G., Yartsev, A., Sundström, V. & Polívka, T. Dynamics of excited states of the carotenoid peridinin in polar solvents: dependence on excitation wavelength, viscosity, and temperature. *J. Phys. Chem. B* **107**, 5339–5348 (2003).
144. Bartholomew, G. P. *et al.* Two-photon absorption in three-dimensional chromophores based on [2.2]-paracyclophane. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 11529–11542 (2004).
145. Reja, S. I., Bhalla, V., Sharma, A., Kaur, G. & Kumar, M. A highly selective fluorescent probe for hypochlorite and its endogenous imaging in living cells. *Chem. Commun.* **50**, 11911–11914 (2014).
146. Kodaimati, M. S., Wang, C., Chapman, C., Schatz, G. C. & Weiss, E. A. Distance-Dependence of Interparticle Energy Transfer in the Near-Infrared within Electrostatic Assemblies of PbS Quantum Dots. *ACS Nano* **11**, 5041–5050 (2017).

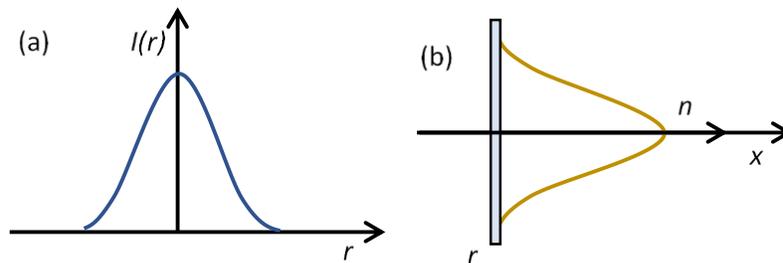
## Apéndice 1. Oscilador de Ti:Zafiro

Uno de los avances más importantes en el campo de la generación de láseres pulsados ha sido el desarrollo de óxido de aluminio dopado con titanio (Ti:Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Ti:Zafiro) como medio de ganancia. En el cristal, los estados basal y excitado están fuertemente acoplados a modos vibracionales del zafiro, lo que provoca un ensanchamiento homogéneo de la banda de emisión de hasta 200 nm (700 nm – 900 nm).<sup>1</sup>

El método para la generación de los pulsos es por amarre de modos, por lo que es necesaria una gran cantidad de modos longitudinales coexistiendo en la cavidad. En este caso, la técnica empleada para lograr el amarre de modos es utilizando el efecto de autoenfoco de Kerr,<sup>2</sup> que se basa en la dependencia del índice de refracción de un material,  $n$ , respecto a la intensidad de la radiación. Para radiación con perfil de intensidad gaussiano, la distribución espacial del índice de refracción es:

$$n(r) = n_0 + \frac{1}{2}n_2I(r), \quad I(r) = e^{-gr^2}, \quad (\text{A1.1})$$

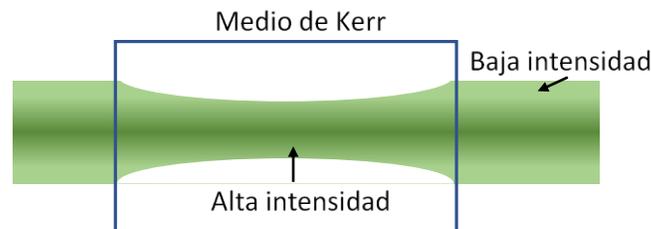
donde  $g$  es un parámetro de la forma y  $r$  es la distancia transversal desde el centro del haz, en la Fig. A1.1 se representa la distribución del índice de refracción para un haz gaussiano.



**Fig. A1.1.** Distribución de la intensidad de un haz gaussiano en uno de sus ejes (a). Variación del índice de refracción asumiendo la propagación en el eje  $x$ .

En la Fig. A1.1 se observa que el índice de refracción cambia de acuerdo con el signo del índice de refracción no lineal. Para un haz gaussiano, si  $n_2 > 0$ , el índice de refracción es máximo en el centro de la distribución y disminuye en los extremos.

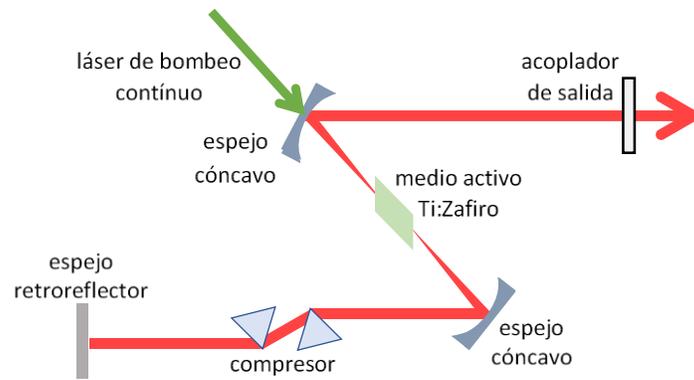
El lente ahora formado por el efecto Kerr, enfoca el haz óptico mientras se propaga por el ancho del material (autoenfoco de Kerr). La Fig. A1.2 muestra el enfoque de un haz láser al atravesar un medio. El enfoque se detiene cuando el diámetro del haz es lo suficientemente pequeño como para que la difracción sea más importante que el efecto Kerr.<sup>2</sup>



**Fig. A1.2.** Autoenfoco de un haz láser en un medio con  $n^2$  positivo.

El principio para el amarre de modos utilizando el efecto Kerr es conocido como auto-amarre, ya que el material de Kerr es el mismo cristal que genera la radiación láser. El método no requiere de otro elemento para que el amarre suceda. Al colocar dos espejos que hagan pasar el haz varias veces por el medio activo, el proceso de pérdida y amplificación se repite, causando que los modos vibracionales coexistan suficiente tiempo para causar el fenómeno de interferencia destructiva y constructiva, generando en un lapso muy corto un pulso de luz.

