



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ISOMERIZACIÓN BIFOTÓNICA DE UN HETEROARILAZOCOMPUESTO A
TRAVÉS DE UNA ANTENA POLIMETÍNICA IR-780

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. EMMANUEL ALEJANDRO GARCÍA VILLATORO

TUTOR : Dr. JORGE PEÓN PERALTA
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MEXICO, OCTUBRE, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

**ISOMERIZACIÓN BIFOTÓNICA DE UN HETEROARILAZOCOMPUUESTO A TRAVÉS DE
UNA ANTENA POLIMETÍNICA IR780**

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. EMMANUEL ALEJANDRO GARCÍA VILLATORO



Ciudad de México, octubre, 2021.

Jurado asignado

Presidente Dr. José Norberto Farfán García

Vocal Dr. Carlos Amador Bedolla

Vocal Dr. Ernesto Rivera García

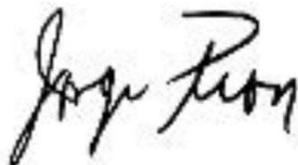
Vocal Dr. Jorge Tiburcio Báez

Secretario Dra. Maria del Carmen Virginia Ortega Alfaro



Q. Emmanuel Alejandro García Villatoro

Sustentante



Dr. Jorge Peón Peralta

Tutor

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Instituto de Química y al Posgrado en Ciencias Químicas por proveerme de vastas oportunidades de desarrollo, aprendizaje y exploración durante este programa.

Al CONACyT por el apoyo económico a través de los proyectos Ciencia de Frontera 2019-51496 y el proyecto 285722, así como por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría (CVU: 931499). De la misma manera, al PAPIIT por el apoyo económico otorgado al proyecto IG200621 y a los recursos de supercómputo otorgados por el proyecto LANCAD-UNAM-DGTIC-210.

Al Dr. Jorge Peón Peralta por recibirme en su grupo de investigación y brindarme las herramientas necesarias para prosperar en la vida académica, por poner en cada momento su confianza en mis habilidades y por la motivación para el desarrollo de este y futuros proyectos académicos y personales.

Al Dr. José Guadalupe López Cortes por estar siempre dispuesto a brindarme su apoyo, orientación y valiosa amistad.

A mis compañeros: Oscar, Andrea, Jesús, Mariana, Bernardo, Leonardo, Dehny, Mario, Salvador, David, Alejandro, Enrique, Ricardo, Genaro; por su apoyo y camaradería durante esta trayectoria.

A mi familia por su apoyo condicional en todo momento y la formación que me han brindado. A mis amigos que hicieron que este lugar se sintiera como un hogar. A Karla que siempre me acompañó y estuvo constantemente aquí.

A los miembros del jurado por sus sugerencias, comentarios y correcciones de la presente tesis.

A los técnicos, académicos y personal del Instituto de Química especialmente a la Q. María de los Ángeles Peña Ortiz y a la Dra. Elizabeth Huerta por la capacitación y adquisición de espectros de RMN; a la Dra. María del Carmen García González y al Dr. Francisco Javier Pérez Flores por la capacitación para el uso del espectrómetro de masas y adquisición de espectros; a la Q. María de la Paz Orta Pérez por el análisis elemental de las muestras, a la Dra. Beatriz Quiroz García y la Dra. Nuria Esturau Escofet del LURMN por la adquisición de espectros de RMN y al M. en C. Everardo Tapia Mendoza por su ayuda técnica (LANCIC). También se agradece al M. en C. Guillermo Roura Perez por su valioso apoyo para la solicitud de patente de los resultados aquí presentados.

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.

Los resultados de esta investigación se publicaron en:

- *“Two-photon induced isomerization through a cyaninic molecular antenna in azo compounds”*
E. Villatoro, L. Muñoz-Rugeles, J. Durán-Hernández, B. Salcido-Santacruz, N. Esturau-Escofet, J. G. López-Cortés, M. C. Ortega-Alfaro, J. Peón,
Chem. Commun., 2021,57, 3123-3126

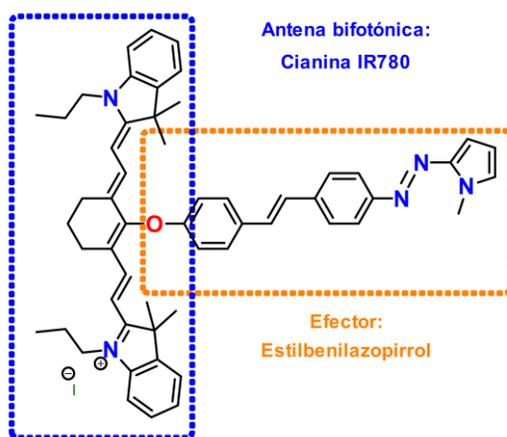
Se ha presentado parcialmente como poster en:

- *“Control bifotónico de la fotoisomerización de un azocompuesto mediado por una antena bifotónica”*. Simposio interno del Instituto de Química, UNAM, 2020

Además, el presente trabajo se presentó ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial para su protección por patente con número de solicitud 92430 y expediente MX/a/2021/071250

Resumen

La inducción de una respuesta molecular empleando luz es el concepto central en novedosos sistemas de control de procesos a escala microscópica. La mayoría de estos esquemas se basan en la transformación reversible de una sustancia al absorber fotones con la energía apropiada. La iniciación de estos cambios con irradiación externa permite a las sustancias actuar como interruptores moleculares con control espacial y temporal de la respuesta esperada. Sin embargo, la mayoría de las sustancias sintetizadas con este fin operan con absorción lineal de luz con lo que existen eventos de excitación a lo largo de todo el camino óptico de la luz, lo que limita la precisión tridimensional de la excitación. El uso de procesos de óptica no lineal como la absorción bifotónica (**TPA**) puede proveer a los sistemas con una extraordinaria selectividad espacial la cual es necesaria para aplicaciones como microfabricación, el almacenamiento óptico de información o la fotoactivación de compuestos con actividad biológica. Los fenómenos de óptica no lineal, como la absorción simultánea de dos fotones, restringen los eventos de excitación al volumen focal de la fuente de irradiación mediante el uso de lentes de enfoque apropiados. La combinación de buenas propiedades de absorción de múltiples fotones, y transformaciones químicas útiles en una misma molécula constituye un reto de diseño. La optimización de ambas propiedades en un solo cromóforo está limitada, ya que los motivos estructurales necesarios interfieren entre sí.



Estructura química del compuesto bicromofórico diseñado **CySAP**.

La presente tesis propone un diseño modular el cual localiza las propiedades de óptica no lineal en un cromóforo “antena” y la respuesta reactiva a la luz en un fragmento denominado en este documento como **efactor**. Este diseño permite la optimización de las propiedades de interés de

forma independiente. Brevemente, el funcionamiento del sistema consiste en la TPA por la antena con una subsecuente migración de la energía de excitación al efector para promover la reacción fotoquímica de isomerización. Como prueba de concepto, se diseñó el compuesto bicromofórico **CySAP**, el cual busca la sensibilización de la isomerización bifotónica de un efector azoico por transferencia de energía desde los estados electrónicos superiores de una antena polimetínica. La antena se derivó de la cianina **IR780**, la cual tiene una simetría que convierte a la transición $S_0 \rightarrow S_2$ en permitida por TPA. El efector es un estilbenilazopirrol (**SAP**) con importante respuesta fotocromica. El compuesto **SAP** y el derivado bicromofórico **CySAP** fueron sintetizados y caracterizados en la presente tesis.

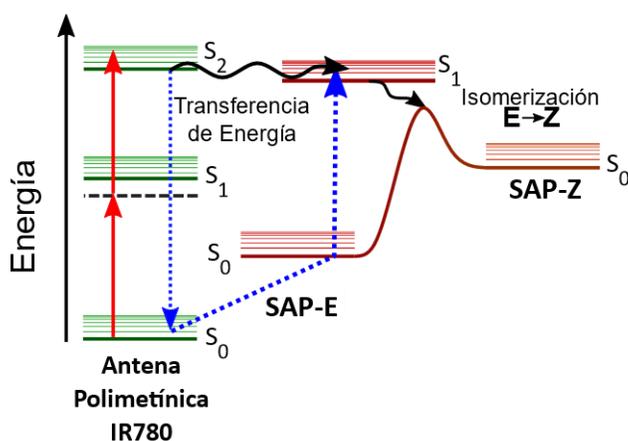


Diagrama de Jablonski simplificado del diseño del sistema bicromofórico **CySAP**

El funcionamiento de este diseño modular requiere que los cromóforos mantengan su independencia electrónica para las transiciones electrónicas por lo que se realizó un cuidadoso análisis del perfil electrónico de los cromóforos aislados, **IR780** y **SAP** y del constructo bicromofórico **CySAP** por espectroscopía óptica estática. Los resultados confirmaron que el acoplamiento de los fragmentos por la ligadura éter no resulta en traslapes orbitales que modifiquen las propiedades ópticas de los cromóforos. La respuesta reactiva a la luz se estudió en primera instancia por excitación directa (lineal) del grupo azoico del efector aislado **SAP** y del compuesto modular **CySAP** con una fuente láser de 430 nm. Estos experimentos confirmaron que el fotocromismo del efector no se ve entorpecido por la conjugación con la antena, por lo que se mantiene su actividad como interruptor molecular. La identidad del fotoproducto y la resistencia a la fatiga del efector se confirmó por resonancia magnética nuclear de muestras irradiadas hasta alcanzar un estado fotoestacionario.

La prueba de concepto crucial en esta tesis fue la isomerización del efector tras excitación bifotónica de la antena. Para ello, el compuesto **CySAP** se irradió con una fuente láser pulsada de femtosegundos entonada a 860 nm. La observación del fotocromismo característico del grupo azo confirmó la sensibilización bifotónica del proceso debido a transferencia de energía desde los estados electrónicos superiores de la fracción polimetínica formados por TPA.

Los cálculos computacionales confirman que el éxito del sistema se debió a la cercanía entre los cromóforos, la orientación favorable de los momentos dipolares de transición y el tiempo de vida anómalamente largo del estado donador S_2 de la cianina (en la escala de picosegundos). Además, se determinó que la transferencia de energía entre la antena polimetínica y el efector **SAP** es un proceso ultrarrápido capaz de competir con la relajación no radiativa por conversión interna del estado singulete excitado superior. La dinámica de estados excitados del sistema bicromofórico **CySAP** se estudió por la técnica de suma de frecuencias de fluorescencia con resolución temporal de subpicosegundos, y se comparó con la dinámica observada para los cromóforos independientes. La desaparición de la componente lenta del decaimiento de la señal de la cianina y la evolución temporal del espectro de fluorescencia resuelto en tiempo confirmaron la aparición de un mecanismo de relajación ultrarrápido. Este proceso se identificó como la transferencia de energía antena->efector lo que confirmó el mecanismo fotofísico propuesto para el funcionamiento del diseño modular en **CySAP**.

Hasta el momento no existen reportes del uso de sistemas polimetínicos para la sensibilización de procesos bifotónicos. El uso de estos cromóforos como antena bifotónica es especialmente atractivo para futuras aplicaciones biológicas. Por otro lado, este diseño bicromofórico puede ser optimizado para la incorporación de antenas con aun mejores propiedades bifotónicas o tiempos de vida mayores del estado singulete excitado superior para maximizar el grado de transferencia energética. El fragmento azoico también puede ser sustituido para incorporar diferentes efectores para fines diversos lo que permitiría la implementación del diseño bicromofórico presentado aquí en aplicaciones que requieran de precisión espaciotemporal. Las lecciones aprendidas en esta tesis abren las puertas al diseño de diversos sistemas modulares para la sensibilización de efectores.

Contenido

RESUMEN.....	I
CONTENIDO	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	6
2.1. Hipótesis	6
2.2. Objetivo General	6
2.3. Objetivos Específicos	6
3. ANTECEDENTES	8
3.1 Absorción de Luz y Teoría de Perturbaciones Dependiente del Tiempo ⁴³⁻⁴⁵	8
3.2. Absorción Bifotónica ^{8,38,46}	13
3.3. Procesos Fotofísicos De Desactivación De Estados Excitados ^{10,44,67}	19
3.4. Fotocromismo e Interruptores Moleculares Fotoactivables	23
3.5. Azocompuestos.....	27
3.6. Transferencia de energía electrónica	33
3.7. Compuestos polimetínicos	37
4. METODOLOGÍA.....	43
4.1. Síntesis y caracterización del compuesto actuador estilbenilazopirrol y del sistema bicromofórico CySAP	43
4.2. Espectroscopía óptica estática	48
4.3. Fotoisomerización del efector por excitación directa	49
4.4. Resonancia magnética nuclear del estado fotoestacionario	52
4.5. Isomerización bifotónica por excitación indirecta mediada por estados superiores de la antena	53
4.6. Métodos computacionales y modelado de la transferencia de energía	55
4.7. Espectroscopía Resuelta en Tiempo	57
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59
5.1. Síntesis Y Caracterización Del Compuesto Actuador Estilbenilazopirrol (SAP) Y Del Sistema Bicromofórico CySAP	59
5.2. Espectroscopía Óptica Estática	65
5.3. Fotoisomerización del efector por excitación directa	73
5.4. Resonancia Magnética Nuclear Del Estado Fotoestacionario	78
5.5. Isomerización Bifotónica por excitación indirecta mediada por estados superiores de la antena	85
5.6. Métodos computacionales y modelado teórico de la transferencia de energía	89
5.7. Espectroscopía Resuelta en Tiempo	100
6. CONCLUSIONES	104
7. REFERENCIAS	107
ANEXOS	123
Anexo I. Caracterización de los productos sintetizados	123
Anexo II. Estimación del factor de orientación $\langle \mu^2 \rangle$	138
Anexo III. Artículo publicado.....	144

1. Introducción

La respuesta a la luz es la esencia del funcionamiento de sistemas que requieren el control de procesos a nivel molecular con estímulos externos. La absorción de luz por una molécula provoca la promoción del sistema a un estado electrónicamente excitado. La relajación electrónica del sistema puede proceder a través de transformaciones químicas desde la superficie de energía potencial del estado excitado de tal manera que la irradiación puede provocar así transformaciones químicas selectivamente. Esta modalidad de control ha sido explotada en diversas áreas como fotocátalisis,¹ la microfabricación,² el almacenamiento óptico de información,³ y sistemas de liberación de fármacos,⁴ entre otras.

Las transformaciones fotoquímicas pueden ser de carácter reversible, donde la irradiación de un sustrato permite alternar entre dos formas isoméricas estables. Este fenómeno es conocido como fotocromismo, y ha sido de gran interés reciente para el diseño de interruptores moleculares. La transformación fotoinducida puede promover cambios reversibles a nivel macroscópico de sistemas complejos tales como películas poliméricas,⁵ liposomas,⁶ o proteínas. Algunos ejemplos de fotocromismo son la fotoisomerización *cis-trans* de insaturaciones, y las reacciones electrocíclicas reversibles.

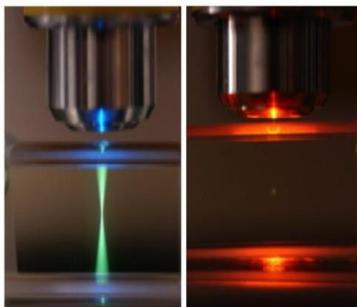


Figura 1.1. Comparación de absorción monofotónica (izquierda) y bifotónica (derecha). Se observa que para TPA solo se excita a la región encontrada en el plano focal del objetivo. La fotografía es propiedad de Steve Ruzin.⁷

La precisión espacial de los eventos de isomerización puede llegar a un grado extraordinario siempre y cuando la excitación ocurra a través de un fenómeno óptico no lineal como la absorción bifotónica (TPA por sus siglas en inglés) según se muestra en la Figura 1.1. La TPA involucra la interacción

simultánea de dos fotones con una molécula para promover una transición electrónica, por lo que el fenómeno es altamente sensible al flujo de fotones, mostrando una dependencia cuadrática con la irradiancia, I , como se muestra en la ecuación 1.1: ⁸

$$[M^*] \propto [M_0] \sigma_2 I^2 \quad (1.1)$$

Donde $[M^*]$ representa la concentración de moléculas excitadas por unidad de tiempo, $[M_0]$ la concentración inicial del cromóforo en su estado basal y σ_2 se conoce como el área transversal de absorción bifotónica. Este último parámetro se utiliza para caracterizar la probabilidad promedio de TPA por una molécula, y se reporta en unidades de GM en honor a Maria Göppert-Mayer quien describió por primera vez el fenómeno en 1931 (1 GM = $10^{-50} \text{cm}^4 \text{s}$).

La observación del fenómeno de TPA requiere el uso de fuentes de luz con gran irradiancia instantánea como láseres pulsados enfocados en la muestra. La dependencia cuadrática con la irradiancia implica que la TPA solo será significativa en el plano focal de la fuente de irradiación, por lo que se pueden localizar los eventos de excitación en volúmenes pequeños (de algunos femtolitros). Con esto, la TPA provee al sistema de un importante grado de control espacial de los fenómenos fotoactivables, sin inducir respuestas a lo largo del camino óptico, a diferencia de la absorción de un solo fotón.

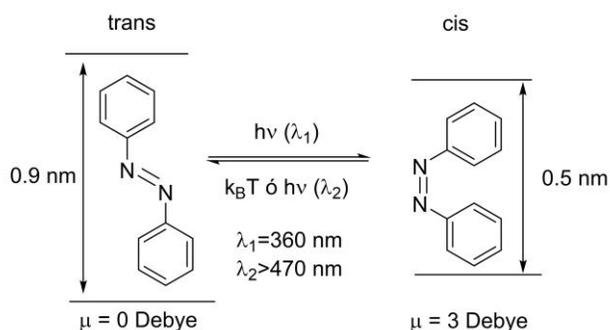


Figura 1.2. Fotocromismo característico del azobenceno. Se señalan las diferencias de geometría y polaridad entre los isómeros. Imagen adaptada de la literatura.⁹

El desarrollo de interruptores moleculares ha sido impulsado de forma importante por la fotoquímica de azocompuestos. Los azocompuestos se caracterizan por la presencia de un grupo cromóforo azo, $-\text{N}=\text{N}-$, donde ambos nitrógenos están unidos a un carbono con hibridación sp^2

aromático. Este grupo funcional presenta isomería geométrica siendo el isómero *E* el térmicamente estable por el menor impedimento estérico entre los sustituyentes. La absorción de luz ultravioleta por este compuesto induce la isomerización *E*→*Z* del grupo funcional a través de intersecciones cónicas en la superficie de energía potencial del estado excitado.¹⁰ El fotocromismo de los azocompuestos trae consigo un gran cambio en el volumen y polaridad de la molécula que altera súbitamente la interacción con el medio circundante. La fotoquímica de los azocompuestos ha permitido su uso como interruptor molecular en diversas aplicaciones como sistemas de liberación de fármacos,^{11–14} sistemas catalíticos,^{15,16} dispositivos de almacenamiento de información y energía,^{17,18} polímeros responsivos,^{19–21} máquinas moleculares,^{22,23} y para el control de sistemas de biológicos.^{24–26}

La implementación de azocompuestos como interruptores en sistemas que requieren confinamiento espacial de los eventos está limitada por sus pobres propiedades de óptica no lineal.^{27–29} Aunque se ha trabajado arduamente en la mejora de las propiedades bifotónicas de estos compuestos para resolver estas complicaciones, los alcances han sido más bien limitados.³⁰ La optimización de la TPA requiere arreglos estructurales específicos de los cromóforos los cuales pueden entorpecer su funcionamiento como interruptor molecular. El presente trabajo aporta un diseño modular bicromofórico en el que la funcionalidad como interruptor molecular y la respuesta óptica bifotónica se encuentren localizadas en secciones independientes de la misma molécula. Este diseño permitiría la optimización de la funcionalidad de sus componentes de forma independiente. El funcionamiento de nuestro diseño bicromofórico se basa también en la migración de la energía de excitación bifotónica del fragmento antena al efector y la subsecuente respuesta fotocromática de éste.

En la literatura existen algunos ejemplos donde se usan compuestos para la sensibilización óptica no lineal (por TPA) de procesos fotoquímicos como la generación de especies reactivas de oxígeno,³¹ liberación de moléculas pequeñas,³² y la emisión de complejos lantánidos.³³ Sin embargo, la mayoría de los sensibilizadores alcanzan niveles por TPA los cuales rápidamente se relajan al estado de menor energía por medio de relajación vibroelectrónica con el medio.^{8,34,35} Este comportamiento limita la aplicación del esquema de sensibilización ya que la energía de uno de los fotones se pierde en forma de calor hacia el medio, con lo que no es posible sensibilizar procesos fotoquímicos de mayor energía como el fotocromismo de azocompuestos. La sensibilización por TPA de procesos fotoquímicos requiere que la antena pueda acceder a estados altamente excitados los cuales

deberán tener un tiempo de vida suficientemente largo, que permita la migración completa de la excitación bifotónica hacia el efector.

El grupo de investigación donde se realizó esta tesis ha estudiado profundamente la posibilidad de usar cianinas como sensibilizadores de TPA.^{36,37} Las cianinas son colorantes orgánicos caracterizados una cadena conjugada de unidades polimetínicas con grupos N-heterociclos a los extremos de la cadena los cuales estabilizan la carga positiva del cromóforo. La distribución simétrica de carga de la estructura y la transición fuertemente permitida $S_0 \rightarrow S_1$ convierten a esta familia de compuestos en excelentes cromóforos no lineales con coeficientes bifotónicos en el orden de cientos de GM.^{8,38} El interés de utilizar las cianinas como antenas bifotónicas surge de que los estados excitados accedidos por TPA tienen tiempos de vida inusualmente largos en el orden de picosegundos.³⁶ Esta condición puede permitir la migración de la excitación desde dichos estados hacia otras regiones de la molécula.³⁷

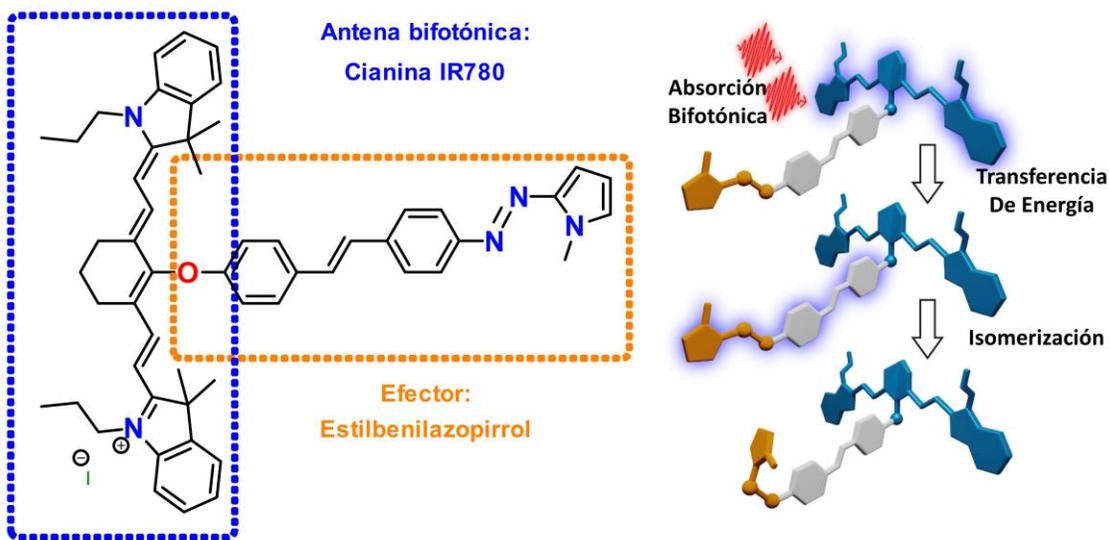


Figura 1.3. Diseño modular bicromofórico antena bifotónica- efector. En la estructura del compuesto modular se resaltan los cromóforos individuales (Antena y Efector) que lo conforman. Se anexa un esquema simplificado del funcionamiento fotoquímico del compuesto.

El presente trabajo expone una prueba de concepto para la isomerización de azocompuestos por excitación bifotónica indirecta mediada por transferencia de energía desde estados electrónicos superiores de compuestos polimetínicos. El diseño modular mostrado en la Figura 1.3 incorpora al compuesto polimetínico **IR780** como antena bifotónica. La cianina se eligió por sus excelentes propiedades fotoquímicas como una sección transversal bifotónica grande ($\sigma_2 = 460 \text{ GM}$) a 860

nm, y tiempo de vida largo para el estado S_2 alcanzado por TPA ($\tau=1.4$ ps),³⁹ así como por su facilidad de modificación al contar con grupo saliente apropiado en la posición *meso* de la cadena (ver Figura 3.13).⁴⁰ El efector del diseño modular corresponde a un fragmento estilbenilazopirrónico, un derivado pirrónico del azobencenos con conjugación electrónica extendida. Se ha demostrado que los azoheteroarenos son superiores como interruptores moleculares que los azobencenos tradicionales ya que tienen mayor estabilidad térmica, mayor rendimiento cuántico de isomerización, requieren fotones de menor energía y los isómeros Z formados tienen tiempos de vida más largos.^{41,42}

Esta tesis presenta el desarrollo de la investigación en seis secciones. La primera sección de introducción presenta una declaración de la motivación tras el desarrollo de sistemas modulares antena bifotónica-efector azoico. La segunda sección presenta la hipótesis y los objetivos generales del proyecto de investigación. La sección tres muestra el trasfondo teórico y el estado del arte del desarrollo de efectores moleculares y cromóforos polimetínicos. La sección cuatro muestra la metodología sintética utilizada, la caracterización del funcionamiento fotoquímico del compuesto bicromofórico y la metodología computacional para el modelado computacional de la fotoquímica observada. La quinta sección presenta los resultados obtenidos. En esta sección se realiza la interpretación de los datos obtenidos para explicar la fotoquímica del sistema bicromofórico y evaluar su eficiencia como interruptor molecular. Por último, la sección seis engloba las conclusiones generales de la presente investigación y las perspectivas para el diseño de sistemas modulares como el presentado en esta tesis.

2. Hipótesis y Objetivos

2.1. Hipótesis

El diseño del sistema bicromofórico **CySAP** podrá mantener la independencia electrónica de los fragmentos que lo conforma al unirse por una ligadura tipo éter que no permite la conjugación de los sistemas π conjugados individuales. Esta unión no entorpecerá el comportamiento fotocromico del efector azoico al no afectarse directamente el enlace isomerizable ni afectará las propiedades de óptica no lineal de la sección antena.

La transferencia de energía ultrarrápida desde los estados superiores de la antena polimetínica, debida a la geometría favorable del sistema bifotónica y la coincidencia energética de los estados electrónicos excitados involucrados, permitirá la isomerización del azocompuesto por excitación bifotónica indirecta. Además, el fenómeno se beneficiará de la proximidad del par interactuante y el tiempo de vida anómalamente largo del estado excitado donador. Esta modalidad de excitación permitirá el promover eventos de isomerización con luz en el infrarrojo cercano con extraordinaria precisión espacial.

2.2. Objetivo General

Diseñar y sintetizar un compuesto bicromofórico capaz de localizar la funcionalidad óptica no lineal y la respuesta reactiva a la luz en secciones electrónicamente independientes de la molécula y estudiar sus propiedades fotoquímicas como prueba de concepto para la isomerización bifotónica de azocompuestos por excitación indirecta mediada por transferencia de energía ultrarrápida a través del espacio desde los estados superiores de una antena polimetínica.

2.3. Objetivos Específicos

- Sintetizar y caracterizar el compuesto bicromofórico **CySAP** presentado en la Figura 2.1.
- Estudiar las transiciones electrónicas de **CySAP** por espectroscopía óptica estática para confirmar la independencia electrónica de los cromóforos individuales que lo conforman.
- Evaluar el grado de fotoisomerización $E \rightarrow Z$ del efector **SAP** por excitación directa monofotónica a 430 nm en presencia y ausencia del fragmento antena.

- Determinar la velocidad y rendimiento cuántico de fotoisomerización del efector en presencia y ausencia del fragmento antena.
- Estudiar la cinética del proceso térmico de isomerización $Z \rightarrow E$ hacia el estado inicial y determinar el tiempo de vida del isómero Z .
- Valorar la resistencia a la fatiga y fotodescomposición del compuesto bicromofórico **CySAP** por espectroscopía óptica y resonancia magnética nuclear de protón.
- Caracterizar el proceso de isomerización e identificar el fotoproducto por espectroscopia óptica y resonancia magnética bidimensional del estado fotoestacionario.
- Establecer intervalos de potencia de irradiación en el infrarrojo cercano en los que se observen fenómenos de óptica no lineal sin evidencia de degradación del compuesto **CySAP**.
- Estudiar la isomerización del efector por excitación no lineal indirecta en el infrarrojo cercano y caracterizar el fenómeno de acuerdo con su proporcionalidad con la potencia de irradiación.
- Establecer un modelo teórico de los procesos fotoquímicos que intervienen en la aproximación modular presentada e identificar áreas de oportunidad para la optimización del diseño de sistemas bicromofóricos.
- Caracterizar la dinámica de relajación de los estados excitados para recabar evidencia experimental del proceso de transferencia de energía desde los estados superiores polimetínicos involucrado en el diseño bicromofórico presentado.

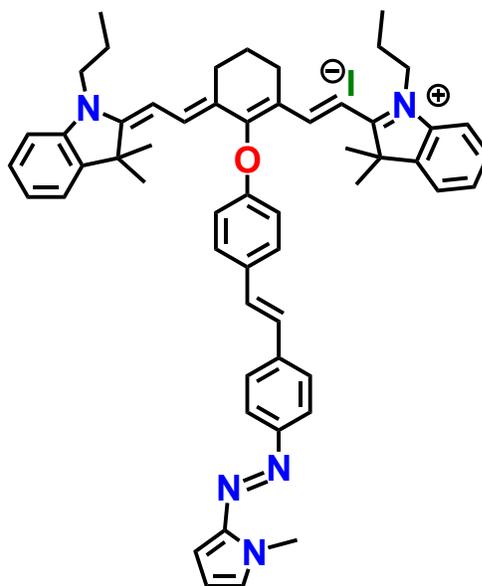


Figura 2.1. Estructura del compuesto bicromofórico **CySAP**.

3. Antecedentes

3.1 Absorción de Luz y Teoría de Perturbaciones Dependiente del Tiempo⁴³⁻⁴⁵

El presente trabajo tiene como objetivo el diseño y estudio de sistemas moleculares antena-efector con respuesta reactiva a la luz por lo que una introducción breve al estudio de la fotoquímica es necesaria. La fotoquímica inicia en el estado basal electrónico de la materia. La interacción de radiación electromagnética con la materia puede promover una transición electrónica a un estado excitado por absorción de fotones con la energía necesaria. De acuerdo con la ley de Stark-Einstein,⁴⁵ una molécula puede absorber un fotón ($E_{h\nu}$) si su energía coincide a la diferencia que existe entre el estado inicial (E_0) y el estado final (E_f):

$$\Delta E = E_f - E_0 = h\nu \quad (3. 2)$$

El estudio cuidadoso del proceso de excitación electrónica por absorción de luz involucra un tratamiento mecánico—cuántico del medio y de la radiación de acuerdo con la teoría de electrodinámica cuántica. Una aproximación razonable para la descripción del fenómeno es proponer un sistema semiclásico de la interacción. Este modelo considera a la materia como un sistema mecánico—cuántico, y la luz de manera clásica como una onda electromagnética oscilante. La interacción luz-materia es modelada bajo el formalismo de la teoría de perturbaciones dependiente del tiempo con estas aproximaciones.

El sistema molecular tiene soluciones para la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo en ausencia de la radiación u otras perturbaciones:

$$\hat{H}^0 \psi_k^0 = E_k^0 \psi_k^0 \quad (3. 3)$$

con energías E_k^0 y funciones de onda ψ_k^0 para estados estacionarios los cuales dependen solamente de la posición de las partículas del sistema. La función de onda ψ_k^0 puede estar construida como uno o más determinantes de Slater. Una molécula orgánica en su estado basal tiene una

configuración electrónica de capa cerrada con los orbitales de menor energía ocupados. Este estado corresponde al singlete basal S_0 .

La función de onda de la molécula, $\Psi(t)$, puede evolucionar si el sistema está sujeto a una perturbación como la exposición a un campo electromagnético. El nuevo estado molecular corresponde a una solución de la Schrödinger dependiente del tiempo que considera la perturbación como un hamiltoniano \hat{H}' .

$$-\frac{\hbar}{i} \frac{\partial \Psi(t)}{\partial t} = (\hat{H}^0 + \hat{H}'(t))\Psi \quad (3.4)$$

La perturbación $\hat{H}'(t)$ del sistema debido a la radiación electromagnética consiste en la interacción dependiente del tiempo de un grupo $\{i\}$ de partículas cargadas con el campo eléctrico de la luz. Considerando una onda linealmente polarizada en el eje x con campo eléctrico oscilante $\mathcal{E}_x(t)$, el Hamiltoniano perturbador resulta ser:

$$\hat{H}'(t) = -\sum_i Q_i x_i \mathcal{E}_x(t) \quad (3.5)$$

En la ecuación 3.4 se puede desestimar la dependencia espacial de la perturbación en la dirección de propagación. La aproximación considera que el campo eléctrico $\mathcal{E}_x(t)$ es prácticamente igual para todos los átomos en una molécula ya que la longitud de onda de la luz es mucho mayor que las dimensiones moleculares. De esta manera se tiene que:

$$\mathcal{E}_x(t) = \mathcal{E}_0 \text{sen}(2\pi\nu t - 2\pi z) \approx \mathcal{E}_0 \text{sen}(2\pi\nu t) = \mathcal{E}_0 \frac{(e^{i\omega t} - e^{-i\omega t})}{2i}; \omega = 2\pi\nu \quad (3.6)$$

Donde ν representa la frecuencia de oscilación del campo electromagnético y \mathcal{E}_0 la amplitud máxima del campo eléctrico.

La función de onda dependiente del tiempo $\Psi(t)$ puede construirse con funciones de onda calculadas para el sistema estacionario ψ_k^0 introduciendo un factor de fase, tal que, $\Psi_k^0 = \psi_k^0 e^{\frac{-iE_k t}{\hbar}}$. Debido a que \hat{H}^0 es un operador Hermitiano, las funciones ψ_k^0 forman un conjunto completo y

cualquier solución de la ecuación de Schrödinger, Ψ , puede ser expresada como una combinación lineal de estas funciones:

$$\Psi(t) = \sum_k a_k(t) \cdot \psi_k^0 e^{\frac{-iE_k t}{\hbar}} \quad (3.7)$$

Donde los coeficientes a_k determinan la contribución de cada función base ψ_k^0 a la función de onda Ψ . La probabilidad de encontrar al sistema en cualquier estado ψ_k^0 es proporcional al valor de su coeficiente elevado al cuadrado $|a_k(t)|^2$. El valor de estos coeficientes puede fluctuar como respuesta a la perturbación aplicada al sistema de acuerdo con la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{da_f(t)}{dt} = -\frac{i}{\hbar} \sum_k a_k(t) \langle \psi_f^0 | \hat{H}' | \psi_k^0 \rangle e^{\frac{i(E_f^0 - E_k^0)t}{\hbar}} \quad (3.8)$$

Para el caso más sencillo, la función de onda antes de la perturbación se considera dominada por un único estado estacionario inicial ψ_i^0 con energía E_i^0 , y que el estado posterior a la perturbación estará dominado por un estado final ψ_f^0 . Esta aproximación implica que ningún otro estado contribuye a la función de onda del sistema en todo momento. De esta manera, el coeficiente del estado inicial tiene un valor $a_i(t=0) = 1$ y para cualquier otro estado $a_{k \neq i}(t=0) = \delta_{ki}$. En condiciones normales de laboratorio la perturbación del sistema es pequeña y actúa en un periodo corto de tiempo, por lo que el cambio de los coeficientes de expansión, a_k , será despreciable con lo que la ecuación que describe la evolución del coeficiente del estado final $a_f(t)$ es:

$$\frac{da_f(t)}{dt} = -\frac{i}{\hbar} \langle \psi_f^0 | \hat{H}' | \psi_i^0 \rangle e^{\frac{i(E_f^0 - E_i^0)t}{\hbar}} \quad (3.9)$$

Sustituyendo la expresión 3.5 de la perturbación debida a la interacción de la radiación electromagnética en la ecuación 3.8 se tiene que:

$$\frac{da_f(t)}{dt} = \varepsilon_0 \frac{(e^{i\omega t} - e^{-i\omega t})}{2i} \frac{i}{\hbar} \langle \psi_f^0 | \sum_i Q_i x_i | \psi_i^0 \rangle e^{\frac{i\omega_{fi}t}{\hbar}} \quad (3.10)$$

Donde:

$$\omega_{fi} = \frac{E_f^0 - E_i^0}{\hbar} \quad (3.11)$$

La resolución de la ecuación diferencial 3.9 al integrar desde el tiempo $t=0$ al tiempo t da lugar a la siguiente expresión para el coeficiente del estado final a cada tiempo:

$$a_f(t) = \frac{\varepsilon_0}{2\hbar i} \langle \psi_f^0 | \sum_i Q_i x_i | \psi_i^0 \rangle \left\{ \left[\frac{e^{i(\omega_{fi}-\omega)t} - 1}{\omega_{fi} + \omega} \right] - \left[\frac{e^{i(\omega_{fi}-\omega)t} + 1}{\omega_{fi} - \omega} \right] \right\} \quad (3.12)$$

La probabilidad de la transición inducida por la absorción de un fotón queda definida por $|a_f(t)|^2$ la cual será significativa si $\omega_{fi} = \omega$ donde el denominador del 2º término se hace cero. Esta condición de resonancia energética es la ley de Stark-Einstein (3.1) donde la energía del fotón absorbido debe ser igual a la diferencia energética entre los estados. Es decir:

$$E_f^0 - E_i^0 = \hbar\omega = h\nu \quad (3.13)$$

Existe una pequeña probabilidad diferente de cero que la transición ocurra cuando ω no sea precisamente igual ω_{fi} debido a la relación de incertidumbre entre tiempo y energía. Estados con un tiempo de vida finito tienen una incertidumbre en su energía.

La probabilidad de inducirse la transición electrónica es proporcional a $\langle \psi_f^0 | \sum_i Q_i x_i | \psi_i^0 \rangle$ donde $\sum_i Q_i x_i$ es el componente x del operador momento dipolar eléctrico $\hat{\mu}$. La expresión generalizada para cualquier orientación de la polarización del campo eléctrico es:

$$|\langle \psi_f^0 | \hat{\mu} | \psi_i^0 \rangle|^2 = |\langle \psi_f^0 | \hat{\mu}_x | \psi_i^0 \rangle|^2 + \left| \langle \psi_f^0 | \hat{\mu}_y | \psi_i^0 \rangle \right|^2 + |\langle \psi_f^0 | \hat{\mu}_z | \psi_i^0 \rangle|^2 \quad (3.14)$$

La integral $|\langle \psi_f^0 | \hat{\mu} | \psi_i^0 \rangle|^2 = \mu_{fi}$ se conoce como el momento dipolar de transición entre los estados i y f . Esta cantidad es una propiedad vectorial de la molécula. Una transición entre estados electrónicos será permitida siempre que $\mu_{fi} \neq 0$. Un valor de momento dipolar de transición de cero $\mu_{fi} = 0$ indica que la transición está formalmente prohibida. En el tratamiento teórico descrito existen una serie de reglas de selección que indican condiciones que deben tener las transiciones electrónicas permitidas para una molécula. En orden de adherencia en sistemas reales se tienen las siguientes reglas de selección:

- Regla de selección de espín electrónico: La integral del momento dipolar de transición tendrá un valor de cero si los estados electrónicos tienen diferente multiplicidad de espín. El espectro de absorción de sustancias orgánicas, al tener un estado basal de capa cerrada, resulta únicamente de transiciones singulete basal - singulete excitado.
- Regla de selección de simetría espacial: La transición será prohibida por simetría espacial si el integrando en la ecuación 3.13 resulta antisimétrico a al menos una operación de simetría del grupo puntal de la molécula. Una transición será permitida solo si el producto de las representaciones irreducibles del estado excitado y alguna de las coordenadas cartesianas forma parte de las bases de la representación irreducible del grupo puntal molecular.
- Regla de selección de simetría local o de traslape: La transición electrónica será prohibida si el traslape espacial de las funciones de onda es insignificante. Esta regla no es tan estricta como las anteriores, ya que el traslape orbital no puede ser cero en todo el espacio.

Este tratamiento aproximado para las transiciones electrónicas usando la teoría de perturbaciones dependiente del tiempo será de gran utilidad para conceptualizar otros procesos fotofísicos involucrados en el funcionamiento de sistemas moleculares como la conversión interna y la transferencia de energía (ver abajo). Sin embargo, debido al número de aproximaciones utilizadas en la formulación, las transiciones consideradas formalmente prohibidas podrían tener una pequeña probabilidad de ocurrir por otros fenómenos.

Experimentalmente, la probabilidad que una molécula absorba un fotón se refleja en su coeficiente de absorción molar ϵ [$\text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$] en la ley de Lambert—Beer para una longitud de onda específica:

$$\log \left[\frac{I_0}{I} \right] = A = \epsilon b C \quad (3.15)$$

Donde I_0 es la intensidad de irradiación incidente en la muestra, I la intensidad transmitida al atravesar la muestra, la cantidad adimensional A es conocida como absorbancia, b es la longitud del camino óptico de la muestra [cm] y C es la concentración [mol L⁻¹] de la especie responsable de la absorción de luz. La ley de Lambert-Beer en general es obedecida por la gran mayoría de las sustancias. Algunas excepciones a esta ley pueden ser debidas a interacción entre moléculas de soluto, perturbaciones al equilibrio térmico por radiación intensa o por la población de estados con tiempo de vida extremadamente largos.⁴⁴

La absorbancia de luz a diferentes longitudes de onda permite reconstruir un espectro de absorción completo que aporta información valiosa de las características electrónicas de la molécula estudiada. Esta información representa el primer escalón para el diseño de sistemas moleculares complejos con respuesta reactiva a la luz como el descrito en el presente trabajo.

3.2. Absorción Bifotónica^{8,38,46}

El diseño molecular desarrollado en el presente trabajo está enfocado en la sensibilización de procesos fotoquímicos por fenómenos de excitación óptica no lineal como la absorción bifotónica. La absorción bifotónica (**TPA**) consiste en la absorción simultánea de dos fotones de un haz que proveen de energía a una molécula para realizar una transición electrónica entre dos estados. A diferencia del proceso de absorción de un fotón descrito anteriormente, es posible promover electrones a estados superiores con fotones de la mitad de la energía necesaria para la transición. Los fotones absorbidos podrían ser de diferente longitud de onda o bien, provenir de haces distintos. Sin embargo, lo más común es que ambos fotones provengan de una misma fuente y sean de la misma degenerados. La condición de resonancia para absorción de dos fotones degenerados es:

$$E_f - E_i = 2h\nu \quad (3.16)$$

Fenomenológicamente, el proceso involucra la interacción de los dos fotones individuales con el material en cuestión. Podemos escribir una ecuación cinética para la población de moléculas en el estado excitado correspondiente a la colisión entre dos fotones y la molécula:⁴⁷

$$\frac{d[M^*]}{dt} = -\frac{1}{2} \frac{d[h\nu]}{dt} = k_2 [h\nu]^2 [M] \quad (3.17)$$

Donde $[M^*]$ y $[M]$ representa a la concentración de moléculas en el estado excitado y basal respectivamente, $[h\nu]$ la densidad de fotones en el medio y k_2 la constante de proporcionalidad. De acuerdo con la ecuación 3.17, el fenómeno sigue una cinética de tercer orden, con segundo orden en la densidad de fotones y primer orden en la concentración de la molécula en estado basal. Podemos convertir la densidad de fotones [fotones cm^{-3}] a flujo de fotones, ϕ [fotones $\text{cm}^{-3}\text{s}^{-1}$], y escribir una expresión para el número de fotones absorbidos por el medio por unidad de tiempo y volumen, $n_{h\nu}^{(2)}$:

$$n_{h\nu}^{(2)} = -\frac{d[h\nu]}{dt} = -\frac{d\phi}{dz} = k_2 \left[\frac{\phi}{c}\right]^2 [M] = \sigma_2 [M] \phi^2 \quad (3.18)$$

El término σ_2 es conocido como la sección o área transversal bifotónica con unidades de $\left[\frac{\text{cm}^4\text{s}}{\text{Fotón molécula}}\right]$. Los valores de sección transversal frecuentemente se reportan en unidades de Göppert Mayer ($1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4\text{s}$) en honor a Maria Göppert Mayer quien describió originalmente el fenómeno en 1931. La absorción bifotónica no puede ser observado con fuentes tradicionales de iluminación ya que se requiere un flujo intenso de fotones para favorecer la interacción simultánea de dos fotones con el cromóforo. El fenómeno de TPA fue observado hasta 1961 con el uso de fuentes de irradiación láser.

El número de moléculas excitadas por unidad de tiempo y volumen puede conocerse con la siguiente expresión derivada de la ecuación 3.17:

$$n_{M^*}^{(2)} = -\frac{d[M]}{dt} = \frac{1}{2} n_{h\nu}^{(2)} = \frac{1}{2} \sigma_2 [M] \phi^2 \quad (3.19)$$

Esta expresión asume que la concentración de moléculas en el estado basal, $[M]$, y el flujo de fotones, $[\phi]$ se mantienen constantes durante la duración de la excitación. Esta condición se

satisface si el número de fotones absorbidos por pulso es pequeño. Las fuentes de irradiación para óptica no lineal usualmente son láseres pulsados los cuales tienen perfiles gaussianos de intensidad de irradiación tanto espacial como temporalmente, y una solución completa de la ecuación 3.18 debe incluir este comportamiento. Sin embargo, es posible simplificar el tratamiento matemático al considerar que el haz de excitación tenga una intensidad constante en el espacio y que sea rectangular en tiempo. Estas aproximaciones no afectan en gran medida las estimaciones realizadas y se llega a resultados muy similares al realizar las soluciones numéricas de las ecuaciones diferenciales acopladas.⁴⁶ Integrando la expresión 3.19 a lo largo de la duración del pulso de excitación (τ) se tiene que:

$$n_{M^*}^{(2)}(\tau) = [M](1 - e^{-1/2\sigma_2\phi^2\tau}) \quad (3.20)$$

Esta expresión puede utilizarse para estimar el número de moléculas que alcanzan el estado excitado durante la duración del pulso, $n_{M^*}^{(2)}$, al conocer el coeficiente de absorción bifotónica y el flujo de fotones en la muestra.

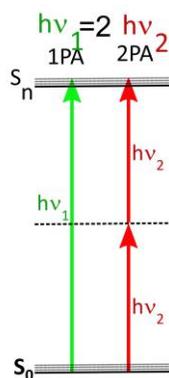


Figura 3.1. Diagrama de Jablonski simplificado del fenómeno de absorción bifotónica

La absorción simultánea de dos fotones puede ser visualizada como un proceso en dos pasos como se muestra en la Figura 3.1. El primer fotón absorbido induce la transición del sistema desde el estado basal Ψ_i^0 a un estado intermedio virtual. El estado virtual creado por la polarización del primer fotón es una superposición de un estado electrónico intermediario Ψ_m^0 y del estado electrónico basal Ψ_i^0 . La presencia del estado Ψ_m^0 en la superposición permite la absorción del segundo fotón para el sistema transitar a un estado electrónico real Ψ_f^0 .³⁸ En el formalismo de la teoría de perturbaciones dependientes del tiempo descrita en la sección anterior en la ecuación 3.8,

esto equivale a eliminar la aproximación en la cual asumimos que todos los coeficientes de estados diferentes al inicial y el final son siempre igual a cero y se considera la variación libre y población dinámica parcial de estos estados. La perturbación puede llevar a la acumulación de estados intermediarios los cuales pueden permitir la transición hacia el estado final. El estado intermedio virtual tiene una incertidumbre energética inmensa por lo que, de acuerdo con la relación de incertidumbre entre tiempo y energía, este estado virtual tiene un tiempo de vida ínfimo.⁴³ Por este motivo, la TPA es un proceso elemental y no debe considerarse una cascada de dos pasos monofotónicos.⁸

La estimación teórica del coeficiente de absorción bifotónica es posible al realizar una expansión del estado intermedio sobre todos los estados intermediarios posibles del sistema, similar a la ecuación 3.7, llegando a la siguiente expresión válida para la absorción de fotones degenerados:^{8,38}

$$\sigma_2(\omega) = \left(\frac{2\pi}{c}\right)^2 \frac{\omega^2}{6\epsilon_0^2 h^2} \frac{1}{\Gamma} \left| \sum_k \left[2 \frac{\mu_{ik}\mu_{kf}}{\omega_{ik} - \omega} \right] \right|^2 \quad (3.21)$$

Donde c es la velocidad de la luz, ϵ_0 es la permitividad del vacío, h la constante de Planck, Γ la anchura a media altura de la banda de TPA en unidades de energía, μ_{ik} el momento dipolar de transición entre el estado inicial i y algún estado intermedio k , μ_{kf} el momento dipolar de transición entre algún estado intermedio k y el estado final f y ω_{ik} fue definido anteriormente en la ecuación 3.11. Esta expresión se simplifica si consideramos que la TPA está dominado por la interacción con un único estado intermedio m , tal que:^{8,38}

$$\sigma_2(\omega) = \left(\frac{2\pi}{c}\right)^2 \frac{\omega^2}{6\epsilon_0^2 h^2} \frac{4}{\Gamma} \frac{\mu_{im}^2 \mu_{mf}^2}{(\omega_{mi} - \omega)^2} \quad (3.22)$$

De la ecuación 3.21 se concluye que la probabilidad de la transición dependerá fuertemente del momento dipolar de transición para cada una de las transiciones. Es decir, el fenómeno será favorable si las transiciones individuales monofotónicas $i \rightarrow m$ y $m \rightarrow f$ son fuertemente permitidas y entre más cerca se encuentre la luz a la condición de resonancia $\omega_{mi} = \omega$. Sin embargo, la TPA no se observa si la luz utilizada entra en la condición de resonancia favoreciéndose

la absorción lineal de un solo fotón sobre el proceso bifotónico. Por ello, es deseable usar fuentes pulsadas que se puedan ajustar con tal que la energía de excitación de los fotones sea ligeramente menor a alguna transición intermedia del sistema.

Las reglas de selección por simetría especial para la TPA son mutuamente excluyentes con las encontradas para la absorción de un solo fotón descritas en la sección anterior. Como ejemplo tomemos una molécula centrosimétrica con estados i, m y f de simetrías alternantes. En esta molécula, el estado basal, i , y el estado final, f , tienen simetría *gerade* (par) y el estado intermedio m presenta simetría *ungerade* (impar). Las transiciones $i \rightarrow m$ y $m \rightarrow f$ entre estados con diferente paridad están permitidas para un solo fotón mientras que la transición $i \rightarrow f$ entre estados con la misma simetría estaría prohibida. Sin embargo, esta transición $i \rightarrow f$ sería permitida por TPA y su intensidad dependerá de qué tan favorables sean las transiciones electrónicas de un solo fotón involucradas en el mecanismo.

El coeficiente de absorción bifotónica σ_2 es una propiedad molecular por lo que su magnitud depende de la estructura del cromóforo. El diseño de cromóforos bifotónicos eficientes está basado en utilizar motivos estructurales como grupos electrodonadores π (**D**), grupos electroaceptores π (**A**) y puentes π polarizables (π) en arreglos electrónicos que maximizan distribuciones de carga centrosimétrica como D π D, A π A, D π A π D, A π D π A, etc. En la literatura se observa que existe una correlación fuerte entre la TPA y el cambio en momento cuadrupolar eléctrico al realizarse la transición electrónica. Por lo tanto, las propiedades de TPA pueden optimizarse al aumentar el grado de desplazamiento de carga utilizando grupos electrodonadores y electroattractores fuertes y aumentando la longitud de conjugación π .^{8,38,48–50}

La TPA presenta un esquema novedoso para el diseño de sistemas responsivos que pueden aprovechar al máximo las ventajas de este fenómeno sobre la absorción monofotónica. El proceso de TPA solo será significativo en el punto focal de la fuente de irradiación debido a la dependencia cuadrática de este con la irradiancia. La TPA puede restringir los eventos de excitación al volumen focal ($\sim 1 \mu\text{m}^3$) de un pulso láser incidente lo que concede gran control espacial al fenómeno sin alteración al medio circundante (Figura 3.2). Algunas situaciones en las que la localización de la excitación por TPA se ha explotado son: la microfabricación de dispositivos electrónicos,⁵¹ fotolitografía para microelectrónica,⁵² almacenamiento óptico de información con ultra alta densidad⁵³ y microscopía de fluorescencia bifotónica.^{50,54–56}

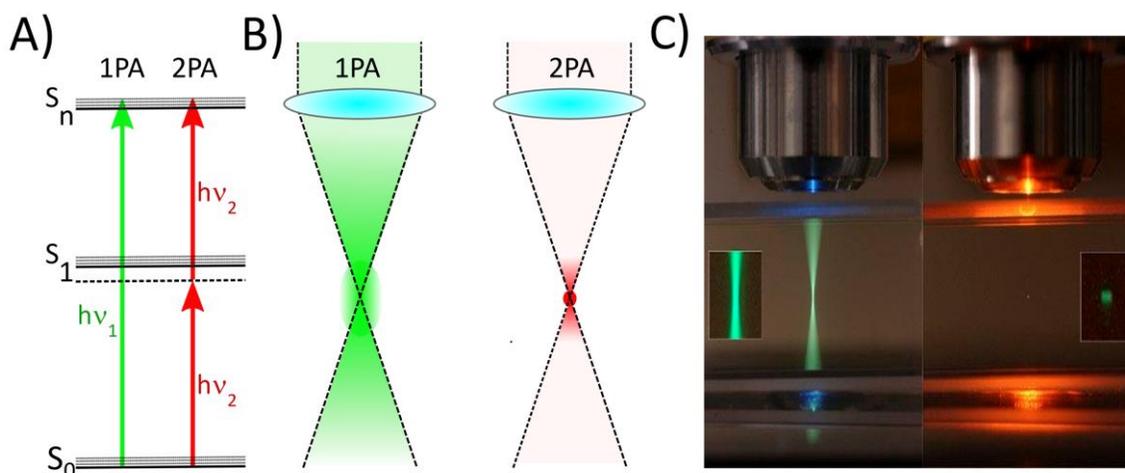


Figura 3.2. Comparación absorción monofotónica (1PA) y absorción bifotónica (TPA). A) Diagrama de Jablonski para ambos procesos donde $h\nu_1(1PA) = 2h\nu_2(2PA)$. B) Localización espacial de los eventos de excitación. C) Fluorescencia de una muestra excitada por ambos procesos ópticos. Izq.: Excitación a 480 nm (1PA). Der: Excitación a 800 nm (TPA).⁷

La TPA es especialmente útil en aplicaciones sensibles a fotones con longitud de onda corta al utilizar fotones con la mitad de la energía los cuales pueden ser absorbidos exclusivamente por el cromóforo de interés sin esparcimiento de la irradiación por interacción con el medio circundante. Esta propiedad de la excitación bifotónica ha sido explotada en esquemas de catálisis fotoredox,⁵⁷ fotofarmacología, terapia fotodinámica,^{58,59} microscopía de fluorescencia TPA,^{50,54-56} sondas moleculares bifotónicas,⁴⁹ microfabricación de estructuras biocompatibles,^{52,60} fotoliberación de fármacos,⁶¹⁻⁶⁵ entre otras. En particular, el diseño de cromóforos bifotónicos ha captado bastante interés para aplicaciones biológicas ya que permite la excitación de cromóforos en el intervalo de transparencia biológica (650—900nm) con mayor penetración en tejidos y menor fotodaño a las estructuras celulares.⁶⁶

El diseño de cromóforos bifotónicos eficientes requiere un cuidadoso control de la estructura electrónica de la molécula ya que, si no se satisfacen las variables de diseño, se puede entorpecer su funcionamiento en los esquemas mencionados. El presente trabajo busca ofrecer una alternativa modular que desacople la optimización de las propiedades ópticas y las de respuesta del sistema fotoquímico en cuestión al estar estas propiedades localizadas en cromóforos independientes que solo interactúan por transferencia de energía después de la excitación del cromóforo antena.

3.3. Procesos Fotofísicos De Desactivación De Estados Excitados^{10,44,67}

El destino de la energía absorbida por un cromóforo determinará la fotoquímica observada tras la excitación electrónica por uno o más fotones. La energía en exceso del estado electrónicamente excitado puede ser disipada al medio por procesos unimoleculares radiativos o no radiativos, transferida a otras moléculas por procesos bimoleculares o utilizada para promover reacciones químicas. La proporción de eventos de excitación que se relajan por un mecanismo específico se define como el rendimiento cuántico del proceso, Φ . Por ejemplo, para el rendimiento cuántico de fluorescencia:

$$\phi_F = \frac{n_{Fluo}}{n_{exc}} \quad (3. 23)$$

Donde n_{Fluo} representa al número de moléculas en el estado excitado que se relajan por emisión de un fotón y n_{exc} representa al número total de eventos de excitación. La relajación del estado excitado no ocurre por un único mecanismo si no que todos los procesos posibles se encontraran en competencia cinética entre sí por lo que el rendimiento de cada fenómeno dependerá de su velocidad relativa. Utilizando el mismo fenómeno de fluorescencia como ejemplo, se tiene la siguiente expresión:

$$\phi_F = \frac{k_{Fluo}}{k_{Fluo} + k_{No Radiativa}} \quad (3. 24)$$

Donde k_{Fluo} es la constante de velocidad del proceso de fluorescencia en unidades de tiempo⁻¹ y $k_{No Radiativa}$ engloba a todos los otros procesos de desactivación no radiativos diferentes a la fluorescencia como conversión interna, cruce intersistema, transferencia de energía, reacciones químicas, etc. La dinámica de desactivación de estados excitados se representa visualmente utilizando diagramas de Jablonski como el mostrado en la Figura 3.3. A continuación se dará una descripción conceptual de algunos de los procesos de desactivación unimolecular que serán de importancia para el presente trabajo.

