



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ANÁLISIS DE PIGMENTOS ROJIZOS EN FORMULACIONES ACRÍLICAS POR
RECUENTO DE FOTONES INDIVIDUALES CORRELACIONADOS EN TIEMPO Y
ANISOTROPÍA DE FLUORESCENCIA

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. ANDREA JULETSY CADENA CAICEDO

DR. JORGE PEÓN PERALTA
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE DE 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**ANÁLISIS DE PIGMENTOS ROJIZOS EN FORMULACIONES ACRÍLICAS POR
RECuento DE FOTONES INDIVIDUALES CORRELACIONADOS EN TIEMPO
Y ANISOTROPÍA DE FLUORESCENCIA**

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. ANDREA JULETSY CADENA CAICEDO

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



Ciudad de México, septiembre del 2022

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dra. Alicia Negrón Mendoza

Vocal: Dr. José Ignacio Jiménez Mier y Terán

Vocal: Dra. Nora Ariadna Pérez Castellanos

Vocal: Dr. Gabriel Ramos Ortiz

Secretario: Dra. Nuria Esturau Escofet



Andrea Juletsy Cadena Caicedo
Sustentante



Dr. Jorge Peón Peralta
Tutor

*Dedicado a mi padre †Luis Gabriel Cadena(1962-2021)
quien desde otro plano me sigue acompañando
en este camino, y me enseñó
que se debe volar alto,
volar sin miedo
¡TE AMA, TU MARIE!*

*“...Confieso que me haces tanta falta
Para decirme: “todo va a estar bien”
Para escucharme con una guitarra
Sentado con tu taza de café...”
Encarnita García*

AGRADECIMIENTOS

A mi gran motor: MI FAMILIA. A mi madre María Elsa Caicedo, mi padre †Luis Gabriel Cadena, mi hermano Gabriel Fernando Cadena Caicedo y mi hermana de la vida Tatiana Vásquez Sáenz. Gracias por su amor infinito y apoyo SIEMPRE.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Instituto de Química y al Posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas por abrirme las puertas y permitir forjar mis conocimientos.

Al Doctor Jorge Peón Peralta, por permitirme hacer parte de su grupo de investigación, por ser parte de este proceso académico, por sus aportes, por su paciencia y por su gran apoyo a lo largo de estos años.

A los miembros del comité tutor: Dr. José Ignacio Jiménez Mier y Terán y Dr. José Guadalupe López Cortés por sus valiosos aportes en este proyecto.

A mis compañeros Espectroscopistas y sintéticos Emanuel García, Francisco Reza, Melissa Bravo, Mario González, Mariana Mejía, Óscar Guzmán, Jesús Durán y Bernardo Salcido por los días de conocimiento, risas, chistes y frustración. ¡Los quiero y los llevo en mi corazón amikes!

A los miembros del jurado: Dra. Alicia Negrón, Mendoza, Dr. José Ignacio Jiménez Mier y Terán, Dra. Nora Ariadna Pérez Castellanos, Dr. Gabriel Ramos Ortiz y Dra. Nuria Esturau Escofet por la revisión de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por el proyecto 285722 y la beca otorgada en mis estudios de doctorado (CVU: 739006).

A Fronteras de la Ciencia 2019–51496 y PAPIIT/DGAPA/ UNAM IG200621 por el apoyo financiero.

A DGTIC-UNAM y el proyecto LANCAD-UNAM-DGTIC-210 por el tiempo de computación.

A mis amigos, Karol Carrillo, Camila Rodríguez, Daniela Campiño, Lorena Duarte, Katerine Gualteros, Jazne Grillo, Geraldine Zaes, Julián Enciso, Jesús Durán, Óscar Guzmán,

Sebastián Rocha, Lina Bolívar, Sebastián Arenas, Reinaldo Pabón, Nathalia Delgado, Edison Huertas, Elizabeth Ayala, Erika Vera, Sirley Plata, Evelyn Quiroz, Alma Bustamante, Alain Oros, Abraham Madariaga, Claudia Villamizar, Edith Leal, Víctor Aristizábal, Andrés Marmolejo, Fernando Holguin y Ana Yáñez, parceros que han estado SIEMPRE, en las buenas, en las malas y peores. Los adoro.

Al laboratorio de Espectrometría de Masas LEM y al Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural del Instituto de Química de la UNAM.

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Espectroscopía Láser ubicado en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutoría del Dr. Jorge Peón Peralta.

El artículo derivado del proyecto:

Cadena-Caicedo, A.; González-Gutiérrez, M.; Guzmán-Méndez, O.; M. Reza, M.; Durán-Hernández, J.; Peon, J. *Time-resolved fluorescence and anisotropy studies of red pigments present in acrylic formulations*. Journal of Luminescence 2022, 248, 118913.

Los artículos derivados de la estancia doctoral son:

Cadena-Caicedo, A.; Gonzalez-Cano, B.; Lopez-Arteaga, R.; Esturau-Escofet, N.; Peon, J. *Ultrafast Fluorescence Signals from NADH: Resonant Energy Transfer in the Folded and Unfolded Forms*. J. Phys. Chem. B 2020, 124, 519–530.

Durán-Hernández, J.; Muñoz-Rugeles, L.; Guzmán-Méndez, O.; M Reza, M.; Cadena-Caicedo, A.; García-Montalvo, V.; Peon, J. *Sensitization of Nd³⁺ Luminescence by Simultaneous Two-Photon Excitation through a Coordinating Polymethinic Antenna*. J. Phys. Chem. A 2022, 126, 16, 2498–2510.

Los resultados del proyecto de investigación se presentaron en:

Simposio interno del Instituto de Química de la UNAM en el año 2020

RESUMEN

Desde el siglo XX, las pinturas acrílicas que incluyen pigmentos orgánicos han sido constituyentes en la paleta de un artista. La identificación de estos pigmentos orgánicos en obras de arte no es un objetivo fácil, y muchos investigadores dedicados a estudios de restauración y conservación se enfrentan a los problemas de extracción de muestras para el respectivo análisis. Es por ello, y con el fin de proporcionar una contribución significativa en la identificación de los pigmentos, que la presente investigación describe las propiedades de emisión de las moléculas, basadas en la técnica de conteo de fotones individuales correlacionados en tiempo (TCSPC). Esta técnica combinada con el registro de espectros de fluorescencia en estado estacionario, aumentan considerablemente el potencial de las técnicas de emisión para los fines de la mencionada identificación, empleando muestras microscópicas como requerimiento para obras de arte y patrimonio cultural.

Para la ejecución de la técnica de TCSPC y con la finalidad de proporcionar sensibilidad y precisión, se ha diseñado un arreglo óptico a partir de un montaje tipo confocal que incluye una gran variedad de lentes y espejos. Es importante enfatizar que el montaje diseñado garantiza altas concentraciones de las moléculas en volúmenes de solución pequeños, asegurando la caracterización precisa de los pigmentos gracias a las lentes del objetivo de alta apertura numérica que recolecta los fotones emitidos por la muestra, y que son capturados por detectores de sincronización precisa y excelente e inigualable sensibilidad.

El presente estudio se realizó con el fin de conocer el potencial de la técnica resuelta en tiempo TCSPC para identificar los pigmentos orgánicos usados en las pinturas acrílicas empleadas en obras de arte. Se estudiaron dos clases de pigmentos orgánicos, quinacridonas y perilenos. Estas sustancias se estudiaron en estado puro y también, resultado de extracciones de diversas formulaciones acrílicas. En primera estancia, los decaimientos de emisión de fluorescencia de los pigmentos fueron determinados a partir de un ajuste de tiempo completo y solventando problemas de solubilidad parcial o evaporación por un ajuste de mezcla de disolventes. Una vez identificado el tiempo característico de cada uno, se estableció el límite del tamaño de muestra extraído donde fue posible identificar el pigmento. Soluciones de muestras de tamaños milimétricos, extracciones micrométricas con aguja y con micro-hisopos fueron las estudiadas y medidas para este objetivo.

Adicionalmente, con base en conocer otra forma de identificación de los pigmentos a partir de la técnica TCSPC, se tomaron mediciones de Anisotropía de Fluorescencia resuelta en tiempo, usando el mismo montaje óptico. A partir de los resultados, se determinó como influye la viscosidad de la solución en el valor del tiempo de difusión y cómo se comporta hidrodinámicamente la molécula dentro del disolvente.

Finalmente, los análisis por las diferentes técnicas demostraron que las características emisivas de los pigmentos podrían usarse con éxito en la identificación de estos. Además, de generar alternativas que den solución a los desafíos durante el proceso sistemático de identificación y detección. Desafíos que incluyen extracción de muestra, reproducibilidad de datos y similitud de tiempos de vida de fluorescencia de los pigmentos. Todo lo anterior con el fin de proporcionar una valiosa herramienta en el proceso de restauración y conservación de patrimonio cultural.

LISTA DE ACRÓNIMOS

NA	Apertura Numérica (Numerical Aperture)
APDs	Fotodiodos de Avalancha (Avalanche Photodiodes)
Y	Yeso
FB	Fibro cemento
CG	Cemento Gris
CB	Cemento Blanco
M	Molar
mg	Miligramo
TCSPC	Conteo de fotones individuales correlacionados en tiempo (Time-Correlated Single Photon Counting)
μm	Micrómetro
μL	Micro litro
TD-DFT	Teoría del Funcional de la densidad tiempo-dependiente (Time-Dependent Density Functional Theory)
DART	Análisis Directo en Tiempo Real (Direct Analysis in Real Time)
RMN- ^1H	Resonancia Magnética Nuclear-Protón
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography)
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
SERS	Espectroscopia Raman mejorada en la superficie (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy)
LIF	Fluorescencia inducida por láser
Py-GC	Pirólisis- Cromatografía de gases
nm	Nanómetro
E_B	Energía del estado basal
E_F	Energía del estado final
S	Estado electrónico singulete

T	Estado electrónico triplete
P	Pigmento
P^*	Pigmento excitado
s	Segundos
IRF	Función de respuesta del instrumento (Instrument Response Function)
τ	Tiempo de vida de fluorescencia
ns	Nanosegundos
ps	Picosegundos
τ_P	Tiempo de vida de fluorescencia del pigmento
τ_{rot}	Tiempo de relajación rotacional
k_{rad}	Constante radiativa
k_T	Constante total
k_{CES}	Constante de cruce entre sistemas
k_{CI}	Constante de conversión interna
k_{RV}	Constante de relajación vibracional
k_{nrad}	Constante no radiativa
$\tau_{hydrody}$	Contribución hidrodinámica
τ_{rot}	Tiempo de relajación rotacional
λ_{max}	Longitud de onda máxima
K	Kelvin
ppm	Partes por millón
mL	Mililitros
mm	Milímetros
g	Gramos
PCM	Módulo continuo polarizable (Polarizable continuum model)
dm	Decímetro
DMSO	Dimetilsulfóxido
ASTM	American Society for Testing and Materials

SED	Stokes-Einstein-Debye
°C	Centígrado
Hz	Hercio
d	Doblete
t	Triplete
δ	Desplazamiento químico
χ^2	Prueba de chi cuadrado

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	14
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo Principal	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3. ANTECEDENTES	20
4. MARCO TEÓRICO	27
4.1. Interacción luz-materia.....	27
4.2. Procesos de desactivación de los estados excitados	30
4.2.1. Procesos no radiativos	32
4.2.2. Procesos radiativos	33
4.3. Espectroscopia de estado estacionario	34
4.3.1. Espectroscopia de absorción, emisión y excitación	34
4.3.2. Parámetros esenciales en procesos de absorción-emisión.....	37
4.4. Espectroscopia resuelta en tiempo	42
4.4.1. Técnica de recuento de fotones individuales correlacionados en tiempo-TCSPC	44
4.4.2. Anisotropía de Fluorescencia	57
5. METODOLOGÍA	63
5.1. Pigmentos, formulaciones acrílicas y reactivos	63
5.2. Técnicas que brindan información sobre la naturaleza molecular de los pigmentos	64
5.2.1. RMN- ¹ H	64
5.2.2. DART	65
5.3. Preparación de muestras	65
5.3.1. Muestras acrílicas	65
5.3.2. Sustratos	65
5.4. Espectroscopia de estado estacionario	67
5.5. Espectroscopia resuelta en tiempo	68
5.5.1. TCSPC.....	68
5.5.2. Anisotropía de Fluorescencia	70
5.6. Cálculos computacionales	72
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
6.1. Espectroscopia de estado estacionario	74

6.2. TCSPC.....	78
6.2.1. Tiempos de vida de característicos de los pigmentos puros por TCSPC	78
6.2.2. Grado de dilución en el que se puede identificar el tiempo de vida del pigmento por TCSPC	79
6.2.3. Sistemas: tipo confocal vs arreglo lateral.....	81
6.2.4. Ajuste libre vs ajuste de tiempos largos	82
6.2.5. Formulación PR206: Quinacridona y quinacridonaquinona	84
6.2.6. Tamaño mínimo de muestra seca extraída de formulaciones acrílicas sobre superficies de diferentes sustratos	85
6.3. Anisotropía de Fluorescencia.....	92
6.3.1. Cálculos de contribuciones hidrodinámicas	96
7. CONCLUSIONES.....	101
8. ANEXOS	104
8.1. Análisis por DART de las formulaciones acrílicas y pigmentos comerciales.....	104
8.2. Análisis por RMN- ¹ H de los pigmentos comerciales PV19 y PR206.....	106
8.3. Parámetros obtenidos de los decaimientos fluorescencia de los pigmentos a varios niveles de dilución hechas a extracciones de películas de las formulaciones acrílicas.	108
8.4. Protocolo de recolección de micro-muestra extraída con micro-hisopos.....	111
8.5. Parámetros obtenidos de los decaimientos de fluorescencia de pigmentos extraídos con micro-hisopos.....	112
9. REFERENCIAS	114
10. ARTÍCULO PUBLICADO	130

1. INTRODUCCIÓN

El auge de la pintura acrílica como material colorante se inició en la primera mitad del siglo XX. En las décadas de 1920 y 1930, muralistas mexicanos como Diego Rivera, José Clemente Orozco y David Siqueiros comenzaron a experimentar con estos materiales sintéticos en edificaciones públicas.¹ A pesar de que los compuestos acrílicos comenzaron a sintetizarse a mediados del siglo XIX, estos solo eran destinados para uso industrial.² Así mismo, importantes artistas estadounidenses como Jackson Pollock, Mark Rothko, Robert Motherwell entre otros, experimentaron con este nuevo medio de pintura durante los años cincuenta. En la década siguiente, los sesentas, diversos artistas británicos también se iniciaron en el uso de la pintura acrílica, impulsando diversas ideas vanguardistas de esa época.^{3,4}

Desde entonces, los acrílicos son comúnmente utilizados por muchos pintores modernos debido a sus efectos de coloración, secado rápido y cualidades de permanencia.⁵ Frecuentemente, las obras de arte basadas en pinturas acrílicas usan pigmentos de color rojo que aparecen como único componente fluorescente dentro de las formulaciones.^{6,7} Por lo tanto, en los últimos años, el estudio e identificación de estos pigmentos ha sido crucial para fines de conservación y restauración.^{8,9-11} A la fecha se han desarrollado diversas estrategias prácticas para caracterizar y reconocer pigmentos orgánicos (esqueletos de anillos carbocíclicos) en obras de arte. Para esto, se han empleado técnicas analíticas separativas y cromatográficas.¹²⁻¹⁵ Sin embargo, dichos métodos se ven limitados por la necesidad de realizar procesos de extracción de muestras de dimensiones grandes (cm^2 y mm^2)^{16,17} ya que estas muestras suelen contener una baja concentración de los colorantes orgánicos.¹⁸

Diversas técnicas basadas en la interacción luz-materia, tanto destructivas como no destructivas, han demostrado tener un gran potencial en la detección e identificación de componentes específicos en obras artísticas.^{12,19,13,20-25,26-29} Entre ellas, los métodos espectroscópicos que usan luz en la zona del visible se han distinguido por tener ventajas relevantes sobre el resto. Estos métodos pueden analizar directamente la obra de arte y brindar la posibilidad de combinarse y complementarse con otras técnicas (reflectancia,

absorbancia y fluorescencia).^{21,30-34} Dentro de este tipo de técnicas, la espectroscopia de fluorescencia convencional o “estática” suele no proporcionar una identificación precisa en el análisis de sistemas conjugados (sistemas de orbitales p conectados con electrones deslocalizados en compuestos con enlaces simples y dobles alternos) ya que diferentes cromóforos pueden mostrar máximos de emisión y formas de bandas semejantes.^{9,33,35,36} Es por ello que técnicas que miden la fluorescencia resuelta en tiempo añaden información complementaria que, como se demostrará en esta tesis, pueden emplear muestras de tamaño microscópico. Dichas muestras pueden obtenerse mediante extracción con pequeños volúmenes de disolvente, por contacto mínimo con micro-hisopos, o a partir de fracciones del orden de nanogramos de métodos de separación.³⁷⁻⁴³

Entre las técnicas que miden la fluorescencia resuelta en tiempo, la técnica de conteo de fotones individuales correlacionados en tiempo (TCSPC, por sus siglas en inglés *Time-Correlated Single Photon Counting*) es la de mayor interés y la que se plantea en este documento. TCSPC consiste en la correlación de fotones detectados de forma individual con lo que se genera un histograma de sus tiempos de llegada a un detector después de un breve pulso de luz de excitación. Como se mostrará más adelante, esta técnica puede ser adaptada para recolectar y redirigir una alta fracción de los fotones emitidos por una muestra gracias al empleo de diversas técnicas ópticas. Estos fotones pueden ser también detectados con una elevada eficiencia gracias al empleo de detectores de tipo fotodiodos de avalancha (APDs, por sus siglas en inglés *Avalanche Photodiode Diodes*). Por lo tanto, TCSPC se encuentra entre las técnicas espectroscópicas con mayor sensibilidad para moléculas emisivas.^{33,44}

En este proyecto proponemos el uso de TCSPC y de mediciones de Anisotropía de Fluorescencia como técnicas altamente sensibles para estudiar un grupo de pigmentos rojos. Las quinacridonas y las diimidias de ácido perileno tetracarboxílico pertenecen a este conjunto, y se caracterizan por ser sistemas policíclicos altamente conjugados. Además, estas moléculas están entre los componentes más comunes de formulaciones acrílicas que se usan en producciones artísticas. Ahora bien, el montaje experimental de las técnicas empleadas en este proyecto permite maximizar la eficiencia de la detección de la luz emitida a través de la óptica y el manejo de la muestra. Por lo tanto, es posible observar fluoróforos a

concentraciones relativamente elevadas gracias a que la muestra se puede concentrar en un volumen extremadamente pequeño (~de 1 a 50 μL). De esta forma es posible detectar la evolución de los estados excitados de las moléculas como función del tiempo, donde dicha evolución o decaimiento es típico de cada cromóforo, permitiendo así su identificación.

Para los fines de este estudio, se construyó un microscopio con un arreglo tipo confocal o pseudo-confocal, el cual tiene acoplado un objetivo de alta apertura numérica (NA, por sus siglas en inglés *Numerical Aperture*) y un sistema de APDs. Esta disposición permite excitar y recolectar la luz con el mismo sistema de lentes, y medir la señal de fluorescencia de los pigmentos con una relación señal/ruido sin precedentes⁴⁵⁻⁴⁷ y detección ultrabaja (potencia óptica < 1 pW).⁴⁸ Asimismo, se garantiza un tamaño de muestreo de 40 μm^2 o menos y pudiendo detectar estas moléculas en concentraciones del orden de 10^{-9} M.

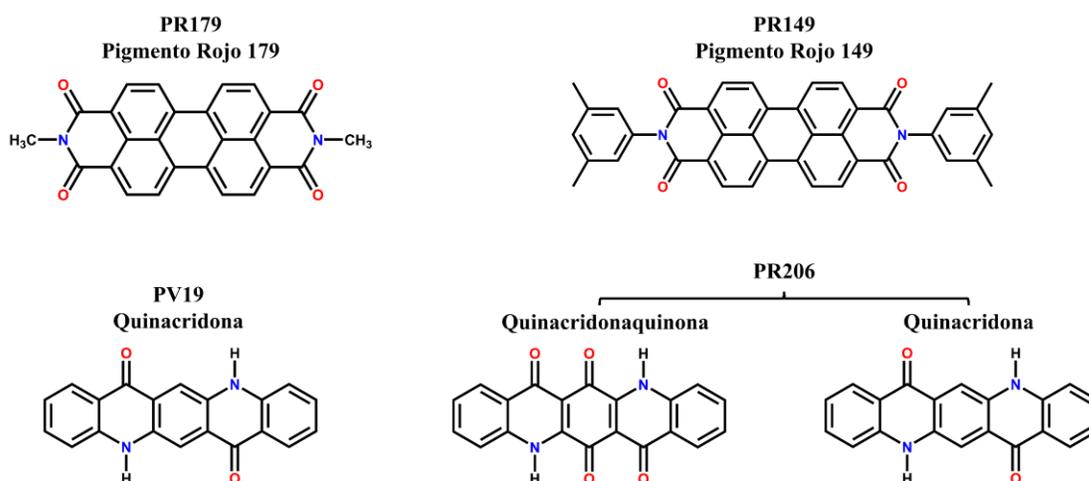


Figura 1.1. Grupo de pigmentos orgánicos rojos considerados en este estudio. Las etiquetas PV# y PR# indican la formulación que contiene la molécula respectiva, ya sea comercial (únicamente el pigmento sin aditivos) o acrílica (con aditivos).

En nuestro estudio nos enfocaremos al estudio de las formulaciones acrílicas PR149, PR179, PV19 y PR206 y sus respectivos cromóforos como se muestra en la Figura 1.1. Estas formulaciones se encuentran en diferentes obras de arte moderno.^{8,14,15,22,27,49,50} De modo que el objetivo es crear y desarrollar estrategias prácticas para detectar y diferenciar los pigmentos orgánicos por la técnica TCSPC.

Los pigmentos se excitaron con pulsos láser de baja intensidad destacándolos gracias a sus emisiones características. Cabe destacar que mediante la técnica TCSPC, el tiempo de vida de cada pigmento es representado a partir del histograma construido por la captura de fotones detectados y la reconvolución de este histograma con una función de respuesta del instrumento (ver métodos). En el presente trabajo, los pigmentos se caracterizaron por contar con tiempos de vida de larga duración, del orden de nanosegundos. Se estudiaron primeramente las moléculas puras y se determinaron los tiempos de vida para cada uno de ellos. Posteriormente, se obtuvieron los decaimientos de fluorescencia de los pigmentos a diferentes concentraciones. Adicionalmente, se llevaron a cabo extracciones microscópicas de formulaciones acrílicas. Estas fueron soportadas en diversas superficies comúnmente empleadas en murales (yeso, cemento blanco y gris y fibrocemento).

Por otro lado, se realizaron mediciones por Anisotropía de Fluorescencia resuelta en tiempo utilizando la misma configuración experimental. Con esta técnica se conoció otra propiedad característica de cada pigmento. Incluso, empleando esta segunda propiedad se confirmó la detección o se logró diferenciar un pigmento de otro en casos donde los tiempos de vida son muy semejantes. Los decaimientos de anisotropía que se obtienen están directamente relacionados con la difusión rotacional de la molécula en el medio, por lo que también son típicos de cada molécula en cada disolvente. Es importante mencionar que compuestos con una sección cromofórica semejante, pero con patrones de sustitución diferentes tenderán a tener dinámicas de difusión rotacional significativamente diferentes. De esta manera, y mediante un ajuste apropiado de mezclas de disolventes, los cromóforos pueden ser identificados o diferenciados. Incluso, los decaimientos de anisotropía pueden ajustarse a caer en diferentes tiempos, donde estos decaimientos pueden ajustarse dependiendo de la naturaleza de la disolución. Así, se demuestra la robustez de la técnica en la detección de los pigmentos con la resolución temporal de sus emisiones.^{44,51}

Finalmente, a través de cálculos teóricos realizados a nivel TD-DFT, se estimaron los tiempos de relajación rotacional puramente hidrodinámicos de los pigmentos perilénicos. Dichos resultados computacionales complementan las mediciones experimentales de Anisotropía de Fluorescencia resueltas en tiempo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Principal

- Estudiar las propiedades de pigmentos rojos para conocer sus características de decaimiento desde el estado fluorescente. Lo anterior con miras a desarrollar estrategias prácticas en el proceso de detección e identificación de un conjunto ilustrativo de pigmentos rojos por las técnicas TCSPC y Anisotropía de Fluorescencia. Este desarrollo tiene como componente principal, la implementación de instrumentación basada en esquemas confocales para maximizar la fracción de fotones colectados en volúmenes del orden de 1 microlitro, además de resolver las señales en función del tiempo.

