



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

**“Estudio de la Fotofísica Primaria de Estados Excitados en Compuestos Aromáticos:  
Conversión Interna y Formación de Excimeros”**

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

PRESENTA

Pedro Navarro Pérez



TUTOR: Dr. Jorge Peón Peralta

AÑO: 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **Agradecimientos.**

- A CONACyT que mediante el Proyecto 79494 me otorgó el Apoyo Económico durante el desarrollo de la Maestría.
- A mis Colegas en el Instituto de Química UNAM Tiki, Mar y Sol, Eddy, Juan Pablo, Cesar, Raquel, Eduardo, William. Facultad de Química UNAM. Instituto de Física UNAM. Euvgyny Oustromov, Max Plank Institute, München. Fernanda Solomon, Imperial Collage London. Jessica Stolee, George Washington University.
- A mi Profesor el Dr. Jorge Peón Peralta por la atención incondicional y el intercambio de ideas y vivencias en el campo de la Química.
- A mi familia y amigos con los que sigo disfrutando de una vida cotidiana de h.

# **Laboratorio de Espectroscopía Láser**

Instituto de Química, UNAM

## Tabla de Contenido

---

**1.- Introducción**

**2.- Antecedentes**

**3.-Objetivos e Hipótesis**

**4.-Desarrollo experimental**

**5.- Resultados y Propuestas**

**6.- Conclusiones**

**7.- Bibliografía**

**Resumen.** En este informe se presenta el estudio sobre la evolución temporal de los estados electrónicos excitados superiores de multiplicidad singulete, en una serie de hidrocarburos poliaromáticos (PAHs) en metanol. Estos estados excitados decaen principalmente por el proceso fotofísico no radiativo de Conversión Interna (CI). Se logró establecer un valor experimental aproximado de este proceso en escalas de femtosegundos (fs). Utilizamos la técnica de espectroscopía láser por suma de frecuencias para resolver en tiempo real la acumulación de la señal de emisión de fluorescencia del estado singulete  $S_1$ . Esta señal corresponde directamente al decaimiento del estado superior por Conversión Interna. Para el procesamiento de los datos se usó una ecuación paramétrica triexponencial convolucionada con la función de respuesta del experimento (tipo gaussiana con duración de pulso de  $600 \pm 30$  fs). Los tiempos obtenidos para antraceno, perileno, fluoranteno y pireno fueron: Conversión Interna =  $160 \pm 20$  fs,  $190 \pm 30$  fs,  $420 \pm 40$  fs y  $134 \pm 30$  fs respectivamente. La posterior relajación vibracional hasta el estado singulete de mínima energía ocurrió en  $27.5 \pm 0.2$  ps,  $11.7 \pm 0.5$  ps,  $33 \pm 0.4$  ps y  $1.07 \pm 0.5$  ps. Los resultados concuerdan con lo esperado por la regla de Oro de Fermi. En ella, la constante de velocidad de Conversión Interna está determinada por la diferencia de energías entre el estado singulete superior y el de mínima energía. Estos datos serán de gran utilidad para diseñar sistemas tipo donador-aceptor en los que se busque que la transferencia de energía ocurra desde el estado singulete superior tratando de imitar a un sistema fotosintético real. Para esto, deberá ocurrir en escalas de tiempo mayor o similar que la Conversión Interna medida.

Adicionalmente, se presentan los resultados preliminares de la observación en tiempo real (con la misma técnica) de la formación de un excímero de naftaleno que se forma intramolecularmente. Bajo estas condiciones el fenómeno deja de ser un proceso controlado por la difusión de los cromóforos en el medio, por la concentración, por la viscosidad o por la polaridad del solvente.

## 1 INTRODUCCIÓN

---

El estudio espectroscópico de la dinámica de estados electrónicos excitados en moléculas se ha hecho posible gracias al desarrollo de la espectroscopía láser durante los últimos 40 años. Se han diseñado técnicas con resolución temporal adecuada (Ahmed Zewail Premio Nobel 1999), como fluorescencia por suma de frecuencias o absorción transitoria<sup>1,2,3</sup>. Éstas han permitido monitorear su evolución en tiempo real y establecer cuáles son sus mecanismos fotofísicos de relajación, así como poder observar la formación y ruptura de enlaces químicos. La escala temporal en la cual ocurren los fenómenos fotofísicos a los que nos referiremos van desde algunos femtosegundos ( $1 \times 10^{-15}$  s) a los pico o hasta los nanosegundos ( $1 \times 10^{-12}$  ó  $1 \times 10^{-9}$  s). Algunos fenómenos fotoquímicos que se estudian son las vibraciones de los modos normales, la redistribución de energía electrónica, la transferencia de un protón o un electrón, la emisión espontánea de un fotón, procesos de fotodisociación, la isomerización en los estados excitados, etc.

Uno de los procesos más importantes cuando una excitación óptica da origen a un estado electrónico superior ( $S_n$ ) es la evolución del sistema a un estado excitado inferior de la misma multiplicidad. A este tipo de proceso se le conoce como Conversión Interna. A pesar de la importancia fundamental de estas transiciones no

radiativas, debido a las escalas de tiempo involucradas (femtosegundos), a la fecha no existen determinaciones directas de la velocidad del proceso de Conversión Interna exceptuando algunos casos particulares<sup>4-6</sup>.

Se decidió estudiar la Conversión Interna de una serie de hidrocarburos poliaromáticos (PAHs) que comúnmente se utilizan en el desarrollo de nanotecnologías como antenas colectoras de luz en sistemas que presentan transferencia de energía<sup>7</sup>. Para esta rama de la fotoquímica es de gran importancia conocer los tiempos de vida de los estados  $S_n$  (que decaen por Conversión Interna), ya que estos datos sirven como referentes para diseñar sistemas cuya transferencia de energía provenga de dichos estados superiores, tal como lo hacen las moléculas tipo carotenoides en la fotosíntesis<sup>8,9</sup> (la condición para que la transferencia de energía pueda realizarse desde estados superiores es que deberá ocurrir más rápido que la Conversión Interna que se estudió en éste proyecto).

En el presente trabajo se utilizó la espectroscopía de fluorescencia con resolución temporal por suma de frecuencias en situación de ángulo mágico como metodología para determinar el tiempo característico en el que ocurre el proceso de Conversión Interna en moléculas poliaromáticas (PAHs)<sup>2</sup>. La fotoexcitación se hizo con el tercer armónico de un láser de Titanio: Zafiro (790 nm) generado en un cristal de borato de bario ( $\beta$ -BBO), y la evolución del estado emisivo se monitoreó mediante la suma óptica de la fluorescencia con el pulso de prueba (retrasado temporalmente). Los resultados obtenidos (antraceno,  $160 \pm 20$  fs; fluoranteno,  $420 \pm 40$  fs y perileno  $190 \pm 30$  fs) permitieron establecer un valor aproximado experimental para la constante cinética unimolecular de dicho proceso. Cabe mencionar que las mediciones se obtuvieron a través del tiempo característico de la acumulación de población por Conversión Interna del estado fluorescente ( $S_1$ ) después de que el pulso láser formara el estado singulete superior ( $S_n$ ).

Adicionalmente se hicieron experimentos sobre la distribución angular de la intensidad de la emisión espontánea de algunas de estas moléculas. Con ello se logró establecer la dirección relativa de los momentos dipolares de transición del estado originalmente formado ( $S_n$ ) y el que emite ( $S_1$ ), dicho proceso está mediado por la Conversión Interna.

Aunado a lo anterior se realizaron algunos experimentos preliminares para observar la formación de excímeros intramoleculares en un compuesto modelo derivado del ciclotrifosfaceno substituido con seis grupos  $\alpha$ -naftiloxi y  $\beta$ -naftiloxi. Esto fue realizado mediante el seguimiento directo de la emisión tipo excímero que se da en dicho compuesto.

Estos datos serán de gran utilidad para diseñar sistemas tipo donador-aceptor en los que se busque que la transferencia de energía ocurra desde el estado singulete superior tratando de imitar a un sistema fotosintético real. Para esto, deberá ocurrir en escalas de tiempo mayor o similar que la Conversión Interna medida.

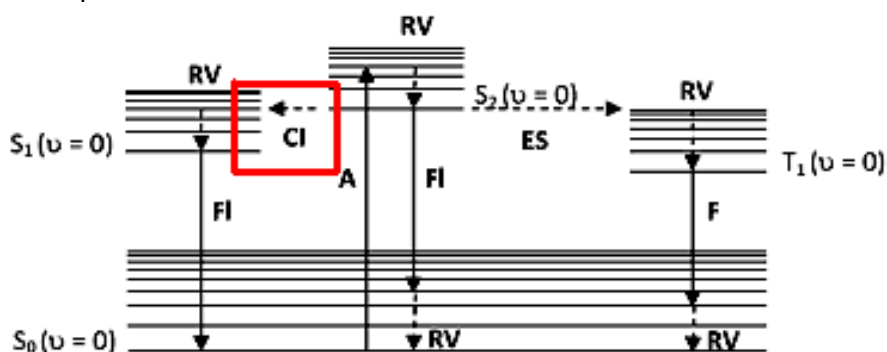


## 2 ANTECEDENTES

### 2.1.- Fotofísica primaria de los estados electrónicos excitados superiores de multiplicidad singlete

Cuando una molécula que se encuentra en la configuración de mínima energía ( $S_0$ ) es irradiada con luz de la longitud de onda ( $\lambda$ ) adecuada para provocar una transición vibroelectrónica (A = Absorción) a un estado electrónico excitado  $S_n$ , ésta regresará a su estado basal mediante alguno o varios de los procesos fotofísicos de relajación de energía electrónica<sup>10</sup>.

El presente informe está enfocado al proceso de transición no radiativa que ocurre entre dos estados con la misma multiplicidad de espín, denominado Conversión Interna. En la figura 1 se representan todos los procesos posibles por los cuales un estado excitado puede decaer al estado basal.



**Figura 1.** Diagrama de Jablonsky representando los procesos fotofísicos de desactivación<sup>10</sup>. A: Absorción. FI: Fluorescencia. ES: Entrecruzamiento entre Sistemas. CI: Conversión Interna. RV: Relajación Vibracional. F: Fosforescencia. Las líneas punteadas corresponden a procesos no radiativos.

El proceso de Conversión Interna es descrito por la mecánica cuántica mediante la teoría de perturbaciones dependiente del tiempo, en particular, a través de la *Regla de Oro de Fermi*, la cual evalúa la probabilidad por unidad de tiempo de que ocurra una transición entre dos estados electrónicos sin que esté involucrada la emisión de un fotón.

A continuación se presentará brevemente cómo es que dicho formalismo permite predecir que las transiciones por Conversión Interna ocurren en escalas de tiempo extremadamente rápidas. La *Regla de Oro* (Ecuación 1) contiene como factores al elemento matricial de interacción entre los dos singletes de la Conversión Interna (digamos  $S_n$  y  $S_1$ ):  $\langle \Psi_{S_1} | H' | \Psi_{S_n} \rangle$  y la densidad de estados vibroelectrónicos del estado  $S_1$  a la energía del estado  $S_n$ :  $\rho$ .

$$k_{CI} (s^{-1}) = \frac{2\pi}{\hbar} |\langle \Psi_{S_1} | H' | \Psi_{S_n} \rangle|^2 \rho \quad (1)$$

Debido a que el hamiltoniano  $H'$  responsable de la transición corresponde a términos de energía cinética nuclear (que se ignoran en la aproximación de Born-Oppenheimer), el elemento matricial  $\langle \Psi_{S_1} | H' | \Psi_{S_n} \rangle$  resulta ser una cantidad de magnitud apreciable en la gran mayoría de los casos (nótese que esto es muy diferente, por ejemplo, a las transiciones singlete-triplete, mediadas por un  $H'$  de acoplamiento espín-órbita, donde en general el elemento matricial respectivo se cancela). Principalmente, debido al elevado acoplamiento entre singletes, el valor de

la constante unimolecular  $k_{CI}$  es sumamente grande. El objetivo principal del trabajo fue la determinación experimental directa de dichas constantes.

Es importante mencionar que aunque la Conversión Interna entre singuletes excitados es en general muy rápida, la Conversión entre singuletes excitados y el singulete basal  $S_0$  es varios órdenes de magnitud menor. Esto se debe a la separación energética entre el singulete basal y el grupo de singuletes excitados  $S_1, S_2, S_3$  etc.