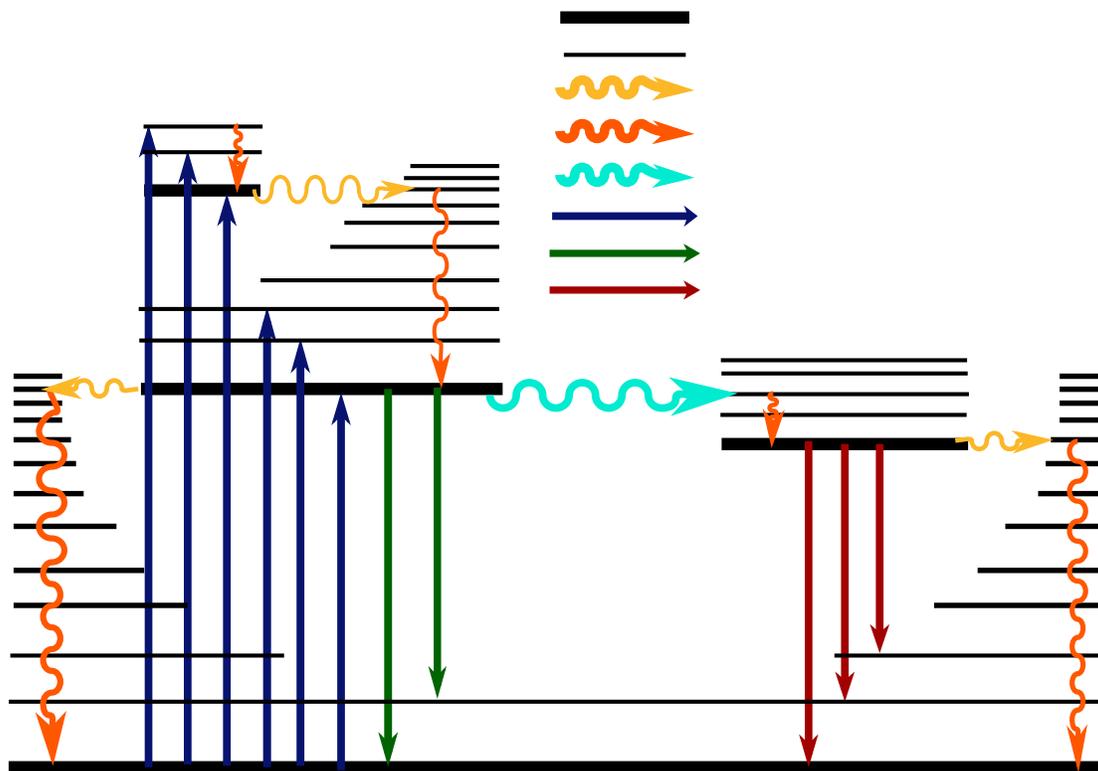


Figura 3.3. Diagrama de Jablonski típico de los procesos fotofísicos de desactivación de estados excitados.

1. Relajación Vibracional (RV): La absorción de un fotón lleva a la molécula a un estado electrónicamente excitado en una configuración de no equilibrio en la que sus átomos y el disolvente circundante no han reaccionado a la nueva distribución electrónica de acuerdo con el principio de Frank-Condon. La redistribución de las moléculas del disolvente es un proceso ultrarrápido que ocurre en tiempos de sub-ps y es función del disolvente. Además, como se muestra la Figura 3.3, la absorción puede colocar al sistema en un estado vibracionalmente excitado del estado electrónico en cuestión. La relajación al estado vibracional basal del estado electrónico puede proceder rápidamente por medio de colisiones con el medio en disolución. Este es un proceso no radiativo que resulta en el calentamiento del medio y relajando la molécula al estado basal vibracional del estado electrónico en el que se encuentra. Además, es posible la relajación vibracional del estado excitado al redistribuir la energía de exceso a otros modos vibracionales excitados por un proceso conocido como redistribución vibracional intramolecular. Sin importar el mecanismo exacto, la relajación vibracional es un proceso ultrarrápido que ocurre en una escala de sub-ps con constantes cinéticas $k_{RV} \geq 10^{13} \text{s}^{-1}$.⁴⁴

2. Conversión Interna (CI): Es un proceso isoenergético no radiativo que ocurre por el acoplamiento vibrónico entre dos niveles vibrónicos de igual energía de diferentes estados electrónicos de la misma multiplicidad de espín. De acuerdo con la ley de la brecha de Englman y Jortner, la velocidad del proceso depende de la diferencia energética entre los estados electrónicos involucrados.⁶⁸ La velocidad de relajación por CI de estados excitados superiores hacia el primer estado excitado de igual multiplicidad es un proceso ultrarrápido que ocurre en escalas de tiempo de sub-ps con constantes cinéticas típicamente de 10^{14} s^{-1} . El proceso de CI de estos estados es mucho más rápido que cualquier otro proceso fotoquímico debido a la congestión elevada de estados excitados cercanos en energía por lo que usualmente este es el mecanismo hegemónico de relajación. Esta característica da origen a la regla de Kasha o Kasha-Vavilov que dicta que cualquier proceso fotofísico ocurre apreciablemente solo desde el estado excitado de menor energía de una multiplicidad dada, sin importar cual es el estado excitado inicial.³⁵ Además, esta regla también indica que el rendimiento cuántico de cualquier proceso tenderá a ser independiente de la longitud de onda de excitación.³⁴

La conversión interna hacia el estado electrónico basal desde el estado excitado de menor energía (S_1) es un proceso relativamente más lento debido a la brecha energética entre los estados. Típicamente, la CI entre los estados S_1 y S_0 ocurre en una escala de tiempo de ns con constantes cinéticas usuales, $k_{CI} < 10^8 \text{ s}^{-1}$. Existen excepciones a este comportamiento general en el que la CI hacia el estado basal es un proceso ultrarrápido en escalas de tiempo del orden de femtosegundos. Este comportamiento anómalo se debe a la presencia de regiones de gran cercanía entre las superficies de energía potencial del estado basal y del estado excitado conocidas como intersecciones cónicas. Un famoso ejemplo ocurre en las bases nitrogenadas del ADN donde la CI ocurre en tiempos menores a un picosegundo.⁶⁹ Esta característica probablemente protege la información almacenada del posible fotodaño en el estado excitado.

3. Cruce intersistema (CIS): Transición no radiativa entre estados excitados de diferente espín electrónico. Estas transiciones están formalmente prohibidas por espín electrónico. En general, esta transición electrónica será considerablemente más lenta que otras no prohibidas por spin, ocurriendo en una escala de tiempo muy variable con constantes cinéticas en el intervalo de 10^5 - 10^9 s^{-1} . Sin embargo, de acuerdo con las reglas de El-Sayed, el proceso podría tener una probabilidad apreciable si la transición involucra estados con diferente simetría orbital, por ejemplo

$^1(\pi, \pi^*) \rightarrow ^3(n, \pi^*)$ como las encontradas en grupos carbonilos y nitroaromáticos los cuales pueden relajarse rápidamente por CI con constantes cinéticas de hasta 10^{14} s^{-1} .^{70,71}

4. Fluorescencia: Es un proceso radiativo en el que una molécula se relaja al estado electrónico basal con emisión de un fotón cuya energía corresponde a la diferencia energética entre los estados. De acuerdo con la expresión de Einstein para la probabilidad de emisión espontánea, se tiene que la constante de velocidad característica para el proceso es $k=10^9 \text{ s}^{-1}$.⁴⁴ La velocidad del proceso es independiente de la temperatura y se ve solo ligeramente afectada por la polaridad del medio. El proceso de fluorescencia de estados superiores ($S_n, n>1$) suele obedecer la regla de Kasha debido a su menor velocidad comparada a los procesos no radiativos mencionados con anterioridad. El reacomodo de la esfera de solvatación de la molécula estabiliza al estado excitado inicialmente formado por lo que la energía del fotón emitido es menor que la energía del fotón inicialmente absorbido por la molécula. La diferencia energética se puede estimar como la diferencia entre los máximos de los espectros de absorción y emisión conocida como desplazamiento de Stokes. La separación entre las bandas de absorción y emisión es un parámetro de desempeño importante para las técnicas de microscopía de fluorescencia ya que permiten mayor sensibilidad de la técnica al reducir la proporción de señal y ruido detectada. La magnitud del desplazamiento será función del grado de reacomodo de la esfera de solvatación por lo que transiciones que involucren un gran movimiento de la densidad electrónica presentaran desplazamientos de Stokes significativos.

5. Fosforescencia: Es un proceso de desactivación radiativo que involucra el decaimiento desde un estado excitado con diferente multiplicidad al estado receptor, por ejemplo, $T_1 \rightarrow S_0$. Es una transición prohibida por spin por lo que será considerablemente lenta al igual que el CIS y sigue las mismas reglas de El-Sayed.

La relajación de los estados excitados superiores por RV y CI suelen ser los fenómenos de desactivación más rápidos, lo que da lugar a la regla de Kasha-Vavilov anteriormente descrita. Sin embargo, algunos procesos ultrarrápidos pueden llegar a tener velocidades similares o mayores por lo que pueden ocurrir antes de la relajación de estos estados excitados al contrario de lo esperado por esta regla. Ejemplos de estos procesos ultrarrápidos son algunas reacciones de transferencia electrónica, reacciones de transferencia de protón y reacciones fotocromáticas como isomerizaciones a través de intersecciones cónicas, rupturas de enlaces y cruce intersistema, entre otros.¹⁰ Algunos de estos fenómenos han sido estudiados por nuestro grupo de investigación con técnicas

espectroscópicas con alta resolución temporal como absorbancia transitoria y suma de frecuencias de fluorescencia (*up-conversion*). También es posible observar comportamiento “antikasha” si la desactivación de estados excitados por RV y CI ocurre de manera inusualmente lenta. El ejemplo clásico es el azuleno donde la fluorescencia detectada proviene principalmente desde el estado S_2 ya que la CI es un proceso lento debido a la gran brecha energética entre los estados $S_2 \rightarrow S_1$ de 1.9 eV.

El diseño de sistemas con fotofísica antikasha permitiría reducir pérdidas energéticas hacia el medio y explotar la energía de excitación completa en esquemas fotoquímicos.⁶⁷ De particular interés para el presente trabajo de diseños modulares antena bifotónica-efector requiere que el cromóforo antena presente un comportamiento antikasha para poder explotar la energía completa del evento de excitación bifotónica sin CI hacia el estado S_1 de la antena.

3.4. Fotocromismo e Interruptores Moleculares Fotoactivables

La sección anterior describió una serie de mecanismos de relajación de estados excitados que liberan la energía de exceso hacia el medio sin modificar la estructura del cromóforo. Sin embargo, algunas sustancias pueden sufrir transformaciones químicas que proceden desde la superficie de energía potencial del estado excitado con subsecuente liberación de la energía de exceso. Las reacciones fotoinducidas pueden ser reversibles o irreversibles.

Las reacciones fotoinducidas irreversibles usualmente involucran la fragmentación de la molécula en varios componentes. Algunos ejemplos de estas reacciones son la fotoreducción de grupos carbonilos y la fotoliberación de N_2 proveniente de azoalcanos y azidas.⁴⁵ Estas reacciones han sido utilizadas para desarrollar técnicas como el marcaje de fotoafinidad en biología que aprovechan los intermediarios altamente reactivos para unir marcadores y así poder identificar sitios de unión desconocidos en proteínas, dinámicas de plegamiento y auxiliar en la elucidación de estructuras en disolución.⁷² Existe otro grupo de cromóforos que se han investigado por sus reacciones fotoquímicas para poder diseñar grupos protectores fotolábiles en las que, por un mecanismo concertado, se fragmenta una molécula sin generar especies altamente reactivas. Por ejemplo, las cumarinas, derivados del pireno y nitroarilos son capaces de liberar cargas moleculares con gran precisión y han sido investigados como acarreadores moleculares con gran precisión espacial de la actividad, especialmente en biología para liberación de fármacos.^{59,62,73,74}

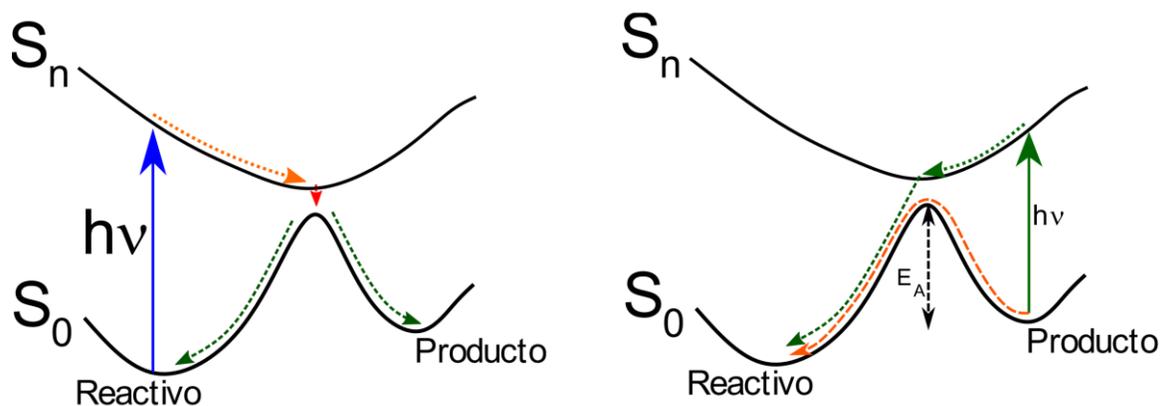


Figura 3.4. Esquema simplificado de las superficies de energía potencial involucradas en especies fotocromáticas. Izquierda: Mecanismo de isomerización reactivo->producto. Derecha: Isomerización reversa producto->reactivo.

Las reacciones fotoquímicas reversibles usualmente son reacciones de isomerización. Los isómeros existen en la misma superficie de energía potencial y se puede transitar de una forma a otra a través de un estado electrónico excitado como se muestra en la Figura 3.4. Esta posibilidad puede ser considerada como una variación de la CI donde, dependiendo de la geometría del estado excitado en la que se realice el cruce hacia la superficie basal, el proceso puede ser no reactivo y llegar al estado basal del reactivo original o puede ser reactivo y generar una nueva sustancia en su estado basal. Este fenómeno de isomerización fotoinducida se conoce también como fotocromismo ya que usualmente viene acompañado de cambios significativos del espectro de absorción del sistema.

En términos generales, los compuestos fotocromáticos se clasifican en dos grupos dependiendo del método de reconversión a la especie termodinámicamente estable: En el fotocromismo tipo P la reacción reversa ocurre solo preferentemente debido a la absorción de luz por lo que el sistema es biestable y la especie generada tiene un tiempo de vida extremadamente largo mientras que en el fotocromismo tipo T la reacción reversa puede ocurrir térmicamente y el tiempo de vida de la especie generada dependerá del tamaño de la barrera de activación.⁷⁵

Las reacciones fotocromáticas usualmente involucran la isomerización de enlaces y reacciones de cicloadición como se muestra en la Figura 3.5. La fotoisomerización por absorción de luz induce cambios importantes en la geometría, polaridad de la estructura y espectro de absorción debido a cambios en el sistema conjugado del cromóforo. La transformación localizada de estos sistemas se ha utilizado para el control de nanosistemas al modificarse la forma en que estos cromóforos

interactúan con el medio circundante. Estos compuestos con respuesta reactiva a la luz reversible se les conoce como interruptores moleculares por su capacidad de transitar de un estado a otro tras absorción de luz. El desarrollo de interruptores moleculares es un área activa de investigación y de gran interés general, siendo el premio nobel de química de 2016 otorgado a J. Sauvage, F. Stoddart y B. Feringa por impulsar el desarrollo de máquinas moleculares. Los interruptores moleculares se han utilizado para el control de nanoreactores, la activación de fluorescencia para microscopía de localización fotoactivada, la propulsión de motores moleculares y el control de canales proteicos entre otras múltiples aplicaciones.⁷⁶ El desempeño de interruptores moleculares se caracteriza con los siguientes parámetros: ⁴¹

- 1) Rendimiento cuántico de fotoisomerización (ϕ_{isom}).
- 2) Estabilidad térmica relativa de los isómeros.
- 3) Abundancia relativa de los isómeros en el estado fotoestacionario.
- 4) Reproducibilidad y resistencia a fatiga.
- 5) Longitud de onda de excitación (λ_{exc}).

El primer caso de fotocromismo a abordar es el ocasionado por la isomerización de un doble enlace C=C o N=N de olefinas y azocompuestos respectivamente. La fotoisomerización de estos cromóforos ocurre a través de una intersección cónica entre las superficies de energía potencial por lo que este es un fenómeno ultrarrápido el cual puede ocurrir en decenas de femtosegundos.⁷⁷ Las olefinas son cromóforos ubicuos en la naturaleza y se incorporan en los centros de respuesta a la luz al detectar la isomerización al absorber un fotón. Por ejemplo, el 11-*cis*-retinal se incorpora a las rodopsinas, las proteínas responsables de la visión en organismos multicelulares, y es un ejemplo perfecto para ilustrar el impacto del fotocromismo a nivel microscópico. Al absorber un fotón, el retinal fotoisomeriza hacia su forma "*todo-trans*" lo cual introduce un cambio conformacional de la proteína y ocasiona una cascada de señalización que es interpretado por el sistema nervioso.⁷⁸ Olefinas isomerizables derivadas del estilbena han sido introducidas como interruptor molecular para el control de sistemas catalíticos, ensamblaje supramolecular y en sistemas fotoactivables huésped-anfitrión.⁷⁹ Los anillos aromáticos en los extremos de la insaturación convierten al estilbena en sustancias químicamente estables, de síntesis sencilla y fácil funcionalización. El estilbena es un ejemplo de sistema biestable con fotocromismo tipo P ya que la cinética del proceso inverso es extremadamente lenta por un mecanismo térmico el cual involucra la ruptura del enlace doble C=C en el estado de transición y es susceptible al impedimento estérico de los sustituyentes.

Por otro lado, los azocompuestos han sido ampliamente utilizados como colorantes por sus excelentes propiedades ópticas y su fotocromismo será descrito con mayor profundidad en una sección posterior de la presente tesis.

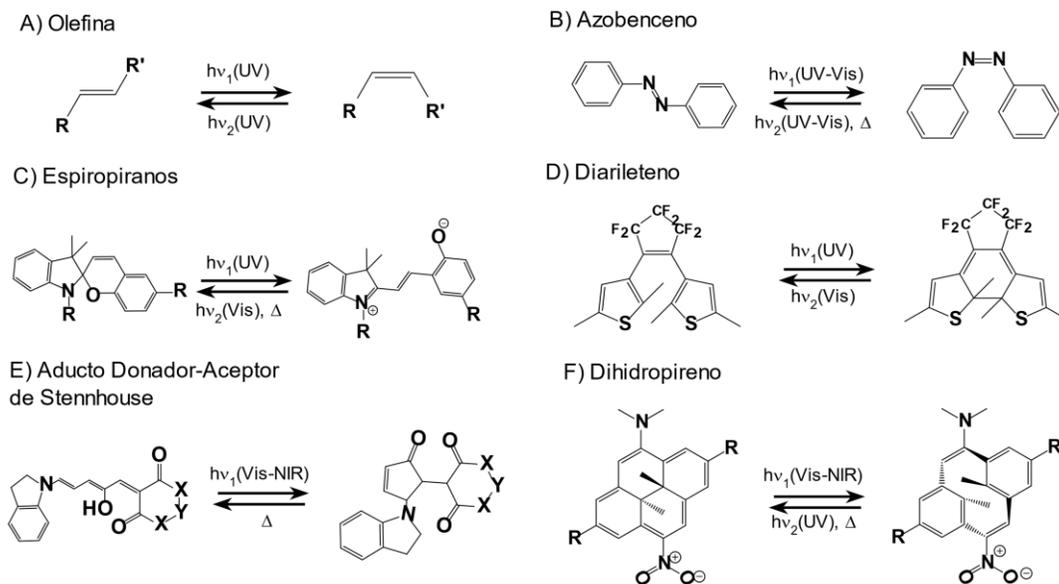


Figura 3.5. Especies fotocromicas representativas.

A diferencia de los interruptores con enlaces isomerizables, el fotocromismo de espiropiranos y diariletenos involucra la ruptura reversible de enlaces en el cromóforo. En ambos casos, la transformación química consiste en transitar de una estructura con sistemas π aromáticos aislados a una estructura con un sistema π altamente conjugado lo que conlleva a un fuerte desplazamiento batocrómico de la absorción del ultravioleta al visible. El mecanismo de fotoisomerización del espiropirano consiste en la ruptura rápida (decenas de ps)¹⁰ heterolítica del enlace C-O en el estado excitado y un posterior reacomodo estructural dando como resultado una merocianina. Además del cambio en sus propiedades ópticas, el proceso de fotoisomerización espiropirano-merocianina ocasiona variaciones drásticas en el pKa del compuesto por lo que este interruptor molecular ha tenido considerable éxito como fotoácido para el control de nanosistemas sensibles a estímulos ácido-base.⁸⁰ Estos compuestos presentan una barrera de activación pequeña para la reacción reversa lo cual limita la aplicación generalizada de este fotointerruptor por los tiempos de vida cortos de la especie generada.⁷⁶ El fotocromismo del diarileteno consiste en una reacción electrocíclica del motivo estructural hexatrieno en el centro del cromóforo. Este interruptor se comporta como un sistema biestable con tiempos de vida largos de hasta varios años debido a la

estructura altamente energética del estado de transición. Por esta razón el diarileno se ha propuesto para sistemas de almacenamiento de información molecular.⁷⁶

La implementación de los fotointerruptores anteriormente mencionados está limitada por el uso de luz con longitud de onda en el ultravioleta para iniciar el proceso de interconversión la cual es fácilmente dispersada o absorbida por el medio comparada con luz de longitud de onda mayor. Una alternativa es el desarrollo de nuevos cromóforos fotocromicos con luz en el visible-infrarrojo cercano como los aductos de Stenhouse y los dihidropirenos. Los aductos donador-aceptor de Stenhouse presentan fotocromismo negativo (colorido->incoloro) con importantes cambios en la estructura y polaridad de la molécula (extendido/hidrofóbico -> compacto/hidrofílico) los cuales pueden iniciar procesos de agregación de nanopartículas.⁸¹ Modificaciones al grupo electroattractor ($X=N$ y $Y=C::O$) recorren la absorción del cromóforo al infrarrojo cercano sin alterar sus propiedades como interruptor.⁸² El mecanismo de transformación involucra una isomería $E \rightarrow Z$ de la olefina central lo que permite una reacción electrocíclica conrotatoria de 4 electrones π .⁸³ De manera similar, el derivado de hidropireno mostrado en la Figura 3.5 presenta fotocromismo negativo con importante absorción en el infrarrojo y se ha demostrado la conversión eficiente del sistema al irradiar con $\lambda > 800$ nm.⁸⁴ Ambos cromóforos representan alternativas interesantes para el desarrollo de nuevos sistemas fotoactivables, sin embargo, aún es necesaria mucha exploración para determinar la capacidad de estos diseños.

3.5. Azocompuestos

Los azobencenos y sus derivados han sido históricamente utilizados como colorantes industriales debido a la gran diversidad de tonalidades fácilmente accesibles y su fácil síntesis en medios acuosos.⁸⁵ El espectro de absorción de los azocompuestos presenta dos transiciones importantes como se muestra en la Figura 3.6: La transición de menor energía $S_0 \rightarrow S_1$ corresponde a una transición $n \rightarrow \pi^*$ poco permitida en el visible mientras que la segunda transición $S_0 \rightarrow S_2$ es fuertemente permitida en el UV al tratarse de una transición $\pi \rightarrow \pi^*$.

Además de su uso como colorante, los azobencenos han sido de gran interés reciente como especies fotocromicas debido a su doble enlace azoico, $N=N$, fotoisomerizable. El isómero térmicamente estable es el isómero E el cual puede isomerizarse al isómero Z tras la absorción de un fotón. El importante cambio de geometría entre los isómeros los hace candidatos excelentes para

interruptores moleculares. La fotoisomerización de azocompuestos se ha utilizado para el control externo sobre procesos como en sistemas de liberación de fármacos,^{11–14} catálisis modulable,^{15,16} almacenamiento de datos,¹⁷ almacenamiento de energía,¹⁸ polímeros responsivos,^{19–21} y máquinas moleculares.^{22,23}

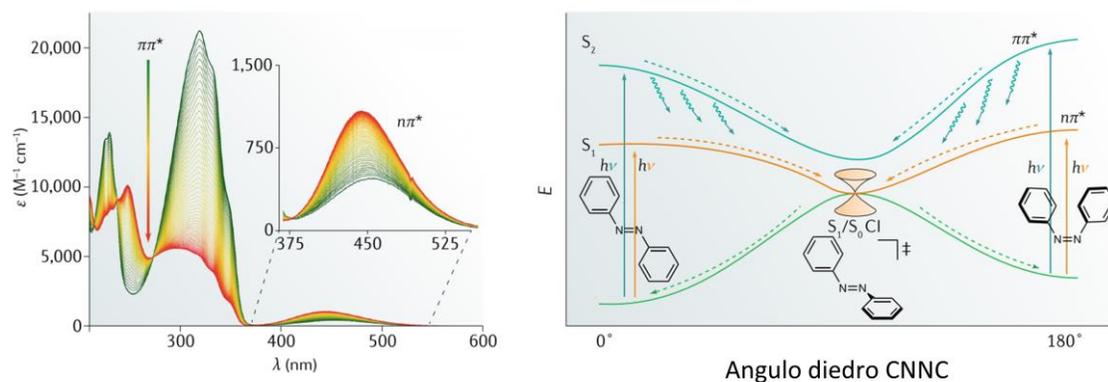


Figura 3.6. Fotoquímica característica de los azobencenos. Izquierda: Espectro de absorción del azobenceno. Derecha: Mecanismo de fotoisomerización del azobenceno. Imagen adaptada de la literatura.⁴¹

La fotoisomerización $E \rightarrow Z$ de la insaturación procede por un mecanismo complejo esquematizado en la Figura 3.6 que involucra la torsión de uno de los anillos aromáticos o la rotación del enlace N-N tras la ruptura formal de la insaturación en el estado excitado.⁸⁶ La sustitución de alguno de los grupos arilo por un fragmento heteroaromático de menor tamaño podría permitir diferentes geometrías en el mecanismo de fotoisomerización y dar lugar a comportamientos diferentes a los esperados para el azobenceno.⁴¹ El mecanismo de fotoisomerización en concreto depende del estado excitado alcanzado por lo que los azobencenos no siguen la regla de Kasha-Vavilov y el rendimiento cuántico de isomerización depende de la longitud de onda de excitación. La fotoisomerización desde cualquiera de los estados excitados es un proceso ultrarrápido que ocurre en escalas de tiempo sub-ps via intersecciones cónicas con el estado basal por lo que es un mecanismo principal de desactivación del estado excitado con mínima fluorescencia.¹⁰

Los azocompuestos presentan fotocromismo tipo T al ser posible el regreso al isómero E por un proceso térmico o por un proceso fotoinducido al ser irradiada la especie Z generada. El tiempo de vida del isómero Z dependerá de la magnitud de la barrera térmica de inversión $Z \rightarrow E$ y del mecanismo de la reacción. El mecanismo de la isomerización espontánea depende de la polaridad y viscosidad del medio, así como de las características estructurales del azocompuesto en cuestión.

Algunas posibilidades se presentan en la Figura 3.7. No existe un tiempo de vida universalmente ideal y se ha trabajado constantemente en buscar efectores que operen en un amplio intervalo de tiempos de isomerización $Z \rightarrow E$ (térmica): desde picosegundos,²⁰ nanosegundos,⁸⁷⁻⁸⁹ segundos, minutos,^{41,90} horas, días,⁸⁸ e incluso años.⁹¹ Esta versatilidad ha permitido implementar efectores basados en azobencenos para el control de procesos biológicos, los cuales ocurren en escalas variables de tiempo.²⁵ Los espectros de absorción de los isómeros E y Z tienen cierto grado de traslape por lo que la iluminación de la muestra puede inducir ambos procesos de fotoisomerización hasta alcanzarse una condición de equilibrio dinámico conocido como estado fotoestacionario (**EFE**). El grado de traslape y el tiempo de vida del isómero Z determina el grado de conversión posible en el EFE. La isomerización en ambas direcciones no introduce fotodaño y el cromóforo puede ser capaz de realizar incluso miles de ciclos de isomerización sin mostrar signos evidentes de fatiga.⁸⁹

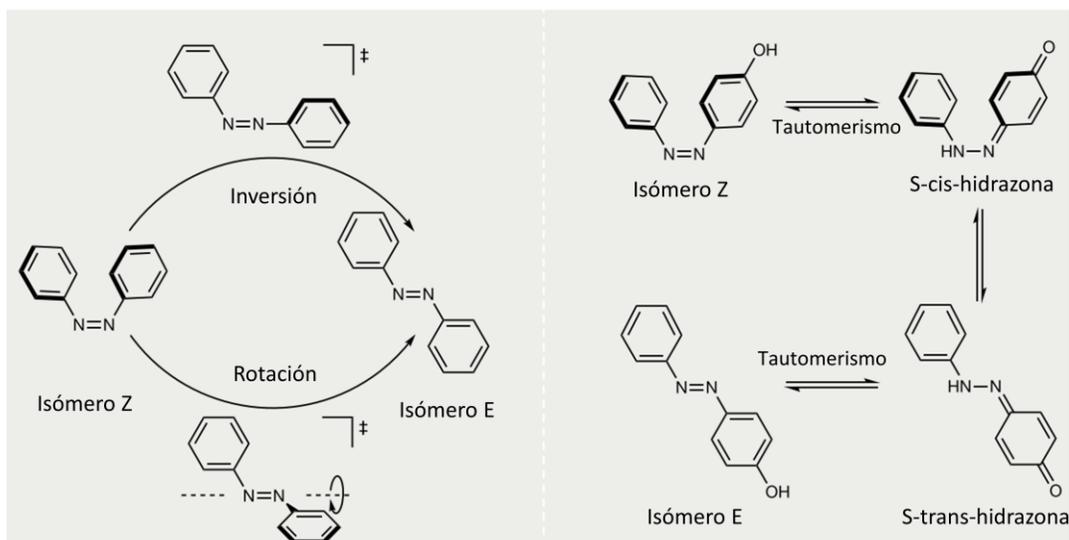


Figura 3.7. Posibles mecanismos para la isomerización espontánea $E \rightarrow Z$ de azocompuestos. Imagen adaptada de la literatura.⁴¹

Las características fotoquímicas del azobenceno como interruptor molecular lo convierten en el fragmento responsivo más comúnmente utilizado en fotofarmacología. La fotofarmacología consiste en la introducción de una unidad fotocromática en la estructura de un compuesto bioactivo para poder modular su actividad biológica con estímulos externos precisos.⁹³ El interruptor molecular puede ser introducido en la periferia de la estructura o sustituir secciones del

farmacóforo como un bioisómero¹ fotoactivable como se muestra en la Figura 3.8 para la fotoestatina. ⁹⁴ De acuerdo con un artículo de revisión publicado por Trauner,²⁴ el azobenceno es la unidad responsiva a la luz en más del 90% de todos los fotofármacos desarrollados con interesantes casos de éxito como el fototrexato (derivado del metotrexato)⁹⁵, las fotoestatinas (derivados de la combrestatina)⁹² y el azofloxacino (derivado del ciprofloxacino)⁹⁴ entre otros. El azobenceno funciona como bioisostero de motivos estructurales frecuentes en farmacóforos como olefinas, amidas, bencil éteres y bencilaminas por lo que su inclusión no afecta gravemente la actividad biológica de estos compuestos. ⁹⁶ Sin embargo, el uso de azocompuestos en aplicaciones biológicas se encuentra limitado al requerir irradiación en la región ultravioleta del espectro, la cual puede conducir a fototoxicidad generalizada. Tan solo 4 de los 123 fotofármacos mencionados en el artículo de revisión de Trauner demuestran isomerización en el intervalo de transparencia biológica del infrarrojo cercano, lo cual indica una evidente necesidad de desarrollar derivados del azobenceno con absorción en esta región espectral. ²⁴

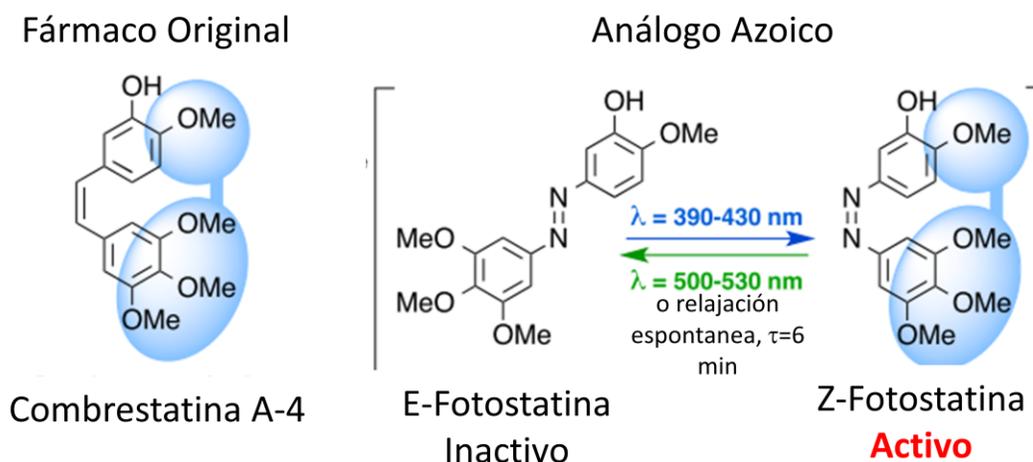


Figura 3.8. Modificación bioisostérica de la combrestatina A-4.⁹² La sustitución de la olefina por el fragmento azoico permite la reconstrucción del farmacóforo (marcado en azul para los compuestos) solo en el isómero Z permitiendo así la activación de la respuesta biológica tras la isomerización fotoinducida.

La primera aproximación es la introducción de patrones de sustitución Donador—Aceptor en los extremos del azobenceno (Sistemas *push-pull* o pseudoestilbeno). Estos auxocromos desplazan el

¹ Bioisómero: Grupos funcionales que no alteran la actividad biológica de una estructura al ser intercambiados entre sí. ¹⁸⁰

espectro de absorción hacia el rojo al disminuir la energía de la transición $\pi-\pi^*$ e incluso llegar a traslapar esta banda con la banda $n-\pi^*$ de menor energía.⁹⁰ La principal desventaja de este diseño es que se favorecen formas tautoméricas tipo hidrazona, lo cual limita la eficiencia de fototransformación. El isómero Z de estos compuestos *push-pull* usualmente tiene un tiempo de vida extremadamente breve al haber giro libre del enlace N-N en el tautómero hidrazona que lo revierte rápidamente a la forma térmicamente más estable.^{87,89,90} Estos azocompuestos pueden ser utilizados en sistemas que requieren respuestas rápidas y reversibles como para la transmisión de información, control de proteínas de membrana y posibles tratamientos contra la ceguera pero no en diseños que requieran tiempos largos de permanencia del isómero Z.^{24,89,97} Otra alternativa investigada es la incorporación de sustituyentes en posición *orto* al grupo azoico como metoxi, fluor y cloro. Esta aproximación busca alterar directamente la densidad electrónica del grupo azoico e inducir un fuerte desplazamiento batocrómico hacia el visible.^{98,99} A diferencia de azobencenos *push-pull*, esta aproximación conduce a un aumento a la barrera de inversión por impedimento estérico por lo que no se afecta negativamente el tiempo de vida del isómero generado.

A pesar del amplio abanico de variaciones de azobencenos, estos diseños moleculares se encuentran limitados al núcleo aromático de benceno. La inclusión de anillos aromáticos heterocíclicos expande la diversidad estructural e introduce una gran variedad de perfiles estéricos y electrónicos.⁴¹ La inclusión de anillos de 5 miembros como pirrol, tiofeno e imidazol ha sido de gran interés por el carácter electrodonador del anillo π -excesivo y su menor tamaño respecto al benceno. Estos derivados heteroaromáticos presentan características electrónicas similares a los pseudoestilbenos en los que la banda de la transición $\pi-\pi^*$ se encuentra desplazada hacia el rojo y queda sobrepuesta a la banda correspondiente a la transición $n-\pi^*$ formalmente prohibida. Otra característica interesante de estos azocompuestos es que el menor tamaño del anillo permite alcanzar geometrías que estabilizan al isómero Z por interacciones no covalentes.^{42,91} De esta manera, se han desarrollado interruptores con fotocromismo en el visible que permanecen en la forma Z por periodos prolongados de incluso hasta varios años.¹⁰⁰ La inclusión de unidades vinílicas o bifenilo en configuraciones *push-pull* se ha utilizado para extender la conjugación del sistema e intensificar el desplazamiento batocrómico de estos diseños.^{28,101} Los esquemas de diseño anteriormente mencionados han logrado tener variaciones de azocompuestos con fotocromismo en el visible, sin embargo, ninguno de estos diseños alcanza la meta de fotocromismo en el infrarrojo

cercano. Existen otras alternativas como la protonación y la coordinación de boro sobre el grupo azoico, pero la fotoisomerización de estos compuestos no se ha estudiado a detalle.¹⁰²⁻¹⁰⁴

El problema de la longitud de onda de excitación podría eludirse si se diseñaran sistemas con fotocromismo iniciado por eventos de excitación bifotónica con luz en el infrarrojo cercano. Lamentablemente, los azocompuestos no son los mejores compuestos en términos de sus propiedades ópticas no lineales al tener valores de sección transversal de absorción bifotónica de hasta 10 GM.²⁸ Aunque existen algunos ejemplos en la literatura de azocompuestos diseñados para este fin con $\sigma_2=10^2-10^3$ GM, estos diseños están restringidos a arquitecturas con motivos dipolares o centrosimétricos cuadrupolares optimizados. Esta condición limita su uso generalizado en aplicaciones biológicas al no ser modificaciones menores de sustancias activas.³⁰

La propuesta presentada en el presente trabajo consiste en un diseño que incorpore la excitación bifotónica indirecta de azocompuestos. Esta aproximación involucra un diseño modular en el que las propiedades de absorción bifotónica se localizan en una sección y transfiere la energía de excitación a otro cromóforo responsable de la respuesta dentro de la misma molécula. En la literatura existen solo algunos ejemplos que se asemejan a nuestro diseño modular, lo cual señala la importancia de trabajar en esta alternativa. Como ejemplos de diseños previos, Kovalenko y Hecht utilizaron un fragmento triarilamina para sensibilizar la isomerización bifotónica $Z \rightarrow E$ de un azobenceno sin embargo los bajos valores de σ_2 de la antena fue una limitante importante del sistema.^{105,106} Por otro lado, Croissant introdujo fluoróforos bifotónicos derivados del paraciclofano en nanopartículas de silica mesoporosa cubiertas de válvulas modificadas con azocompuestos para la liberación bifotónica en el infrarrojo de la carga farmacéutica.¹⁰⁷ En el campo de la fotofarmacología se destaca el trabajo de Gorostiza para la isomerización de ligantes proteicos azoicos por excitación bifotónica indirecta con una antena basada en naftaleno.¹⁰⁸ Sin embargo, la inclusión del fragmento de naftaleno interfiere con la interacción del ligante con la proteína por lo que desarrollos posteriores desecharon su utilización y se centran en sintetizar azocompuestos con isomerización bifotónica directa.¹⁰⁹ Estos ejemplos indican una serie de condiciones mínimas para el funcionamiento de estos diseños modulares:

- La antena debe tener excelentes propiedades de óptica no lineal.
- La transferencia de energía antena->efector debe ser eficiente.
- La presencia de la antena no debe impedir el funcionamiento del efector.

Estas consideraciones fueron incorporadas en el diseño del sistema bicromofórico antena bifotónica—efector **CySAP** de la presente tesis.

3.6. Transferencia de energía electrónica

El presente trabajo propone un diseño modular capaz de localizar las propiedades de TPA y el funcionamiento como interruptor molecular en cromóforos independientes de la molécula. El correcto funcionamiento de este diseño requiere que la energía de excitación bifotónica inicial sea transferida del cromóforo antena al cromóforo efector. Este proceso se conoce como transferencia de energía electrónica (**TE**). La migración de la energía consiste en la relajación de un estado singlete excitado al promover la excitación electrónica de otro cromóforo como se muestra en el panel A de la Figura 3.9.

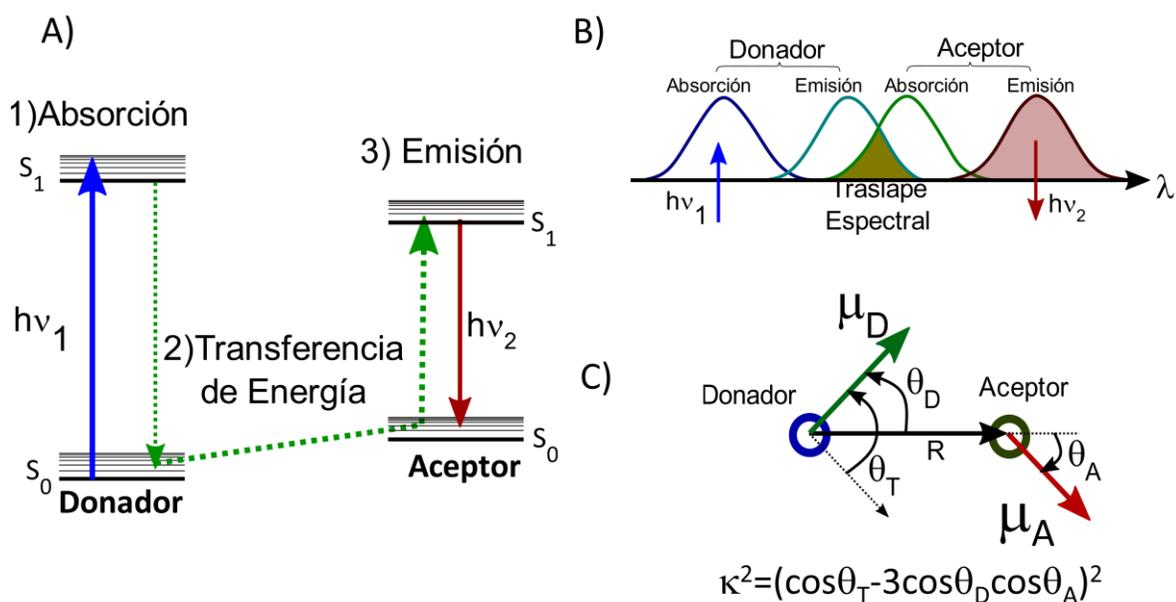


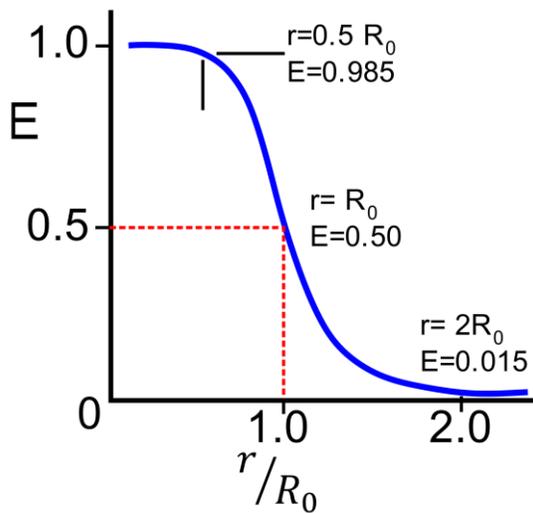
Figura 3.9. Transferencia de energía de resonancia por el mecanismo de Förster. A) Diagrama de Jablonski del proceso. B) Traslape espectral del par donador-aceptor. C) Esquema del factor orientacional. Los momentos dipolares de transición se representa como μ_A y μ_D para el acepto y el donador respectivamente.

El fenómeno de transferencia de energía se conoce desde hace casi cien años al ser observado por primera vez en 1922 por Cario y Frank en vapores atómicos de talio y mercurio al detectar la emisión de Tl excita en una longitud de onda únicamente absorbida por Hg.¹¹⁰ La primera descripción teórica

fue hecha por Förster en 1948 donde formuló la siguiente ecuación para la constante de velocidad para el proceso de transferencia de energía electrónica:

$$k_{TE} = 8.8 \times 10^{23} \frac{\kappa^2 \phi_f(D)}{n^4 \tau_D R^6} \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (3.25)$$

Donde $\phi_f(D)$ es el rendimiento cuántico de fluorescencia del donador, n el índice de refracción del medio, τ_D el tiempo de vida del estado excitado donador en ausencia del aceptor, R la distancia entre los cromóforos, κ^2 el factor de orientación entre los momentos dipolares de transición, $F_D(\lambda)$ corresponde al espectro de fluorescencia normalizado, $\varepsilon_A(\lambda)$ corresponde a la absorbancia del aceptor a la longitud de onda λ . La integral en la expresión se le conoce como integral de trasape y puede ser encontrada en la literatura como $J(\lambda)$.



$$E = \left[1 + \left(\frac{R}{R_0} \right)^6 \right]^{-1}$$

$$R_0 = 0.211 \left[\frac{\kappa^2 \phi_F(D) J(\lambda)}{n^4} \right]^{1/6}$$

Figura 3.10. Dependencia de la eficiencia de RET con respecto a la distancia. R_0 representa la distancia de Förster. Imagen reproducida de la literatura. ¹¹³

El proceso de TE es extremadamente sensible a la separación entre los cromóforos de acuerdo con la ecuación 3.25 donde se observa una fuerte dependencia inversamente proporcional con la sexta potencia de la distancia como se muestra también en la Figura 3.10. El parámetro R_0 en esta Figura se conoce como la distancia de Förster y representa la distancia en la que eficiencia del proceso para dos cromóforos específicos ha caído al 50%. En 1967 Stryer y Haughland acuñan el uso del fenómeno de TE como una regla espectroscópica al desarrollar técnicas que aprovechan esta sensibilidad

espacial para medir espectroscópicamente distancias intermoleculares con precisión.¹¹¹ Por ejemplo, es posible utilizar la técnica para observar el cambio estructural de macromoléculas en disolución al incorporar un par donador-aceptor en diferentes regiones de la estructura y analizar el grado de transferencia de energía entre los cromóforos. Incluso, con esta técnica es posible estudiar el plegamiento en tiempo real de una proteína individual al utilizar microscopía de fluorescencia resuelta en tiempo, lo cual proporciona información extraordinaria para el desarrollo de nuevos modelos biológicos.¹¹² En el contexto del diseño de sistemas antena-efector interactuantes por TE, es evidente la necesidad de diseñar sistemas que sitúen a los cromóforos a distancias menores que R_0 para maximizar la eficiencia del proceso.

Además de la cercanía entre los cromóforos, la eficiencia de la TE depende del grado de coincidencia energética entre los estados donador y receptor evaluado como la integral de traslape entre el espectro de fluorescencia del donador y el espectro de absorción del aceptor como se muestra en la Figura 3.9. Este comportamiento es similar a lo esperado por la regla de oro de Fermi que dicta que la velocidad de estos procesos dependerá de la densidad de transiciones de la misma energía.⁴⁴ La TE por el mecanismo tipo Förster resulta de la interacción coulombica entre los fragmentos donador y aceptor por lo que requiere una orientación favorable entre los momentos dipolares de transición respectivos, lo cual se evalúa con factor de orientación κ^2 mostrado en la Figura 3.9. Un arreglo colineal de los momentos de transición tendrá la máxima eficiencia de TE con un valor de $\kappa^2 = 4$, mientras que un arreglo perpendicular apaga la transferencia con $\kappa^2 = 0$. En el caso de moléculas individuales con plena libertad conformacional y rotacional, se considera un valor de $\kappa^2 = 2/3$ el cual surge de analizar la orientación promedio al explorar los dipolos diferentes orientaciones aleatorias en el tiempo de vida del estado excitado.¹¹³

El modelo desarrollado por Förster considera que la transferencia de energía se da por interacciones coulombicas a través del espacio entre los cromóforos. Este mecanismo será válido si la interacción se trata de un acoplamiento débil y la fotofísica de los cromóforos individuales no se ve afectada por la presencia del otro y no existe interacción entre los orbitales involucrados. Estas condiciones se evalúan como la ausencia de bandas adicionales en el espectro de absorción de los componentes individuales. Es importante mencionar que la TE no está mediada por la emisión y reabsorción de fotones entre los cromóforos. Un tratamiento más formal vía la teoría de electrodinámica cuántica indica que la TE ocurre al intercambiar fotones “virtuales” entre el par implicado, pero dado que la

distancia entre los cromóforos es menor que la longitud de onda reducida del fotón ($R < \lambda/2\pi$), este es reabsorbido por el aceptor antes de que sus propiedades tengan algún significado físico.¹¹⁴

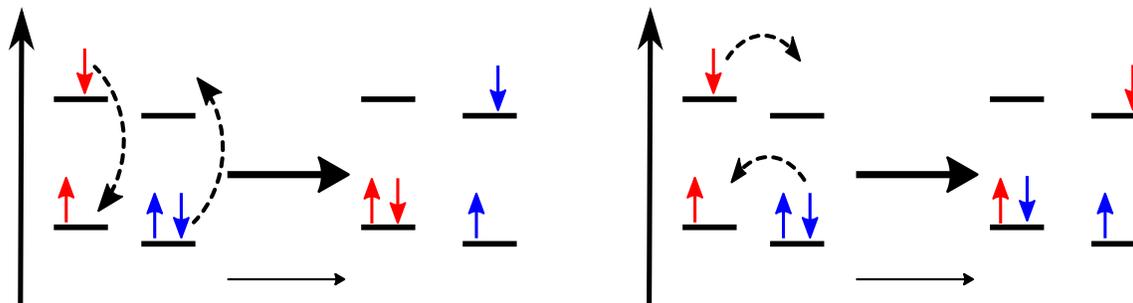


Figura 3.11. Mecanismos fotofísicos de transferencia de energía. El mecanismo de Förster consiste en la relajación del estado excitado del cromóforo donador con la consecuente excitación electrónica del cromóforo aceptor mediada exclusivamente por interacciones coulombicas entre los cromóforos. El mecanismo de Dexter involucra el intercambio electrónico entre las especies involucradas.

Otro mecanismo posible para la transferencia de energía es el descrito por Dexter, el cual consiste en un intercambio electrónico entre las especies como se muestra en la Figura 3.11. En este mecanismo el cromóforo donador transfiere un electrón en su estado excitado al aceptor en un orbital excitado y, de manera simultánea, el aceptor transfiere un electrón desde su estado HOMO hacia el estado HOMO mono-ocupado del donador. El intercambio electrónico requiere del traslape entre los orbitales moleculares involucrados, por ejemplo, vía colisiones.⁴⁵

En sistemas químicos que incorporan a ambos cromóforos (donador y aceptor) muy próximos entre sí, es posible que la transferencia de energía ocurra por los mecanismos tanto de Förster como de Dexter simultáneamente con lo que ninguno de los modelos aislado sea completamente adecuado para describir el fenómeno.¹¹⁵ En particular, la eficiencia del proceso vía mecanismo tipo Dexter dependerá de las características electrónicas y geométricas del segmento enlazante o "puente".¹¹⁶ Para efectos del presente trabajo, se utilizará el tratamiento desarrollado por Förster como una aproximación del fenómeno. En ambos casos existen factores en común entre los mecanismos como la coincidencia en los niveles energéticos implicados (lo cual se evalúa con el grado de traslape espectral) y la distancia entre los cromóforos.

El fenómeno de transferencia de energía permite el diseño de sistemas antena-efector en el que un cromóforo antena complementa las propiedades ópticas de un efector en la molécula. Por ejemplo, la terapia fotodinámica se fundamenta en el uso de colorantes (antena) que promueven la generación de especies reactivas de oxígeno (efector) que ocasionan respuestas terapéuticas altamente selectivas y mínimamente invasivas.^{117,118} Por otro lado, las técnicas diagnósticas por fluorescencia utilizan pares donador-aceptor para aumentar la sensibilidad de los métodos ya que la TE induce una gran separación entre las longitudes de onda de excitación y detección, o al funcionar como sensores del ambiente intracelular de los tejidos estudiados.^{119,120} La sensibilización a través de TE permite complementar otros efectores moleculares como catalizadores, emisores lantánidos y motores moleculares donde la especie en cuestión sea poco eficiente para la absorción de fotones o, como en el caso del presente trabajo, para otorgar propiedades de óptica no lineal que mejoran su funcionamiento al otorgar extraordinaria precisión espacial.^{1,32,57,64,121,122}

3.7. Compuestos polimetínicos

Las cianinas son compuestos polimetínicos que han sido utilizados ampliamente como colorantes orgánicos y como sensibilizadores en fotografía.¹²³ La estructura se conforma de unidades metínicas conjugadas con anillos N-heterocíclicos a los extremos de la cadena como se muestra en la Figura 3.12. Los grupos terminales pueden ser iguales y dar lugar a compuestos simétricos con grupo puntual C_{2v} , o diferentes y generar cianinas que pueden ser funcionalizadas selectivamente.¹²⁴

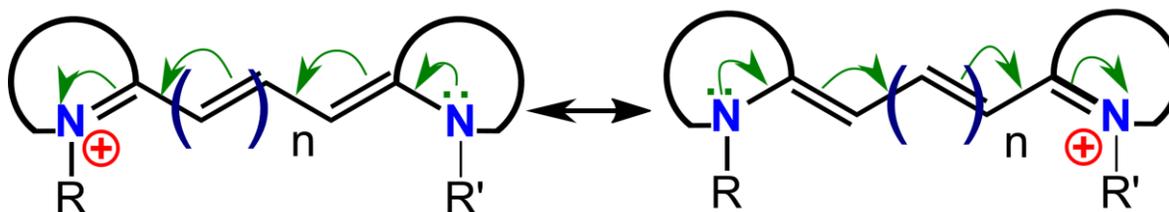


Figura 3.12. Formas canónicas características de la estructura resonante de las cianinas.

Las propiedades ópticas de esta familia de pigmentos han sido estudiadas a profundidad.^{123,125-127} El cromóforo característico de este grupo de colorantes es el sistema π conjugado mostrado en la Figura 3.12 que cuenta con un número impar de átomos en el que la carga positiva está deslocalizada a lo largo de la cadena y entre los grupos terminales de nitrógeno. El número de unidades vinílicas y la naturaleza de los grupos heterocíclicos permiten ajustar sus propiedades ópticas, siendo posible encontrar cianinas con máximos de absorción entre 500-1000 nm.

El espectro de absorción característico de las cianinas está dominado por la transición S_0-S_1 (HOMO-LUMO) altamente permitida como se muestra en la Figura 3.13. La energía de la transición HOMO-LUMO puede disminuir considerablemente al aumentar el tamaño de la caja de potencial electrónico introduciendo unidades vinílicas. Las cianinas son especialmente sensibles a este efecto vinílico siendo el desplazamiento batocrómico inducido de cerca de 100 nm por cada unidad vinílica, por lo que, con tan solo con 3 unidades es posible generar cromóforos con absorción en el infrarrojo cercano.¹²⁷ Además, la introducción de unidades vinílicas aumenta el coeficiente de absorción del pigmento, conduciendo a valores de coeficiente de absorción molar mayores a $250000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

126,128

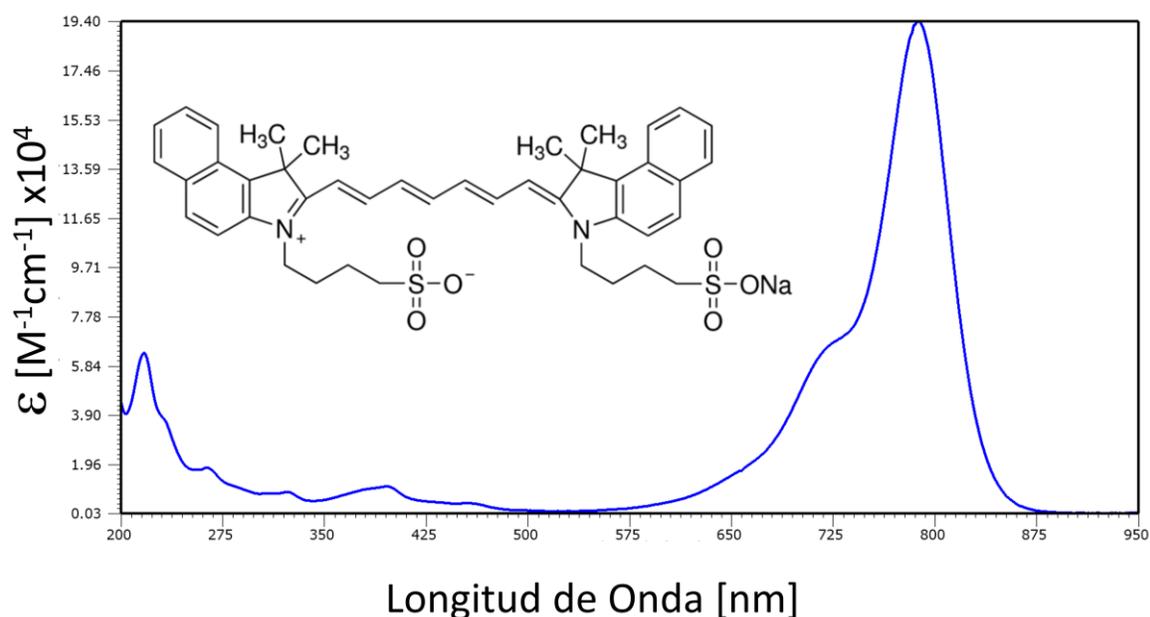


Figura 3.13. Espectro de absorción de una cianina característica. El espectro y la estructura corresponden al verde indocianina.