2.2. Objetivos Específicos

- Confirmar la identidad de los pigmentos (en los que sea necesario) por las técnicas de espectrometría de masas de análisis directo en tiempo real (DART) y espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H).
- Reconocer y distinguir los pigmentos rojos en estudio por la técnica de espectroscopia de estado estacionario a concentraciones del orden de 10^{-7} M.
- Implementar instrumentación especializada en la detección de fluorescencia y su resolución temporal de intensidad y anisotropía en concentraciones mínimas y volúmenes del orden de 1 microlitro. Esta instrumentación incluye la selección de componentes ópticos, de detección y manejo de las señales, así como la puesta a punto del instrumento. El estudio presente permitirá establecer límites de detección para las señales mencionadas.
- Manipular los parámetros y las condiciones del experimento para identificar y clasificar los pigmentos a través de las técnicas TCSPC y Anisotropía de

Fluorescencia. Lo anterior, a partir de una muestra micrométrica extraída con aguja o micro-hisopos.

- Determinar el mejor método de ajuste de las trazas obtenidas por TCSPC, comparando entre un ajuste libre que incluye la traza temporal completa de los datos junto con la función de respuesta del instrumento, y un ajuste que se enfoca solamente en los tiempos largos de la traza.
- Mejorar la sensibilidad de las técnicas de TCSPC y Anisotropía de Fluorescencia con el uso de diferentes objetivos y caminos ópticos en un sistema tipo confocal.
- Identificar y diferenciar los pigmentos por las técnicas TCSPC y Anisotropía de Fluorescencia en muestras imperceptibles para el ojo humano, utilizando muestras obtenidas a partir de fracciones microscópicas de formulaciones acrílicas, por contacto mínimo con micro-hisopos o de soluciones stock [10^{-6} M].
- Determinar el tiempo de difusión rotacional de los pigmentos en diferentes composiciones de mezclas por Anisotropía de Fluorescencia, y demostrar si los perilenos Pigmento Rojo 149 y Pigmento Rojo 179 son diferentes hidrodinámicamente. Lo anterior permitiría establecer una segunda variable que se resuelve en el mismo equipo para diferenciar entre pigmentos con tiempos de decaimiento de fluorescencia similares.
- Complementar con cálculos computacionales la contribución hidrodinámica a los diferentes tiempos de difusión rotacional de los perilenos.
- Encontrar solución a la problemática de baja reproducibilidad en las mediciones por TCSPC de los pigmentos de naturaleza perilénica, moléculas solubles solo en diclorometano (solvente de alta volatilidad). Esto es, emplear diferentes pasos de extracción con diferentes disolventes para minimizar efectos de cambios de concentración.

3. ANTECEDENTES

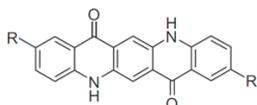
El rápido avance de la química sintética durante el siglo XIX llevó al desarrollo de pigmentos orgánicos sintéticos. Por consiguiente, ahora éstos dominan en el mercado y han reemplazado parcialmente a los pigmentos orgánicos de origen natural. El término “pigmento orgánico sintético” se refiere específicamente a aquellos pigmentos manufacturados y que tienen esqueletos de anillos carbocíclicos como parte de su estructura. Muchos de estos sistemas son cromóforos impartiendo color a una formulación. Además, los pigmentos orgánicos pueden contener grupos funcionales que actúan como auxocromos, es decir, son grupos que incrementan la intensidad y la longitud de onda de absorción.⁵² Por lo tanto, alteran la apariencia de tonalidad primaria de los pigmentos.⁵³ Estas funcionalidades incluyen grupos ceto, tio, nitro y nitroso, por mencionar algunos.^{54,55}

Ahora bien, los pigmentos sintéticos están clasificados con un sistema de nomenclatura “Color Index-(CI)”, el cual es un registro de referencia para todos los tintes y pigmentos, elaborado por la Sociedad de Tintoreros y Coloristas.⁵⁶ Por ende, estos se registran con un nombre genérico y un número. En este trabajo, usamos los nombres de Color Index para indicar los pigmentos comerciales o formulaciones acrílicas analizados (como por ejemplo Pigment Red 179 o PR179). El número del índice de color revela cierta información sobre la constitución química del pigmento, ya que ciertas clases de pigmentos tienen intervalos de números específicos.

Los pigmentos orgánicos sintéticos se caracterizan por ser químicamente estables, y se definen como colorantes no solubles en un medio, brindando color y opacidad.⁵⁷ Estos pigmentos están entre los más empleados desde su introducción en el medio artístico por su amplia gama de color, intensidad y luminosidad. De hecho, a partir de comienzos del siglo XX, la expansión, comercialización y uso en obras de arte ha sido sobresaliente.¹¹ Tal es el caso de la familia de quinacridonas y perilenos (Tablas 3.1 y 3.2 respectivamente). Las primeras fueron descubiertas en 1935 por su polimorfismo^{8,58} y comercializadas a partir del año 1958 por su intenso colorido, resistencia a la luz y variedad de color.^{8,59} Los segundos fueron reconocidos pocos años después como pigmentos, siendo sobresalientes en la década

de 1980 por el mundo del arte, a pesar de ser previamente usados como colorantes de tina o tinción para fibras sintéticas, pigmentación y pinturas de dispersión.⁵⁹

Tabla 3.1. Familia de quinacridonas disponibles comercialmente



CI-Nombre del pigmento	No. del índice	No. CAS	R	Tonalidad
PR 122	73915	1643-40-6	CH ₃	Magenta
PR 202	73907	3089-17-6	Cl	Carmesí
PV 19	73900	1047-16-1	H	Rojo-violeta
PR 206	73900 + 73920	71819-76-6	PV19 	Escarlata quemada

Tabla 3.2. Familia de perilenos disponibles comercialmente



CI-Nombre del pigmento	No. del índice	No. CAS	R	Tonalidad
PR 123	71145	24108-89-2		Rojo Escarlata
PR 149	71137	24108-89-2		Rojo amarillento
PR 178	71155	3049-71-6		Rojo
PR 179	71130	5521-31-3	H ₃ C-N	Rojo-marrón
PR 190	71140	6424-77-7		Rojo azulado
PR 224	71127	128-69-8	o	Rojo azulado

Continuando con el contexto artístico, las formulaciones acrílicas ingresaron a la paleta de los artistas en 1947 con pinturas a base de solución acrílica, y a mediados de la década de los

cincuentas, con emulsiones acrílicas (también conocidas como dispersiones). Desde la década de 1960, las formulaciones de emulsión acrílica han sido las más populares por su composición a base de agua.^{53,60} En la actualidad muchas formulaciones están disponibles, y cada una se compone de aglutinantes de resina acrílica polimérica, pigmentos, extensores y una variedad de aditivos. Además, pueden existir variaciones dependiendo de la marca y los cambios en los componentes por parte de los fabricantes y las propiedades de rendimiento que se requieran.⁶¹ Actualmente, diversas formulaciones acrílicas de grado profesional se comercializan, entre ellas se destacan marcas como: Golden y Winsor & Newton acrylics, las cuales se tienen en cuenta en este estudio.

Con el tiempo, el aumento de los pigmentos orgánicos presentes en formulaciones acrílicas ha causado que mezclas de pigmentos dentro del mismo producto generen un color particular, y de esta forma aumente la gama de tonalidades. Tal es el caso de producciones artísticas realizadas por los expresionistas abstractos de Nueva York de los años setentas: Jackson Pollock, Helen Frankenthaler, Morris Louis, Jack Levine Barnett Newman y Mark Rothko, personajes que preferían formulaciones acrílicas con mezclas de pigmentos con el objetivo de generar matices intensos y variedad de colores en sus obras.^{27,55,62-64} También del muralista mexicano David Siqueiros quien pudo posiblemente emplear las quinacridonas en sus obras artísticas como los murales. Esto con base en sus constantes ensayos con materiales sintéticos y pigmentos orgánicos. No sin dejar de mencionar que en su época de apogeo, las quinacridonas se encontraban en el boom de los pigmentos más empleados por sus excelentes características.⁶⁵

Hoy en día, el número de obras artísticas que emplean pigmentos orgánicos en formulaciones acrílicas es muy amplio. Con esto, la caracterización física, química y estructural de los pigmentos es crucial ya que dicha caracterización provee información de valor en temas de mantenimiento, restauración y de perspectiva del material artístico, cultural e histórico de diversos países. La identificación verídica de pigmentos en pinturas presenta un desafío grande debido a que en general, se cuenta con cantidades de muestras muy bajas dependiendo del nivel de deterioro de la pieza o mural.^{16,32,66} Además, de la interferencia en el análisis causado por barnices o consolidantes utilizados para reparar grietas, poros,

agujeros u otras pérdidas en una pintura.⁶⁷⁻⁶⁹ Es por ello, que el primer paso en el análisis de una obra de arte es la inspección visual y fotográfica. Las técnicas colorimétricas se han utilizado ampliamente para monitorear y evaluar la tasa de decoloración de los pigmentos.^{70,71} Pero no basta únicamente con un análisis visual, es necesario el uso de varias técnicas para caracterizar pigmentos orgánicos, técnicas que se distinguen por ser sensibles y selectivas respecto a la naturaleza de los componentes. Entre estas técnicas, se encuentra la cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC, por sus siglas en inglés *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*) junto con la espectrofotometría de ultravioleta visible (UV-Vis), que proporcionan detalles sobre la creación del artista o posibles restauraciones realizadas a la obra artística.^{26,29,72,73} Incluso, la adición de detectores (arreglo de diodos y espectrómetro de masas), los cuales permiten mejorar y complementar el análisis ofreciendo información sobre los posibles productos de degradación.²⁸ La espectroscopia Raman mejorada en la superficie (SERS, por sus siglas en inglés *Surface-Enhanced Raman Scattering*) también ha sido relevante por la cantidad mínima de muestra que se requiere para el análisis.²⁴ Un ejemplo claro de ello, es la identificación de pigmentos orgánicos (rosas y púrpuras) en muestras del orden de nanogramos reportados en el trabajo de Eslande y colaboradores.⁷⁴ La técnica de pirólisis-cromatografía de gases (Py-GC, por sus siglas en inglés *Pyrolysis Gas Chromatography*) también es aplicada extensivamente en el análisis de aglutinantes y pigmentos orgánicos sintéticos.^{75,76}

Por otro lado, el uso de técnicas no destructivas en el análisis de obras artísticas es también notable con fines de conservación e historia del arte. Por lo tanto, el manejo de instrumentación *in situ* es común en la identificación y análisis de pigmentos. Tal es el caso del uso de equipos portables de espectroscopia de fluorescencia, que brindan algo de información sobre las propiedades moleculares de los componentes de una pieza artística.^{32,33,35,36,77-83} Inclusive, la técnica analítica versátil como espectroscopia de fluorescencia inducida por láser (LIF, por sus siglas en inglés *Laser-Induced Fluorescence*), la cual proporciona información directamente relacionada con la estructura molecular de los pigmentos y los medios de unión como los aglutinantes.^{34,77,84,85}

Diversas obras artísticas que involucran formulaciones acrílicas contienen pigmentos rojos como las quinacridonas y los perilenos (PV19, PR206 y PR179). Estos pigmentos se han estudiado por diversas técnicas analíticas. Por ejemplo, el pigmento PV19, se ha identificado en pequeñas muestras de la serie *Pietre* de 1949 a 1968 del pintor Lucio Fontana por espectrometría de masas, micro-espectroscopia Raman e ionización por desorción láser.^{8,13} Del mismo modo, PR206 se distingue en obras de arte de los años 1946 a 1992 del artista gráfico Sam Francis, siendo Raman e infrarrojo los métodos relevantes en este estudio.^{14,49} Asimismo, el PV19 en esculturas moldeadas por Phillip King en 1970.²² Incluso, tintas de imprenta del año 1992 diseñadas por Elizabeth Murray, quien también incluye este pigmento.⁸ Por último, el perileno PR179 empleado en murales e ilustraciones de Youngsun Jin y Sandrine Maugy, respectivamente.^{15,50} (Figura 3.1).



Figura 3.1. Obras artísticas que contienen pigmentos como quinacridonas y perilenos. De A) Elizabeth Murray⁸ B) Phillip King²² C) Sam Francis^{14,49} D) Youngsun Jin¹⁵ E) Sandrine Maugy⁵⁰ y F) Lucio Fontana^{8,13}

Debido a las propiedades físicas y químicas que presentan los pigmentos tales como: la estabilidad térmica, el brillo y la coloración, el desafío de identificación de los pigmentos aumenta aún más.

Ahora bien, es necesario enfocar el objetivo en la mínima extracción de muestra, con el fin de evitar alguna perturbación en la obra de arte (Figura 3.2). Siendo la toma de pequeños fragmentos y el raspado considerable (~ 1 mg) en la zona de estudio los más empleados.^{86,87} Extracciones que en principio son representativas en tamaño y que contienen pigmentos y otros materiales como consolidantes.^{14,18,37,76,87,88} Técnicas analíticas como microcromatografía de capa fina emplean un pequeño consumo de muestra. Estas se caracterizan por ofrecer un análisis rápido cualitativo y cuantitativo de sustancias coloreadas como los pigmentos. Asimismo, se emplean para obtener un aislamiento eficiente de las moléculas orgánicas en cantidades mínimas con disolventes apropiados.^{40,43} Por otro lado, el uso de micro-hisopos proporciona muestreos confiables y una excelente estrategia en la identificación de pigmentos, lo cual resulta un procedimiento menos invasivo en donde la acción es superficial y el contacto con la obra mínimo. De hecho, en la literatura se encuentran estudios de identificación y clasificación de medios aglutinantes por esta clase de muestreo.³⁷ Por último el método de micro aspiración, el cual emplea pequeñas membranas de nitrocelulosa con el fin de obtener información presente en la superficie de la obra de arte (microorganismos) y por ende en la posible caracterización de pigmentos, siendo en el último caso un aporte significativo en la identificación cuando se obtienen obras de arte con varias capas de pintura.^{38,89}

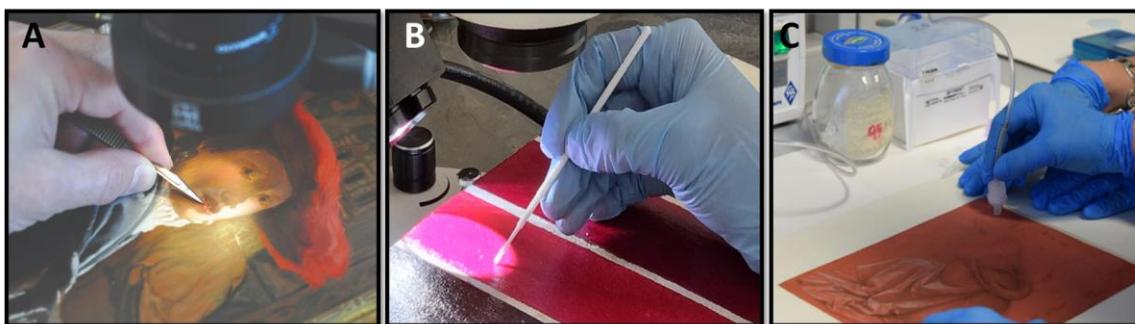


Figura 3.2. Ejemplos de técnicas de muestreo en obras artísticas A) Con bisturí B) Con micro-hisopos frotando C) Por proceso de micro aspiración.³⁸

Cabe mencionar que, a pesar del uso de muchas técnicas analíticas en el análisis de pigmentos, ninguna posee una excelente sensibilidad y precisión para muestras microscópicas con áreas del orden de $1 \mu\text{m}^2$. Como se mostrará en la presente tesis, TCSPC

añade información significativa sobre los pigmentos sin alterar de forma significativa la representación artística. El tamaño de muestra que se puede llegar a emplear es mínimo y los detalles proporcionados por este método con respecto a los pigmentos pueden ser 100% certeros. De esta manera, las técnicas de fluorescencia resueltas en tiempo aplicadas al análisis del patrimonio cultural proporcionan un medio rápido (~5 segundos) para diferenciar pigmentos.

La verdadera fortaleza de TCSPC, técnica que empleamos en este trabajo, es que brinda mediciones cuantitativas con un sistema tipo confocal versátil y ultrasensible, garantizando el uso de muestras microscópicas, imperceptibles a nuestros ojos, y de esta forma consolidar que pigmentos fluorescentes en posibles murales mexicanos⁶⁵ puedan distinguirse eficientemente en condiciones prácticas y sencillas por este método (muestreo, tiempo corto de análisis y procesamiento de datos).

4. MARCO TEÓRICO

Las propiedades de los estados excitados de las moléculas orgánicas son estudiadas por técnicas de estado estacionario y resuelto en tiempo. Primero, el uso de métodos convencionales (absorbancia, emisión y excitación) proporcionan una visión parcial del comportamiento de la molécula. Segundo, la técnica de espectroscopia de emisión resuelta en tiempo añade información relevante sobre la dinámica del estado excitado responsable de la emisión que se está detectando. Este capítulo aborda fundamentos básicos como absorbancia y fluorescencia. Inicia con la descripción de la interacción de la luz con la materia y continua con los procesos de desactivación de los estados excitados. Los términos como tiempo de vida, rendimiento de fluorescencia y coeficiente de absorptividad molar también se explican en esta sección. Por último, los fundamentos y el sistema óptico de las técnicas TCSPC y Anisotropía de Fluorescencia son descritos de forma detallada. Técnicas con arreglos tipo confocal que incrementan la captura de fotones generando una mayor sensibilidad y por ende una amplia detección de los pigmentos.

4.1. Interacción luz-materia

La mecánica cuántica dependiente del tiempo describe a la espectroscopia como una disciplina que se basa en el estudio de la materia a través de su interacción con la radiación electromagnética. Clásicamente, las interacciones luz-materia son el resultado de un campo electromagnético oscilante que interactúa resonantemente con partículas cargadas. Mientras que en mecánica cuántica, los campos de luz actúan para acoplar estados cuánticos de las partículas cargadas en la materia.

Una de las interacciones luz-materia más importantes es la absorción de un fotón. En otras palabras, una molécula que se encuentra en un estado basal de energía E_B puede cambiar a un estado final de mayor energía E_F por la absorción de luz con una frecuencia ν . De tal forma, que se cumpla la relación que se muestra en la Ecuación 4.1.⁹⁰

$$E_F - E_B = h\nu \qquad \text{Ecuación 4.1}$$

en donde un fotón solo puede ser absorbido si su energía corresponde a la energía entre los dos estados estacionarios de la molécula E_B y E_F , y si existe interacción de la radiación electromagnética con el sistema como se muestra en la siguiente ecuación:

$$U_{B \rightarrow F} = \langle \Psi_F | \hat{U} | \Psi_B \rangle \quad \text{Ecuación 4.2}$$

donde, \hat{U} es el operador del momento dipolar eléctrico ($\hat{\mathbf{M}}$), el momento dipolar magnético ($\hat{\mathbf{M}}$), y/o el momento cuadrupolar eléctrico ($\hat{\mathbf{Q}}$), y Ψ_F y Ψ_B expresan las funciones de onda de los estados final (mayor energía) y basal respectivamente. Cabe destacar que es común limitar la Ecuación 4.2 a transiciones de dipolo eléctrico, ya que las transiciones de los dipolos magnéticos y cuadrupolares se pueden ignorar por ser de orden superior.^{90,91}

La probabilidad de una transición de dipolo eléctrico es proporcional al coseno cuadrado del ángulo entre los vectores de momento de transición en la molécula y el vector del campo eléctrico de la luz. Por consiguiente, el resultado es una dependencia orientacional para la absorción y emisión de la luz polarizada linealmente.⁹⁰

La absorción de radiación electromagnética se puede explicar también a partir de la teoría de perturbaciones dependientes del tiempo. Para explicar esto supongamos que se tiene un sistema (átomo o molécula) en su estado estacionario basal y descrito por la función de onda Ψ_B como se describe en la Ecuación 4.3.

$$\hat{H}_0 \Psi_B = E \Psi_B \quad \text{Ecuación 4.3}$$

Si el sistema es perturbado por la exposición de luz, el vector del campo eléctrico del mismo induce fuerzas oscilatorias en las partículas cargadas de la molécula. Así que, el operador \hat{H}_0 ya no describe la energía del sistema y debe tener en cuenta el operador de perturbación \hat{H}' , el cual involucra la radiación denotándose como $(\hat{H}_0 + \hat{H}')$. Por lo tanto, las funciones propias de $(\hat{H}_0 + \hat{H}')$ serán diferentes a la función Ψ_B y dependientes del tiempo de la siguiente forma:^{92,93}

$$(\hat{H}_0 + \hat{H}') \Psi(x, t) = i\hbar \frac{\partial \Psi}{\partial t} \quad \text{Ecuación 4.4}$$

Con esto, estas funciones de onda pueden ser construidas en términos de funciones de onda del sistema no perturbado donde los coeficientes c_k de cada término expresan una dependencia temporal, tal y como se ilustra en la Ecuación 4.5.

$$\Psi(x, t) = \sum c_k(t) \Psi_{k'} \quad \text{Ecuación 4.5}$$

La perturbación del sistema se puede considerar como una combinación lineal de las funciones de onda Ψ_B iniciales del sistema con otras posibles funciones de onda. Es decir, que una molécula en su estado basal evolucione con el tiempo a otros estados y que si la perturbación es removida después de cierto tiempo t , exista la probabilidad que la molécula este en un estado final Ψ_F . Probabilidad denotada como el cuadrado del coeficiente $a_k(t)$ (Ecuación 4.6) y que brinda información de la evolución temporal entre el estado basal al estado final después de una perturbación.⁹²

$$[a_k(t)]^2 = \frac{8\pi^3}{3h^2} |\langle \Psi_F | \hat{\mu} | \Psi_B \rangle|^2 \rho(\nu_{FB}) t \quad \text{Ecuación 4.6}$$

donde $\rho(\nu_{FB})$ corresponde a la densidad de radiación por unidad de volumen a la frecuencia ν_{FB} asociada a la transición, t al tiempo y $\hat{\mu}$ se denota como el operador de momento dipolar.

La absorción de radiación electromagnética ocurre en tiempos breves comparados con los tiempos reportados por los movimientos nucleares (aproximación de Born-Oppenheimer). Por tal motivo, la función de onda puede ser factorizada en dos funciones: La función de onda electrónica (Ψ) y la función de onda nuclear (θ) como se expresa en la Ecuación 4.7, la cual representa el momento dipolar de transición entre las funciones de onda de los estados basal y final.^{92,93}

$$\mu_{FB} = \int \Psi_F \theta_F \hat{\mu} \Psi_B \theta_B d\tau \quad \text{Ecuación 4.7}$$

Y que puede omitir las coordenadas nucleares estableciendo solo las funciones de onda electrónicas como se muestra a continuación:

$$\mu_{FB} = \int \Psi_F \hat{\mu} \Psi_B d\tau \quad \text{Ecuación 4.8}$$

Además, de considerarse como una propiedad vectorial de la molécula distinta de cero para los estados final e inicial ($\mu_{FB} \neq 0$).