Para ubicar al proceso de Conversión Interna en el laboratorio y resaltar su importancia, hay que analizar un experimento común de fluorescencia. Cuando se tiene un cromóforo que presenta varias transiciones electrónicas en su espectro de absorción, y se hace el experimento de fluorescencia, generalmente se verá una sola banda de emisión independientemente de la longitud de onda de excitación utilizada, la cual corresponde a la transición radiativa  $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_1$ .

Esto ocurre debido a que en la ecuación cinética de desaparición del estado  $S_n$  aparecen:

- el proceso de Conversión Interna:  $S_n \rightarrow S_1$ , con constante:  $k_{CI}$
- el proceso de emisión espontánea:  $S_n \rightarrow S_0 + h\nu_n$ , con constante:  $k_f$

donde aproximadamente las constantes unimoleculares abarcan valores en los siguientes intervalos

$$k_{CI} : 10^{15} \text{ s}^{-1} - 10^{12} \text{ s}^{-1} \quad k_f : 10^9 \text{ s}^{-1} - 10^8 \text{ s}^{-1}$$

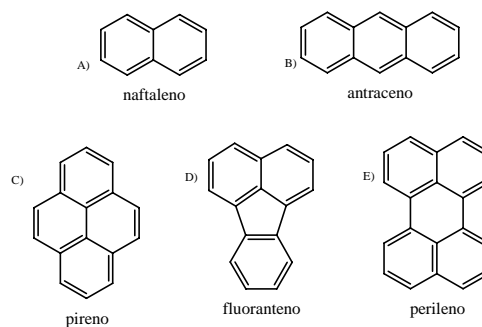
El decaimiento del estado  $S_n$  estará dado por:

$$- d[S_n]/dt = [S_n] ( k_{CI} + k_f ) \quad (2)$$

Donde debido a que la  $k_{CI} \gg k_f$ , el decaimiento de  $S_n$  ocurre casi solo por Conversión Interna. En consecuencia, la rápida acumulación del estado  $S_1$ , hace que únicamente se observe esta emisión ( $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_1$ ). Este hecho experimental se conoce como la regla de Kasha<sup>11</sup>.

Sin embargo, la regla de Kasha tiene algunas excepciones: La primera se encontró en la molécula de azuleno en 1955<sup>12</sup>. Se observó una emisión de  $S_2 \rightarrow S_0$  en 390 nm muy intensa, y la otra de  $S_1 \rightarrow S_0$  de muy baja intensidad en 760 nm debido a la gran diferencia de energía ( $\Delta E$ ) entre los estados  $S_2$  y  $S_1$ . En 1997 se midió el tiempo de vida de fluorescencia del estado  $S_2$  del azuleno que fue de  $1.31 \pm 0.03$  ns con la técnica de suma de frecuencias<sup>13</sup>.

Algunos trabajos relacionados a los mecanismos de transferencia de energía en sistemas fotosintéticos establecen que un estado excitado superior es el responsable de la eficiente transferencia de energía en estos sistemas<sup>14,15</sup>. Esto nos hizo pensar en cuál debería de ser el tiempo en que los PAHs (presentados en la figura 2) debieran de presentar la transferencia de energía desde estados singulete superiores antes de que se presente su desactivación por Conversión Interna.



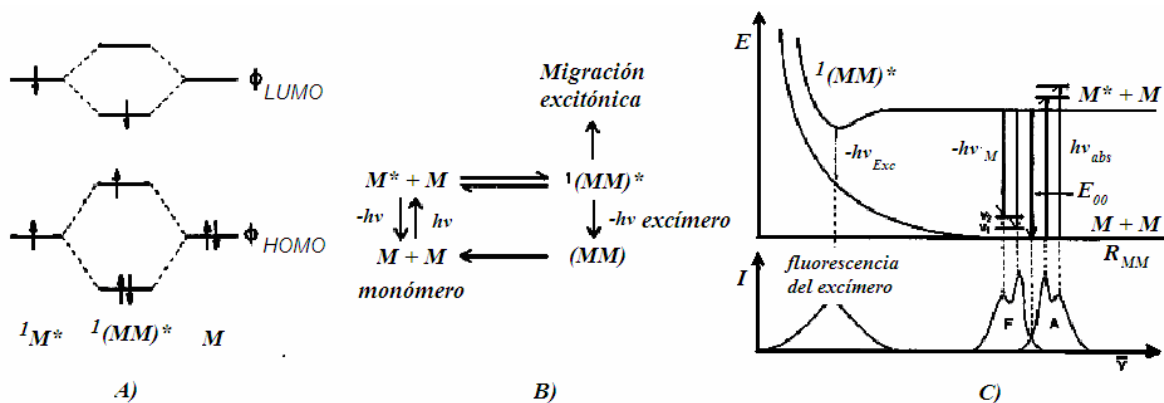
**Figura 2.** Se presentan los hidrocarburos poliaromáticos (PAH) de los cuales se obtuvieron los valores de la constante de velocidad ( $k_{CI}$ ) de Conversión Interna. A, B, C, E pertenecen al grupo puntual  $D_{2h}$ . D pertenece al grupo  $C_{2v}$ .

Últimamente se han estudiado los tiempos del proceso de Conversión Interna de estados singlete superiores en una gran cantidad de compuestos tipo carotenoide utilizando únicamente técnicas de absorción transitoria<sup>16,17,18</sup>. Una desventaja de la absorción transitoria es que se miden al mismo tiempo todos los procesos de la evolución del estado excitado y esto hace difícil interpretar los resultados, por ejemplo, diferenciar a la Conversión Interna de la relajación vibracional. En cambio, la técnica de suma de frecuencias mide únicamente la aparición del estado emisivo. En todos estos estudios se ha tratado de correlacionar la constante de velocidad de Conversión Interna y los tiempos de vida del estado  $S_n$  con la simetría de los estados involucrados en el acoplamiento vibracional. Sin embargo, aún no se ha definido bien a un operador de interacción adecuado para evaluar dicha transición (como el operador momento dipolar en las transiciones electrónicas).

## 2.2 Interacción entre un estado excitado y uno basal: La formación de excímeros

Los excímeros se utilizan como marcadores para estudiar procesos de doblamiento de polímeros, incluidas las proteínas<sup>19,20</sup>. Si se enlazan a una cadena polimérica algunos cromóforos al azar se puede conocer si en un volumen espacial bien definido hay interacción entre dos cromóforos y estos resultados dan información sobre cómo debió de haberse dado el encuentro. De este fenómeno se puede extraer información sobre la dinámica de la cadena polimérica, qué tan rápido y en qué forma se está doblando. Sin embargo, el tiempo de formación inherente del excímero puede ser un efecto negativo en la función de respuesta de la prueba ya que no se sabe en qué tiempo éste se forma y aparece su emisión, por lo tanto ya que contamos con una resolución temporal de femtosegundos vamos a estudiarlo.

En fotoquímica la palabra excímero proviene de la contracción de dímero excitado<sup>21</sup>. Este dímero se forma cuando un cromóforo que está en su estado electrónico excitado se acerca lo suficiente y con la orientación adecuada a otro para interaccionar y repartirse la energía de excitación. Dicha interacción provoca que se forme un pozo de energía potencial (ver figura 3C) que estabiliza al dímero lo suficiente como para que éste presente su propia emisión desde un estado de menor energía que el del monómero. Debido a la naturaleza de los orbitales moleculares de un cromóforo, o sea orbitales  $\pi$ , se puede aplicar la teoría de orbitales moleculares, la cual, mediante una combinación lineal de los orbitales de cada cromóforo genera una serie de nuevos orbitales moleculares para el dímero (se muestra en la figura 3A). Al final del proceso, después de la emisión, el dímero simplemente se disocia y ambos cromóforos regresan a su estado basal (figura 3B).



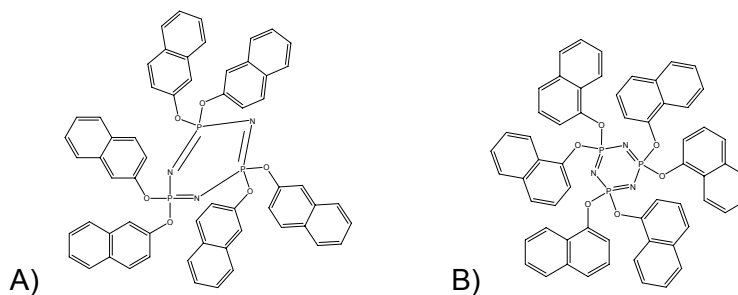
**Figura 3.** A) Esquema de los orbitales moleculares (OM) que forman dos monómeros (M) al interactuar como un excímero. B) Representación cinética del fenómeno. C) Representación de una curva de energía potencial como función de la distancia entre monómeros (M) para la formación de excímeros<sup>10</sup>.

La formación de un excímero en solución está controlada por la constante de difusión de los cromóforos en el medio. Dependen de la probabilidad de que se encuentren con la orientación y la energía adecuada para poder interactuar. Además, son totalmente función de la concentración del cromóforo y de la polaridad del solvente. Todo lo anterior son propiedades inherentes a este fenómeno en solución, que no permiten hacer un estudio más íntimo de su formación. Por lo tanto, decidimos darnos a la tarea de diseñar un sistema modelo (que se presentan en la figura 4) en el que algunas de las limitantes antes señaladas puedan evitarse.

-El tener a los cromóforos enlazados en la misma molécula permitirá estudiar al fenómeno de formación de excímeros sin que éste dependa de la difusión de los cromóforos en el medio en que se estudien. Es decir, aprovechar que la distancia entre cromóforos es muy corta lo cual favorece la aparición del complejo excitado. En estado sólido se reporta que dicha distancia no es mayor a 4.5 Å<sup>22</sup>.

-Se espera que en solución el enlace P-O-C permita que el cromóforo gire y se oriente en la mejor disposición para lograr la interacción con máxima eficiencia.

Nuestra propuesta para estudiar el fenómeno de formación de excímeros son los sistemas multicromofóricos modelo:



**Figura 4.** Derivados de ciclotrifosfaceno. A) Con β-naftol (CTP-B) se espera una orientación por arriba y por debajo del plano<sup>23</sup>. B) Con α-naftol en acomodo tipo dominó<sup>22</sup>.

### 3 OBJETIVOS

---

#### 3.1.- Conversión Interna

-Medir las constantes de velocidad del proceso de Conversión Interna ( $k_{CI}$ ) para los cinco PAHs enlistados en este trabajo, o al menos determinar un intervalo experimental para los tiempos de vida de los estados electrónicos superiores ( $S_n$ ) de los PAHs.

-Reportar que con la técnica de suma de frecuencias es posible observar la acumulación de la señal de emisión directa de un estado fluorescente generado por la Conversión Interna desde un estado electrónico superior.

-Producir datos que permitan correlacionar la simetría de los estados involucrados en nuestra serie de PAHs con su constante de velocidad de Conversión Interna y los tiempos de vida del estado  $S_n$  generado inicialmente.

-Determinar la orientación del momento dipolar del estado excitado inicialmente ( $S_n$ ) respecto al del estado emisor ( $S_1$ ).

-Obtener tanto los valores iniciales como los tiempos del decaimiento de la anisotropía de fluorescencia haciendo excitaciones a un estado que no es el emisor ( $S_n$ ) mediante el experimento de polarización de la excitación de la emisión de la fluorescencia.

#### 3.2.- Formación de Excímeros

-Obtener en tiempo real los valores para el tiempo de formación de un excímero después de la excitación de un cromóforo en la molécula de CTP.