La generación de pulsos ultracortos por amarre de modos empleando un medio de Kerr provee de ventajas como una mayor ganancia debido al autoenfoco, ya que la intensidad llega a ser mucho más alta causada por el enfoque del haz en la cavidad, que permite la salida sólo de haces con suficiente energía, generando pulsos muy breves, dependientes de la cantidad de modos que coexisten en la cavidad y la intensidad del haz enfocado en el medio de Kerr. El esquema del oscilador de Ti:Zafiro y sus principales componentes se muestran en la Fig. A1.3.<sup>1</sup>



**Fig. A1.3.** Diagrama de los componentes principales de un láser de Ti:Zafiro

Los sistemas de Ti:Zafiro, como el empleado para la realización de este trabajo, son capaces de generar pulsos de alrededor de 150 fs de duración, con una frecuencia de repetición de 100 MHz y energía por pulso de aproximadamente 3 nJ.

### **Amplificador Regenerativo de Pulsos**

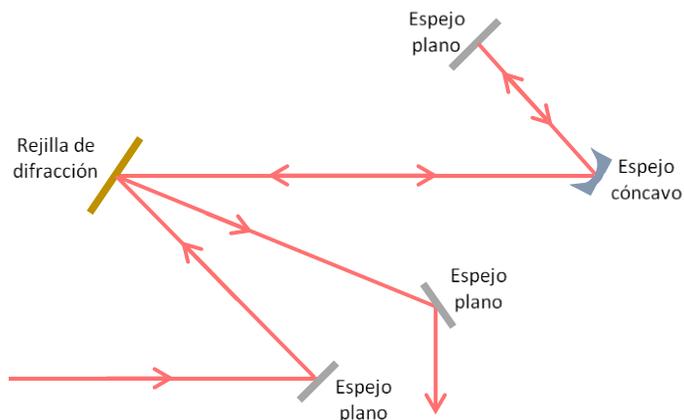
Los pulsos ultracortos obtenidos del oscilador presentan la desventaja de poseer muy poca energía, por lo que es necesario amplificarlos. El amplificador regenerativo permite aumentar la energía de los pulsos provenientes del oscilador hasta aproximadamente 0.65 mJ/pulso manteniendo casi intactas las propiedades espectrales y temporales del pulso.

El sistema para amplificar los pulsos consta de tres componentes, el expansor de pulsos ultracortos, la cavidad de amplificación de pulsos y el compresor de pulsos.<sup>3</sup>

### **Expansor de Pulsos**

El ensanchamiento temporal del pulso previo a la amplificación de este es necesario debido a que la amplificación directa de los pulsos ultracortos genera potencias pico muy grandes, capaces de dañar elementos de la cavidad de amplificado, entre ellas el medio activo.<sup>3</sup> Una vez realizada la expansión del pulso, es posible regresarlo a su duración original mediante un sistema compresor de pulsos, que se describirá más adelante.

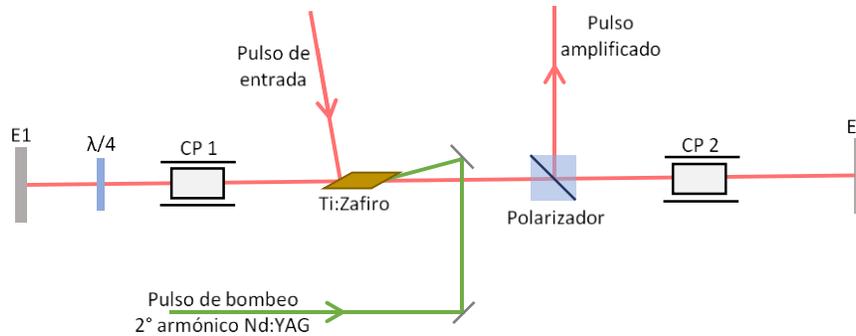
Los principales elementos del expansor, mostrados en la Fig. A1.4, son una rejilla de difracción donde se dispersan las componentes espectrales. Mediante el uso de espejos y lentes se logra que las de menor longitud de onda recorran una mayor distancia después de varias difracciones, lo que genera que las componentes del pulso salgan en tiempos diferentes, teniendo como resultado un pulso de mayor duración, aproximadamente 1000 veces la duración de entrada.<sup>1</sup>



**Fig. A1.4.** Esquema del arreglo del expansor de pulsos ultracortos.

### **Amplificador de Pulsos**

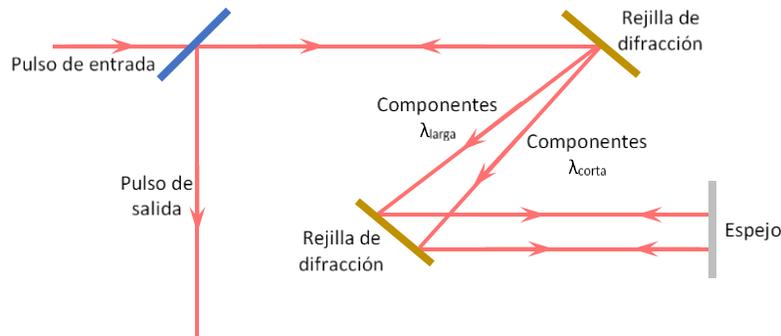
El amplificador es capaz de aumentar de manera eficiente la energía de los pulsos hasta en un factor de  $10^6$ . La idea general del proceso, mostrado en la Fig. A1.5, es que uno de los pulsos proveniente del oscilador entra en el amplificador debido a su polarización. El pulso queda atrapado en el sistema y es amplificado en cada paso por el cristal, el cual es “bombeado” por otro láser. Al pasar por el medio de ganancia, el pulso gana cada vez más energía (10-20 ciclos). Cuando el aumento en la energía es suficiente, el pulso de luz es extraído de la cavidad debido al cambio en su polarización.<sup>1</sup>



**Fig. A1.5.** Esquema del amplificador regenerativo, se muestran los componentes: espejos (E), retardador de fases ( $\lambda/4$ ), celdas Pockels (CP) y polarizador (P).

### Compresor de Pulsos

Una vez amplificado el pulso, es necesario reconstruirlo temporalmente a su duración inicial para su uso en la espectroscopía con resolución temporal. Este proceso es realizado mediante un arreglo que se muestra en la Fig. A1.6.