El primer estado excitado es considerablemente emisivo por lo que es posible diseñar pigmentos polimetínicos capaces de operar en el intervalo de transparencia biológica en el infrarrojo cercano (650—900 nm), lo cual es crucial para aplicaciones biológicas no invasivas.⁶⁶ Por ejemplo, el pigmento “indocianina verde” es un fluoróforo no tóxico aprobado por la FDA como agente de contraste en angiografía, neurocirugía y cirugía cardiovascular, con absorción y emisión en esta ventana de acción biológica ($\lambda > 800 \text{ nm}$).¹²⁹ Las cianinas han sido también investigadas como agentes sensibilizadores de terapia fotodinámica, terapia fototermal y sistemas de liberación de fármacos

por su capacidad de operar en el infrarrojo cercano.^{117,130,131} Además, se han utilizado cianinas que incluyen átomos pesados en su estructura para promover el cruce intersistema y sensibilizar por transferencia de energía la transición $^3\text{O}_2 \rightarrow ^1\text{O}_2$ para su uso en terapia fotodinámica.^{117,132} Otras cianinas han sido utilizadas por su capacidad de transformar la energía absorbida en calor, ya sea en terapia fototermal promoviendo la muerte celular por el aumento local de temperatura o para desestabilizar arreglos supramoleculares y activar sistemas de liberación de fármacos como liposomas y nanopartículas.^{130,133-136} La combinación de actividad diagnóstica y terapéutica convierte a las cianinas en poderosos agentes altamente selectivos que combinan propiedades terapéuticas y diagnósticas (agente teranóstico) mínimamente invasivas.¹³⁷

Debido a la simetría del cromóforo, en las cianinas, los estados excitados tienen simetría alternante par-impar siendo así que la primera transición $S_0(\text{par}) \rightarrow S_1(\text{impar})$ es sumamente permitida y domina gran parte del espectro. Sin embargo, es posible observar bandas de absorción de mayor energía correspondientes a transiciones a singuletes excitados superiores, $S_0 \rightarrow S_n$, en la región del ultravioleta. Algunas de estas son formalmente prohibidas por simetría para un fotón como la $S_0(\text{par}) \rightarrow S_2(\text{par})$. Sin embargo, estas transiciones prohibidas para un fotón son permitidas para la absorción bifotónica (TPA) al tener reglas de selección mutuamente excluyentes. De acuerdo con la teoría de TPA descrita en la sección anterior, el proceso se ve favorecido al tener estados excitados con simetrías alternantes y con arreglos electrónicos cuadrupolares. Los grupos N-heterocíclicos actúan también como grupos electrodonadores por lo que las cianinas tienen un arreglo electrónico simétrico $D\pi D$ favorable para la optimización de las propiedades de óptica no lineal. Además, en esta familia de compuestos la transición fuertemente permitida $S_0 \rightarrow S_1$ puede promover la TPA al aportar favorablemente al estado intermedio para la transición $S_0 \rightarrow S_2$. Estas características resultan en condiciones ideales para la optimización de la TPA con valores de sección transversal bifotónica entre 50—10000 GM en el infrarrojo cercano.¹³⁸ Estos valores son varios órdenes de magnitud mayor que los encontrados para otros colorantes orgánicos, los cuales tienen valores típicos entre 0.5-10 GM.³⁸

A diferencia de las múltiples aplicaciones de cianinas con absorción lineal de luz, sus propiedades de óptica no lineal han sido menos explotadas en la literatura. La mayoría de las publicaciones que integran TPA de cianinas utilizan únicamente el estado excitado S_1 en sus diseños fotofísicos y se desestima el incorporar directamente en sus esquemas el estado excitado S_2 al que se llega por el proceso no lineal.¹³⁹⁻¹⁴³ En otras palabras, la rápida conversión interna $S_2 \rightarrow S_1$ ocasiona que el

excitado estado operacional tras la TPA suele considerarse como el estado S_1 el cual también puede ser alcanzado por óptica lineal sin requerir fuentes de irradiación de alta intensidad y sin perder resolución espacial al utilizar técnicas confocales. Además, la baja energía del estado excitado S_1 limita el tipo de procesos fotoquímicos que se pueden sensibilizar por TPA. Por ello, el diseño de sistemas que incorporen de manera efectiva estas propiedades ópticas no lineales requiere encontrar cianinas que tengan estados excitados superiores con tiempos de vida largos, capaces de romper la regla de Kasha-Vavilor y así poder aprovechar la energía completa de la excitación bifotónica en el esquema fotoquímico.

En un estudio realizado por nuestro grupo de investigación se encontró que existen cianinas que tienen estados excitados S_2 alcanzados por TPA con tiempos de vida anómalamente largos de entre 0.5—17 ps.³⁶ Algunas cianinas representativas de este trabajo se muestran en la Figura 3.14. Los tiempos de vida de los estados excitados cianínicos de este trabajo se ajustaron a lo esperado por la “ley de la brecha energética” de Englman y Jortner donde la variable crucial para este comportamiento inusual es la separación energética entre los estados S_1 - S_2 .³⁹ Este descubrimiento creó oportunidades para el diseño de nuevas cianinas con estados excitados superiores (S_2) de vida larga. El tiempo de vida del estado S_2 anómalamente largo podría permitir la incorporación de cianinas como cromóforos bifotónicos para promover otros procesos fotofísicos ultrarrápidos como transferencia de energía, transferencia de carga, reacciones fotoquímicas vía intersecciones cónicas y transferencia de protón intramolecular. En particular, la transferencia de energía ultrarrápida permitiría utilizar a las cianinas como sensibilizador bifotónico de otros cromóforos efectores. De esta idea surge el diseño modular que se describe en el presente trabajo donde las propiedades de óptica no lineal están localizadas en una sección polimetínica y la respuesta fotoquímica en otra sección de la molécula.

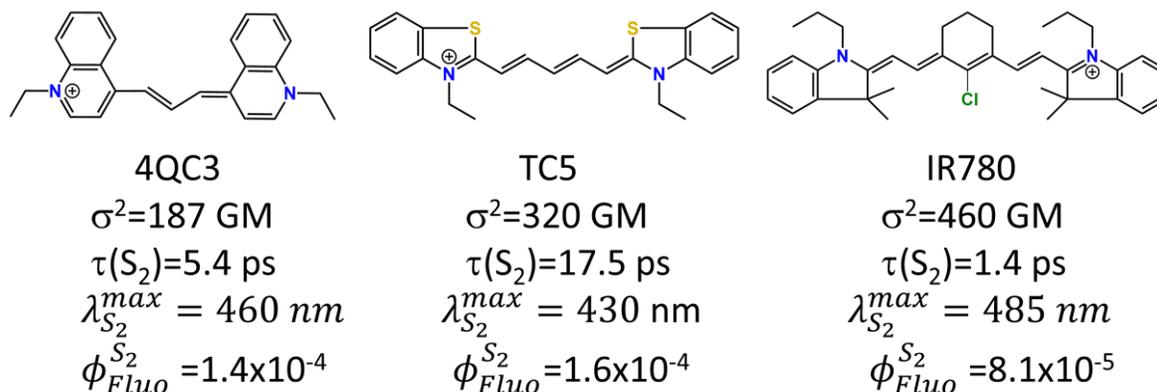


Figura 3.14. Pigmentos polimetínicos con tiempo de vida largo para el estado singlete excitado superior S_2 alcanzado por absorción bifotónica.³⁶

A pesar de tener un menor tiempo de vida relativamente bajo entre las cianinas presentadas, la cianina heptametínica **IR780** se escogió como la posible antena bifotónica del sistema modular presentado. La **IR780** ha sido ampliamente estudiada como colorante fluorescente en el infrarrojo cercano con mucho éxito y con baja toxicidad celular. La cianina **IR780** presenta una acumulación preferencial en tejidos tumorales debido a que células cancerosas sobreexpresan proteínas transportadoras de cationes lipofílicos por lo que esta cianina tiene un gran potencial como agente diagnóstico en medicina.^{144–146} Además, este compuesto polimetínico presenta una gran afinidad mediada por glicólisis por las membranas mitocondriales,¹⁴⁷ y se ha observado que es capaz de inducir la apoptosis en células de cáncer de pulmón resistentes a fármacos al despolarizar la membrana y aumentar la generación de especies reactivas de oxígeno.¹⁴⁴ Adicionalmente, la **IR780** puede asimilarse en diferentes tipos de nanopartículas debido a su carácter de catión lipofílico y se ha demostrado su posible inclusión en sistemas como liposomas y micelas, así como en nanopartículas biocompatibles con el fin de funcionar como agente fotodinámico/fototermal o para inducir la liberación de fármacos con estímulos externos.^{148–150} De manera un tanto sorprendente, en la literatura se encuentran pocas aplicaciones de la **IR780** que hagan uso de sus propiedades de óptica no lineal.

Dejando de lado las características fotoquímicas y su potencial como agente teranóstico es necesario tener consideraciones prácticas respecto a la modificación estructural de la cianinas. El átomo de cloro en la posición *meso* de esta molécula puede actuar como grupo saliente por lo que la **IR780** es fácilmente funcionalizada por sustitución nucleofílica con una gran variedad de cromóforos como fenoles, alcoholes, aminas, azidas y tioles,^{151–153} sin afectar significativamente sus

propiedades de óptica no-lineal.³⁷ Al considerar los argumentos sintéticos, teranósticos y fotofísicos es claro que la cianina **IR780** es ideal para esta prueba de concepto para la sensibilización bifotónica de efectores moleculares.

4. Metodología

4.1. Síntesis y caracterización del compuesto actuador estilbenilazopirrol y del sistema bicromofórico CySAP

Los reactivos 4-yodoanilina, N-metil-1H-pirrol, 4-hidroxibenzaldehído, trietilamina, terbutóxido de potasio 1M en THF, bromuro de metil-trifenilfosfonio y yoduro de **IR780** fueron adquiridos de Sigma-Aldrich y utilizados sin mayor purificación. La caracterización de los compuestos se realizó con las siguientes técnicas analíticas:

- La caracterización por espectroscopía infrarroja (IR) se adquirió en un espectrómetro FT-IR Perkin-Elmer Spectrum 100.
- La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizó en un espectrómetro Bruker Avance 300 y en un espectrómetro Bruker Avance III HD 700. Como disolventes se utilizaron CDCl_3 , CD_2Cl_2 y $\text{DMSO}-d_6$ de acuerdo con la solubilidad de la muestra.
- La espectrometría de masas de alta resolución (EMAR) se realizó en un espectrómetro JEOL JMSAX505. Los valores de las señales se expresan en unidades de masa/carga.
- El análisis elemental (AE) por combustión en un equipo Thermo Scientific Flash 2000 a 950 °C. Se usó metionina como estándar de verificación.

La síntesis se realizó siguiendo una ruta de 4 pasos individuales de síntesis que se describen brevemente a continuación y se presentan en la Figura 4.1.

(a) Reacción de Wittig—Síntesis del Estireno S: Se colocó 15 mmol de $\text{Ph}_3\text{PCH}_3\text{Br}$ en un matraz bola bajo atmósfera de nitrógeno. Posteriormente se adicionó 25 ml de una disolución de terbutóxido de potasio 1 M en THF y se dejó en agitación por 10 minutos. Seguido a ello, se agregó 10.6 mmol de 4-hidroxibenzaldehído y se dejó por 24 h a temperatura ambiente. La reacción se terminó al agregar 100 ml de una solución acuosa saturada de NH_4Cl . El producto fue aislado al realizar extracciones diclorometano/agua, y lavado con salmuera. La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna con silica gel, eluyendo un 10% de acetato de etilo (AcOEt) en hexano. El producto se obtuvo como un sólido blanco con un 86% de rendimiento.

^1H RMN (700 MHz, DMSO- d_6): 9.51 (s, 1H), 7.49 – 7.14 (m, 2H), 6.74 (dd, J = 8.5, 1.5 Hz, 2H), 6.61 (dd, J = 17.6, 10.9 Hz, 1H), 5.58 (dd, J = 17.6, 1.1 Hz, 1H), 5.04 (dd, J = 10.9, 1.1 Hz, 1H).

EMAR [ESI $^+$]: teórico para $\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_1$ [M+H] $^+$: 121.06534, encontrado: 121.06527. Diferencia (ppm)= - 0.60

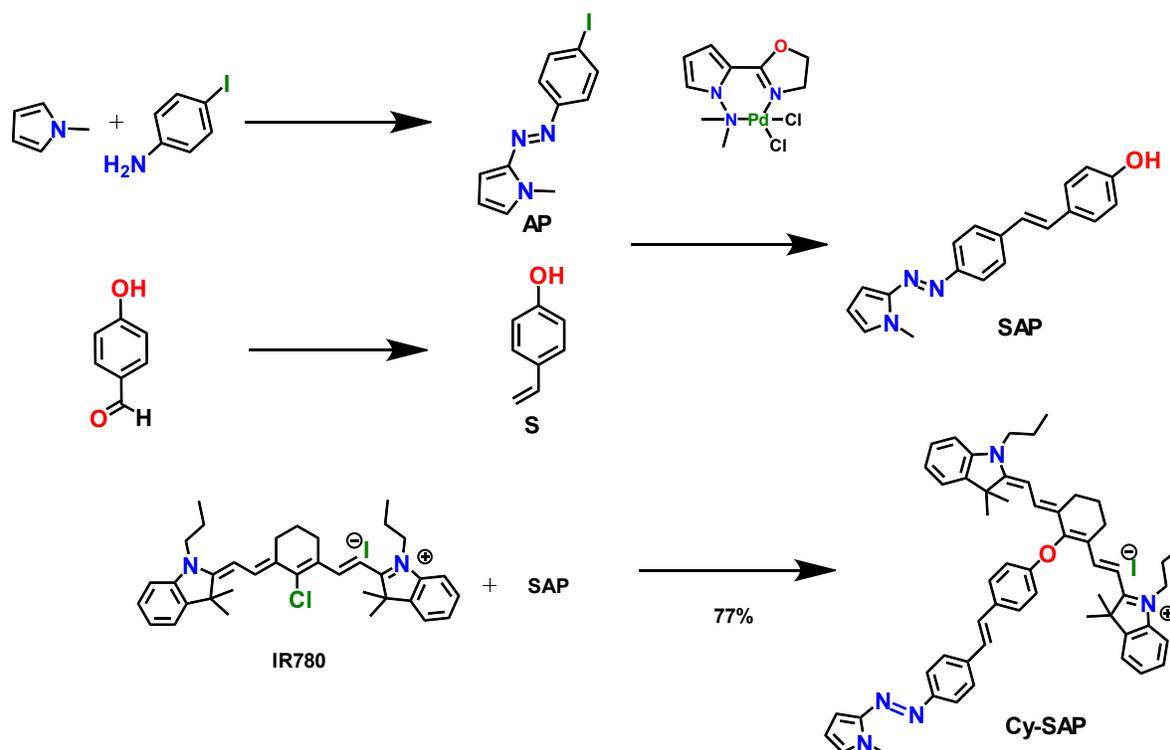


Figura 4.1. Ruta de Síntesis para los compuestos **SAP** y **CySAP**. Condiciones experimentales: (a) 1.0 eq. N-metilpirrol, 1.2 eq. 4-yodoanilina, 1.4 eq. NaNO_2 , HCl, agua/acetona, 0°C , 2h; (b) 1.5 eq. $\text{Ph}_3\text{PCH}_3\text{Br}$, 2.5 eq. t-BuOK, THF, t.a., 24h; (c) 1.0 eq. **AP**, 1.2 eq. **S**, 2.4 eq. Et_3N , 0.1% [ligante pirrónico Pd/(N,N)] (**Cat**), DMF, 160°C , 4h; (d) 2.5 eq. **SAP**, 55 eq. Et_3N , atmósfera de N_2 , acetonitrilo, t.a., 24h.

(b) Acoplamiento Diazoico—Síntesis del Azopirrol AP: Se colocó 9.6 mmol de 4-yodoanilina en un matraz bola con 30 ml de una mezcla de agua/acetona 1:1. La mezcla se enfrió a 0°C y se adicionó lentamente 13 ml de HCl 12 M. Después, una solución con 10.6 mmol de NaNO_2 en 5 ml de agua se agregó gota a gota y la mezcla de reacción se dejó en agitación a 0°C por una hora. Posteriormente, se agregó una disolución de N-metil-1H-pirrol (8 mmol) y Na_2CO_3 (16 mmol) en 30 ml agua/acetona 1:1. La mezcla se tornó rápidamente de color rojo intenso. La reacción dejó una hora en agitación a

temperatura ambiente. La acetona en el medio se removió al vacío y se realizaron extracciones diclorometano—agua. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna usando silica gel como fase estacionaria y eluyendo con 5-30% AcOEt en hexano. El compuesto se obtuvo como un sólido naranja con un 99% de rendimiento.

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 7.99 – 7.77 (m, 2H), 7.63 – 7.48 (m, 2H), 7.33 (t, J = 2.1 Hz, 1H), 6.65 (dd, J = 4.2, 1.7 Hz, 1H), 6.31 (dd, J = 4.2, 2.6 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H).

EMAR [ESI+]: teórico para C₁₁H₁₁IN₃ [M+H]⁺: 311.99976, encontrado: 311.99977. Diferencia (ppm)= 0.01

(c) Acoplamiento Mirozoki-Heck—Síntesis de Estilbenil Azopirrol (SAP): Se utilizó un catalizador de [Pd/ (N, N) ligante pirrólico] cuyo uso y síntesis se encuentra descrito en la literatura.^{28,154} En un matraz bola se colocó 7 mmol de **AP**, 5.4 mmol de **S**, 0.1% mol del catalizador de Pd y 60 ml de DMF como disolvente. La mezcla se llevó a reflujo por tres horas. Después de enfriar la mezcla se adicionaron 40 ml de NH₄Cl saturado, y la mezcla se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó rigurosamente con salmuera para remover el exceso de DMF y fue secada sobre Na₂SO₄ anhidro. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna sobre silica gel eluyendo con 50-50% de mezcla AcOEt en hexano. Se obtuvo **SAP** como un sólido naranja oscuro con un 77% de rendimiento.

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): 9.64 (s, 1H, H₁₆), 7.75 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H₈), 7.66 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H₇), 7.50 – 7.41 (m, 2H, H₁₃), 7.30 – 7.17 (m, 2H, H₂, H₁₁), 7.08 (d, J = 16.4 Hz, 1H, H₁₀), 6.85 – 6.74 (m, 2H, H₁₄), 6.59 (dd, J = 4.1, 1.6 Hz, 1H, H₄), 6.29 (dd, J = 4.2, 2.6 Hz, 1H, H₃), 3.93 (s, 3H, H₁).

^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 157.60 (C₁₅), 151.84 (C₆), 146.06 (C₅), 138.89 (C₉), 129.62 (C₁₁), 128.21 (C₁₂), 128.13 (C₁₃), 128.01 (C₂), 126.82 (C₇), 124.43 (C₁₀), 122.13 (C₈), 115.62 (C₁₄), 110.17 (C₃), 99.61 (C₄), 33.06 (C₁).

^1H , ^{13}C -HSQC (300 MHz / 75 MHz, DMSO- d_6): $\delta(^1\text{H}) / \delta(^{13}\text{C}) =$ 3.93/32.66 (H₁/ C₁), 6.29/109.85 (H₃/ C₃), 6.60/99.10 (H₄/ C₄), 6.79/115.14 (H₁₄/ C₁₄), 7.12/124.02, 7.05/123.96 (H₁₀/ C₁₀), 7.22/129.05, 7.28/128.98 (H₁₁/ C₁₁), 7.27/127.90 (H₂/ C₂), 7.46/127.76 (H₁₃/ C₁₃), 7.67/126.60 (H₇/ C₇), 7.74/121.61 (H₈/ C₈). ^1H , ^{13}C -HMBC (300 MHz / 75 MHz, DMSO- d_6): $\delta(^1\text{H}) / \delta(^{13}\text{C}) =$ 3.94/ 128.69, 146.55 (H₁/ C_{2,5}), 6.30/100.06 (H₃/ C₄), 6.60/110.64 (H₄/ C₃), 6.80/116.09, 128.47, 158.02 (H₁₄/ C_{14,12,15}), 7.10,7.04/ 138.93, 129.67, 127.11 (H₁₀/ C_{9,11,12}), 7.22,7.27/ 124.43, 128.21, 138.93 (H₁₁/ C_{10,12,9}), 7.27/ 99.61, 110.17,146.06 (H₂/ C_{4,3,5}), 7.45/ 156.97, 128.11 (H₁₃/ C_{15,13}), 7.66/ 124.29, 126.77,151.77 (H₇/ C_{10,7,6}), 7.76/ 122.03, 138.80 (H₈/ C_{8,9}).

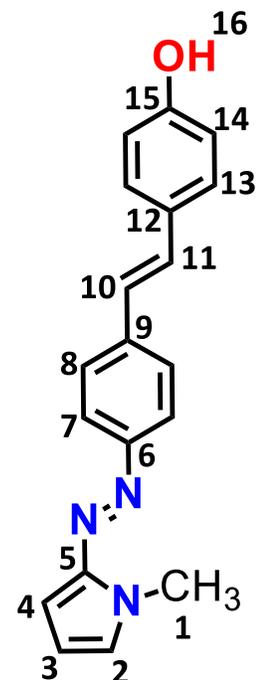


Figura 1.2. Índices atómicos utilizados para la asignación de señales en RMN para SAP.

IR (KBr) ν_{max} 3223.73, 3017.84, 2921.32, 1585.35, 1507.37, 1470.79, 1392.32, 1350.68, 1324.78, 1241.87, 1166.83, 1042.97, 959.76, 834.20, 719.73, 539.73.

EMAR [ESI+]: teórico para C₁₉H₁₈N₃O [M+H]⁺: 304.14499, encontrado: 304.14357. Diferencia (ppm)= -4.65.

AE: Calculado: 13.85% N, 75.23% C, 5.65%, encontrado 13.04% N, 73.53 % C, 5.45 % H.

(d) Sustitución Nucleofílica—Síntesis de sistema bicromofórico Cianina—SAP (CySAP): Se colocó en un matraz bola 1.1 mmol de **IR780-I**, 2.7 mmol de **SAP**, 8 ml de trietilamina (58 mmol) con 80 ml de acetonitrilo anhidro en atmósfera inerte. La reacción se realiza con un exceso de trietilamina, para favorecer la desprotonación del fenol en **SAP** y promover su capacidad como nucleófilo. La mezcla se dejó en agitación por 24 h a temperatura ambiente y posteriormente a 40°C por 2h. El disolvente y la base fueron removidos por evaporación al vacío. El exceso de **SAP** en la mezcla de

reacción se eliminó por dos cromatografías en columna consecutivas utilizando diclorometano-etanol como eluyente y silica gel como fase estacionaria. El producto crudo se purificó por recristalización vía difusión lenta de eter dietílico a una disolución saturada del producto en DCM. El compuesto **CySAP** se obtuvo como un sólido verde oscuro cristalino con un 74% de rendimiento.

¹H RMN (700 MHz, CD₂Cl₂): 7.96 (d, J = 14.1 Hz, 2H, H₂₀), 7.85 – 7.74 (m, 2H, H₈), 7.65 – 7.55 (m, 4H, H₁₄, H₇), 7.36 (td, J = 7.7, 1.2 Hz, 2H, H₃₂), 7.30 (dd, J = 7.6, 1.2 Hz, 2H, H₃₀), 7.20 (td, J = 7.5, 0.9 Hz, 2H, H₃₁), 7.16 (d, J = 16.3 Hz, 1H, H₁₁), 7.14 – 7.10 (m, 4H, H₁₃, H₃₃), 7.09 (d, J = 16.4 Hz, 1H, H₁₀), 6.98 (dd, J = 2.6, 1.7 Hz, 1H, H₂), 6.65 (dd, J = 4.2, 1.7 Hz, 1H, H₄), 6.28 (dd, J = 4.2, 2.6 Hz, 1H, H₃), 6.04 (d, J = 14.2 Hz, 2H, H₂₁), 3.99 (t, J = 7.9, 7.3 Hz, 4H, H₂₆), 3.95 (s, 3H, H₁), 2.73 (t, J = 6.3 Hz, 4H, H₁₈), 2.06 (q, J = 6.3 Hz, 2H, H₁₉), 1.86 (h, J = 7.4 Hz, 4H, H₂₇), 1.37 (s, 12H, H₂₉), 1.04 (t, J = 7.4 Hz, 6H, H₂₈).

¹³C RMN (176 MHz, CD₂Cl₂): 172.86 (C₂₂), 164.72 (C₁₆), 160.19 (C₁₅), 153.47 (C₆), 147.26 (C₅), 142.82 (C₂₀), 142.70 (C₂₅), 141.61 (C₂₄), 138.84 (C₉), 132.43 (C₁₂), 129.10 (C₇), 129.06 (C₃₂), 128.76 (C₁₁), 127.79 (C₁₀), 127.51 (C₂), 127.44 (C₁₄), 125.57 (C₃₁), 122.96 (C₈), 122.72 (C₃₀), 122.54 (C₁₇), 115.64 (C₁₃), 111.19 (C₃₃), 110.74 (C₃), 100.38 (C₂₁), 100.30 (C₄), 49.62 (C₂₃), 46.50 (C₂₆), 33.81 (C₁), 28.24 (C₂₉), 24.94 (C₁₈), 21.70 (C₁₉), 21.26 (C₂₇), 11.88 (C₂₈).

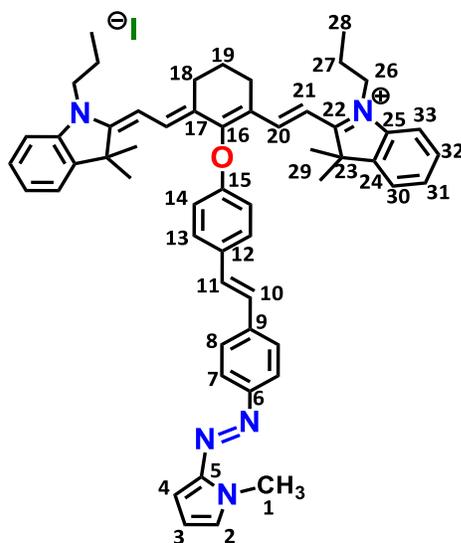


Figura 4.3. Índices utilizados para la asignación de RMN para **Cy-SAP**

¹H, ¹H-COSY (700 MHz / 700 MHz, CD₂Cl₂): $\delta(^1\text{H}) / \delta(^1\text{H}) = 1.08/1.88$ (H₂₈/ H₂₇), 1.88/4.02 (H₂₇/ H₂₆), 2.10/2.76 (H₁₉/ H₁₈), 6.07/8.00 (H₂₁/ H₂₀), 6.32/6.68, 7.02 (H₃/ H₄, H₂), 7.62/7.16 (H₁₄/

^1H , ^{13}C -HSQC (700 MHz / 176 MHz, CD_2Cl_2): $\delta(^1\text{H}) / \delta(^{13}\text{C}) = 1.04/11.29$ ($\text{H}_{28}/\text{C}_{28}$), $1.37/27.67$ ($\text{H}_{29}/\text{C}_{29}$), $1.86/20.66$ ($\text{H}_{27}/\text{C}_{27}$), $2.07/21.13$ ($\text{H}_{19}/\text{C}_{19}$), $2.73/24.40$ ($\text{H}_{18}/\text{C}_{18}$), $3.96/33.05$ (H_1/C_1), $3.99/45.90$ ($\text{H}_{26}/\text{C}_{26}$), $6.05/99.80$ ($\text{H}_{21}/\text{C}_{21}$), $6.28/110.01$ (H_3/C_3), $6.65/99.50$ (H_4/C_4), $6.98/127.02$ (H_2/C_2), $7.07/127.15$ ($\text{H}_{10}/\text{C}_{10}$), $7.11/110.62$ ($\text{H}_{33}/\text{C}_{33}$), $7.13/115.05$ ($\text{H}_{13}/\text{C}_{13}$), $7.15/128.08$ ($\text{H}_{11}/\text{C}_{11}$), $7.20/124.98$ ($\text{H}_{31}/\text{C}_{31}$), $7.29/122.17$ ($\text{H}_{30}/\text{C}_{30}$), $7.36/128.53$ ($\text{H}_{32}/\text{C}_{32}$), $7.59/127.88$ ($\text{H}_{14}/\text{C}_{14}$, H_7/C_7), $7.80/122.36$ (H_8/C_8), $7.97/142.22$ ($\text{H}_{20}/\text{C}_{20}$). ^1H , ^{13}C -HMBC (700 MHz / 176 MHz, CD_2Cl_2): $\delta(^1\text{H}) / \delta(^{13}\text{C}) = 1.04/20.68$, 45.93 ($\text{H}_{28}/\text{C}_{27,26}$), $1.37/27.65$, 49.04 , 141.03 , 172.27 ($\text{H}_{29}/\text{C}_{29,23,24,22}$), $1.86/11.29$, 45.93 ($\text{H}_{27}/\text{C}_{28,26}$), $2.06/24.36$, 121.98 ($\text{H}_{19}/\text{C}_{18,17}$), $2.73/24.26$, 121.98 , 142.13 , 164.15 ($\text{H}_{18}/\text{C}_{18,17,20,16}$), $3.95/127.21$, 146.68 ($\text{H}_1/\text{C}_{2,5}$), $3.99/11.29$, 20.67 , 142.25 , 172.28 ($\text{H}_{26}/\text{C}_{28,27,25,22}$), $6.04/49.04$, 121.96 , 142.01 ($\text{H}_{21}/\text{C}_{23,17,20}$), $6.29/127.19$, 146.70 ($\text{H}_3/\text{C}_{2,5}$), $6.66/127.25$, 146.70 ($\text{H}_4/\text{C}_{2,5}$), $6.98/99.72$, 110.15 , 127.28 , 146.66 ($\text{H}_2/\text{C}_{4,3,2,5}$), $7.08/127.21$, 131.91 ($\text{H}_{10}/\text{C}_{11,12}$), $7.11/124.92$, 141.11 ($\text{H}_{33}/\text{C}_{31,25}$), $7.12/115.07$, 131.87 , 159.61 ($\text{H}_{13}/\text{C}_{13,12,15}$), $7.15/128.12$, 138.15 ($\text{H}_{11}/\text{C}_{11,9}$), $7.20/110.62$, 122.21 , 141.11 ($\text{H}_{31}/\text{C}_{33,30,24}$), $7.30/49.05$, 128.53 , 142.24 ($\text{H}_{30}/\text{C}_{23,32,25}$), $7.36/110.64$, 122.20 , 142.18 ($\text{H}_{32}/\text{C}_{33,30,25}$), $7.59/127.43$, 159.62 ($\text{H}_{14}/\text{C}_{14,15}$), $7.60/122.14$, 152.90 ($\text{H}_7/\text{C}_{8,6}$), $7.96/24.35$, 121.98 , 164.15 , 172.27 ($\text{H}_{20}/\text{C}_{18,17,16,22}$).

IR (KBr) ν_{max} 2958.91, 2923.43, 2868.63, 1556.07, 1505.46, 1397.06, 1353.05, 1228.10, 1149.55, 1083.01, 1034.67, 993.80, 912.94, 788.72, 707.09.

EMAR [FAB+]: teórico para $\text{C}_{55}\text{H}_{60}\text{N}_5\text{O}$ $[\text{M}]^+$: 806.4798, encontrado: 806.4794. diferencia (ppm) = -0.5

AE: calculado, 7.50% H, 70.73% C, 6.48% N; encontrado, 7.14% N, 68.70% C, 6.40

4.2. Espectroscopía óptica estática

Los espectros de absorción y de fluorescencia fueron obtenidos con los espectrofotómetros Cary-50 y Cary-eclipse (Varian) respectivamente. Se utilizaron disolventes grado HPLC (Sigma-Aldrich) y celdas de cuarzo con un paso óptico de 1 cm. Los compuestos fueron repurificados por recristalización (**CySAP** e **IR780**) o cromatografía en columna (**SAP**) antes de ser estudiados. Los coeficientes de absorción para **SAP** y **CySAP** se determinaron en intervalos de absorbancia menor a 0.8 con el objetivo de evitar efectos de reabsorción, lo que corresponde a concentraciones en el intervalo 10^{-6} - 10^{-5} mol/L.

La fluorescencia de los compuestos involucrados en el estudio (**SAP**, **IR780** y **CySAP**) fue estudiada ya que son parámetros para el funcionamiento del esquema antena—efector. El rendimiento cuántico de fluorescencia de algunos estados excitados de los fluoróforos fue estimado utilizando diferentes estándares de fluorescencia con la siguiente ecuación:

$$\phi_{Fluo} = \phi_R \frac{I}{I_R} \frac{Abs_R}{Abs} \frac{n^2}{n_R^2} \quad (4.1)$$

Donde ϕ_R es el rendimiento cuántico de fluorescencia del estándar, I e I_R son la fluorescencia integrada de la muestra y el estándar respectivamente, Abs y Abs_R son la absorbancia de la muestra y el estándar en la longitud de onda de excitación y η y η_R son los índices de refracción del medio. Como estándar para la fluorescencia del estado S_2 de la **IR780** y del efector **SAP** se utilizó la Cumarina 153 ($\phi_R = 0.38$)¹⁵⁵ mientras que para la fluorescencia del estado S_1 de **CySAP** se utilizó la misma cianina **IR780** como estándar ($\phi_R = 0.076$).¹⁵⁶

La fluorescencia de los estados excitados superiores del cromóforo polimetínico ha sido reportada previamente.³⁹ La emisión de los estados excitados se analizó promoviendo las transiciones S_0 — S_n excitando con $\lambda=385$ nm y registrando las señales correspondientes a los estados cianínicos superiores. Debido a que se trata de la emisión proveniente de estados superiores, la forma completa de la banda de emisión S_n — S_0 es difícil de observar por lo que fue necesario estimar el pico completo con el uso de un par de curvas log-normal. Un tratamiento similar fue requerido para visualizar la emisión del efector **SAP** ya que el rendimiento de fluorescencia es minúsculo lo cual es de esperarse ya que los azocompuestos desactivan sus estados excitados principalmente por conversión interna hacia la forma *E* o *Z* (ver sección de resultados).^{41,90}

4.3. Fotoisomerización del efector por excitación directa

Para estos estudios se utilizaron disoluciones 10 μ M de **CySAP** o **SAP** en acetonitrilo. La isomerización se monitoreó observando los cambios en el espectro de absorción con el espectrofotómetro Cary50. Los experimentos de los compuestos **SAP** y **CySAP** se realizaron de forma paralela para poder comparar directamente los resultados obtenidos.

El primer estudio consistió en evaluar la cinética de la fototransformación hacia el estado fotoestacionario (EFE) tras excitación monofotónica directa en el cromóforo azoico de ambas moléculas. La fuente de irradiación fue el segundo armónico de un láser pulsado de femtosegundos con longitud de onda centrada en 432 nm y una potencia ajustable con un filtro de densidad neutral. El láser pulsado utilizado es un láser de Titanio: Zafiro (Ti:Za) amplificado con una longitud de onda original centrada en 865 nm con una frecuencia de repetición de 1 kHz y pulsos con duración de 150 fs. Esta fuente de irradiación también se utilizó para inducir la isomerización por excitación bifotónica indirecta (ver abajo). El segundo armónico fue generado al hacer atravesar el haz por un cristal de óptica no lineal de β -borato de bario (β -BBO 0.5 mm, 29.2°).

Así mismo, el tiempo necesario para alcanzar el EFE se estudió evaluando el cambio en el espectro de absorción de las muestras como resultado de diferentes tiempos de irradiación hasta no observar cambios en el espectro. Para el experimento, la potencia del haz incidente se ajustó en 2 mW. Las disoluciones se mantuvieron en agitación durante el experimento para asegurar homogeneidad en la muestra y reabastecer de moléculas en el estado basal al sitio donde el láser entra en contacto con la muestra.

La proporción entre los isómeros *E* y *Z* en el EFE y la forma del espectro de absorción del isómero *Z* se determinaron a partir del método reportado por Calbo.⁴² La absorbancia en el EFE se determinó de acuerdo con la ley de Lambert-Beer de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$A_{PSS}(\lambda) = \epsilon_E(\lambda)C_E(PSS) + \epsilon_Z(\lambda)C_Z(PSS) \quad (4.2)$$

Donde $A_{PSS}(\lambda)$ es el valor de absorbancia a una longitud de onda del EFE, $\epsilon_E(\lambda)$ y $\epsilon_Z(\lambda)$ son los coeficientes de extinción molar para los isómeros *E* y *Z* respectivamente, y C_E y C_Z son las concentraciones de los isómeros en el EFE. En la expresión no aparece el valor del paso óptico por simplicidad de la expresión ya que se utilizan celdas de 1 cm. La expresión anterior se reorganiza para determinar $\epsilon_Z(\lambda)$:

$$\epsilon_Z(\lambda) = \frac{A_{PSS}(\lambda) - \epsilon_E(\lambda)C_E(PSS)}{C_Z(PSS)} \quad (4.3)$$

La concentración inicial de **SAP** permanece constante durante el experimento, tal que: $c_0 = C_E(PSS) + C_Z(PSS)$. Además, definiendo la variable *f* como la fracción del isómero *E* en el EFE, $f = C_E(PSS)/c_0$, e introduciendo ambas expresiones en la ecuación 4.3 se obtiene una ecuación que se

puede utilizar para determinar tanto la proporción de los isómeros en el EFE y el espectro de absorción del isómero Z generado:

$$\epsilon_Z(\lambda) = \frac{\frac{A_{PSS}(\lambda)}{c_0} - \epsilon_E(\lambda) * f}{1 - f} \quad (4.4)$$

El valor de f se determinó con esta aproximación como el promedio de dos valores límites: El valor límite superior de f es aquel en el que la absorbancia del espectro se mantiene positiva en el respectivo intervalo de longitudes de onda. El valor límite inferior es el valor de f en el que no se discierne absorción obvia del isómero E en el espectro resultante.

Con respecto al tiempo de vida del isómero Z, la cinética de isomerización térmica de regreso al isómero E fue determinada. Se irradió una muestra hasta alcanzar el EFE y posteriormente se registró la evolución del espectro de absorción al detener la irradiación. El proceso se realizó en la oscuridad para evitar inducir este proceso por vía fotoquímica. La reacción sigue una cinética de primer orden y con la siguiente ecuación general se calcula su constante de velocidad:

$$\ln(A_\infty - A) = -k_{Z \rightarrow E} t + \ln(A_\infty - A_0) \quad (4.5)$$

Donde A_∞ representa la absorbancia de la disolución a un tiempo infinito donde la reacción $Z \rightarrow E$ se ha completado, A es la absorbancia para cada tiempo t, A_0 la absorbancia inicial a $t=0$ y k la constante de velocidad para la reacción en unidades de $M^{-1}s^{-1}$.

El rendimiento cuántico de fotoisomerización se determinó utilizando el programa desarrollado por Börjesson.¹⁵⁷ El programa resuelve de manera numérica la ecuación cinética para la concentración del isómero E en la disolución:

$$\frac{d[E]}{dt} = -\frac{\Phi_E * I * \beta_E}{N_A * V} + \frac{\Phi_Z * I * \beta_Z}{N_A * V} + k_{Z \rightarrow E}[Z] \quad (4.6)$$

Donde Φ es el rendimiento cuántico de fotoisomerización, I el flujo de fotones a través de la muestra, N_A el número de Avogadro, V el volumen de la disolución, $k_{Z \rightarrow E}$ la constante de velocidad para isomerización espontánea del isómero Z y β representa la fracción de fotones absorbidos por las especies involucradas. La expresión anterior considera tres fenómenos: La fotoisomerización $E \rightarrow Z$, el regreso $Z \rightarrow E$ fotoinducido y la reacción térmica espontánea $Z \rightarrow E$.

La determinación de este parámetro se realizó utilizando como fuente de irradiación un láser continuo sintonizado a 405 nm con una potencia de 2 mW (PicoQuant). Debido a que el proceso de isomerización es sumamente rápido, fue necesario irradiar la muestra dentro de la cámara del espectrofotómetro llevando el haz del láser desde la mesa óptica hacia el equipo en cuestión. Los experimentos se realizaron por triplicado.

La resistencia a la fatiga del efector se estudió sometiendo una muestra a varios ciclos de fotoisomerización y relajación térmica. Las muestras fueron irradiadas con el segundo armónico del láser pulsado anteriormente mencionado por un intervalo de 5 minutos y posteriormente permitiéndoles regresar a su estado original en la oscuridad. El proceso se repitió un total de 5 veces registrando continuamente el espectro de absorción de la muestra.

4.4. Resonancia magnética nuclear del estado fotoestacionario

La evolución temporal de la composición química de disoluciones de **SAP** y **CySAP** se estudió por RMN-¹H utilizando el espectrómetro Bruker Avance III HD 700. Se utilizó acetonitrilo deuterado como disolvente. Debido a la baja sensibilidad de la RMN, fue necesario tener concentración elevada del analito para tener señales apreciables. Sin embargo, a la vez, se necesitan concentraciones lo suficientemente bajas para poder inducir fotorreacciones a lo largo de la muestra y no solo en el frente de la muestra. Balanceando estos efectos, la concentración utilizada fue de 0.1 mg/ml y 0.01 mg/ml para **SAP** y **CySAP** respectivamente.

La relajación térmica del isómero Z generado hacia el isómero termodinámicamente estable ocurre en la escala de tiempo de los experimentos (ver arriba) por lo que fue necesario controlar el tiempo transcurrido entre la irradiación hacia el EFE y los experimentos por RMN. Por este fin, la irradiación se debió realizar directamente en el tubo de RMN en la proximidad del espectrómetro. Además, fue necesario reducir la duración de los experimentos para tener resolución temporal del proceso de isomerización por lo que se realizaron 8 barridos con un tiempo de adquisición de 2.8 s. Los parámetros se escogieron para reducir el tiempo requerido para cada experimento a aproximadamente 30 segundos

Las muestras se irradiaron por 10 minutos utilizando una lámpara de halógeno-tungsteno que opera entre 300-2600 nm (Thorlabs SLS201). Inmediatamente después, las disoluciones se introdujeron en el espectrómetro y se registraron los espectros de RMN-¹H cada minuto a lo largo de dos horas.

La proporción de los isómeros presentes se determinó tomando como referencia los valores de las integrales correspondientes a los picos localizados en 3.95 (*E-SAP*) y 4.01 (*Z-SAP*). Además, se analizó un estudio cinético de la evolución temporal de primer orden utilizando un análogo de la ecuación 4.5.

Para confirmar la identidad de las especies involucradas en el EFE se realizaron experimentos bidimensionales para realizar la asignación de las señales observadas. Fue necesario irradiar la disolución antes de cada experimento para reestablecer el EFE en las mismas condiciones descritas anteriormente. A continuación, se describen brevemente los parámetros de los experimentos realizados:

- ^1H : 16 barridos, 2.3243 s tiempo de adquisición, 2.000 s tiempo de relajación
- HSQC: 8 barridos, 0.1843 s tiempo de adquisición, 0.9386 s tiempo de relajación
- HMBC: 8 barridos, 0.1841 s tiempo de adquisición, 0.9386 s tiempo de relajación
- COSY: 8 barridos, 0.3246 s tiempo de adquisición, 1.000 s tiempo de relajación

Debido a las bajas concentraciones utilizadas (0.1 mg/ml) y los cortos tiempos de análisis no fue posible realizar experimentos de RMN de ^{13}C . Toda la información de este núcleo es obtenida a partir de los experimentos heteronucleares bidimensionales HSQC y HMBC. Las señales correspondientes al isómero *Z* se obtienen al realizar la resta aritmética de los espectros iniciales del isómero *E* y del EFE. Para obtener datos significativos es necesario normalizar las señales de ambos espectros y referenciar las señales con respecto a las características del disolvente.

4.5. Isomerización bifotónica por excitación indirecta mediada por estados superiores de la antena

El fotocontrol por óptica no lineal del sistema bicromofórico **CySAP** es el objetivo principal de esta tesis y se estudió con el experimento mostrado en la Figura 4.4. El efector aislado **SAP** se estudió de forma paralela para confirmar el rol de la antena en la respuesta no-lineal observada. Ambos compuestos fueron purificados cuidadosamente antes de los experimentos: **CySAP** por recristalización de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O}$ y **SAP** por cromatografía. Acetonitrilo grado HPLC fue utilizado para las mediciones correspondientes.

Los experimentos utilizaron como fuente de irradiación un láser pulsado amplificado regenerativamente ajustado a 860 nm. Los pulsos ultracortos se originan en un oscilador de titanio:zafiro (Ti:Za) (Clark Marx Corporation) el cual produce un tren de pulsos con frecuencia de repetición de 100 MHz, duración temporal de 150 fs y 2 nJ de energía por pulso. El oscilador es bombeado con un láser de NdVO₄ de 532 nm y 4W (Coherent Inc.). Los pulsos se alargan temporalmente antes de ser amplificados por un amplificador regenerativo bombeado con un láser de Nd:YLF (527 nm, 12 W, 1 kHz). Los pulsos se recomprimen temporalmente una vez terminada la fase de amplificación a la duración original. Del tren de pulsos original, un pulso cada milisegundo es amplificado de tal manera que se tiene un haz láser con frecuencia de repetición de 1 kHz y 580 mW de potencia promedio. Los pulsos individuales tienen una duración de 150 fs y 0.5 mJ de energía. La intensidad de irradiación en la muestra se moduló utilizando un filtro de densidad óptica neutral.

La muestra se irradió enfocando el haz de luz con un lente (Thorlabs, f=1000 mm) en una celda de cuarzo de 0.5 cm de paso óptico. Se utilizó un volumen de 400 μL de disoluciones con una concentración aproximada de 10⁻⁶ M. Las celdas fueron selladas cuidadosamente para no observar cambios de absorbancia resultantes de la evaporación del disolvente. Las muestras se mantuvieron bajo agitación constante. La respuesta del efector se monitoreó siguiendo la evolución del espectro de absorción antes y después de la irradiación.

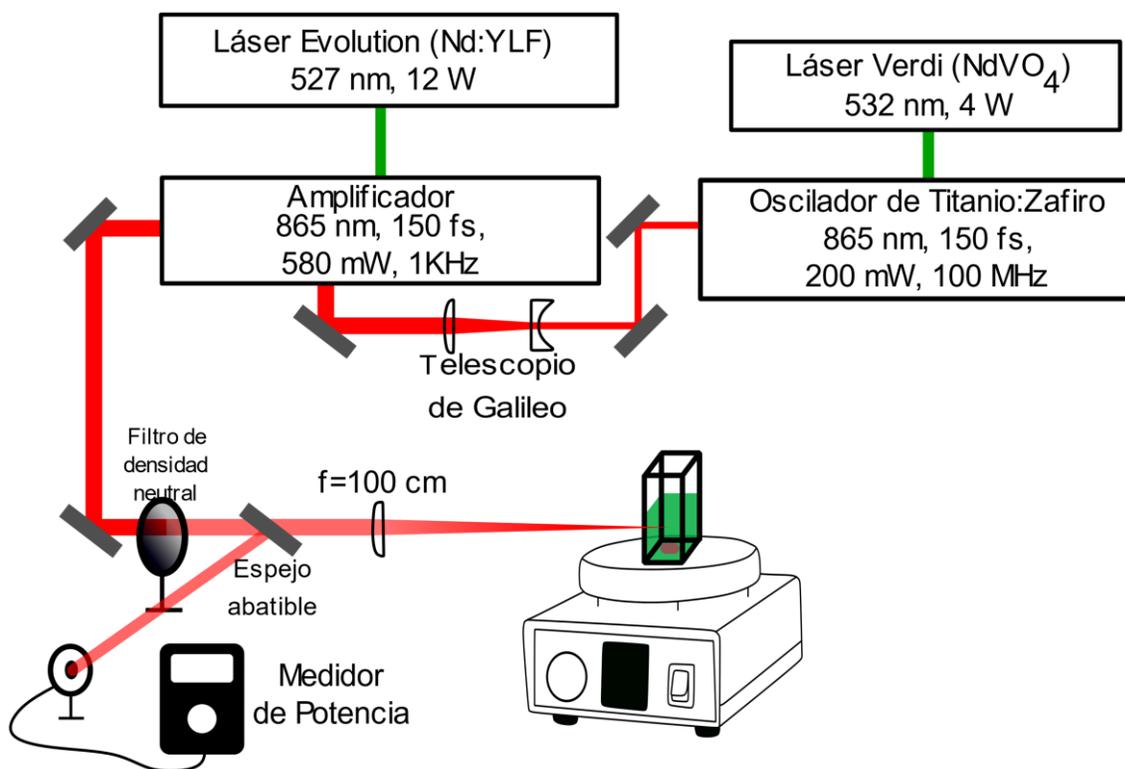


Figura 4.4. Montaje experimental para excitación no-lineal.

La primera aproximación fue determinar niveles de intensidad de irradiación sin fotodegradación aparente de los compuestos. Las muestras fueron irradiadas con potencias variables a 860 nm y se monitoreó la transformación siguiendo el cambio del espectro de absorbancia. Las disoluciones se irradiaron por 5 minutos con diferentes potencias en el intervalo de 3-20 mW, lo que corresponde a picos de irradiancia entre 2×10^{10} — 2×10^{11} W cm⁻². Una vez determinado el intervalo de potencias confiable, se examinó el estado fotoestacionario alcanzado por absorción bifotónica irradiando la muestra por intervalos de un minuto con una potencia de 5 mW hasta no observar cambios en el espectro de absorción. La dependencia bifotónica de la respuesta como función de la intensidad de la irradiación se evaluó en el intervalo donde no se observa fotodegradación (2—7 mW o 2 — 5×10^{10} W cm⁻²).

4.6. Métodos computacionales y modelado de la transferencia de energía

Durante el diseño del sistema CySAP se consideró la importancia de la velocidad de transferencia de energía desde el segundo singulete excitado localizado en el fragmento antena hacia los estados

excitados del efector. Este parámetro es crucial para el funcionamiento adecuado del sistema bicromofórico.

Los parámetros geométricos considerados en el mecanismo de transferencia de energía de Förster (κ^2 y r) fueron determinados por cálculos computacionales con el software Gaussian09-E0.1.¹⁵⁸ Las geometrías de los cromóforos **IR780**, **SAP** y **CySAP** en su estado basal, así como la geometría del isómero Z de **SAP** se optimizaron a nivel de la teoría de funcionales de la densidad (DFT) con el funcional híbrido PBE0 y un conjunto de funciones base 6-31+G(d). Los cálculos se realizaron considerando solvatación de acetonitrilo por el modelo del continuo polarizable (PCM). La ausencia de frecuencias vibracionales imaginarias en el proceso de optimización de frecuencias vibracionales confirmó que las estructuras calculadas representan mínimos energéticos.

Las energías y momentos de transición electrónica para **IR780** y **SAP** se calcularon bajo el formalismo de la teoría del funcional de la densidad dependiente del tiempo (TD-DFT). Los cálculos utilizaron el funcional PBE0 y un conjunto de funciones base 6-31+G(d). Las energías de excitación de las transiciones verticales se corrigieron considerando la aproximación del estado específico. El cálculo correspondiente para **CySAP** no está incluido, ya que éste no logró converger presumiblemente por su gran tamaño.

La eficiencia del proceso de transferencia de energía fue estimada de acuerdo con la teoría de Förster y la constante de velocidad del proceso se calculó utilizando la ecuación 4.7 desarrollada en los antecedentes:

$$k_{FRET} = 8.8 \times 10^{23} \frac{\kappa^2 \phi_f(D)}{n^4 \tau_D r^6} J(\lambda) \quad (4.7)$$

Donde κ^2 es el factor de orientación entre los momentos dipolares de transición, $\phi_f(D)$ el rendimiento cuántico de fluorescencia del donador en ausencia del aceptor, n^4 el índice de refracción del disolvente (1.346 para acetonitrilo), τ_D el tiempo de vida de fluorescencia del donador en ausencia del aceptor y r la distancia entre los cromóforos. Los cálculos se realizaron utilizando el software PhotoChemCAD™.¹⁵⁹

El factor de orientación κ^2 se estimó partiendo de los datos computacionales. Debido a que no se realizó el cálculo TD-DFT de la molécula completa fue necesario aproximar este valor procediendo

de las transiciones de los cromóforos individuales utilizando la estructura optimizada de **CySAP** como marco de referencia. Para ello, los centros de masa de **SAP** y la cianina **IR780** se trasladan a sus respectivos centros de masa en **CySAP** y las estructuras se alinean por rotación. Los momentos dipolares de transición involucrados fueron modificados a este nuevo marco de referencia. El factor de orientación se calculó de acuerdo con la siguiente expresión:¹¹³

$$\kappa^2 = (\cos\theta_T)^3 - 3\cos\theta_D\cos\theta_A)^2 \quad (4.8)$$

Donde θ_T es el ángulo entre el momento dipolar de transición del donador y el aceptor, y θ_D, θ_A representan al ángulo entre el vector que une a los cromóforos y el momento dipolar de transición del donador y el aceptor respectivamente. El código que se generó para la manipulación de los datos y el cálculo del factor de orientación se incluye en los anexos.

4.7. Espectroscopía Resuelta en Tiempo

La dinámica de los estados excitados de **SAP**, **IR780** y **CySAP** se estudió por suma de frecuencias de fluorescencia con resolución temporal de femtosegundos bajo condiciones de excitación bifotónica. Este estudio se usó para evidenciar y estudiar el proceso de transferencia de energía ultrarrápida desde los estados excitados superiores del fragmento polimetínico en **CySAP** que permite la isomerización bifotónica del efector.

Un esquema simplificado del montaje experimental se presenta en la Figura 4.5 y es descrito brevemente a continuación. El disolvente utilizado en los experimentos fue acetonitrilo. El experimento utilizó el haz láser descrito en la sección 4.5 como fuente de irradiación, el cual consiste en un tren de pulsos ultracortos (150 fs) con frecuencia de repetición de 1 kHz y 0.5 mJ de energía por pulso. El haz láser es separado para dar origen a los pulsos de excitación bifotónica y compuerta en el experimento. El haz de excitación es enfocado en la muestra con un lente con distancia focal de 100 cm en el seno de la muestra. La muestra circula constantemente utilizando una bomba de flujo de tal manera que la excitación ocurre en una porción no irradiada de la disolución. La emisión de fluorescencia fue recogida con un par de espejos parabólicos y se enfocó en un cristal de β -BBO (0.5 mm, 44.3°). La señal de fluorescencia se sumó en el cristal con el pulso de compuerta y el haz resultante se enfocó hacia un monocromador doble. Esta señal fue amplificada por un tubo fotomultiplicador y un amplificador *lock-in*, el cual se encuentra referenciado a un obturador óptico con frecuencia de 330 Hz.³⁹ El haz de compuerta atraviesa una etapa de retraso ajustable, lo cual

nos permite identificar la naturaleza de los estados excitados a diferentes tiempos y reconstruir la cinética de decaimiento de los estados excitados.

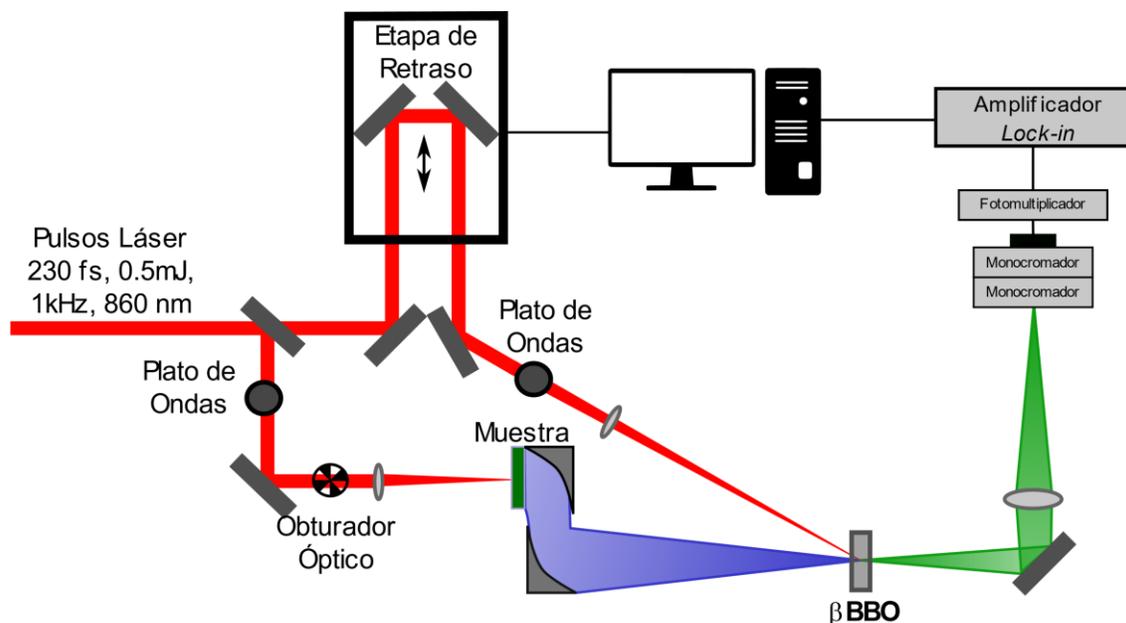


Figura 4.5. Esquema del montaje experimental para la técnica de suma de frecuencias bifotónica. Las líneas rojas representan haces de 800 nm, la línea azul a la emisión de la muestra y las verdes corresponden a longitudes de onda resultantes de la suma de frecuencias.

Al utilizar pulsos ultracortos para la excitación y detección de la fluorescencia, la señal detectada está convolucionada con el perfil temporal de intensidad de ambos pulsos. Para poder obtener información significativa acerca de la dinámica de estados excitados es necesario deconvolucionar la función de respuesta y posteriormente ajustar una función a los datos de decaimiento de la señal de fluorescencia.

Los experimentos con **IR780** y **CySAP** se realizaron de manera paralela con excitación bifotónica a 860 nm y detectando la fluorescencia resuelta en tiempo a 475, 500, 525, 575 y 600 nm lo cual corresponde a la región espectral de emisiones del estado S_2 cianínico y de estados receptores superiores del efector. Para la detección de señal con **SAP** se requirió incrementar la concentración del soluto y aumentar la energía del pulso debido a su menor sección transversal bifotónica.²⁸ Los experimentos mencionados en esta sección fueron realizados con apoyo de Leonardo Muñoz, Jesús Duran y Bernardo Salcido, todos colaboradores del proyecto de investigación.