## 4 DESARROLLO EXPERIMENTAL

---

### 4.1.- Implementación de la Técnica

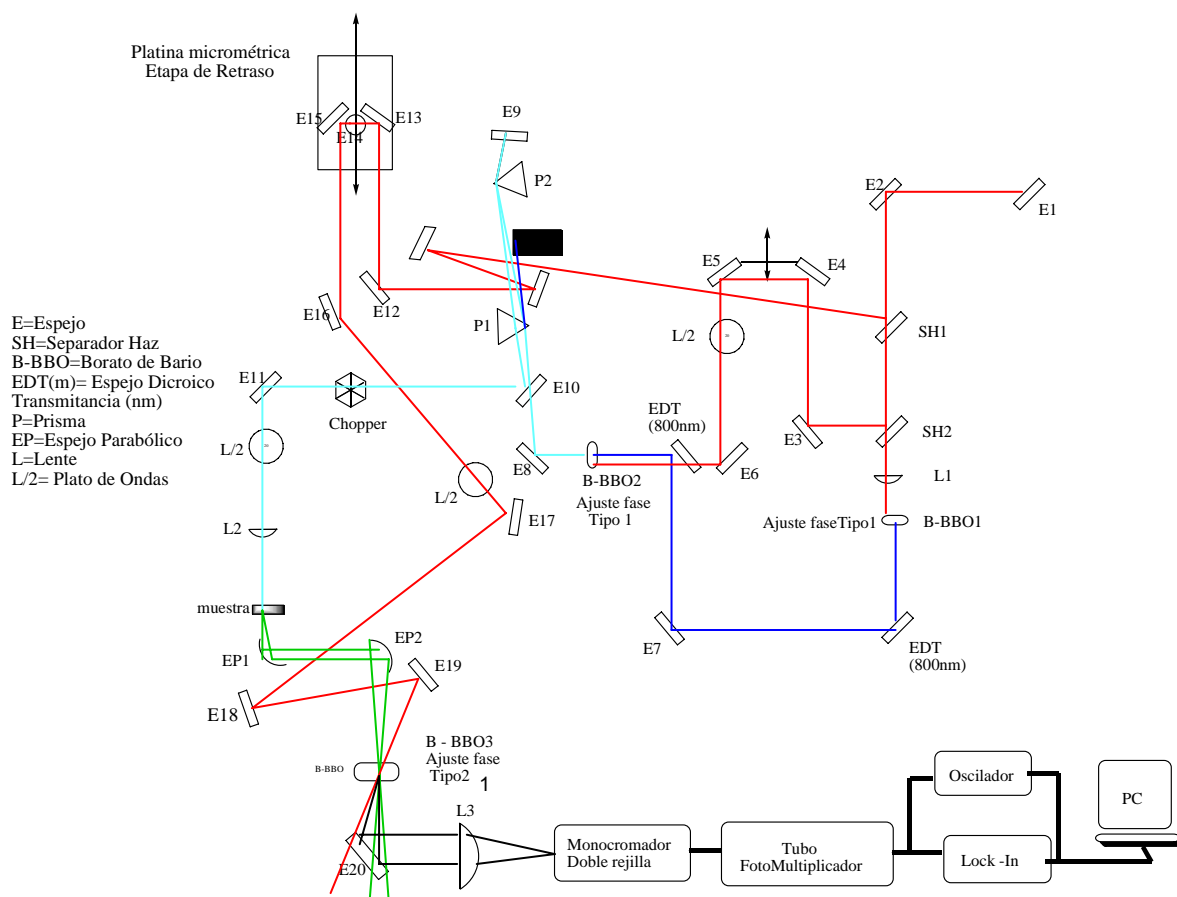
#### Fluorescencia con Resolución Temporal. Suma de Frecuencias

Los objetivos de este proyecto requieren medir la velocidad a la que se acumula señal de fluorescencia emitida desde los estados que se producen de la Conversión Interna o la formación de excímeros. La intensidad de dicha señal es directamente proporcional a la población de dichas especies ( $S_1$  o el excímero mismo). Debido a que estos procesos ocurren en escalas temporales sumamente breves, es necesario contar con técnicas de espectroscopía que detecten dicha acumulación con una resolución de femtosegundos. Esto último sólo se puede lograr usando un pulso de radiación láser ultracorto para inducir el estado inicial del fenómeno (digamos, el estado  $S_n$  en la Conversión Interna) y luego, hacer uso de otro pulso láser (retrasado respecto al primero un tiempo bien definido) que genere una “compuerta temporal” para detectar la fluorescencia que está apareciendo conforme el estado final del proceso se va acumulando (ver diagrama experimental, figura 5). Esta metodología se conoce como fluorescencia con resolución temporal por suma de frecuencias. A continuación se realiza una descripción detallada de su implementación, la cual formó parte principal del proyecto realizado durante la maestría.

*Generación de pulsos ultracortos.* La primera etapa consta de un láser de onda continua (VERDI - Coherent), el cual opera a una longitud de onda de 527 nm y produce una potencia luminosa de 5 W. Este láser *bombea* una cavidad láser (oscilador) de estado sólido basado en el material “Titanio-Zafiro” (Ti:Z : Óxido de titanio cristalino con impurezas del catión Titanio(III)). El material Ti:Z genera una emisión estimulada ajustable alrededor de 800 nm que se conoce como el pulso fundamental. La formación de pulsos con duración de unos 50 fs se logra generando un estado resonante dentro de la cavidad óptica, llamado de “ajuste de fases” (Mode-Locking<sup>24</sup>). Brevemente, se trata de poner a una única fase la mayor cantidad de componentes espectrales con interferencia constructiva, mientras que en cualquier otro momento fuera de esta fase la interferencia se hace destructiva. El oscilador genera pulsos con una frecuencia de repetición de 100 MHz, una energía de 5 nJ/pulso y una duración temporal entre 30 fs y 90 fs.

*Amplificación del tren de pulsos.* La amplificación regenerativa de los pulsos se logra con un láser de Nd:YAG bombeado por una lámpara de Kriptón (Clark ORC 1000). El láser de Nd:YAG bombea otro cristal de Ti:Z con una potencia de 5 W. Éste comienza a emitir estimuladamente a partir del pulso generado en la etapa anterior (oscilador) el cual es inyectado en la cavidad regenerativa mediante una combinación de reflexiones. La salida de la cavidad regenerativa está controlada por unos dispositivos optoelectrónicos llamados “*celdas Pockels*” con las que se pueden realizar cambios en la polarización del pulso inyectado para hacer que ingrese, se amplifique (mantenerlo dentro de la cavidad un tiempo ajustable) y luego se extraiga de la cavidad de amplificación. En este experimento, los pulsos ya amplificados que se obtienen tienen 550 mW de potencia promedio (considerando 1000 pulsos por segundo) y una duración entre 50 fs y 70 fs con una frecuencia de repetición de 1 kHz. Los pulsos pueden generarse entre 750 y 900 nm.

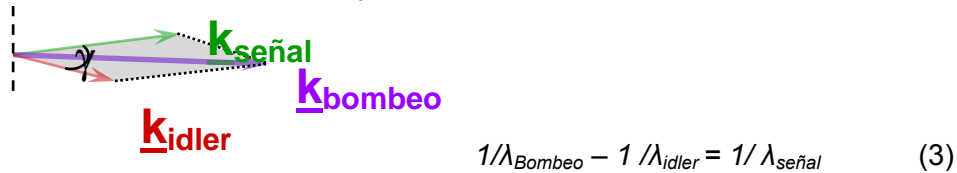
*Técnica de suma de frecuencias.* Fundamentalmente, esta técnica utiliza dos trenes de pulsos entre los cuales se establece una etapa de retraso. La diferencia del tiempo de arribo entre cada tren se obtiene de un alargamiento del camino óptico (véase la figura 5) que recorre el pulso de compuerta (para medir la fluorescencia en función del tiempo) en relación al pulso de inicio (haz azul claro) que genera los estados excitados cuya evolución nos interesa estudiar. La resolución temporal se logra con una plataforma con movimiento micrométrico (etapa de retraso figura 5), que nos da 6.7 fs de retraso para el pulso de prueba por cada micrómetro de desplazamiento.



**Figura 5.** Montaje experimental en el laboratorio de espectroscopia láser después de la etapa de amplificación regenerativa. Rojo: marca dos caminos ópticos que recorren diferentes partes del haz fundamental (770 nm con 550 mW de potencia) generados por unos separadores de haces (SH1, SH2). Azul: Camino óptico que recorre el segundo armónico ( $2\omega$  de 385 nm con 60 mW) generado en el  $\beta$ -BBO1 hasta llegar al  $\beta$ -BBO2. Azul claro: Camino óptico para el tercer armónico  $3\omega$  de 257 nm con 11 mW de potencia (fue necesario generar 265 nm para excitar a naftaleno y pireno, así como a los ciclotrifosfacenos) generado en un segundo cristal  $\beta$ -BBO2 que se utiliza como el haz de bombeo. Negro: aparece la señal de suma de frecuencias generada en el cristal  $\beta$ -BBO3 entre la fluorescencia de la muestra (verde) y el haz de prueba (rojo).

*Generación del tercer armónico.* La dificultad de generar pulsos de longitud de onda en el UV medio hace que nuestro experimento sea relevante a nivel internacional. Sin una fuente de luz UV no se podrían hacer los experimentos sobre los estados electrónicos singulete superiores de las moléculas presentadas. Para ello, se utiliza un proceso de óptica no lineal entre el haz fundamental que se suma

ópticamente con su segundo armónico ( $2\omega$ ) generado en un primer  $\beta$ -BBO1 (385 nm). El fenómeno requiere que ambos pulsos se encuentren con la misma polarización al entrar al cristal, y que además, el ángulo de incidencia sobre la cara del cristal corresponda al ángulo de ajuste de fases para ambas longitudes de onda. Este fenómeno se denomina ajuste de fases tipo 1 en un cristal uniaxial negativo como es el  $\beta$ -BBO y genera una señal correspondiente al  $3\omega$  (257 nm) con polarización perpendicular a la del fundamental y el  $2\omega$ .



**Figura 6.** Proceso de óptica no lineal para provocar la suma óptica de dos señales electromagnéticas. *Bombeo* corresponde al campo de frecuencia más alta, *signal* de frecuencia intermedia e *idler* de más baja frecuencia (en el experimento corresponde al haz fundamental).

### Polarización de la excitación de la emisión de la fluorescencia<sup>25</sup>

*Experimentos en ángulo mágico.* Este experimento se realiza cuando se quiere medir una señal de fluorescencia característica de una molécula. Para esto, se prefiere obtener un resultado que sea directamente proporcional a la intensidad total ( $I_{Total}$ ) y no un dato que sea proporcional a uno u otro componente de la polarización ( $I_{para}$  (paralelo a la polarización del haz de excitación) o  $I_{perp}$  (perpendicular al haz de excitación)). A partir de este resultado se logra obtener la evolución de la intensidad de fluorescencia de los estados excitados sin observar efectos de difusión rotacional (descritos más adelante), lo cual hace más precisas las determinaciones experimentales. Usando condiciones de ángulo mágico, se ofrece información sobre la población total de estados excitados y la evolución temporal que éstos siguen. Este experimento es el indicado para obtener los tiempos característicos de los procesos que medimos. Ampliamente, la situación de ángulo mágico corresponde a que la polarización del proceso de detección está a un ángulo de  $54.7^\circ$  respecto a la polarización del pulso de excitación. Lo anterior asegura que la distribución angular de estados excitados no se genere con alguna orientación en particular sino que sea indistinguible.

La intensidad total de una traza de la intensidad de fluorescencia en condición de ángulo mágico se puede obtener a partir de la relación:

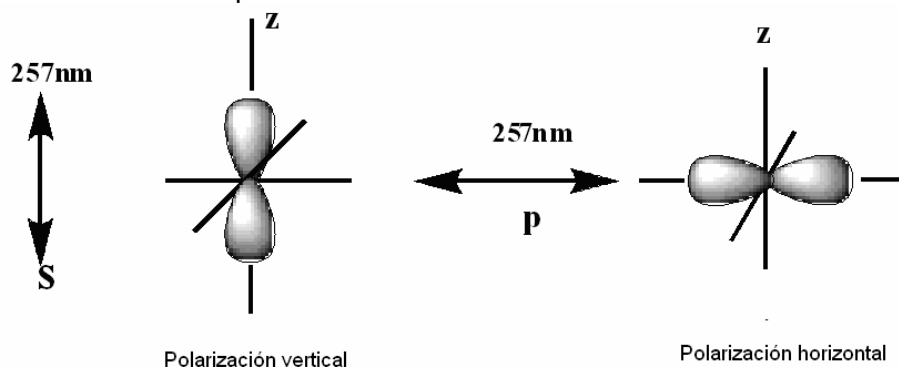
$$I_{mag}(t) = \{ I_{para}(t) + 2 I_{perp}(t) \} / 3 \quad (4)$$

donde  $I_{para}$  e  $I_{perp}$ , corresponden a la intensidad de fluorescencia con polarización paralela o perpendicular al eje de polarización del pulso de excitación.