**Fig. A1.6.** Diagrama de los componentes del compresor de pulsos.

El proceso es el inverso a la expansión, en el sistema se utilizan dos rejillas de difracción dispuestas de tal manera que las componentes espectrales con longitud de onda mayor recorren una mayor distancia que las de menor longitud de onda. El uso de la segunda rejilla provoca la cancelación de los efectos de velocidad de dispersión de grupo y con ello reduce la duración temporal del pulso. La velocidad de dispersión de grupo se refiere a la diferencia en la velocidad de las diferentes componentes de una onda electromagnética al atravesar un medio.<sup>3</sup>

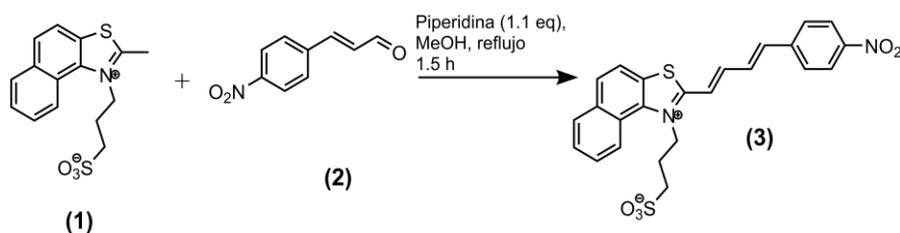
### Referencias

1. Rulliere, C. Femtosecond laser pulses. (2005).
2. Danaie, M. & Kaatuzian, H. Design and simulation of an all-optical photonic crystal AND gate using nonlinear Kerr effect. *Opt. Quant. Electron.* 44, 27–34 (2012).
3. Abramczyk, H. Introduction to laser spectroscopy. (2005).

## Apéndice 2. Síntesis y Caracterización

En este apartado se abordarán detalladamente los pasos necesarios para obtener el sistema diseñado de azida en forma de hemicianina. Además, se presenta la caracterización espectroscópica de cada uno de los productos intermedios y del producto final. Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  fueron tomados en un espectrofotómetro de 300 MHz Unity de Varian en DMSO- $d_6$  con tetrametilsilano como estándar interno. Los datos son reportados como desplazamiento químico (multiplicidad, constantes de acoplamiento y número de protones). Los puntos de fusión fueron medidos con un aparato Fisher-Jones y no están corregidos.

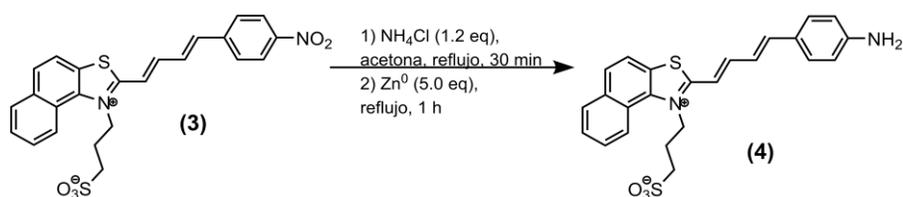
### Síntesis de 2-(4-(4-nitrofenil)buta-1,3-dien-1-il)-1-(1-sulfonato)propilnafto[1,2-*d*]tiazolio [hCy-NO $_2$ ]



Para lograr la síntesis de hCy-NO $_2$  se llevó a cabo una síntesis partiendo del 4-nitrocinnamaldeído y la sal del metil-1-(3-sulfopropil)nafto[1,2-*d*]tiazolio, siguiendo un procedimiento modificado del reportado por Jedrzejewska *et al.*<sup>99</sup> La sal del metil-1-(3-sulfopropil)nafto[1,2-*d*]tiazolio, **1** (0.500 g, 1.47 mmol), fueron secados a 140 °C toda una noche. Luego fue suspendido en 40 mL de MeOH bajo atmósfera de N $_2$  y 1.1 equivalentes de piperidina (0.16 mL) fueron agregados. La mezcla se mantuvo a refluxo (70 °C) hasta tener una solución traslúcida de color amarillo. Posteriormente, se agregó una solución de 1.3 equivalentes de 4-nitrocinnamaldeído, **2** (0.320 g), en 5 mL de MeOH. La reacción se mantuvo en refluxo y en atmósfera de N $_2$  por 1.5 h. La reacción fue seguida por cromatografía en capa fina (CCF) hasta su completitud. Después de esto, parte del disolvente (20 mL) fue removido al vacío. El resto de la mezcla fue enfriado en un baño

de hielo y filtrada en frío. El producto fue lavado con AcOEt (3 × 10 mL) y secado con vacío. El producto fue recristalizado en MeOH para obtener **3** como un sólido naranja (0.394 g, 56 %). p.f. 267 °C; <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8.94-8.97 (d, 1H), 8.27-8.33 (m, 5H), 8.03-8.05 (d, 2H), 7.87-7.94 (m, 3H), 7.56-7.61 (m, 3H), 5.33-5.38 (t, 2H), 3.16 (s), 2.42-2.47 (m, 2H). Espectroscopía Infrarroja (KBr, cm<sup>-1</sup>): 1594, 1508 (-CH=CH-); 1341, 861 (-NO<sub>2</sub>); 1167 (-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Espectrometría de masas (FAB<sup>+</sup>, m/z) 481.