5. Resultados y Discusión

5.1. Síntesis Y Caracterización Del Compuesto Actuador Estilbenilazopirrol (SAP) Y Del Sistema Bicromofórico CySAP

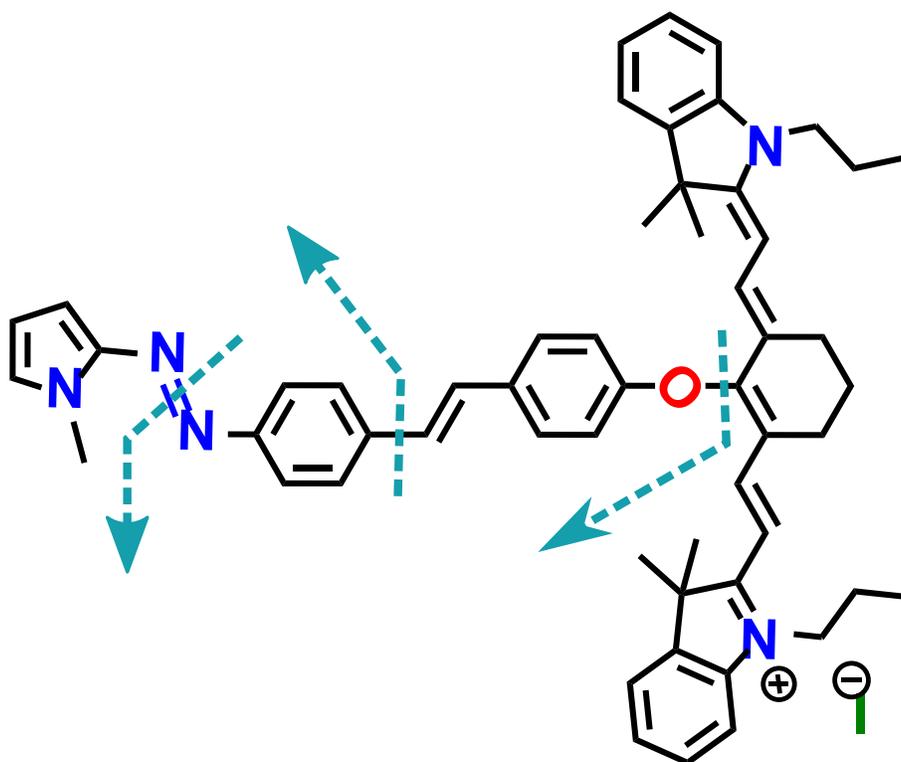


Figura 5.1. Desconexiones retrosintéticas para la obtención del compuesto bicromofórico **CySAP**.

La construcción de la molécula se llevó a cabo por el esquema convergente de la Figura 5.1, donde los fragmentos de la molécula final se unen de manera eficiente. Un paso preliminar corresponde a la síntesis del 4-hidroxiestireno vía una reacción de Wittig. Es necesario el uso de atmósfera inerte para evitar la destrucción del iluro de fosforo por la presencia de agua en el medio. Aunque se trata de una reacción sencilla, varios problemas surgen debido a la tendencia del producto a polimerizar. El hidroxiestireno polimeriza con extremadamente facilidad por vía catiónica y radicalaria, incluso en fase sólida a bajas temperaturas debido a la gran capacidad del grupo hidroxilo de estabilizar a los intermediarios correspondientes.¹⁶⁰ Por este motivo, fue necesario evitar en todo momento el uso de ácidos fuertes para la neutralización del medio, evitar exponer el producto aislado a

temperaturas altas (>40°C), e incluso evitar el uso de disolventes clorados como DCM. En cualquiera de estas condiciones el sólido rápidamente se torna en una resina insoluble en la mayoría de los disolventes. A pesar de ello, en las condiciones mencionadas, se logró un rendimiento alto con los cuidados adecuados.

De manera paralela se realizó el acoplamiento azoico entre el *N*-metilpirrol y la 4-yodoanilina. La sal de diazonio derivada de la anilina debe ser generada en un medio acuoso ácido, sin embargo, fue necesaria la presencia de un cosolvente como la acetona o el metanol para asegurar la solubilidad en todo momento de los reactivos. El medio ácido se debió neutralizar al adicionar el pirrol para evitar la polimerización catiónica de este heterociclo. Fue necesario cuidar la velocidad de adición del pirrol, ya que este podría en algún momento reaccionar con dos equivalentes de la sal de diazonio y generar un compuesto bisazoico.¹⁰³ Con los cuidados adecuados, fue posible tener rendimientos cuantitativos para la formación del azopirrol (**AP**) correspondiente. La caracterización de ambos compuestos precursores se llevó a cabo por simple comparación con los espectros de RMN-¹H reportados en la literatura y el resultado de espectrometría de masas de alta resolución.

Los fragmentos hidroxiestireno y AP se unieron por acoplamiento C—C con la reacción de Mizoroki-Heck para generar el efector estilbenilazopirrol (**SAP**). La reacción se realiza clásicamente utilizando catalizadores basados en Pd, sin embargo, los azocompuestos tienden a coordinar de manera efectiva al metal impidiendo la reacción al promover la activación C-H en posición orto.¹⁶¹ Por este motivo fue necesario el uso de un ligante robusto que limite la coordinación del grupo azo. El catalizador utilizado fue desarrollado por el grupo de José López y Carmen Ortega del Instituto de Química y el Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM respectivamente.^{28,154} Se utilizó un ligante N,N bidentado basado en pirrol y oxazolona capaz de catalizar efectivamente el acoplamiento. En el medio básico impuesto por la trietilamina, el hidroxiestireno se encuentra desprotonado siendo el fenóxido correspondiente un grupo extremadamente donador de densidad electrónica. Sin embargo, está reportado que la reacción es menos efectiva con estirenos con grupos electrodonadores como -N(CH₃)₂. Por este motivo, fue necesario aumentar el tiempo de reacción comparado al descrito anteriormente por los autores para obtener resultados comparables.²⁸ Los rendimientos alcanzados con esta modificación son buenos (77%) en una escala de hasta 2 g de sustrato utilizando un tubo sellado en vez de un reactor Parr como recipiente de reacción.

La reacción es altamente selectiva hacia el isómero *trans* del estilbeno generado lo cual se puede confirmar por RMN-¹H. Las asignaciones de las señales observadas en el análisis se realizaron apoyándose en los espectros bidimensionales utilizando la señal simple característica del grupo *N*-metilo como señal testigo (los espectros completos pueden ser encontrados en los anexos). Las señales correspondientes a los protones estilbenilo se presentan como señales dobles en 7.1 ppm, con una constante de acoplamiento $J=16.4$ Hz, la cual es característica del acoplamiento de núcleos en posición *trans* de un alqueno.¹⁶² Estos protones estilbenílicos se encuentran significativamente desprotegidos debido a la interacción con los anillos aromáticos a los que se encuentran enlazados, de tal manera que aparecen en la región del espectro donde se encuentran señales de anillos aromáticos.

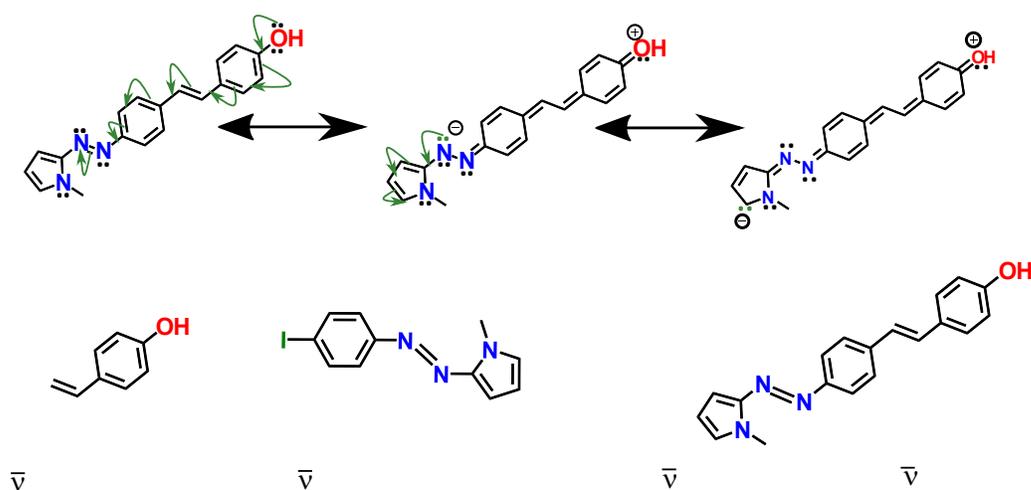


Figura 5.2. Estructuras de resonancia de **SAP** y señales características en el infrarrojo. Los valores respectivos para el 4-vinilfenol y el 4-yodofenilazopirrol se tomaron directamente de la literatura para comparación.^{163,164}

Los estilbenilazopirroles se comportan como sistemas *push-pull*, en los que la transición electrónica HOMO-LUMO induce transferencia de densidad electrónica desde una sección de la molécula (*push*) a un aceptor adecuado (*pull*). Se ha visto que el grupo pirrol puede actuar tanto como donador o aceptor de densidad electrónica dependiendo la naturaleza del estilbeno al cual se encuentre unido. Ante la incorporación del grupo electrodonador hidroxilo en **SAP**, el pirrol podría actuar como aceptor de densidad electrónica como se visualiza en la Figura 5.2. La espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) aporta evidencias acerca de este comportamiento. La señal

correspondiente al estiramiento del enlace C=C de **CySAP** se encuentra 24 cm^{-1} por debajo de la esperada para 4-hidroxiestireno. De la misma manera el estiramiento asimétrico N=N está 18 cm^{-1} por debajo del observado para el azocompuesto precursor. Ambas evidencias indican que el orden de enlace ha disminuido como resultado del carácter push-pull de la molécula al disminuirse la densidad electrónica en los enlaces correspondientes. El debilitamiento del enlace tendrá consecuencias importantes en la cinética de isomerización del grupo azo al disminuir la energía de activación para el proceso térmico (ver sección posterior). Los espectros completos de RMN e IR se incluyen como anexos al final del texto.

El efector **SAP** se unió a la antena polimétinica **IR780** por una reacción de sustitución nucleofílica en la posición meso de la cadena polimetínica. El mecanismo por el cual ocurre la reacción no es del todo claro y existen dos propuestas prominentes, las cuales se muestran en la Figura 5.3.

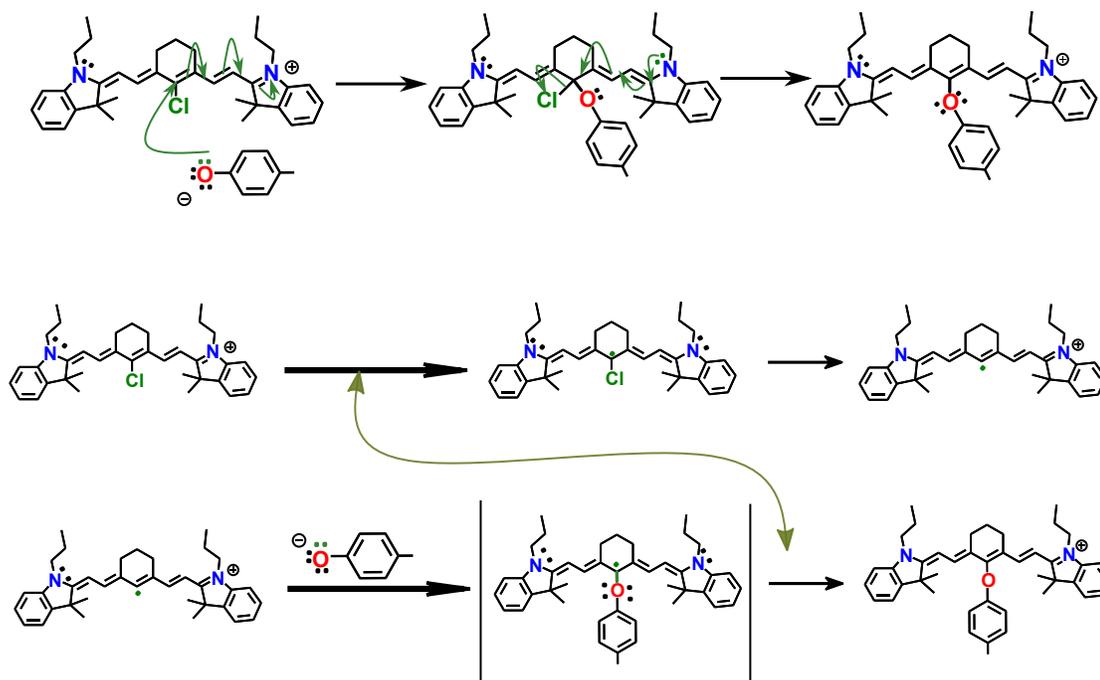


Figura 5.3. Posibles mecanismos para la reacción de sustitución sobre la posición meso: a) Mecanismo adición—eliminación b) Mecanismo de sustitución nucleofílica radicalaria de primer orden. La reacción se efectuó en condiciones anhidras y libres de oxígeno utilizando acetonitrilo como disolvente (ver arriba).

La primera propuesta corresponde a un mecanismo típico de adición—eliminación.¹⁶⁵ En el medio alcalino impuesto por el exceso de la trietilamina, el grupo hidroxilo se encuentra desprotonado

siendo un nucleófilo de fuerza moderada. Debido a la carga positiva en la cadena polimetínica, el patrón de conjugación y el halógeno, la posición meso es altamente electrofílica, similar a un derivado de ácido, por lo que la reacción de adición debería proceder sin problemas. La eliminación debería proceder fácilmente al generar un sistema altamente conjugado. Es posible que la reacción sea catalizada de manera directa por la trietilamina reaccionando con la **IR780** previamente y sea el grupo trietilamonio el grupo saliente cuando se dé la sustitución por el fenol.

La segunda propuesta involucra un mecanismo de sustitución nucleofílica radicalaria de primer orden ($S_{RN}1$).⁴⁰ El paso de iniciación involucra un paso de reducción, donde el reductor podría ser en primera instancia el fenol debido a sus conocidas propiedades redox. La reacción en cadena consiste en pasos de reducción, ionización, adición y oxidación en ese orden. De acuerdo con ambos mecanismos es importante trabajar en condiciones anhidras, ya que el agua podría adicionarse como nucleófilo de manera irreversible y disminuir la eficiencia de la reacción. Además, si la reacción ocurriese bajo un mecanismo $S_{RN}1$ sería vital desgasificar el medio de reacción. El oxígeno disuelto en el medio terminaría la reacción en cadena. Trabajando en condiciones anhidras y en atmósfera inerte de nitrógeno se obtienen buenos rendimientos para la reacción en escala de gramos.

De acuerdo con la RMN-¹H, se conservó el patrón de señales de una cianina heptametínica meso-sustituida indicando que la reacción ocurrió en la posición anteriormente ocupada por el átomo de cloro. La adición de **SAP** en cualquier posición diferente hubiera generado un cambio importante en la simetría de la molécula lo que debería haber conducido a una multitud de señales anormales en los espectros. En el espectro mostrado se resaltan las modificaciones de señales correspondientes a átomos en la cadena polimétínica hacia campo alto. El desplazamiento observado para estas señales es consistente con la sustitución del halógeno por un átomo de oxígeno con carácter electrodonador. Cabe recalcar que las señales correspondientes a **SAP** sufren modificaciones mínimas, lo cual era de esperarse ya que la transformación no resulta en diferencias significativas de la estructura al unirse con el fragmento polimetínico. Los espectros completos con las asignaciones completas se encuentran en los anexos. Adicionalmente, se conoce que las cianinas pueden adicionar nucleófilos como hidruros, alcóxidos y cianuro en la posición C2 de la cadena polimetínica (Carbono B en Figura 5.4).¹²⁶ Sin embargo, el espectro de RMN-¹³C indica que no existe una modificación importante en la señal del C2 encontrada arriba de 170 ppm por lo que se descarta una reacción en esta posición. Lo que se observa es la desaparición de la señal a 145 ppm del carbono meso unido a cloro y la aparición de una señal similar a 153 ppm. El desplazamiento de la

señal a campo bajo es congruente con la mayor electronegatividad del átomo de oxígeno al que se encuentra ahora unido este carbono meso.

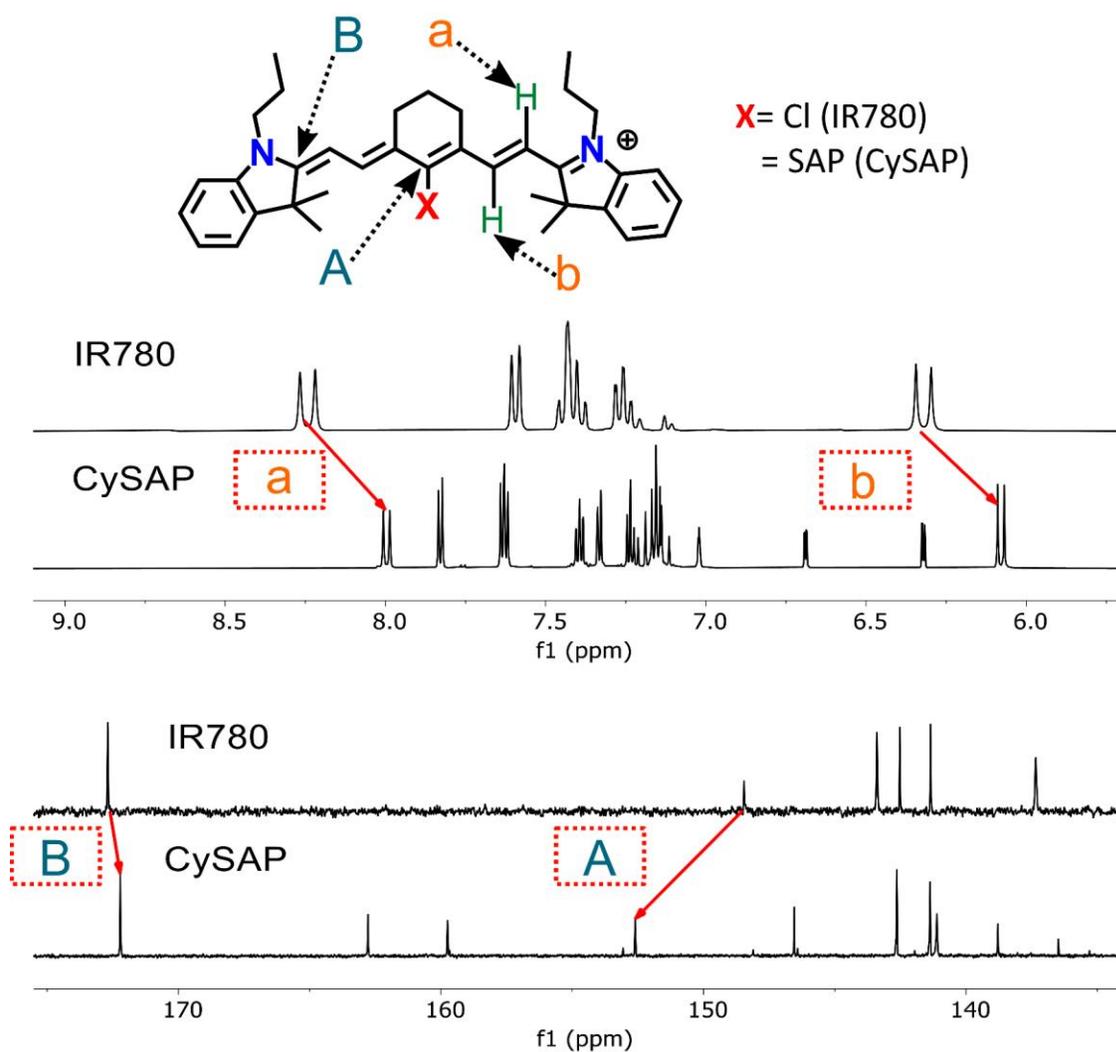


Figura 5.4. Comparación de espectros de resonancia magnética nuclear. Arriba: RMN-¹H. Abajo: RMN-¹³C. Se utiliza DMSO-d₆ como disolvente para ambos compuestos. Los espectros de **IR780** fueron tomados a 300 MHz y los correspondientes a **CySAP** a 700 MHz.

5.2. Espectroscopía Óptica Estática

El sistema **CySAP** consiste en dos cromóforos interactuantes de tal manera que se localizan las propiedades de óptica no lineal y la respuesta fotoquímica en secciones diferentes de la molécula. El requisito fundamental para el funcionamiento del diseño bicromofórico es mantener la independencia de los cromóforos al realizar la unión y así conservar sus propiedades fotofísicas. Esta característica se evaluó observando las transiciones electrónicas de cada cromóforo en la dupla por espectroscopía óptica. En primera instancia, se describen las transiciones electrónicas observadas en los espectros de absorción de los cromóforos aislados que componen a **CySAP** mostrados en la Figura 5.5.

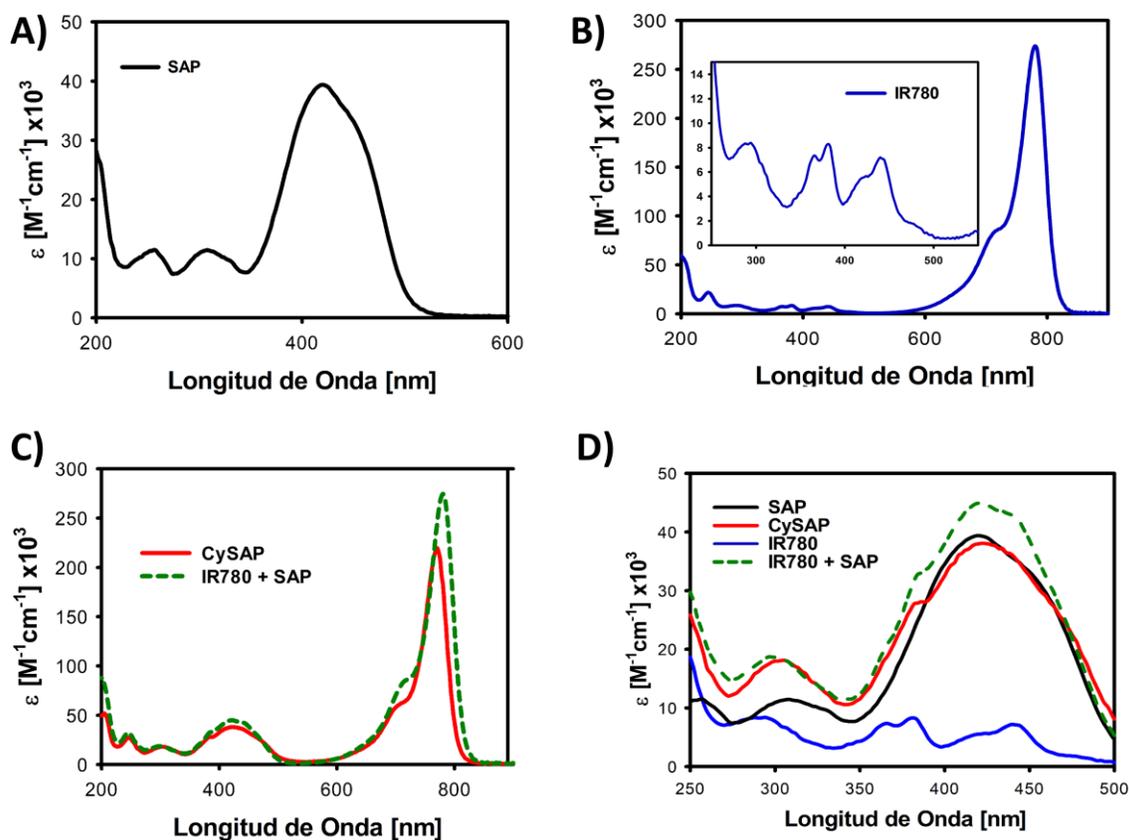


Figura 5.5. Espectros de absorción UV-Vis de A) Estilbenilazopirrol (**SAP**), B) **IR780** y C) **CySAP**. En la figura C se añade la suma de los espectros de los cromóforos individuales como comparación. D) Acercamiento a la región espectral comprendida entre 250–500 nm. Todos los espectros mostrados fueron adquiridos utilizando acetonitrilo HPLC como disolvente.

El espectro de absorción del efector **SAP** se caracteriza por una transición $\pi-\pi^*$ altamente permitida observada como una banda ancha e intensa entre 350–500 nm en la Figura 5.5 (inciso A). A diferencia del azobenceno, no es posible observar la transición $n-\pi^*$ la cual tendería a ser de menor energía.⁸⁶ Debido a la naturaleza *push-pull* del compuesto, **SAP** se comporta como un pseudoestilbeno en el que la banda $\pi-\pi^*$ esta desplazada hacia el rojo y virtualmente oculta a la transición $n-\pi^*$ formalmente prohibida por simetría.^{41,42,90} Esta transición $\pi-\pi^*$ se encuentra fuertemente desplazada hacia el visible respecto a otros azopirroles o azopirrazoles que absorben principalmente en el ultravioleta debido a la extensión de la conjugación del sistema π por el fragmento estilbenilo.^{28,41,100}

La cianina **IR780** tiene un espectro de absorción dominado por una banda característica intensa ($\epsilon=260\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\lambda_{\text{max}}=780\ \text{nm}$) correspondiente a la transición fuertemente permitida S_0-S_1 . La ampliación mostrada en la Figura 5.5 (Inciso B) en el intervalo de 300-500 nm muestra transiciones electrónicas a singuletes excitados superiores débilmente permitidas. La transición con un máximo local en 430 nm corresponde justamente a la transición poco permitida S_0-S_2 para un fotón pero, fuertemente permitida para transiciones bifotónicas en la región del infrarrojo cercano a 860 nm.¹⁶⁶

El espectro de absorción del sistema **CySAP** mostrado en la Figura 5.5 (inciso C) consta de dos secciones principales correspondientes a transiciones electrónicas de los cromóforos individuales que lo constituyen. La primera es una banda delgada y muy intensa en el infrarrojo cercano ($\lambda_{\text{max}}=770\ \text{nm}$, $\epsilon=220\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) asociada a la una transición electrónica localizada en el fragmento polimetínico. La segunda corresponde a una banda intensa y ancha entre 350–500nm asociada a una transición localizada en el grupo azoico. Como se observa en la Figura 5.5 (inciso C y D), el espectro de absorción de **CySAP** se reproduce con precisión con la suma de los espectros para los cromóforos individuales. Con esta observación se puede afirmar que los cromóforos mantienen la independencia de sus sistemas conjugados al realizar la unión entre ellos por lo que las propiedades fotofísicas de cada una de las secciones son conservadas. Algunas diferencias mínimas entre el espectro de **CySAP** y el resultante de la suma de los espectros de los cromóforos individuales mostrados en la Figura 5.5 se explican por cambios en la densidad electrónica de los respectivos sistemas π al formarse el enlace éter. El más notable es el desplazamiento hipsocrómico (10 nm) e hipocrómico en la banda de absorción del fragmento cianínico el cual se debe principalmente a la diferencia de electronegatividad entre el cloro y el oxígeno siendo este comportamiento reportado

previamente en la literatura.¹⁵¹ De igual manera, se observa un ligero efecto hipocrómico en la banda de absorción del grupo azo entre 350–500 nm, lo cual puede atribuirse a una disminución del carácter *push-pull* al sustituirse el fenol por el grupo éter menos electrodonador.

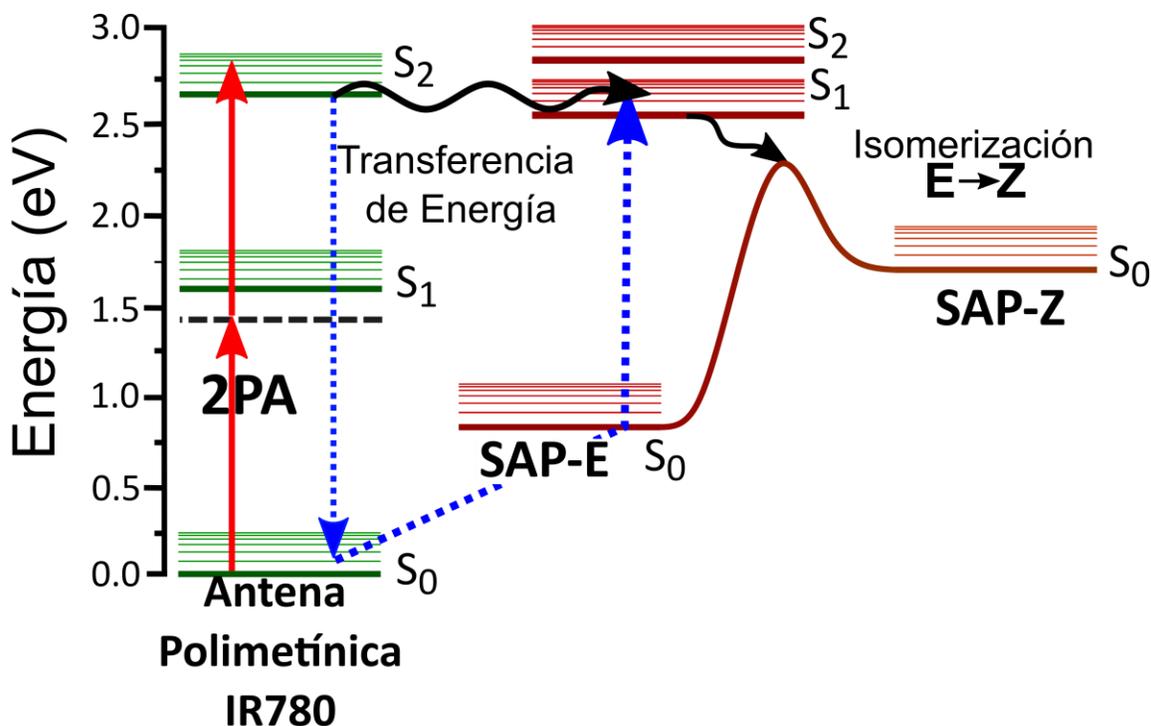


Figura 5.7. Diagrama de Jablonski de la fotoisomerización bifotónica del diseño bicromofórico **CySAP**. La respuesta óptica no lineal está mediada por la transferencia de energía hacia el efector azoico **SAP** desde estados excitados accedidos por TPA localizados en el fragmento polimetínico **IR780**.

El funcionamiento de la dupla cromofórica depende de la habilidad de los estados superiores localizados en el fragmento polimetínico ($S_{n>1}$) de transferir energía hacia el efector como se muestra en la Figura 5.7. Como se mencionó en los antecedentes, la transición electrónica $S_0 \rightarrow S_2$ de la cianina **IR780** está fuertemente permitida para dos fotones ($\sigma_2=460$ GM a 860 nm) y el estado excitado alcanzado tiene un tiempo de vida anómalamente largo para un singulete excitado superior a S_1 ($\tau=1.4$ ps).³⁹ La migración de la excitación del fragmento polimetínico hacia el efector puede inducir la fototransformación de éste por un evento de excitación bifotónico con luz en el infrarrojo cercano. Para ello, el estado alcanzado por TPA debe ser emisivo y corresponder en energía con la transición electrónica del efector a sensibilizar. Esta propuesta involucra una violación de la regla de

Kasha-Vavilov lo cual solo será posible si la transferencia de energía ocurre en una escala de tiempo menor al tiempo de vida de este estado donador.

La fluorescencia de estos estados excitados superiores se estudió irradiando directamente en las bandas de absorción de los estados cianínicos superiores con luz de longitud de onda entre 250—450 nm. La señal de fluorescencia detectada tiene una intensidad baja debido a que el estado emisor decae al estado S_1 . También fue necesario reconstruir la forma completa del espectro de emisión del estado S_2 utilizando curvas log-normal partiendo de los datos experimentales como se muestra en la Figura 5.8. El rendimiento cuántico de fluorescencia del estado S_2 se determinó en 8.1×10^{-5} el cual no es despreciable al tratarse de la emisión de un estado excitado superior. El espectro de excitación mostrado en la Figura 5.8 ($\lambda_{em}=525$ nm) confirmó que la emisión detectada proviene de los estados $S_{n>1}$ de la cianina y no de impurezas presentes en el medio al reproducir con fidelidad el espectro de absorción de las transiciones superiores del cromóforo polimetínico.

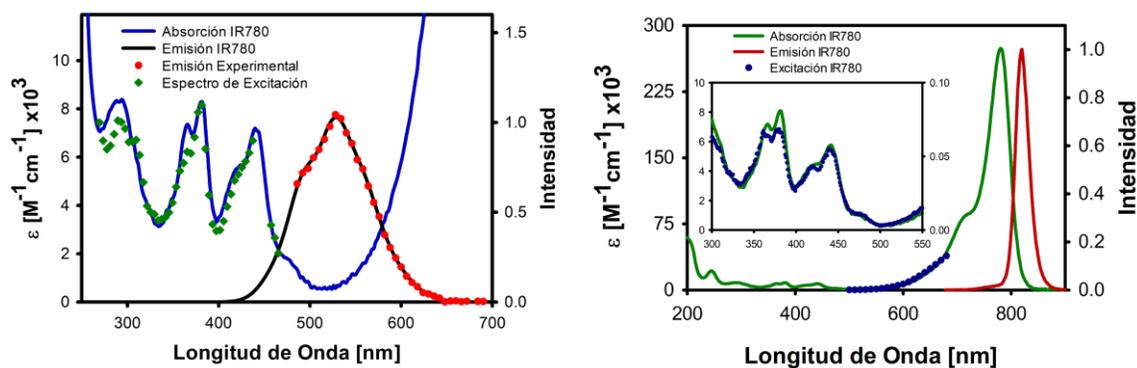


Figura 5.8. Espectroscopía de fluorescencia de la cianina **IR780**. Izquierda: Fluorescencia desde estados excitados superiores (S_2) de la cianina (rojo) y la reconstrucción del pico con curvas log-normal (negro). Se incluyen los espectros de absorción (azul) y de excitación detectando la emisión en 525 nm (verde). Derecha: Fluorescencia desde el estado S_1 de la cianina (rojo). Se incluyen los espectros de absorción y excitación correspondientes. Todos los espectros fueron tomados en acetonitrilo.

Además de la emisión desde los estados superiores, la cianina **IR780** presenta fluorescencia significativa desde el estado S_1 la cual se muestra en la Figura 5.8. El rendimiento cuántico de fluorescencia, reportado en 0.076 ,¹⁵⁶ no cambia significativamente al excitar en cualquier región del espectro como demuestra el espectro de excitación de la Figura 5.8. Esta observación indica que la conversión interna $S_n \rightarrow S_1$ es la vía de desactivación principal de estos estados excitados superiores

lo cual es congruente con su corto tiempo de vida ($\tau(S_2) = 1.4$ ps).³⁹ En general, los estados singulete $S_{n>1}$ decaen al estado S_1 por conversión interna ultrarrápida en escalas de tiempo de femtosegundos debido a la cercanía energética entre estos estados excitados por lo que difícilmente otros procesos fotofísicos pueden ocurrir.^{10,34,35} Sin embargo, el mecanismo fotofísico propuesto puede ser factible debido al tiempo de vida anómalamente largo del estado excitado S_2 (1.4 ps contra decenas de femtosegundos) de la cianina ocasionado por la brecha energética entre los estados S_2-S_1 .³⁹ El proceso de transferencia de energía desde estados excitados superiores propuesto en la Figura 5.7 debe ocurrir en una escala de tiempo menor para poder competir de manera significativa con la desactivación del estado S_2 por conversión interna ($S_{2(\text{cianina})} \rightarrow S_{1(\text{cianina})}$). Esta condición puede ser alcanzada con cuidadoso diseño del sistema bicromofórico como se discutirá en secciones posteriores.

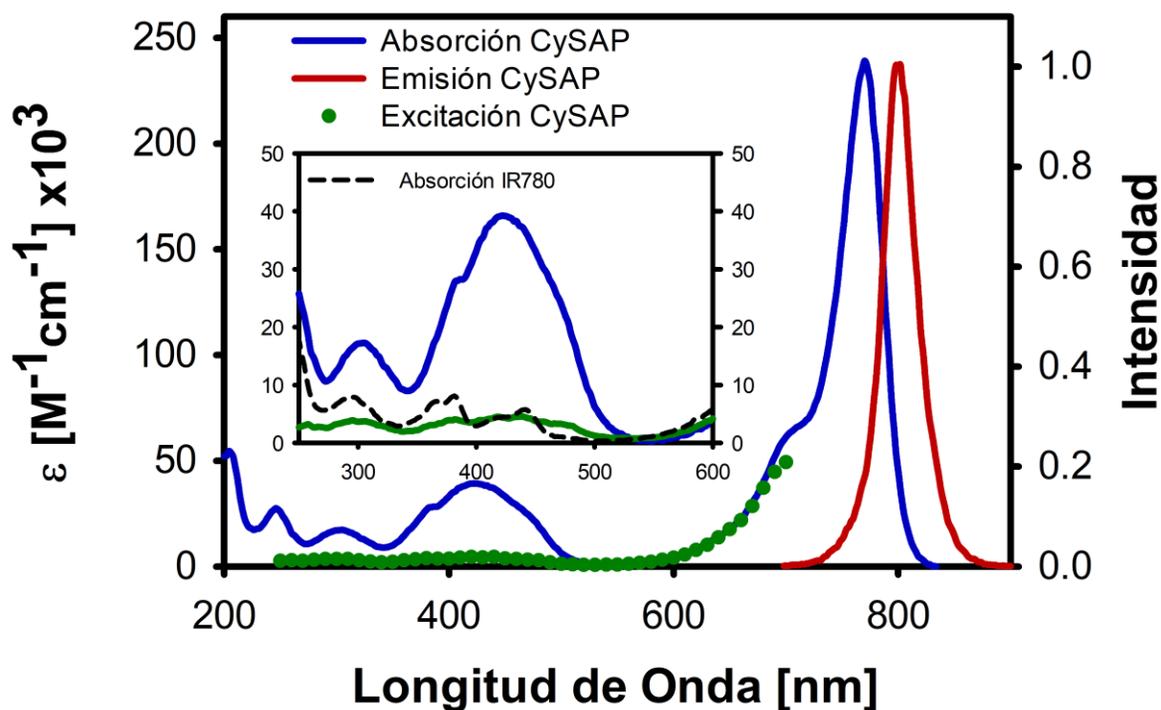


Figura 5.9. Espectroscopia de fluorescencia de **CySAP**. En el recuadro se presenta un acercamiento a la región comprendida entre 250 y 600 nm y se anexa el espectro de absorción de la **IR780**. El espectro de excitación se realizó monitoreando la emisión del máximo localizado en 800 nm.

El sistema bicromofórico **CySAP** presenta importante fluorescencia desde el fragmento cianínico como se evidencia en la Figura 5.9 con un máximo emisor en 800 nm. El rendimiento cuántico de fluorescencia excitando directamente al fragmento cianínico en 680 nm corresponde a 0.12

utilizando **IR780** como referencia. El ligero aumento en rendimiento estaría asociado al cambio en densidad electrónica debido a la sustitución en la posición meso. El espectro de excitación revela información sumamente importante para el análisis de la dupla donde se pueden distinguir dos secciones. En longitudes de onda superiores a 600 nm, el espectro de excitación reproduce con precisión al espectro de absorción indicando que la excitación en esta zona conduce directamente al estado emisor, lo cual es de esperarse ya que se está excitando directamente el estado S_1 de la cianina. Al ser irradiado **CySAP** entre 250—500 nm, el espectro de excitación detectando la emisión cianínica del estado S_1 a 800 nm no reproduce el espectro de absorción de ninguno de los cromóforos individuales. En esa región del espectro ocurren transiciones electrónicas localizadas tanto en el fragmento polimetínico como en la sección azoica y esta observación sugiere que el estado S_1 de la cianina puede ser formado como resultado de cualquiera de estas excitaciones iniciales.

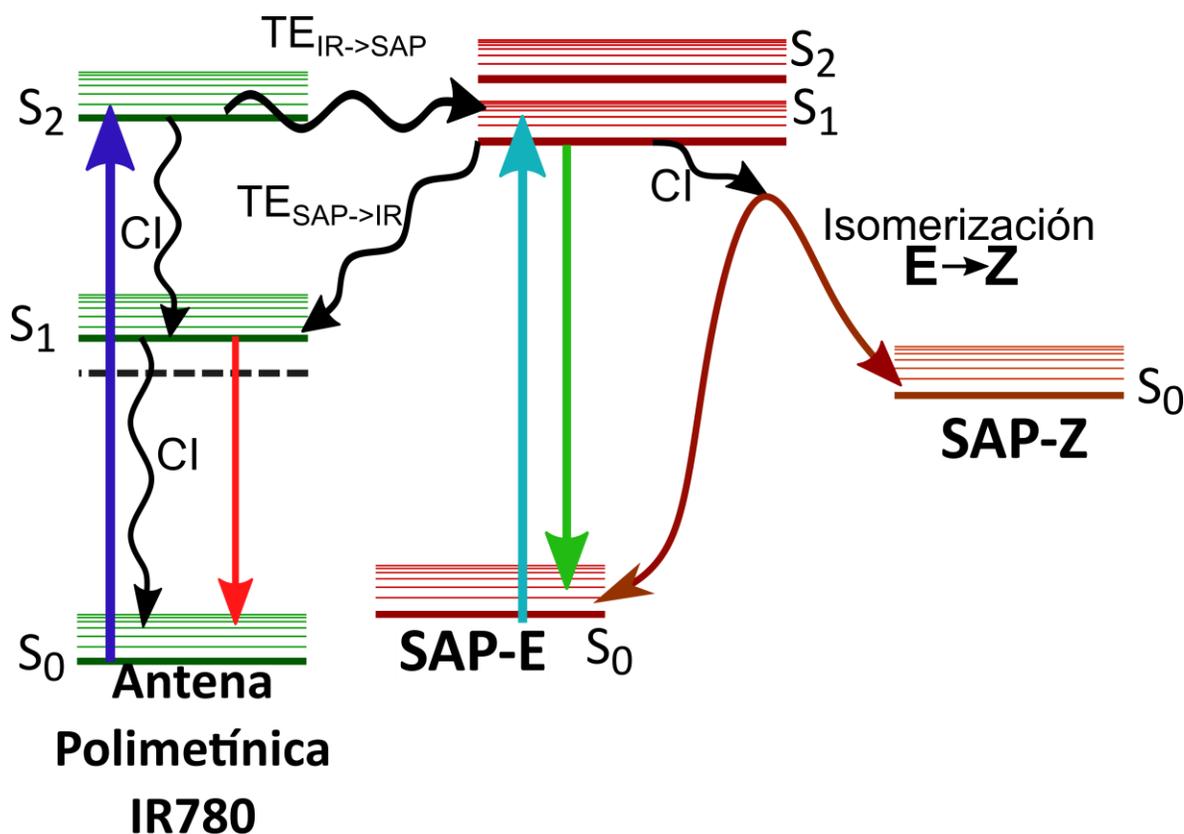


Figura 5.10. Diagrama de Jablonski para los posibles procesos fotoquímicos encontrados en el sistema bicromofórico **CySAP**. En el diagrama se utilizan los acrónimos CI (conversión interna) y TE (transferencia de energía) para facilitar la visualización.

El mecanismo fotofísico del sistema bicromofórico presentado anteriormente es una idealización del funcionamiento de la dupla. Una imagen más realista de la fotofísica del sistema es presentada en la Figura 5.10. Además del ya mencionado proceso de transferencia de energía $S_2(\text{IR}) \rightarrow S_1(\text{SAP})$, la transferencia de energía $S_1(\text{SAP}) \rightarrow S_1(\text{IR})$ es una posibilidad. Este fenómeno de retrotransferencia de energía podría ser un lastre significativo para nuestro diseño antena bifotónica—efector. La sensibilización óptica no lineal del sistema no sería observable si este fenómeno fuera un proceso fotofísico principal ya que el estado S_1 de **SAP** actuaría solo como un estado intermedio en la conversión interna $S_2 \rightarrow S_1$ de la cianina sin poder isomerizar. Reiterando, la sensibilización bifotónica del azocompuesto en nuestro diseño requiere que esta “retrotransferencia de energía” (**SAP**→ cianina) no sea favorable.

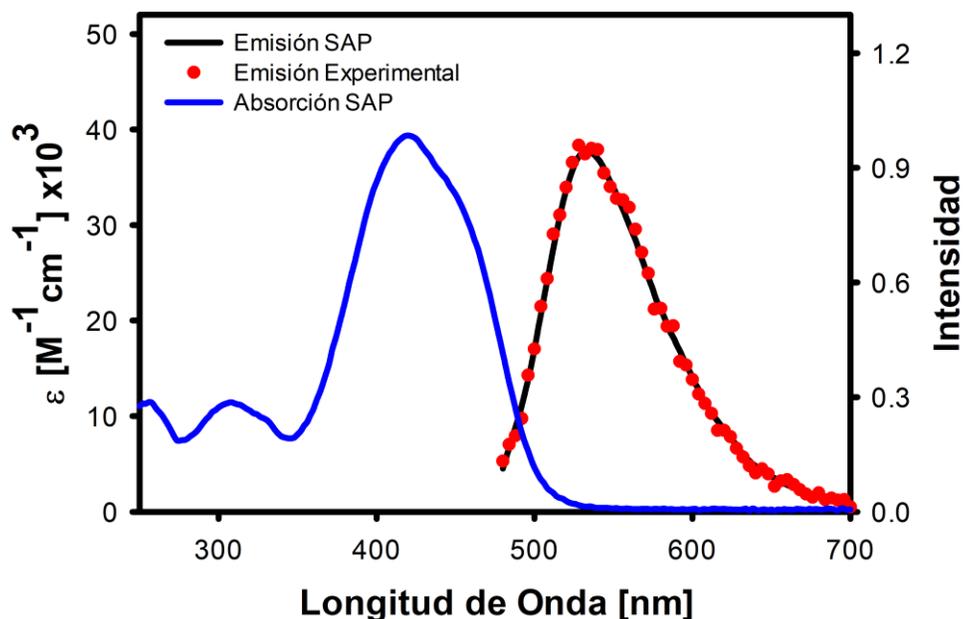


Figura 5.11. Espectroscopía de fluorescencia de **SAP**. Se usó acetonitrilo como disolvente.

Como primera aproximación, la espectroscopía de fluorescencia de **SAP** mostrada en la Figura 5.11 otorgó información importante sobre el destino de la energía de excitación en ausencia de la antena polimetínica. El rendimiento cuántico para la emisión corresponde a $\Phi = 4.9 \times 10^{-4}$ y se observa un importante desplazamiento de Stokes de cerca de 100nm. La presencia de intersecciones cónicas en la superficie de energía potencial de estados excitados de los azocompuestos da como resultado rendimientos de fluorescencia minúsculos como el observado al ser la conversión interna hacia la forma *Z* o *E* su principal vía de relajación.^{41,90} No se incluye el espectro de excitación debido a que no otorga información relevante acerca de la naturaleza del estado excitado ya que los

azocompuestos no siguen la regla de Kasha, exhibiendo diferentes rendimientos dependiendo de la longitud de onda de excitación.^{41,90}

El rendimiento de la transferencia de energía indeseada $S_1(\text{SAP}) \rightarrow S_1(\text{IR})$ se estimó experimentalmente al comparar los rendimientos de fluorescencia excitando en diferentes regiones del espectro. La intensidad de la señal de fluorescencia fue normalizada respecto al valor de intensidad al excitar a 700 nm, lo que corresponde a una excitación directa del fragmento polimetínico. La información provista en la Figura 5.12 se utilizó para estimar el rendimiento de este proceso de transferencia de energía parásita de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\Phi_{S_1(\text{SAP}) \rightarrow S_1(\text{Cy})}(\text{Experimental}) = \frac{\phi_{500 \text{ nm}}}{\phi_{680 \text{ nm}}} = 0.2$$

Donde $\phi_{500 \text{ nm}}$ y $\phi_{680 \text{ nm}}$ representan los rendimientos de fluorescencia al excitar en las respectivas longitudes de onda. El experimento no encontró diferencias significativas entre los disolventes por lo que esta elección no será relevante para los experimentos posteriores de excitación bifotónica

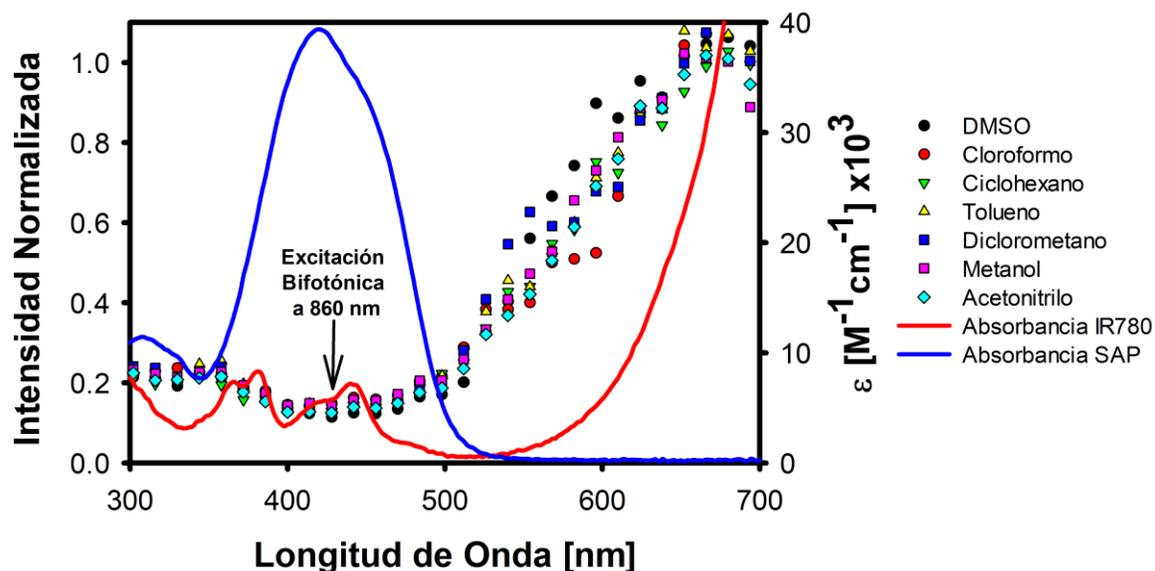


Figura 5.12. Espectroscopía de excitación normalizada para **CySAP**. Los símbolos presentan puntos del espectro de excitación en diferentes disolventes. Se grafican con líneas los espectros de absorción de los cromóforos independientes para comparación.

La proporción de eventos de excitación en ambos cromóforos da lugar al comportamiento observado en la Figura 5.12, donde al irradiar con $\lambda < 600 \text{ nm}$, la mayoría de estos no conduce al

estado emisor S_1 de la cianina lo cual es justamente lo deseable en este diseño. Elegimos reportar la estimación de esta transferencia de energía al irradiar alrededor de 500 nm, ya que en esta región la mayoría de los fotones son absorbidos exclusivamente por **SAP** y la absorción debida a excitaciones localizadas en el fragmento polimetínico es despreciable. El rendimiento: $\Phi_{S_1(\text{SAP}) \rightarrow S_1(\text{Cy})} = 0.2$, para este proceso indeseado sugiere que no es un factor que obstruye tajantemente nuestro diseño modular para la sensibilización bifotónica de la isomerización de azocompuestos. El valor encontrado se corrobora en secciones posteriores de forma computacional (ver abajo).

La estimación análoga para el rendimiento de transferencia de energía desde los estados electrónicos superiores de la cianina hacia el azocompuesto no es posible por este método, ya que la excitación de estos estados es encubierta por excitaciones localizadas en **SAP**. Sin embargo, este crucial parámetro se estimó teóricamente y los resultados se muestran en secciones posteriores de la presente tesis.

5.3. Fotoisomerización del efector por excitación directa

La respuesta reactiva a la luz del efector **SAP** se estudió bajo irradiación con luz visible tanto como sustancia aislada, así como dentro del sistema antena—efector **CySAP**. Los siguientes parámetros de desempeño como interruptor molecular fueron evaluados: Composición del estado fotoestacionario (EFE), cinética de isomerización térmica, rendimiento cuántico de fotoisomerización y resistencia a la fatiga. Los estudios se realizaron de forma paralela para **SAP** y **CySAP** para poder comparar directamente los resultados. El funcionamiento efectivo de nuestra propuesta modular necesita que estos parámetros no se vean significativamente afectados por la unión con el fragmento polimetínico, de lo contrario, se estaría sacrificando la acción del efector por la respuesta óptica no lineal, lo cual limitaría cualquier futura aplicación.

En primera instancia se estudió la cinética de fotoisomerización para determinar el tiempo necesario para alcanzar el EFE. Las muestras fueron excitadas utilizando el segundo armónico de un láser pulsado de femtosegundos entonado en 432 nm. Las disoluciones alcanzan rápidamente un estado fotoestacionario tras 9 minutos de irradiación como se muestra en la Figura 5.13. El patrón de modificaciones espectrales de **CySAP** es idéntico al observado para **SAP** sugiriendo que la fotoquímica del efector no se ve afectada al realizar la conjugación con la antena polimetínica. En

ambos casos se observó una pronunciada disminución en la absorción en el intervalo de 370—500 nm mientras que hay un aumento significativo entre 270—370 nm. El punto isobéptico localizado en 360 nm indica que se trata de un proceso limpio de isomerización involucrando únicamente a los isómeros *E* y *Z* sin sugerencia de que existan otras reacciones secundarias, lo cual se confirmó por experimentos de RMN del EFE (ver abajo). Es importante notar que la composición del EFE depende en general de la longitud de onda, potencia de irradiación y cinética del regreso térmico.

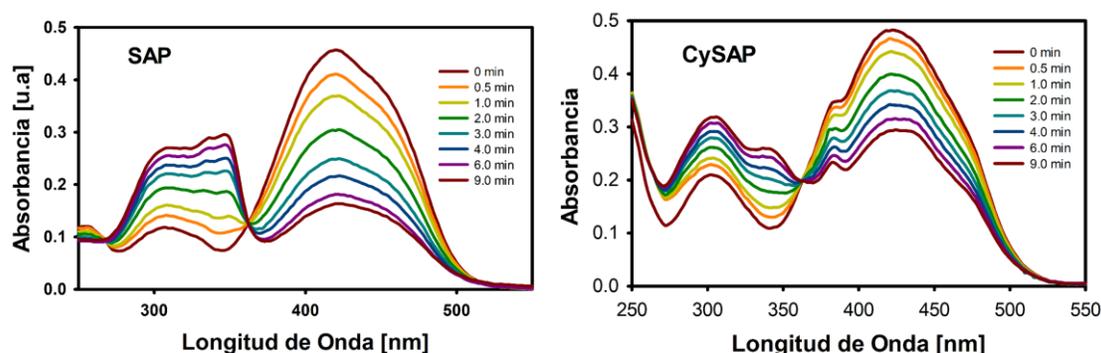


Figura 5.13. Evolución espectral de **SAP** y **CySAP**. Como fuente de irradiación se usa un láser pulsado entonado en 432 nm con una potencia de 2 mW.

El espectro de absorción del EFE se utilizó para estimar de manera simultánea el porcentaje de fotoconversión *E*->*Z* y el espectro de absorción del isómero *Z* formado. Los espectros del isómero *Z* mostrados en la Figura 5.14 exhiben un fuerte desplazamiento hipsocrómico de la absorción, lo cual probablemente es resultado de la disminución de la conjugación efectiva del sistema π del grupo azoico. Los compuestos heteroazoaromáticos con anillos de 5 miembros, como en **SAP**, adoptan una geometría torcida en su isómero *Z*, lo cual sitúa al grupo estilbenilo de forma perpendicular al grupo azo (Forma T, ver abajo).^{42,91,101} Esta torción impide la conjugación efectiva del sistema π a lo largo de toda la molécula que ocasionaba el pronunciado efecto batocrómico del isómero *E*-**SAP** respecto a otros heteroaril azocompuestos. La débil banda de absorción entre 420-500 nm exhibida por *Z*-**SAP** podría deberse a la transición n - π^* ligeramente permitida por el cambio de simetría de la molécula. La absorción entre 400—500nm de *Z*-**CySAP** está dominada por transiciones electrónicas localizadas en el fragmento polimetínico y no es posible discernir la absorción asociada a la transición n - π^* de **SAP**.