Ahora bien, las muestras que se utilizan en las mediciones espectroscópicas suelen estar formadas por un gran número de moléculas. De acuerdo con la ley de Boltzmann en equilibrio térmico a temperatura T , el número de moléculas en un estado N_j de energía E_j está dado por:⁹⁰

$$N_j = \left(\frac{N_0}{Z}\right) e^{-E_j/kT} \quad \text{Ecuación 4.9}$$

donde N_0 es el número total de moléculas, k es la constante de Boltzmann y Z es la función de partición; es decir, la suma de los factores de Boltzmann $e^{-E_j/kT}$ para todos los estados cuánticos posibles de la molécula. Por consiguiente, el número promedio N_j de moléculas en un estado de energía E_j es mayor que el número N_j de moléculas en un estado de energía superior.⁹⁰

Dado que los procesos de absorción y emisión son intrínsecamente igual de probables, se promueven más moléculas desde el estado electrónico inferior (S_0) al estado electrónico superior (S_n). La distribución del equilibrio térmico se ve perturbada, pero debido a las interacciones con el medio ambiente, son posibles las transiciones espontáneas (radiativas y no radiativas) a otros estados de energía y se puede restaurar la distribución del equilibrio. Transiciones que representan las diferentes formas de relajación y que se explicarán en el siguiente apartado.⁹⁰

4.2. Procesos de desactivación de los estados excitados

En las moléculas, la absorción involucra la promoción de un electrón de una capa orbital externa hacia un orbital vacío de mayor energía. Por lo tanto, el electrón de una molécula es promovido de un orbital a otro cambiando el estado de la molécula y considerando la configuración electrónica de este puede tratarse de un estado singulete o triplete (Figura 4.1) siendo:⁹⁴

- Singulete (S_1, S_2, \dots): Con un electrón en un orbital antienlace pero con todos los electrones “apareados”.

- Triplete ($T_1, T_2\dots$): Con un electrón en un orbital antienlace, con un par de electrones “desapareados”.⁹⁴

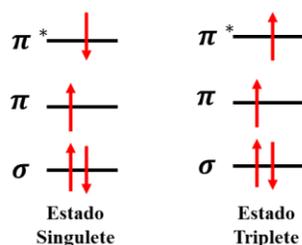


Figura 4.1. Estados electrónicos: Singlete y triplete

Cuando una molécula absorbe radiación electromagnética se excita desde un nivel vibracional del estado electrónico basal (S_0) a uno de los niveles vibracionales del estado electrónico excitado ($S_1, S_2\dots$). Básicamente, la molécula electrónicamente excitada es inestable respecto al estado electrónico basal (S_0). Por lo que si no modifica su estructura química mediante un proceso fotoquímico, busca alguna forma de perder su energía de excitación regresando a su estado basal por diferentes procesos de desactivación (Figura 4.2).⁹⁵

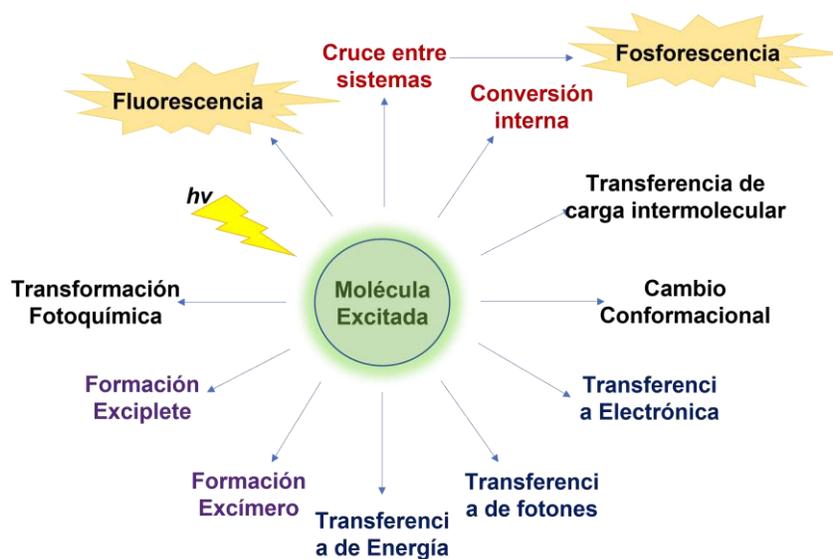


Figura 4.2. Esquema de todas las posibles vías de los procesos de desactivación por parte de una molécula después de absorber radiación electromagnética.^{94,96}

Entre los procesos de desactivación están los radiativos y no radiativos (Figura 4.3). Procesos radiativos, como fluorescencia y fosforescencia donde se emite un fotón desde el estado electrónico excitado. Y procesos no radiativos, en los que la población del estado excitado se transfiere a otro sin que exista alguna emisión.^{90,97,98}

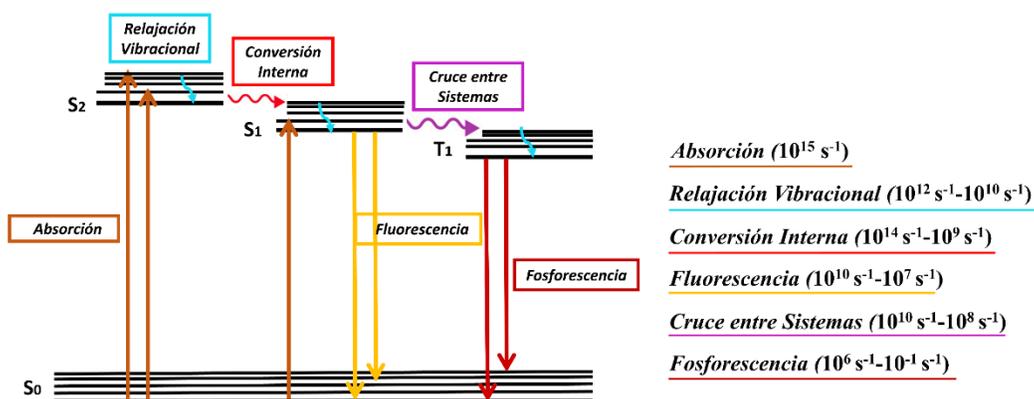


Figura 4.3. Diagrama de Jablonski. Los diferentes procesos de desactivación se ilustran con sus respectivos intervalos de tiempo.

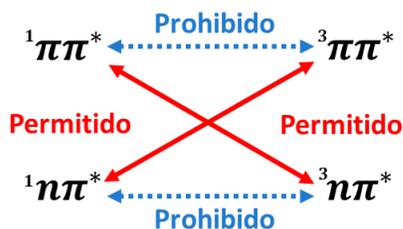
4.2.1. Procesos no radiativos

- Relajación vibracional: Proceso en el que la molécula en uno de los niveles vibracionales más altos cae rápidamente al nivel vibracional más bajo al perder energía por colisiones con moléculas del disolvente. La relajación vibracional da como resultado una transferencia de energía y un incremento minúsculo de la temperatura del disolvente. Además, se caracteriza por ser un proceso que se origina en un intervalo de tiempo de 10^{12} s^{-1} a 10^{10} s^{-1} .⁹⁵
- Conversión interna: La molécula sufre una transición entre dos estados electrónicos excitados isoenergéticos con la misma multiplicidad ($S_2 \rightarrow S_1$ o $T_2 \rightarrow T_1$). Este proceso se da en un intervalo de tiempo de 10^{14} s^{-1} a 10^9 s^{-1} y depende de la diferencia energética que pueda existir entre los estados electrónicos involucrados.⁹⁹
- Cruce entre sistemas: La molécula presenta una transición no radiativa entre dos niveles isoenergéticos de estados de diferente multiplicidad de espín ($S_1 \rightarrow T_1$).

Transición que en principio puede ser prohibida por la regla de selección de espín, pero permitida debido a las reglas de El-Sayed. Reglas que describen la interacción de singlete-triplete a través del acoplamiento espín-orbita. En donde el estado singlete es casi isoenergético con el estado triplete, y donde el cambio en el espín electrónico está acompañado por un cambio específico en la configuración electrónica. Por otra parte, el cruce entre sistemas se caracteriza por ser el más lento en los procesos de desactivación. Incluso, varias órdenes de magnitud (10^{10} s^{-1} a 10^8 s^{-1}), más que la fluorescencia.^{90,97}

Según la regla de El-Sayed, el cruce entre sistemas es fuerte entre estados con diferentes tipos de orbitales involucrados en la transición. Esto es, triplete ($n\pi^*$) a singlete ($\pi\pi^*$) o singlete ($\pi\pi^*$) a triplete ($\pi\pi^*$). Asimismo, de singlete ($n\pi^*$) a triplete ($n\pi^*$), pero un poco más lento. Por ello, el esquema de acoplamiento espín-orbita entre estos estados, y que es característico en moléculas con grupos carbonilo se ilustra en la Figura 4.4.¹⁰⁰

Figura 4.4. Esquema acoplamientos espín-orbita permitidos y no permitidos



4.2.2. Procesos radiativos

- **Fluorescencia:** Proceso en el cual se emiten fotones de la transición radiativa $S_1 \rightarrow S_0$ y ocurre en una escala de 10^{10} s^{-1} a 10^7 s^{-1} . Como consecuencia de procesos no radiativos, la fluorescencia se origina, con algunas excepciones, desde el nivel vibracional más bajo del primer estado electrónico singlete excitado hasta el estado electrónico basal (Regla de Kasha).¹⁰¹ Cabe señalar, que en el primer estado excitado, la fluorescencia puede competir en escalas de tiempo con otros procesos no radiativos como conversión interna y relajación vibracional.⁹⁷

- Fosforescencia: Emisión radiativa desde el estado triplete con un intervalo de tiempo de 10^6 s^{-1} a 10^{-1} s^{-1} . Así como el cruce de sistemas, la fosforescencia es un proceso prohibido por la regla de selección. Por lo tanto, la probabilidad de que esta suceda es muy baja y solo ocurre por acoplamiento espín-orbita como se explicó anteriormente. Generalmente, la fosforescencia no se observa en soluciones fluidas a temperatura ambiente porque hay muchos procesos de desactivación que tienen constantes de velocidad más rápidas. Por ende, estos procesos compiten efectivamente con la emisión de fotones en soluciones líquidas, reduciendo así el canal de desactivación.⁹⁹

4.3. Espectroscopia de estado estacionario

La espectroscopia de estado estacionario es una de las herramientas más utilizadas en el estudio de los estados excitados de las moléculas. La señal que se registra por esta técnica se caracteriza por ser un promedio temporal de todos los eventos que presenta un cromóforo, los cuales pueden ser procesos radiativos o no radiativos en escalas de tiempo mayores a las que usualmente una técnica resuelta en tiempo podría registrar.^{102,103} Del mismo modo, por este método se obtienen espectros de absorción, emisión y excitación, los cuales proporcionan datos relevantes con respecto a las moléculas.

4.3.1. Espectroscopia de absorción, emisión y excitación

La medición de los espectros de emisión en el estado estacionario es tan común como la medición de los espectros de absorción. Estos suelen ser procedimientos de rutina en la caracterización de nuevos compuestos, seguimiento de reacciones químicas o procesos industriales. Desde el punto de vista fotofísico, los espectros de absorción y emisión brindan información sobre el sistema electrónico de la materia. Por ejemplo, en absorción se muestran los espectros de energía del fotón absorbido, y las bandas corresponden a las transiciones del estado basal al estado electrónico excitado ($P + h\nu \rightarrow P^*$). Mientras que en emisión, las bandas de los espectros representan la energía de los fotones emitidos durante la relajación al estado basal ($P^* \rightarrow P + h\nu$).^{104,105}

Existen diferencias entre los espectros de absorción y emisión así correspondan a transiciones electrónicas entre los mismos estados, esto debido a que las formas y las posiciones relativas que presentan los espectros están determinadas por la interacción de estas con el disolvente.⁹⁷ Es preciso señalar, que la estructura molecular también desempeña un papel notable en la determinación de la forma y la posición de la longitud de onda de emisión y sus respectivos parámetros en las moléculas aromáticas. En general, las moléculas que no son planas suelen tener espectros de absorción y emisión sin estructura, mientras que las moléculas planas y rígidas como los pigmentos muestran espectros con bandas vibracionales bien definidas.^{106,107}

Por otra parte, espectroscopias de absorción y emisión se consideran como dos métodos complementarios. Por absorción, se proporciona información de naturaleza más aplicada, tal como la longitud de onda del máximo de absorción de un cromóforo y su coeficiente de absortividad molar (como se verá más adelante). Y por emisión se obtiene información sobre la estructura molecular del fluoróforo y el entorno local que lo rodea.¹⁰²

En espectroscopia de estado estacionario, el espectro de excitación también es importante ya que representa la distribución de electrones de la molécula en el estado electrónico basal. La excitación es equivalente a la absorción, puesto que tras la absorción, la molécula alcanza el estado electrónico excitado S_n .¹⁰⁸ Cuando se registra un espectro de excitación, la emisión de una molécula es independiente de la longitud de onda de excitación de acuerdo con la regla de Kasha. Esto si no existen excepciones a la regla como en el caso del azuleno donde la emisión de fluorescencia de la molécula proviene del estado electrónico S_2 (alta brecha de energía entre los estado excitados).^{97,109} Generalmente, el espectro de excitación tendrá la misma forma y distribución de longitud de onda que el espectro de absorción. Sin embargo, en los casos en que exista la presencia por parte de otras moléculas en solución, este se modificará.¹⁰⁸

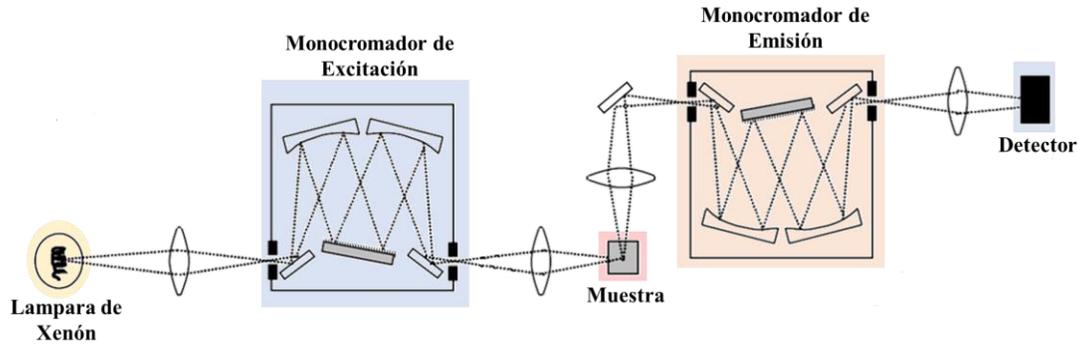


Figura 4.5. Esquema de un espectrofluorómetro donde la emisión se recolecta a 90° con respecto a la excitación. En este instrumento las rejillas de cada monocromador minimizan las señales espurias relacionadas a longitudes de onda diferentes a la seleccionada en el momento de la medición.⁹²

Los espectros de excitación y emisión de fluorescencia generalmente se registran usando espectrofluorómetros equipados con monocromadores que permiten el escaneo de longitudes de onda diferentes a la seleccionada (Figura 4.5). Básicamente, un espectro de excitación muestra la distribución de la intensidad de emisión en una longitud de onda mientras escanea la longitud de onda de excitación en un intervalo. Ahora bien, en la práctica para la adquisición del espectro de excitación, el monocromador de emisión del espectrofluorómetro se ajusta a una longitud de onda fija (intervalo de emisión de la muestra) y el monocromador de excitación escanea un intervalo de longitudes de onda correspondientes a la absorción de la muestra.^{92,97} Al igual sucede con el espectro de emisión, el cual se adquiere ajustando la longitud de onda de excitación a un valor fijo, y luego el monocromador de emisión escanea en un intervalo de longitudes de onda de emisión.¹¹⁰

Con base en lo anterior, para un instrumento ideal, los espectros de emisión registrados directamente representarían la tasa de emisión de fotones emitidos en cada longitud de onda, en un intervalo de longitud de onda determinado por el ancho de la rendija y la dispersión del monocromador de emisión. Y de manera similar, el espectro de excitación representaría la emisión relativa del fluoróforo en cada longitud de onda de excitación.^{92,97}

Finalmente, es importante mencionar que existen dos reglas generales que se aplican a los espectros de emisión:

- La emisión ocurre en longitudes de onda más largas que la longitud de onda de excitación (Desplazamiento Stokes).

- La forma del espectro de emisión no cambia al variar la longitud de onda de excitación.⁸⁴

4.3.2. Parámetros esenciales en procesos de absorción-emisión

Un cromóforo se caracteriza por tener tres propiedades fundamentales: Coeficiente de absorptividad molar (ϵ), rendimiento de fluorescencia (ϕ_f) y tiempo de vida de fluorescencia (τ).

Primero, el término coeficiente de absorptividad molar (ϵ) es una medida de la fuerza con la que una especie o sustancia química absorbe radiación en una longitud de onda particular. De igual modo, es una propiedad intrínseca que depende de la estructura química y la composición de la molécula. Este se caracteriza por unidades SI (en Sistema Internacional) $M^{-1}cm^{-1}$ y se utiliza con frecuencia en espectroscopia para medir la concentración de una sustancia química en solución.^{97,111}

De acuerdo con la ley de Lambert-Beer^{92,97} es posible conocer el coeficiente de absorptividad molar. La ley establece que la pérdida de intensidad de la luz cuando se propaga en un medio es directamente proporcional a la intensidad y la longitud de la trayectoria tal y como se ilustra en la Figura 4.6. Figura que explícitamente representa, como un haz de luz de una determinada longitud de onda e intensidad (I_0) entra en contacto perpendicularmente con una solución, la cual absorbe parte de la radiación y la luz restante o transmitida (I) pasa a través de la solución e incide en el detector.^{97,111,112}

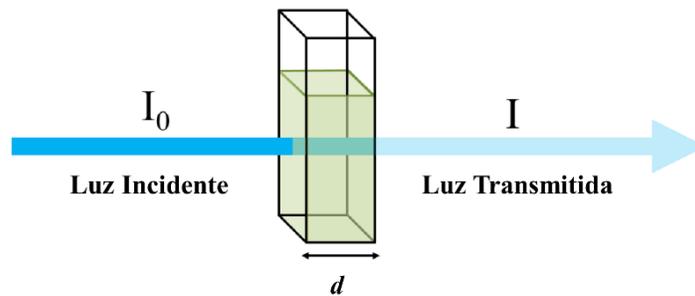


Figura 4.6. Absorción de la luz. Representación del haz de luz monocromático que incide en una solución homogénea que se encuentra contenida en una celda.

Matemáticamente la relación de la intensidad de radiación transmitida y la que entra en contacto con la solución se denota como transmitancia (Ec. 4.10).¹¹³

$$T = \frac{I}{I_0} \quad \text{Ecuación 4.10}$$

La cual está estrechamente relacionada con la absorbancia a través de la siguiente relación:¹¹³

$$A = \log_{10} \left(\frac{1}{T} \right) \quad \text{Ecuación 4.11}$$

Por esta razón, la ley se define como la relación entre la concentración de una solución y la cantidad de luz absorbida por la solución como se muestra en la Ecuación 4.12:

$$A = \varepsilon dC \quad \text{Ecuación 4.12}$$

Donde:

A = Absorbancia

ε = Absortividad molar ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

d = Longitud del camino de la celda que contiene la muestra (cm)

C = Concentración de la molécula en la solución (mol L^{-1})

Es importante mencionar que esta ley solo se cumple para soluciones diluidas, ya que si se tiene concentraciones altas, el ε puede variar debido a fenómenos de dispersión de luz, agregación de moléculas, entre otros.¹¹¹

Como se mencionó anteriormente cuando una molécula absorbe un fotón, se forma un estado energéticamente excitado, el cual puede desactivarse por diferentes procesos regresando a su estado electrónico basal. El rendimiento de fluorescencia (φ_f) es un indicador para medir la eficiencia de la emisión de fluorescencia de una molécula en relación con todas las posibles vías de desactivación. Esta propiedad generalmente se expresa como la relación adimensional entre el número de fotones emitidos (por unidad de tiempo y volumen) y la cantidad de fotones absorbidos.¹¹⁴ En otras palabras, el φ_f representa la

probabilidad de que un fluoróforo excitado se desactive por fluorescencia en lugar de otro mecanismo no radiativo.

Los rendimientos de fluorescencia tienen que oscilar entre valores de cero y uno. Así que, moléculas fluorescentes comúnmente empleadas como sondas tienen rendimientos de fluorescencia que van desde 0.05 o menos, hasta la unidad en función de diferentes factores como el pH, la concentración y la polaridad del disolvente.⁹⁷

Existen dos métodos para medir φ_f : el método absoluto y el método relativo. En este trabajo abordamos el método relativo que es más confiable para registrar el φ_f . Por lo que, específicamente se emplea el método comparativo de Williams y colaboradores,¹¹⁵ el cual implica el uso de muestras estándar bien caracterizadas con valores de φ_f conocidos a diversas longitudes de onda de excitación y en diferentes disolventes. En el método, las soluciones de las muestras estándar y la molécula en estudio con absorbancia idéntica a la misma longitud de onda de excitación absorben el mismo número de fotones. Por consiguiente, una relación simple de las intensidades de fluorescencia integradas de las dos soluciones registradas en condiciones idénticas producirá la relación de los valores del φ_f . La Ecuación 4.13 muestra a I e I_R como intensidades integradas de los espectros de emisión de la muestra y el estándar respectivamente. OD_R es la densidad óptica o absorbancia del estándar y OD es la de la muestra a la longitud de onda de excitación. Además, n_R es el índice de refracción de la medición del estándar y n el de la muestra.^{97,115}

$$\varphi_f = \varphi_{fR} \frac{I}{I_R} \frac{OD_R}{OD} \frac{n^2}{n_R^2} \quad \text{Ecuación.4.13}$$

Ahora bien, no todos los fluoróforos excitados emiten un fotón ya que existe la posibilidad de que ocurran procesos no radiativos cuando se excita a una molécula como se mencionó anteriormente. Por lo cual, el rendimiento de fluorescencia también puede ser representado en términos de tasa de descomposición como se verá a continuación.¹¹⁶

Es necesario definir que la intensidad de fluorescencia dependiente del tiempo es proporcional a la población en el estado excitado. Y esta puede explicarse a partir de la Ecuación cinética 4.14, la cual describe el decaimiento de la población del estado excitado

singulete $[S_1]$ después de la excitación. Incluso, se construye sumando todas las vías paralelas de desactivación:^{97,116,117}

$$\frac{d[S_1]}{dt} = -k_{Total}[S_1] \quad \text{Ecuación.4.14}$$

Una ecuación que tiene como función solución el desarrollo matemático denotado como la Ecuación 4.18 Solución que se da a través de diferentes pasos como se muestra en las siguientes ecuaciones:

$$\int_t^{t'} \frac{d[S_1]}{[S_1]} = -k_T \int_t^{t'} dt \quad \text{Ecuación.4.15}$$

$$\ln \frac{[S_1]}{[S_1]_0} = -k_T t \quad \text{Ecuación.4.16}$$

$$\frac{[S_1]}{[S_1]_0} = e^{-k_T t} \quad \text{Ecuación.4.17}$$

$$[S_1]_t = [S_1]_0 e^{-k_T t} \quad \text{Ecuación.4.18}$$

Donde $[S_1]_0$ es la población de estado excitado en el tiempo cero (definido en cualquier momento después de la excitación instantánea), y k_T es el conjunto de las constantes radiativas (k_{rad}) y no radiativas (k_{nrad}). Radiativas como la fluorescencia y no radiativas como conversión interna (k_{CI}), relajación vibracional (k_{RV}) y cruce entre sistemas (k_{CES}).

$$k_T = k_{rad} + k_{CI} + k_{RV} + k_{CES} = \sum_i k_T \quad \text{Ecuación.4.19}$$

Tal como se ha explicado a lo largo de esta sección, $[S_1]$ puede desactivarse mediante procesos radiativos y no radiativos. En el caso de nuestros pigmentos el proceso de desactivación que domina es el radiativo, por lo cual es el canal que nos interesa en este trabajo. Es por ello, que se plantea la ecuación cinética para este proceso de desactivación en donde $[hv]$ expresa la concentración de fotones. Ecuación que se ilustra y se desarrolla de la siguiente manera:

$$\frac{d[hv]}{dt} = k_{rad}[S_1]_t \quad \text{Ecuación.4.20}$$

Donde $[S_1]_t$ es reemplazado por la Ecuación 4.18 obteniendo:

$$\frac{d[h\nu]}{dt} = k_{rad}[S_1]_0 e^{-k_T t} \quad \text{Ecuación.4.21}$$

Y que integrada da como resultado la Ecuación 4.23:

$$\int_t^{t'} d[h\nu] = k_{rad}[S_1]_0 \int_t^{t'} e^{-k_T t} dt \quad \text{Ecuación.4.22}$$

$$[h\nu] = \frac{k_{rad}[S_1]_0}{k_T} [1 - e^{-k_T t}] \quad \text{Ecuación.4.23}$$