*Experimentos que miden la anisotropía de fluorescencia.* Este análisis ofrece información adicional a los tiempos de vida de los procesos que se presentan. El experimento permite distinguir sistemáticamente la relación que existe entre el momento bipolar de transición del estado excitado y el del estado emisivo. Como ya se ha mencionado, consideramos medir la acumulación de la emisión del estado  $S_1$  resultante del proceso de Conversión Interna. Una manera de saber que en efecto la emisión que se detecta viene de  $S_1$  (después de que se generó un estado superior  $S_n$  que se convirtió en estados  $S_1$ ), es mediante la determinación de la anisotropía de la fluorescencia. Debido a que el pulso luminoso con el que se realiza la excitación está polarizado, la distribución de la orientación de los estados excitados originados (esto es, de sus momentos dipolares de transición) tiene una distribución de coseno



cuadrado alrededor del ángulo de excitación (ver figura 7). Una medida de dicha distribución es la anisotropía de la emisión.



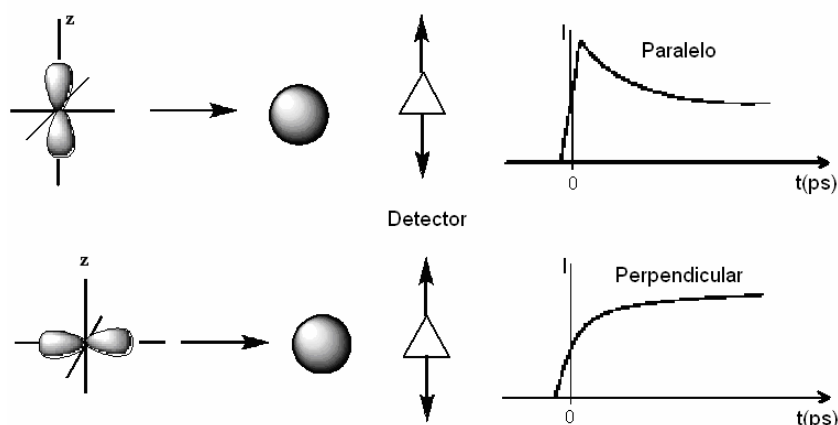
**Figura 7.** Representación de la distribución angular de los estados excitados para el experimento de anisotropía que se genera al incidir un pulso de inicio con una polarización arreglada: vertical u horizontal.

La anisotropía de una señal de fluorescencia se define como:

$$r(t) = \frac{I_{\text{para}}(t) - I_{\text{perp}}(t)}{I_{\text{para}}(t) + 2 \cdot I_{\text{perp}}(t)} \quad (5)$$

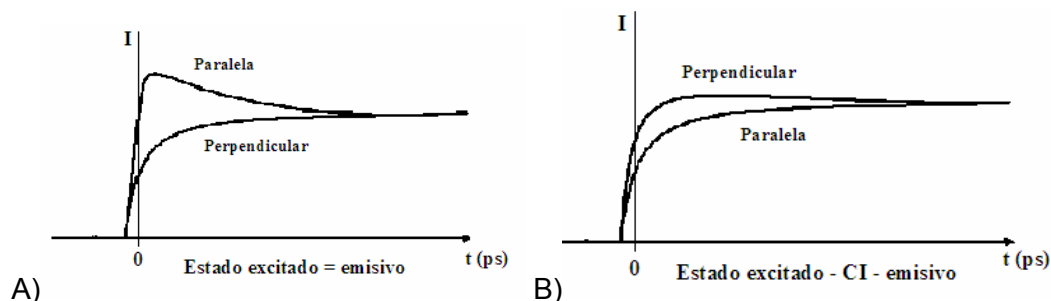
Para una muestra en solución, se sabe que el valor de  $r(t)$  es positivo cuando el momento dipolar de transición del estado emisor está paralelo al del estado formado originalmente (este es el caso de cuando se detecta la emisión del mismo estado que fue inicialmente excitado), mientras que cuando los momentos de transición de los estados originalmente formado y luego detectado, tienen una orientación a  $90^\circ$ , la anisotropía es negativa. Dicho resumidamente, gracias a que en algunos de los PAHs que se estudiaron (perileno por ejemplo), los estados  $S_n$  y  $S_1$  tienen momentos de transición perpendiculares, al detectarse el estado  $S_1$  (previa excitación a  $S_n$ ) se espera una anisotropía con un valor negativo.

El tiempo de decaimiento obtenido mediante una parametrización exponencial de la evolución de  $r(t)$ , indica qué tan rápido la población de estados pierden la anisotropía original y recuperan una distribución isotrópica en la solución. Es por esto que se observa cómo la señal en paralelo y en perpendicular tiende a un valor asintótico después de un tiempo dado.



**Figura 8.** Trazas de fluorescencia como función del tiempo esperada para el decaimiento de la anisotropía de un estado emisor después de generar una distribución angular en paralelo al detector (arriba) o perpendicular a él (abajo). Este es el caso simple en que no hay Conversión Interna.

Algo muy importante a considerar al hacer estos experimentos es que cuando el momento dipolar del estado emisor no es el mismo que el momento dipolar del estado generado con la excitación, se presenta un proceso intermedio de Conversión Interna de los momentos dipolares, por lo tanto el orden de las señales se puede invertir (es decir, la anisotropía podría ser negativa):



**Figura 9.** Comparación de las señales esperadas para el decaimiento de la anisotropía como función del tiempo (detector con orientación vertical). A) El estado emisorivo corresponde al mismo inicialmente excitado. B) Aparición de la fluorescencia, mediada por la Conversión Interna entre el estado excitado superior y el estado emisorivo

Cuando se tienen estados electrónicos puros el valor de anisotropía esperado a tiempo cero ( $r(t = 0)$ ) es de 0.4 para el caso en que el estado excitado es el mismo que el emisorivo y de -0.2 para los estados conectados por Conversión Interna con momentos de transición perpendiculares. En algunos casos en que se generan estados electrónicos mezclados (ver sección de resultados), estos valores no se alcanzan experimentalmente y la información que se puede obtener de los experimentos de polarización de la excitación de fluorescencia se vuelve limitada.

#### 4.2.- Metodología de espectroscopias de UV-Vis y Fluorescencia (estáticos)

Se hizo el estudio espectroscópico de UV -Vis en estado estacionario. Los espectros de absorción se toman en un espectrofotómetro comercial Cary 50- Bio, con corrección de línea base para el disolvente que fue metanol HPLC. El barrido del espectro de 800 – 200 nm. Esto nos sirvió para determinar las longitudes de onda ( $\lambda$ ) a las cuales serán excitados los compuestos con el pulso láser de bombeo.

Los espectros de emisión se tomaron en un espectrofotómetro Cary Eclipse. La  $\lambda$  de excitación se ajustó en el máximo de absorción de cada PAH para excitar los estados singulete superiores (intervalo 250 – 270 nm). El máximo de emisión ( $\lambda_{flu}$ ) nos sirvió para determinar (según la ecuación 3) la longitud de onda de detección ( $\lambda_{det}$ ) que hay que ajustar para monitorear el tiempo de aparición del estado  $S_1$ , el cual debe de corresponder directamente al tiempo de vida del estado  $S_n$  superior.

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### 5.1.-Los resultados para la Conversión Interna

La determinación de los tiempos de Conversión Interna está limitada por la función de respuesta inherente al experimento. La función de respuesta del experimento de suma de frecuencias es de  $600 \pm 30$  fs. Aún así es posible extraer tiempos característicos de menos de 100 fs gracias al ajuste de funciones exponenciales convolucionadas con la función de respuesta.

Para el análisis de resultados se utilizaron expresiones de cinética unimolecular para el seguimiento de la evolución temporal de los estados electrónicos excitados. Dado que durante la evolución del estado que estaremos detectando aparecerán en secuencia una serie de estados (por ejemplo, antes y después de la relajación vibracional, así como el decaimiento del estado  $S_1$ ), los datos obtenidos en el experimento de suma de frecuencias se ajustan a una función multi exponencial del tipo:

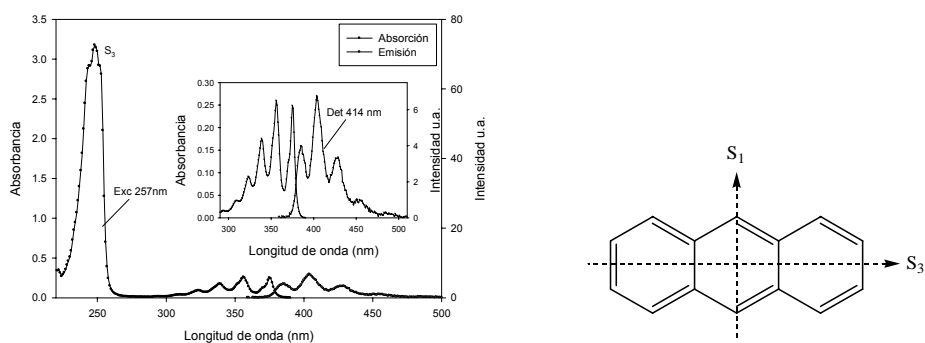
$$I(t) = A \exp(-t/b) + C \exp(-t/d) + E \exp(-t/f) \quad (6)$$

Con este ajuste se describen todos los pasos del proceso utilizando los resultados de la traza obtenida en condición de ángulo mágico, que evita los efectos de difusión rotacional provocados por tener luz polarizada. El primer término corresponde a la acumulación del estado  $S_1$  con un exceso de energía vibracional, con lo que  $b$  es el tiempo de vida del estado  $S_n$  (y  $b^{-1}$ , la constante unimolecular de Conversión Interna). El segundo término corresponde a un incremento (o disminución) en la cantidad de fluorescencia en la parte central de la banda (o a las orillas de la misma), y es debido al proceso de relajación vibracional dentro del estado  $S_1$ . Finalmente, el tercer término está asociado al tiempo de vida del estado  $S_1$  el cual decae en una escala temporal mucho mayor, del orden de nanosegundos. Todos estos procesos aparecen esquematizados más adelante en las figuras 12 y 13.

Con los resultados obtenidos se logró establecer un valor aproximado experimental que servirá para explicar cualquier evento fotoquímico en el que se involucre la Conversión Interna entre estados singulete en este tipo de moléculas.

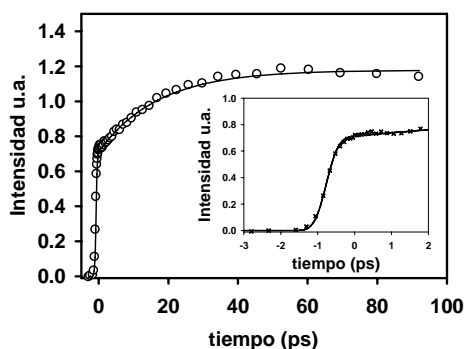
#### **RESULTADO 1. Conversión Interna de $S_3$ de antraceno**

La molécula de antraceno tiene todas sus transiciones de absorción permitidas (aparecen en la figura 10) a los estados  $S_1$ ,  $S_2$  y  $S_3$ . La transición al estado  $S_1$  presenta estructura vibracional de 385 – 330 nm y es el estado responsable de la fluorescencia que en antraceno aparece como la imagen especular de la absorción de  $S_1$ . La transición al  $S_3$  es mucho más intensa pero no se ve emisión de este estado superior (ejemplo de la regla de Kasha). El estado  $S_2$  es de absorbancia mínima y se encuentra entre las dos bandas ya mencionadas.



**Figura 10.** Espectro de absorción y emisión ( $\lambda$  excitación = 257 nm) de antraceno en metanol. En el recuadro se presenta la progresión vibracional de la transición al estado  $S_1$  y su fluorescencia igual de estructurada. En la molécula de antraceno los momentos dipolares de transición al estado  $S_1$  y  $S_3$  están orientados en el eje corto y largo respectivamente.