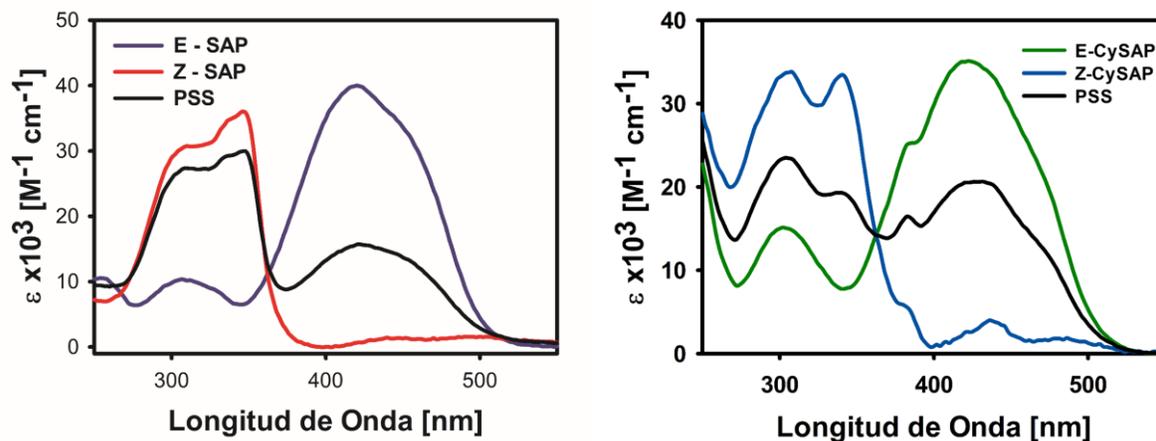


Figura 5.14. Espectro de absorción para los isómeros Z de **SAP** y **CySAP** en el estado fotoestacionario. La determinación fue realizada por el método de Calbo considerando un 68% y 46% del isómero Z en el EFE para **SAP** y **CySAP** respectivamente.⁴²

El porcentaje de isomerización se calculó en **68%** para **SAP** y en **46%** para **CySAP**. El rendimiento de la fototransformación en el EFE está limitado por la reacción de isomerización inversa fotoinducida o espontánea por un mecanismo térmico.^{41,90} El efecto hipsocrómico en la absorción del isómero **Z-SAP** induce una separación grande entre los máximos de absorción para las especies por lo que es posible excitar selectivamente solo a una de ellas y limitar el regreso fotoinducido $Z \rightarrow E$. Naturalmente, la absorción importante entre 400—500 nm en el espectro de **Z-CySAP** se debe a excitaciones localizadas en el sistema π de la cianina las cuales no contribuyen a la fotoisomerización $Z \rightarrow E$. Esta observación sugiere que el factor que limita la eficiencia del proceso es la transformación espontánea del isómero Z hacia el isómero E por un mecanismo térmico posiblemente exacerbada por el incremento local de temperatura en el sitio de irradiación. El porcentaje de fotoisomerización en el EFE de **SAP** y **CySAP** es adecuado en el contexto de interruptores moleculares donde se busca una transformación significativa. Ambos compuestos podrían ser incorporados para inducir una respuesta dinámica como en la desestabilización de nanosistemas o en polímeros responsivos.^{5,11,14}

La cinética de isomerización térmica $Z \rightarrow E$ se estudió al registrar la evolución temporal del espectro de absorción de las disoluciones cuando se les permite regresar desde el EFE al estado original en oscuridad a temperatura ambiente como se muestra en la Figura 5.15. En los recuadros respectivos se coloca la determinación de la constante de velocidad para ambos casos registrando el cambio de absorbancia a 420 nm. El regreso al estado inicial desde el EFE y la presencia del mismo punto

isobéptico en 360 nm indica que se trata del proceso inverso al de fotoisomerización de la Figura 5.13 y que no existen intermediarios diferentes a los del proceso fotoinducido. En ambos casos se observó un regreso completo tras 90 min en la oscuridad a temperatura ambiente sin evidencias obvias de fotodescomposición del efector. La absorción característica del fragmento polimetínico ($\lambda > 600$ nm) en **CySAP** no se alteró en ningún momento lo que sugiere que este fragmento no se ve afectado por lo que se descarta la posibilidad de disociación observada en otros sistemas bicromofóricos que incorporan a la cianina **IR780**.^{37,165} La constante cinética para el proceso unimolecular se determinó en 6.8×10^{-4} y $7.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ para **Z-SAP** y **Z-CySAP** respectivamente lo que corresponde a un tiempo de vida media ($\tau_{1/2}$) 17.0 y 16.0 min para el isómero Z generado. Este resultado indica que la conjugación del efector **SAP** con la antena no afecta significativamente el tiempo de vida de la especie generada. Azocompuestos con tiempo de vida en una escala similar han sido implementados en fotofarmacología, en el control de procesos biológicos y en sistemas de liberación de fármacos.^{11,12,25,41,97} En particular, estas aplicaciones se beneficiarían de la sensibilización óptica no lineal propuesta para **CySAP**, ya que el efecto está limitado a un volumen específico de irradiación utilizando luz en el infrarrojo cercano, la cual tiene mayor capacidad de penetración en tejidos biológicos sin fototoxicidad.⁶⁶

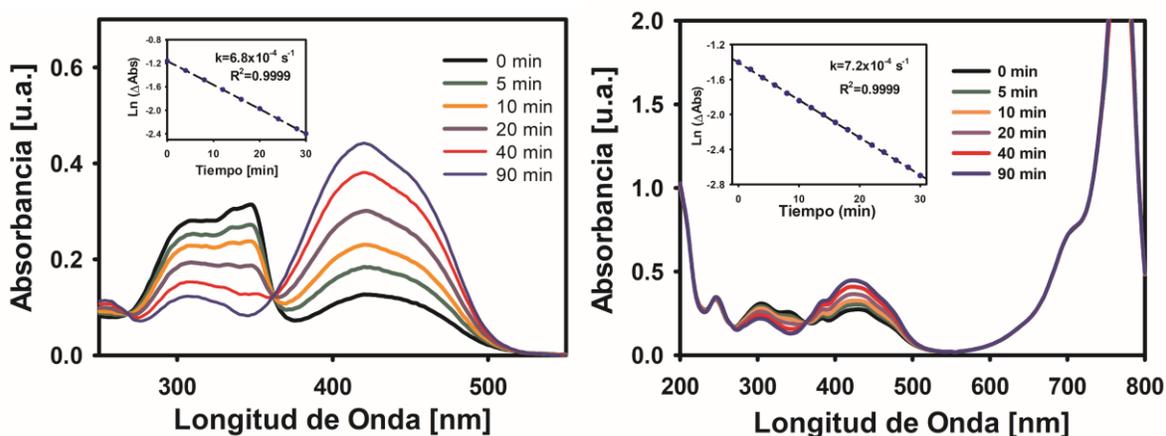


Figura 5.15. Relajación térmica de los compuestos tras fotoisomerización hacia el EFE de **SAP** (izquierda) y **CySAP** (derecha). En los recuadros se muestra la regresión lineal de los datos cinéticos de retorno.

El rendimiento cuántico de fotoisomerización se determinó como **0.29** y **0.22** para **SAP** y **CySAP** respectivamente. El procedimiento fue adaptado del desarrollado por Borjenson y se describió en la sección 4.3 del documento. El resultado indicó que la isomerización es un mecanismo importante

de desactivación y que no existe diferencias significativas entre los compuestos estudiados. El rendimiento ligeramente menor calculado para **CySAP** se debe a que parte de la luz a 405 nm es absorbida por el fragmento polimetínico y se relaja por conversión interna al estado S_1 de la cianina, como se observó en los experimentos de fluorescencia de **CySAP** (ver arriba). Los azocompuestos presentan una intersección cónica en la superficie de energía potencial del estado excitado, la cual puede conducir a cualquiera de los dos isómeros por conversión interna ultrarrápida siendo este mecanismo la vía de relajación principal del estado excitado.^{20,41,167,168}

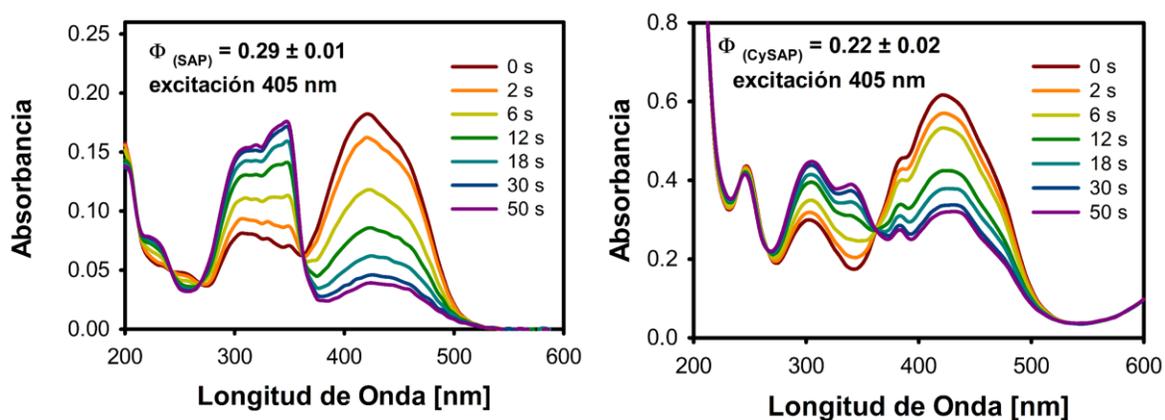


Figura 5.16. Determinación del rendimiento cuántico de fotoisomerización de **SAP** (izquierda) y **CySAP** (derecha). Los resultados para cada compuesto se presentan en la esquina superior izquierda de la gráfica. Las muestras fueron irradiadas con un láser continuo de 405 nm a 3 mW de potencia hasta alcanzar el estado fotoestacionario. En las figuras se presenta la evolución espectral de ambos compuestos tras diferentes periodos de irradiación.

Por último, la resistencia a la fatiga de los cromóforos fue evaluada tras varios ciclos de fotoisomerización/relajación térmica. En ambos casos se observó una completa recuperación del estado original tras cada ciclo como se muestra en la Figura 5.17 por lo que no existe evidencia de fatiga.

Los resultados mostrados en esta sección señalan que no hay diferencias importantes en la fotoquímica del efector **SAP** al realizarse la conjugación con la antena polimetínica en **CySAP**. La función de **CySAP** como interruptor molecular no es impedido por la presencia del fragmento cianínico. Esta conclusión se suma a las evidencias de independencia de los cromóforos encontradas por espectroscopía óptica estática (ver arriba).

Los parámetros de desempeño determinados para el efector indican que su posible implementación eficiente en diseños moleculares complejos como liposomas fotoactivables o polímeros funcionales. El presente trabajo representa una prueba de concepto de la fotoactivación no lineal del efector y las posibles aplicaciones quedan relegadas para futuros proyectos de investigación.

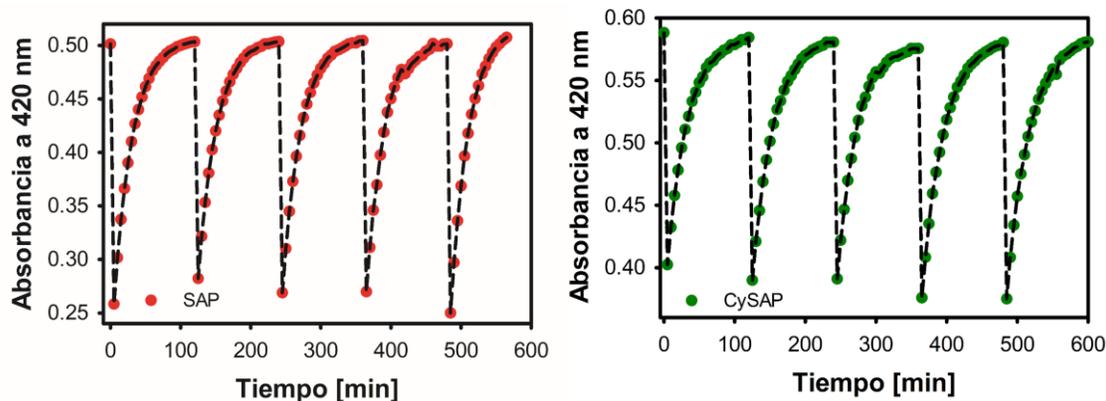


Figura 5.17. Resistencia a fatiga de **SAP** y **CySAP**. Las muestras fueron sometidas a cinco ciclos de isomerización/relajación. Se utilizó el segundo armónico del láser pulsado ($\lambda=860$ nm) entonado en 430 nm por 5 minutos con 3 mW de potencia como fuente de irradiación.

5.4. Resonancia Magnética Nuclear Del Estado Fotoestacionario

El estudio de la fotoisomerización por RMN aportó información valiosa sobre la identidad de la especie generada y sobre la especificidad de la reacción química fotoinducida. Como primer paso, se realizó el estudio de **SAP** por su mayor simplicidad estructural. Los espectros de RMN- ^1H del estado inicial compuesto exclusivamente por *E-SAP*, del EFE y del estado alcanzado tras relajación térmica **SAP** se muestran en la Figura 5.18.

El espectro del EFE mostró la clara aparición de señales nuevas en el espectro asociadas a la formación de *Z-SAP* y se asignaron con precisión utilizando experimentos de RMN bidimensional (ver abajo). Las señales testigo del grupo *N*-metilo localizadas en 3.95 ppm (*E-SAP*) y 4.01 ppm (*Z-SAP*) se utilizaron para determinar la proporción de estos isómeros. Las integrales de estas señales indican que el EFE alcanzado por irradiación con luz blanca consiste en 30% de *Z-SAP* y 70% de *E-SAP*. El espectro determinado después del periodo de relajación térmica no mostró señales diferentes al espectro del estado inicial indicando un proceso de fotoisomerización limpio y

reversible. La fiel reproducción del espectro inicial tras la relajación térmica que no muestra diferencias en las señales observadas después de la relajación indica la ausencia de procesos de fotodescomposición. En los espectros mostrados en la Figura 5.18 no se observan las señales asociadas al protón fenólico de **SAP**. Este protón puede intercambiarse fácilmente por deuterio proveniente del D₂O residual, proveniente del disolvente utilizado, al dejarse las muestras reposar en la oscuridad un tiempo considerable antes de realizar los experimentos. El intercambio resultaría en alteraciones al pKa del fenol y la contribución a la estabilidad de formas tautoméricas hidrazona y modificar el tiempo de vida determinado para **Z-SAP** (ver abajo).

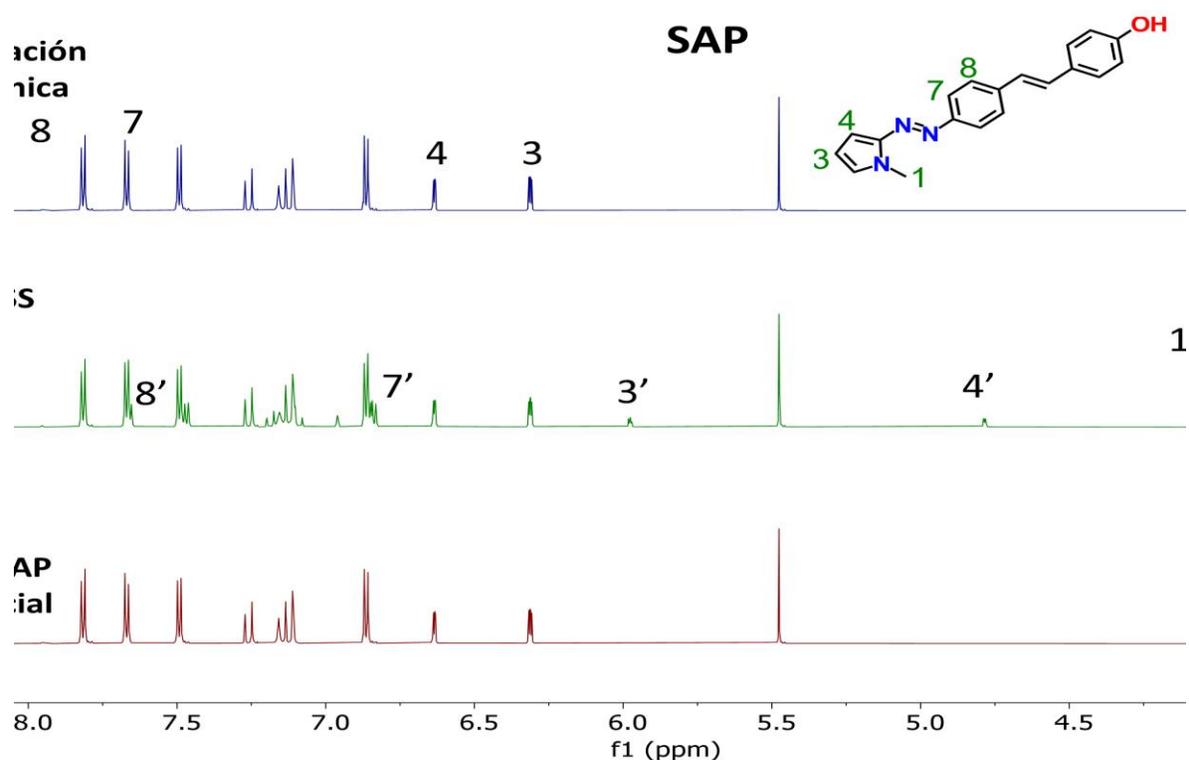


Figura 5.18. Espectroscopía de RMN-¹H del estado inicial, del EFE y de una muestra tras un periodo de relajación térmica. Los experimentos se realizaron en MeCN-*d*₃ utilizando luz blanca de una lámpara de halógeno-tungsteno. En la figura se muestra la asignación de algunas señales características. La asignación completa de las señales del EFE se encuentra en la Figura 5.21.

Los resultados de los experimentos correspondientes para **CySAP** se muestran la Figura 5.19 y a simple vista es evidente que la transformación observada es análoga a la vista para el efector **SAP** aislado. Las integrales correspondientes a las señales de los hidrógenos del metilo pirrólico (3.93 y

4.00 ppm para *E* y *Z* respectivamente) indican que el EFE este compuesto de una mezcla 50% *E*-**CySAP** y 50% *Z*-**CySAP**. Experimentos de RMN bidimensional confirman la identidad del compuesto *Z*-**CySAP** formado (ver abajo). Es de vital importancia notar que el espectro del estado tras relajación térmica reproduce fielmente al estado inicial y no existe ninguna evidencia de fotodescomposición. Estos resultados corroboraron que los eventos de excitación únicamente inducen la isomerización reversible del efector y no se induce la ruptura homolítica del enlace C—O como se ha observado en otros sistemas bicromofóricos que involucran a la **IR780** unidos por un enlace tipo éter.^{37,165}

El EFE alcanzado en ambos casos no es el mismo al alcanzado en experimentos anteriores donde la muestra fue irradiada con una fuente láser con longitud de onda discreta. Debido a que se utiliza una fuente no coherente de luz blanca, en este caso es posible también estar induciendo la reacción reversa de fotoconversión *Z*→*E*. Además, la excitación no selectiva del medio pudo incrementar la temperatura de la mezcla y aumentar así la velocidad de la reacción térmica inversa. Asimismo, las altas concentraciones necesarias para el experimento de RMN-¹H pudieron inducir fuertes efectos de “absorción en el frente de la celda” lo cual limita el grado de fototransformación alcanzada en el bulto de la disolución.

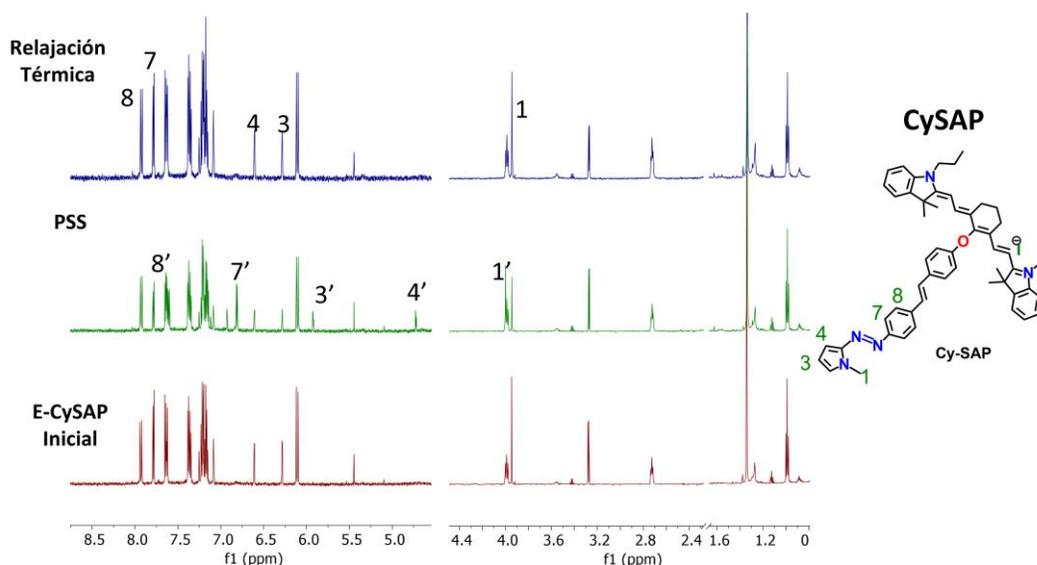


Figura 5.19. Espectroscopía de RMN-¹H del estado inicial, del EFE y de la muestra tras un periodo de relajación térmica. Los experimentos se realizan en MeCN-*d*3 utilizando luz blanca de una lámpara de halógeno-tungsteno. En la figura se muestra la asignación de algunas señales características. La asignación completa de las señales del EFE se encuentra en la Figura 5.22.

La cinética del proceso de isomerización térmica Z->E (de regreso al isómero térmicamente estable) de ambos compuestos fue estudiada de forma tangencial a los experimentos ya mencionados. La evolución temporal de los espectros de RMN-¹H de las disoluciones se presentan en la Figura 5.20. El ajuste de los datos cinéticos determinó una constante cinética para la reacción de isomerización Z->E de $8.1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ y $9.3 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ para **SAP** y **CySAP** respectivamente en las condiciones del experimento por RMN. Estos resultados corresponden a un tiempo de vida media $\tau_{1/2} = 14$ min y 12 min para Z-SAP y Z-CySAP respectivamente. El tiempo de vida de los isómeros formados encontrados difiere ligeramente del anteriormente determinado, lo cual puede deberse al efecto isotópico del disolvente.

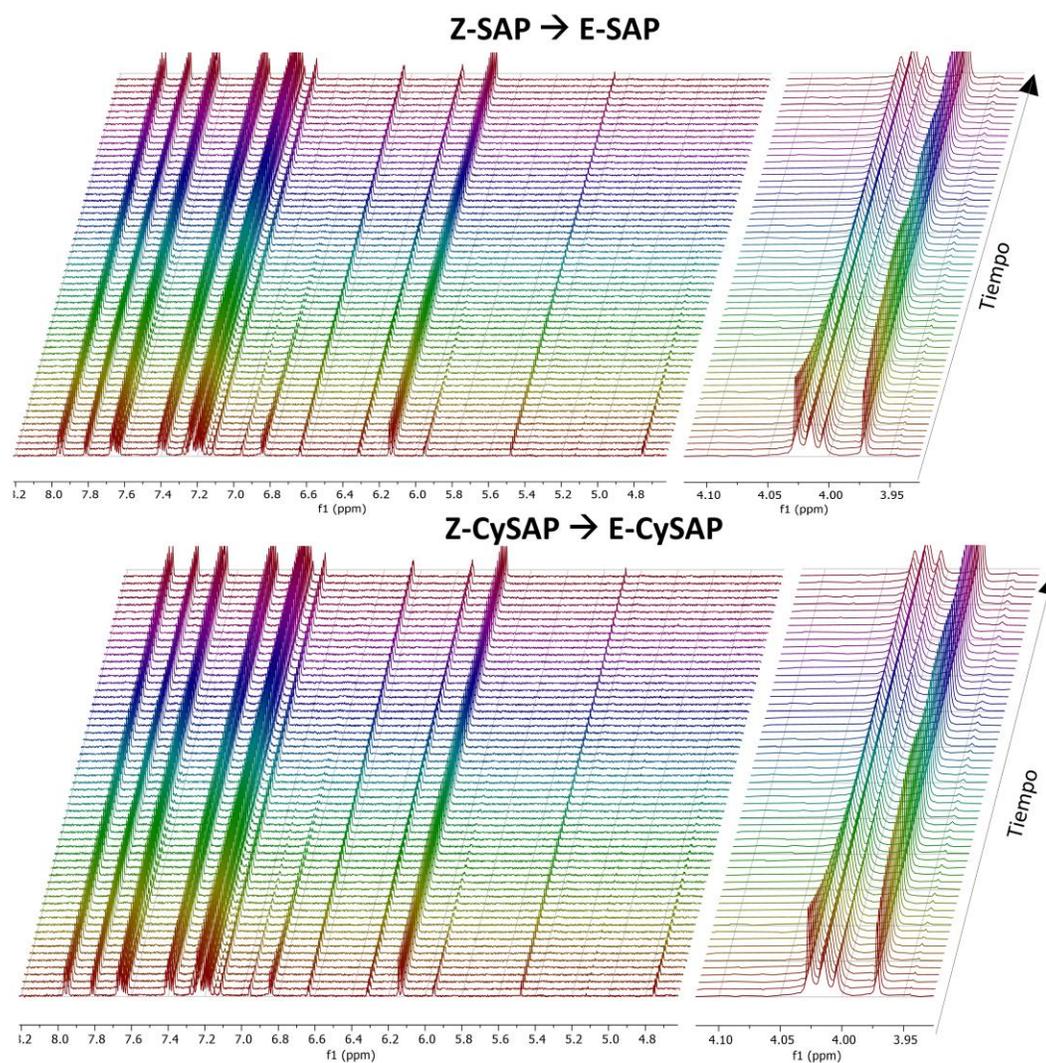


Figura 5.20. Evolución temporal del espectro de RMN-¹H del EFE de **SAP** (arriba) y **CySAP** (abajo).

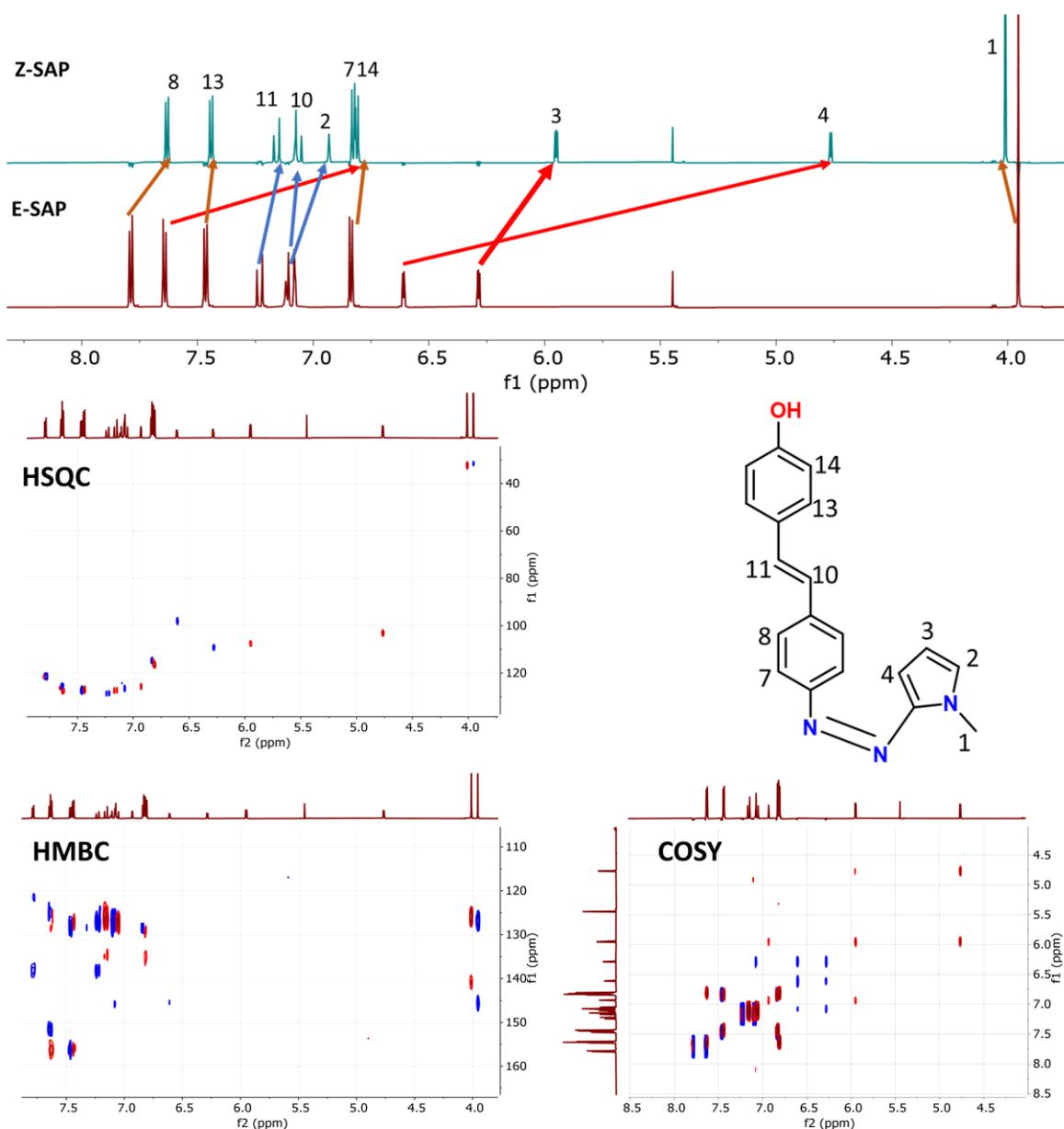


Figura 5.21. Espectro de RMN- ^1H para Z-SAP. Las señales asociadas al isómero Z fueron determinadas por simple resta del espectro de E-SAP al del EFE. Las asignaciones se basaron en los espectros bidimensionales HSQC, HMBC y COSY mostrados en la parte inferior de la figura.

Los cambios más sobresalientes en el espectro de Z-SAP se asocian a las señales de los hidrógenos cercanos al grupo azo (7,4 y 3 en la Figura 5.21) manifestando que la transformación está localizada en esta región de la estructura. La señal del hidrógeno 4 presentó un fuerte desplazamiento hacia

campo alto de 2 ppm. El desplazamiento tan grande de la señal del hidrógeno en la posición 4 hacia campo alto indica un aumento sustancial de apantallamiento del núcleo.¹⁶² El apantallamiento puede ser resultado de la interacción significativa entre este núcleo átomo y el campo magnético originado por la corriente de anillo del benceno vecino. Un estudio elaborado por Fuchter y Contreras-García muestra que azocompuestos con anillos heteroaromáticos de 5 miembros como pirrol y pirazol pueden adoptar una configuración de “*T*” estabilizada por las interacciones no covalentes tipo H- π .⁴² El mismo efecto es observado en el núcleo H-3, lo cual refuerza la hipótesis de una configuración tipo “*T*” del isómero Z. En este caso, el efecto observado en el núcleo H-3 es menor que el de H-4 debido a su mayor separación con el anillo de benceno en Z-**SAP**. Como último elemento a considerar, el desplazamiento de las señales del metilo pirrólico encontrado es de tan solo 0.1 ppm indicando que no hay diferencias en las interacciones intramoleculares de estos núcleos lo cual es coherente con la geometría propuesta.

En el compuesto bicromofórico **CySAP** existen varios enlaces isomerizables y se determinó la identidad de aquel que presenta la respuesta reactiva a la irradiación. La mayor complejidad del espectro y la menor concentración del analito impidieron realizar un análisis de las señales observadas en el EFE de Cy-**SAP** tan profundo como el realizado para **SAP**. Sin embargo, las señales asignadas en la Figura 5.22 fueron suficientes para realizar la caracterización del fotoproducto. Los cambios observados en el espectro fueron en gran medida idénticos a los encontrados para **SAP**. La señal asociada al hidrógeno en la posición 4 se desplazó fuertemente hacia campo alto, lo que sugiere que el compuesto adopta la misma conformación tipo “*T*” descrita anteriormente para **SAP**. Exceptuando las señales asociadas a los hidrógenos 2,7,3 y 1 en la Figura 5.22, no se observaron modificaciones importantes en el espectro de RMN confirmando así que la fotoquímica observada se debe únicamente a la isomerización del grupo funcional azo y que no existe algún otro fenómeno fotoinducido como isomerización de estilbena, la isomerización de los enlaces C=C de la cianina o la fotodisociación del compuesto efector.

En conclusión, los resultados presentados en esta sección de RMN del EFE confirmaron más allá de toda duda razonable que la transformación observada en **SAP** y **CySAP** por excitación directa del efector se debe únicamente a la isomerización fotoinducida *E*->*Z* del enlace N=N en el fragmento azoico. Además, los experimentos corroboraron que el proceso es completamente reversible sin signos de fotodescomposición alguna después de 45 min.

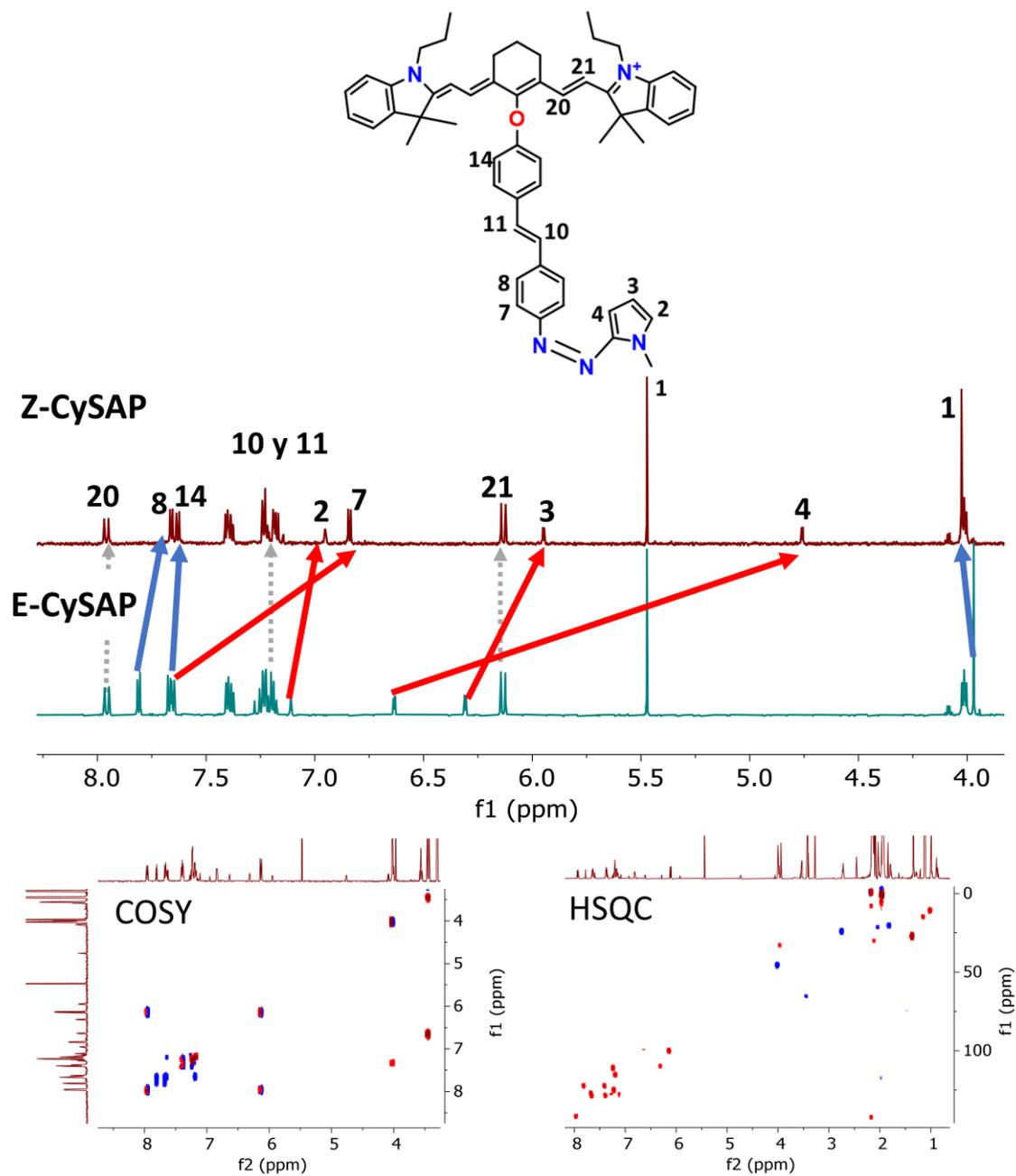


Figura 5.22. Espectro de RMN- ^1H para **Z-CySAP**. Las señales asociadas al isómero Z fueron determinadas por simple resta del espectro de **E-SAP** al del EFE. Las asignaciones se basaron en los espectros bidimensionales HSQC, HMBC y COSY mostrados en la parte inferior de la figura.

5.5. Isomerización Bifotónica por excitación indirecta mediada por estados superiores de la antena

El diseño fotoquímico del sistema **CySAP** involucra que los eventos de excitación bifotónica ocurran únicamente en la sección polimetínica de la molécula y que la migración de la energía hacia el fragmento azoico sensibilice la isomerización del efector. La antena bifotónica en **CySAP** es un derivado de la cianina **IR780** por sus excelentes propiedades ópticas no lineales en el infrarrojo cercano. Este compuesto presenta excitación bifotónica eficiente en el infrarrojo cercano con un valor alto de área transversal bifotónica ($\sigma_2=460$ GM) a 860 nm. La excitación bifotónica con fotones de 860 nm es equivalente en energía a fotones de 430 nm, por lo que se pueden promover transiciones electrónicas hacia los estados singlete superiores del fragmento cianina.

La fuente de irradiación utilizada en estos experimentos fue un láser pulsado entonado a 860 nm (el montaje experimental se describe en la sección 4.5.). Fotones con esta longitud de onda no pueden ser absorbidos de forma lineal por los cromóforos presentes en el medio de acuerdo con el espectro de absorción de los compuestos (ver arriba). Esta condición resulta esencial para poder observar fenómenos de óptica no-lineal y no eventos de excitación de un solo fotón.

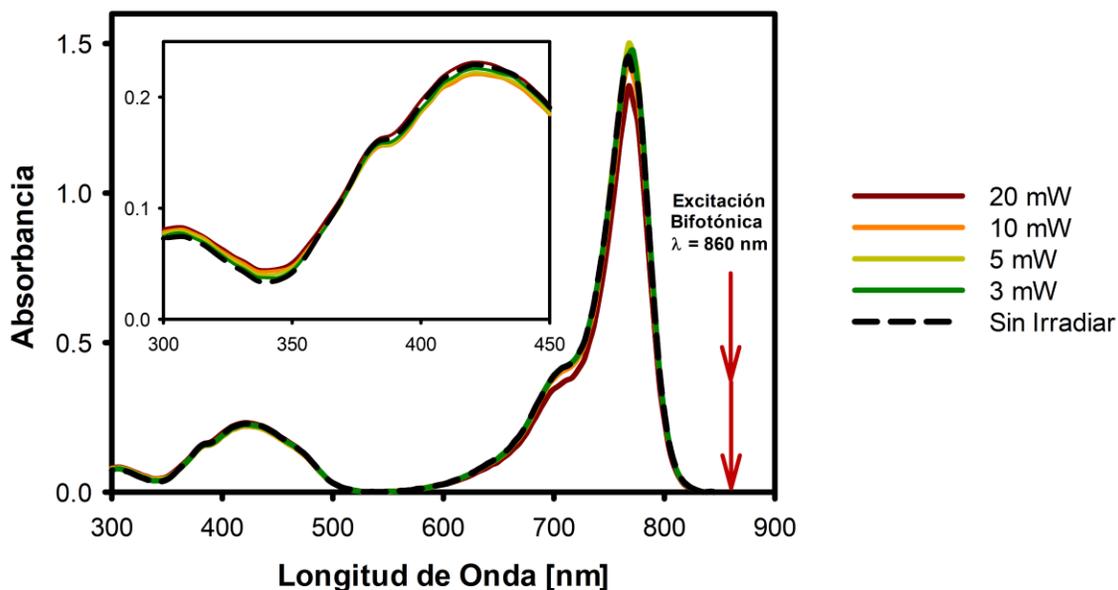


Figura 5.23. Evolución espectral de **CySAP** tras excitación óptica no lineal. El recuadro contiene un acercamiento la señal de absorción entre 300—450 nm.

La primera aproximación al control óptico no lineal de **CySAP** buscó determinar intervalos de potencia de irradiación en el que se observe una respuesta de isomerización del efector sin señales de fotodescomposición del compuesto. El experimento mostró evidencias de isomerización con potencias de irradiación promedio tan bajas como 3 mW. La evolución espectral de la muestra presentada en la Figura 5.23 indica que con potencias de irradiación menores a 10 mW la fototransformación de **CySAP** se restringió únicamente a la isomerización del fragmento azoico. El efecto observado a potencias de excitación mayores de 10 mW se limitó al fragmento polimetínico sin evidencias de fotoisomerización del efector. El espectro mostró una disminución de la absorbancia de longitudes de onda arriba de 650 nm sugiriendo la descomposición de la cianina. Es posible que procesos ópticos de orden superior induzcan reacciones de fragmentación, solvólisis o redox que conduzcan a compuestos sin absorbancia en esa región espectral.

La transformación observada se identificó como la isomerización del efector al reproducirse la misma respuesta observada por excitación directa monofotónica con irradiación en el visible con $\lambda=425$ nm (ver arriba). La respuesta de **CySAP** fue reversible y existió un regreso completo al estado inicial tras varios minutos de acuerdo con lo exhibido en la Figura 5.24. Esta información indicó que se trata de una isomerización limpia $E \rightarrow Z$ del azocompuesto sin evidencias de descomposición u otros procesos secundarios. El grado de conversión en el EFE se estimó en 7% con el método utilizado en la sección 5.3.

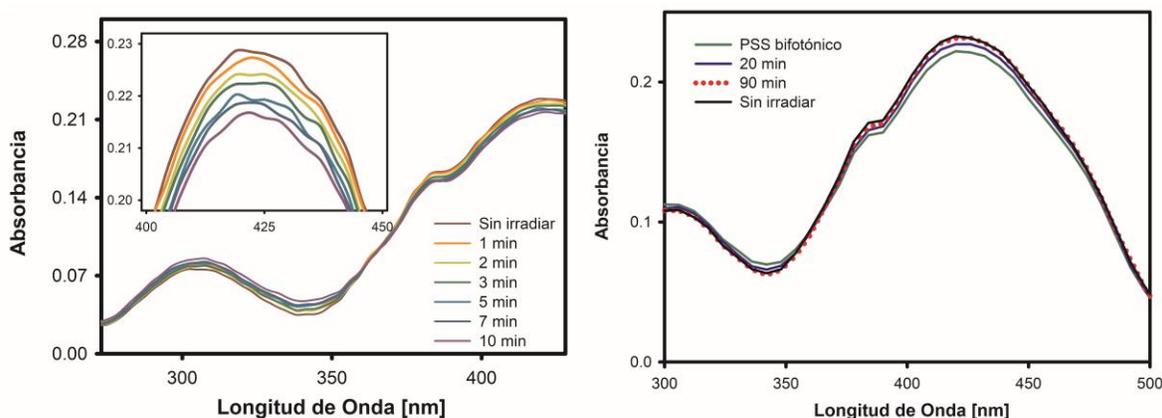


Figura 5.24. Izquierda: Evolución temporal hacia el EFE bajo excitación bifotónica a 860 nm con 5 mW de potencia promedio. Derecha: Relajación térmica del EFE bifotónico de **CySAP** hacia el estado inicial.

La principal ventaja del diseño es la restricción espacial del fenómeno por excitación por óptica no lineal por lo que no es relevante el grado de conversión en todo el volumen de la disolución. Además, el experimento realizado monitoreó el grado de isomerización con una técnica que detecta el efecto en el bulto por lo que no es posible conocer la eficiencia de la reacción en el punto focal. Los fenómenos inducidos por óptica no lineal encuentran aplicaciones en procesos que requieren respuestas en regiones confinadas en el punto focal de la irradiación como la microfabricación y el almacenamiento tridimensional de información. Los resultados mostrados en la presente sección no sugieren que el desempeño de **CySAP** como efector molecular en estas aplicaciones sea sub-óptimo y se necesita investigar su desempeño en el futuro.

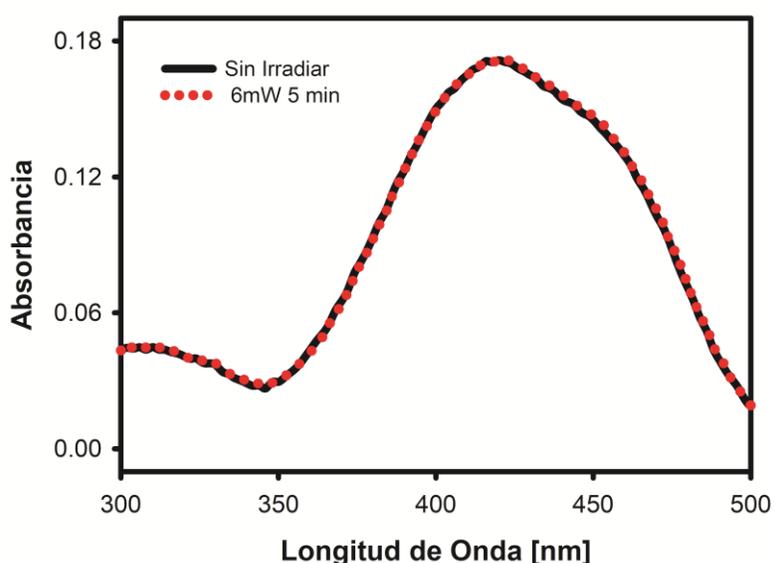


Figura 5.25. Espectro de absorción de **SAP** tras irradiación a 860 nm con un láser pulsado. No se observa ninguna respuesta del efector ante la irradiación en ausencia de la antena bifotónica.

La reacción de fotoisomerización observada se trató indudablemente de un proceso óptico no lineal al verse promovida por fotones de la mitad de energía que los anteriormente utilizado por excitación directa monofotónica. El efector **SAP** es un cromóforo no lineal poco eficiente con valor de sección transversal bifotónica insignificante ($\sigma_2=0.1-10 \text{ GM}$)²⁸ comparado con la antena **IR780** por lo que la respuesta no lineal observada debió deberse principalmente por excitación indirecta del azocompuesto. Esta aseveración se confirmó irradiando el compuesto **SAP** aislado en condiciones idénticas. La prueba no mostró ninguna evidencia de isomerización en ausencia de la antena polimetínica como se infiere de la Figura 5.25. Este experimento confirmó que la respuesta

detectada anteriormente para el sistema bicromofórico **CySAP** se debió exclusivamente a una transferencia energética hacia el efector desde los estados excitados superiores de la antena polimetínica alcanzados por un fenómeno óptico no lineal.

La dependencia de la respuesta del sistema **CySAP** con la potencia de irradiación mostrada en la Figura 5.26 se utilizó para caracterizar el fenómeno óptico no lineal observado. En el experimento se utilizaron potencias de irradiación entre 2—6 mW las cuales se encuentran muy por debajo del umbral de descomposición de 20 mW por lo que las variaciones provienen únicamente de la isomerización del efector. Las variaciones detectadas en el espectro de absorción de **CySAP** fueron pequeñas por lo que errores aleatorios de la medición afectarían significativamente el resultado de utilizarse una sola longitud de onda como es evidente en la Figura 5.26. Por ello, el cambio en la integral de regiones del espectro fue analizado para suavizar estas diferencias causadas por el error aleatorio. Se escribió un programa que realiza la integración numérica por regla del trapecio en dos regiones del espectro: La primera entre 300—350 nm y la segunda entre 400—450 nm. La primera región presenta integrales positivas que corresponden a la aparición del isómero *Z* y el segundo intervalo posee valores negativos de integral que representan la desaparición del isómero *E*. La Figura 5.23 muestra una cantidad reducida de experimentos por cuestiones de visualización, sin embargo, la determinación de la dependencia tomó los datos de las 7 mediciones realizadas.

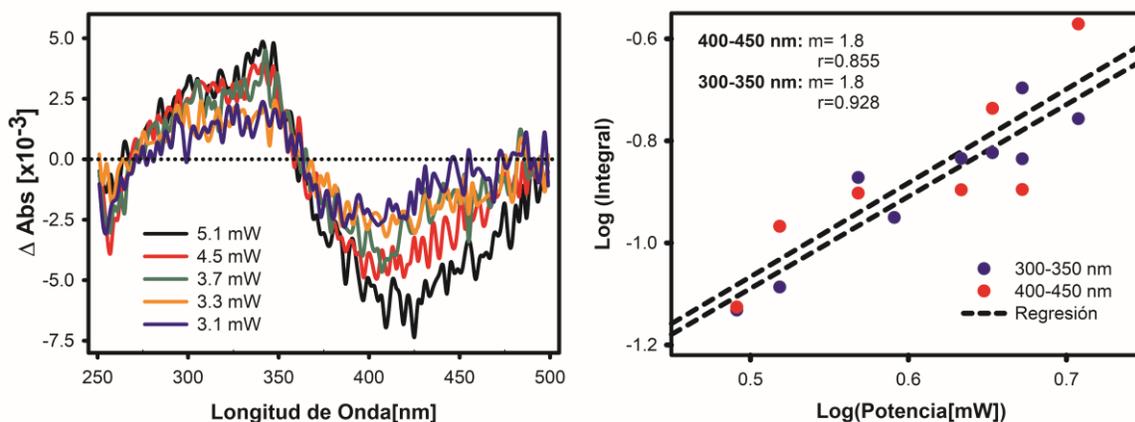


Figura 5.26. Izquierda: Cambio transitorio en el espectro de absorción de **CySAP** tras excitación a 860 nm a diferentes potencias. Derecha: Dependencia bifotónica del proceso fotoinducido. En esta figura se presenta el logaritmo del valor absoluto de la integral como función del logaritmo de la potencia.

El análisis por regresión lineal de los datos manifestó una dependencia cuadrática del proceso con la potencia de irradiación con $m=1.8$. Este resultado prueba que la isomerización observada es debida a un proceso de absorción bifotónica. El valor ligeramente menor a 2 puede ser resultado de procesos como absorción de estado excitado,⁸ por la presencia de otros fenómenos ultrarrápidos de relajación o a errores aleatorios del método.

En conjunto, la información presentada en esta sección constituye evidencia sólida de la isomerización del efector **SAP** mediada por los estados excitados superiores del fragmento polimetínico en **CySAP** accedidos por excitación bifotónica. La respuesta observada por lo tanto debió ser resultado de un proceso de transferencia energética ultrarrápida que involucra estados superiores de la sección antena (S_n), que se forman por excitación bifotónica y que resultan en una excitación indirecta del efector.

5.6. Métodos computacionales y modelado teórico de la transferencia de energía

El modelado computacional de las transiciones electrónicas involucradas en el diseño fotoquímico se utilizó para confirmar los planteamientos de este sistema modular y luego, conceptualizar los resultados experimentales mostrados; así como para estimar la eficiencia de la interacción de los cromóforos por transferencia de energía.

La optimización de la geometría de los cromóforos individuales, **SAP** y **IR780**, dio como resultado estructuras planas a lo largo de sus respectivos sistemas π tal cual se observa en la Figura 5.27. El anillo de ciclohexeno y la naturaleza de las cadenas alquílicas laterales de la estructura de la cianina **IR780** reducen la libertad conformacional en el fragmento polimetínico y asegura la planaridad de la cadena.³⁶ La rigidez conformacional asegura la conjugación del sistema π y contribuye a las excelentes propiedades de óptica no lineal. Por contrario, la estructura de **SAP** cuenta varios enlaces sencillos con libertad conformacional que pueden cambiar ligeramente el grado de conjugación en el sistema π . La estructura optimizada de **CySAP** muestra que el efector azoico adopta una posición prácticamente perpendicular al plano formado por la cadena polimetínica de la antena bifotónica. Esta configuración dificultaría el traslape de los orbitales moleculares de los cromóforos individuales que se encuentran perpendiculares, lo cual explica la independencia electrónica observada experimentalmente. La conformación probablemente está anclada por impedimento estérico con

las cadenas alquílicas laterales de la cianina por lo que no debería haber variaciones importantes del arreglo perpendicular.

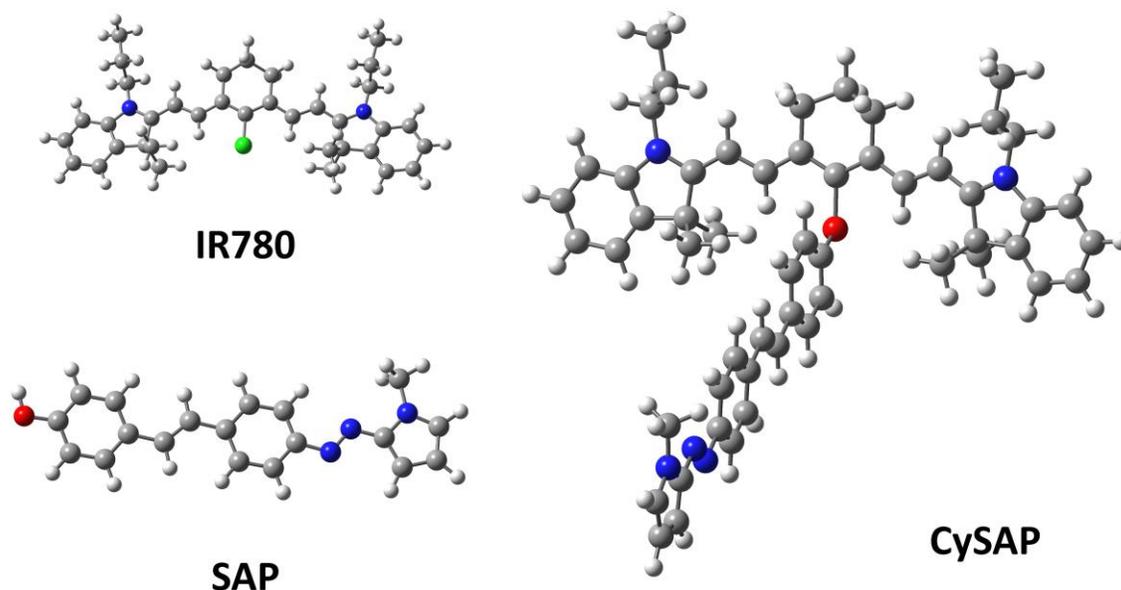


Figura 5.27. Estructuras optimizadas (DFT, PBE0, 6-31+G(d), PCM=MeCN) de los cromóforos individuales y el sistema bicromofórico **CySAP**. El contraíón de la cianina se omite ya que tiene poca influencia sobre las propiedades ópticas de la cianina en las condiciones experimentales.^{169–171} El análisis vibracional no revela frecuencias imaginarias para ninguna de las estructuras.

Los cálculos de optimización de la geometría señalan que el isómero *E* es 12.4 kJ/mol más estable que el isómero *Z*. De acuerdo con la distribución de Boltzman, el 99.96% de todas las moléculas de **SAP** se encontrarían en el isómero *E* a temperatura ambiente. La minúscula cantidad de *Z-SAP* fue virtualmente indetectable con las técnicas analíticas utilizadas. La optimización de la estructura de **Z-SAP** presentada en la Figura 5.28 confirmó que este isómero adopta una conformación de T al igual que otros azocompuestos que incorporan anillos heteroaromáticos de 5 miembros en su estructura.^{42,91} Esta conformación presenta una interacción fuerte por puente de hidrógeno entre el hidrógeno en la posición 3 del pirrol con la nube π del anillo de benceno, congruente con un desplazamiento de 2 ppm hacia campo bajo en RMN-¹H de la señal correspondiente (ver arriba). Esta estructura es 0.3 eV más estable que una conformación torcida donde el grupo metilo adopta la posición sobre el anillo.

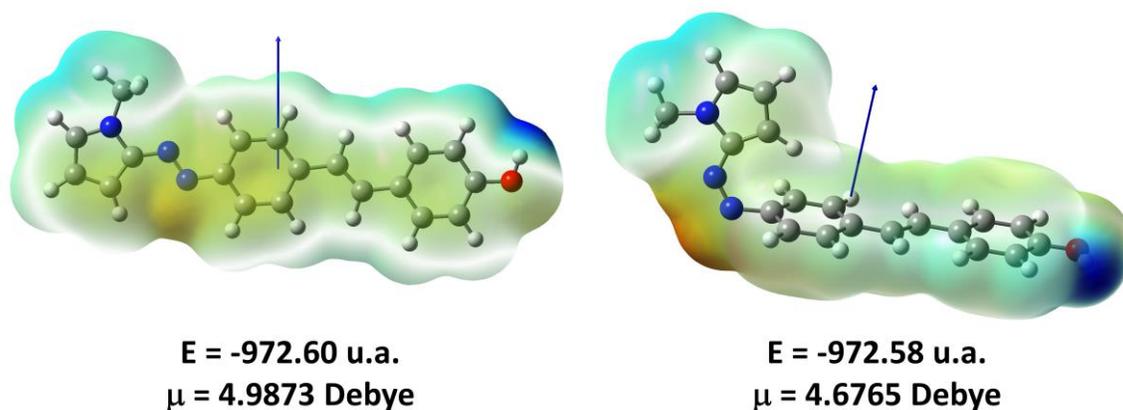


Figura 5.28. Mapa de potencial electrostático del efector **SAP** en sus isómeros *E* (Izquierda) y *Z* (Derecha).

El perfil de la distribución de cargas mostrado en la Figura 5.28 muestra acumulación importante de la densidad de carga sobre el grupo azo y que existe un sitio fuertemente ácido en el protón fenólico. Estas regiones en la estructura son capaces de interactuar por puente de hidrógeno con su entorno lo que ocasiona que la transición hacia el estado S_1 se manifieste como una banda de absorción sumamente ancha entre 350—500 nm en el espectro de absorción (ver arriba). Además, el anillo fenólico se encuentra con una densidad de carga disminuida lo que soporta el comportamiento *push-pull* sugerido en secciones anteriores en el que el fenol actúa como grupo donador y el pirrol como aceptor de densidad electrónica. Los azocompuestos han sido estudiados como interruptores moleculares, ya que la isomerización viene acompañada de un cambio importante en el momento dipolar del compuesto.^{24,66,172} Sin embargo, aunque **SAP** no cambia de manera pronunciada la magnitud del momento dipolar al isomerizarse, se observó un cambio importante en la dirección del vector. Por lo tanto, la isomerización de **SAP** podría cambiar de forma importante la forma que interacciona con arreglos supramoleculares e inducir una respuesta reactiva a la luz.

El cálculo de las transiciones verticales de cromóforos individuales, **SAP e IR780**, se realizó bajo el formalismo de la teoría del funcional de la densidad dependiente del tiempo (**TD-DFT**). Las energías calculadas corresponden a transiciones verticales en las que se compara la energía del estado excitado y el estado basal ambos en la geometría del estado basal sin considerar el carácter vibrónico de las transiciones electrónicas. En ambos casos es posible comparar los datos experimentales para valorar la precisión de los cálculos como se muestra en las figuras 5.29 y 5.30 para **SAP e IR780** respectivamente. La comparación de los resultados experimentales con los

calculados aporta información conceptual acerca de las observaciones experimentales descritas anteriormente.