Y que por otro lado considerando un $t \rightarrow \infty$ se obtiene el φ_f el cual se denota en la Ecuación 4.25:

$$[h\nu] = \frac{k_{rad}[S_1]_0}{k_T} \quad \text{Ecuación.4.24}$$

$$\frac{[h\nu]}{[S_1]_0} = \frac{k_{rad}}{k_T}$$

$$\frac{k_{rad}}{k_T} = \frac{k_{rad}}{k_{rad} + k_{nrad}} = \varphi_f \quad \text{Ecuación.4.25}$$

donde la k_{rad} se puede calcular a partir de la Ecuación 4.26 y está determinada por el espectro de absorción $\varepsilon(\bar{\nu})$, el espectro de emisión $F(\bar{\nu})$ representado en la escala de número de onda (cm^{-1}) y el índice de refracción del medio (n). Además, de que las integrales se calculan sobre los espectros de emisión y absorción entre los estados electrónicos $S_0 \leftrightarrow S_1$.^{90,97,118}

$$\begin{aligned} k_{rad} &\simeq 2.88 \times 10^9 n^2 \frac{\int F(\bar{\nu}) d\bar{\nu}}{\int F(\bar{\nu}) d\bar{\nu} / \bar{\nu}^3} \int \frac{\varepsilon(\bar{\nu})}{\bar{\nu}} d\bar{\nu} \\ &= 2.88 \times 10^9 n^2 \langle \bar{\nu}^{-3} \rangle^{-1} \int \frac{\varepsilon(\bar{\nu}) d\bar{\nu}}{\bar{\nu}} \quad \text{Ecuación 4.26} \end{aligned}$$

Entre los parámetros comúnmente usados, el tiempo de vida de fluorescencia (τ) se denota como una propiedad intrínseca de los cromóforos. Básicamente, el τ expresa el tiempo característico de una molécula en permanecer en su estado electrónico excitado antes de regresar a su estado electrónico basal.¹¹⁹

Durante el tiempo de vida del estado excitado, un cromóforo puede exhibir cambios conformacionales, interactuar con otras moléculas y rotar o difundirse en el entorno que lo rodea. Para un cromóforo el tiempo de vida se expresa como el recíproco de la tasa de descomposición total tal y como se muestra en la Ecuación 4.27.

$$\tau = \frac{1}{k_{rad}+k_{nrad}} = \frac{1}{k_T} \quad \text{Ecuación 4.27}$$

que se define también como la población que decae exponencialmente 1/e o ~37% con el tiempo debido a la emisión de fluorescencia y procesos no radiativos.^{97,116,117}

Es importante mencionar que el tiempo de vida radiativo o natural del fluoróforo (τ_0) se define como:

$$\tau_0 = \frac{1}{k_r} \quad \text{Ecuación 4.28}$$

Por lo tanto, el φ_f y el τ están relacionados por la expresión:

$$\varphi_f = \frac{\tau}{\tau_0} \quad \text{Ecuación 4.29}$$

En general, las moléculas rígidas como los pigmentos de este estudio tienen valores de φ_f cercanos a la unidad, ya que disipan menos energía a través de la conversión interna en comparación con aquellas moléculas que pueden girar libremente.¹²⁰

Con base en lo mencionado sobre el tiempo de vida de fluorescencia, este se puede medir con técnicas espectroscópicas resueltas en tiempo empleando pulsos de radiación con el fin de promover el estado excitado del cromóforo. Estas técnicas emplean arreglos tipo confocal que incrementan la detectabilidad mínima de los pigmentos en un tiempo de medición muy corto, como se verá más adelante en la discusión de resultados.

4.4. Espectroscopia resuelta en tiempo

La espectroscopia resuelta en tiempo se caracteriza por ser una poderosa herramienta en el estudio de la estructura y la dinámica de las moléculas en períodos cortos. Adicionalmente, proporciona la capacidad de distinguir entre diferentes fluoróforos excitados mediante la

deconvolución del perfil del tiempo de vida de fluorescencia.¹²¹ Otra de las características es la capacidad de medir cambios en el intervalo de tiempo de picosegundos o nanosegundos convirtiéndola en una técnica útil en el análisis de pigmentos orgánicos.¹²² Específicamente, la técnica se basa en monitorear los eventos dinámicos que ocurren dentro de un fluoróforo, y en registrar el perfil de intensidad dependiente del tiempo de la luz emitida tras una excitación pulsada (Figura 4.7). Básicamente, se puede llegar a registrar el perfil del decaimiento en el tiempo de la señal en un solo ciclo de excitación-emisión, pero existen problemas como un rápido decaimiento registrado y, por otro lado, un tiempo de vida de fluorescencia que se extiende hasta varias decenas de nanosegundos que impiden obtener una solución simple como en la mayoría de los casos. Por ello, para recuperar no solo el tiempo de vida, sino la forma del decaimiento de fluorescencia es necesario resolver temporalmente la señal de tal manera que el decaimiento de fluorescencia este representado por algunas decenas de muestras. Dicho de otra forma, muestrear en pasos de 20 ps, un decaimiento de fluorescencia que dura 300 ps.^{44,97}

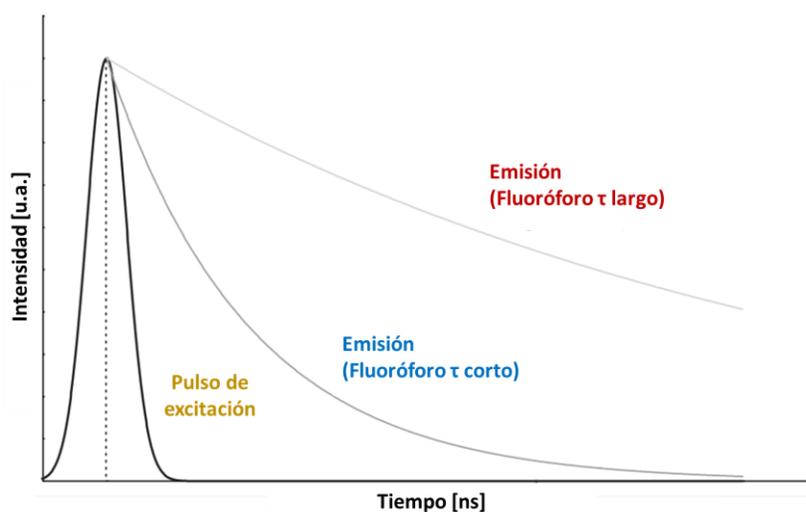


Figura 4.7. Esquema del decaimiento de la fluorescencia tras una excitación pulsada. Se muestran el comportamiento de la traza para un tiempo de vida corto y un tiempo de vida largo.¹¹⁹

A simple vista, parece ser razonable registrar el decaimiento con un fotodiodo o un registrador electrónico ordinario. Sin embargo, la resolución temporal requerida es difícil de lograr, y la luz emitida puede ser muy débil (pocos fotones por ciclo de excitación-emisión) para crear un voltaje análogo que represente una señal óptica.¹²² Es decir, surgirían problemas

cuando se quiera observar el comportamiento de la muestra y esta consista en unas pocas moléculas o incluso en una sola molécula, situación que es absolutamente válida y real en aplicaciones de microscopía confocal.⁴⁴

4.4.1. Técnica de recuento de fotones individuales correlacionados en tiempo-TCSPC

La técnica TCSPC es la solución para los problemas mencionados anteriormente. Básicamente, con la excitación periódica de un láser, es posible extender la recopilación de datos a lo largo de múltiples ciclos de excitación-emisión. Por ende, se puede aceptar la escasez de fotones y reconstruir el perfil de decaimiento de la fluorescencia a partir de la multitud de eventos de fotones únicos recolectados durante muchos ciclos. En principio, la técnica se basa en la detección repetitiva de fotones individuales y la medición de sus tiempos de llegada con respecto al pulso de excitación.^{44,97} Detallando más el proceso, la muestra es excitada repetidamente con pulsos láser cortos emitiendo fluorescencia, y la diferencia de tiempo entre la excitación y emisión es medida por dispositivos electrónicos que actúan como un cronómetro (Figura 4.8).¹²³

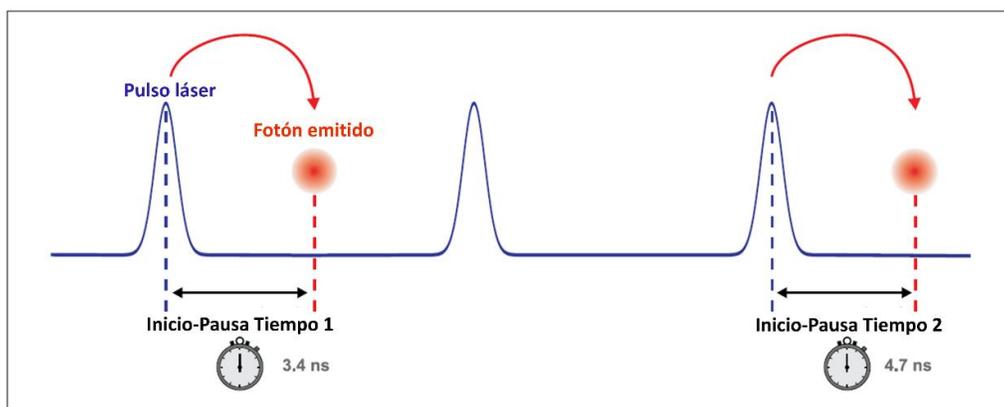


Figura 4.8. Medición de tiempos de inicio-pausa en una medición de fluorescencia resuelta en tiempo por la técnica TCSPC.

La lectura del cronómetro que correlaciona estos dos tiempos reconstruye un histograma de lapsos de tiempo de excitación-emisión. Así pues, las lecturas del cronómetro se clasifican en un histograma que consta de grupos de tiempo. En otros términos, los eventos de un solo

fotón se clasifican en diferentes canales del histograma de acuerdo con diferentes retrasos de tiempo, y de esta forma se representa el decaimiento de fluorescencia (Figura 4.9).^{97,123}

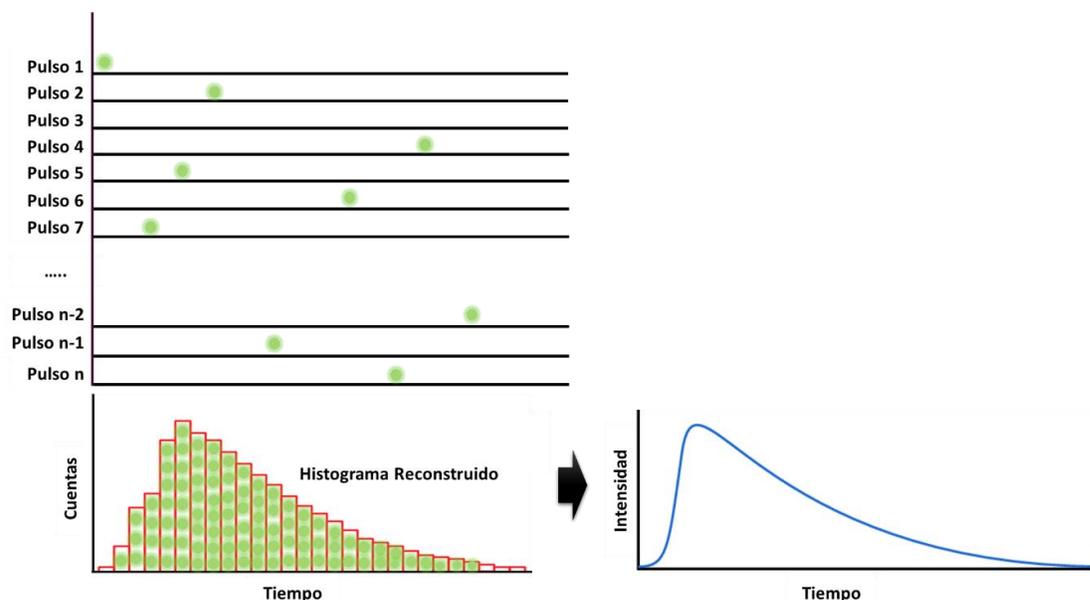


Figura 4.9. Principio de la técnica TCSPC. Después de excitar repetidamente la muestra y cronometrar la llegada de muchos fotones, se construye un histograma que representa el decaimiento de fluorescencia.

Cabe señalar que según las leyes de la física cuántica, la aparición de un fotón o un ciclo vacío es completamente aleatoria (no habrá fotones en muchos ciclos), y solo puede describirse en términos de probabilidades como se verá más adelante.⁴⁴

Con todo es importante destacar que la técnica TCSPC supera a las demás técnicas (RP-HPLC, UV-Vis, LIF, SERS, entre otras) en sensibilidad, robustez, eficiencia de conteo, alta resolución de tiempo y precisión de los datos, parámetros que se explican a continuación:¹²⁴

- Robustez

La técnica TCPSC posee una excelente robustez ya que es insensible a las fluctuaciones de los pulsos de la fuente de excitación, a las fluctuaciones de los pulsos del detector y al ruido de fondo del detector. Incluso, para la mayoría de los detectores, el ruido de fondo se elimina mediante un umbral que permite procesar solo pulsos de cierta amplitud. Por este motivo, la técnica garantiza un buen resultado a la hora de analizar los datos.

- Sensibilidad

La técnica brinda una sensibilidad excepcional. TCSPC se caracteriza por medir fotones individuales. Por ello, es un método resuelto en tiempo ultrasensible en la detección de los pigmentos. Dado que el proceso de captura de un solo fotón se realiza por repetidas veces, se logra procesar una cantidad suficientemente alta de fotones individuales para la medición del τ . No obstante, como solo se procesa un solo fotón a la vez, se requiere de una energía de pulso de excitación baja sin afectar la degradación de la muestra (otra ventaja de usar esta técnica).⁵¹

- Resolución de Tiempo

TCSPC proporciona la resolución de tiempo más alta entre las técnicas que utilizan detectores de fotones individuales. Así que, esto lo distingue de la técnica de autocorrelación. Ahora bien, la característica del sistema TCSPC que resume su precisión de temporización general es la función de respuesta del instrumento (IRF, por sus siglas en inglés *Instrument Response Function*), la cual es infinitamente estrecha si se supone como parte de un sistema ideal.

La IRF generalmente se caracteriza por su ancho completo a la mitad del máximo (FWHM, por sus siglas en inglés *Full Width at Half Maximum*). Inclusive, la IRF es una función de las incertidumbres aportadas por la fuente de excitación (láser), el detector, los componentes ópticos y el sistema TCSPC (electrónica). Componentes que contribuyen tanto a la forma como al ancho de la IRF (Figura 4.10).

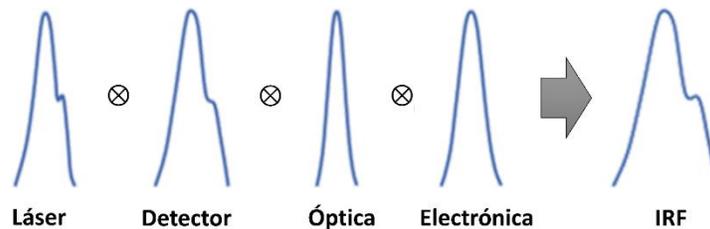


Figura 4.10. Representación de los componentes que contribuyen al ancho de la IRF.

La contribución de la dispersión de tiempo introducida por los componentes individuales del sistema al ancho total de la IRF depende en gran medida de su magnitud relativa. Matemáticamente, la IRF total es la convolución de todos los componentes y se puede obtener una estimación del ancho a partir de la suma geométrica de los componentes individuales.¹²⁵

$$e_{IRF} = \sqrt{\sum e_{componentes}^2} \quad \text{Ecuación 4.30}$$

La medición de la IRF no es solo un medio para optimizar y caracterizar el instrumento, también sirve como base para el análisis de datos por deconvolución, así que, es una tarea de medición frecuente. Además, de predecirse por la Ecuación 4.30, la IRF puede medirse experimentalmente. El enfoque típico consiste en medir la IRF bajo las mismas condiciones en la que se mide una muestra objetivo utilizando fluoróforos fuertemente apagados, y la misma longitud de onda de excitación. Esto con el fin de generar IRFs con tiempos de vida muy cortos. Tal es el caso de la fluoresceína apagada con yoduro de sodio (NaI), la cual se usa en este trabajo y reporta un τ de 200 ps.

Se mencionó anteriormente que la IRF total es la convolución de todos los componentes. De manera similar, el decaimiento de fluorescencia medido es la convolución del proceso físico del decaimiento exponencial con la IRF. Dicho de otra forma, con este modelo teórico, es posible extraer los parámetros del proceso de decaimiento de fluorescencia de la molécula obtenidos de los resultados complejos de los histogramas recopilados.¹²⁵

Enfatizando en el análisis de datos, el decaimiento de fluorescencia de una molécula suele obtenerse típicamente con la función monoexponencial que se muestra en la Ecuación 4.31, que representa el resultado de la convolución de la IRF con la intensidad de fluorescencia ($I_0 e^{-t/\tau}$) de la molécula, la cual comprende el número de fotones emitidos una vez excitada en función del tiempo

$$f(t) = IRF \otimes I_0 e^{-t/\tau} \quad \text{Ecuación 4.31}$$

siendo I_0 la intensidad de fluorescencia en tiempo cero.

- Alta eficiencia de fotones-alta precisión de tiempos de vida

TCPSC posee una eficiencia de fotones casi ideal. Esta eficiencia se traduce directamente en la precisión del registro del tiempo de vida de la fluorescencia. En condiciones ideales se determina un tiempo de vida de fluorescencia único con una relación señal-ruido (SNR, por sus siglas en inglés *signal-to-noise ratio*) de:

$$SNR = \sqrt{N} \quad \text{Ecuación 4.32}$$

a partir de un número de fotones detectados N . Como factor fundamental, la técnica ofrece una mejor precisión para una cantidad de fotones detectados ya que cuenta con una IRF muy corta también, la cual fue descrita con anterioridad.^{126,127}

- Tasas de recuento y estadísticas de fotones individuales

Como se ha explicado a lo largo de esta sección, la técnica posee baja probabilidad de registrar más de un fotón por ciclo. Por lo cual, la mayoría de los detectores de conteo de fotones individuales y la electrónica TCSPC tienen un tiempo “muerto”. Tiempo que garantiza que no exista el fenómeno de “pile-up” en el ciclo excitación-emisión o pérdida de fotones por las altas tasas de conteo. Proceso que conduciría a una distorsión en el histograma, el cual representaría un τ más corto o un decaimiento biexponencial con un componente adicional más corto (Figura 4.11)

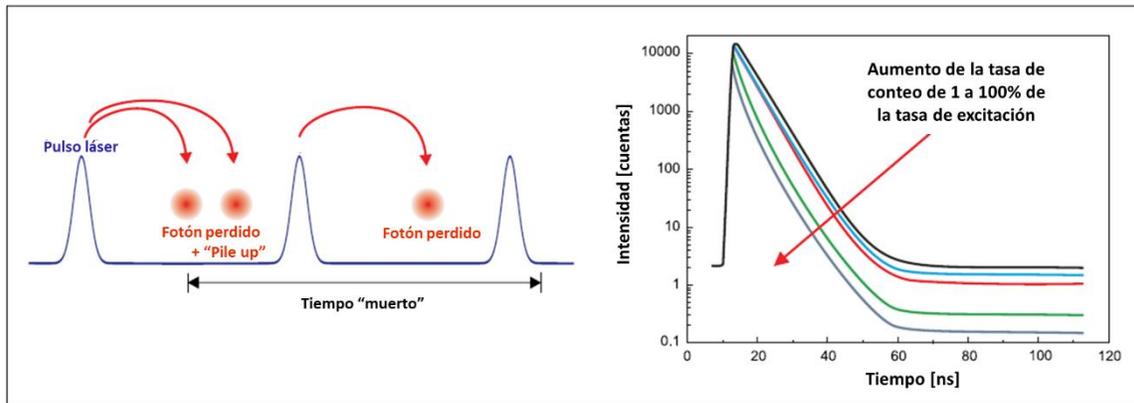


Figura 4.11. Distorsión de la traza del decaimiento de fluorescencia por TCSPC por el efecto “Pile-up”.

Resumiendo lo anterior, TCSPC tiene sus ventajas y limitaciones. En el aspecto positivo, TCSCP ofrece una sensibilidad extremadamente alta del conteo de fotones individuales, que solo es posible en el dominio del tiempo. Conjuntamente, los histogramas obtenidos dan información cualitativa del tiempo de vida y pueden ser indicativos de la presencia de más de una vía de desactivación (como fluorescencia). Además, como se trata de cronometrar la llegada de los fotones, en lugar de las intensidades de la luz, no es vulnerable a alguna fluctuación proveniente de la fuente de excitación. Sin embargo, para adquirir histogramas representativos del proceso de decaimiento de fluorescencia, no debe detectarse más de un fotón por ciclo de excitación-emisión. Esta restricción se relaciona principalmente con el tiempo “muerto” instrumental y es para evitar la posibilidad de que llegue un fotón mientras el equipo no es capaz de cronometrarlo. Razón por la cual en la práctica se limita la tasa de detección a menos del 2% de la frecuencia de excitación. Un valor que significa que la distorsión relacionada con los fotones de fluorescencia no detectados será menor que otros errores experimentales.^{51,128}

En otro orden de ideas, los avances en tecnología sobre fuentes de excitación, como los diodos láseres permiten tasas de adquisición mucho más rápidas. Permitiendo que los tiempos de recolección se reduzcan significativamente, y que sea posible la adquisición de datos en tiempos de milisegundos.¹²⁴

Aunque el fundamento de TCSPC no ha cambiado notablemente desde su concepción a principios de la década de 1960, las sucesivas mejoras en la instrumentación han creado un método extremadamente poderoso y popular para la determinación del estado emisor de las moléculas, razón por lo cual es relevante en nuestro trabajo. Esto gracias a las características que ofrece la técnica, las cuales brindan una detección rápida y eficiente de los pigmentos como se mencionó anteriormente en los antecedentes.