Cuando se excita con el haz de 257 nm (que corresponde a la transición  $S_0 \rightarrow S_3$ )<sup>26</sup>, no tenemos señal a tiempo cero, pero vemos como ésta se incrementa muy rápido debido al proceso de Conversión Interna ( $S_3 \rightarrow S_1$ ) ya que la señal corresponde al estado  $S_1$  que emite fotones de 414 nm. Esta acumulación se distingue en la gráfica interna de la figura 11. Los experimentos de la evolución de la fluorescencia obtenidos cuando la polarización de la excitación está en condición de ángulo mágico nos permitió extraer los tiempos de vida de cada proceso. Éstos se obtuvieron de hacer la parametrización sobre la evolución de la fluorescencia con una función tri-exponencial (ecuación 6).



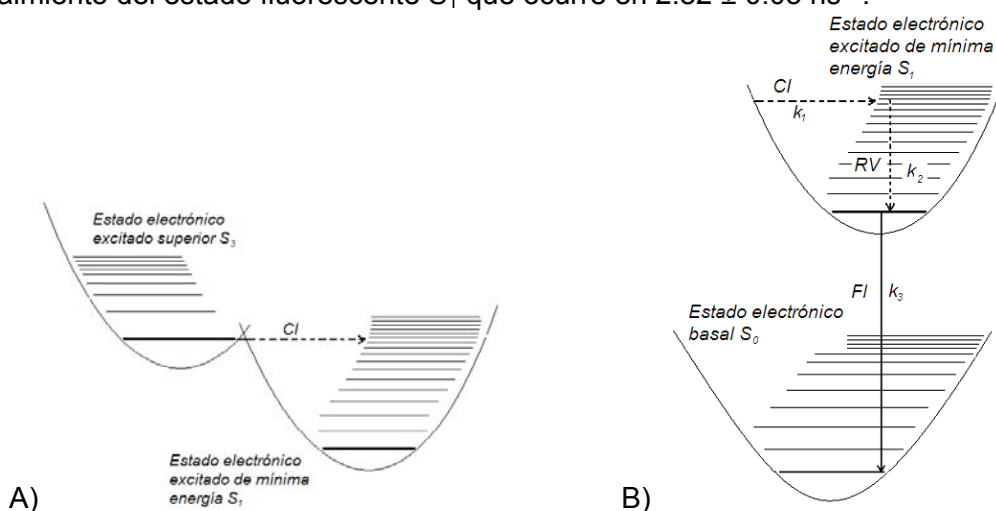
**Figura 11.** Evolución temporal de la intensidad de fluorescencia de antraceno en la condición de excitación en ángulo mágico en metanol. Detección de emisión en 414 nm. En el recuadro se muestra la evolución del proceso ultrarrápido de Conversión Interna.

El mecanismo de relajación fotofísico desde el estado excitado superior presenta varios pasos que aparecen esquematizados en la figura 12. Del ajuste tri exponencial (Ecuación 6) obtuvimos tiempos característicos para cada uno:

El tiempo de Conversión Interna se obtuvo del primer componente de la traza, un valor de  $160 \pm 20$  fs. En el recuadro de la figura 11, se tiene una expansión de la evolución ultrarrápida, donde el tiempo dado por un ajuste monoexponencial concuerda con el valor obtenido con la Ecuación 6.

El segundo incremento de señal (con pendiente menos pronunciada) se debe a la relajación vibracional dentro del estado  $S_1$  (RV), que ocurre desde todos los estados vibracionales calientes generados por la Conversión Interna hasta el de mínima energía aún en el estado  $S_1$ . El tiempo obtenido es de  $27.5 \pm 0.2$  ps.

La tercer componente presenta un cambio de pendiente el cual corresponde al decaimiento del estado fluorescente  $S_1$  que ocurre en  $2.82 \pm 0.05 \text{ ns}^{27}$ .

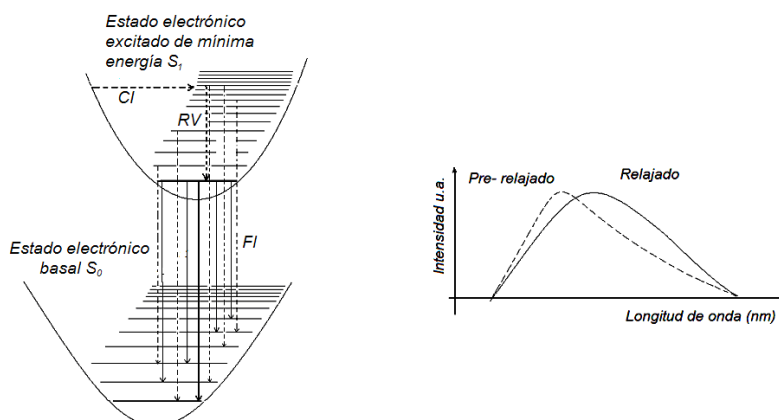


**Figura 12.** Representación del mecanismo de desactivación foto-física del estado electrónico  $S_3$  de antraceno. A) Conversión Interna (CI,  $k_1$ ). B) Relajación Vibracional (RV,  $k_2$ ) y el decaimiento desde el estado relajado de  $S_1$  (FI,  $k_3$ ) en la molécula de antraceno.

Para poder discutir los tiempos de relajación vibracional es necesario hablar del espectro de fluorescencia del estado relajado y/o pre relajado vibracionalmente<sup>28</sup> (ver figura 13) ya que dependiendo de la contribución de cada tipo de emisión veremos:

a) El perfil temporal de la fluorescencia tiene una evolución con dos aumentos de la señal previa al decaimiento de  $S_1$ , en el caso del estado relajado. Si la contribución de las emisiones desde el estado relajado es mayor que las de los pre relajados, la RV se presentará solamente como el aumento en la señal de emisión de dicho estado. Este efecto se presentó en el antraceno y perileno.

b) El perfil tiene un aumento ultrarrápido por Conversión Interna, seguido de un decaimiento rápido que se conecta con el decaimiento lento del estado  $S_1$ . Si la contribución de las emisiones desde estados pre relajados vibracionalmente es grande para la señal que estamos detectando, ésta desaparecerá rápidamente (en algunos picosegundos), y por consiguiente se verá como un decaimiento de la señal. Este efecto se presentó en fluoranteno y pireno.

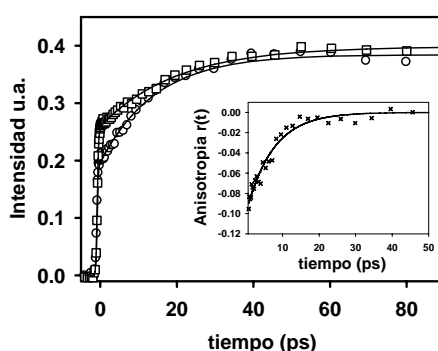


**Figura 13.** Con líneas punteadas aparecen las emisiones desde estados vibracionales superiores dentro del estado emisor  $S_1$  que conforman al espectro pre relajado. Las líneas continuas son las emisiones del estado vibracionalmente relajado del  $S_1$  que refieren al espectro relajado. Nótese que la mayoría de las líneas punteadas son de mayor tamaño que la

transición 0 – 0 (marcada con línea continua en negrita) mientras que las continuas son de menor tamaño.

El hecho de que existan transiciones desde estados vibracionales superiores (líneas punteadas) hace que en tiempos muy cortos ( $t < 1$  ps) el espectro presente un máximo de emisión centrado a longitudes de onda menores (mayor energía) y que luego de la RV, este máximo se recorra un poco hacia el rojo. Así se fundamenta perfectamente el tipo de perfil temporal que se obtienen en los experimentos de la evolución de la intensidad de fluorescencia en cada caso (segundo término exponencial).

En la figura 14 aparecen los experimentos con luz polarizada que da información sobre la anisotropía de la solución. El resultado permitió corroborar la naturaleza del momento bipolar de transición del estado excitado y del estado emisor.



**Figura 14.** Evolución temporal de la intensidad de fluorescencia de antraceno en metanol detectando en 414 nm, después de la excitación con 257 nm. La polarización de la excitación perpendicular (□, por encima) y paralela (○). En el recuadro se muestra el signo y el decaimiento de la anisotropía como función del tiempo, ajustada a una función monoexponencial:  $Y = A \exp(-t / b)$

La anisotropía a tiempo cero tiene un valor de:  $r(t = 0) = -0.1$

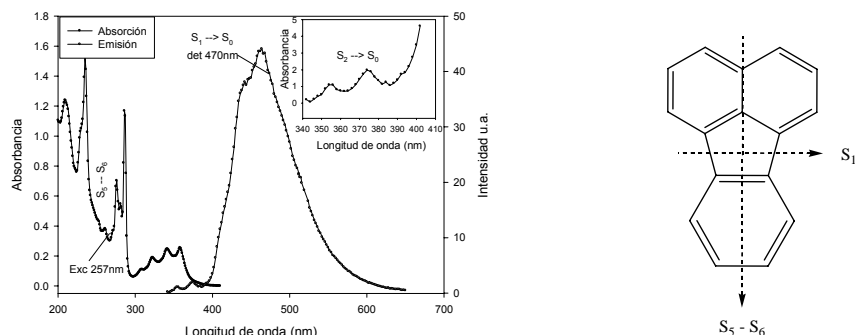
El tiempo de decaimiento de la anisotropía ocurre en  $r(t) = 8.5 \pm 0.2$  ps

La excitación de la fluorescencia en perpendicular es mayor que en paralelo ( $r(t) < 0$ ), lo cual indica que está ocurriendo una conversión del dipolo de transición del estado excitado  $S_3$  al dipolo de transición del estado emisor  $S_1$ .

## RESULTADO 2.

### Conversión Interna de un estado singlete superior ( $S_n$ ) de fluoranteno

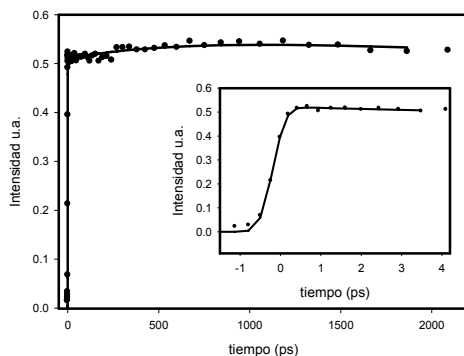
La molécula de fluoranteno tiene menor simetría y no es totalmente conjugada como otros PAH; de hecho, se parece en algunas propiedades de simetría al azuleno. Se ha reportado<sup>29,30</sup> que en fase gaseosa presenta una emisión proveniente del estado  $S_1$  pero también del  $S_2$  (se ven en la figura 15). Igual que en naftaleno la transición  $S_0 \rightarrow S_1$  está prácticamente prohibida, pero a diferencia de naftaleno este estado es altamente emisor y tiene un tiempo de vida largo.



**Figura 15.** Absorción y emisión (excitación = 257 nm) del fluoranteno en metanol. La transición al estado  $S_1$  es totalmente prohibida, no aparece en el gráfico. La excitación electrónica genera un estado desconocido superior. En el recuadro aparece la emisión de la transición  $S_2 \rightarrow S_0$  que reporta Philen<sup>29</sup>.

De nuevo, se detectó la emisión del estado  $S_1$  (figura 16) donde la velocidad de su acumulación indica el tiempo de Conversión Interna seguida de la relajación de los estado vibracionalmente excitados en  $S_1$

Ahora se presenta en la figura 16 el resultado del experimento en ángulo mágico para el fluoranteno detectando emisión de 470 nm. De este resultado se extrajeron los tiempos de cada uno de los mismos procesos descritos para antraceno en la figura 12.



**Figura 16.** Evolución temporal de la intensidad de fluorescencia de fluoranteno con excitación con 257 nm en situación de ángulo mágico. Detección 470 nm en metanol. En el recuadro se presenta el componente ultrarrápido parametrizado con una función monoexponencial.

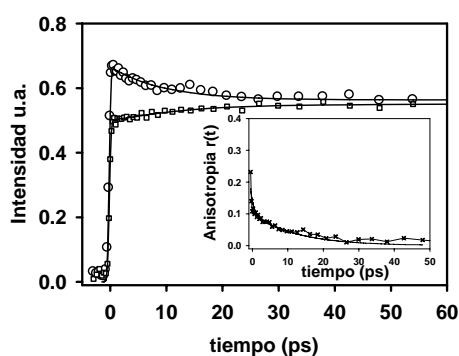
Los resultados del ajuste sobre el primer componente de acumulación de señal corresponde a la Conversión Interna del  $S_{n(\text{mezclado})} \rightarrow S_1$  que evoluciona en  $420 \pm 40$  fs.