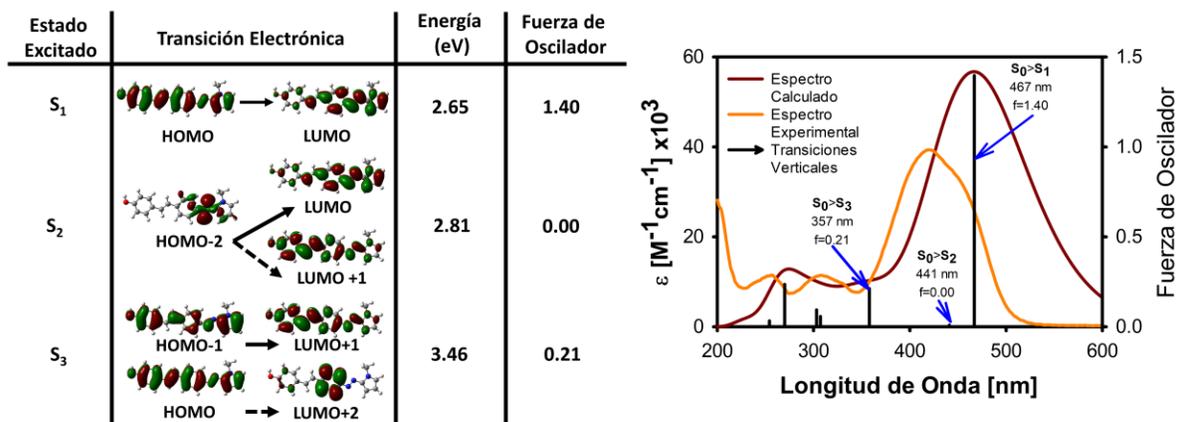


Figura 5.29. Izquierda: Transiciones electrónicas calculadas para **SAP**. Derecha: Comparación espectro de absorción calculado y espectro experimental de **SAP** en MeCN. Los cálculos se realizaron al nivel TD-DFT de teoría con un funcional PBE0 (6-31+G(d), PCM=MeCN) y corrección de estado específico.

La banda de absorción principal de **SAP** origina de una transición HOMO—LUMO de carácter $\pi-\pi^*$ como se muestra en la Figura 5.26. La transición es altamente permitida con fuerza de oscilador $f=1.40$ lo cual es congruente con el coeficiente de extinción molar de $40 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los resultados sugieren que la transición $S_0 \rightarrow S_1$ involucra un gran desplazamiento de densidad de carga hacia el anillo de pirrol confirmando la naturaleza *push-pull* de la transición (ver arriba). Este fuerte carácter *push-pull* da como resultado absorción de luz significativamente más intensa que el encontrado para otros colorantes orgánicos como el azobenceno ($20 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). De acuerdo con la información presentada en la Figura 5.29, la transición $S_0 \rightarrow S_2$ tiene un claro carácter $n-\pi^*$ por lo que está formalmente prohibida por simetría, lo cual respalda el no poder distinguirla en el espectro de absorción experimental. La banda de absorción en el espectro experimental centrada en 300 nm probablemente surge de la transición $S_0 \rightarrow S_3$ permitida por simetría. La diferencia de energía de las transiciones respecto al valor experimental, de tan solo 0.3 eV para la transición $S_0 \rightarrow S_1$, se encontró dentro del margen esperado para el protocolo utilizado.¹⁷³

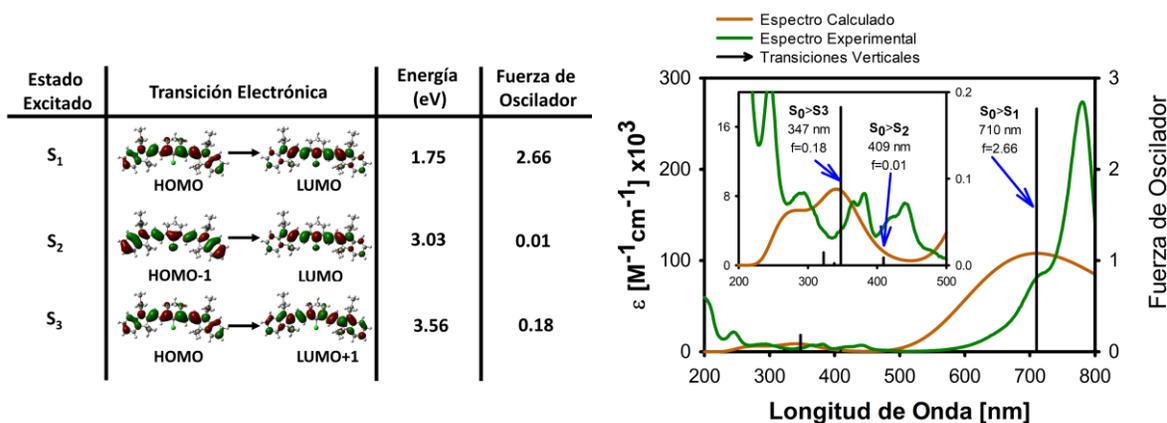


Figura 5.30. Izquierda: Transiciones electrónicas calculadas para la cianina **IR780**. Derecha: Comparación espectro de absorción calculado y espectro experimental de **IR780** en MeCN. Los cálculos se realizaron al nivel TD-DFT de teoría con un funcional PBE0 (6-31+G(d), PCM=MeCN) y corrección de estado específico.

La transición electrónica $S_0 \rightarrow S_1$ de la cianina **IR780** calculada mostró un fuerte carácter $\pi-\pi^*$, la cual es altamente permitida con fuerza de oscilador estimada $f=2.66$. Esta transición da origen a la banda de absorción intensa característica de las cianina en 780 nm con un coeficiente de extinción molar de $260 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, la cual es un orden de magnitud mayor que la mayoría de los cromóforos orgánicos tradicionales. La cianina presenta otra serie de bandas de mayor energía en su espectro de absorción entre 300–500 nm, las cuales corresponden a las transiciones $S_0 \rightarrow S_2$ (430 nm) y $S_0 \rightarrow S_3$ (390 nm) de acuerdo con los cálculos presentados. La simetría del esqueleto polimetínico da origen a simetrías alternantes de sus estados electrónicos, evidenciado por el patrón de intensidad de las transiciones electrónicas. De esta manera, las transiciones electrónicas $S_0 \rightarrow S_1$ y $S_0 \rightarrow S_3$ se determinaron como permitidas, mientras que la transición $S_0 \rightarrow S_2$ está formalmente prohibida por simetría. La transición electrónica $S_0 \rightarrow S_2$ ocasiona un desplazamiento centrosimétrico de carga de los extremos hacia el centro de la molécula como se observa en la Figura 5.30. Este motivo estructural cuadrupolar se ha asociado con elevados valores de sección transversal bifotónico y contribuye a la gran sección transversal de la cianina **IR780** ($\sigma_2 = 420 \text{ GM}$).^{8,38,39,174} Los cálculos TD-DFT para cianinas suelen ser problemáticos debido al carácter multireferenciado de la transición y se tiende a sobreestimar la energía de las transiciones correspondientes.¹⁷⁵ El uso de funcionales híbrido con importantes contribuciones de intercambio de Hartree-Fock eliminan una porción significativa del error por auto interacción electrónica que da origen al error del cálculo. El funcional

PBE0 utilizado se encuentra entre los mejores para el cálculo de transiciones de cianinas con una desviación insignificante de la energía de la transición principal de solo 0.15 eV.

En los métodos TD-DFT se introducen varias aproximaciones en el funcional de correlación de intercambio, por lo que la exactitud del método dependerá en gran medida de esta elección. En general, entre mayor sea la proporción de intercambio de Hartree-Fock se incrementa la energía calculada para las transiciones, ya que conducen a una descripción más localizada de los orbitales.¹⁷⁶

En un extenso artículo de revisión elaborado por Jacquemin en el que se comparan diversas alternativas para cálculos TD-DFT, se concluye que funcionales híbridos (con 15-28% de intercambio de Hartree-Fock) como PBE0 son los más precisos para el cálculo de transiciones verticales de colorantes orgánicos justificando su uso en el presente trabajo.¹⁷³ La elección de este funcional no sacrifica la precisión de la geometría del estado basal siendo este altamente competente para el cálculo correspondiente.¹⁷⁷ Además, ya que se consideran estudios en fase condensada es crucial considerar el rol del disolvente al menos de manera implícita por el modelo del continuo polarizable (PCM) y su respuesta al cambio de polaridad en el estado excitado con la corrección de estado específico.¹⁷⁸

Con los datos experimentales y calculados de las transiciones electrónicas para los cromóforos individuales, **SAP** y **IR780**, se realizó la estimación de la velocidad de la transferencia de energía de acuerdo con la ecuación de Förster (Sección 3.4):

$$k_{FRET} = 8.8 \times 10^{23} \frac{\kappa^2 \phi_f(D)}{n^4 \tau_D r^6} J(\lambda) \quad (5.5)$$

El rendimiento cuántico de fluorescencia del donador $\phi_f(D)$, el estado S_2 de la **IR780**, se determinó experimentalmente como $\phi_f(S_2IR)=8.1 \times 10^{-5}$; la integral de traslape $J(\lambda)$ se calculó partiendo de los espectros de fluorescencia y de absorción de la **IR780** y **SAP** respectivamente; el tiempo de vida del estado donador fue determinado experimentalmente por espectroscopía ultrarrápida como $\tau_D=1.4$ ps;³⁷ finalmente, los cálculos computacionales estimaron la distancia entre los cromóforos de centro a centro como $r=9.2$ Å. El factor de orientación de los momentos dipolares de transición no pudo ser calculado de manera directa ni obtenido experimentalmente por lo que se recurrió a estimaciones de este parámetro. En la mayoría de los casos cuando se considera la transferencia de energía por un mecanismo tipo Förster se usa un valor de $\kappa^2 = 2/3$, apropiado para un arreglo aleatorio dinámico entre los cromóforos.¹¹³ Sin embargo, el compuesto bicromofórico **CySAP** ancla

los cromóforos en una conformación por lo que lo más adecuado sería considerar el arreglo geométrico que existe entre los momentos dipolares en la estructura del estado basal de la molécula.

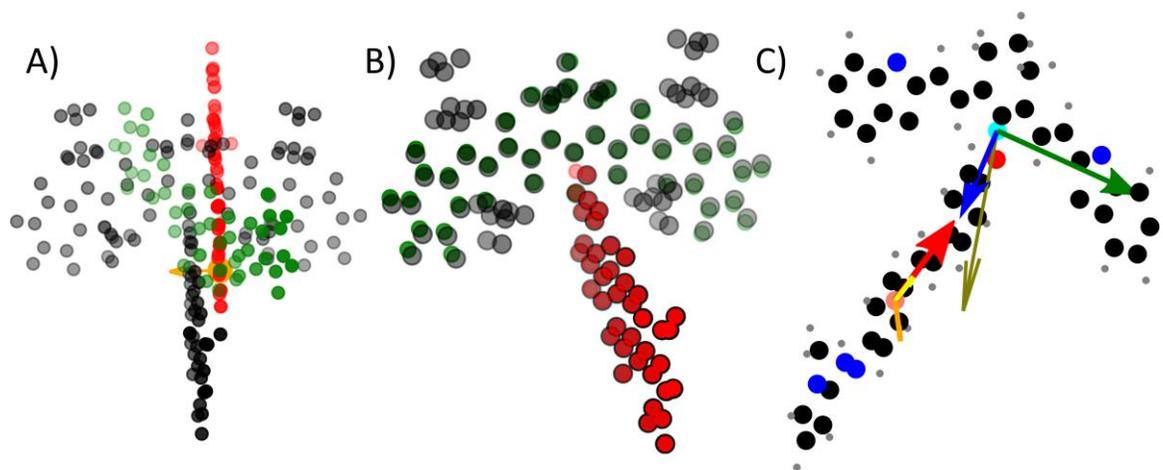


Figura 5.31. Alineación de los cromóforos **SAP** (rojo), **IR780**(verde) a la estructura del compuesto **CySAP** (Negro). A) Distribución espacial original de los cromóforos B) Estructuras de los cromóforos alineados sobrepuestos a **CySAP**. C) Vectores de momento dipolar de transición de los cromóforos alineados. Las flechas color verde, azul y dorado representan los vectores correspondientes a las transiciones desde el estado basal al estado S_1 , S_2 y S_3 de la cianina **IR780** respectivamente. Las flechas color rojo, naranja y amarillo representan los vectores correspondientes a las transiciones desde el estado basal al estado S_1 , S_2 y S_3 respectivamente del efector **SAP**. Los puntos rosa y cian representan los centros de masa de **SAP** y **IR780** respectivamente.

Un problema para la interpretación de los datos fue evidente al intentar integrar los resultados para los componentes individuales en la estructura de la molécula completa: Las estructuras se crearon con diferentes marcos de referencia por lo que se encuentran desplazadas y rotadas entre sí como se muestra en el primer panel de la Figura 5.31. El proceso de alineación y estimación del factor de orientación se realizó con un programa escrito en Python especialmente para estos fines y se describe brevemente a continuación y se incluye completo en los anexos:

1. Preparación de datos de estructuras optimizadas de **CySAP**, **IR780** y **SAP**: Dos documentos xyz donde se aíslan las coordenadas de los fragmentos dentro de **CySAP** se prepararon manualmente utilizando como guía visual el programa Avogadro con el fin de guiar la alineación. Los

documentos con las coordenadas de los momentos dipolar de transición se prepararon de manera paralela.

2. Importación de datos: Los datos estructurales se importan y se organizan como *array* en Python. Estos arreglos de datos pueden ser tratados como un conjunto de vectores tridimensionales.
3. Centrado de las estructuras: Los cálculos de centro de masa de las estructuras se utilizaron para desplazar las estructuras a alinear al origen del sistema de referencia.
4. Alineado de **SAP** y su fragmento correspondiente dentro de **CySAP**: Se utilizó la función *scipy.spatial.transform.Rotation.align_vectors* incluida en la librería *Scipy* para determinar la rotación entre **SAP** y su fragmento en **CySAP**. La función encuentra la rotación que optimiza la alineación de dos conjuntos de vectores utilizando el algoritmo de Kabsch y devuelve al usuario la matriz rotacional optimizada. Este algoritmo se basa en la minimización de la suma ponderada de las desviaciones entre los conjuntos al aplicar la operación.¹⁷⁹ La rotación encontrada se aplicó entonces al conjunto de vectores de posición de **SAP** y a los vectores de momento dipolar de transición.
5. Alineado de **IR780** y su fragmento correspondiente dentro de **CySAP**: Se repiten el punto anterior para la **IR780** y su porción en la estructura bicromofórica. Las cadenas alquílicas se omitieron para facilitar el proceso de alineación.
6. Cálculo del factor de orientación:

$$\kappa^2 = (\cos\theta_T)^3 - 3\cos\theta_D\cos\theta_A)^2 \quad (5.6)$$

Donde θ_T es el ángulo entre el momento dipolar de transición del donador y el aceptor, y θ_D, θ_A representa al ángulo entre el vector que une a los cromóforos y el momento dipolar de transición del donador y el aceptor respectivamente.

La alineación resultante se presenta en el panel central de la Figura 5.31. En esta figura se observa que la alineación de **SAP** es idónea sin haber desviaciones aparentes en su estructura dentro de **CySAP** mientras que la alineación de la cianina **IR780** es ligeramente menos precisa. Es posible que el uso de matrices rotacionales haya limitado el grado de precisión si se llegase a caer en un bloqueo de cardan, lo cual resulta en la pérdida de un grado de libertad rotacional en el proceso de optimización de la rotación. La pérdida de este grado de libertad podría evitarse utilizando un algoritmo que utilice cuaterniones en vez de matrices para optimizar la rotación. A pesar de estas pequeñas desviaciones, el grado de alineación fue satisfactorio para la estimación del factor de orientación.

A simple vista en la Figura 5.31, es claro que el vector de transición $S_0 \rightarrow S_2$ de la cianina (flecha azul) es prácticamente colinear con el correspondiente a la transición $S_0 \rightarrow S_1$ del azocompuesto (flecha roja) lo cual maximizaría el grado de transferencia de energía entre los estados. En la misma figura se observa que la transición $S_0 \rightarrow S_1$ del azocompuesto y la correspondiente a $S_0 \rightarrow S_1$ de la cianina (flecha verde) son prácticamente perpendiculares lo cual apagaría el fenómeno indeseable de retrotransferencia de energía comentado en la sección 5.2.

El cálculo de la integral de traslape y la velocidad del proceso mostrado se realizó utilizando el programa PhotochemCAD con la información presentada en la Figura 5.32.¹⁵⁹ El grado de transferencia de energía desde los estados excitados superiores del fragmento polimetínico hacia el efector se estimó como:

$$\phi_{TE}[S_2(IR) \rightarrow S_1(SAP)] = 0.75; \quad k_{TE}[S_2(IR) \rightarrow S_1(SAP)] = 2.2 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$$

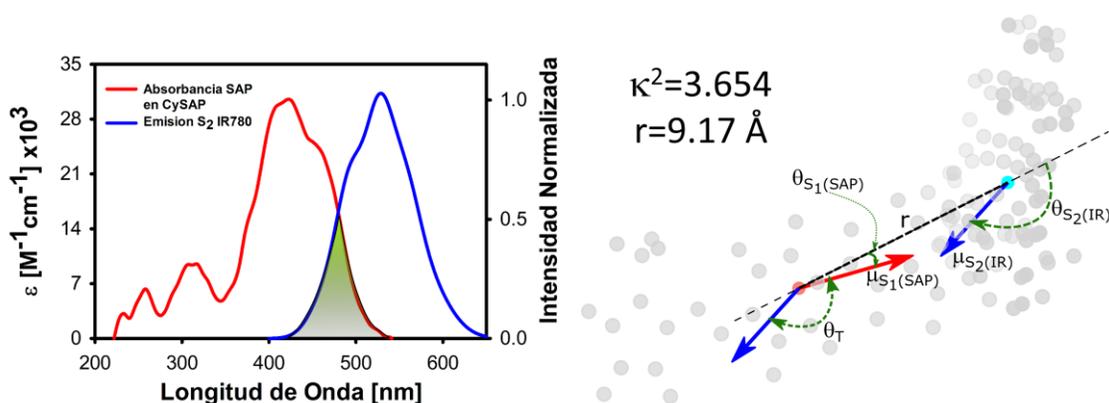


Figura 5.32. Transferencia de energía $S_2(\text{IR780}) \rightarrow S_1(\text{SAP})$. Izquierda: Traslape de espectros de absorción y fluorescencia de **SAP** e **IR780**. El triángulo verde representa el área a integrar. Derecha: Parámetros geométricos involucrados en el mecanismo de Förster de transferencia de energía.

La estimación sugiere que el proceso de transferencia de energía desde el estado S_2 de la **IR780** es altamente eficiente, en contra de lo usualmente esperado por la regla de Kasha por tratarse de un estado electrónico superior. Este resultado altamente favorable se debe principalmente a la gran cercanía de los cromóforos, a la orientación favorable de los vectores de transición y al tiempo de vida anómalamente largo del estado donador S_2 ($\tau = 1.4 \text{ ps}$)³⁹. Para el par de cromóforos en cuestión, se calculó la distancia de Förster $R_0 = 11 \text{ \AA}$ la cual es considerablemente mayor que la distancia existente dentro de **CySAP**. Este resultado también indica que no sería posible utilizar un segmento

enlazador mucho más largo ya que la eficiencia del proceso decae rápidamente como $1/R^6$. El factor de orientación de los vectores involucrados para la transferencia de energía $S_2(\text{IR780}) \rightarrow S_1(\text{SAP})$ se calcula como $\kappa^2=3.65$, muy cerca del valor máximo de $\kappa^2=4$, lo cual optimiza la probabilidad de transferencia de energía. Si se considerase el valor de $\kappa^2=2/3$ para una distribución aleatoria la eficiencia del proceso disminuiría de manera considerable a $\phi_{TE} = 0.44$, lo cual evidencia la importancia de poder anclar los cromóforos en esta configuración favorable. La estimación de la constante de velocidad del proceso indicó que se trataría de un proceso ultrarrápido. La velocidad de la transferencia de energía calculada es aproximadamente tres veces mayor que la del decaimiento no radiativo del estado S_2 de la cianina **IR780** con constantes cinéticas de $22 \times 10^{11} \text{ s}^{-1}$ y $7.1 \times 10^{11} \text{ s}^{-1}$. Esta diferencia indica que la transferencia de energía sería el mecanismo principal de relajación del estado excitado alcanzado por TPA en nuestro esquema fotofísico mostrado en la Figura 5.34.

La eficiencia de la retrotransferencia de energía (indeseable) del estado S_1 de **SAP** hacia el estado S_1 de la **IR780** mostrada en la Figura 5.33 se calculó con el mismo método anteriormente descrito. En nuestro esquema fotofísico, este proceso limitaría la aplicación de nuestro diseño ya que, aunque se logre la sensibilización bifotónica del efector, este le devolvería la energía a la cianina en su estado S_1 sin haberse promovido la fotoconversión. Introduciendo los datos presentados en la Figura 5.34 a la ecuación de Förster utilizando el programa anteriormente mencionado, se encontró que este fenómeno es muy poco probable con:

$$\phi_{TE}[S_1(\text{SAP}) \rightarrow S_1(\text{IR})] = 0.01$$

A diferencia de la transferencia $S_2(\text{IR780}) \rightarrow S_1(\text{SAP})$, la retrotransferencia de energía está fuertemente impedida en el sistema **CySAP**. Esto se debe principalmente al arreglo casi perpendicular de los momentos dipolares de transición involucrados con un valor de $\kappa^2 \approx 0$. Un arreglo completamente aleatorio de los momentos dipolares con $\kappa^2=2/3$ promovería el proceso con un rendimiento calculado $\phi_{TE} = 0.78$ de tal manera que resulta vital el arreglo impuesto para permitir el funcionamiento fotofísico de la dupla **CySAP**. Este resultado indica que no sería viable el unir los fragmentos con secciones flexibles como cadenas alquílicas que otorguen libertad conformacional al sistema y permitan este proceso. El resultado calculado difiere considerablemente del resultado experimentalmente encontrado de $\phi_{TE} = 0.2$, lo cual podría

deberse a variaciones dinámicas de la geometría que permiten un arreglo más favorable de los momentos dipolares de transición.

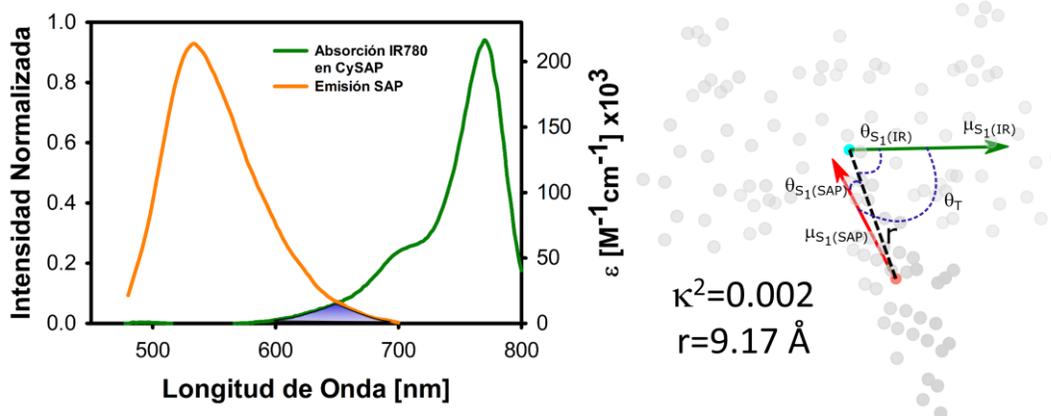


Figura 5.33. Parámetros para estimar la eficiencia de la retrotransferencia de energía $S_1(\text{SAP}) \rightarrow S_1(\text{IR})$. Izquierda: Traslape de espectros de absorción y fluorescencia de **SAP** e **IR780**. El triángulo azul representa el área a integrar. Derecha: Parámetros geométricos involucrados en el mecanismo de Förster de transferencia de energía.

Un último comentario acerca de las aproximaciones utilizadas es relevante. La gran cercanía de los cromóforos puede dar lugar también a un mecanismo de transferencia energética tipo Dexter que considera la interacción directa entre los orbitales moleculares ignorando la orientación de los vectores de momento dipolar de transición. Este mecanismo coexiste con el descrito por Förster y probablemente ambos contribuyen a las observaciones.

Los cálculos computacionales presentados revelaron parámetros importantes para el éxito del diseño bicromofórico presentado como la orientación perpendicular de los cromóforos y la cercanía espacial. Estas condiciones permiten que la transferencia de energía desde los estados superiores de la cianina sea favorable a pesar de ir en contra de la regla de Kasha-Vavilov y restringen el mecanismo de retrotransferencia indeseable al mínimo.

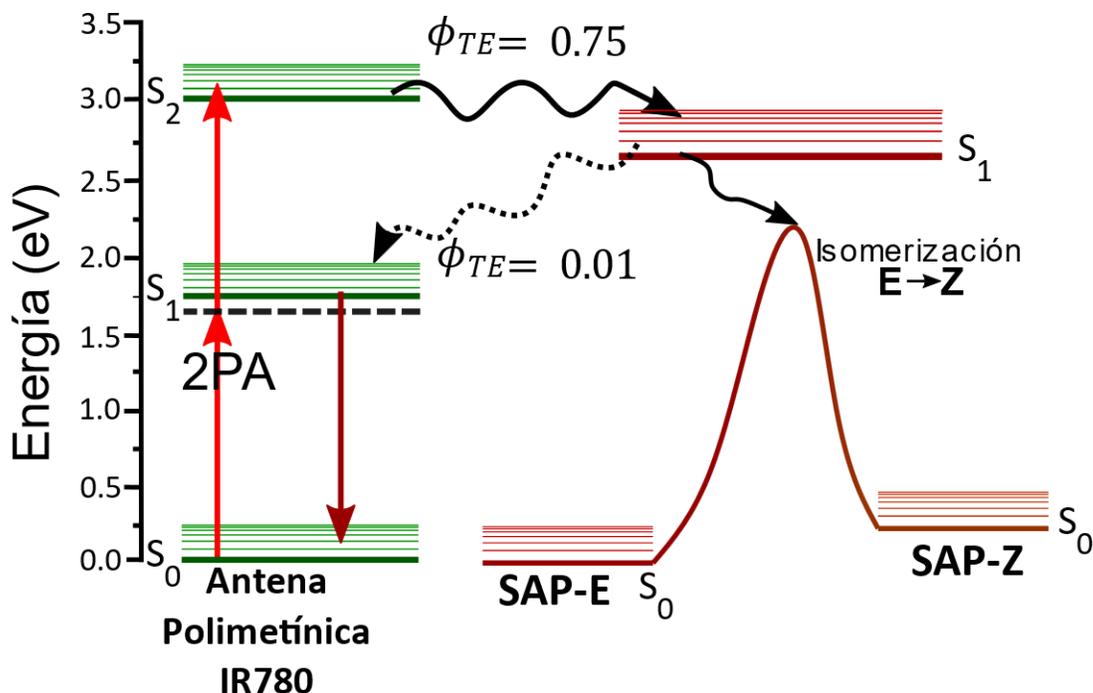


Figura 5.34. Diagrama de Jablonski representando las interacciones por transferencia de energía de los cromóforos independientes dentro de **CySAP**. El eje de energía se construyó respecto a los resultados computacionales.

5.7. Espectroscopía Resuelta en Tiempo

La dinámica de estados excitados se estudió por la técnica de suma de frecuencias. La técnica monitorea la fluorescencia de los estados excitados en disolución por un fenómeno óptico no lineal y reconstruye la evolución de la población de estados emisivos con resolución temporal en la escala de subpicosegundos. Estos experimentos permitieron detectar cambios en la acumulación de estados emisivos que evidencian el proceso ultrarrápido de transferencia de energía desde el estado excitado S_2 del fragmento polimetínico al efector azoico, lo cual sirvió para verificar el mecanismo propuesto.

La intensidad de la señal detectada depende de las propiedades bifotónicas del cromóforo estudiado y del rendimiento cuántico de fluorescencia del estado emisivo estudiado como se muestra en la Figura 5.35. Los estilbenilazopirroles tienen valores de sección transversal bifotónica pequeña del orden de $0.1-10 \text{ GM}$,²⁸ por lo que fue necesario aumentar la concentración del cromóforo y aumentar la potencia de irradiación para poder detectar señales reproducibles. Este

resultado concuerda perfectamente con la nula detección de isomerización al intentar excitar bifotónicamente a **SAP** en ausencia de la cianina (ver arriba). El fragmento polimetínico presente en la cianina **IR780** y la dupla **CySAP** es un excelente cromóforo bifotónico por lo que no hay complicaciones graves para la detección de estados excitados por TPA.

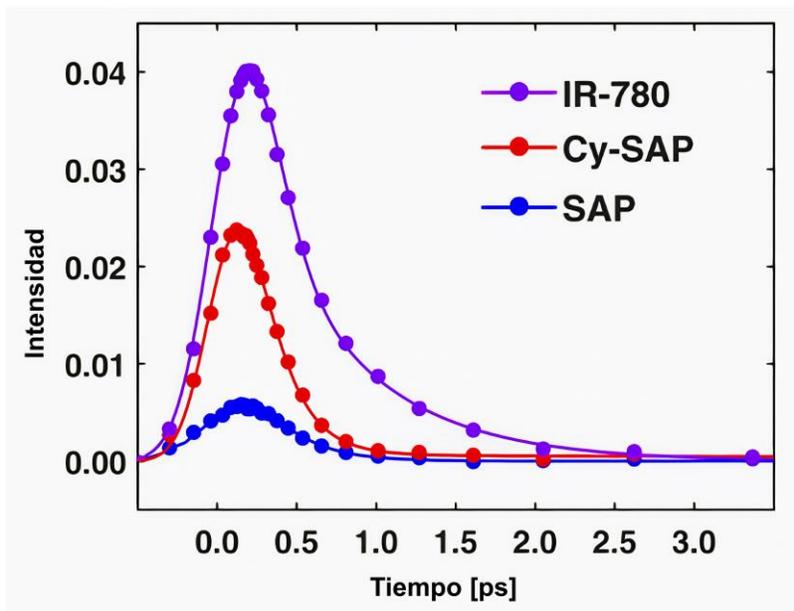


Figura 5.35. Señales de fluorescencia resuelta en tiempo por suma de frecuencias bifotónica. La Figura muestra la detección de la emisión a 500 nm.

La relajación del estado emisor de la cianina **IR780** mostrada en la Figura 5.36 presentó un decaimiento biexponencial de la señal con constantes de tiempo de 220 fs y 1.4 ps. La componente rápida del decaimiento probablemente se debe a procesos de relajación rápidos dentro del estado excitado S_2 inmediatamente después de la excitación bifotónica.³⁶ La componente lenta se asocia con el proceso de conversión interna hacia el estado S_1 del cromóforo.³⁶ El espectro de emisión resuelto en tiempo de este excitado se encontró centrado en 525 nm, congruente con el espectro de fluorescencia estacionario presentado anteriormente (ver arriba). El espectro de fluorescencia resuelto en tiempo correspondiente a **SAP** se observa centrado en 500 nm y es análogo al determinado por espectroscopía óptica estática. La señal de fluorescencia detectada para **SAP** presentó un decaimiento exponencial con constante de tiempo determinado en 240 ± 60 fs, lo cual está en el límite de sensibilidad de la técnica. El decaimiento ultrarrápido de la señal de fluorescencia está asociado a la presencia de intersecciones cónicas con el estado basal las cuales dan origen al proceso de fototransformación hacia el isómero Z.^{28,41,90} Los espectros de emisión de los cromóforos

individuales pueden ser distinguidos por la posición del máximo de fluorescencia de la señal y la forma del espectro.

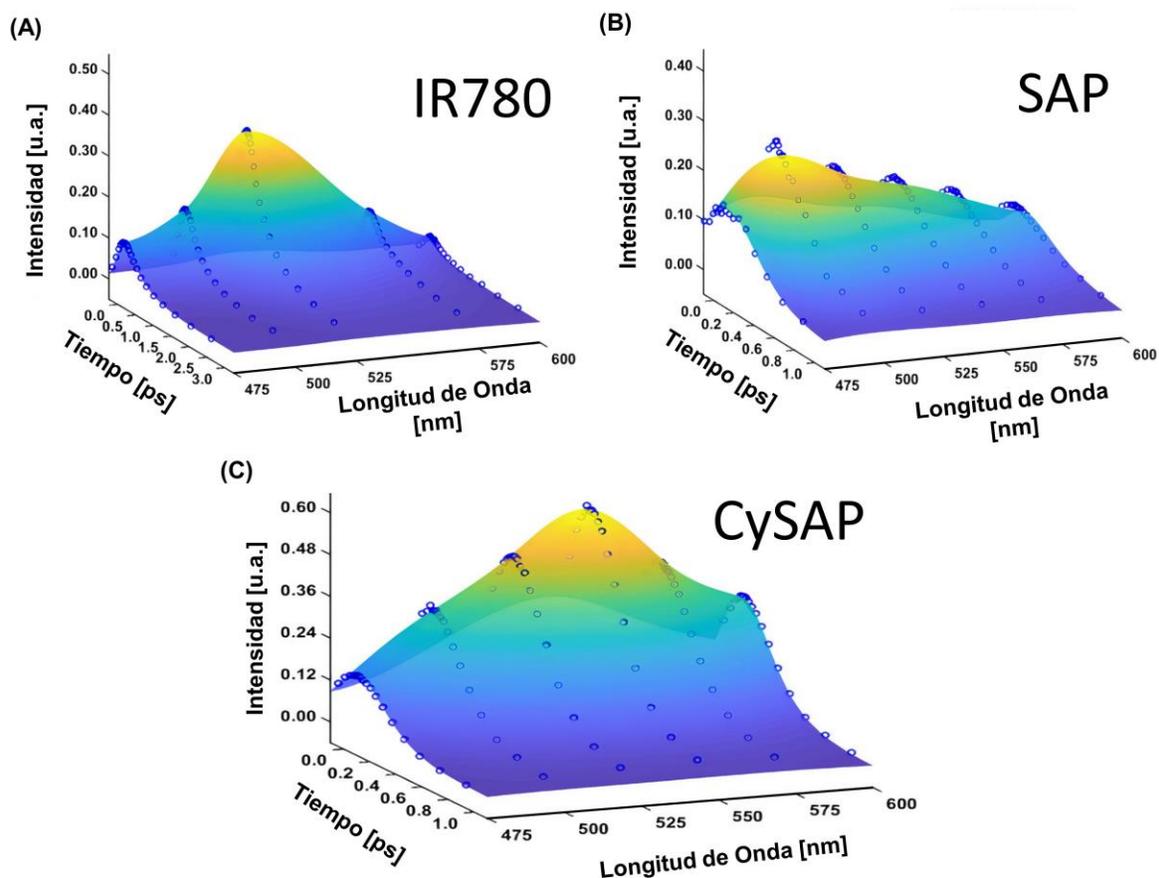


Figura 5.36. Espectro de emisión resuelto en tiempo de A) **IR780**, B) **SAP** y C) **CySAP** tras excitación bifotónica a 860 nm. La superficie colorida es interpolada de los datos experimentales.

La aparición de un camino de desactivación adicional del estado S_2 del fragmento polimetínico (de transferencia de energía) fue evidente al comparar el espectro de fluorescencia resuelto en tiempo de **CySAP** con los espectros respectivos para **SAP** y la **IR780** como se presenta en la Figura 5.36. La emisión resuelta en tiempo de **CySAP** incluida en el panel inferior de la Figura 5.36 presentó un decaimiento monoexponencial ultrarrápido con una constante de tiempo de 200 ± 60 fs. El espectro de emisión inicial reproduce con bastante fidelidad al mostrado para **IR780**, indicando que el estado S_2 polimetínico es el estado inicialmente excitado por TPA. El decaimiento de la señal mostró la aparición de un hombro en 500 nm asociado a la población de estados excitados localizados en el efector **SAP**. La ausencia del componente lento de 1.45 ps de la **IR780** y el hombro en 500 nm en el

espectro de **CySAP** indicó que el sistema evoluciona rápidamente por un mecanismo ausente en la **IR780**. Las observaciones presentadas fueron congruentes con el mecanismo propuesto para la desactivación de los estados excitados superiores de la fracción polimetínica en **CySAP** vía la transferencia de energía ultrarrápida antena->efector.

Esta evidencia experimental otorgó el último pilar para la demostración satisfactoria de la sensibilización de isomerización bifotónica de azocompuestos por transferencia de energía ultrarrápida desde singuletes excitados superiores de la cianina.

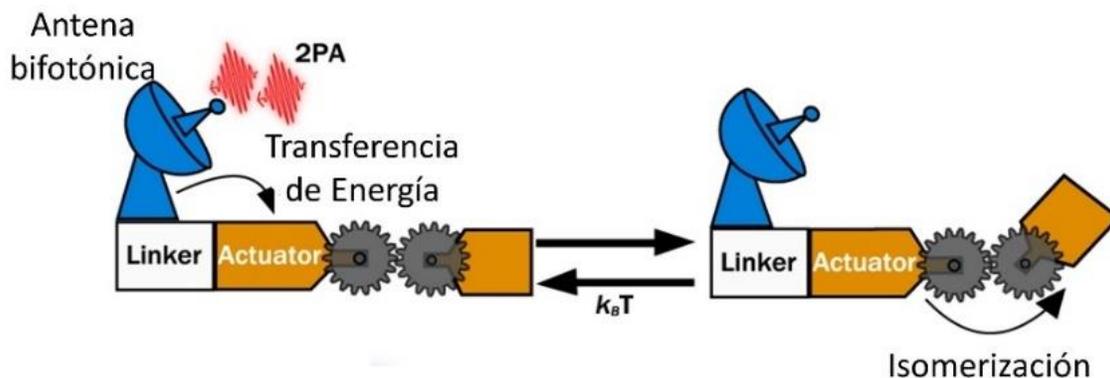
6. Conclusiones

En esta última sección se presentan las conclusiones de la presente tesis derivadas del diseño, síntesis y estudio fotoquímico del sistema bicromofórico **CySAP**.

- La investigación aportó un método eficiente para la síntesis del compuesto bicromofórico **CySAP** con rendimientos para los pasos sintéticos individuales superiores al 70% y un rendimiento global del 50%. La caracterización de este compuesto confirmó que el efector **SAP** se une a la antena polimetínica por sustitución nucleofílica del átomo de cloro en la posición meso de la cadena. El diseño modular presentado conservó la independencia electrónica de los cromóforos individuales de acuerdo con la información provista por la espectroscopía óptica estática. El acoplamiento por la ligadura tipo éter no mostró evidencias de permitir el traslape orbital de los sistemas π de los cromóforos.
- La evaluación del desempeño del efector como interruptor molecular fotoactivable en **CySAP** mostró isomerización a un estado fotoestacionario considerablemente enriquecido del isómero **Z-CySAP** (50% de **Z-CySAP** en el EFE) con altos rendimientos cuánticos de fotoisomerización ($\phi_{\text{Fluo}} > 0.2$). No se observaron diferencias considerables de estos parámetros con respecto al efector aislado por lo que se concluyó que la conjugación con la antena polimetínica no entorpece su funcionamiento como interruptor molecular. El estudio de la cinética de isomerización térmica espontánea **Z**->**E** (de “regreso” al isómero **E**) determinó el tiempo de vida media del isómero **Z-CySAP** de 16 minutos. Estos parámetros de desempeño sugieren que el compuesto **CySAP** podría implementarse en sistemas que requieran interruptores fotocromicos con tiempos de vida medio como sistemas de liberación de fármacos o para el diseño de polímeros responsivos.
- El sistema bicromofórico **CySAP** demostró ser resistente a la fatiga después de varios ciclos de irradiación. Los estudios de RMN de la fotoisomerización confirmaron que se trata de un proceso limpio sin evidencias de fotodescomposición. El isómero **Z-CySAP** fue caracterizado por RMN bidimensional del EFE y se confirmó que adopta una geometría “tipo T” estabilizada por interacciones intermoleculares no covalentes entre el anillo aromático de benceno y los protones del anillo pirrol.
- El control bifotónico de la isomerización del efector mediado por la transferencia energética desde los estados superiores del fragmento polimetínico en **CySAP** se confirmó por excitación

bifotónica con luz en el infrarrojo cercano. No se observó isomerización alguna al someter al efector aislado a las mismas condiciones de excitación, lo cual confirmó que el proceso requiere de la antena bifotónica y descartó la posibilidad de TPA directa del fragmento azoico. El proceso óptico no lineal observado se identificó como absorción bifotónica al observar una dependencia cuadrática del proceso con la intensidad de la irradiación. Este resultado fue crucial para el desarrollo de la presente tesis, ya que fue la confirmación experimental definitiva de la hipótesis inicial.

- La respuesta fotoquímica observada se complementó con el resultado de cálculos computacionales. Estos resultados revelaron que los momentos dipolares de transición involucrados en la sensibilización bifotónica de la isomerización del efector se encuentran en un arreglo casi colineal el cual maximiza la posibilidad de transferencia energética entre el estado S_2 (**IR780**) y el estado S_1 (**SAP**). La transferencia energética se modeló de acuerdo con la teoría de Förster y se determinó que fueron cruciales la proximidad del par donador aceptor en **CySAP** y el tiempo de vida anómalamente largo del estado singulete excitado superior donador S_2 (**IR780**). Además, la fotoisomerización del azocompuesto en **CySAP** dependía de que la transferencia de energía del efector hacia el estado S_1 de la cianina fuera despreciable. Esto se logró ya que los momentos de transición involucrados en esta transferencia energética indeseable se encuentran perpendiculares entre si, por lo que se apaga casi por completo esta vía de relajación. Esta condición indica que no sería posible el uso de secciones ligantes flexibles que permitan la libre orientación de los momentos dipolares de transición y propicien este fenómeno indeseable.
- Por último, el estudio de la dinámica de relajación de estados excitados confirmó la aparición de un mecanismo ultrarrápido de relajación de los estados excitados superiores del fragmento polimetínico anteriormente ausente en la cianina **IR780**. La aparición de un hombro característico de la población de estados excitados del efector en el espectro de fluorescencia resuelto en tiempo permitió identificar esta nueva vía de relajación como la transferencia de energía ultrarrápida antena-efector. El fenómeno observado mostró un tiempo característico cercano al límite de resolución de la técnica de 240 fs, mucho menor que el componente largo del decaimiento observado para el estado excitado de la cianina **IR780**, por lo que es natural que la transferencia de energía pueda sobreponerse a la conversión interna como la vía principal de relajación de los estados electrónicos superiores de la cianina accedidos por TPA.



Representación esquemática del sistema bicromofórico antena bifotónica -efector desarrollado en la presente tesis.

La prueba de concepto aquí presentada abre la posibilidad de diseñar sistemas antena bifotónica—efector altamente eficiente con miras de utilizar estas construcciones moleculares en sistemas de liberación de fármacos, fotofarmacología, microscopia de superresolución con extraordinaria precisión espaciotemporal. los cuales se beneficiarían de la restricción de los eventos de excitación por TPA al punto focal de la irradiación. En particular, las interesantes propiedades teranósticas de compuestos polimetínicos los convierten en las antenas ideales para sinergizar con la respuesta farmacológica de azocompuestos especializados. La optimización de la fotoquímica de los cromóforos individuales y la inclusión de estos sistemas modulares en esquemas responsivos representan por lo tanto líneas de investigación de gran interés para el futuro.

7. Referencias

- (1) Michelin, C.; Hoffmann, N. Photosensitization and Photocatalysis - Perspectives in Organic Synthesis. *ACS Catal.* **2018**, *8* (12), 12046–12055.
- (2) del Barrio, J.; Sánchez-Somolinos, C. Light to Shape the Future: From Photolithography to 4D Printing. *Advanced Optical Materials*. 2019.
- (3) Zhang, J.; Zou, Q.; Tian, H. Photochromic Materials: More than Meets the Eye. *Adv. Mater.* **2013**, *25* (3), 378–399.
- (4) Yavlovich, A.; Smith, B.; Gupta, K.; Blumenthal, R.; Puri, A. Light-Sensitive Lipid-Based Nanoparticles for Drug Delivery: Design Principles and Future Considerations for Biological Applications. *Mol. Membr. Biol.* **2010**, *27* (7), 364–381.
- (5) Gelebart, A. H.; Jan Mulder, D.; Varga, M.; Konya, A.; Vantomme, G.; Meijer, E. W.; Selinger, R. L. B.; Broer, D. J. Making Waves in a Photoactive Polymer Film. *Nature* **2017**, *546* (7660), 632–636.
- (6) Leung, S. J.; Romanowski, M. Light-Activated Content Release from Liposomes. *Theranostics* **2012**, *2* (10), 1020–1036.
- (7) Ruzin, S.; Aaron, H. 1P vs 2P fluorescence imaging
<http://microscopy.berkeley.edu/courses/tlm/2P/index.html> (accessed 2020 -10 -25).
- (8) He, G. S.; Tan, L. S.; Zheng, Q.; Prasad, P. N. Multiphoton Absorbing Materials: Molecular Designs, Characterizations, and Applications. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (4), 1245–1330.
- (9) Arya, P.; Jelken, J.; Lomadze, N.; Santer, S.; Bekir, M. Kinetics of Photo-Isomerization of Azobenzene Containing Surfactants. *J. Chem. Phys.* **2020**, *152* (2).
- (10) Kumpulainen, T.; Lang, B.; Rosspeintner, A.; Vauthey, E. Ultrafast Elementary Photochemical Processes of Organic Molecules in Liquid Solution. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (16), 10826–10939.
- (11) Liu, D.; Wang, S.; Xu, S.; Liu, H. Photocontrollable Intermittent Release of Doxorubicin Hydrochloride from Liposomes Embedded by Azobenzene-Contained Glycolipid. *Langmuir* **2017**, *33* (4), 1004–1012.
- (12) Zhang, X.; Lei, B.; Wang, Y.; Xu, S.; Liu, H. Dual-Sensitive On-Off Switch in Liposome Bilayer for Controllable Drug Release. *Langmuir* **2019**, *35* (15), 5213–5220.
- (13) Reise, F.; Warias, J. E.; Chatterjee, K.; Krekieln, N. R.; Magnussen, O.; Murphy, B. M.; Lindhorst, T. K. Photoswitchable Glycolipid Mimetics: Synthesis and Photochromic

- Properties of Glycoazobenzene Amphiphiles. *Chem. - A Eur. J.* **2018**, *24* (66), 17497–17505.
- (14) Cui, Z. K.; Phoeung, T.; Rousseau, P. A.; Rydzek, G.; Zhang, Q.; Geraldine Bazuin, C.; Lafleur, M. Nonphospholipid Fluid Liposomes with Switchable Photocontrolled Release. *Langmuir* **2014**, *30* (36), 10818–10825.
- (15) Ihrig, S. P.; Eisenreich, F.; Hecht, S. Photoswitchable Polymerization Catalysis: State of the Art, Challenges, and Perspectives. *Chem. Commun.* **2019**, *55* (30), 4290–4298.
- (16) Dorel, R.; Feringa, B. L. Photoswitchable Catalysis Based on the Isomerisation of Double Bonds. *Chem. Commun.* **2019**, *55* (46), 6477–6486.
- (17) Oliveira, O. N.; Dos Santos, D. S.; Balogh, D. T.; Zucolotto, V.; Mendonça, C. R. Optical Storage and Surface-Relief Gratings in Azobenzene-Containing Nanostructured Films. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2005**, *116* (1–3), 179–192.
- (18) Li, S.; Wang, H.; Fang, J.; Liu, Q.; Wang, J.; Guo, S. Photo-Isomerization Energy Storage Using Azobenzene and Nanoscale Templates: A Topical Review. *J. Therm. Sci.* **2020**, *29* (2), 280–297.
- (19) Kanj, A. B.; Müller, K.; Heinke, L. Stimuli-Responsive Metal-Organic Frameworks with Photoswitchable Azobenzene Side Groups. *Macromol. Rapid Commun.* **2018**, *39* (1), 1–14.
- (20) Santer, S. Remote Control of Soft Nano-Objects by Light Using Azobenzene Containing Surfactants. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2018**, *51* (1).
- (21) Yu, Y.; Nakano, M.; Ikeda, T. Directed Bending of a Polymer Film by Light. *Nature* **2003**, *425* (6954), 145–145.
- (22) Norikane, Y.; Tamaoki, N. Light-Driven Molecular Hinge: A New Molecular Machine Showing a Light-Intensity-Dependent Photoresponse That Utilizes the *Trans-Cis* Isomerization of Azobenzene. *Org. Lett.* **2004**, *6* (15), 2595–2598.
- (23) Merino, E.; Ribagorda, M. Control over Molecular Motion Using the *Cis-Trans* Photoisomerization of the Azo Group. *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 1071–1090.
- (24) Hüll, K.; Morstein, J.; Trauner, D. In Vivo Photopharmacology. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (21), 10710–10747.
- (25) Velema, W. A.; Szymanski, W.; Feringa, B. L. Photopharmacology: Beyond Proof of Principle. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (6), 2178–2191.
- (26) Beharry, A. A.; Woolley, G. A. Azobenzene Photoswitches for Biomolecules. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (8), 4422–4437.
- (27) Andrade, A. A.; Yamaki, S. B.; Misoguti, L.; Zilio, S. C.; Atvars, T. D. Z.; Oliveira, O. N.;

- Mendonça, C. R. Two-Photon Absorption in Diazobenzene Compounds. *Opt. Mater. (Amst)*. **2004**, *27* (3), 441–444.
- (28) Muñoz-Rugeles, L.; Gallardo-Rosas, D.; Durán-Hernández, J.; López-Arteaga, R.; Toscano, R. A.; Esturau-Escofet, N.; López-Cortés, J. G.; Peón, J.; Ortega-Alfaro, M. C. Synthesis and Photodynamics of Stilbenyl-Azopyrroles: Two-Photon Controllable Photoswitching Systems. *ChemPhotoChem* **2020**, *4* (2), 144–154.
- (29) Breukers, R. D.; Janssens, S.; Raymond, S. G.; Bhuiyan, M. D. H.; Kay, A. J. Synthesis and Characterization of Strongly Two Photon Absorbing and Photoswitchable Azo Molecules. *Dye. Pigment*. **2015**, *112*, 17–23.
- (30) Dudek, M.; Tarnowicz-Staniak, N.; Deiana, M.; Pokładek, Z.; Samoć, M.; Matczyszyn, K. Two-Photon Absorption and Two-Photon-Induced Isomerization of Azobenzene Compounds. *RSC Adv.* **2020**, *10* (66), 40489–40507.
- (31) Grzybowski, A.; Pietrzak, K. Maria Goeppert-Mayer (1906-1972): Two-Photon Effect on Dermatology. *Clin. Dermatol.* **2013**, *31* (2), 221–225.
- (32) Weckler, S. R.; Mikhailovsky, A.; Korystov, D.; Ford, P. C. A Two-Photon Antenna for Photochemical Delivery of Nitric Oxide from a Water-Soluble, Dye-Derivatized Iron Nitrosyl Complex Using NIR Light. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (11), 3831–3837.
- (33) Picot, A.; Malvolti, F.; Le Guennic, B.; Baldeck, P. L.; Williams, J. A. G.; Andraud, C.; Maury, O. Two-Photon Antenna Effect Induced in Octupolar Europium Complexes. *Inorg. Chem.* **2007**, *46* (7), 2659–2665.
- (34) Del Valle, J. C.; Catalán, J. Kasha's Rule: A Reappraisal. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21* (19), 10061–10069.
- (35) Kasha, M. Characterization of Electronic Transitions in Complex Molecules. *Discussions of the Faraday Society*. 1950, pp 14–19.
- (36) Guarín, C. A.; Villabona-Monsalve, J. P.; López-Arteaga, R.; Peon, J. Dynamics of the Higher Lying Excited States of Cyanine Dyes. An Ultrafast Fluorescence Study. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117* (24), 7352–7362.
- (37) Rodríguez-Romero, J.; Guarín, C. A.; Arroyo-Pieck, A.; Gutiérrez-Arzaluz, L.; López-Arteaga, R.; Cortés-Guzmán, F.; Navarro, P.; Peon, J. Fluorophore Release from a Polymethinic Photoremovable Protecting Group Through a Nonlinear Optical Process. *ChemPhotoChem* **2017**, *1* (9), 397–407.
- (38) Pawlicki, M.; Collins, H. A.; Denning, R. G.; Anderson, H. L. Two-Photon Absorption and the

- Design of Two-Photon Dyes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2009**, *48* (18), 3244–3266.
- (39) Guarín Durán, C. A. Estudios Espectroscópicos de La Fotodinámica de Estados Excitados Superiores de Compuestos Polimetínicos, Universidad Nacional Autónoma de México, 2015.
- (40) Strekowski, L.; Lipowska, M.; Patonay, G. Substitution Reactions of a Nucleofugal Group in Heptamething Cyanine Dyes. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4578–4580.
- (41) Crespi, S.; Simeth, N. A.; König, B. Heteroaryl Azo Dyes as Molecular Photoswitches. *Nat. Rev. Chem.* **2019**, *3* (3), 133–146.
- (42) Calbo, J.; Weston, C. E.; White, A. J. P.; Rzepa, H. S.; Contreras-García, J.; Fuchter, M. J. Tuning Azoheteroarene Photoswitch Performance through Heteroaryl Design. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (3), 1261–1274.
- (43) Levine, I. *Quantum Chemistry*, 7th Editio.; Pearson, 2013.
- (44) Klessinger, M.; Michl, J. *Excited States and Photo-Chemistry of Organic Molecules*; Wiley-VCH, 1995.
- (45) Anslyn, E. V.; Dougherty, D. A. *Modern Physical Organic Chemistry*; University Science Books, 2006.
- (46) Rumi, M.; Perry, J. W. Two-Photon Absorption: An Overview of Measurements and Principles. *Adv. Opt. Photonics* **2010**, *2* (4), 451.
- (47) Friedrich, D. M. Two-Photon Molecular Spectroscopy. *J. Chem. Educ.* **1982**, *59* (6), 472–481.
- (48) Albota, M.; Beljonne, D.; Brédas, J. L.; Ehrlich, J. E.; Fu, J. Y.; Heikal, A. A.; Hess, S. E.; Kogej, T.; Levin, M. D.; Marder, S. R.; McCord-Maughon, D.; Perry, J. W.; Röckel, H.; Rumi, M.; Subramaniam, G.; Webb, W. W.; Wu, X. L.; Xu, C. Design of Organic Molecules with Large Two-Photon Absorption Cross Sections. *Science (80-.)*. **1998**, *281* (5383), 1653–1656.
- (49) Kim, H. M.; Cho, B. R. Small-Molecule Two-Photon Probes for Bioimaging Applications. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (11), 5014–5055.
- (50) Galas, L.; Gallavardin, T.; Bénard, M.; Lehner, A.; Schapman, D.; Lebon, A.; Komuro, H.; Lerouge, P.; Leleu, S.; Franck, X. “Probe, Sample, and Instrument (PSI)”: The Hat-Trick for Fluorescence Live Cell Imaging. *Chemosensors* **2018**, *6* (3).
- (51) Lee, K. S.; Kim, R. H.; Yang, D. Y.; Park, S. H. Advances in 3D Nano/Microfabrication Using Two-Photon Initiated Polymerization. *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33* (6), 631–681.
- (52) Accardo, A.; Blatché, M.-C.; Courson, R.; Loubinoux, I.; Vieu, C.; Malaquin, L. Two-Photon Lithography and Microscopy of 3D Hydrogel Scaffolds for Neuronal Cell Growth. *Biomed.*

- Phys. Eng. Express* **2018**, 4 (2), 027009.
- (53) Kallepalli, D. L. N.; Alshehri, A. M.; Marquez, D. T.; Andrzejewski, L.; Scaiano, J. C.; Bhardwaj, R. Ultra-High Density Optical Data Storage in Common Transparent Plastics. *Sci. Rep.* **2016**, 6 (1), 1–11.
- (54) Williams, R. M.; Piston, D. W.; Webb, W. W. Two-Photon Molecular Excitation Provides Intrinsic 3-Dimensional Resolution for Laser-Based Microscopy and Microphotochemistry. *FASEB J.* **2018**.
- (55) Benninger, R. K. P.; Piston, D. W. Two-Photon Excitation Microscopy for Unit 4.11 the Study of Living Cells and Tissues. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2013**, No. SUPPL.59, 1–24.
- (56) Wang, B. G.; König, K.; Halbhuber, K. J. Two-Photon Microscopy of Deep Intravital Tissues and Its Merits in Clinical Research. *J. Microsc.* **2010**, 238 (1), 1–20.
- (57) Glaser, F.; Kerzig, C.; Wenger, O. S. Multi-Photon Excitation in Photoredox Catalysis: Concepts, Applications, Methods. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2020**, 10266–10284.
- (58) Shen, Y.; Shuhendler, A. J.; Ye, D.; Xu, J. J.; Chen, H. Y. Two-Photon Excitation Nanoparticles for Photodynamic Therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, 45 (24), 6725–6741.
- (59) Tong, R.; Kohane, D. S. Shedding Light on Nanomedicine. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **2012**, 4 (6), 638–662.
- (60) Nguyen, A. K.; Narayan, R. J. Two-Photon Polymerization for Biological Applications. *Mater. Today* **2017**, 20 (6), 314–322.
- (61) Becker, Y.; Unger, E.; Fichte, M. A. H.; Gacek, D. A.; Dreuw, A.; Wachtveitl, J.; Walla, P. J.; Heckel, A. A Red-Shifted Two-Photon-Only Caging Group for Three-Dimensional Photorelease. *Chem. Sci.* **2018**, 9 (10), 2797–2802.
- (62) Klán, P.; Šolomek, T.; Bochet, C. G.; Blanc, A.; Givens, R.; Rubina, M.; Popik, V.; Kostikov, A.; Wirz, J. Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology: Reaction Mechanisms and Efficacy. *Chem. Rev.* **2013**, 113 (1), 119–191.
- (63) Hammer, C. A.; Falahati, K.; Jakob, A.; Klimek, R.; Burghardt, I.; Heckel, A.; Wachtveitl, J. Sensitized Two-Photon Activation of Coumarin Photocages. *J. Phys. Chem. Lett.* **2018**, 9 (6), 1448–1453.
- (64) Croissant, J.; Maynadier, M.; Gallud, A.; Peindy N'Dongo, H.; Nyalosaso, J. L.; Derrien, G.; Charnay, C.; Durand, J. O.; Raehm, L.; Serein-Spirau, F.; Cheminet, N.; Jarrosson, T.; Mongin, O.; Blanchard-Desce, M.; Gary-Bobo, M.; Garcia, M.; Lu, J.; Tamanoi, F.; Tarn, D.; Guardado-Alvarez, T. M.; Zink, J. I. Two-Photon-Triggered Drug Delivery in Cancer Cells Using

- Nanoimpellers. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, *52* (51), 13813–13817.
- (65) Anselmo, A. C.; Gokarn, Y.; Mitragotri, S. Non-Invasive Delivery Strategies for Biologics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *18* (1), 19–40.
- (66) Lerch, M. M.; Hansen, M. J.; van Dam, G. M.; Szymanski, W.; Feringa, B. L. Emerging Targets in Photopharmacology. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2016**, *55* (37), 10978–10999.
- (67) Demchenko, A. P.; Tomin, V. I.; Chou, P. T. Breaking the Kasha Rule for More Efficient Photochemistry. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (21), 13353–13381.
- (68) Englman, R.; Jortner, J. The Energy Gap Law for Radiationless Transitions in Large Molecules. *Mol. Phys.* **1970**, *18* (2), 285–287.
- (69) Pecourt, J. M. L.; Peon, J.; Kohler, B. DNA Excited-State Dynamics: Ultrafast Internal Conversion and Vibrational Cooling in a Series of Nucleosides. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (42), 10370–10378.
- (70) Baryshnikov, G.; Minaev, B.; Ågren, H. Theory and Calculation of the Phosphorescence Phenomenon. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (9), 6500–6537.
- (71) Zugazagoitia, J. S.; Almora-Díaz, C. X.; Peon, J. Ultrafast Intersystem Crossing in 1-Nitronaphthalene. An Experimental and Computational Study. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112* (3), 358–365.
- (72) Smith, E.; Collins, I. Photoaffinity Labeling in Target-and Binding-Site Identification. *Future Medicinal Chemistry*. Future Science February 1, 2015, pp 159–183.
- (73) Lin, Q.; Yang, L.; Wang, Z.; Hua, Y.; Zhang, D.; Bao, B.; Bao, C.; Gong, X.; Zhu, L. Coumarin Photocaging Groups Modified with an Electron-Rich Styryl Moiety at the 3-Position: Long-Wavelength Excitation, Rapid Photolysis, and Photobleaching. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2018**, *57* (14), 3722–3726.
- (74) Yang, Y.; Mu, J.; Xing, B. Photoactivated Drug Delivery and Bioimaging. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **2017**, *9* (2).
- (75) Bouas-Laurent, H.; Dürr, H. Organic Photochromism (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73* (4).
- (76) Feringa, B.; Browne, W. R. *Molecular Switches*; Feringa, B. L., Browne, W. R., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2011.
- (77) Quick, M.; Berndt, F.; Dobryakov, A. L.; Ioffe, I. N.; Granovsky, A. A.; Knie, C.; Mahrwald, R.; Lenoir, D.; Ernsting, N. P.; Kovalenko, S. A. Photoisomerization Dynamics of Stiff-Stilbene in Solution. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (5), 1389–1402.