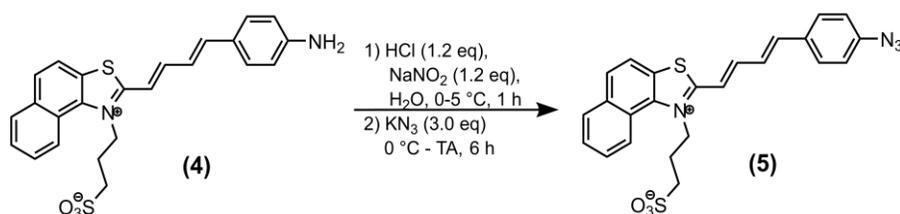
### Síntesis de 2-(4-(4-aminofenil)buta-1,3-dien-1-il)-1-(1-sulfonato)propilnafto[1,2-d]tiazolio [hCy-NH<sub>2</sub>]



Con el fin de realizar la reducción del grupo nitro a la amina aromática respectiva, se llevó a cabo el método reportado por Boyer y Alul.<sup>125</sup> En una mezcla de acetona/metanol (30 mL/20 mL), se suspendió el 2-(4-(4-nitrofenil)buta-1,3-dien-1-il)-1-(1-sulfonato)propilnafto[1,2-d]tiazolio, **3** (0.500 g, 1.11 mmol). Posteriormente, se adicionaron 1.2 equivalentes de NH<sub>4</sub>Cl (84 mg) en 0.5 mL de agua. La mezcla se mantuvo a reflujo (80 °C) por 30 min. Después, 3 equivalentes de zinc en polvo (0.200 g) fueron agregados. Pasados 30 min, otros 2 equivalentes de zinc (0.135 g) fueron agregados. La mezcla se mantuvo a reflujo por 1 h. El término de la reacción fue monitoreado por CCF. La mezcla de reacción aún caliente fue filtrada al vacío. El disolvente de la solución filtrada fue evaporado. El sólido resultante fue lavado con acetona caliente (5 × 10 mL). Por último, se realizó cromatografía en sílica gel con la mezcla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/Et<sub>3</sub>N 85:14:1, como eluyente. Se obtuvo **4** como un sólido morado (0.110 g, 22 %), p.f. > 300 °C; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8.94-8.97 (d, 1H), 8.27-8.33 (m, 5H), 8.03-8.05 (d, 2H), 7.87-7.94 (m, 3H), 7.56-7.61 (m, 3H), 5.33-5.38 (t, 2H), 3.16 (s), 2.42-2.47 (m, 2H); FT-

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3127, 3040 ( $-\text{NH}_2$ ); 1514, 1595 ( $-\text{CH}=\text{CH}-$ ); 1162 ( $\text{SO}_3^-$ ); y espectrometría de masas (FAB<sup>+</sup>,  $m/z$ ) 370 ( $-\text{SO}_3^-$ ).

### Síntesis de 2-(4-(4-azidofenil)buta-1,3-dien-1-il)-1-(1-sulfonato)propilnafto[1,2-d]tiazolio [hCy-N<sub>3</sub>]

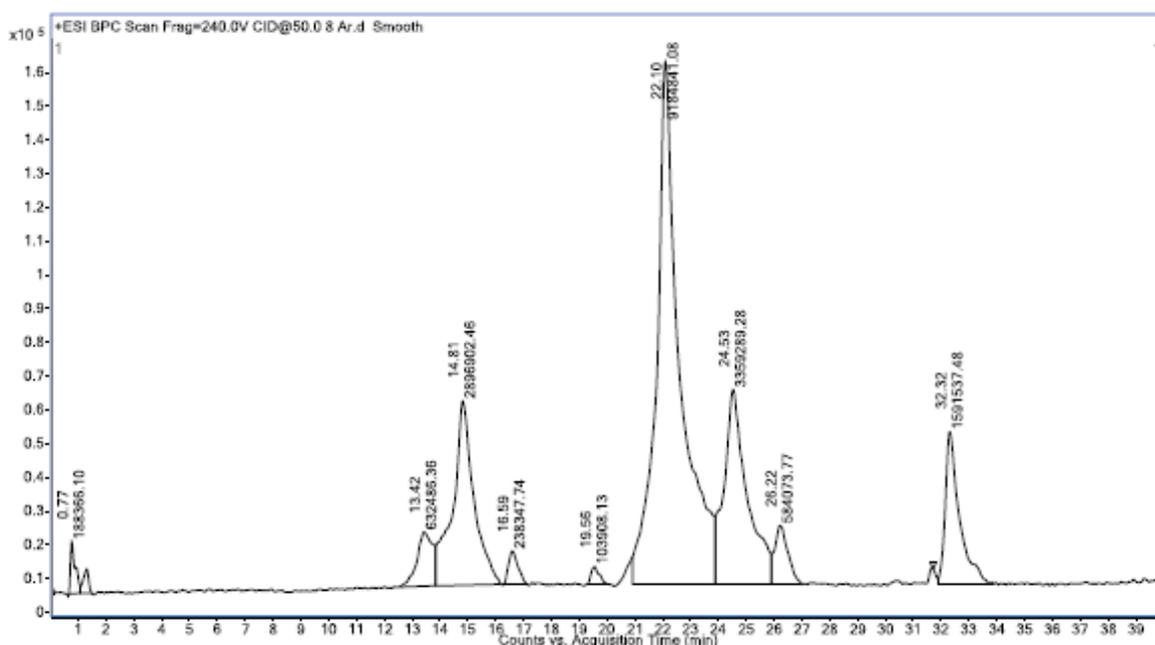


El paso final en la síntesis de hCy-N<sub>3</sub> fue el sustituir el grupo amino por el azida mediante un acoplamiento con sales de diazonio. Se suspendió 2-(4-(4-aminofenil)buta-1,3-dien-1-il)-1-(1-sulfonato)propilnafto[1,2-d]tiazolio, **4** (0.350 g, 0.78 mmol), en 15 mL de agua y fue enfriado a 0-5 °C en un baño de hielo. Una vez alcanzada la temperatura, se añadieron lentamente 2.5 equivalentes de HCl (0.16 mL). Cuando se consiguió una solución roja, se adicionaron a la mezcla 1.2 equivalentes de NaNO<sub>2</sub> (65 mg) que se mantuvo en agitación a baja temperatura por 1 h. Posteriormente, se agregaron 3 equivalentes de KN<sub>3</sub> (0.20 g) a la solución. La reacción se mantuvo en agitación por toda la noche permitiendo alcanzar temperatura ambiente. El crudo de reacción fue neutralizado con una solución saturada de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> hasta alcanzar un pH = 8. El producto fue extraído con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 × 30 mL) y lavado con agua fría (5 mL). La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y el disolvente fue removido con vacío en la obscuridad. Se obtuvo **5** como un sólido café (0.133 g, 36 %). Se descompone a 210 °C; FT-IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 2119 ( $-\text{N}_3$ ), 1512, 1623 ( $-\text{CH}=\text{CH}-$ ), 1174 ( $-\text{SO}_3^-$ ); y espectrometría de masas (DART<sup>+</sup>,  $m/z$ ) 476. El producto se mantuvo en la obscuridad y en atmósfera de Ar hasta que se realizaron los experimentos.