Observando con mucho detalle el recuadro de la figura 16, se percibe que luego de la aparición de la señal por Conversión Interna, los datos y el ajuste toman la tendencia de decaer únicamente por algunos femtosegundos y después se convierte a otro decaimiento cuya pendiente corresponde al tiempo de vida del estado  $S_1$ . Apoyados en el análisis de la relajación vibracional (figuras 12 y 13) se adjudica este decaimiento mínimo pero ultrarrápido a las emisiones desde estados pre relajados que contribuyen a la señal de fluorescencia, antes de que ocurra la relajación vibracional (RV) dentro del estado  $S_1$ . El tiempo obtenido del ajuste de la relajación vibracional es de  $33 \pm 0.4$  ps.

Después de este pequeñísimo efecto, se detecta un decaimiento de la señal de emisión del estado  $S_1$  hasta los  $27 \pm 0.07$  ns.

En un futuro se propone generar la luz de excitación específica para excitar al estado  $S_2$  del fluoranteno, cuya energía de excitación corresponde a 300 nm. Hacer el experimento de fluorescencia por suma de frecuencias detectando directamente el decaimiento de este estado, el cual, llegamos a observar aún en el espectrofotómetro de fluorescencia en estado estacionario (véase recuadro de la figura 15) entre 350 y 390 nm, será importante mejorar la función de respuesta del experimento para una mejor determinación.

Para este compuesto la traza tomada con polarización paralela al detector está por encima de la traza en perpendicular (figura 17). El resultado se debe a que la excitación con 257 nm produce una sobre posición de diversos estados superiores aproximadamente  $S_5$  y  $S_6$  según Michi<sup>31</sup>, los cuales evolucionan hacia los singuletes excitados de menor energía. La acumulación de la señal del estado  $S_1$  por lo tanto, no se asigna a una conversión específica entre dos estados sino entre varios.



**Figura 17.** Evolución temporal de la intensidad de fluorescencia, monitoreada por suma de frecuencias, del fluoranteno en metanol. Detectando emisión de  $S_1$  en 470 nm, luego de la excitación con 257 nm. La polarización de la excitación de la intensidad de fluorescencia paralela ( $\circ$ ) y perpendicular ( $\square$ ). En el recuadro se muestra el signo y el decaimiento de la anisotropía.

En el recuadro de la figura 17, se presenta el valor para la anisotropía a tiempo cero  $r(t = 0) = 0.23$ . Este resultado difiere del valor esperado de 0.4 teórico, para momentos dipolares de transición paralelos, porque se está detectando un estado mezclado.

El decaimiento de la anisotropía resultó ajustarse con una función bi exponencial:

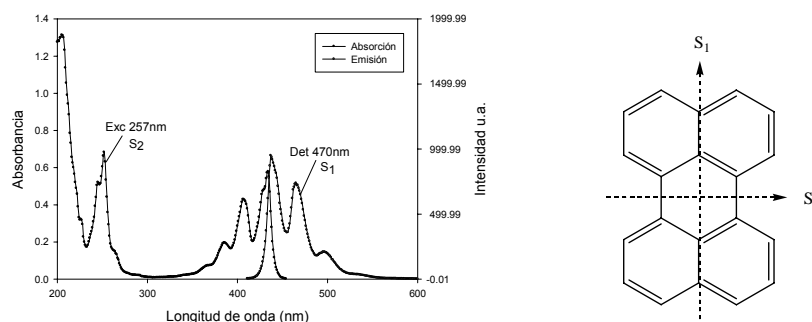
- Un componente muy rápido que puede corresponder a la solvatación del estado excitado generado, o puede tratarse también de la relajación del exceso de energía vibracional. Esto ocurre en un tiempo de  $661 \pm 80$  fs.
- El segundo componente presentó siempre el mismo tiempo de decaimiento sin importar hasta donde se hiciera el ajuste exponencial sobre los datos (se hizo el ajuste hasta los 2000 ps). El tiempo de decaimiento es de  $11.9 \pm 0.3$  ps con un coeficiente de 0.23 que concuerda con el valor de  $r(t = 0)$ . Este último tiempo se asocia a la difusión rotacional de las moléculas fluorescentes hasta recuperarse una distribución isotrópica.

Con base en los resultados del experimento de polarización de la excitación de fluorescencia nos dimos cuenta que el estado excitado inicialmente a 257 nm (sobreposición  $S_5$  con  $S_6$ ) y el dipolo del estado emisor tienen, en cierta medida, la misma orientación.



### RESULTADO 3. Conversión Interna del S<sub>2</sub> de perileno

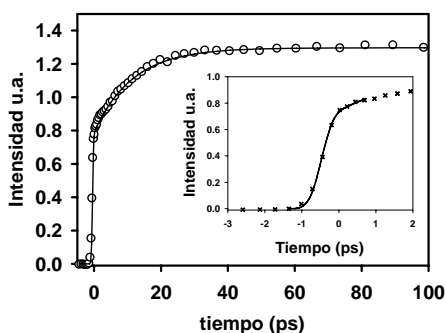
El perileno es una molécula muy utilizada en investigaciones dentro del campo de la fotoquímica debido a que presenta propiedades inusualmente ideales como su rendimiento cuántico de fluorescencia<sup>32</sup> del 93 %. Además la molécula es muy simétrica y así como el antraceno tiene las transiciones a los estados S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub> permitidas (figura 18). No obstante, a diferencia del antraceno la fuerza de oscilador de las transiciones es casi igual, esto se nota en las intensidades relativas de las bandas de absorción.



**Figura 18.** Espectro de absorción y emisión (excitación a 257 nm) en metanol de perileno. Los momentos dipolares de transición (de los estados S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub>) aparecen orientados de forma perpendicular entre sí.

La transición al estado S<sub>1</sub> presenta estructura vibracional bien definida y su fluorescencia es la imagen especular de ella. La transición S<sub>2</sub> → S<sub>0</sub> aunque es igual de probable, no se alcanza a observar en estado estacionario debido a la rapidísima Conversión Interna (Regla de Kasha).

Se decidió hacer los experimentos de suma de frecuencias con la detección en 470 nm (que se muestran en la figura 19) debido a que el máximo de emisión en 435 nm está solapado con el espectro de absorción y esto podría traer consecuencias en los resultados por efectos de reabsorción de la fluorescencia.



**Figura 19.** Decaimiento de la intensidad de fluorescencia de perileno en metanol detectando en 470 nm, después de la excitación con 257 nm con polarización en situación de ángulo mágico. En el recuadro se presenta la evolución de la Conversión Interna ajustada a una función exponencial.

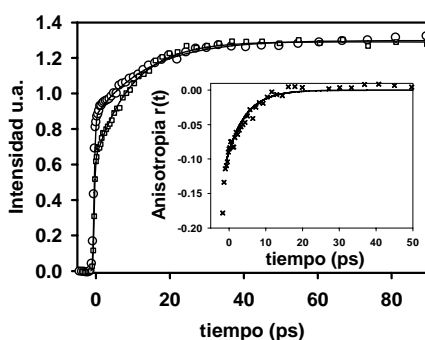
La aparición del estado S<sub>1</sub> debido a la Conversión Interna desde S<sub>2</sub> ocurre en  $190 \pm 30$  fs.

El proceso de relajación vibracional en este caso ocurre en un tiempo de  $11.7 \pm 0.5$  ps. La contribución de las transiciones pre-relajadas es baja, y principalmente estamos viendo transiciones desde el estado relajado de  $S_1$ . Finalmente el cambio de pendiente se presenta y la señal de fluorescencia se extingue en un tiempo de  $9.6 \pm 0.04$  ns.

Es de esperarse también que pueda hacerse la detección directa del estado  $S_2$  con la implementación de algunos ajustes en el experimento como son la optimización de la detección de longitudes de onda menores a 310 nm, y una mejor función de respuesta.

Debido a la alta simetría de la molécula, hacen que los momentos dipolares de transición de los estados electrónicos estén bien definidos y no se presente el problema que con fluoranteno de estados mezclados. Perileno es un ejemplo muy claro de lo que los experimentos del decaimiento de la anisotropía permiten analizar: fundamentalmente es un oblató difundiéndose rotacionalmente en un medio viscoso.

En los resultados de la evolución de la intensidad de fluorescencia con pulso polarizado de la figura 20, se observa claramente que la traza con detección perpendicular tiene mayor intensidad en tiempo cero que en paralelo. Esto permite asegurar que el estado emisor no es el que excitamos (véase recuadro figura 20, anisotropía negativa), y que en lugar de eso, estamos teniendo Conversión Interna.



**Figura 20.** Evolución temporal de la intensidad de fluorescencia de perileno en metanol detectando en 470 nm, después de la excitación con 257 nm. Polarización de la excitación perpendicular (○, por encima) y paralela (□). En el recuadro se muestra el decaimiento de la anisotropía como función del tiempo.

La anisotropía obtenida a  $t = 0$  es de signo negativo,  $r(t = 0) = -0.148$ . Este resultado está muy cercano al valor esperado  $-0.2$ . Además, concuerda muy bien con el trabajo de Knutson<sup>33,34</sup> y Phillips<sup>35</sup> quienes reportan una anisotropía de  $-0.167$  (con diferente resolución temporal). En estos trabajos afirman que hay una dependencia entre el valor de la anisotropía a tiempo cero  $r(t = 0)$  y la energía de excitación utilizada para generar al  $S_2$ . El límite de  $-0.2$  se alcanza cuando la energía de excitación utilizada concuerda con la transición  $S_0^{v=0} \rightarrow S_n^{v=0}$ . De no ser así, existen pérdidas de anisotropía por relajación vibracional (RV). Como comparación, nosotros excitamos con un exceso de energía mayor, 257 nm, que Knutson que usó 265 nm.

El decaimiento de la anisotropía es de manera biexponencial: Primero aparece un proceso que evoluciona en 125 fs, que se debe precisamente a la relajación vibracional dentro de  $S_1$  inmediatamente después de la Conversión Interna; para después aparecer un segundo componente de difusión rotacional en que la anisotropía se va a cero en cuestión de  $5.09 \pm 0.12$  ps

En la tabla 1 se presenta un resumen de los tiempos aproximados experimentales obtenidos para todo el proceso de fotodesactivación de un estado electrónico excitado superior.

	S <sub>3</sub> Antraceno	S <sub>2</sub> Perileno	S <sub>5-6</sub> Fluoranteno
Conversión Interna (CI)	160 ± 20 fs	190 ± 30 fs	420 ± 40 fs
Relajación Vibracional (RV)	27.5 ± 0.2 ps	11.7 ± 0.5 ps	33 ± 0.4 ps
Fluorescencia (FI)	2.82 ± 0.05 ns	9.6 ± 0.04 ns	27 ± 0.07 ns

**Tabla1.** Tiempos de Conversión Interna, Relajación Vibracional y Fluorescencia obtenidos de la evolución temporal de la intensidad de fluorescencia del estado S<sub>1</sub> mediante la técnica de suma de frecuencias tomados en condición de ángulo mágico para antraceno, perileno y fluoranteno.

En la tabla 2 se resumen los resultados de los experimentos de anisotropía de la señal de fluorescencia.

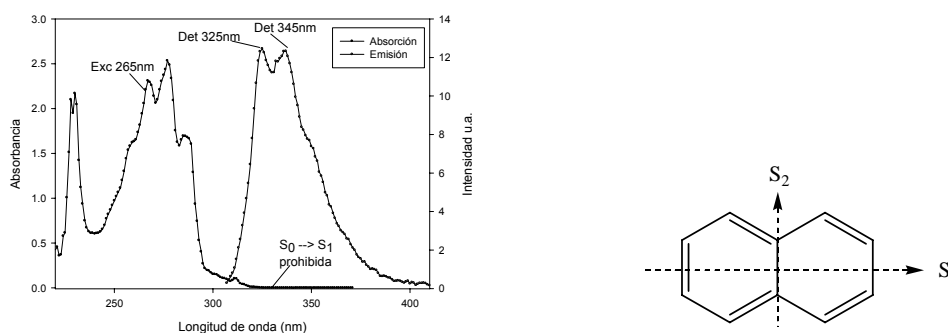
	Antraceno	Perileno	Fluoranteno
r(t=0)	-0.1	-0.148	0.231
dr(t) / dt	8.5 ± 0.2 ps	125 ± 30 fs 5.09 ± 0.12 ps	661 ± 30 fs 11.9 ± 0.3 ps

**Tabla 2.** Anisotropía de las soluciones a tiempo cero (r (t=0)), y su decaimiento como función del tiempo (dr(t)/dt) debido a la difusión rotacional de antraceno, perileno y fluoranteno excitados a un estado electrónico superior con 257 nm.