- (78) Nelson, David L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry: International Edition*, 7 th.; W.H. Freeman: New York, NY, 2017.
- (79) Villarón, D.; Wezenberg, S. J. Stiff-Stilbene Photoswitches: From Fundamental Studies to Emergent Applications. *Angewandte Chemie - International Edition*. Wiley-VCH Verlag August 3, 2020, pp 13192–13202.
- (80) Kortekaas, L.; Browne, W. R. The Evolution of Spiropyran: Fundamentals and Progress of an Extraordinarily Versatile Photochrome. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48* (12), 3406–3424.
- (81) Helmy, S.; Leibfarth, F. A.; Oh, S.; Poelma, J. E.; Hawker, C. J.; De Alaniz, J. R. Photoswitching Using Visible Light: A New Class of Organic Photochromic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (23), 8169–8172.
- (82) Hemmer, J. R.; Poelma, S. O.; Treat, N.; Page, Z. A.; Dolinski, N. D.; Diaz, Y. J.; Tomlinson, W.; Clark, K. D.; Hooper, J. P.; Hawker, C.; Read De Alaniz, J. Tunable Visible and Near Infrared Photoswitches. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (42), 13960–13966.
- (83) Lerch, M. M.; Wezenberg, S. J.; Szymanski, W.; Feringa, B. L. Unraveling the Photoswitching Mechanism in Donor-Acceptor Stenhouse Adducts. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (20), 6344–6347.
- (84) Klaue, K.; Garmshausen, Y.; Hecht, S. Taking Photochromism beyond Visible: Direct One-Photon NIR Photoswitches Operating in the Biological Window. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2018**, *57* (5), 1414–1417.
- (85) Hunger, K.; Mischke, P.; Rieper, W.; Zhang, S. Azo Dyes, 1. General. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2017; pp 1–24.
- (86) Bandara, H. M. D.; Burdette, S. C. Photoisomerization in Different Classes of Azobenzene. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (5), 1809–1825.
- (87) García-Amorós, J.; Velasco, D. Recent Advances towards Azobenzene-Based Lightdriven Real-Time Information-Transmitting Materials. *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 1003–1017.
- (88) Simeth, N. A.; Crespi, S.; Fagnoni, M.; König, B. Tuning the Thermal Isomerization of Phenylazoindeole Photoswitches from Days to Nanoseconds. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (8), 2940–2946.
- (89) Garcia-Amorós, J.; Díaz-Lobo, M.; Nonell, S.; Velasco, D. Fastest Thermal Isomerization of an Azobenzene for Nanosecond Photoswitching Applications under Physiological Conditions. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2012**, *51* (51), 12820–12823.

- (90) Bandara, H. M. D.; Burdette, S. C. Photoisomerization in Different Classes of Azobenzene. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (5), 1809–1825.
- (91) Weston, C. E.; Richardson, R. D.; Haycock, P. R.; White, A. J. P.; Fuchter, M. J. Arylazopyrazoles: Azoheteroarene Photoswitches Offering Quantitative Isomerization and Long Thermal Half-Lives. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (34), 11878–11881.
- (92) Borowiak, M.; Nahaboo, W.; Reynders, M.; Nekolla, K.; Jalinot, P.; Hasserodt, J.; Rehberg, M.; Delattre, M.; Zahler, S.; Vollmar, A.; Trauner, D.; Thorn-Seshold, O. Photoswitchable Inhibitors of Microtubule Dynamics Optically Control Mitosis and Cell Death. *Cell* **2015**, *162* (2), 403–411.
- (93) Velema, W. A.; Szymanski, W.; Feringa, B. L. Photopharmacology: Beyond Proof of Principle. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (6), 2178–2191.
- (94) Velema, W. A.; Van Der Berg, J. P.; Hansen, M. J.; Szymanski, W.; Driessen, A. J. M.; Feringa, B. L. Optical Control of Antibacterial Activity. *Nat. Chem.* **2013**.
- (95) Matera, C.; Gomila, A. M. J.; Camarero, N.; Libergoli, M.; Soler, C.; Gorostiza, P. Photoswitchable Antimetabolite for Targeted Photoactivated Chemotherapy. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (46), 15764–15773.
- (96) Morstein, J.; Awale, M.; Reymond, J. L.; Trauner, D. Mapping the Azolog Space Enables the Optical Control of New Biological Targets. *ACS Cent. Sci.* **2019**, *5* (4), 607–618.
- (97) Tochitsky, I.; Kienzler, M. A.; Isacoff, E.; Kramer, R. H. Restoring Vision to the Blind with Chemical Photoswitches. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (21), 10748–10773.
- (98) Dong, M.; Babalhavaeji, A.; Samanta, S.; Beharry, A. A.; Woolley, G. A. Red-Shifting Azobenzene Photoswitches for in Vivo Use. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48* (10), 2662–2670.
- (99) Dong, M.; Babalhavaeji, A.; Collins, C. V.; Jarrar, K.; Sadovski, O.; Dai, Q.; Woolley, G. A. Near-Infrared Photoswitching of Azobenzenes under Physiological Conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (38), 13483–13486.
- (100) Weston, C. E.; Richardson, R. D.; Haycock, P. R.; White, A. J. P.; Fuchter, M. J. Arylazopyrazoles: Azoheteroarene Photoswitches Offering Quantitative Isomerization and Long Thermal Half-Lives. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (34), 11878–11881.
- (101) Balam-Villarreal, J. A.; López-Mayorga, B. J.; Gallardo-Rosas, D.; Toscano, R. A.; Carreón-Castro, M. P.; Basiuk, V. A.; Cortés-Guzmán, F.; López-Cortés, J. G.; Ortega-Alfaro, M. C. π -Extended Push-Pull Azo-Pyrrole Photoswitches: Synthesis, Solvatochromism and Optical Band Gaps. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, *18* (8), 1657–1670.

- (102) Dong, M.; Babalhavaeji, A.; Hansen, M. J.; Kálmán, L.; Woolley, G. A. Red, Far-Red, and near Infrared Photoswitches Based on Azonium Ions. *Chem. Commun.* **2015**, 51 (65), 12981–12984.
- (103) Li, Y.; Patrick, B. O.; Dolphin, D. Near-Infrared Absorbing Azo Dyes: Synthesis and X-Ray Crystallographic and Spectral Characterization of Monoazopyrroles, Bisazopyrroles, and a Boron-Azopyrrole Complex. *J. Org. Chem.* **2009**, 74 (15), 5237–5243.
- (104) Moreno, M.; Gelabert, R.; Lluch, J. M. The Quest for Photoswitches Activated by Near-Infrared Light: A Theoretical Study of the Photochemistry of BF₂-Coordinated Azo Derivatives. *ChemPhysChem* **2016**, 2824–2838.
- (105) Moreno, J.; Gerecke, M.; Grubert, L.; Kovalenko, S. A.; Hecht, S. Sensitized Two-NIR-Photon Z→E Isomerization of a Visible-Light-Addressable Bistable Azobenzene Derivative. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2016**, 55 (4), 1544–1547.
- (106) Whitby, R.; Ben-Tal, Y.; MacMillan, R.; Janssens, S.; Raymond, S.; Clarke, D.; Jin, J.; Kay, A.; Simpson, M. C. Photoinitiators for Two-Photon Polymerisation: Effect of Branching and Viscosity on Polymerisation Thresholds. *RSC Adv.* **2017**, 7 (22), 13232–13239.
- (107) Croissant, J. G.; Zink, J. I.; Raehm, L.; Durand, J. O. Two-Photon-Excited Silica and Organosilica Nanoparticles for Spatiotemporal Cancer Treatment. *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, 7 (7), 1–22.
- (108) Izquierdo-Serra, M.; Gascón-Moya, M.; Hirtz, J. J.; Pittolo, S.; Poskanzer, K. E.; Ferrer, È.; Alibés, R.; Busqué, F.; Yuste, R.; Hernando, J.; Gorostiza, P. Two-Photon Neuronal and Astrocytic Stimulation with Azobenzene-Based Photoswitches. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136 (24), 8693–8701.
- (109) Cabré, G.; Garrido-Charles, A.; Moreno, M.; Bosch, M.; Porta-de-la-Riva, M.; Krieg, M.; Gascón-Moya, M.; Camarero, N.; Gelabert, R.; Lluch, J. M.; Busqué, F.; Hernando, J.; Gorostiza, P.; Alibés, R. Rationally Designed Azobenzene Photoswitches for Efficient Two-Photon Neuronal Excitation. *Nat. Commun.* **2019**, 10 (1), 907.
- (110) Loria, S. Indirectly Excited Fluorescence Spectra. *Phys. Rev.* **1925**, 26 (5), 573–584.
- (111) Sobakinskaya, E.; Schmidt am Busch, M.; Renger, T. Theory of FRET “Spectroscopic Ruler” for Short Distances: Application to Polyproline. *J. Phys. Chem. B* **2018**, 122 (1), 54–67.
- (112) Schuler, B.; Eaton, W. A. Protein Folding Studied by Single-Molecule FRET. *Current Opinion in Structural Biology*. February 2008, pp 16–26.
- (113) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Lakowicz, J. R., Ed.; Springer

US: Boston, MA, 2006.

- (114) Jones, G. A.; Bradshaw, D. S. Resonance Energy Transfer: From Fundamental Theory to Recent Applications. *Front. Phys.* **2019**, *7* (JULY).
- (115) Cravcenco, A.; Ye, C.; Gräfenstein, J.; Börjesson, K. Interplay between Förster and Dexter Energy Transfer Rates in Isomeric Donor-Bridge-Acceptor Systems. *J. Phys. Chem. A* **2020**, *124* (36), 7219–7227.
- (116) Skourtis, S. S.; Liu, C.; Antoniou, P.; Virshup, A. M.; Beratan, D. N. Dexter Energy Transfer Pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113* (29), 8115–8120.
- (117) Geralde, M. C.; Leite, I. S.; Inada, N. M.; Salina, A. C. G.; Medeiros, A. I.; Kuebler, W. M.; Kurachi, C.; Bagnato, V. S. Pneumonia Treatment by Photodynamic Therapy with Extracorporeal Illumination - an Experimental Model. *Physiol. Rep.* **2017**, *5* (5), 1–7.
- (118) Yoon, I.; Li, J. Z.; Shim, Y. K. Advance in Photosensitizers and Light Delivery for Photodynamic Therapy. *Clin. Endosc.* **2013**, *46* (1), 7–23.
- (119) Wu, L.; Huang, C.; Emery, B. P.; Sedgwick, A. C.; Bull, S. D.; He, X. P.; Tian, H.; Yoon, J.; Sessler, J. L.; James, T. D. Förster Resonance Energy Transfer (FRET)-Based Small-Molecule Sensors and Imaging Agents. *Chemical Society Reviews*. Royal Society of Chemistry August 7, 2020, pp 5110–5139.
- (120) Arroyo-Pieck, A.; Araiza-Olivera, D.; Peon, J. Bichromophoric Sensors for Ratiometric Measurements of Molecular Microenvironments through the Interplay of Charge Transfer and Energy Transfer Channels. *Chempluschem* **2018**, *83* (12), 1097–1108.
- (121) Qin, X.; Liu, X.; Huang, W.; Bettinelli, M.; Liu, X. Lanthanide-Activated Phosphors Based on 4f-5d Optical Transitions: Theoretical and Experimental Aspects. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (5), 4488–4527.
- (122) Lu, J.; Pattengale, B.; Liu, Q.; Yang, S.; Li, S.; Huang, J.; Zhang, J. Donor-Acceptor Fluorophores for Energy-Transfer-Mediated Photocatalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (42), 13719–13725.
- (123) Berneth, H. Methine Dyes and Pigments. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008.
- (124) Pisoni, D. S.; Todeschini, L.; Borges, A. C. A.; Petzhold, C. L.; Rodembusch, F. S.; Campo, L. F. Symmetrical and Asymmetrical Cyanine Dyes. Synthesis, Spectral Properties, and Bsa Association Study. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (12), 5511–5520.
- (125) Shindy, H. A. Fundamentals in the Chemistry of Cyanine Dyes: A Review. *Dye. Pigment.*

2017, *145*, 505–513.

- (126) Strekowski, L. *Heterocyclic Polymethine Dyes*; Strekowski, L., Ed.; Topics in Heterocyclic Chemistry; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2008; Vol. 14.
- (127) Bricks, J. L.; Kachkovskii, A. D.; Slominskii, Y. L.; Gerasov, A. O.; Popov, S. V. Molecular Design of near Infrared Polymethine Dyes: A Review. *Dye. Pigment.* **2015**, *121*, 238–255.
- (128) Kurutos, A.; Ryzhova, O.; Trusova, V.; Gorbenko, G.; Gadjev, N.; Deligeorgiev, T. Symmetric Meso-Chloro-Substituted Pentamethine Cyanine Dyes Containing Benzothiazolyl/Benzoselenazolyl Chromophores Novel Synthetic Approach and Studies on Photophysical Properties upon Interaction with Bio-Objects. *J. Fluoresc.* **2016**, *26* (1), 177–187.
- (129) Alander, J. T.; Kaartinen, I.; Laakso, A.; Pätilä, T.; Spillmann, T.; Tuchin, V. V.; Venermo, M.; Välisuo, P. A Review of Indocyanine Green Fluorescent Imaging in Surgery. *International Journal of Biomedical Imaging.* 2012.
- (130) Li, W.; Yang, J.; Luo, L.; Jiang, M.; Qin, B.; Yin, H.; Zhu, C.; Yuan, X.; Zhang, J.; Luo, Z.; Du, Y.; Li, Q.; Lou, Y.; Qiu, Y.; You, J. Targeting Photodynamic and Photothermal Therapy to the Endoplasmic Reticulum Enhances Immunogenic Cancer Cell Death. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1).
- (131) Yue, C.; Liu, P.; Zheng, M.; Zhao, P.; Wang, Y.; Ma, Y.; Cai, L. IR-780 Dye Loaded Tumor Targeting Theranostic Nanoparticles for NIR Imaging and Photothermal Therapy. *Biomaterials* **2013**, *34* (28), 6853–6861.
- (132) Atchison, J.; Kamila, S.; Nesbitt, H.; Logan, K. A.; Nicholas, D. M.; Fowley, C.; Davis, J.; Callan, B.; McHale, A. P.; Callan, J. F. Iodinated Cyanine Dyes: A New Class of Sensitisers for Use in NIR Activated Photodynamic Therapy (PDT). *Chem. Commun.* **2017**, *53* (12), 2009–2012.
- (133) Wang, K.; Zhang, Y.; Wang, J.; Yuan, A.; Sun, M.; Wu, J.; Hu, Y. Self-Assembled IR780-Loaded Transferrin Nanoparticles as an Imaging, Targeting and PDT/PTT Agent for Cancer Therapy. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 27421.
- (134) You, J.; Zhang, P.; Hu, F.; Du, Y.; Yuan, H.; Zhu, J.; Wang, Z.; Zhou, J.; Li, C. Near-Infrared Light-Sensitive Liposomes for the Enhanced Photothermal Tumor Treatment by the Combination with Chemotherapy. *Pharm. Res.* **2014**, *31* (3), 554–565.
- (135) Luo, D.; Carter, K. A.; Razi, A.; Geng, J.; Shao, S.; Giraldo, D.; Sunar, U.; Ortega, J.; Lovell, J. F. Doxorubicin Encapsulated in Stealth Liposomes Conferred with Light-Triggered Drug Release. *Biomaterials* **2016**, *75*, 193–202.

- (136) Gao, C.; Liang, X.; Mo, S.; Zhang, N.; Sun, D.; Dai, Z. Near-Infrared Cyanine-Loaded Liposome-like Nanocapsules of Camptothecin-Floxuridine Conjugate for Enhanced Chemophotothermal Combination Cancer Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (4), 3219–3228.
- (137) Bhattarai, P.; Dai, Z. Cyanine Based Nanoprobes for Cancer Theranostics. *Adv. Healthc. Mater.* **2017**, *6* (14), 1–23.
- (138) Przhonska, O. V.; Webster, S.; Padilha, L. A.; Hu, H.; Kachkovski, A. D.; Hagan, D. J.; Van Stryland, E. W. Two-Photon Absorption in Near-IR Conjugated Molecules: Design Strategy and Structure–Property Relations. In *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology I: Fundamentals and Molecular Design*; 2010; pp 105–147.
- (139) Ahn, H. Y.; Yao, S.; Wang, X.; Belfield, K. D. Near-Infrared-Emitting Squaraine Dyes with High 2PA Cross-Sections for Multiphoton Fluorescence Imaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2012**, *4* (6), 2847–2854.
- (140) Yang, W.; Shan Chan, P.; Shan Chan, M.; Fai Li, K.; Kwan Lo, P.; Ki Mak, N.; Wai Cheah, K.; Shing Wong, M. Two-Photon Fluorescence Probes for Imaging of Mitochondria and Lysosomes. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (33), 3428–3430.
- (141) Niu, W.; Guo, L.; Li, Y.; Shuang, S.; Dong, C.; Wong, M. S. Highly Selective Two-Photon Fluorescent Probe for Ratiometric Sensing and Imaging Cysteine in Mitochondria. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (3), 1908–1914.
- (142) Pascal, S.; Denis-Quanquin, S.; Appaix, F.; Duperray, A.; Grichine, A.; Le Guennic, B.; Jacquemin, D.; Cuny, J.; Chi, S. H.; Perry, J. W.; Van der Sanden, B.; Monnereau, C.; Andraud, C.; Maury, O. Keto-Polymethines: A Versatile Class of Dyes with Outstanding Spectroscopic Properties for in Cellulo and in Vivo Two-Photon Microscopy Imaging. *Chem. Sci.* **2016**, *8* (1), 381–394.
- (143) Zhou, Y.; Ma, C.; Gao, N.; Wang, Q.; Lo, P. C.; Wong, K. S.; Xu, Q. H.; Kinoshita, T.; Ng, D. K. P. Pyrrolopyrrole Aza Boron Dipyrromethene Based Two-Photon Fluorescent Probes for Subcellular Imaging. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6* (35), 5570–5581.
- (144) Wang, Y.; Liu, T.; Zhang, E.; Luo, S.; Tan, X.; Shi, C. Preferential Accumulation of the near Infrared Heptamethine Dye IR-780 in the Mitochondria of Drug-Resistant Lung Cancer Cells. *Biomaterials* **2014**, *35* (13), 4116–4124.
- (145) Zhang, E.; Luo, S.; Tan, X.; Shi, C. Mechanistic Study of IR-780 Dye as a Potential Tumor Targeting and Drug Delivery Agent. *Biomaterials* **2014**, *35* (2), 771–778.

- (146) Nödling, A. R.; Mills, E. M.; Li, X.; Cardella, D.; Sayers, E. J.; Wu, S. H.; Jones, A. T.; Luk, L. Y. P.; Tsai, Y. H. Cyanine Dye Mediated Mitochondrial Targeting Enhances the Anti-Cancer Activity of Small-Molecule Cargoes. *Chem. Commun.* **2020**, *56* (34), 4672–4675.
- (147) Zhang, C.; Long, L.; Shi, C. Mitochondria-Targeting IR-780 Dye and Its Derivatives: Synthesis, Mechanisms of Action, and Theranostic Applications. *Adv. Ther.* **2018**, *1* (7), 1800069.
- (148) Jiang, C.; Cheng, H.; Yuan, A.; Tang, X.; Wu, J.; Hu, Y. Hydrophobic IR780 Encapsulated in Biodegradable Human Serum Albumin Nanoparticles for Photothermal and Photodynamic Therapy. *Acta Biomater.* **2015**, *14*, 61–69.
- (149) Wang, K.; Zhang, Y.; Wang, J.; Yuan, A.; Sun, M.; Wu, J.; Hu, Y. Self-Assembled IR780-Loaded Transferrin Nanoparticles as an Imaging, Targeting and PDT/PTT Agent for Cancer Therapy. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (March), 1–11.
- (150) Yan, F.; Duan, W.; Li, Y.; Wu, H.; Zhou, Y.; Pan, M.; Liu, H.; Liu, X.; Zheng, H. NIR-Laser-Controlled Drug Release from DOX/IR-780-Loaded Temperature-Sensitive-Liposomes for Chemo-Photothermal Synergistic Tumor Therapy. *Theranostics* **2016**, *6* (13), 2337–2351.
- (151) Streckowski, L.; Lipowska, M.; Patonay, G. Substitution Reactions of a Nucleofugal Group in Heptamethine Cyanine Dyes. Synthesis of an Isothiocyanato Derivative for Labeling of Proteins with a Near-Infrared Chromophore. *J. Org. Chem.* **1992**, *57* (17), 4578–4580.
- (152) Streckowski, L.; Lipowska, M.; Górecki, T.; Mason, J. C.; Patonay, G. Functionalization of Near-Infrared Cyanine Dyes. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. 1996, pp 1685–1688.
- (153) Wang, Y.; Weng, J.; Lin, J.; Ye, D.; Zhang, Y. NIR Scaffold Bearing Three Handles for Biocompatible Sequential Click Installation of Multiple Functional Arms. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (6), 2787–2794.
- (154) Hochberger-Roa, F.; Cortés-Mendoza, S.; Gallardo-Rosas, D.; Toscano, R. A.; Ortega-Alfaro, M. C.; López-Cortés, J. G. Synthesis and Catalytic Applications of [N,N]-Pyrrole Ligands for the Regioselective Synthesis of Styrene Derivatives. *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361* (17), 4055–4064.
- (155) Brouwer, A. M. Standards for Photoluminescence Quantum Yield Measurements in Solution (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83* (12), 2213–2228.
- (156) Chapman, G.; Henary, M.; Patonay, G. The Effect of Varying Short-Chain Alkyl Substitution on the Molar Absorptivity and Quantum Yield of Cyanine Dyes. *Anal. Chem. Insights* **2011**, *6*, 29–36.
- (157) Stranius, K.; Börjesson, K. Determining the Photoisomerization Quantum Yield of

- Photoswitchable Molecules in Solution and in the Solid State. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (December 2016), 1–9.
- (158) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery Jr., J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Gaussian 09, Revision E.01. Gaussian, Inc.: Wallingford CT 2009.
- (159) Taniguchi, M.; Du, H.; Lindsey, J. S. PhotochemCAD 3: Diverse Modules for Photophysical Calculations with Multiple Spectral Databases. *Photochem. Photobiol.* **2018**, *94* (2), 277–289.
- (160) Sovish, R. Notes: Preparation and Polymerization of p-Vinylphenol. *J. Org. Chem.* **1959**, *24* (9), 1345–1347.
- (161) Cope, A. C.; Siekman, R. W. Formation of Covalent Bonds from Platinum or Palladium to Carbon by Direct Substitution. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87* (14), 3272–3273.
- (162) Günter, H. (Universität S. *NMR Spectroscopy. Basic Principles, Concepts, and Applications in Chemistry.*, 3rd ed.; Wiley-VCH: Singapore, 2013.
- (163) Falk, A.; Cavalieri, A.; Nichol, G. S.; Vogt, D.; Schmalz, H.-G. Enantioselective Nickel-Catalyzed Hydrocyanation Using Chiral Phosphine-Phosphite Ligands: Recent Improvements and Insights. *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357* (14–15), 3317–3320.
- (164) Hochberger-Roa, F. DISEÑO DE AZO-PIRROLES COMO PRECURSORES DE MATERIALES MOLECULARES, UNAM, 2010.
- (165) Lim, S. Y.; Hong, K. H.; Kim, D. Il; Kwon, H.; Kim, H. J. Tunable Heptamethine-Azo Dye Conjugate as an NIR Fluorescent Probe for the Selective Detection of Mitochondrial Glutathione over Cysteine and Homocysteine. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (19), 7018–7025.

- (166) Fu, J.; Padilha, L. A.; Hagan, D. J.; Van Stryland, E. W.; Przhonska, O. V.; Bondar, M. V.; Slominsky, Y. L.; Kachkovski, A. D. Experimental and Theoretical Approaches to Understanding Two-Photon Absorption Spectra in Polymethine and Squaraine Molecules. *J. Opt. Soc. Am. B* **2007**, *24* (1), 67.
- (167) Siewertsen, R.; Schönborn, J. B.; Hartke, B.; Renth, F.; Temps, F. Superior $Z \rightarrow e$ and $e \rightarrow Z$ Photoswitching Dynamics of Dihydrodibenzodiazocine, a Bridged Azobenzene, by $S_1(N\pi^*)$ Excitation at $\lambda = 387$ and 490 Nm. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13* (3), 1054–1063.
- (168) Todd, D. C.; Jean, J. M.; Rosenthal, S. J.; Ruggiero, A. J.; Yang, D.; Fleming, G. R. Fluorescence Upconversion Study of *Cis*-Stilbene Isomerization. *J. Chem. Phys.* **1990**, *93* (12), 8658–8668.
- (169) Kada, Y. Quantum-Chemical Characterization of Ion-Pairing Effect on the Linear and Third-Order Nonlinear Optical Response in Cyanine Dyes. *J. Mol. Struct.* **2019**, *1186*, 127–136.
- (170) Bouit, P.-A.; Aronica, C.; Toupet, L.; Le Guennic, B.; Andraud, C.; Maury, O. Continuous Symmetry Breaking Induced by Ion Pairing Effect in Heptamethine Cyanine Dyes: Beyond the Cyanine Limit. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (12), 4328–4335.
- (171) Werncke, W.; Pfeiffer, M.; Johr, T.; Lau, A.; Grahn, W.; Johannes, H. H.; Dähne, L. Increase and Saturation of the Third Order Hyperpolarizabilities in Homologous Series of Symmetric Cyanines. *Chem. Phys.* **1997**, *216* (3), 337–347.
- (172) Agnetta, L.; Decker, M. *Photoresponsive Hybrid Compounds*; Elsevier Ltd, 2017.
- (173) Laurent, A. D.; Jacquemin, D. TD-DFT Benchmarks: A Review. *Int. J. Quantum Chem.* **2013**, *113* (17), 2019–2039.
- (174) Guarin, C. A.; Mendoza-Luna, L. G.; Haro-Poniatowski, E.; Hernández-Pozos, J. L. Two-Photon Absorption Spectrum and Characterization of the Upper Electronic States of the Dye IR780. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2021**, *249* (186), 119291.
- (175) Jacquemin, D.; Zhao, Y.; Valero, R.; Adamo, C.; Ciofini, I.; Truhlar, D. G. Verdict: Time-Dependent Density Functional Theory “Not Guilty” of Large Errors for Cyanines. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8* (4), 1255–1259.
- (176) Laurent, A. D.; Adamo, C.; Jacquemin, D. Dye Chemistry with Time-Dependent Density Functional Theory. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16* (28), 14334–14356.
- (177) Korth, M.; Grimme, S. Mindless DFT Benchmarking. *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, *5* (4), 993–1003.
- (178) Guido, C. A.; Jacquemin, D.; Adamo, C.; Mennucci, B. Electronic Excitations in Solution: The

Interplay between State Specific Approaches and a Time-Dependent Density Functional Theory Description. *J. Chem. Theory Comput.* **2015**, *11* (12), 5782–5790.

- (179) Kabsch, W. A Solution for the Best Rotation to Relate Two Sets of Vectors. *Acta Crystallogr. Sect. A* **1976**, *32* (5), 922–923.
- (180) Stevens, E. *Medicinal Chemistry. The Modern Drug Discovery Process*; Pearson, 2014.

Anexos

Anexo I. Caracterización de los productos sintetizados

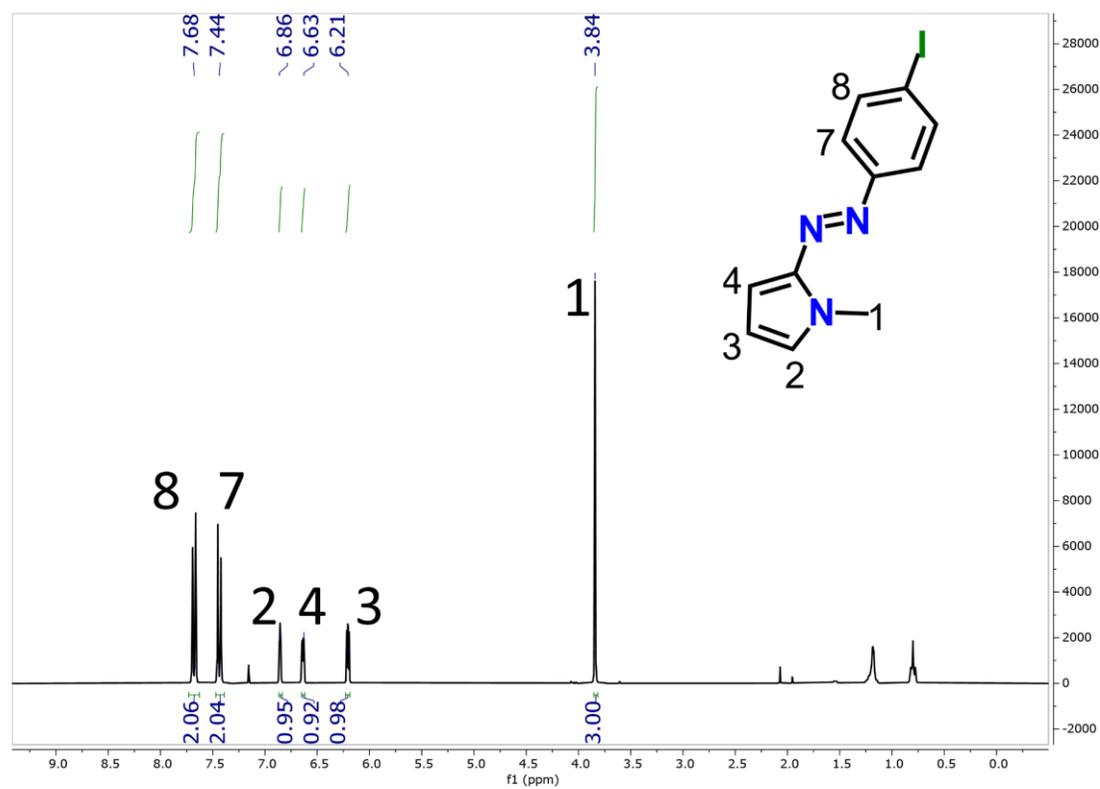


Figura A.1. Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, DMSO-d_6) del azopirrol **AP**.

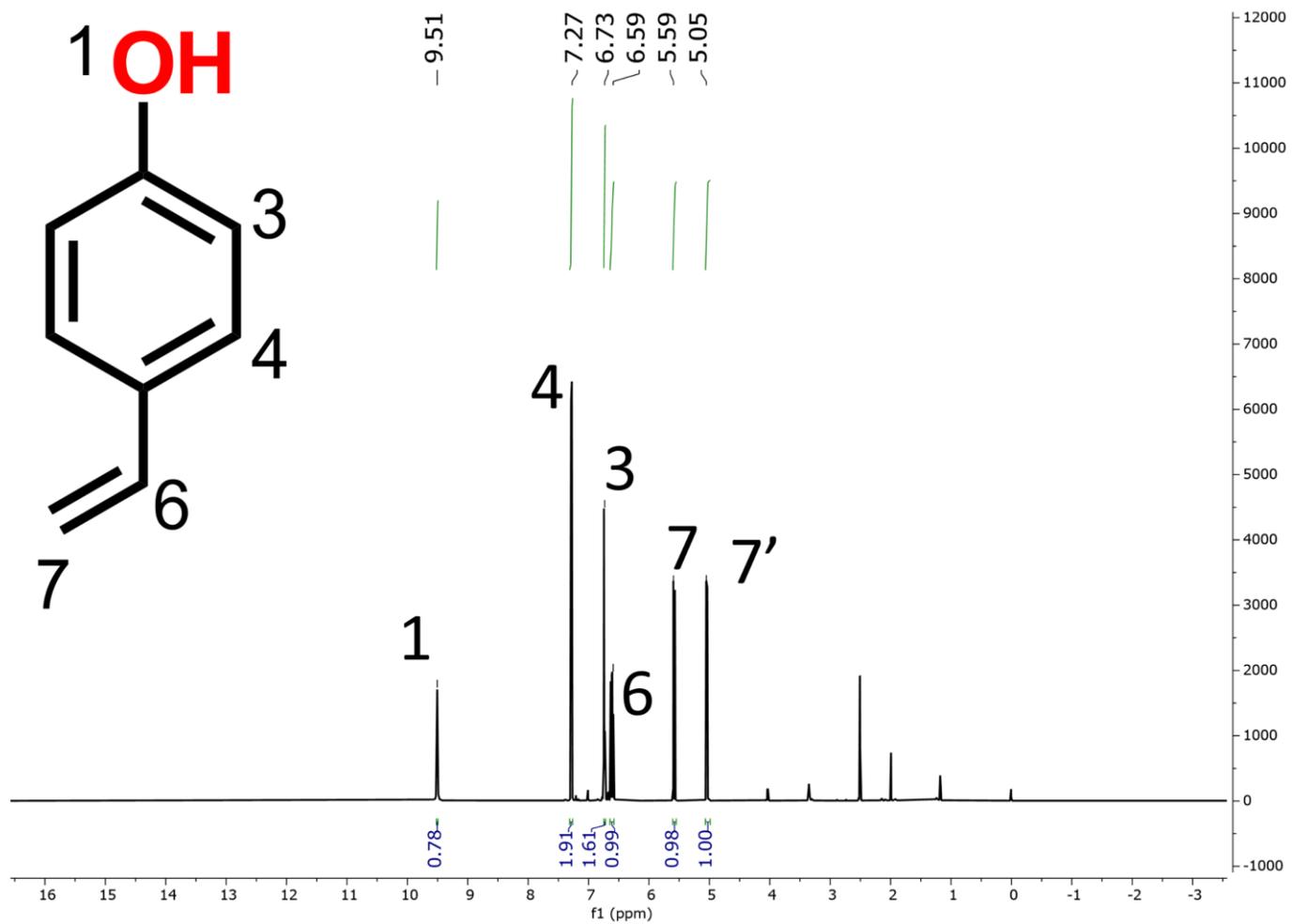


Figura A.2. Espectro de RMN-¹H (700 MHz, DMSO-d₆) del 4-hidroxiestireno.

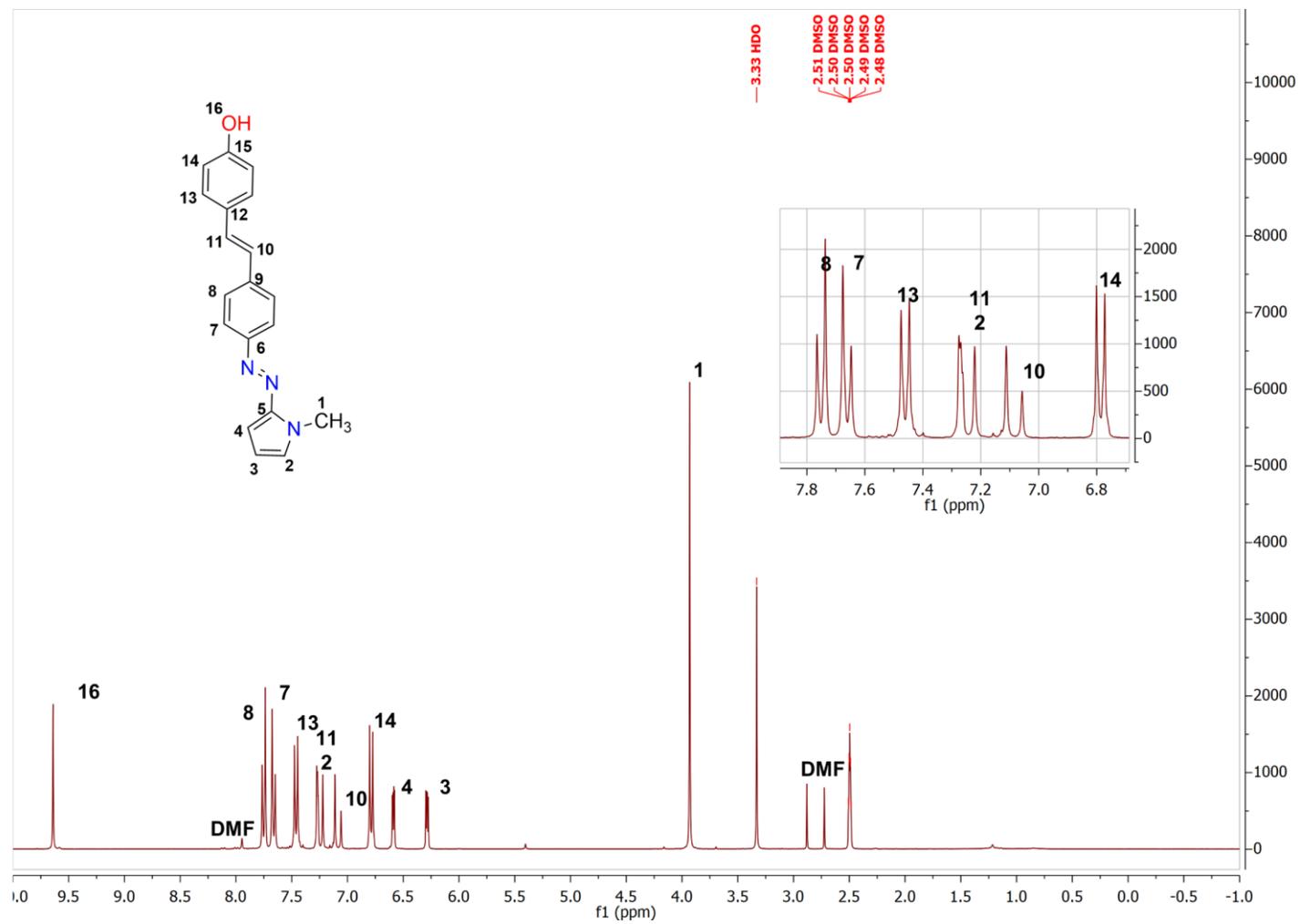


Figura A.3. Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, DMSO-d_6) de SAP.

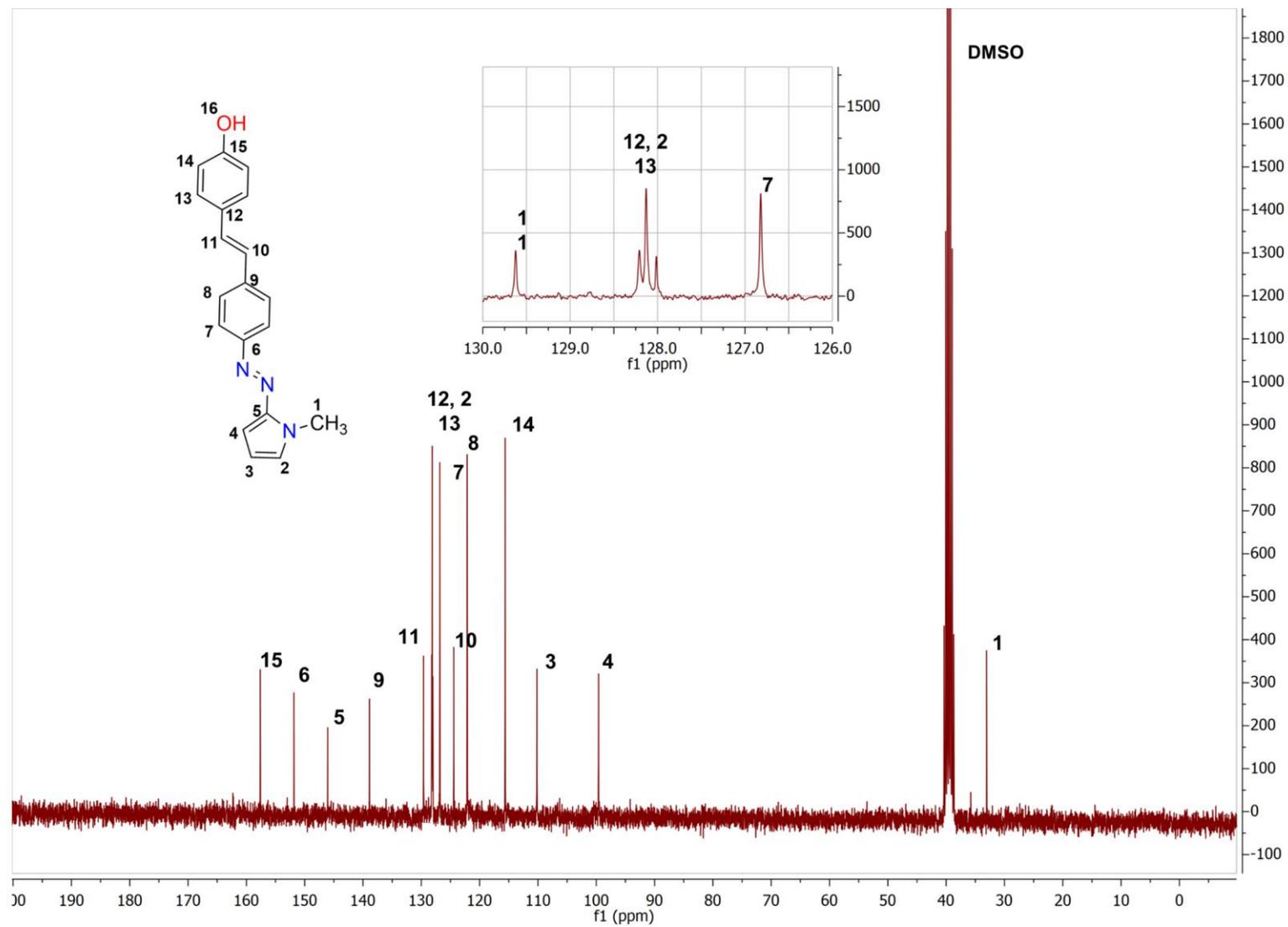


Figura A.4. Espectro de RMN- ^{13}C (75 MHz, DMSO-d_6) de SAP.

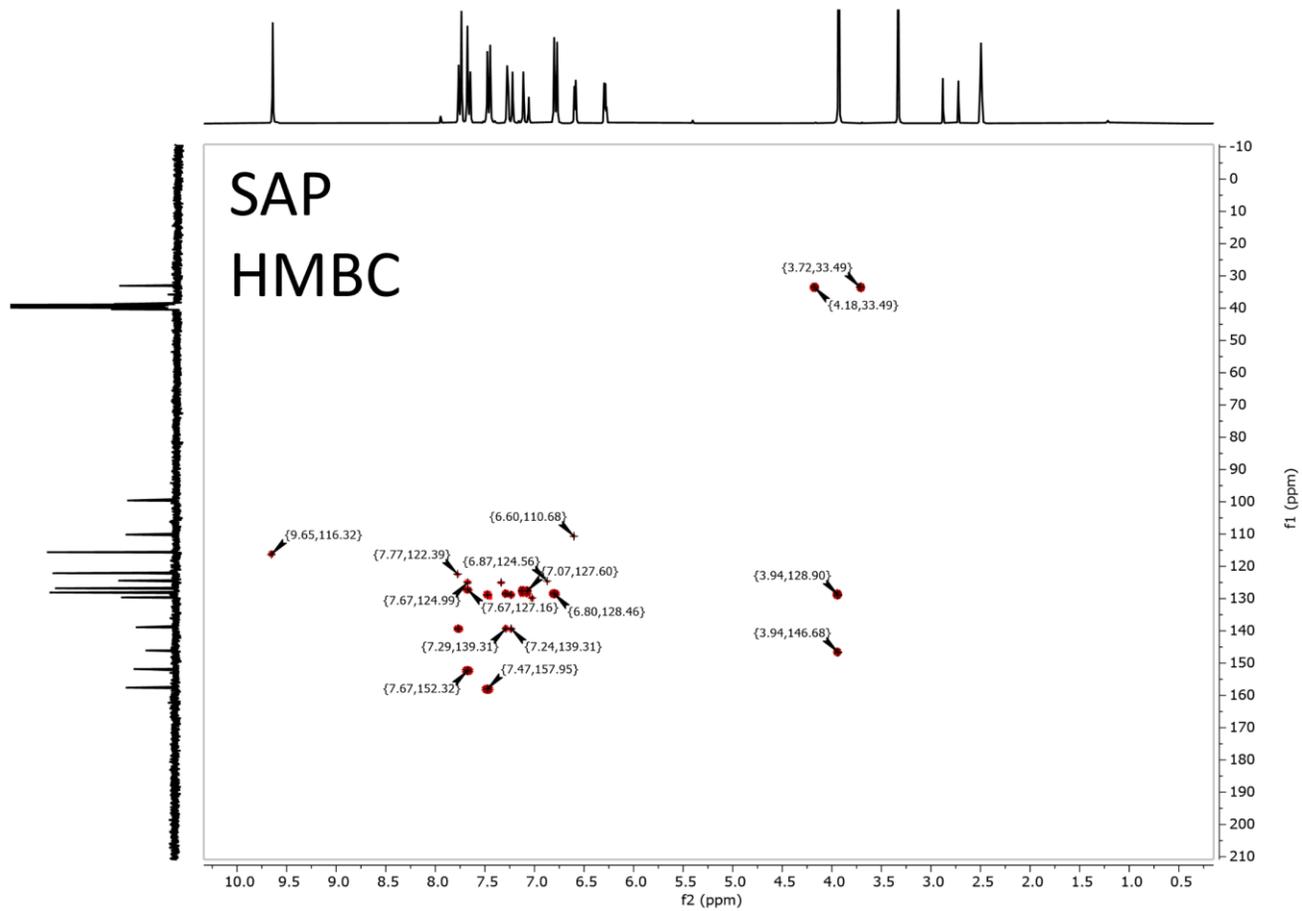


Figura A.5. Espectro de HMBC (300,75 MHz, DMSO-d₆) de **SAP**.

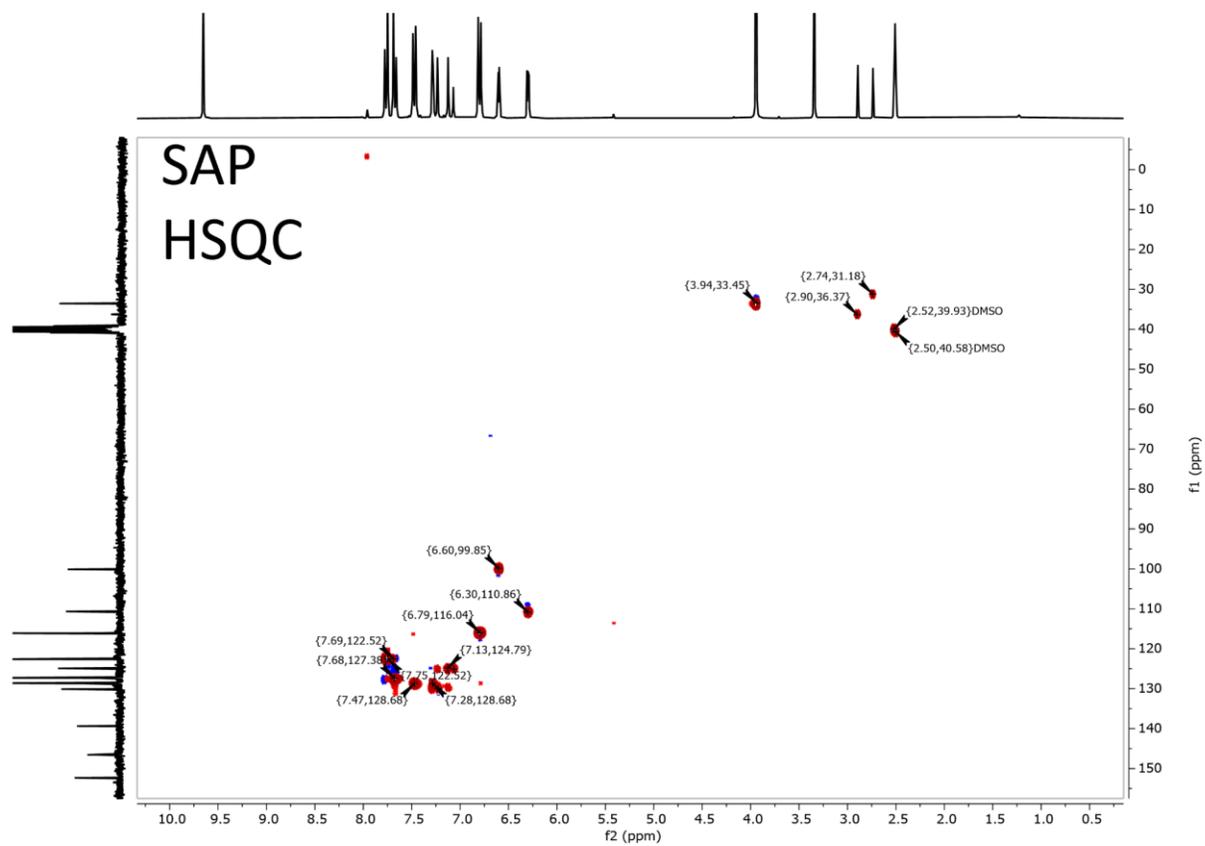


Figura A.6. Espectro de HSQC (300,75 MHz, DMSO-d₆) de **SAP**.

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM
LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS

Acq. Data Name: u-3217 HA1
Creation Parameters: Average(MS[1] Time:1..1)
Dr Pegn Jorge / Emmanuel
x10³ Intensity (302423)

Experiment Date/Time: 11/20/2018 11:21:36 AM
Instrument : JEOL The AccuTOF : JMS-T100LC
Ionization Mode: DART+

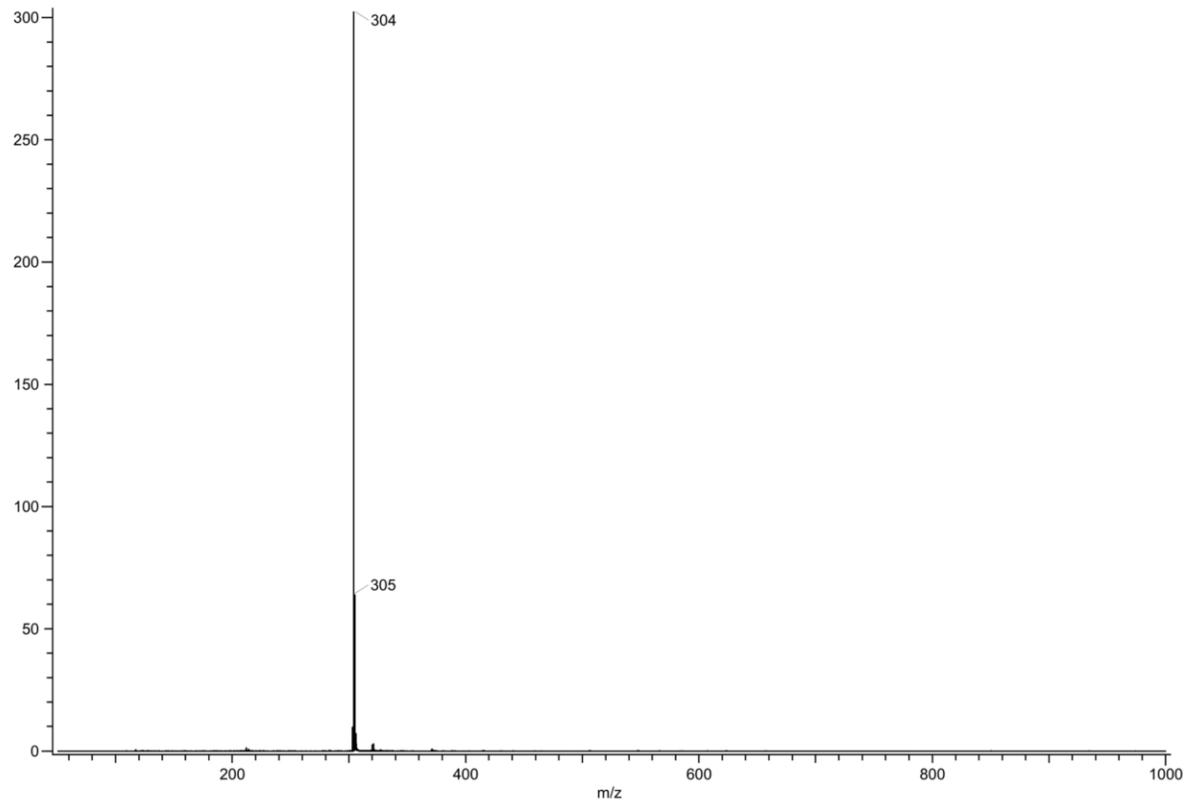


Figura A.7. Espectro de masas (DART+) de **SAP**.

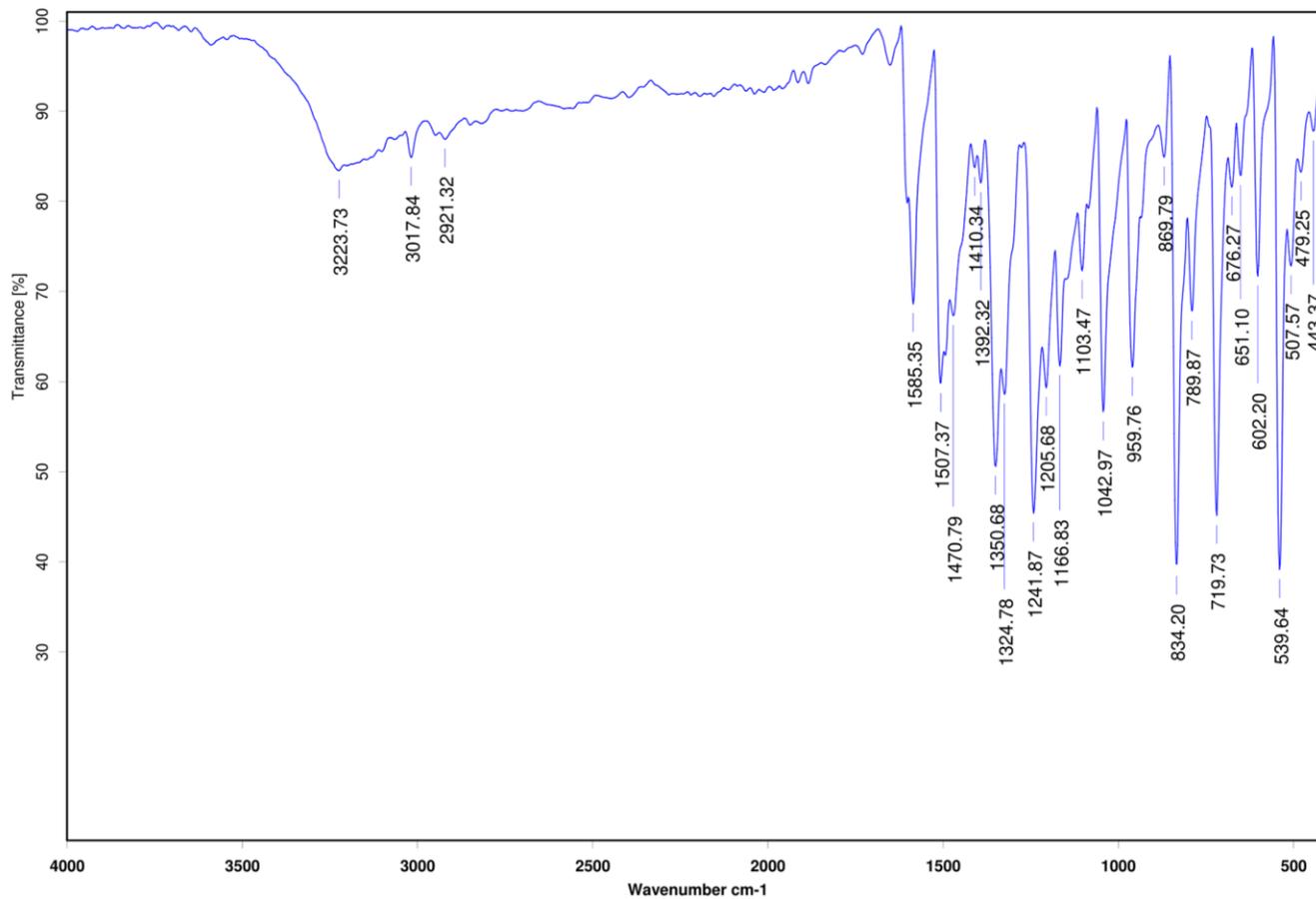


Figura A.8. Espectro de infrarrojo (Pastilla de KBr) de SAP.