4.4.1.1. Instrumentación de TCSPC

Por lo regular la instrumentación en la técnica TCSPC se puede dividir en:

- Diodos láser y LEDs (light-emitting diodes)

Los avances en la tecnología de semiconductores han permitido que esta clase de fuentes de excitación se conviertan en opciones rentables para las mediciones resueltas en tiempo. Estas fuentes abarcan un amplio intervalo de longitud de onda desde la región ultravioleta (250 nm) hasta la región de infrarrojo cercano (1310 nm). La Figura 4.12 ejemplifica el cuadro de selección de los intervalos de las longitudes de onda empleadas por tres clases de fuentes.^{44,129}

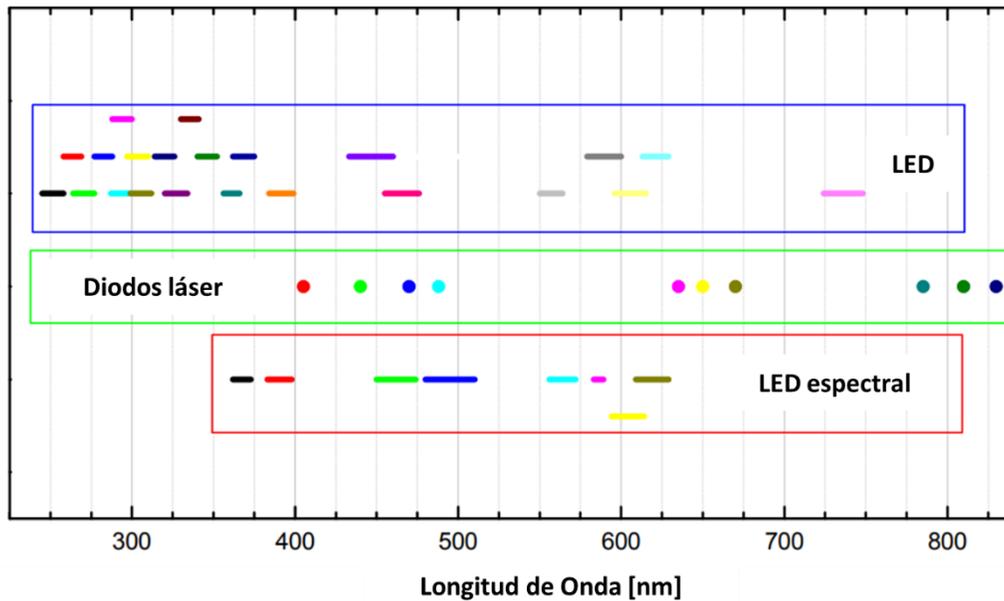


Figura 4.12. Intervalos de longitud de onda empleados por fuentes LED y diodos láser.^{44,129}

Aparte de la buena cobertura de longitud de onda, estas fuentes pueden pulsar hasta 80 MHz. Los LEDs exhiben anchos de pulso de aproximadamente 500 ps (ultravioleta) a ~1.5 ns (visible/infrarrojo cercano). En cambio, los diodos láser los cuales empleamos en este trabajo suelen tener anchos de pulso menores a 100 ps, y su costo, además del hecho de que rara vez requieren mantenimiento, los ha convertido en opciones ideales para la determinación rutinaria del tiempo de vida de fluorescencia. Por último, los LEDs espectrales (salida espectral diversa) hacen posible seleccionar una fuente de luz de diodo individual para proporcionar la banda de longitud de onda de excitación óptima para los fluoróforos en las regiones ultravioleta, visible e infrarrojo cercano. Además, de estar diseñados para medir tiempos de vida en escala de tiempo de la fosforescencia, con anchos de pulso variable lo que proporciona una potencia de hasta 0.1 mW.⁴⁴

- Detectores de fotón único

En la práctica, la detección de un solo fotón requiere de dos cosas: Primero, que el fotón se convierta en una señal electrónica y segundo, que la señal que se produzca sea más grande que el ruido. Existen detectores que tienen diferentes características en cuanto a la dispersión del tiempo de tránsito, la eficiencia de detección, el ruido y la durabilidad. Un ejemplo de ellos son los detectores de tipo fotodiodos de avalancha (APDs) como se muestra en la Figura 4.13, los cuales se caracterizan por:

- Resolución de temporización hasta < 50 ps (FWHM)
- Eficiencia de detección de hasta el 49 %
- Diferentes áreas activas de 20, 50 y 100 μm
- Altas tasas de conteo ultraestables
- Alta robustez¹³⁰

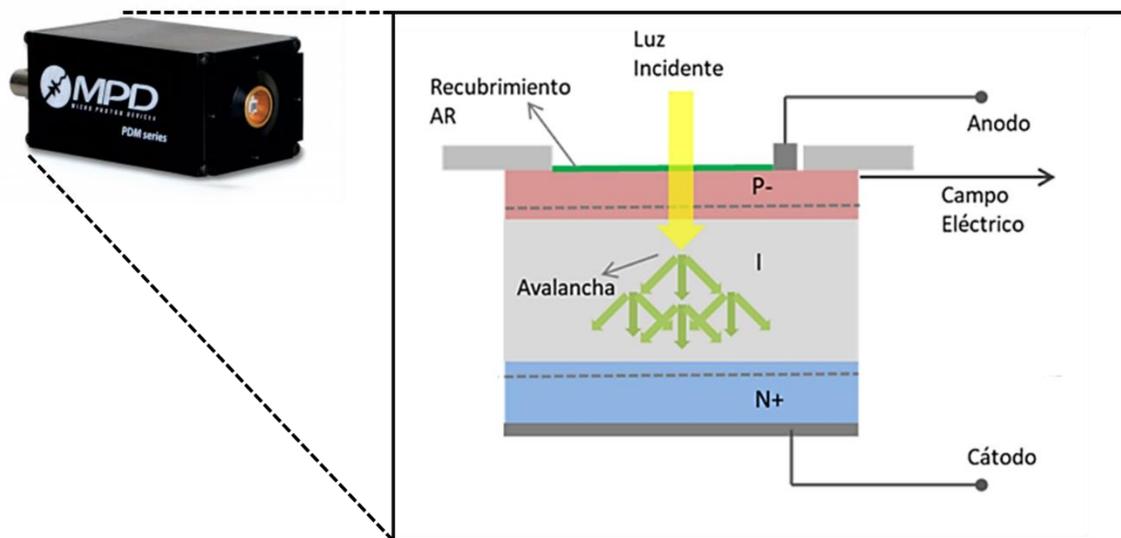


Figura 4.13. Detector APD de la serie MPD usado en nuestro trabajo

Un APD se construye a partir del contacto de dos materiales semiconductores. Estos dopados con impurezas para generar un material con portadores de carga negativa (tipo N) y carga positiva (tipo P). Además, de una zona intrínseca (I) poco conductiva. Normalmente, un APD opera bajo una condición de polarización inversa (ánodo conectado al borne negativo y cátodo conectado al borne positivo). Así que esto propicia la multiplicación en avalancha de los huecos y electrones creados por el impacto de los fotones. En otros términos, a medida

que un fotón incide en la región I y crea un par de electrones, los portadores se mueven por el alto campo eléctrico colisionando unos con otros y creando un par de electrones hueco. Este proceso se repite y se crea una avalancha que permite que la ganancia del diodo se incremente millones de veces (ganancia multiplicada hasta por un factor de 50), generando un nivel de sensibilidad alto en el detector y por ende un aumento en la detección mínima de los cromóforos.¹³¹

- Tarjeta de correlación digital

La tarjeta de correlación digital o contador de fotones que se utiliza en la configuración TCSPC de este trabajo es PicoHarp 300. Este contador de fotones tiene una alta capacidad de tasa de conteo de 10 millones de conteos/segundo, asimismo, de lograr una resolución temporal de aproximadamente 10 ps. Este instrumento posee un contador integrado que cuenta el número de fotones y el tiempo de llegada de cada uno. En la Figura 4.14, el esquema del Pico Harp ilustra el componente electrónico incorporado denominado Discriminador de fracción constante (CFD, por sus siglas en inglés *Constant Fraction Discriminator*), el cual controla el inicio y la detención de un evento de llegada de fotones (cronómetro). Como dato relevante, este componente minimiza las lecturas falsas. O sea, restringe la señal a un voltaje de umbral, lo que permite la detección de pulsos de señal por encima de cierto nivel de voltaje.

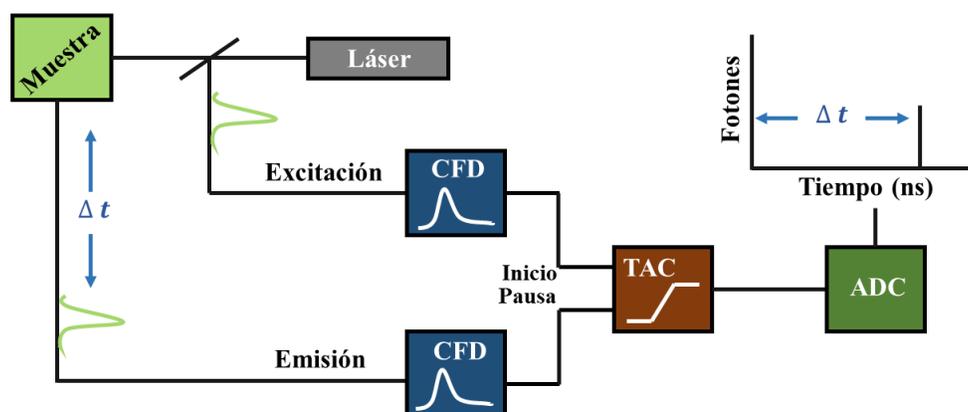


Figura 4.14. Esquema electrónico empleado en un sistema TCSPC

El tiempo de retardo se calcula pasando el tiempo de llegada tanto del pulso de excitación como del pulso de emisión a un convertidor de tiempo a amplitud (TAC, por sus siglas en inglés *time-to-amplitude converter*). Convertidor que genera una rampa de voltaje (voltaje que aumenta linealmente) con un tiempo en escalas de nanosegundos o más rápidas. La señal de inicio de la rampa de voltaje proviene del pulso de excitación y la señal de pausa proviene del fotón detectado (pulso de emisión). Después de esto, el TAC contiene un voltaje proporcional al tiempo de retardo entre las señales de excitación y emisión y si la señal no está dentro de este intervalo, el evento simplemente no se registra. Finalmente, el voltaje registrado se convierte de un valor analógico a digital el cual se almacena como un solo evento con el tiempo de retardo medido (Δt). Así que se construye el histograma del decaimiento de fluorescencia repitiendo este proceso muchas veces con un láser pulsado.

- Óptica empleada en nuestro sistema tipo confocal TCSPC

En la construcción de un sistema tipo confocal, la elección de una lente objetivo es extremadamente importante, ya que la capacidad de captación de luz de la lente (apertura numérica) y la captura de una alta fracción de fotones son factores determinantes.

La apertura numérica NA es la consideración más importante asociada con la capacidad de captación de luz de un objetivo. El valor está directamente relacionado con el semiángulo del cono colector del objetivo (α) y el índice de refracción del medio de inmersión (n) como se ilustra en la Figura 4.15. Además, de estar determinado por la Ecuación 4.33:^{129,132}

$$NA = n \sin \alpha \qquad \text{Ecuación 4.33}$$

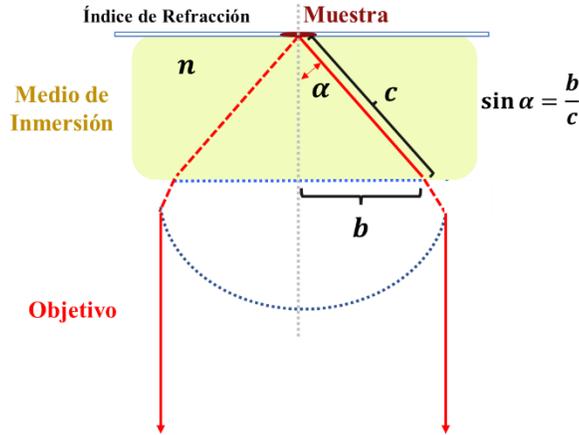


Figura 4.15. Esquema de elementos que involucran NA en un objetivo

Cabe destacar que el número de fotones que tienen la posibilidad de alcanzar y ser capturados por la lente del objetivo depende del ángulo α . Matemáticamente la captura de fotones γ de una lente objetivo se describe a partir de la Ecuación 4.34.¹³³

$$\gamma = \frac{n_{lens}}{n_{epr}} = \frac{1 - \cos\alpha}{2} = \frac{1 - \sqrt{1 - \sin^2\alpha}}{2}$$

$$\gamma = \frac{[1 - \sqrt{1 - (NA/n)^2}]}{2}$$

Ecuación 4.34

donde n_{lens} representa el número de fotones que puede ser capturado por la lente dentro de un ángulo α (Ecuación 4.35)

$$n_{lens} = n_{epr} \left[\frac{1 - \cos\alpha}{2} \right]$$

Ecuación 4.35

y n_{epr} los fotones que emiten en promedio los cromóforos, y por lo tanto se pueden usar en el registro.

$$n_{epr} = \frac{n_{emit}T}{[rT + (r-1)T_0]}$$

Ecuación 4.36

Los términos de la anterior ecuación corresponden a:

- T : Tiempo en segundos
- r : Registros de fase

- T_0 : Intervalo de tiempo entre dos registros
- n_{emit} : Fotones que emite una molécula antes de llegar a la foto-destrucción (término que se define como la conversión de S_1 a otra especie química no fluorescente).

La Figura 4.16 muestra las eficiencias de captura de fotones para diferentes medios de inmersión, como aire ($n = 1.0$), agua ($n = 1.33$) y aceite ($n = 1.51$). Los lentes de alta NA son extremadamente sensibles a la luz. Por tanto, los objetivos de alta potencia están diseñados para funcionar con aceite como medio de inmersión (lente objetivo usado en este trabajo).¹³³

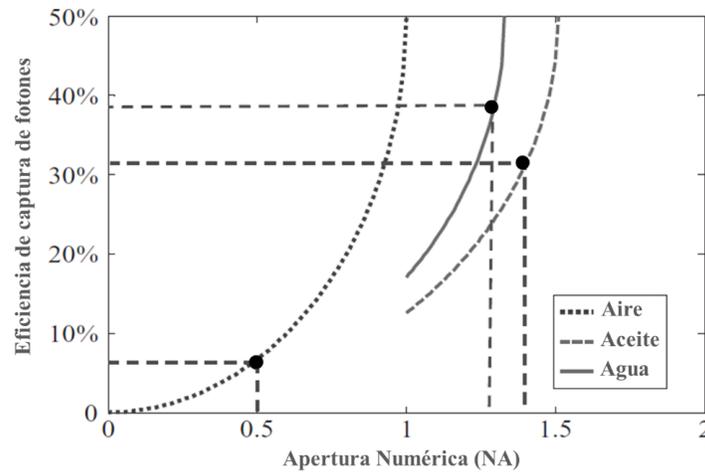


Figura 4.16. Fracción de fotones capturados por tres lentes en diferentes medios de inmersión.

Entre otros componentes básicos de un sistema tipo confocal como el que empleamos en este trabajo son: Divisores de haz, espejos, lentes y filtros para la selección de longitud de onda. Cada uno de ellos cumple una función dentro de la configuración permitiendo mediciones fiables. Estos se describen en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Componentes ópticos empleados en un sistema confocal para llevar a cabo mediciones TCSCP^{134,135}

Componente	Función
Divisor de haz	Es un componente óptico que transmite y refleja parcialmente un haz de luz incidente.
Espejos planos	Están montados sobre soportes giratorios y son ajustados para reflejar la luz en la dirección deseada.
Espejo Dicroico	Están diseñados para reflejar la luz cuya longitud de onda está por debajo de un valor específico (es decir, la longitud de onda de corte) mientras permiten que todas las demás longitudes de onda pasen a través de él sin alteraciones. En un microscopio, el espejo dicroico dirige el intervalo de longitud de onda adecuado a la muestra.
Lentes planos-cóncavos	Divergen un haz colimado y dada su distancia focal y su aberración esférica negativa, estos lentes se pueden usar para equilibrar las aberraciones de otras lentes en el sistema.
Lentes planos-convexos	Enfocan los haces de luz paralelos en un solo punto. Se pueden utilizar para enfocar, recoger y colimar la luz.
Lentes acromáticos	Están optimizados para proporcionar una distancia focal casi constante en un amplio ancho de banda. Enfocan y coliman. Además, proporcionan un rendimiento monocromático mejorado.

Es clave comentar que en nuestro sistema tipo confocal no es necesario el uso de un agujero estenopeico o “pinhole” como elemento óptico, componente relevante en un microscopio confocal y que brinda importantes ventajas en resolución espacial y contraste de imágenes, ya que excluye la luz desenfocada y proporciona una capacidad de seccionamiento óptico.¹²²

El “pinhole” presenta una desventaja para nuestro sistema, y es que elimina muchos fotones que podrían llegar al detector. Por consiguiente disminuiría la eficiencia en la captura de fotones. Razón que hace especial nuestro sistema tipo confocal, ya que con el uso de la lente objetivo de NA amplia recolectamos ~32% de fotones y no existe pérdida alguna de esos fotones capturados por el detector.¹³³

En la sección de metodología se incluye el montaje experimental tipo confocal explicado de forma detallada. En este se mencionan las características de cada elemento óptico empleado en la configuración.

4.4.2. Anisotropía de Fluorescencia

Las mediciones de Anisotropía de Fluorescencia ofrecen la posibilidad de estudiar la orientación y la movilidad de una molécula en el medio, así como los diferentes procesos que las afectan. Estas se monitorean utilizando la técnica TCSPC comúnmente usada para determinar el τ de fluorescencia como se describió antes. La técnica se basa en el principio de excitación fotoselectiva de las moléculas por luz polarizada. Comúnmente, un pulso de luz polarizada linealmente y de longitud de onda apropiada pasa por una solución. De manera que, los fluoróforos con vectores de transición de absorción alineados en paralelo al eje de polarización de la luz se excitan preferentemente. Mientras que aquellos con vectores perpendiculares no se excitan en absoluto permaneciendo en su estado electrónico basal (Figura 4.17). Por esta razón, el proceso genera una población sesgada de moléculas excitadas que tienden a relajarse o despolarizarse aleatoriamente debido a la difusión rotacional browniana o vibraciones torsionales.^{97,136}

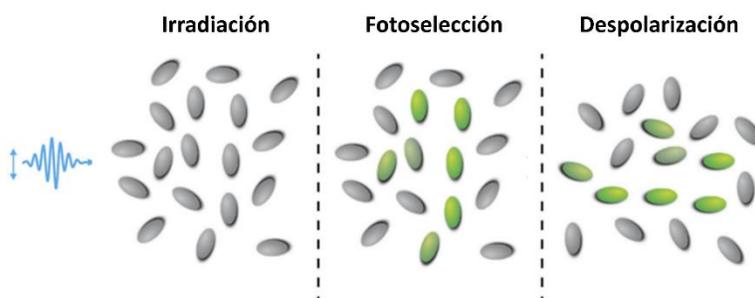


Figura 4.17. Principios de Anisotropía de Fluorescencia. La luz polarizada excita selectivamente los fluoróforos alineados a lo largo de un eje preferencial, luego ocurre la despolarización del conjunto excitado selectivamente.

En el análisis del cambio de polarización, la luz emitida se separa y se dirige a dos detectores (APDs) que miden de forma independiente la intensidad de los dos componentes de polarización, los cuales son paralelo y perpendicular al eje de excitación como se muestra en la Figura 4.18.

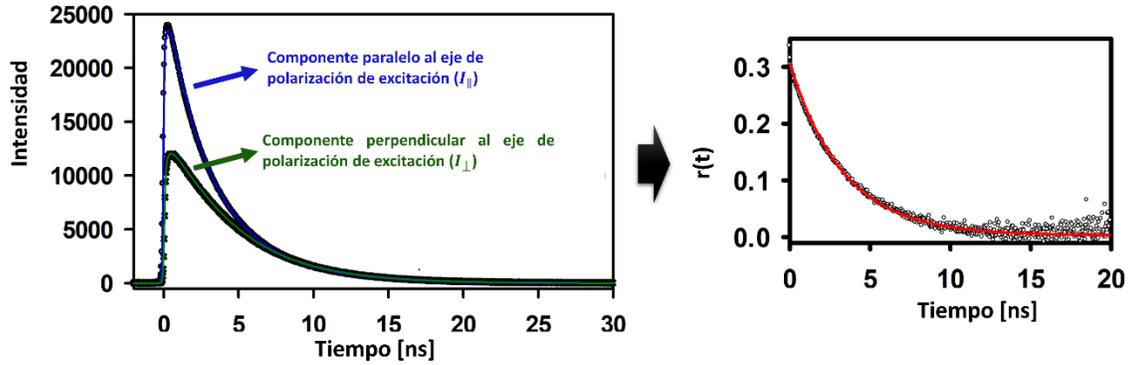


Figura 4.18. Anisotropía $r(t)$ obtenida a partir de los componentes paralelo y con respecto a la polarización de excitación.

Por lo tanto, con las dos mediciones registradas, la Anisotropía de Fluorescencia, r , se puede calcular a partir de:^{97,137,138}

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad \text{Ecuación 4.37}$$

Donde I_{\parallel} es la intensidad paralela e I_{\perp} la intensidad perpendicular al eje de polarización de excitación.

Para la fotoselección en solución isotrópica, la anisotropía fundamental (r_0) está determinada por el ángulo β entre el momento dipolar de transición de absorción y emisión. Cuando los momentos dipolares de transición de absorción o emisión son paralelos, el valor de r_0 es 0.4. Para la mayoría de los fluoróforos el valor de r_0 es inferior a 0.4, y varía con el cambio en la longitud de onda de excitación. La Ecuación 4.38 expresa a r_0 en ausencia de cualquier movimiento de difusión rotacional o transferencia de energía:⁹⁷

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \right) \quad \text{Ecuación 4.38}$$

Para un fluoróforo en solución con excitación monofotónica el valor de la Ecuación 4.38 está dentro de un intervalo de -0.2 a 0.4. La Tabla 4.2 muestra la relación entre β y la r_0 :

Tabla 4.2. Relación entre el desplazamiento angular de los momentos de transición (β) y la anisotropía fundamental (r_0).

β (Grados)	r_0
0	0.4
45	0.1
54.7	0
90	-0.2

Por Anisotropía de Fluorescencia se pueden conocer las propiedades de una molécula tales como la rigidez de su estructura, la interacción de esta con el disolvente, y el tamaño y la forma. Incluso, con la técnica se logra monitorear directamente la difusión rotacional en tiempo real a través de la evolución temporal de la anisotropía $r(t)$.^{97,136}

Desde hace tiempo en el área de fisicoquímica, el movimiento de rotación de una molécula en solución es tema de interés ya que dichos movimientos reflejan directamente las interacciones entre la molécula y el disolvente.¹³⁹ Por tal motivo, los estudios relacionados con la dinámica de rotación brindan una base para explorar la naturaleza de la fricción del disolvente, y cómo esta influye en dinámicas más complejas como reacciones químicas.¹⁴⁰ Algunos aspectos de la fricción se pueden entender fácilmente en términos de teorías hidrodinámicas, las cuales se derivan de la extrapolación del comportamiento macroscópico hasta el nivel molecular.

La teoría del movimiento rotacional de Stokes-Einstein-Debye (SED), propuesto hace un tiempo, es un modelo de este tipo. En esta teoría se estima el tiempo de reorientación de la molécula a partir de la contribución hidrodinámica ($\tau_{hydrody}$) al movimiento de rotación en un medio viscoso a través del tamaño y la forma molecular¹⁴¹. Esto con el fin de proporcionar estimaciones razonables de los tiempos de rotación de las moléculas en solución.

$$\tau_{hydrody} = \frac{\eta V f C}{k_B T} \quad \text{Ecuación 4.39}$$

La Ecuación 4.39 expresa esta teoría donde η es la viscosidad experimental del disolvente, V es el volumen molecular, k_B es la constante de Boltzmann y T es la temperatura absoluta. De la misma manera, el factor f se refiere a la asfericidad de la molécula calculada de forma

confiable a partir de los resultados de los cuerpos elipsoidales obtenidos por Perrin,¹⁴² y C depende de las condiciones de contorno hidrodinámicas ya sea por adherencia o deslizamiento.^{141,143–146}

Cabe resaltar que se pueden llegar a modelar las contribuciones hidrodinámicas considerando a las moléculas como elipsoides con diferentes coeficientes de difusión a lo largo de los tres ejes. Normalmente en la práctica experimental, en soluciones homogéneas se observan decaimientos de anisotropía monoexponencial, y esto es debido a que la diferencia de magnitud entre los tiempos de correlación de la molécula a lo largo de los diferentes ejes de rotación no es significativa, causando que el tiempo de reorientación medido exprese el promedio de los tiempos de correlación. Es por ello, que con base en esto, el tiempo de reorientación para los elipsoides se puede llegar a calcular a partir de los coeficientes de difusión D_i s usando la relación de la Ecuación 4.40.^{143,147}

$$\tau_{hd} = \frac{6}{5r_0} \left[\frac{\cos^2\theta \sin^2\theta}{3(D+D_z)} + \frac{F+G}{4(6D-2\Delta)} + \frac{F-G}{4(6D+2\Delta)} \right] \quad \text{Ecuación 4.40}$$

La cual se deriva bajo la suposición de que el dipolo de transición está en el plano de la molécula, y θ es el ángulo entre el dipolo de transición y el eje longitudinal de la molécula con:

$$D = \frac{(D_x+D_y+D_z)}{3} \quad \text{Ecuación 4.41}$$

donde D es el coeficiente de difusión medio y promedio de los coeficientes de difusión a lo largo del eje largo D_x , el eje corto en el plano D_y y el eje fuera del plano D_z ; y Δ , F y $G\Delta$ están representados como:

$$\Delta = (D_x^2 + D_y^2 + D_z^2 - D_x D_y - D_y D_z - D_z D_x)^{1/2} \quad \text{Ecuación 4.42}$$

$$F = \alpha_x^2 + \alpha_y^2 + \alpha_z^2 - \frac{1}{3} \quad \text{Ecuación 4.43}$$

$$G\Delta = D_x(\alpha_x^4 + 2\alpha_y^2\alpha_z^2) + D_y(\alpha_y^4 + 2\alpha_z^2\alpha_x^2) + D_z(\alpha_z^4 + 2\alpha_x^2\alpha_y^2) - D \quad \text{Ecuación 4.44}$$

siendo $\alpha_{x,y,z}$ los valores de los cosenos de θ con respecto a los tres ejes.^{143,147}

El éxito de esta teoría hidrodinámica resulta de la predicción de que los tiempos de rotación deben ser proporcionales a la relación η/T como se da en las mediciones realizadas dentro de un solo disolvente.¹⁴⁸ Sorprendentemente los tiempos de rotación reales predichos por la teoría SED a menudo son comparables con los tiempos de rotación medidos experimentalmente cuando el único determinante de la difusión rotacional es la fricción hidrodinámica. Es decir, la constante de proporcionalidad, que se deriva considerando únicamente el comportamiento de un cuerpo macroscópico en un fluido continuo, no está demasiado alejada de la realidad molecular.