## RESULTADOS PRELIMINARES DE NAFTALENO y PIRENO

### RESULTADO 4. Conversión Interna del S<sub>2</sub> naftaleno

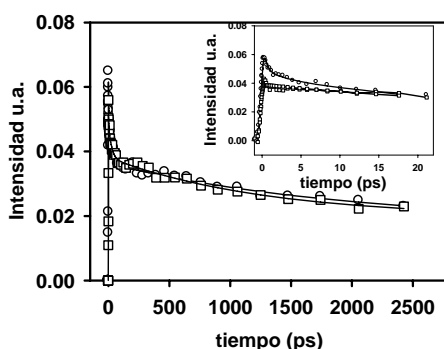
El naftaleno presenta la transición al primer estado electrónico excitado, en principio, prohibida por simetría entre el S<sub>0</sub> → S<sub>1</sub>. Sin embargo, la emisión de la molécula ocurre principalmente desde este S<sub>1</sub> con un tiempo de vida largo, pero con una proporción de fotones emitidos / unidad de tiempo muy pequeña lo que hace difícil su seguimiento con las técnicas convencionales de resolución temporal. Se ha hablado en el estudio teórico-práctico que el espectro de fluorescencia tiene emisión directa tanto del estado S<sub>2</sub> (325nm) como del S<sub>1</sub> (345 nm) que se superponen, por esto, se ven dos máximos en la emisión de la figura 21<sup>36</sup>.



**Figura 21.** Absorción y emisión (excitando a 265 nm) de naftaleno en metanol. La transición S<sub>0</sub> → S<sub>1</sub> está prohibida por simetría.

Dado que los dos estados tienen una diferencia de energía de  $940 \text{ cm}^{-1}$  se espera que la Conversión Interna sea bastante rápida debido al acoplamiento fuerte entre modos vibracionales isoenergéticos ( $S_n^{v=0} - S_1^{v \neq 0}$ )<sup>36</sup>. Pero experimentalmente ocurre un problema, la emisión de dos estados desde niveles tan parecidos de energía no permite la distinción absoluta del decaimiento de uno y la aparición del otro, en lugar de esto se obtienen señales mezcladas.

Este es el caso de nuestro experimento con detección en 325 nm que se presenta en la figura 22. El experimento de polarización de la excitación de fluorescencia muestra que la detección en paralelo está por encima de la perpendicular. Con base en ello, suponemos que el estado detectado es el mismo que se está excitando. Es poco probable que se esté logrando excitar al  $S_1$  ya que ésta transición es prohibida, y además, la energía de la transición no corresponde a la longitud de onda de excitación utilizada de 265 nm.



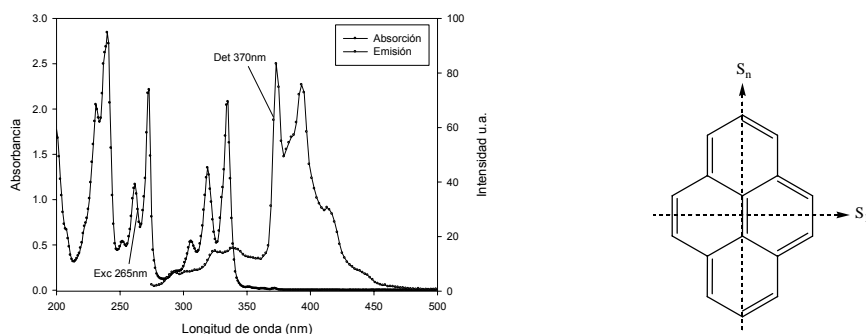
**Figura 22.** Evolución temporal de la intensidad de fluorescencia de naftaleno en metanol detectando en 325 nm después de excitar con 265 nm al nivel  $S_2$ . Señal en paralelo por encima (○) y perpendicular abajo (□). En el recuadro se presenta una ampliación solamente de los tiempos cortos para distinguir el orden de los resultados de la difusión rotacional.

La aparición de la señal ocurre en  $190 \pm 30 \text{ fs}$  que corresponde a la relajación vibracional del exceso de energía con el que se excitó el estado  $S_2$ , dicho proceso debe ocurrir mucho más rápido pero está limitada su resolución por la función de respuesta del experimento.

Después, esta relajación vibracional conduce a la población del estado  $S_2^{v=0}$  (casi isoenergética a  $S_1$ ) el cual decae de manera muy rápida por la Conversión Interna en un tiempo de  $490 \pm 40 \text{ fs}$  debido al acoplamiento vibracional con el  $S_1$ . Después la pendiente cambia y la señal continúa con un decaimiento lento en tiempos de vida de  $12.7 \pm 0.2 \text{ ns}$ . Esta señal de fondo corresponde a la emisión de 325 nm del estado  $S_1$  que se está formando y que se sobrepone a la del estado  $S_2$ .

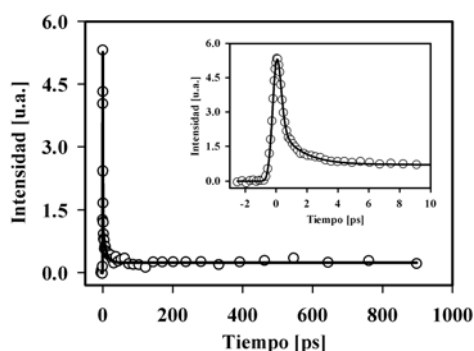
## **RESULTADO 5.** Conversión Interna de un estado sobrepuesto $S_n$ de pireno

El pireno es una molécula con alta simetría donde la primera transición está casi prohibida como en el caso de naftaleno, pero todas las demás transiciones son permitidas prácticamente con la misma magnitud. Esto último hace que las transiciones electrónicas del pireno a estados electrónicos superiores siempre se cataloguen como estados mezclados (ver figura 23).



**Figura 23.** Espectro de absorción y emisión (excitando a 265 nm) de pireno en metanol.

Debido a que los estados excitados superiores de pireno son de naturaleza mezclada se espera un resultado poco usual del experimento de polarización de la excitación de fluorescencia. Se hizo el experimento con excitación a una longitud de onda ( $\lambda = 265$  nm) únicamente en ángulo mágico, (figura 24). Según lo reportado por Fiebig<sup>6</sup> excitamos al estado  $S_6$  de pireno.



**Figura 24.** Evolución temporal de la fluorescencia de pireno en metanol, excitando con polarización en situación de ángulo mágico. Detección en 370 nm.

El resultado muestra un proceso de desactivación con 3 componentes a partir del ajuste con la Ecuación 6.

El primer componente corresponde al decaimiento del estado  $S_2$  que emite fotones de 370 nm debido a la transición  $S_2^{v=0} \rightarrow S_0^{v \neq 0}$  pero que decae en cuestión de  $134 \pm 30$  fs debido a la Conversión Interna de  $S_2 \rightarrow S_1$ .

Como segundo componente en este decaimiento se identificó un proceso que ocurre en  $1.07 \pm 0.5$  ps que provoca un cambio en la pendiente del decaimiento ultrarrápido y lleva la traza hacia la evolución suave y lenta del estado  $S_1$ . El proceso se reconoce como la relajación vibracional de los estados vibracionalmente excitados de  $S_1^{v \neq 0} \rightarrow S_1^{v=0}$  generados inmediatamente después de la Conversión Interna.

No obstante, se sabe que la parte azul del espectro de emisión del estado  $S_1$  de pireno también está identificado por emitir fotones de 370 nm, pero presenta un tiempo de vida de  $347 \pm 0.06$  ns<sup>37</sup>. Éste corresponde a la señal a tiempos largos de la figura 24.

El hecho de que existan dos estados que presentan emisión en la misma longitud de onda de detección (370 nm) hace que los perfiles del decaimiento sea complejo, y que haya señales de fondo que llegan a vivir siempre lo que vive el estado  $S_1$  de la molécula que se esté estudiando. Este trabajo debe ser complementado con el

experimento de polarización de la excitación una vez que se tenga la fuente de excitación de 265 nm.

Resumen de los experimentos preliminares hechos sobre naftaleno y pireno en metanol:

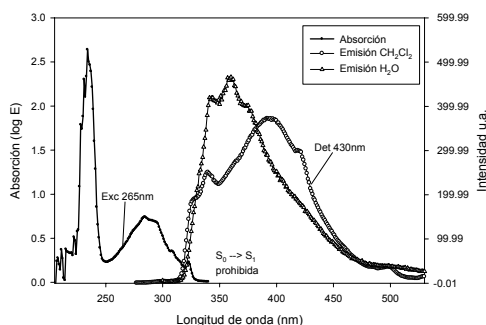
	Naftaleno	Pireno
Conversión Interna (CI)	490 ± 40 fs	134 ± 30 fs
Relajación Vibracional (RV)	----	1.07 ± 0.5 ps
Fluorescencia (FI)	12.7 ± 0.02 ns	347 ± 0.06 ns

**Tabla 3.** Aparecen los tiempos obtenidos para cada proceso de fotodesactivación del estado electrónico excitado inicialmente en las moléculas de naftaleno y pireno. ----: no fue posible determinarlo debido a que los estados singulete se encuentran muy próximos en energía.

### 5.2.- Resultados Preliminares sobre la Formación de Excímeros

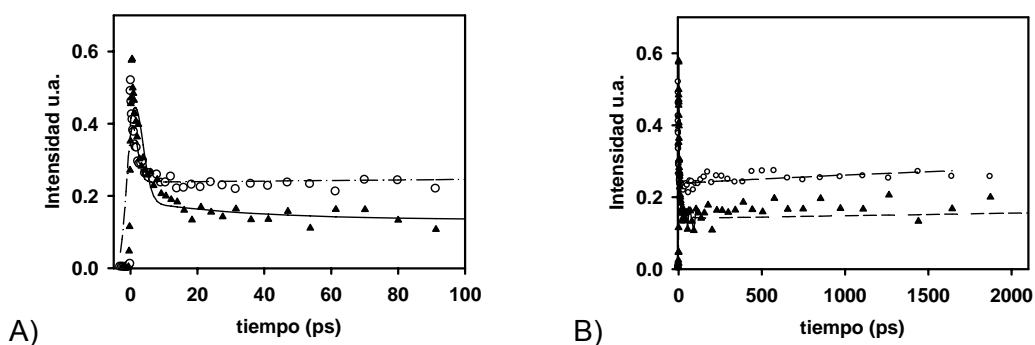
En el espectro de emisión de los derivados de ciclotrifosfacenos (CTP) con  $\alpha$ - y  $\beta$ -naftol, aparece una banda ancha y sin estructura vibracional (figura 3) que generalmente indica la formación de un excímero. La emisión de un excímero se encuentra corrida hacia longitudes de onda mayores debido a que la energía de excitación electrónica inicial sobre el monómero está ahora deslocalizada en los dos cromóforos. En esta molécula además de verse la emisión del excímero centrada en 470 nm, se alcanza a apreciar una parte de emisión del monómero de naftaleno (identificados como el doblete con máximos en 325 nm y 345 nm, de la figura 21).

Lo interesante de la emisión es que es fuertemente dependiente a la polaridad del disolvente (como se ve en la figura 25). En agua, la emisión de monómero es relativamente mayor que la del excímero, mientras que en diclorometano se ve cómo el solapamiento de la banda ancha es casi total sobre la emisión del naftaleno.



**Figura 25.** Se presenta el espectro de absorción del CTP- $\beta$  donde la transición  $S_0 \rightarrow S_1$  está prohibida en naftol. Espectros de emisión excitando en 265 nm en dos disolventes diferentes, agua ( $\Delta$ ) y diclorometano ( $\circ$ ).