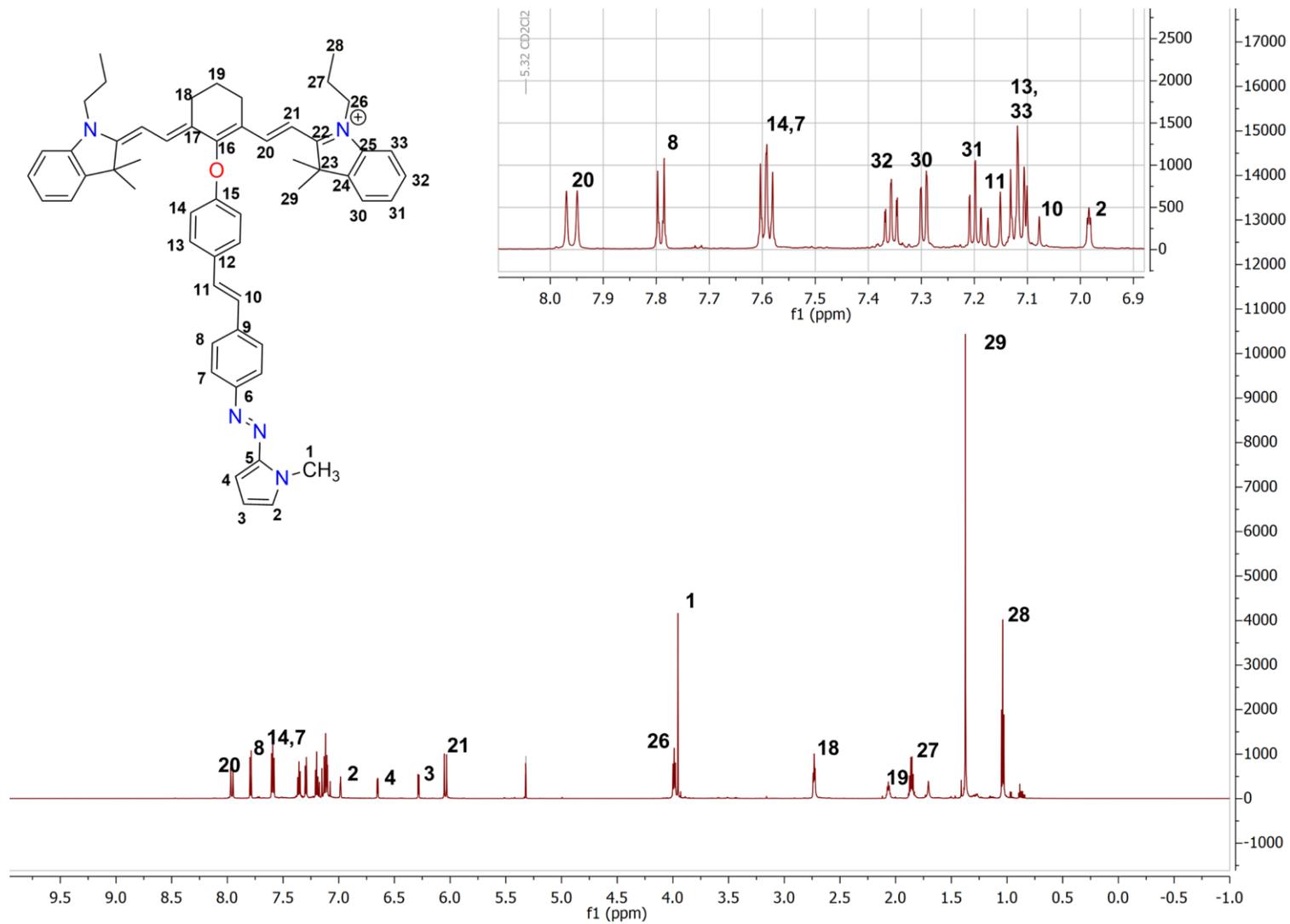


Figura A.9. Espectro de RMN ^1H (700 MHz, CD_2Cl_2) de CysAP.

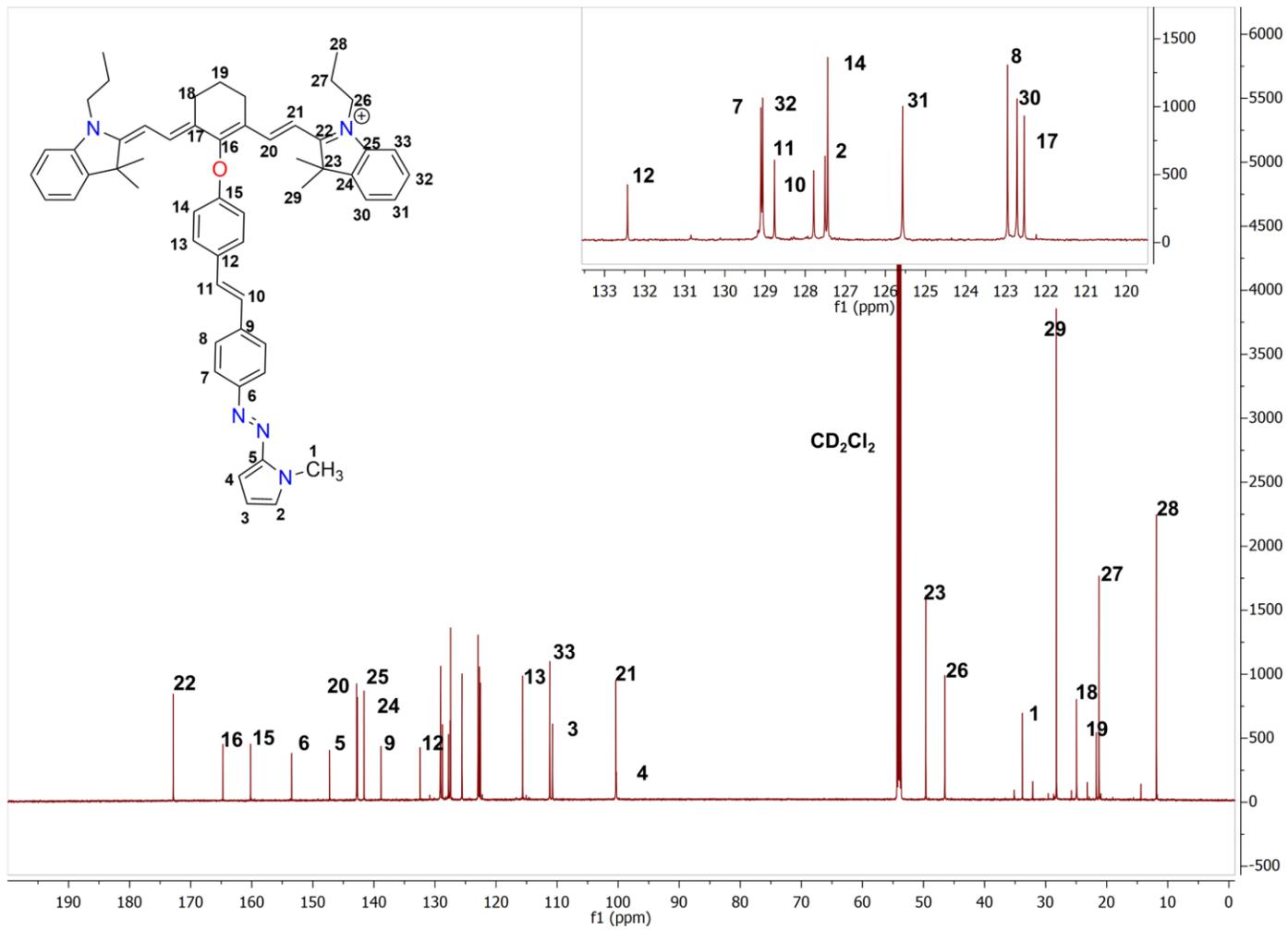


Figura A.10. Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, CD_2Cl_2) de **CySAP**.

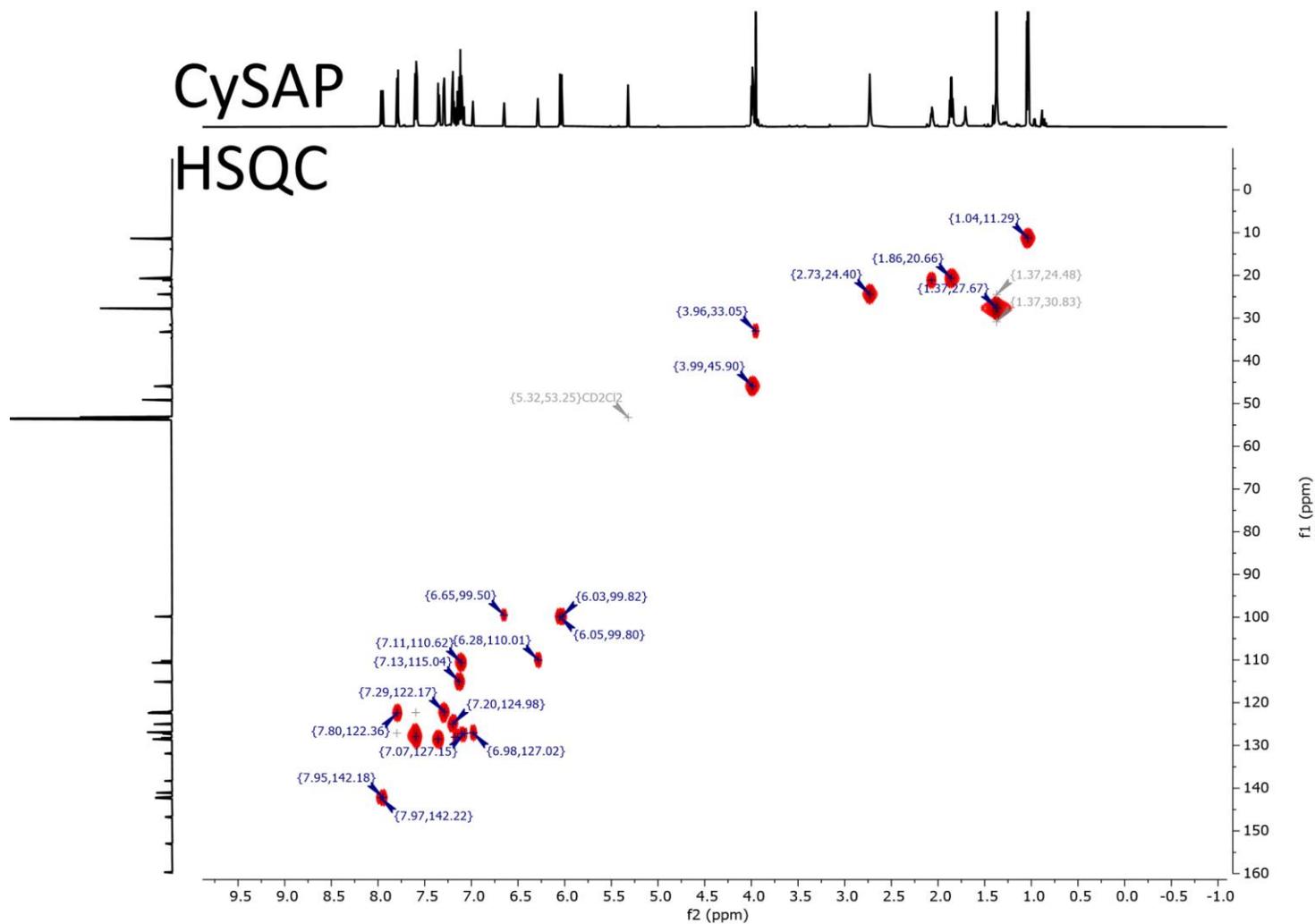


Figura A.11. Espectro de HSQC (700,150 MHz, CD₂Cl₂) de **CySAP**.

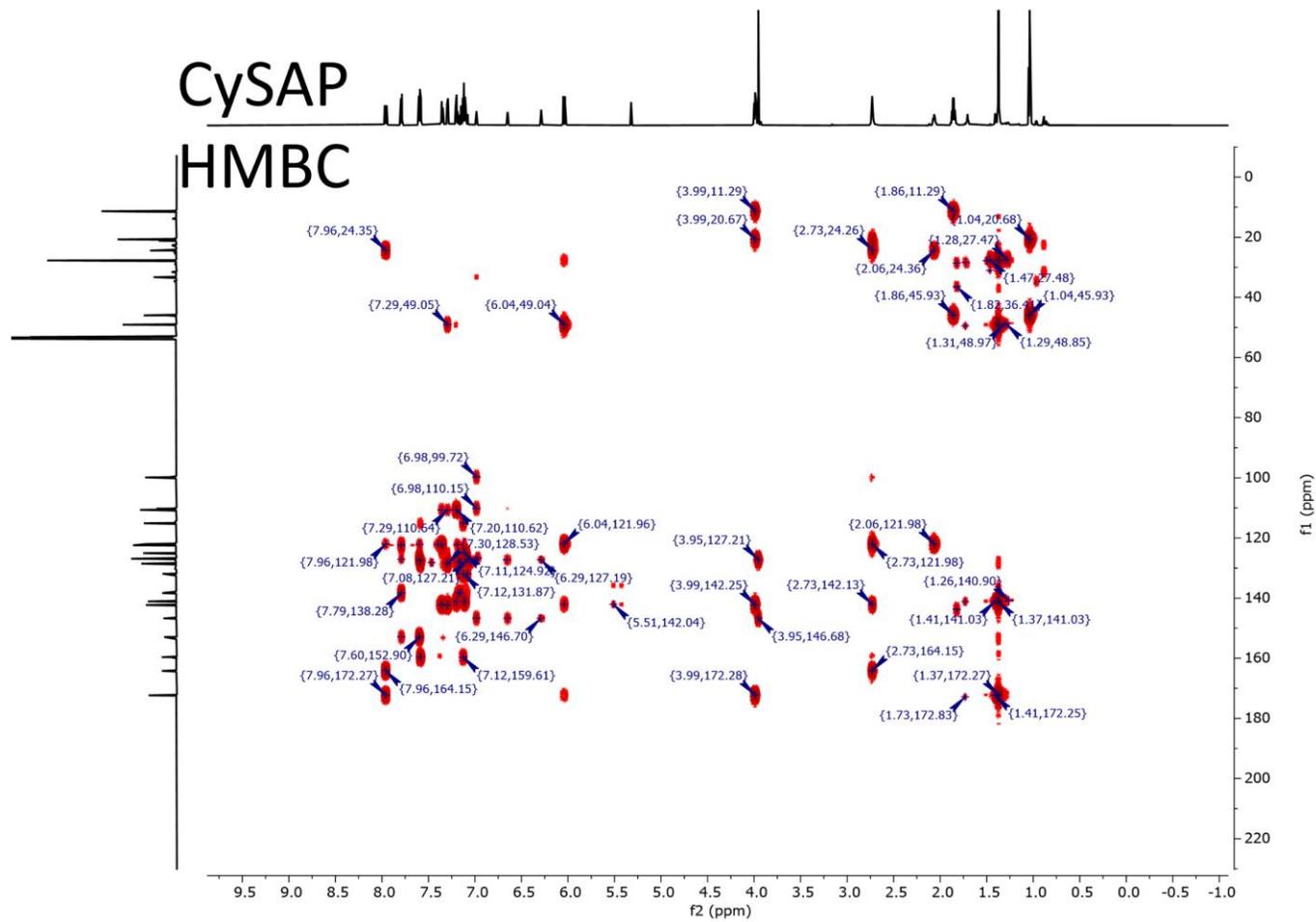


Figura A.12. Espectro de HMBC (700,150 MHz, CD₂Cl₂) de **CySAP**.

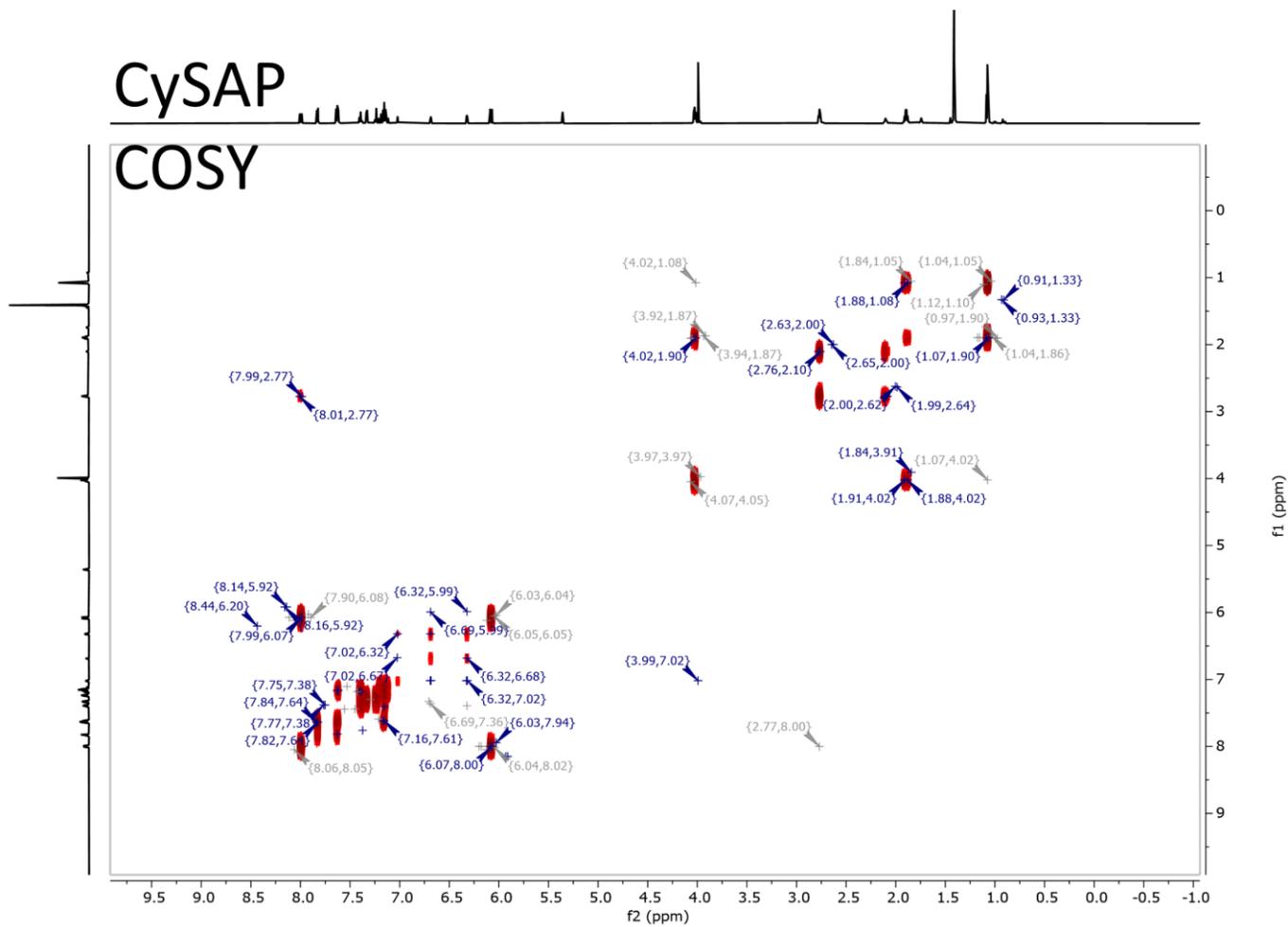


Figura A.13. Espectro de COSY (700 MHz, CD₂Cl₂) de **CySAP**.

[Mass Spectrum]
Data : Dr Jorge Peon036 Date : 30-Jan-2019 11:09
Instrument : MStation
Sample : 65 RCAA
Note : -Luis Velasco
Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
RT : 7.06 min Scan# : (52,68) Temp : 3276.7 deg.C
BP : m/z 154 Int. : 75.22 (788744)
Output m/z range : 10 to 855 Cut Level : 0.00 %

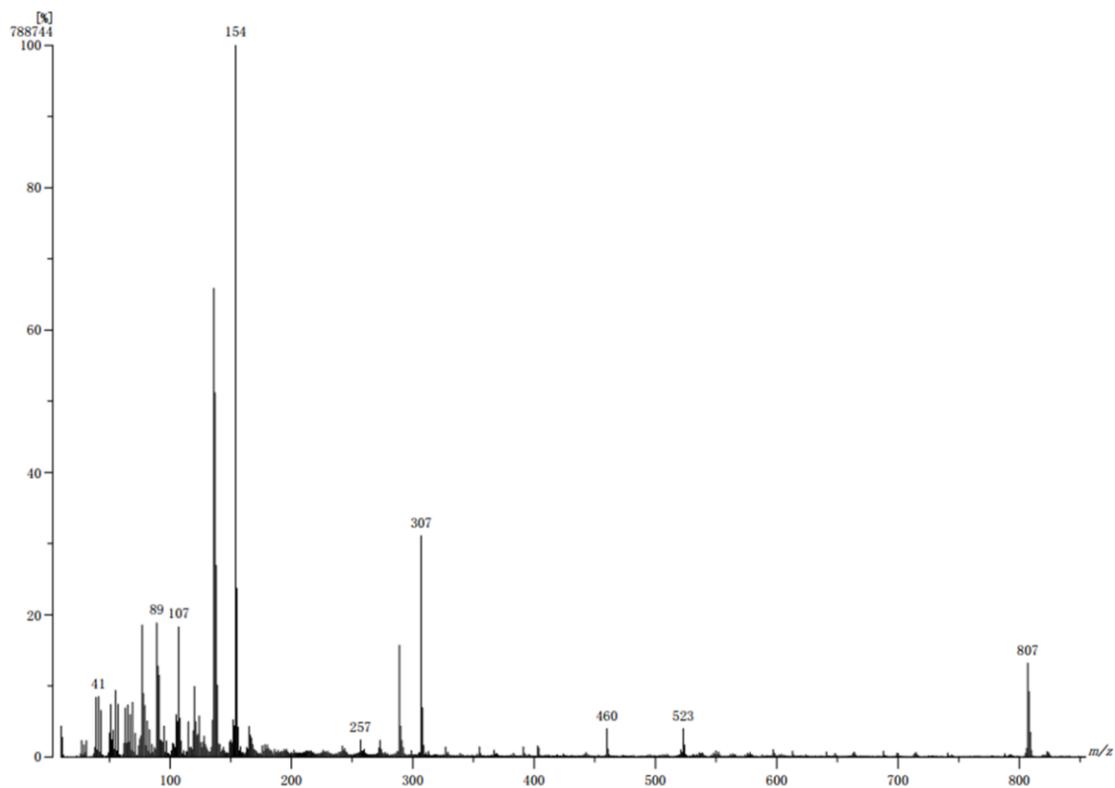


Figura A.14. Espectro de masas (FAB+) de **CySAP**.

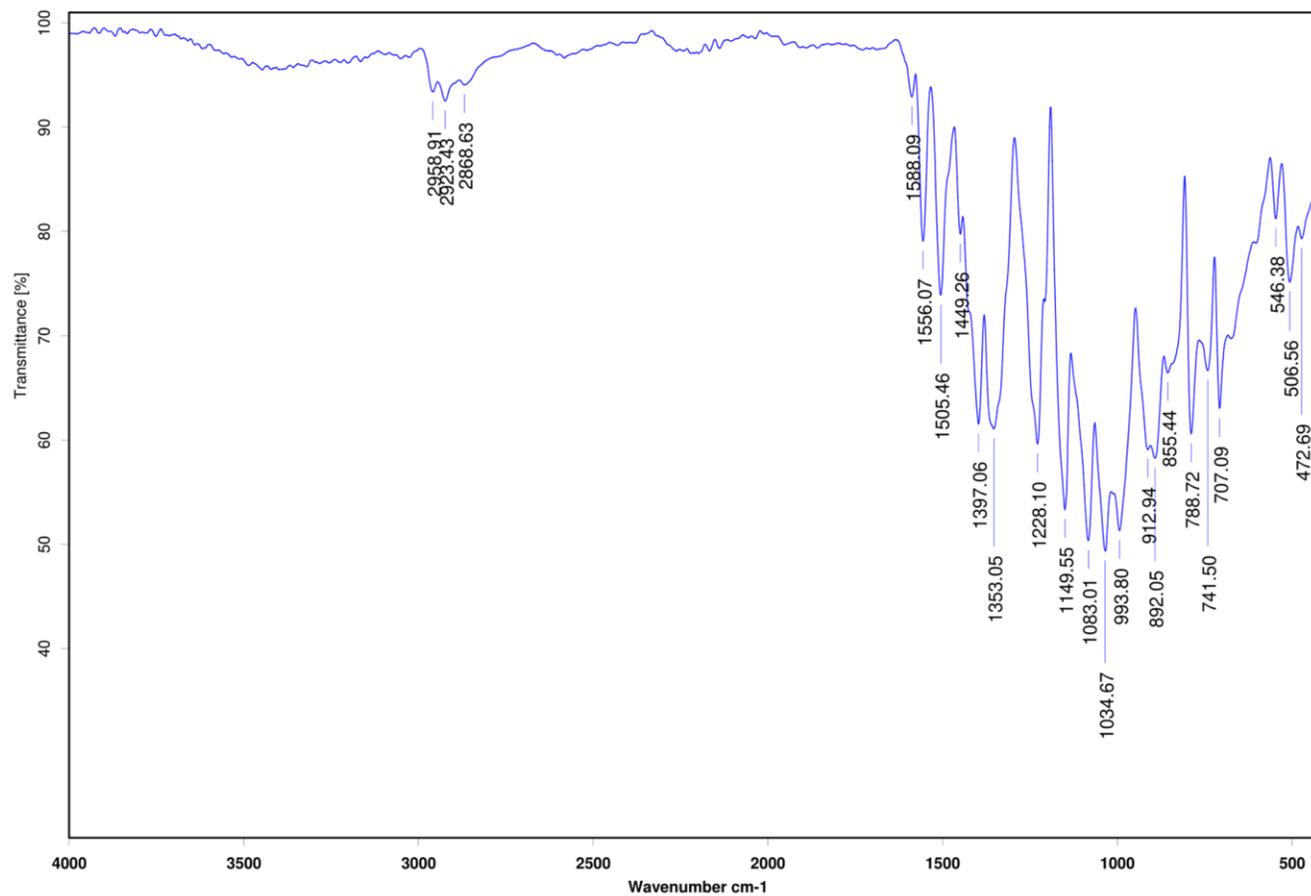


Figura A.15. Espectro de infrarrojo (pastilla de KBr) de **CySAP**.

Anexo II. Estimación del factor de orientación κ^2

Se presenta el programa escrito para la estimación del factor de orientación. El código se escribió en el lenguaje de Python 3.0. El código aquí presentado incluye algunos comentarios sobre el diseño del programa los cuales se señalan con el símbolo # antes del texto.

```
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
from scipy.spatial.transform import Rotation as R

#Masa atómica de algunos compuestos representativos
lib={"C":12.00,"H":1.00,"O":16.00,"N":14.01,"Cl":35.453,"S":32.06}

def importar(nombre):
    #La funcion importa los datos estructurales partiendo de un archivo xyz y los almacena como
    # un par de arrays uno para las posiciones de los átomos y otro para la identidad de estos
    XYZ=open(nombre+".xyz", "r")
    linea=XYZ.readline()
    atom, X, Y, Z=linea.split()
    pos=np.array([[X,Y,Z]])
    lista=np.array([atom])
    for linea in XYZ:
        data=linea.split()
        atom, X, Y, Z = data
        pos=np.append(pos,[[X,Y,Z]],axis=0)
        lista=np.append(lista,[atom],axis=0)
    XYZ.close()

    pos=np.asarray(pos,dtype=float)
    return pos,lista
```

```

def vectores(nombre):
    #La funcion importa los vectores de momento dipolar de transicion partiendo de un archivo txt
    # .y los almacena como un par de arrays uno para las direcciones y otro para la identidad de la
    transicion y la fuerza de oscilador
    VEC=open(nombre+".txt", "r")
    linea=VEC.readline()
    estado, X, Y, Z,f_osc = linea.split()
    pos=np.array([[X,Y,Z]])
    lista=np.array([[estado,f_osc]])
    for linea in VEC:
        estado, X, Y, Z,f_osc = linea.split()
        pos=np.append(pos,[[X,Y,Z]],axis=0)
        lista=np.append(lista,[[estado,f_osc]],axis=0)
    pos=np.asarray(pos,dtype=float)
    lista=np.asarray(lista,dtype=float)
    VEC.close()
    return pos,lista

def com(datos,lista):
    #Calcula el centro de masa de la estructura
    masatotal=0
    com=np.array([0,0,0])
    a=0
    for atomo in datos:
        masa=lib[lista[a]]
        masatotal=masatotal+masa
        coord=atomo
        com=com+masa*coord
        a+=1

    com=com/masatotal
    return (com)

```

```

#Estructura de la molécula completa
CySAP=importar("CySAP")
cCySAP=com(CySAP[0],CySAP[1])

#Porción del fragmento azo en CySAP
SAP=importar("SAP")
cSAP=com(SAP[0],SAP[1])

#Estructura del Azocompuesto aislado
Azo=importar("Azo")
Azo_v,Azo_estados=vectores("Azo_Transicion")
cAzo=com(Azo[0],Azo[1])

#Porcion polimétrica en CySAP. Se omiten las cadenas laterales
Cy=importar("Cy")
cCy=com(Cy[0],Cy[1])

#Estructura del compuesto IR780
IR=importar("IR")
cIR=com(IR[0],IR[1])
IR_v,IR_estados=vectores("IR_Transicion")

def noH(datos,lista):
    #La función devuelve las posiciones de los
    # átomos diferentes a hidrógeno en la estructura
    estructura=np.empty((1,3))
    a=0
    for atomo in datos:
        if lista[a]!="H":
            X,Y,Z=atomo[0],atomo[1],atomo[2]
            estructura=np.append(estructura,[[X,Y,Z]],axis=0)

```

```

    a+=1
    estructura=np.delete(estructura,0,axis=0)
    estructura=np.asarray(estructura,dtype=float)
    return(estructura)

# Alinear fragmento Azoico
d_Azo=Azo[0]-cAzo
d_SAP=SAP[0]-cSAP
V,s=R.align_vectors(noH(d_SAP,SAP[1]),noH(d_Azo,Azo[1]))
r_Azo=V.apply(d_Azo)
Azo_v=V.apply(Azo_v)

#Ajustar el cambio
d_CySAP=CySAP[0]-cSAP
d_Cy=Cy[0]-cSAP
d_IR=IR[0]-cSAP
cCy=com(d_Cy,Cy[1])
cIR=com(d_IR,IR[1])

# Alinear fragmento Cianina
d_Cy=d_Cy-cCy
d_IR=d_IR-cIR
V,s=R.align_vectors(noH(d_Cy,Cy[1]),noH(d_IR,IR[1]))
r_IR=V.apply(d_IR)
IR_v=V.apply(IR_v)

V,s=R.align_vectors(noH(d_Cy,Cy[1]),noH(r_IR,IR[1]))
r_IR=V.apply(r_IR)
IR_v=V.apply(IR_v)

r_IR=r_IR+cCy

```

```
#Recalcular centros de Masa
```

```
cSAP=com(r_Azo,Azo[1])
```

```
cIR=com(r_IR,IR[1])
```

```
def kappa(D,cD,A,cA):
```

```
    r=cA-cD
```

```
    cosT_D=(np.dot(D,r)/(np.linalg.norm(D)*np.linalg.norm(r)))
```

```
    cosT_A=(np.dot(A,r)/(np.linalg.norm(A)*np.linalg.norm(r)))
```

```
    cosT_T=(np.dot(A,D)/(np.linalg.norm(A)*np.linalg.norm(D)))
```

```
    K=cosT_T-3*cosT_D*cosT_A
```

```
    Kappa2=K**2
```

```
    return Kappa2,np.linalg.norm(r)
```

```
Transferencia,rT=kappa(IR_v[1],cSAP,Azo_v[0],cIR)
```

```
print ("EL valor de kappa para la transición IR (S2) -> Azo (S1) = ",Transferencia)
```

```
print ("EL valor de distancia = ",rT)
```

```
RetroTransferencia,rT=kappa(Azo_v[0],cSAP,IR_v[0],cIR)
```

```
print ("EL valor de kappa para la transición Azo (S1) -> IR (S1) = ",RetroTransferencia)
```

```
print ("EL valor de distancia = ",rT)
```

```
def grafica (datos,lista):
```

```
    #Genera la gráfica 3d de los datos. Los colores de los átomos siguen la convención usual
```

```
    a=0
```

```
    for atomo in datos:
```

```
        if lista[a]=="C":
```

```
            ax.scatter(atomo[0],atomo[1],atomo[2] , zdir='z', s=110, color="black", depthshade=True)
```

```
        if lista[a]=="H":
```

```
            ax.scatter(atomo[0],atomo[1],atomo[2] , zdir='z', s=25, color="grey", depthshade=True)
```

```
        if lista[a]=="N":
```

```
            ax.scatter(atomo[0],atomo[1],atomo[2] , zdir='z', s=110, color="blue", depthshade=True)
```

```

if lista[a]=="O":
    ax.scatter(atomo[0],atomo[1],atomo[2] , zdir='z', s=110, color="red", depthshade=True)
if lista[a]=="Cl":
    ax.scatter(atomo[0],atomo[1],atomo[2] , zdir='z', s=110, color="green", depthshade=True)
if lista[a]=="S":
    ax.scatter(atomo[0],atomo[1],atomo[2] , zdir='z', s=110, color="yellow", depthshade=True)
a+=1

fig = plt.figure()
ax = fig.add_subplot(111, projection='3d')
ax.set_xticks([])
ax.set_yticks([])
ax.set_zticks([])

grafica(r_Azo,Azo[1])
grafica(r_IR,IR[1])

# #Vectores SAP
ax.scatter(cSAP[0],cSAP[1],cSAP[2] , zdir='z', s=50, color="salmon", depthshade=True)
ax.quiver(cSAP[0], cSAP[1], cSAP[2], Azo_v[0,0], Azo_v[0,1], Azo_v[0,2], length=1,color="red")

# #Vectores IR
ax.scatter(cIR[0],cIR[1],cIR[2] , zdir='z', s=50, color="cyan", depthshade=True)
ax.quiver(cIR[0], cIR[1], cIR[2], IR_v[0,0], IR_v[0,1], IR_v[0,2], length=1,color="green")
ax.quiver(cIR[0], cIR[1], cIR[2], IR_v[1,0], IR_v[1,1], IR_v[1,2], length=10,color="blue")

plt.show()

```



Two-photon induced isomerization through a cyaninic molecular antenna in azo compounds†

Emmanuel Villatoro,^a Leonardo Muñoz-Rugeles,^{id}^a Jesús Durán-Hernández,^a Bernardo Salcido-Santacruz,^a Nuria Esturau-Escofet,^{id}^a Jose G. López-Cortés,^{id}^a M. Carmen Ortega-Alfaro,^{id}^b and Jorge Peón,^{id}^{*a}

Cite this: *Chem. Commun.*, 2021, 57, 3123

Received 25th December 2020
Accepted 25th January 2021

DOI: 10.1039/d0cc08346a

rsc.li/chemcomm

We present a new design for non-linear optically responsive molecules based on a modular scheme where a polymethinic antenna section with important two-photon absorption properties is bonded to an isomerizable actuator section composed of a stilbenyl-azopyrrole unit. Upon two photon excitation, energy migration from the antenna-localized second singlet excited state to the stilbenyl-azopyrrole section allows for efficient indirect excitation and phototransformation of this actuator.

Reactive response to light is inspiring new molecular control schemes with applications in photo-pharmacology,¹ catalytic process initiation, and the manipulation of molecular gears.² The initial step in these processes is an electronic excitation which triggers a specific molecular transformation.^{1,2} For many of these applications, it is crucial to have high spatial control of the photochemistry. Such control can be achieved if the initial excitation occurs by a non-linear absorption event.

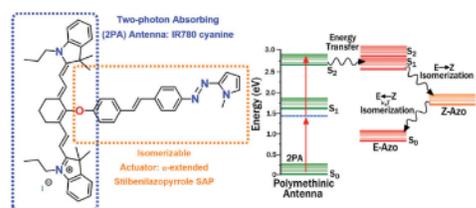
In this contribution, a new bichromophoric design for non-linear optically switchable molecules is proposed. The main idea is to use two chromophores to isolate the two-photon absorption (2PA) properties in one section (the antenna), and the photochemical transformation in another segment (the actuator) as seen in Scheme 1. The moieties are joined through an ether type functionality in a way that the two keep their independent properties as localized chromophores.³ In this design, upon 2PA at the antenna, the energy associated with the excitation is used to efficiently drive changes in the actuator region after rapid exciton migration.

The actuator in our design is a π -extended stilbenyl-azopyrrole (SAP). Azoheteroarenes have shown outstanding properties as photoswitches, providing a versatile scaffold for

future applications. Also, from their extended conjugation, they have transition energies appropriate for indirect excitation through energy transfer from specific upper states in the antenna section (see below).⁴ In our design, the antenna is the polymethinic IR780 cyanine dye. Its symmetry properties make the S_0 to S_2 transition strongly two-photon allowed (with 460 GM units at 860 nm).⁵

Scheme 1 outlines the relevant energy levels for our design and proposed mechanism. The S_2 polymethinic state (formed by 2PA) requires a long enough lifetime for the exciton migration to occur before internal conversion to the S_1 state within this chromophore. The large energy gap between the S_2 and the S_1 cyaninic states (of about 1.0 eV), results in a small vibronic coupling. Thus, for this kind of cyanines, the S_2 lifetime can be in the time scale of picoseconds.⁵

Scheme 2 displays an overview of the synthetic method. Briefly, a Mirozoki-Heck cross-coupling between **1** and **2** affords the intended SAP actuator. To accomplish this coupling, it was crucial the use of complex **3** as catalytic precursor.⁶ A nucleophilic reaction couples SAP through an ether bond to the IR780 cyanine rendering the expected Cy-SAP system. Detailed synthesis and characterization for the SAP and Cy-SAP molecules are included in the ESI†



Scheme 1 Molecular structure of the Cy-SAP dyad. Relative energy diagram of the electronic levels for the polymethinic “two-photon antenna” based on the IR780 cyanine, coupled to a stilbenyl-azopyrrole (SAP) actuator.

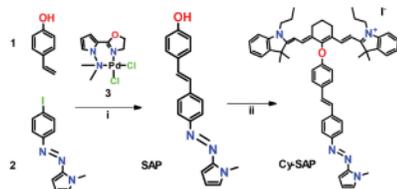
^a Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico. E-mail: jpeon@unam.mx

^b Instituto de Ciencias Nucleares, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

† Electronic supplementary information (ESI) available: Synthesis and characterization of CySAP. Experimental and computational details. Time-resolved spectral data for individual components. See DOI: 10.1039/d0cc08346a



Communication



Scheme 2 Synthetic methodology. (i) 0.1% of **3**, DMF, 160 °C, 2 h. (ii) **IR780**, Et₃N, MeCN, r.t., 24 h.

The key design element of the Cy-SAP system relies on its modular structure. The chromophores keep their respective electronic transition patterns despite the covalent linkage. As seen in Fig. 1, the Cy-SAP absorption spectrum replicates the merged spectrum formed by the simple sum of the SAP and IR780 spectra. From the match, it can be concluded that the SAP unit and the cyaninic section of Cy-SAP keep their excited singlet manifold order and character. The latter is crucial for our design as the cyanine keeps its symmetry and state ordering properties. These properties are essential for a large two-photon absorption cross-section into its S_n ($n > 1$) states.⁵

Polymethine chromophores have been shown to produce significant emissions from their S_2 singlet.^{5b} Fig. 1 shows the well-defined emission band from IR780's S_2 state at 528 nm. This well-defined emission results from the remarkably slow decay of this upper singlet state of several cyanines compared to that of other common chromophores.^{5a} As stated above, our scheme is based on energy transfer coupling between the two sections. Thus, it requires the presence of isoenergetic electronic transitions. Such energy matching will involve the S_2 state of the antenna with the first excited state of the acceptor (SAP). The spectral overlap is shown in the inset of Fig. 1.

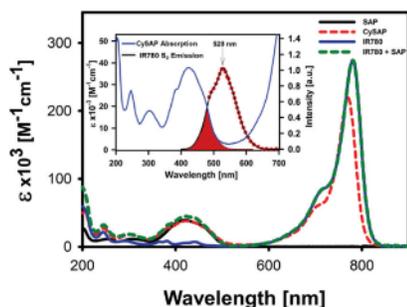


Fig. 1 Absorption spectrum of Cy-SAP (dashed red line) and, for comparison, the sum of the absorption spectra of SAP and IR780 (dashed green line). We also include the absorption spectra of SAP (black line) and IR780 (blue line). Inset: Absorption spectrum of Cy-SAP and emission spectrum from the second excited singlet state of the IR780 cyanine. All spectra were taken in acetonitrile. The red area indicates the spectral overlap between the FRET pair. Fig. S7 in the ESI† confirms that this emission band results from electronic excitation of the cyanine into its S_n ($n > 1$) states.

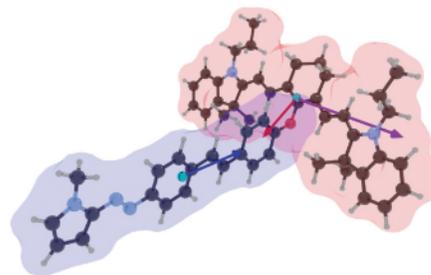


Fig. 2 Calculated equilibrium geometry of Cy-SAP. The red area shows the biphotonic antenna and the blue section highlights the isomerizable actuator. The arrows indicate the transition dipole moments where the blue vector corresponds to the first transition localized in SAP, the purple vector corresponds to the first transition localized in the antenna section, and the red vector corresponds to the second transition localized in the antenna ($S_2 \rightarrow S_0$).

TD-DFT calculations at the PBE0/M06 6-311++G(d,p) (PCM = CH₃CN) level of theory were performed to estimate the energy transfer parameters.⁷ The relevant transition moments are depicted in Fig. 2 and are shown within the optimized Cy-SAP structure. The IR780 antenna S_2 state bears an emission transition vector oriented along the short molecular axis in the direction of the *meso* substituent. The SAP actuator has a strong $S_0 \rightarrow S_1$ transition dipole oriented along its main axis and towards the antenna. These vectors are nearly collinear and correspond to a high orientation factor, κ^2 , for energy transfer: 3.76 (for PBE0) and 3.73 (for the M06 functional).

Our estimation of the coupling between the two chromophores of Cy-SAP considers a Förster mechanism.⁸ The parameters include the spectral overlap shown in Fig. 1, the orientation factor taken from our TD-DFT calculations, and the experimental lifetime of the cyaninic S_2 state in IR780. Further details are found in the ESI.† The predicted antenna to actuator energy transfer yield is between 75.0% (PBE0) and 74.8% (M06). Such large yield for transfer from the S_2 state localized at the antenna section to the S_1 state localized at the actuator comes from four main factors: (1) a favourable κ^2 orientation factor, (2) a large oscillator strength for the acceptor transition of $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, (3) a long-lived upper singlet state for the cyanine-localized S_2 donor singlet state of 1.45 ps (see below), and (4) the proximity of the chromophores of 0.92 nm (center to center).

The photochemical transformation of the actuator of Cy-SAP was first studied by direct linear excitation of the SAP unit within Cy-SAP and compared against the behaviour of the isolated actuator SAP. The results are summarized in Table 1. Upon irradiation, the Cy-SAP system rapidly evolves towards a photo-stationary state (PSS). Fig. 3 shows the complete thermal back isomerization. NMR spectroscopy of the PSS shows a clear mixture of *E* and *Z* isomers as seen in the inset of Fig. 3. A complete and clean thermal isomerization back to the *E* isomer was observed within several minutes for both molecules. The corresponding data for SAP is included in Fig. S14 (ESI†).



Table 1 Isomerization parameters for SAP and Cy-SAP

	$t_{1/2}^a$ [min]	k^a [s ⁻¹]	PSS ^b [%]		$\Phi_{E \rightarrow Z}^c$ [%]
			E	Z	
Cy-SAP	5.5	7.2×10^{-4}	56	44	22 ± 2
SAP	5.5	6.8×10^{-4}	32	68	29 ± 1

^a For the first-order $Z \rightarrow E$ back thermal isomerization. ^b Method described by Calbo *et al.* ^c Method proposed by Börjesson. ³ A 10^{-5} M acetonitrile solution and a 485 nm continuous laser were used to obtain the photostationary state.

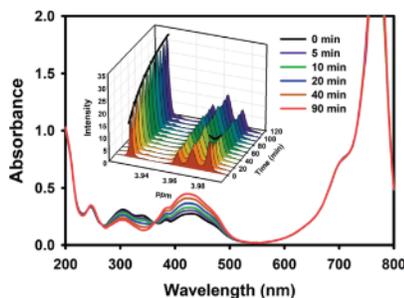


Fig. 3 Thermal $Z \rightarrow E$ back-isomerization was observed after the formation of a photo-stationary state in Cy-SAP solutions. Main: UV-Vis kinetics. Inset: ¹H NMR spectroscopy kinetics. The spectrum shown is a section of the complete spectrum shown in Fig. S15 in the ESI.†

The PSS spectra of SAP and Cy-SAP were deconvoluted into their *E* and *Z* components in Fig. S16 (ESI†). The *E/Z* ratio in the PSS of Cy-SAP is only slightly smaller than that in SAP. Furthermore, Fig. S18 (ESI†) indicates that both systems are capable of several switching cycles without any noticeable fatigue. Such photo-conversion properties are significant and appropriate for several kinds of applications.¹

The fact that the isomerization quantum yield in going from SAP to Cy-SAP only shows a small drop is quite relevant. The indirect non-linear excitation of the stilbenyl-azopyrrole section is to occur by energy transfer from a higher antenna-localized excited state. However, a cyaninic lower energy state (*S*₁, 780 nm band) is present and could provide deactivation channel due to back energy transfer (actuator back to cyanine). The minor $E \rightarrow Z$ yield drop (from 0.29 to 0.22) implies that this not a predominant pathway. Therefore, this potential drawback does not impede the photochemistry in the actuator section.

The main advantage of the Cy-SAP system is its control through non-linear excitation with NIR light. Focused laser pulses tuned to energies slightly below the first cyaninic transition (860 nm) induce the corresponding isomerization. Fig. 4 depicts the resulting spectral evolution after 2PA. The $E \rightarrow Z$ photoinduced response of the system is identical to that observed for linear photoisomerization with visible light in Fig. 3. The clear isosbestic point at 365 nm shown in Fig. 4 and the complete thermal back-isomerization in Fig. S21 (ESI†)

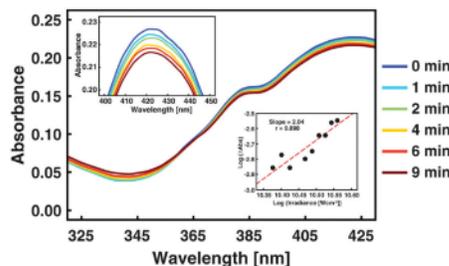


Fig. 4 Evolution from the *E*-isomer to the *Z* isomer of Cy-SAP as a function of irradiation time. The electronic excitation in these experiments corresponds to two-photon absorption of 860 nm, 100 fs laser pulses. The experimental details are included in the ESI.† The lower inset shows the square dependence of the transformation as a function of pulse intensity.

demonstrate a clean two-photon isomerization. Experiments at different excitation powers show no photodegradation at the powers of the experiments (see Fig. S19, ESI†). Back-to-back tests with the SAP molecule (without the antenna) showed no evolution at the same conditions and corroborate the essential role of the antenna section. Given the biphotonic nature of the excitation, the PSS shows a smaller $E \rightarrow Z$ transformation for this PSS in the overall volume of the cell (see Fig. S19, ESI†). However, this is not a concern since these systems are meant for applications where the effects are microscopically localized, like in organelles or liposomes, where localized single molecule photo-transformations are crucial^{1d,2} (rather than large bulk effects).

Femtosecond-resolved fluorescence measurements were used to directly observe the mechanistic aspects of the antenna *S*₂ excitation and energy migration in Cy-SAP. Biphotonic fluorescence up-conversion is ideal for these characterizations since transient emissions from higher states can be resolved in the sub-ps scale. Fig. S23 (ESI†) displays the detection of the emission from the upper excited states of Cy-SAP. Experiments detecting the emissions from the isolated antenna (IR780) and actuator (SAP) are depicted in the ESI,† in Fig. S23.

The emission intensities of Fig. S23 (ESI†) correspond to the energy region of the spontaneous emission from the cyaninic-localized *S*₂ state. These signals exhibit a single exponential decay of 200 ± 60 fs for the Cy-SAP system. These decays are much faster in comparison with those from the *S*₂ emission for the IR780 (antenna-only) case, which is congruent with the proposed mechanism. Specifically, the IR780 emission in Fig. S23 (ESI†) shows a bi-exponential decay with time constants of 220 fs and 1.45 ps due to *S*₂ → *S*₁ internal conversion, where the sub-ps dynamics are attributed to fast relaxation events after excitation. The lack of the 1.45 ps component in Cy-SAP indicates that system evolves into the energy-transfer state before the population of the relaxed cyaninic *S*₂ state is established. The initial (near $t = 0$) emission spectrum of Cy-SAP resembles that of the IR780 cyanine in Fig. S23 (ESI†) indicating the nature of the originally excited state. However,



the Cy-SAP traces decay much faster and display the formation of a shoulder at shorter wavelengths corresponding to the emission from the SAP excited states shown in Fig. S23 (ESI[†]). The faster signal loss in Fig. S23 (ESI[†]) is consistent with the presence of a new channel for the evolution of the cyanine-localized state (polymethinic S₂), due to the presence of the antenna-to-actuator energy migration channel, indicated as “energy transfer” in Scheme 1.

Kinetic modeling of the emission signals agrees with the observed changes between IR780 Cy-SAP. The population modeling used follows the proposed mechanism and is described in the ESI[†]. The model accounts for the changes in the up-conversion signals considering a Förster type energy transfer rate constant from the S₂ state.

Besides the sub-ps spectral evolutions, time-resolved emission polarization anisotropies ($r(t)$) from the up-conversion signals are presented as part of the ESI[†]. The near time-zero ($r(t \approx 0)$) anisotropies of IR780, SAP and Cy-SAP show clear differences. Here, Cy-SAP shows a significantly smaller $r(0)$ value than the IR780 and SAP solutions. This low anisotropy is consistent with the presence of the additional S₂ decay channel in Cy-SAP from exciton migration (see ESI[†]).

It should be noticed that the emission decays and anisotropies from Cy-SAP in the 475 to 600 nm region are due to: two-photon excitation into a superposition of S_n states, the “not-so-rapid” internal conversion to the cyaninic S₁ state of approximately $k_{IC} \approx 10^{12} \text{ s}^{-1}$, and exciton migration to form the SAP localized excited states. Our femtosecond experiments show clear differences between the dynamics of the separate fragments (IR780 and SAP) and those of the antenna-actuator system Cy-SAP, which are consistent with the mechanism indicated in Scheme 1.

In summary, the absorbance changes due to the E-Z isomerization as a function of the 860 nm excitation intensity in Fig. 4 demonstrate the biphotonic nature of this transformation. Crucial back-to-back tests with SAP show no isomerization evidence at these powers for the actuator-only solutions or IR780 – SAP mixtures. Such experiments demonstrate that the CySAP non-linear isomerization response requires the presence of the antenna section. The cyaninic moiety provides the 2PA properties in this modular design where actuator excitation occurs indirectly. The Cy-SAP molecule represents a proof of concept for this general design where the antenna section provides the actuator with significant two-photon properties using a near-resonant step-like transition (cyaninic S₁ at 1.5 eV) to augment the 2PA properties of NIR light. This modular design and the resulting non-linear properties can have applications in areas where highly localized E-Z photoisomerization processes are important, including the de-stabilization of liposomes for content-release, and the control of *cis-trans* isomerization related to macromolecular control, or photopharmacological schemes.¹⁰

Authors acknowledge CONACyT-México grant Ciencia de Frontera 2019-51496, CONACyT-México 285722, and PAPIIT/DGAPA/UNAM IG200621 for financial support, DGTIC-UNAM project LANCAD-UNAM-DGTIC-210 for computer time.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Notes and references

- (a) W. A. Velema, W. Szymanski and B. L. Feringa, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 2178–2191; (b) K. Hill, J. Morstein and D. Trauner, *Chem. Rev.*, 2018, **118**, 10710–10747; (c) I. Tochitsky, M. A. Kienzler, E. Isacoff and R. H. Kramer, *Chem. Rev.*, 2018, **118**, 10748–10773; (d) C. Matera, A. M. J. Gomila, N. Camarero, M. Libergoli, C. Soler and P. Gorostiza, *J. Am. Chem. Soc.*, 2018, **140**, 15764–15773; (e) M. Wegener, M. J. Hansen, A. J. M. Driessen, W. Szymanski and B. L. Feringa, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**, 17979–17986.
- (a) R. Dorel and B. L. Feringa, *Chem. Commun.*, 2019, **55**, 6477–6486; (b) F. M. Raymo and M. Tomasulo, *Chem. – Eur. J.*, 2006, **12**, 3186–3193; (c) D. Roke, S. J. Wezenberg and B. L. Feringa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2018, **115**, 9423–9431.
- (a) J. Moreno, M. Gerecke, L. Grubert, S. A. Kovalenko and S. Hecht, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2016, **55**, 1544–1547; (b) M. Izquierdo-Serra, M. Gascón-Moya, J. J. Hirtz, S. Pittolo, K. E. Poskanzer, E. Ferrer, R. Alibés, F. Busqué, R. Yuste and J. Hernando, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 8693–8701; (c) J. Croissant, A. Chaix, O. Mongin, M. Wang, S. Clément, L. Raehm, J.-O. Durand, V. Hugues, M. Blanchard-Desce and M. Maynadier, *et al.*, *Small*, 2014, **10**, 1752–1755; (d) G. Cabré, A. Garrido-Charles, M. Moreno, M. Bosch, M. Porta-de-la-Riva, M. Krieg, M. Gascón-Moya, N. Camarero, R. Gelabert and J. M. Lluch, *et al.*, *Nat. Commun.*, 2019, **10**, 907.
- (a) J. Calbo, C. E. Weston, A. J. P. White, H. S. Rzepa, J. Contreras-García and M. J. Fuchter, *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**, 1261–1274; (b) S. Crespi, N. A. Simeth and B. König, *Nat. Rev. Chem.*, 2019, **3**, 133–146; (c) C. E. Weston, R. D. Richardson, P. R. Haycock, A. J. P. White and M. J. Fuchter, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 11878–11881.
- (a) C. A. Guarín, J. P. Villabona-Monsalve, R. López-Arteaga and J. Peon, *J. Phys. Chem. B*, 2013, **117**, 7352–7362; (b) J. Fu, L. A. Padilha, D. J. Hagan, E. W. Van Stryland, O. V. Przhonska, M. V. Bondar, Y. L. Slominsky and A. D. Kachkovski, *J. Opt. Soc. Am. B*, 2007, **24**, 67; (c) R. S. Lepkovicz, O. V. Przhonska, J. M. Hales, J. Fu, D. J. Hagan, E. W. Van Stryland, M. V. Bondar, Y. L. Slominsky and A. D. Kachkovski, *Chem. Phys.*, 2004, **305**, 259–270; (d) J. Rodríguez-Romero, C. A. Guarín, A. Arroyo-Pieck, L. Gutiérrez-Arzaluz, R. López-Arteaga, F. Cortés-Guzmán, P. Navarro and J. Peon, *ChemPhotoChem*, 2017, **1**, 397–407.
- (a) L. Muñoz-Rugeles, D. Gallardo-Rosas, J. Durán-Hernández, R. López-Arteaga, R. A. Toscano, N. Esturau-Escofet, J. G. López-Cortés, J. Peón and M. C. Ortega-Alfaro, *ChemPhotoChem*, 2020, **4**, 144–154; (b) F. Hochberger-Roa, S. Cortés-Mendoza, D. Gallardo-Rosas, R. A. Toscano, M. C. Ortega-Alfaro and J. G. López-Cortés, *Adv. Synth. Catal.*, 2019, **361**, 4055–4064.
- M. J. Frisch, *et al.*, *Gaussian 09, Revision E.01*, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
- M. Taniguchi, H. Du and J. S. Lindsey, *Photochem. Photobiol.*, 2018, **94**, 277–289.
- K. Stranius and K. Börjesson, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 1–9.
- (a) D. Liu, S. Wang, S. Xu and H. Liu, *Langmuir*, 2017, **33**, 1004–1012; (b) M. J. Fuchter, *J. Med. Chem.*, 2020, **63**, 11436–11447; (c) J. Morstein, M. Awale, J. L. Reymond and D. Trauner, *ACS Cent. Sci.*, 2019, **5**, 60.