## Apéndice 3. Espectros de masas de hCy-N<sub>3</sub> irradiada

En este apéndice se presentan cromatogramas y espectros de masas obtenidos para diferentes picos de los cromatogramas en soluciones de hemicianina en forma de azida irradiadas a diferentes tiempos y con y sin tratamiento de argón burbujeado para desplazar el O<sub>2</sub> disuelto.

Para estudiar los fotoproductos de la se empleó un cromatógrafo Agilent 1200 Infinity Series con muestreador automático, acoplado a un detector 6530 Accurate-Mass Q-TOF de Agilent (tiempo de vuelo). La columna utilizada para las medidas fue una poroshell 120 EC-C18 (5 µm, 50 mm) de Agilent. Los experimentos fueron eluidos con una mezcla H<sub>2</sub>O/MeOH (gradiente de 70:30 a 50:50) y un flujo de 0.3 mL/min.



**Fig. A2.1.** Cromatograma de una solución de hCy-N<sub>3</sub> burbujeada con argón e irradiada por 30 min.

Cada uno de los picos más importantes de los cromatogramas fueron analizados mediante espectrometría de masas e identificados por comparación con estándares (hCy-NH<sub>2</sub> y hCy-NO<sub>2</sub>) o de acuerdo con los patrones de fragmentación encontrados.