Los resultados de la figura 26 presentan una dinámica significativamente más compleja que la esperada para la acumulación de una especie emisiva, particularmente la del excímero de naftaleno.



**Figura 26.** Evolución temporal de la intensidad de fluorescencia de los derivados de CTP detectando en 430 nm en diclorometano. Con  $\beta$ -naftol ( $\circ$ ) y con  $\alpha$ -naftol ( $\blacktriangle$ ). Ajuste de la evolución del decaimiento con la ecuación 6:  $I(t) = A \exp(-t/b) + C \exp(-t/d) + E \exp(-t/f)$ . Para los tiempos de evolución cortos (A) y la traza completa (B).

La señal detectada se enciende de inmediato en  $t = 0$  que posteriormente decae de manera exponencial en  $3.09 \pm 0.3$  ps (figura 26A). Decae hasta la mitad del total de la intensidad. Este decaimiento en ambos derivados de CTP con  $\beta$ -naftol y  $\alpha$ -naftol es igual.

Luego hay un cambio de signo en la pendiente (figura 26B), comienza a subir la señal lentamente como se esperaba para el excímero. Alrededor de los 500 ps deja de acumularse y vuelve a cambiar de signo para un tercer proceso el cual debe corresponder al decaimiento del excímero.

Si observamos el decaimiento de algún CTP y el del naftaleno solo, en los primeros ps de la traza ambos se ajustan con una función mono exponencial, y se ve un comportamiento bastante similar entre ellas por lo que podría proponer que este decaimiento inicial se da por la desactivación del estado excitado de naftaleno previo a la formación del excímero, el cual tarda un tiempo dado (no resuelto) en formarse.

La idea inicial que se planteó al desarrollar estos compuestos fue la de observar con nuestra resolución temporal como iba a ir acumulándose la señal de fluorescencia del excímero pero sin depender de la difusión molecular que generalmente rige la formación de un excímero en solución, porque en este caso los cromóforos están preferentemente orientados y a distancias muy cortas dentro de la molécula. También se pensó que podríamos distinguir una diferencia en los tiempos de formación entre ambos derivados debido a que hay un acomodo diferente de los sustituyentes.

Esta parte del proyecto requiere de experimentos adicionales a otras longitudes de onda de detección y de excitación.

## 6 CONCLUSIONES

---

### 6.1.- Conclusiones Conversión Interna y Anisotropía

El valor experimental aproximado determinado para las constantes del proceso de Conversión Interna y de relajación vibracional, está íntimamente ligado a la diferencia de energías entre los estados singulete involucrados en cada uno de los PAHs estudiados. Fluoranteno es quien presenta los resultados más particulares, debido a que su baja simetría y falta de estructura conjugada hacen que sus niveles de energía se alejen más que en los otros 4 casos analizados (antraceno, perileno, naftaleno y pireno).

Alguien interesado en diseñar un sistema que transfiera energía desde un estado electrónico excitado superior utilizando alguno de nuestros compuestos (PAHs) como antenas colectoras de luz, deberá lograr que la velocidad con la que se da la transferencia de energía compita con los cientos de femtosegundos aquí reportados para el proceso de Conversión Interna, de no ser así, se espera que la eficiencia de la transferencia sea baja.

Los datos experimentales obtenidos podrán utilizarse para soportar cálculos químico- cuánticos relacionados al proceso de Conversión Interna en moléculas PAHs.

La detección directa del decaimiento de los estados superiores tuvo sus limitantes a lo largo de este trabajo. Queda abierto en este punto como tema de investigación para el grupo de investigación.

Las anisotropías negativas son un ejemplo poco usual de un experimento de éste tipo.

En antraceno y perileno tenemos claramente una Conversión Interna entre estados con momentos dipolares de transición con orientación perpendicular entre ellos.

El estado electrónico superior ( $S_5 - S_6$ ) mezclado de fluoranteno que se excita con 265 nm posee una orientación preferencial en el eje corto de la molécula que es el mismo del estado  $S_1$  emisivo.

El valor de la anisotropía a tiempo cero depende de la energía con la que se excite al cromóforo. Esto se debe a que cuando una molécula es llevada a estados electrónicos excitados superiores su reactividad se altera, y puede presentar procesos alternos a la Conversión Interna de  $S_n \rightarrow S_1$  como reacciones químicas fotoinducidas, emisión del estado superior o Conversiones Internas a  $S_0$  que compiten con el proceso de emisión de  $S_1$  detectado en el experimento.

#### Experimentos preliminares

En el caso de naftaleno, creemos tener detectada la emisión directa desde el estado  $S_2$ , pero resultó estar mezclado con el  $S_1$  por la tan pequeña diferencia de energía entre los dos estados singulete.

El pireno presenta un decaimiento de señal de fluorescencia mezclada correspondiente a dos estados que emiten fotones de 370 nm.



Es posible detectar con el diseño de nuestro experimento la emisión típica de un excímero de naftaleno por lo que será factible resolverlo temporalmente en cuanto se cuente nuevamente con la fuente de luz de bombeo de 265 nm

Aunque en tiempos cortos no tenemos certeza de lo que provoca esos decaimientos resultados, el incremento de señal después de esta etapa hace pensar que ésta es la acumulación lenta del excímero.

Se observó el efecto de estados emisivos sobrepuestos, que son el monómero mismo de naftaleno (del lado rojo del espectro) y la emisión del excímero (del lado azul del espectro). Lo indicado será recorrer la longitud de onda de detección a donde nos aseguremos que no pueda haber la más mínima emisión del monómero y aún se alcance a detectar el excímero. Entonces podremos resolver en tiempo la formación del excímero.

## REFERENCIAS

- 1.-Femtochemistry: Atomic-scale dynamics of the chemical bond. Ahmed Zewail. *J. Phys. Chem. A* **2000**. Vol 104, 5660-5694.
- 2.-DNA/RNA nucleotides and nucleosides: direct measurement of excited-state lifetimes by femtosecond fluorescence up-conversion Jorge Peon, Ahmed Zewail. *Chem. Phys. Lett.* **2001**. Vol 348, Issues 3-4, 255-262.
- 3.-Photochemical applications of femtosecond time-resolved transient absorption spectroscopy. Foggì. *Int. J. of Photoenergy*. **2001**. Vol 3. 103-109.
- 4.-Femtosecond relaxation processes from a higher excited electronic state of Coumarin481. Keitaro Yoshihara. *Chem. Phys. Lett.* **1998**. Vol 287. 29-34.
- 5.-Ultrafast dynamics of carotenoid excited states. Polívka & Sundström. *Chem. Rev.* **2004**. Vol 104. 2021-2071.
- 6.-Excited state mixing in pyrene derivatives. Femtosecond broad-band probe spectroscopy. T. Fiebig. *J. Phys. Chem A* **2003**. Vol 107. 4592-4600.
- 7.-Molecular machines and devices. Balzani. **2003**. VCH publishers.
- 8.-Pigment organization and energy level structure in light harvesting complex 4: Two dimensional electronic spectroscopy. G. Fleming. *J. Phys. Chem. B.* **2009**. Vol 113. 6495-6504.
- 9.-Ultrafast photophysics and photochemistry of Ni bacteriochlorophyll a. Peter Florian. *J. Phys. Chem. B.* **1999**. Vol 103 (33). 7055-7060.
- 10.-Excited State Dynamics and Photochemistry in Organic Molecules. Klessinger. 1995 VCH publishers.
- 11.-Establishment of Kasha's rule. *Pure & Applied Chemistry*. **1996**. Vol 1, 371-380.
- 12.-Fluorescence from S<sub>2</sub> in azulene molecule. M. Beer. *J. Chem. Phys.* **1955**. Vol 23. 1390-1397.
- 13.-Dynamics of azulene S<sub>2</sub> by fs transient absorption. Remigio Salvi. *J. Photochem. Photobiol., A.* **1997**. Vol 105. 129-134.
- 14.-Tetrapyrrole singlet excited states quenching by carotenoids in an artificial photosynthetic antenna. Devens Gust. *J. Phys. Chem. B.* **2006**. Vol 110. 25411-25420.
- 15.-Sub-20 fs temporal resolution for the study of energy transfer processes in photosynthesis. Giulio Cerullo. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2007**. Vol 6, 135-144.
- 16.-Pump-Probe spectroscopy with sub 10-fs resolution for probing Internal Conversion in carotenoids. S. de Silvestri. *Chem. Phys.* **2008**. Vol 350. 45-55.
- 17.-Internal Conversion in β-Carotene: Strong vibronic coupling J. Luis Pérez-Lustres. *Angew Chem. Int. Ed. Communications Femtochemistry*. **2007**. Vol 46, 3758-3761.
- 18.-Direct proof for energy-level crossing in photoexcited lutein and β-carotene. Evgyny Oustromov. *Phys. Rev. Lett.* **2009**. Vol 103 (10). 108302(4)
- 19.- A Blob model to study chain folding by fluorescence. A. Mathew, J. Duhamel. *Macromolecules* **1999**. Vol 32. 7100-7108.
- 20.- Side-Chain dynamics of an α-helical polypeptide monitored by fluorescence. J. Duhamel. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 12810-12822.
- 21.-Essentials of Molecular Photochemistry. Baggot. 3<sup>rd</sup> Ed. 1998. CRCpress. Capitulo 7,8.
- 22.-Synthesis and structure of phosphazene rings bearing ariloxy side groups. Harry Allcock *J. Chem Soc. Dalton Trans* **1995**. Iss 1. 3521-3533.
- 23.-Photophysical studies on multichromophoric cyclotriphosphazenes. Trinuclear excimer formation. Chattopadhyay. *Tetrahedron Letters*. **2005**. Vol 46. 3089-3092.
- 24.-Kerr-lens mode-locking of a flashlamp-pumped Nd:YAG laser. Jiaxian. *Optics & LASER Technology*. **2000**. Vol 32. 277-279.
- 25.-Principles of Fluorescence Spectroscopy. Lakowicz. 3<sup>rd</sup> Edition. 2004. Springer. Capítulos: 9, 10, 11, 12.

- 26.-Electronic spectrum of anthracene: Ab Initio molecular orbital calculations. Sason Shaik. *J. Phys. Chem.* **1995**. Vol 99. 16558-16565.
- 27.-Viscosity and temperature dependence of fluorescence lifetimes of anthracene. L. Gigghino. *J. Phys. Chem* **1981**. Vol 85. 2810-2816
- 28.-Ultrashort vibronic and thermal relaxation of dye molecules after femtosecond UV excitation. T. Elsaesser, W. Kaiser. *Chem. Phys. Lett.* **1989**. Vol 156, Iss 4. 381 – 386.
- 29.-S<sub>1</sub> & S<sub>2</sub> fluorescence of fluoranthene. Philen. *Chem. Phys. Lett.* **1976**. Vol 43, Iss 2. 358-361.
- 30.-Dual fluorescence of fluoranthene in vapor phase. M. Forcé. *J. Phys. Chem.* **1989**. Vol 93. 7985-7988.
- 31.-Electronic properties of fluoranthene excited states. J.Michl. *J. Mol.Spectrosc.***1970**. Vol 30. 66 – 79.
- 32.-Dependence of photophysical properties on orbital nature of catacondensed PAH`s. Nijegorodov *Spectrochimica Acta part A.* **1997**. Vol 53. 2013-2022 .
- 33.-Femtosecond fluorescence UpConversion of rotations of perylene in Hexadecane. Jay R. Knutson. *J. Phys. Chem A.* **2003**. Vol 107. 8383 – 8394,
- 34.-Molecular Dynamics simulations of Perylene Librations comparison with fs. Jay R. Knutson. *J. Phys. Chem A.* **2008**. Vol 112. 5593-5597.
- 35.-Time resolved fluorescence anisotropy of perylene. Phillips. *J.Phys.Chem.* **1986**. Vol 90. 5960-5967.
- 36.-Dependence of absorption, fluorescence CI, ES in ring number in PAH`s. Nijegorodov. *Spechtrochimica Acta part A.* **1997**. Vol 53. 1813-1824.
- 37.-Solvent dependence of fluorescence lifetimes in perylene. J. Wilkinson. *J. Phys.Chem. A.* **2000**. Vol 104. No 24. 379 – 388.