Una de las teorías que va más allá de una descripción puramente hidrodinámica de la rotación, relaciona las desviaciones del comportamiento hidrodinámico simple con la presencia de mecanismos adicionales de fricción que no se tienen en cuenta en las descripciones hidrodinámicas. La teoría de SED se basa en un modelo continuo del disolvente. De modo que, es necesaria cualquier contribución para mejorar la comprensión de la dinámica rotacional. Es por ello que a parte de la fricción hidrodinámica (ζ_{hd}), la fricción dieléctrica (ζ_{de}) se considera como corrección macroscópica primaria y la fricción de solvatación ($\zeta_{Solvatación}$) como una corrección adicional necesaria generándose una fricción total por parte de la molécula que se expresa simbólicamente como:¹⁴⁹

$$\zeta_{Total} = \zeta_{hd} + \zeta_{de} + \zeta_{Solvatación} \quad \text{Ecuación 4.45}$$

Haciendo hincapié en que es posible que la contribución causada por la fricción dieléctrica sea más dominante en algunos sistemas y que los efectos de solvatación sean significativos en otros.

Finalmente, los modelos continuos de fricción dieléctrica conducen a una dependencia del tiempo de relajación de las propiedades dieléctricas del solvente como la constante dieléctrica (ϵ) y el tiempo de relajación (τ_D). Bajo algunas suposiciones y aproximaciones, la fricción asociada a las fuerzas dieléctricas se puede escribir como:¹⁴⁹

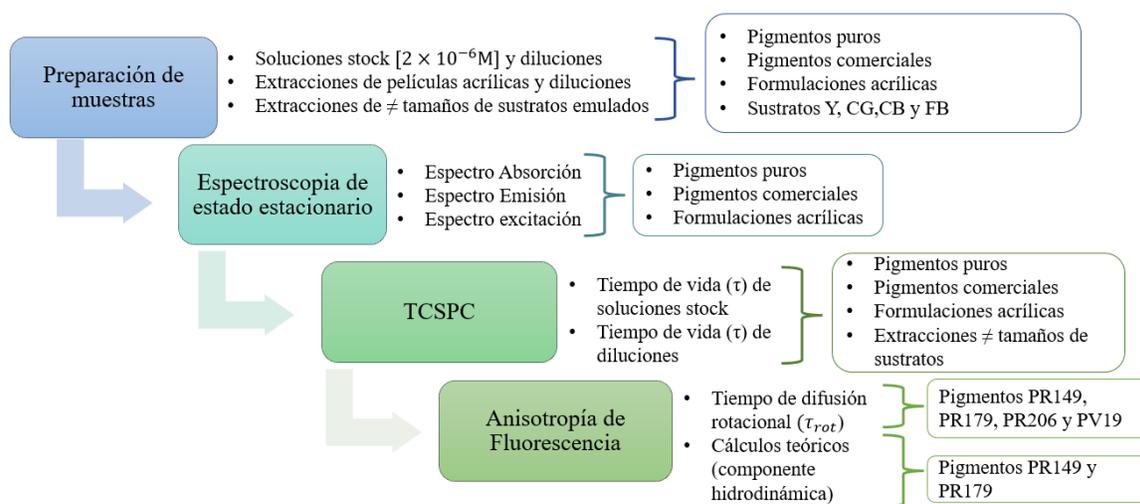
$$\zeta_{de} = A_p \frac{(\epsilon-1)}{(2\epsilon+1)^2} \tau^D \quad \text{Ecuación 4.46}$$

donde la expresión de la constante de proporcionalidad A_p depende del modelo empleado y contiene propiedades de la molécula.^{149,150}

Es primordial recalcar que los fundamentos de esta teoría proporcionan la información necesaria para explicar qué tanto influye la fricción hidrodinámica en los decaimientos de Anisotropía de Fluorescencia de los pigmentos estudiados.

5. METODOLOGÍA

Este capítulo menciona los diferentes pasos que se realizaron para conocer las propiedades intrínsecas de los pigmentos estudiados. La sección describe las estrategias empleadas para obtener datos confiables y certeros. De igual modo, esta incluye información sobre la manipulación y extracción de la muestra. Incluso, la explicación detallada de los arreglos ópticos de las técnicas TCSPC y Anisotropía de Fluorescencia, los cuales miden la emisión resuelta en tiempo de las moléculas. Además, de ser sistemas que se emplean en la identificación de los pigmentos en este trabajo. A continuación se muestra de forma esquematizada la metodología que se llevó a cabo.



5.1. Pigmentos, formulaciones acrílicas y reactivos

Se estudiaron pigmentos puros, pigmentos comerciales y formulaciones acrílicas.

- **Pigmentos puros:** Pigmento Rojo 149 (N, N'-bis(3,5 dimetilfenil)-3,4,9,10-diimida perilentetracarboxílica) y Pigmento Rojo 179 (N, N'-dimetil-3,4,9,10-perilendicarboximida) adquiridos directamente de TCI AMERICA y Sigma Aldrich, respectivamente y con pureza del $\sim 97\%$.
- **Pigmentos comerciales:** Marrón castaño-PR206 y rojo magenta-PV19 de la compañía Kremer Pigmente. Pigmentos que presentan una baja pureza y que no están contenidos dentro de una dispersión acuosa como una emulsión acrílica o matriz.

- **Formulaciones acrílicas:** Rojo de quinacridona (PV19) con #7310 de Golden acrylics, naranja oscuro de quinacridona (PR206) con #559 de Winsor & Newton acrylics, perileno marrón (PR179) con #507 de Winsor & Newton acrylics y perileno rojo con #464 de Winsor & Newton acrylics. Formulaciones que contienen el pigmento y otros componentes como espesantes, humectantes, cargas, emulsificantes, entre otros; y que están inmersos en una emulsión acrílica (composición de homopolímeros y copolímeros de ésteres de ácidos acrílico y metacrílico).¹⁵¹⁻¹⁵³

Los pigmentos comerciales y puros con sus respectivas diluciones se prepararon diariamente con concentraciones de 2×10^{-6} M.

En el proceso experimental también se usaron disolventes puros como diclorometano (CH_2Cl_2 , Sigma Aldrich, HPLC, ≥ 99.8 %), dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, para análisis de trazas inorgánicas, ≥ 99.99995 %), glicerina (Sigma Aldrich, ≥ 99.5 %) y tolueno (Sigma Aldrich, 99.9%).

Adicionalmente, las moléculas puras de los pigmentos comerciales PV19 y PR206 se obtuvieron por cromatografía en columna, técnica en la que se varió gradualmente la composición de CH_2Cl_2 y metanol en el proceso de purificación. Aquí, los espectros obtenidos de las moléculas confirmaron los datos reportados por espectrometría de masas en la literatura.¹⁵⁴⁻¹⁵⁷

5.2. Técnicas que brindan información sobre la naturaleza molecular de los pigmentos

5.2.1. RMN-¹H

Los pigmentos comerciales PV19 y PR206 en DMSO-d_6 se prepararon al momento de hacer la medición en el equipo de Resonancia Magnética Nuclear Bruker de 400 MHz). Las soluciones de concentración 20 mM se tomaron en tubos de 5 mm y con un volumen de 0.7 mL. Los datos se colectaron a una temperatura de 298 Kelvin y con un tiempo de adquisición de 64 scans. Finalmente, los datos se analizaron en el programa MestReNova 8.1.

5.2.2. DART

Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrofotómetro AccuTOFLC equipado con una fuente de ionización del controlador ionSense DART. La técnica se empleó con el fin de conocer la masa molecular establecida correlacionando el valor de m/z correspondiente al ion molecular adquirido por esta técnica de espectrometría de masas.

5.3. Preparación de muestras

5.3.1. Muestras acrílicas

Se formaron películas de 200 μm de grosor de las formulaciones acrílicas sobre un portaobjetos de vidrio (Figura 5.1) siguiendo la norma ASTM D823-25(método Blade).¹⁵⁸ Las películas se dejaron secar por una semana en la oscuridad y posteriormente se llevó a cabo la extracción y manipulación de las muestras con una aguja. Las extracciones de $\sim 0.4 \times 0.4$ mm se colocaron en microtubos con 2mL de CH_2Cl_2 o DMSO dependiendo de la solubilidad del pigmento. Luego las muestras se sonicaron por 15 minutos y se guardaron en la oscuridad durante 24 horas. En todos los casos el sobrenadante se tomó directamente del extracto para realizar la medición respectiva.

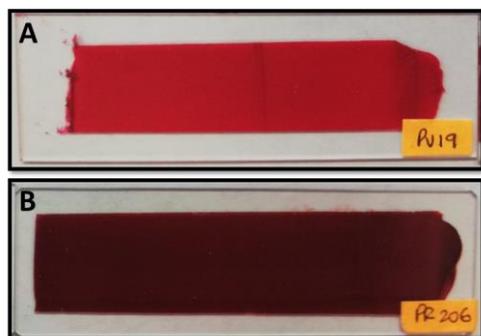


Figura 5.1. Películas de 200 μm de grosor de dos formulaciones acrílicas comerciales sobre portaobjetos de vidrio. De A) PV19 y B) PR206.

5.3.2. Sustratos

Sustratos de cemento gris y blanco con un tamaño de 80 \times 20 mm (Figura 5.2) se realizaron a partir de una mezcla de agua/cemento de 50 g de agua y 125 g de cemento. Para estas muestras se hizo un curado rápido utilizando un baño de agua a una temperatura de 25 ± 3 °C

durante tres horas. Las muestras se secaron y curaron en el laboratorio en un lugar húmedo. Esto con el fin evitar cambios extremos de temperatura que perjudicaran el curado del cemento durante unos días.

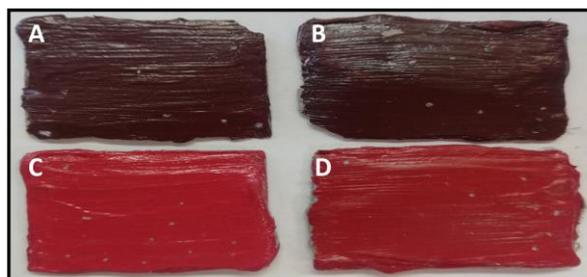


Figura 5.2. Sustratos de cemento gris de 80 × 20 mm De A) PR179 B) PR206 C) PV19 D) PR149.

Por otro lado, para las superficies de yeso se mezcló una parte de agua con tres de yeso seco obteniendo una contextura homogénea. Una vez obtenida la mezcla se formaron placas con un tamaño de 80 × 20 mm aplicando con espátula el yeso a superficies de cartón, las cuales tardaron 48 horas en secar.

Finalmente, un panel de fibrocemento (registrado por la empresa Mexalit Industrias S.A. de C.V. y Grupo Eureka marca Cenpanel Procovers) también se usó como sustrato. A este se realizaron cortes de 30 × 15 cm humedeciendo la superficie con agua destilada para evitar la abundancia de partículas de fibrocemento en el aire. Uno de los cortes se empleó como sustrato para la aplicación de las formulaciones acrílicas (Figura 5.3). La empresa que registró el panel de fibrocemento suministró al pintor David Alfaro Siqueiros paneles para su producción de murales durante las décadas de los sesenta y setenta.¹⁵⁹

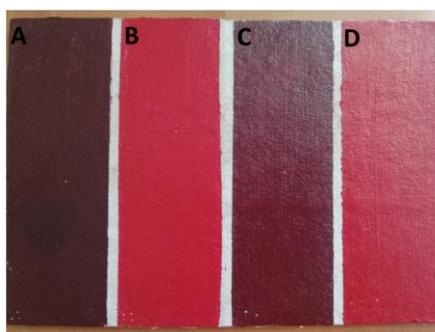


Figura 5.3. Panel de fibrocemento empleado como sustrato para las diferentes formulaciones acrílicas. A) PR206 B) PV19 C) PR179 y D) PR149.

Una vez formados los sustratos, se aplicó a cada superficie las formulaciones acrílicas obteniendo recubrimientos de aproximadamente $200\ \mu\text{m}$ de espesor tal y como se realizó con las muestras acrílicas. Después del secado, con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ 1500 con aumentos finales de 7.5 a 112x) se ejecutó la extracción y manipulación de las muestras de tamaño lateral inferior a $100\ \mu\text{m}$ (Figura 5.4). Realizados los cortes, las muestras se disolvieron en un volumen de $50\ \mu\text{L}$ del respectivo disolvente para llevar a cabo las mediciones de emisión resueltas en tiempo.

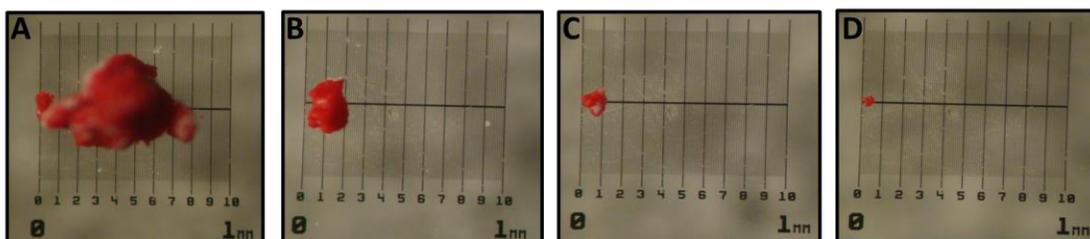


Figura 5.4. Cortes de muestras con ayuda de un microscopio estereoscópico. De A) 0.75 mm B) 0.18 mm C) $100\ \mu\text{m}$ D) $40\ \mu\text{m}$.

Cabe mencionar, que para muestras microscópicas inferiores a $100\ \mu\text{m}$ se realizó un proceso de transferencia a otros disolventes para eliminar cambios en la concentración por efectos de evaporación durante la medición. Transferencia a otros disolventes realizadas solo a soluciones que contenían perilenos como pigmentos (solubles en CH_2Cl_2).

5.4. Espectroscopia de estado estacionario

Los espectros de absorción, emisión y excitación se obtuvieron en un espectrofotómetro Cary-50 (Varian) y un fluorímetro Cary Eclipse (Varian) respectivamente. Todos los espectros se tomaron a temperatura ambiente ($20 \pm 1\ ^\circ\text{C}$) en una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Los rendimientos de fluorescencia (φ_f) y los coeficientes de absortividad molar para los pigmentos (ε) fueron determinados por estas técnicas espectroscópicas y las Ecuaciones 4.12 y 4.13 expuestas en el capítulo anterior.

5.5. Espectroscopia resuelta en tiempo

5.5.1. TCSPC

Las moléculas de este trabajo presentan estados excitados de primer singulete altamente emisivos con tiempos de vida de varios nanosegundos. El uso de TCSPC ayudó a resolver la dinámica de estos pigmentos en esta escala de tiempo. La Figura 5.5 muestra un diagrama detallado de la configuración óptica, la cual es similar a un microscopio confocal construido junto con un sistema TCSPC. Como se muestra, la configuración consta de tres fuentes de excitación de 354 nm, 405 nm y 485 nm. En nuestro estudio, la fuente de excitación que consiste en un láser pulsado de picosegundos de 485 nm y con una frecuencia de repetición de 10 MHz fue la seleccionada para irradiar los cromóforos. Con esta fuente se excitaron las soluciones de los diferentes pigmentos posicionados en medio de un par de portaobjetos con el fin de minimizar el volumen de muestra necesario a $\sim 1\mu\text{L}$. Una vez excitado el pigmento, por un camino óptico compuesto por varios elementos, la fluorescencia de este se recolectó con un objetivo Nikon Plan Apo VC 60X/1.4 de inmersión en aceite. La emisión de fluorescencia recolectada se filtró a través de un espejo dichroico de 510 nm. Este espejo eliminó los fotones de excitación residuales, y dirigió y enfocó el haz con una lente de distancia focal de 30 mm al APD. En esta parte del sistema, los pulsos láser fueron sincronizados por un controlador láser (PDL-800-D, PicoQuant) y el APD, los cuales se encontraban conectados a una tarjeta de correlación digital (PicoHarp 300). Un software especializado de adquisición de datos SymphoTime 64 de la compañía PicoQuant permitió registrar los histogramas (eventos de excitación-emisión). Finalmente, el análisis de las trazas obtenidas se realizó considerando decaimientos exponenciales convolucionados con la función de respuesta del instrumento (IRF) medida a partir de fluoresceína apagada por exceso de NaI en una solución tampón. Análisis que se realizaron por triplicado a soluciones preparadas de forma independiente con la finalidad de conocer la incertidumbre de los tiempos de vida de los pigmentos.

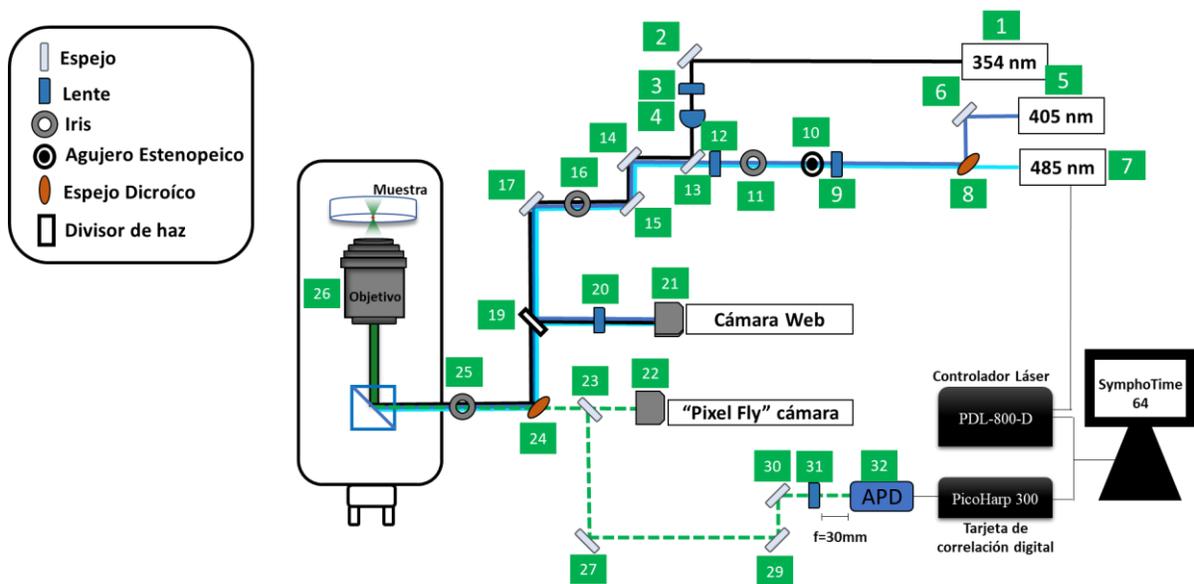


Figura 5.5. Configuración para las mediciones de recuento de fotones individuales correlacionados en tiempo.

Tabla 5.1. Componentes de la configuración para el conteo de fotones individuales correlacionados en tiempo.

No.	COMPONENTE	NOMBRE	CARACTERÍSTICAS	PROVEEDOR
1	Láser de 354 nm	LDH-P-FA-355	355nm \pm 1nm, <80ps FWHM, Potencia promedio >1mW,	PicoQuant
2	Espejo plano	PF10-03-F01	Espejo de aluminio mejorado con UV	Thorlabs
3	Lente plano-cóncavo	LC1715	Lente NBK-7 (f = -50.0mm)	Thorlabs
4	Lente plano-convexo	LA1461	Lente NBK-7 (f = 249.2mm)	Thorlabs
5	Láser de 405 nm	LDH-D-C-405	405nm \pm 10nm, <50ps FWHM, Potencia promedio 3mW (en los ajustes de frecuencia de repetición e intensidad máxima)	PicoQuant
6	Espejo plano	PF10-03-F01	Espejo de aluminio mejorado con UV	Thorlabs
7	Láser de 485 nm	LDH-D-C-485	485nm \pm 10nm, <110ps FWHM, Potencia promedio 5mW (en los ajustes de frecuencia de repetición e intensidad máxima)	PicoQuant
8	Espejo dicróico	DMLP425	Espejo dicróico de paso largo "longpass" con corte en 425nm	Thorlabs
9	Lente plano-convexo	LA1951	Lente NBK-7 (f = 25.3mm)	Thorlabs
10	Agujero estenoico	P100K	Agujero de acero inoxidable $\varnothing=100\mu\text{m} \pm 4\mu\text{m}$	Thorlabs
11	Iris	D25SZ	$\varnothing=25\text{mm}$ Apertura máxima	Thorlabs
12	Lente plano-convexo	LA1461	Lente NBK-7 (f = 249.2mm)	Thorlabs

No.	COMPONENTE	NOMBRE	CARACTERÍSTICAS	PROVEEDOR
13	Espejo plano	PF10-03-F01	Espejo de aluminio con protección UV y montura <i>flip</i>	Thorlabs
14	Espejo plano	PF10-03-F01	Espejo de aluminio con protección UV y montura <i>flip</i>	Thorlabs
15	Espejo plano	PF10-03-F01	Espejo de aluminio con protección UV y montura <i>flip</i>	Thorlabs
16	Iris	D25SZ	Ø= 25mm Apertura máxima	Thorlabs
17	Espejo plano	PF10-03-F01	Espejo de aluminio con protección UV y montura <i>flip</i>	Thorlabs
19	Divisor de haz	BP108	Minimizan la dispersión cromática para longitudes de 400-2400nm, 8:92 (R:T)	Thorlabs
20	Lente plano-convexo	LA1484	Lente NBK-7 (f = 300mm)	Thorlabs
21	Cámara CCD	Logitech	Cámara CCD de baja resolución	Logitech
22	Cámara CCD	pco.pixelfly usb	Cámara CCD ultracompacta de 14 bits	PCO
23	Espejo plano	BB1-E02	Espejo dieléctrico de banda ancha 400-750nm	Thorlabs
24	Espejo Dicroico	ZT405/473-491/NIRrpc	Espejo dicroico de ventana multipaso	Chroma
25	Iris	D25SZ	Ø= 25mm Apertura máxima	Thorlabs
26	Objetivo	CFI60 SuperFluor	Lente de objetivo de inmersión en aceite 60X/1.4 NA	Nikon
27	Espejo plano	BB1-E02	Espejo dieléctrico de banda ancha 400-750nm	Thorlabs
29	Espejo plano	BB1-E02	Espejo dieléctrico de banda ancha 400-750nm	Thorlabs
30	Espejo plano	BB1-E02	Espejo dieléctrico de banda ancha 400-750nm	Thorlabs
31	Lente acromático	AC254-030-A-ML	Lente doble acromática (f = 30 mm) Recubrimiento BBAR: 400-700 nm	Thorlabs
32	Fotodiodo de avalancha	MPD	Diodo de avalancha de fotón único de bajo ruido	Microphoton Devices

La Figura 5.5 muestra los componentes empleados en la configuración óptica. Estos son denotados con números los cuales se muestran en la Tabla 5.1. Tabla que muestra las características, el proveedor, el fabricante y el nombre del componente óptico. Cabe decir, que el “pinhole” solo se usa con fines de alineación en los experimentos.