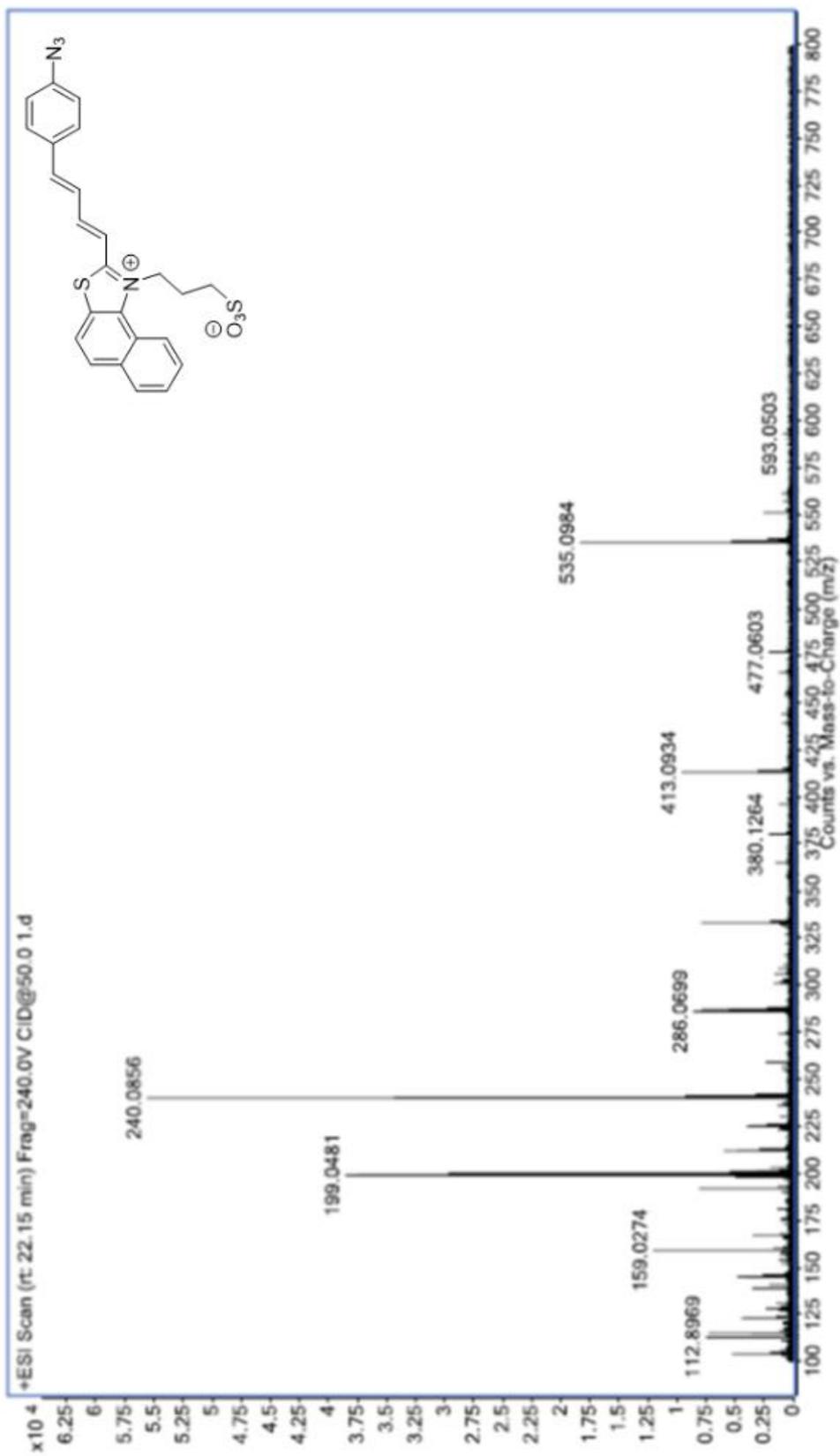
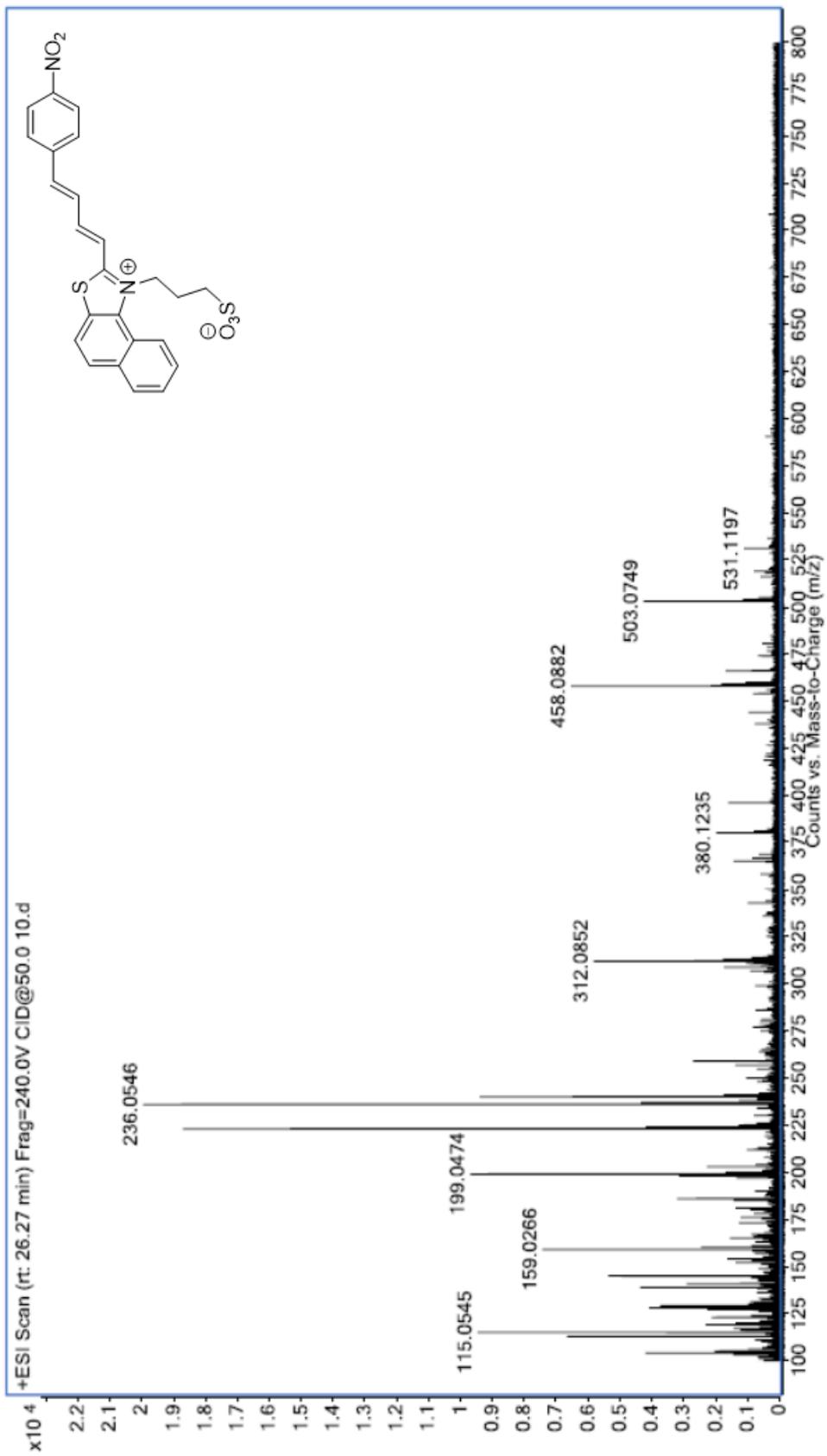
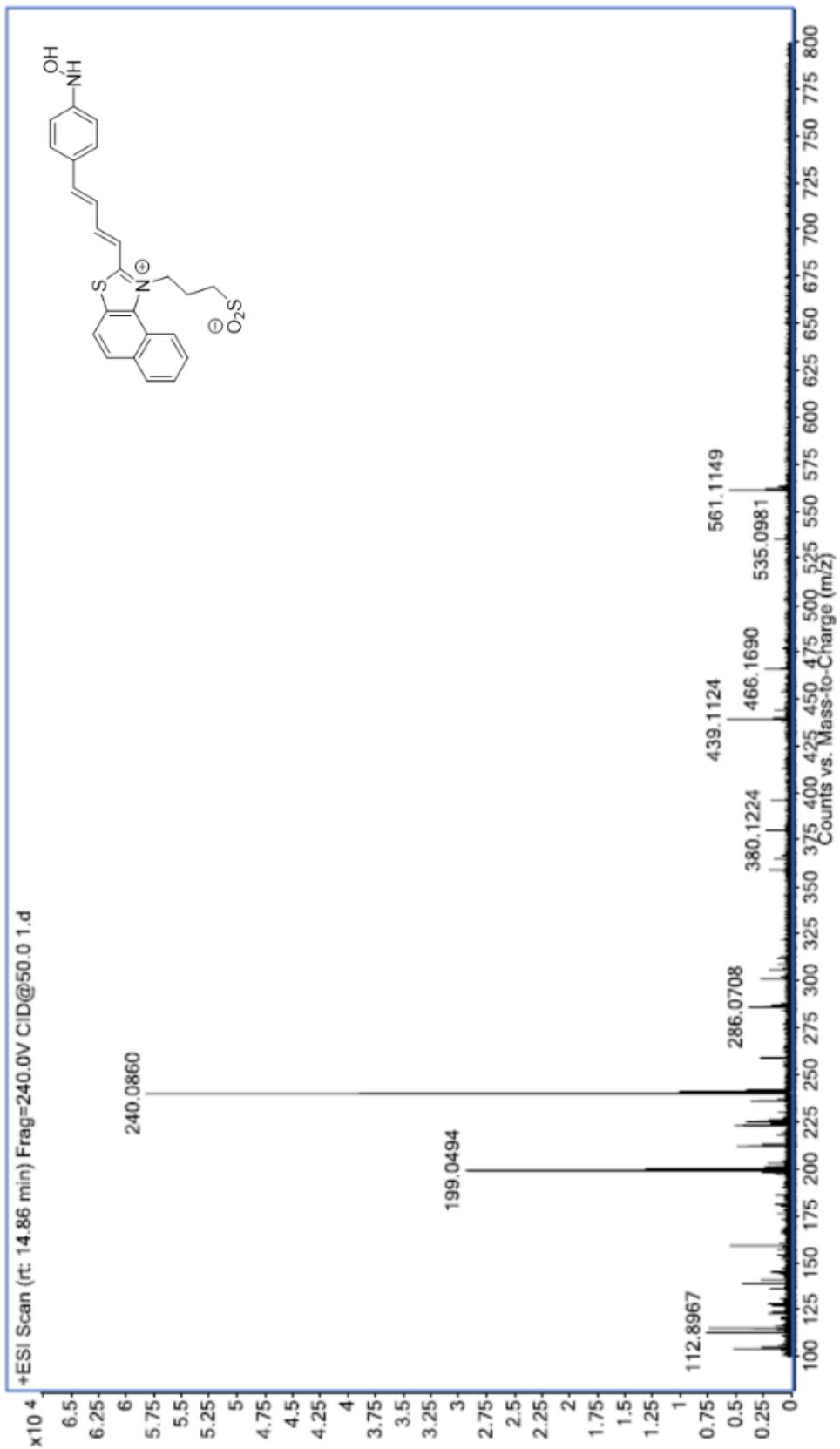