5.5.2. Anisotropía de Fluorescencia

El tiempo de difusión rotacional de los pigmentos en solución relacionado con la emisión resuelta en tiempo puede ser determinado por Anisotropía de Fluorescencia. Para realizar estas mediciones, los experimentos se llevaron a cabo con la misma configuración óptica de TCSPC. En este caso, el haz de excitación de 485 nm se envió al sistema tipo confocal

descrito anteriormente. Sin embargo antes de pasar por la muestra, un polarizador se posiciono justo antes del espejo dicróico de 510 nm como se muestra en la Figura 5.6. Una vez que la muestra emitió fluorescencia, los componentes paralelos y perpendiculares de la emisión se detectaron separando los dos componentes por un cubo divisor de haz polarizador, el cual también se incluyó en el camino óptico. Posteriormente, cada componente se envió y enfocó por las lentes acromáticas a los dos APDs. La Figura 5.6 y la Tabla 5.2 muestran los componente ópticos añadidos.

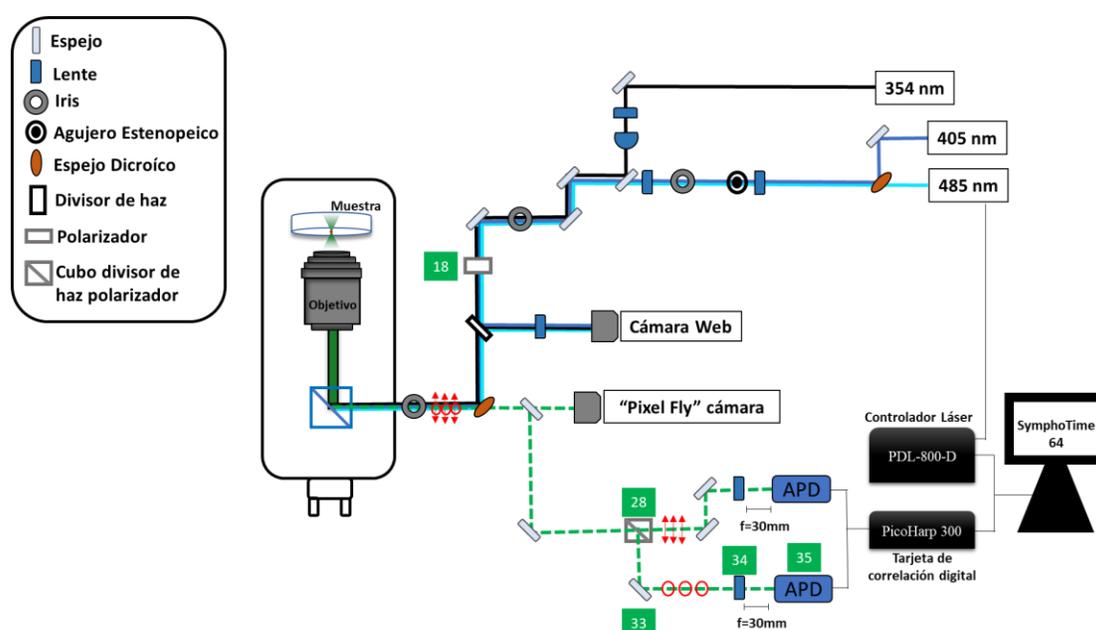


Figura 5.6. Configuración para las mediciones de Anisotropía de Fluorescencia.

Tabla 5.2. Componentes de la configuración para Anisotropía de Fluorescencia

No.	COMPONENTE	NOMBRE	CARACTERÍSTICAS	PROVEEDOR
18	Polarizador lineal	LPVISE100-A	Polarizador lineal 400-750nm	Thorlabs
28	Cubo polarizador	PBS251	Cubo divisor de haz polarizador que refleja la luz polarizada s, mientras transmite la luz polarizada p 420-680nm	Thorlabs
33	Espejo plano	BB1-E02	Espejo dieléctrico de banda ancha 400-750nm	Thorlabs
34	Lente acromático	AC254-030-A-ML	Lente doble acromática (f=30mm) Recubrimiento BBAR: 400-700nm	Thorlabs
35	Fotodiodo de avalancha	MPD	Diodo de avalancha de fotón único de bajo ruido	Microphoton Devices

5.6. Cálculos computacionales

La contribución hidrodinámica de los tiempos de reorientación de los perilenos (Pigmento Rojo 149 y Pigmento Rojo 179) se calculó utilizando los respectivos coeficientes de difusión rotacional molecular. A partir de estos cálculos se logró estimar las dimensiones de los tres radios axiales para los coeficientes de relajación rotacional. Incluso, se evaluó la diferencia de los tiempos de difusión rotacional de ambas moléculas que presentan tiempos de vida de emisión semejantes pero volúmenes hidrodinámicos diferentes. Por otro lado, las direcciones de los momentos de transición y otros parámetros geométricos también se calcularon con estructuras obtenidas del paquete de software Gaussian 16.¹⁶⁰ La geometrías de equilibrio del estado fundamental se optimizaron utilizando el funcional PBE0 y el conjunto base 6-311++ G (d,p).¹⁶¹⁻¹⁶⁴ Cabe decir que todos los cálculos se realizaron con un modelo de solvatación implícito, PCM (Modelo continuo polarizable) en DMSO. Por el método TD-DFT con el mismo conjunto funcional y base se obtuvo la dirección de los dipolos de transición S_1-S_0 ¹⁶¹⁻¹⁶⁴, y para lograr esto se optimizaron las geometrías de equilibrio en el primer estado excitado singulete, geometrías que se corroboraron previamente por un análisis de frecuencia. Finalmente, los volúmenes moleculares y los tamaños de los ejes se calcularon considerando un contorno de 0.0035 electrones/bohr³.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se consideran los diferentes resultados obtenidos en la identificación de cuatro pigmentos rojos. En primera instancia se comprueba la naturaleza molecular de cada uno por las técnicas de DART y RMN-¹H. Después, a partir de espectroscopia de estado estacionario se logra tener una noción sobre el estado emisivo de las moléculas dando paso al estudio por espectroscopia resuelta en tiempo. Con esta última técnica se genera un esquema sistemático en la identificación de pigmentos por diversas metodologías de muestreo. Además, de manipular los parámetros y las condiciones del experimento con el fin de distinguir y clasificar las moléculas considerando muestras de la menor dimensión posible, y buscando arreglos experimentales que maximicen la capacidad de detectar los pigmentos por sus señales de decaimiento del primer estado excitado.

Tal como se mencionó en los antecedentes, algunos artistas hasta la fecha han empleado formulaciones acrílicas de color rojo a las obras artísticas.^{8,13-15,22,49,50} Estas formulaciones se analizaron en este trabajo y abarcan tonalidades que las hacen tener semejanzas en apariencia entre algunas de ellas como se ilustra en la Figura 6.1. En esta figura se muestra la apariencia de aplicaciones secas de formulaciones de PR206 la cual exhibe semejanzas con PR179 y la de PV19 que es semejante a la de PR149.

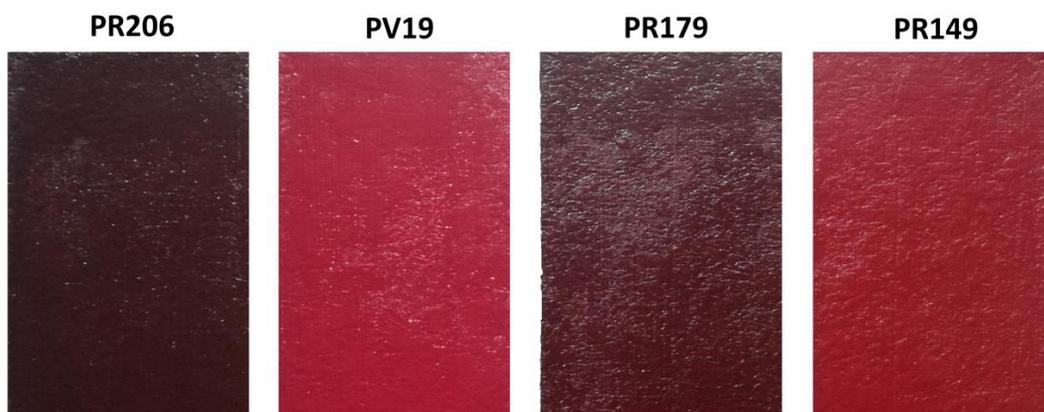


Figura 6.1. Muestras de formulaciones acrílicas sobre una placa de fibrocemento estudiadas en este trabajo.

Antes de llevar a cabo el estudio de identificación por las diferentes técnicas, la identidad de los pigmentos se confirmó por los datos proporcionados a partir de la técnica de

espectroscopía DART. Una técnica que utiliza velocidades de adquisición de datos rápidas, simplicidad de diseño, amplia gama de masas observadas y mediciones de masas exactas que brindan información precisa.¹⁶⁵ La sección de anexos muestra la relación masa-carga (m/z) característica de cada pigmento. Picos abundantes correspondientes a $[M+H]^+$ de 313 para la quinacridona, 599 para el Pigmento Rojo 149 y 419 para el Pigmento Rojo 179. Además, se muestran otros datos reportados por las señales de RMN-¹H. Estas señales integradas determinan las cantidades relativas de los componentes de las formulaciones comerciales PV19 y PR206. Señales que permiten obtener una relación 80:20 de quinacridona:quinacridonaquinona en la formulación comercial PR206 y que se obtienen a partir de un doblete en 8.25 ppm como señal de referencia (Anexos).

En este trabajo, los pigmentos presentes en las formulaciones acrílicas muestran una conjugación aromática extendida en sistemas fusionados perilénicos o pentacénicos. Como se mostrará más adelante, los pigmentos se caracterizan por presentar un componente emisivo de larga duración que es característico de cada uno. Este componente coincide para los pigmentos puros y extraídos de las formulaciones como se verá en la siguiente sección.

6.1. Espectroscopia de estado estacionario

Por espectroscopia de estado estacionario se identificó el componente emisivo de cada pigmento en concentraciones superiores a 10^{-5} M. La Figura 6.2 (principal) ilustra los espectros de absorción, emisión y excitación de los cuatro cromóforos puros, mientras que los recuadros en la figura incluyen comparaciones entre los espectros de emisión y excitación de los pigmentos puros y los extraídos directamente de las películas de las formulaciones acrílicas.

Los cromóforos de los perilenos (Pigmento Rojo 149 y Pigmento Rojo 179) en CH_2Cl_2 incluidos en A y B de la Figura 6.2 y que dan la misma tonalidad a las formulaciones acrílicas son la únicas especies detectadas. Como se muestra en la figura, para ambas moléculas la posición del máximo de absorción y sus progresiones son casi idénticas, y la diferencia entre

ambos espectros es tan solo de 4 nm (536 nm para el Pigmento Rojo 149 y 532 nm para el Pigmento Rojo 179).

Por otro lado, para PV19 y PR206 se identifica la especie emisiva quinacridona en las extracciones con DMSO (C de la Figura 6.2). La quinacridona se encuentra como único componente en la formulación acrílica PV19 y hace parte de la formulación PR206. Esto está indicado en la información de la ficha técnica de Kremer Pigmente¹⁶⁶ y fue comprobado con los espectros de RMN-¹H reportados en los anexos. Estos datos validan que la formulación acrílica PR206 es una mezcla de quinacridona y quinacridonaquinona.

Es importante mencionar que pese a que la quinacridona forma parte de la mezcla, esta no fluoresce y no se extrae por DMSO debido a su baja solubilidad. Esto se comprueba en el recuadro D mostrado de la Figura 6.2. Esta figura ilustra una coincidencia de los máximos en los espectros de emisión y excitación de la quinacridona en su estado puro y extraído de la película acrílica de la formulación PR206.

Por último, entre otros factores que se observan en la Figura 6.2, la quinacridona muestra una estructura de imagen especular con máximos de absorción y emisión en 523 y 539 nm respectivamente. Este comportamiento también se distingue en los espectros de absorción y emisión para los perilenos (Pigmento Rojo 149 y Pigmento Rojo 179).

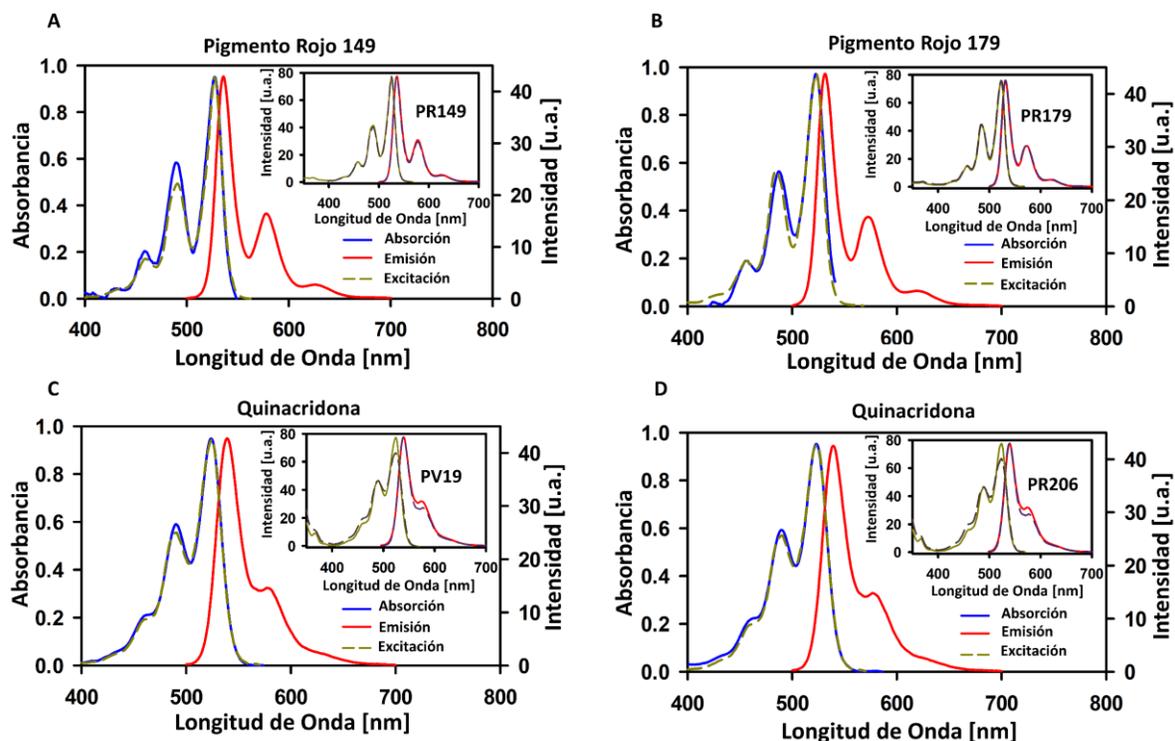


Figura 6.2. Espectros de absorción (líneas azules), emisión (líneas rojas) y excitación (líneas verdes discontinuas) de los pigmentos de este estudio. Los recuadros muestran una comparación entre los espectros de emisión y excitación de los pigmentos puros (líneas sólidas) y las soluciones que resultan de las extracciones de las películas de las formulaciones acrílicas (líneas discontinuas). A) Pigmento Rojo 149 y B) Pigmento Rojo 179 en CH_2Cl_2 C) quinacridona y D) quinacridona extraída de la formulación acrílica PR206 en DMSO. La gráfica principal en D corresponde a la molécula de quinacridona purificada a partir de la formulación comercial. La longitud de onda de excitación fue de 490 nm y la longitud de onda de emisión fue de 580 nm en todos los casos.

Ahora bien, los espectros de absorción, emisión y excitación de los pigmentos extraídos directamente de las películas acrílicas así como los pigmentos comerciales se muestran en la Figura 6.3. Aquí, los espectros de absorción para todos los casos muestran la presencia de componentes adicionales que se encuentran dispersos en la solución (diferencia entre espectros de absorción y excitación). Tal es el caso del PR206 comercial, el cual exhibe en su espectro de absorción la banda característica de la quinacridonaquinona. Esta banda está centrada a 430 nm y se encuentra superpuesta en el espectro de la molécula quinacridona.¹⁶⁷

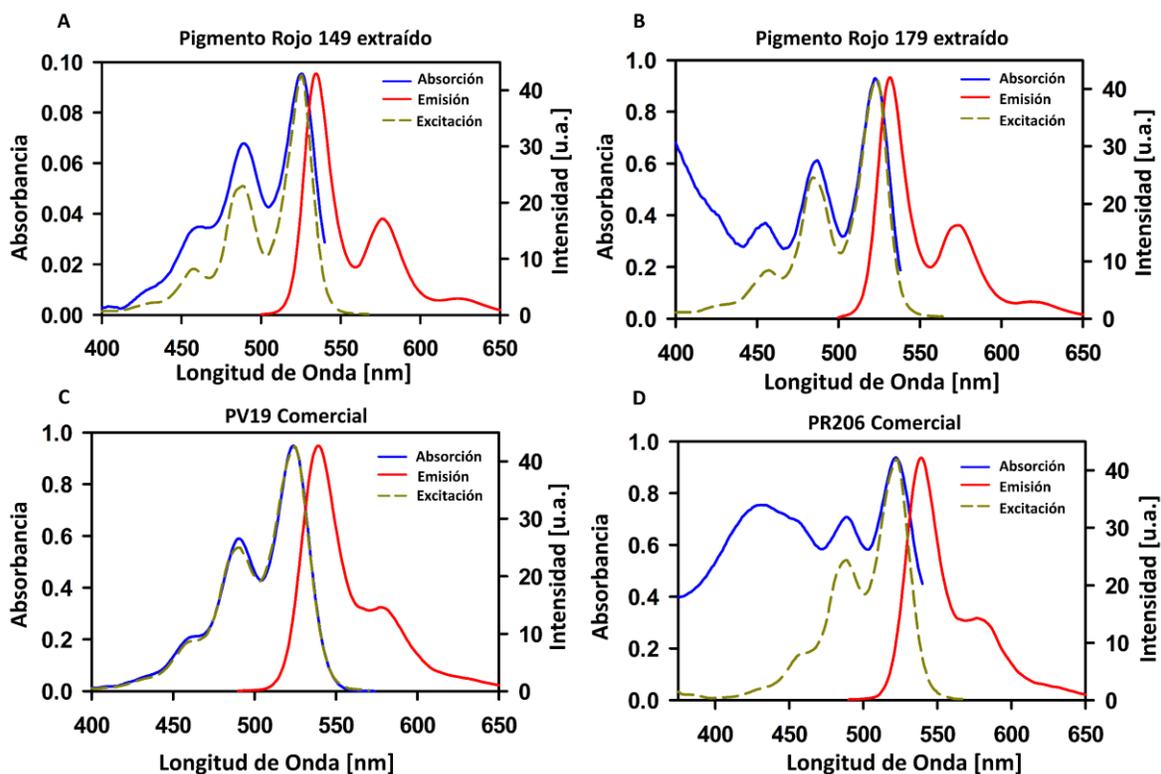


Figura 6.3. Espectros de absorción (líneas azules), emisión (líneas rojas) y excitación (líneas verdes discontinuas) de los pigmentos extraídos a partir de las películas de las formulaciones acrílicas A) Pigmento Rojo 149 extraído y B) Pigmento Rojo 179 extraído. Los experimentos se realizaron con una longitud de onda de excitación de 490 nm y una longitud de onda de emisión de 580 nm. Pigmentos comerciales C) PV19 y D) PR206 los experimentos se realizaron con una longitud de onda de excitación de 480 nm y una longitud de onda de emisión de 580 nm.

Por espectroscopia de estado estacionario no solo se determinan las características emisivas de los pigmentos, también se conocen los datos espectroscópicos como el coeficiente de absorptividad molar ε y el rendimiento de fluorescencia φ_f de cada una de las moléculas. La Tabla 6.1 expone los valores de los parámetros calculados por las Ecuaciones 4.12 y 4.13, donde la molécula 9,10-difenilantraceno en etanol (φ_f de 0.95)^{168,169} fue tomada como estándar en las mediciones de φ_f .

Tabla 6.1. Coeficientes de absortividad molar y rendimientos de fluorescencia de los cromóforos

	Absorción		Emisión	
	$\lambda_{max}(nm)$	$\epsilon(dm^3mol^{-1}cm^{-1})$	$\lambda_{max}(nm)$	φ_f
Pigmento Rojo 149 (PR149)	527	11048 (490)	536	0.96
Pigmento Rojo 179 (PR179)	523	2891 (490)	532	0.96
Quinacridona (PV19 y PR206)	524	7036 (490)	539	0.99

Los valores indicados en la tabla con respecto a los parámetros de ϵ y φ_f son comparables con los valores reportados en la literatura para estos cromóforos.^{170,171,172,173} Por tanto, estos datos espectroscópicos son otra forma de validar la identidad de los pigmentos de este estudio.

6.2. TCSPC

6.2.1. Tiempos de vida de característicos de los pigmentos puros por TCSPC

Con nuestro sistema tipo confocal (o pseudo-confocal) se logró estudiar las especies emisivas de los pigmentos de este estudio. Por TCSPC se realizó un estudio sistemático con el fin de identificar los pigmentos en diferentes intervalos de concentración y tamaños de muestra. En este proceso se produjeron trazas reproducibles de al menos cuatro órdenes de magnitud más pequeñas en concentración que las reportadas por espectroscopia estática ($\sim 10^{-5}$ M). La Figura 6.4 presenta las trazas de las soluciones de los cuatro pigmentos puros donde en cada traza se identifica el decaimiento correspondiente al tiempo de vida de fluorescencia. Estos valores se obtuvieron a partir de los ajustes monoexponenciales convolucionados con la IRF generando τ cortos (perilenos) o largos (quinacridona) dependiendo de la molécula:

- Pigmento Rojo 149: 3.50 ± 0.25 ns en CH_2Cl_2
- Pigmento Rojo 179: 3.90 ± 0.29 ns en CH_2Cl_2
- Quinacridona: 17.70 ± 0.24 ns en DMSO

Con base en lo anterior, las incertidumbres de los tiempos de vida de los pigmentos se determinaron a partir del triplicado de cada solución preparada de forma independiente, la cual se midió y analizó bajo el mismo sistema óptico experimental.

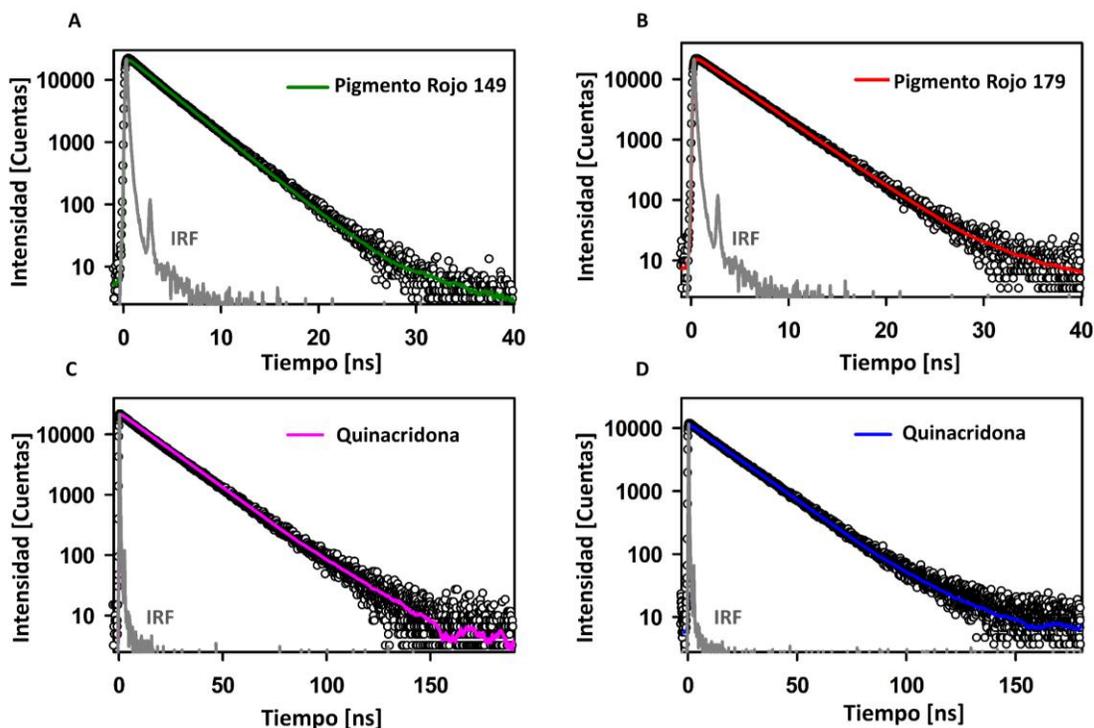


Figura 6.4. Trazas de TCSPC de los pigmentos puros excitados a 485 nm. A) Pigmento Rojo 149 B) Pigmento Rojo 179 en CH_2Cl_2 C) quinacridona en PV19 y D) quinacridona en PR206 en DMSO. Los ajustes monoexponenciales convolucionados con la IRF se denotan como líneas sólidas de color.