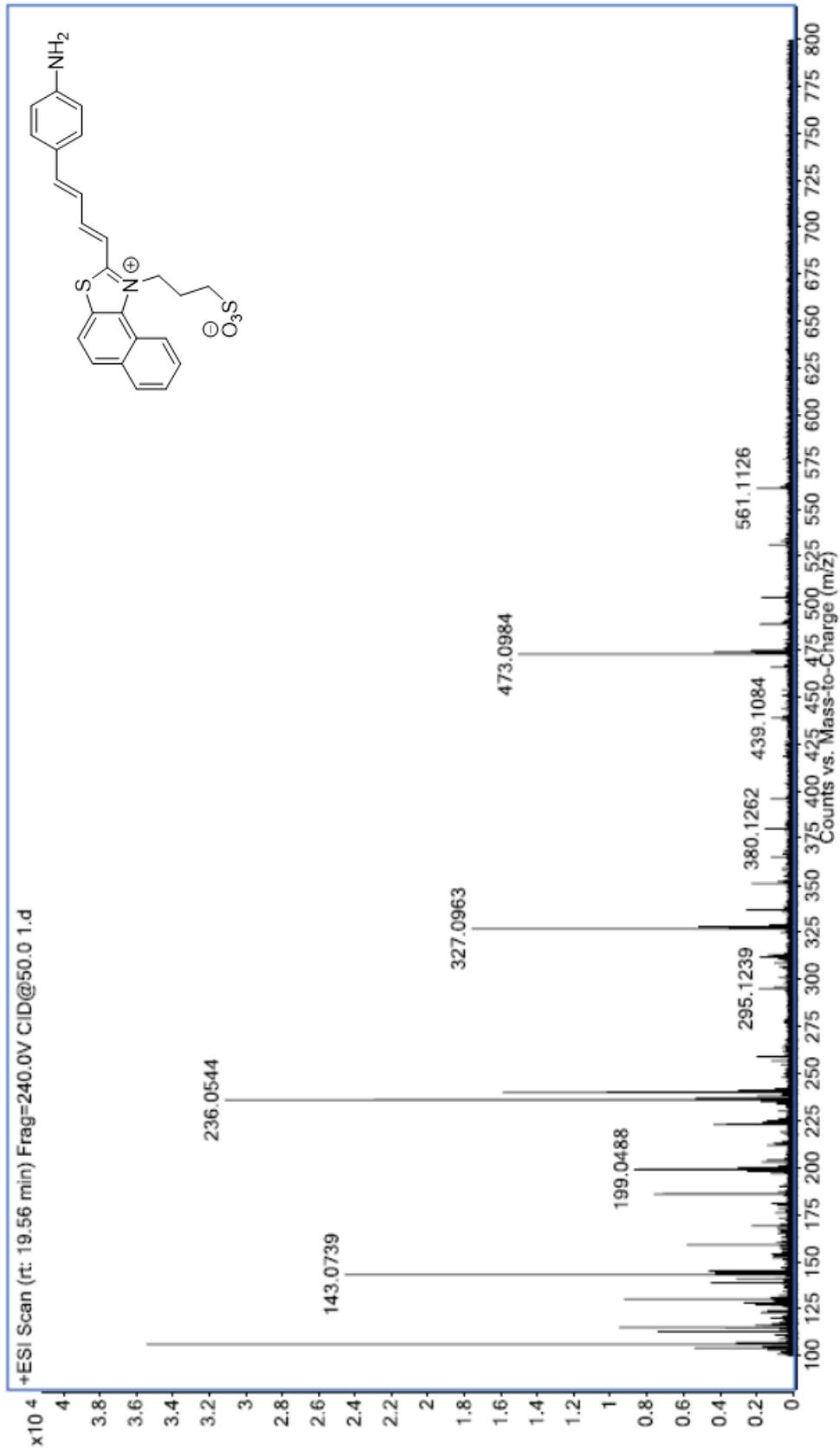
Fig. A2.1. Espectro de masas (TOF) para la forma azida (hCy-N3). El tiempo de retención es 22.1 min. Ion molecular m/z 477.



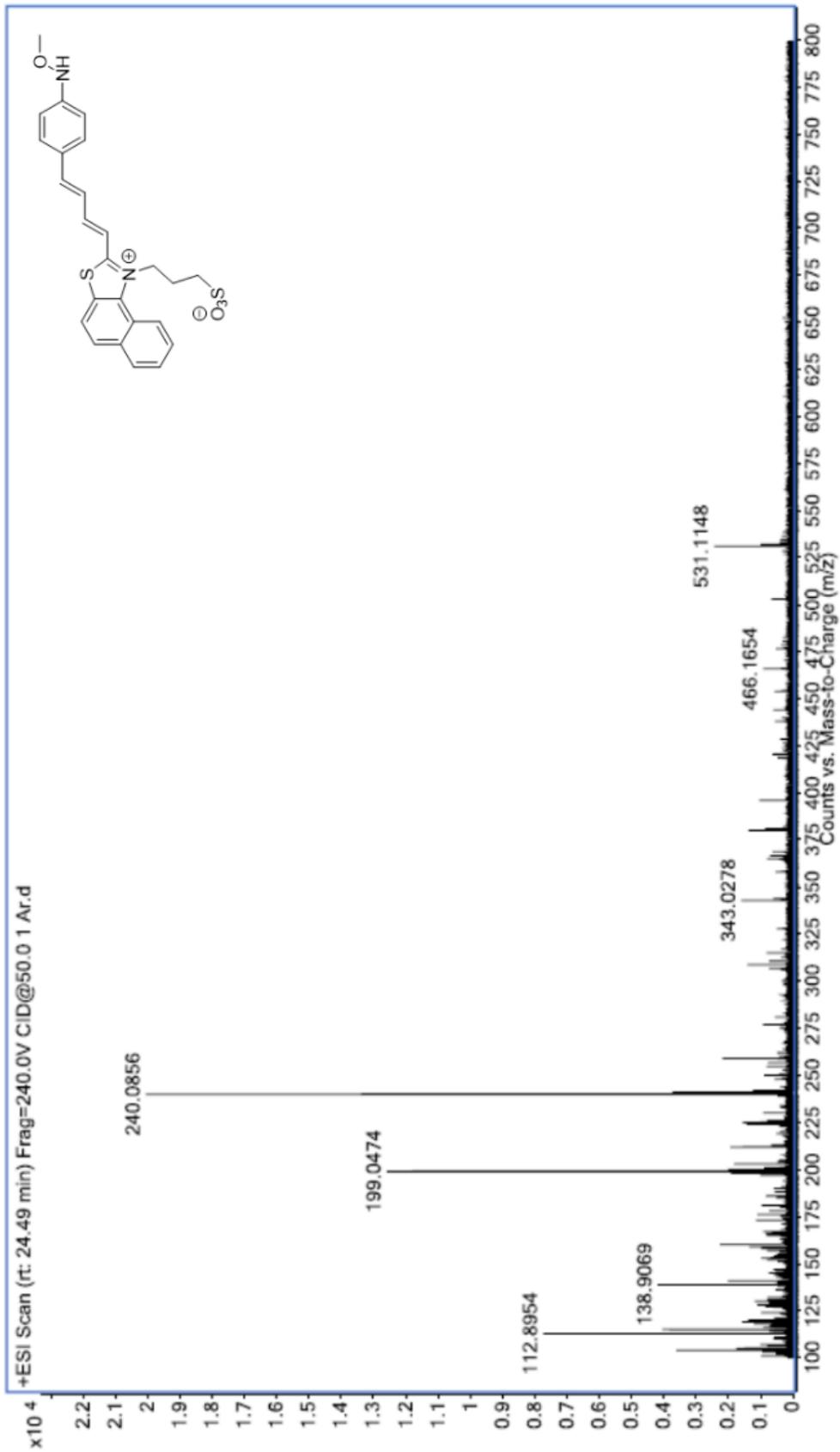
**Fig. A2.2.** Espectro de masas (TOF) para la forma nitro (hCy-NO<sub>2</sub>). El tiempo de retención es 26.2 min. Ion molecular m/z 481, + Na<sup>+</sup> m/z 503.



**Fig. A2.3.** Espectro de masas (TOF) para la forma oxima (hCy-NH-OH). El tiempo de retención es 14.9 min. Ion molecular m/z 466, -NH-OH m/z 439.



**Fig. A2.4.** Espectro de masas (TOF) para la forma amina (hCy-NH<sub>2</sub>). El tiempo de retención es 19.6 min. Ion molecular m/z 450, + Na<sup>+</sup> m/z 473.



**Fig. A2.5.** Espectro de masas (TOF) para la forma O-metil oxima (hCy-NH-OMe). El tiempo de retención es 24.5 min. Ion molecular m/z 480, + Na<sup>+</sup> m/z 503, -CH<sub>3</sub> m/z 466.

## Anexo: Artículos publicados

---

En este apartado se presentan los artículos publicados en revistas indexadas durante los estudios de doctorado.

Artículos publicados como primer autor:

- **Gutiérrez-Arzaluz, L.**, López-Arteaga, R., Cortés-Guzmán, F., Peon, J. (2017). *Nitrated Fluorophore Formation upon Two-Photon Excitation of an Azide with Extended Conjugation*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 121, 9910-9919.
- **Gutiérrez-Arzaluz, L.**, Ramírez-Palma, D., Buitrón-Cabrera, F., Rocha-Rinza, T., Cortés-Guzmán, F., & Peon J. (2017). *Evolution of electron density towards the conical intersection of a nucleic acid purine*. *Chemical Physics Letters*, 683, 425-430.
- **Gutiérrez-Arzaluz, L.**, Cortés-Guzmán, F., Rocha-Rinza, T., & Peón, J. (2015). *Ultrafast excited state hydrogen atom transfer in salicylideneaniline driven by changes in aromaticity*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(47), 31608-31612.
- **Gutiérrez-Arzaluz, L.**, Rocha-Rinza, T., & Cortés-Guzmán, F. (2015). *Stilbene photoisomerization driving force as revealed by the topology of the electron density and QTAIM properties*. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1053, 214-219.

Artículos publicados como coautor:

- Rodríguez-Romero, J., Guarín, C. A., Arroyo-Pieck, A., **Gutiérrez-Arzaluz, L.**, López-Arteaga, R., Cortés-Guzmán, F., Navarro, P., & Peon, J. (2017). *Fluorophore release from a polymethinic photoremovable protecting group through a non-linear optical process*. *ChemPhotoChem*, 1, 397-407.