6.2.2. Grado de dilución en el que se puede identificar el tiempo de vida del pigmento por TCSPC

Una vez caracterizado el tiempo de vida de cada pigmento, se llevaron a cabo mediciones de las muestras extraídas de las películas de las cuatro formulaciones acrílicas. Esto con el fin de estimar el tamaño mínimo del fragmento extraído donde el pigmento rojo se podía identificar. La Figura 6.5 muestra las trazas de las diluciones hechas a partir de las extracciones. Tal y como se observa en la figura, los pigmentos extraídos con sus respectivas diluciones se distinguen fácilmente a diferentes concentraciones hasta las trazas correspondientes a concentraciones de 10^{-9} M y 10^{-8} M (concentración límite de 10^{-9} M para

el Pigmento Rojo 149 y la quinacridona en PR206 y PV19, y 10^{-8} M para el perileno Pigmento Rojo 179).

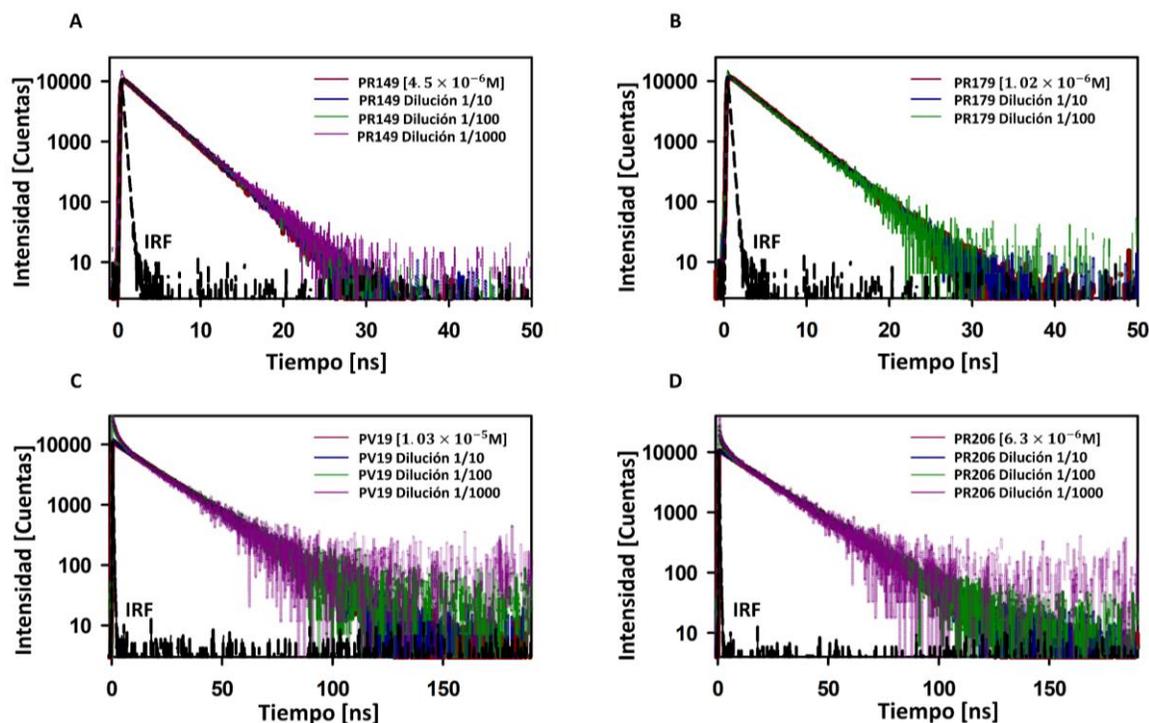


Figura 6.5. Trazas de TCSPC de las extracciones de las formulaciones acrílicas y sus respectivas diluciones a una longitud de excitación a 485 nm. A) Pigmento Rojo 149 B) Pigmento Rojo 179 en CH_2Cl_2 C) quinacridona en PV19 y D) quinacridona en PR206 en DMSO.

El resumen de los datos obtenidos a diferentes concentraciones se encuentra en las Tablas 8.1 a 8.4 de la sección de anexos. Cada tabla reporta valores de decaimiento de la intensidad de fluorescencia de los pigmentos hasta cierto límite de concentración, ya sea 10^{-8} M o 10^{-9} M. Para los casos de PV19 y PR206 a las concentraciones menores se empleó un ajuste biexponencial, en donde el tiempo de vida del componente mayoritario corresponde al τ del pigmento (17.70 ns.), y el minoritario (pequeño pico en tiempos cercanos a cero) se asocia a la dispersión de la solución en DMSO (<200 ps). En esta parte del estudio, las soluciones más diluidas de los valores límite mencionados muestran tiempos de vida que se desvían de los valores reales de las constantes de tiempo de los pigmentos puros. Por tanto, son excluidos del análisis tal como se representa con un color rojo en las tablas de la sección de anexos. En otras palabras, a diluciones mayores ya no se observan los tiempos de vida característicos de

los pigmentos, valores que son diferentes a los reportados por los pigmentos puros en la anterior subsección y que no abarcan el intervalo de incertidumbre de cada tiempo de vida.

Adicionalmente, con los datos obtenidos de los coeficientes de absorptividad molar y los máximos de absorbancia por espectroscopia de estado estacionario, se determinan las concentraciones respectivas a cada fragmento extraído. Concentraciones con valores de 10^{-5} M y 10^{-6} M (como se muestran en la Figura 6.5 y las Tablas 8.1 a 8.4) partiendo de muestras extraídas de $0.4 \text{ mm} \times 0.4 \text{ mm}$, y diluidas en volúmenes de 2 mL de CH_2Cl_2 o DMSO según el caso.

6.2.3. Sistemas: tipo confocal vs arreglo lateral

Uno de los objetivos del presente estudio es la instalación de un sistema de emisión-excitación con elevada fracción de fotones colectados para mejorar la detección de los pigmentos por sus tiempos de vida de fluorescencia. En las mediciones TCSPC el sistema tipo confocal junto con el objetivo de 1.4 NA permite una mejor sensibilidad si se compara con arreglos laterales como se muestra en la Figura 6.6, la cual ilustra las direcciones de los fotones emitidos por un cromóforo y la fracción capturada por la lente del objetivo en cada sistema. Además de mostrar cómo influye el índice de refracción del medio en la captura de los fotones, donde el medio de inmersión elimina cualquier reflexión originada (A en la Figura 6.6.) y la refracción entre la celda y el aire provoca que se pierdan fotones (B en Figura 6.6.).

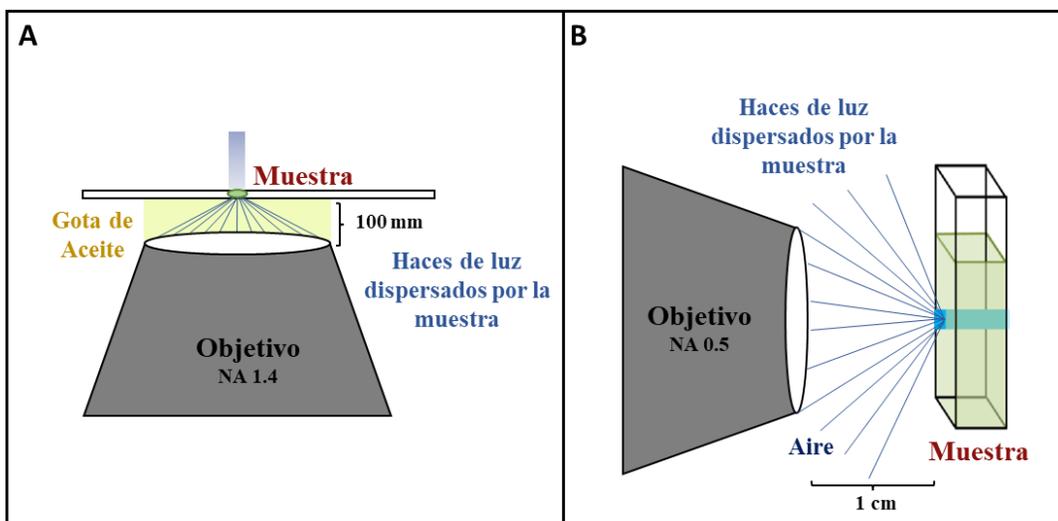


Figura 6.6. Comparación de sistemas de captura de fotones A) Tipo confocal o pseudo-confocal B) Arreglo lateral.

La diferencia en la captura de fotones entre ambos sistemas no solo se exhibe de forma ilustrativa, también se demuestra por el porcentaje de fotones capturados, valores que se obtienen a partir de la Ecuación 4.34 reportada en la sección del marco teórico. Valores que representan un 32% para el sistema tipo confocal o pseudo-confocal y un 6.6% para el arreglo lateral, dato cinco veces menor comparado con el sistema tipo confocal.

Incluso si se realiza una comparación de estos dos sistemas en cuentas/segundo se presenta una diferencia notable para ambos sistemas. Tal es el caso de la traza tomada para PV19 en un tiempo de adquisición de 5 segundos. Histogramas que se obtienen a partir de la captura de siete millones de fotones en un sistema tipo confocal y dos millones de fotones en un arreglo lateral. Afirmando una vez más que nuestro sistema tipo confocal presenta una mayor eficiencia de captura de fotones por parte de la lente del objetivo.

6.2.4. Ajuste libre vs ajuste de tiempos largos

Igualmente, el ajuste de trazas obtenido de un ajuste libre que incluye la traza temporal completa de los datos proporciona una identificación más confiable del τ del pigmento. Este siendo más certero si se compara con el ajuste enfocado solamente en los tiempos largos de

la traza - tiempos mayores a 0.2 veces la constante de decaimiento de cada pigmento - (Figura 6.7).

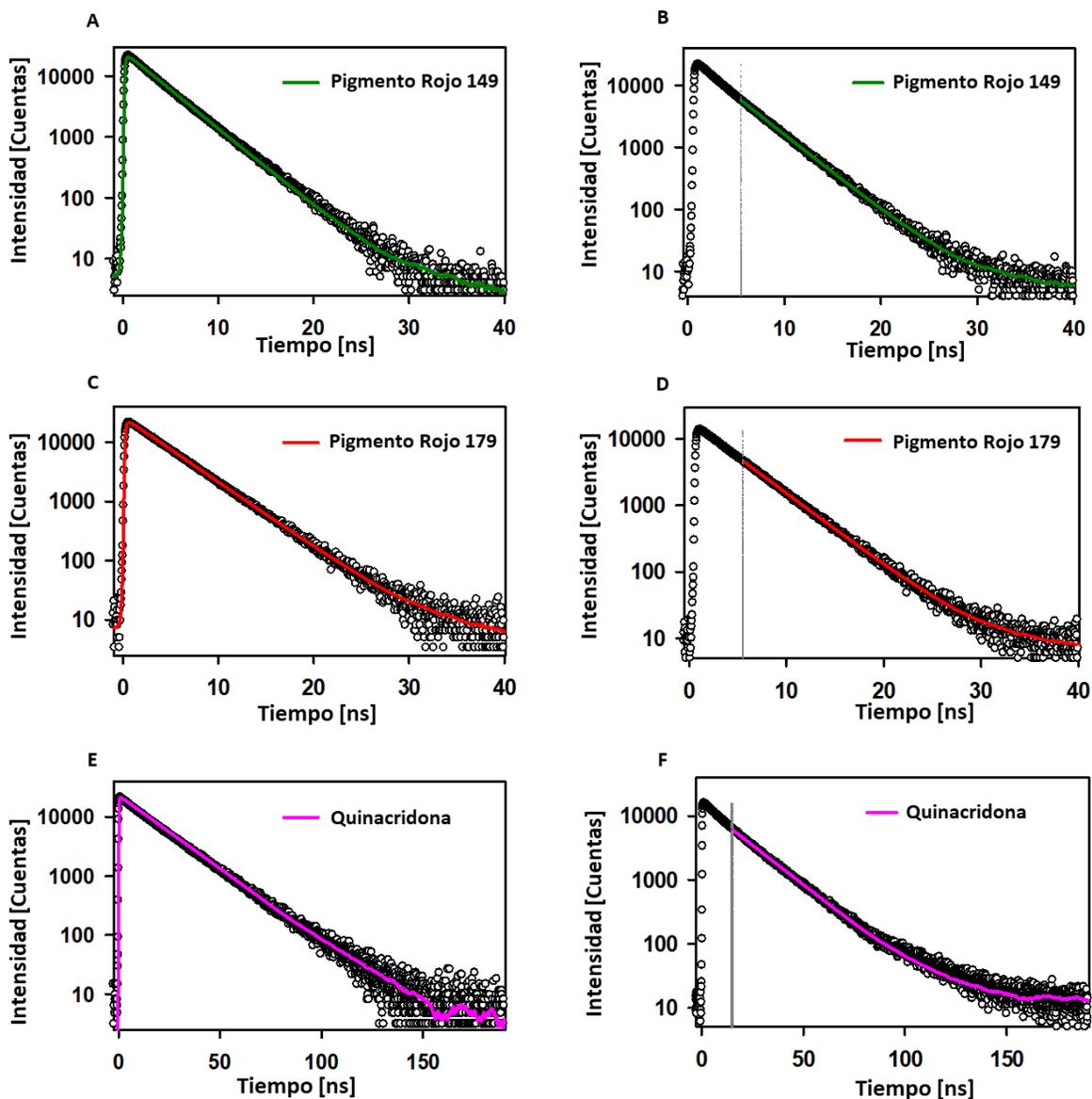


Figura 6.7. Comparación de los ajustes libres (A, C y D) vs ajustes de tiempos largos (B, D y F) de los pigmentos: Pigmento Rojo 149 y Pigmento Rojo 179 en CH_2Cl_2 , y quinacridona en DMSO a una longitud de excitación a 485 nm. Los ajustes se muestran como líneas de colores y el intervalo se muestra en gris.

La Tabla 6.2 muestra los valores obtenidos por ambos métodos de ajuste, en donde los valores del ajuste libre reportados están dentro del error experimental de los tiempos de vida obtenidos por las moléculas en su estado puro. Caso contrario a lo que sucede con los ajustes centrados solo en tiempos largos, los cuales muestran tiempos de vida que exceden el valor

real o dentro de la incertidumbre del tiempo de vida característico de cada pigmento. Valores reportados ~ 0.4 veces mayores que los específicos para los pigmentos. En esta subsección es relevante comentar que los ajustes de tiempos largos se realizaron con el fin de determinar si este método era viable en la eliminación del ruido causado por la dispersión de las soluciones en los disolventes (pico en tiempos cortos) sin llegar a afectar los tiempos de vida característicos de cada pigmento.

Tabla 6.2. Parámetros obtenidos de las trazas usando ajuste de tiempo libre y ajuste centrado en tiempos largos de los diferentes pigmentos.

Pigmento	Ajuste de tiempo libre			Ajuste centrado en tiempos largos		
	τ [ns]	Contribución [%]	X^2	τ [ns]	Contribución [%]	X^2
Pigmento Rojo 149 [4.5×10^{-6}]	3.50 ± 0.25	100	1.92	4.00 ± 0.23	100	1.16
Pigmento Rojo 179 [1.02×10^{-6}]	3.90 ± 0.29	100	2.01	4.30 ± 0.31	100	1.21
Quinacridona [1.03×10^{-5}]	17.70 ± 0.24	100	1.72	18.15 ± 0.34	100	1.30

6.2.5. Formulación PR206: Quinacridona y quinacridonaquinona

Recordemos con lo mencionado anteriormente que la formulación PR206 se compone de dos moléculas: quinacridona y quinacridonaquinona.^{167,174,175} Por espectroscopia de estado estacionario las extracciones de las películas acrílicas de PR206 solo mostraron la presencia de la quinacridona. Este dato nuevamente se confirma por la técnica TCSPC, la cual reporta el τ de 17.70 ± 0.24 ns para la quinacridona. Con estos resultados no solo se confirma lo anterior a esto, sino también se demuestra que la quinacridonaquinona a pesar de ser un componente de la formulación no muestra señales de fluorescencia. La ausencia de emisión de fluorescencia de la quinona es consecuencia de la presencia de grupos funcionales como los carbonilos, los cuales promueven el cruce entre sistemas al estado triplete por las reglas de El-Sayed (sección marco teórico), limitando de esta forma la vía de desactivación radiativa.¹⁷⁶⁻¹⁷⁸

6.2.6. Tamaño mínimo de muestra seca extraída de formulaciones acrílicas sobre superficies de diferentes sustratos

Determinados los tiempos de vida de los pigmentos en las diluciones por esta técnica resuelta en tiempo, también se caracterizaron las soluciones derivadas de muestras secas extraídas de la formulaciones acrílicas sobre las superficies de diferentes sustratos (Y, CG, CB y FB). Se conoce que en pinturas de áreas grandes como murales, existe la posibilidad de extraer muestras microscópicas de los bordes del mural o de pequeños fragmentos.^{179,16} La toma de estas muestras también puede realizarse mediante el uso de micro-hisopos secos o con un poco de solvente embebido.²⁶ Esto con el fin de obtener soluciones de pocos microlitros y en altas concentraciones que luego pueden ser analizadas por el sistema tipo confocal.^{37-39,41,42}

- Muestreo a partir de micro-hisopos

Se realizó en primer lugar un muestreo de la superficie de FB para las cuatro formulaciones con micro-hisopos como se explica en la Figura 6.8 y en el protocolo en la sección de anexos. Con esto se demostrará que con este tipo de muestreo, es factible reconocer los pigmentos a partir de la técnica TCSPC como se verá en las trazas características de la Figura 6.9.

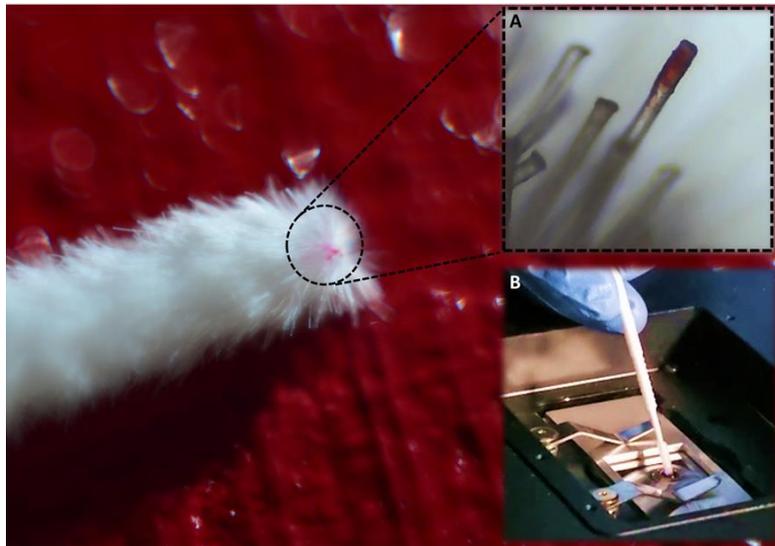


Figura 6.8. Muestreo de la superficie del panel del FB con micro-hisopos. Los recuadros muestran A) Micro-hisopo, imagen tomada bajo un microscopio con un objetivo 10x B) Muestra depositada en el portaobjetos donde previamente se encontraba un volumen de 2 μ L del solvente apropiado.

En la Figura 6.9 cada una de las trazas de los pigmentos extraídos con los micro-hisopos representa el tiempo de vida dentro de la desviación estándar del pigmento puro. Estos tiempos se obtuvieron a partir del ajuste con la IRF del sistema. Los resultados se resumen en la Tabla 8.5 de la sección de anexos. Estas extracciones presentan concentraciones de pigmentos de $\sim 10^{-7}$ M calculadas a partir de la tasa de recuento de fotones observada por la técnica que corresponde a soluciones de dicha concentración según los estudios de la Figura 6.5. Este resultado indica que con muestreo con micro-hisopos y empleando volúmenes de solución apropiados (pequeños), es considerablemente fácil llegar a concentraciones en las que la técnica de TCSPC – tipo confocal puede directamente determinar el tiempo de vida de fluorescencia del cromóforo presente en la muestra.

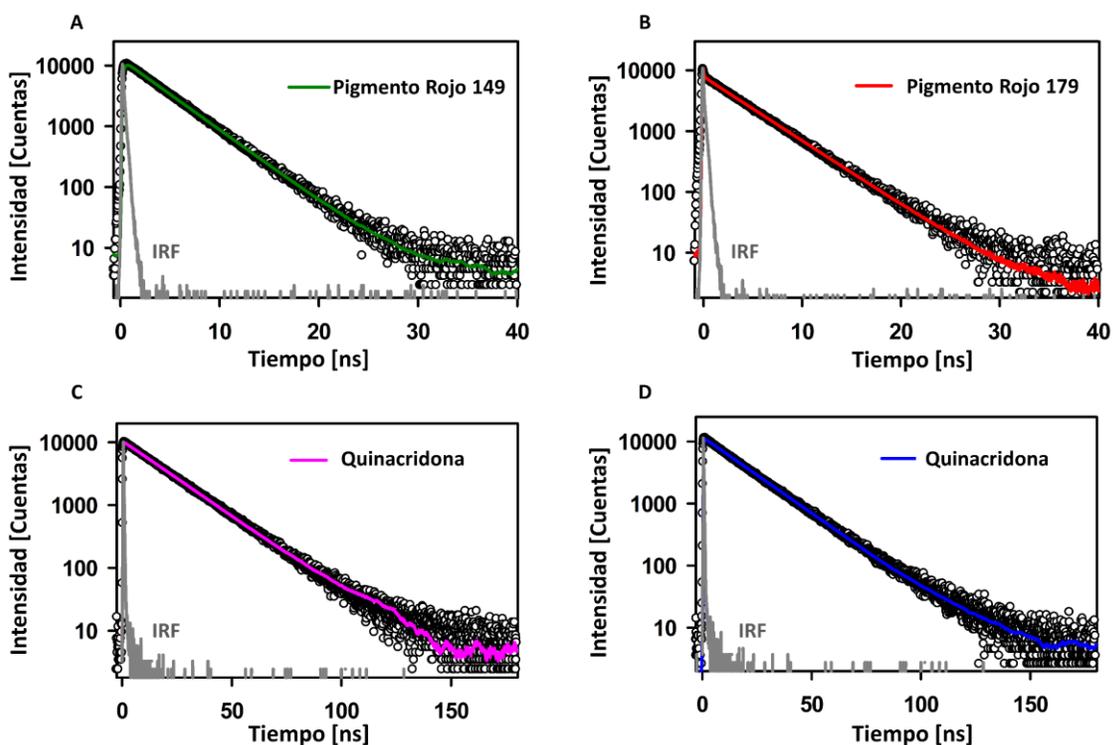


Figura 6.9. Trazas de TCSPC de las muestras obtenidas de la superficie de las formulaciones acrílicas secas por micro-hisopos. A) Pigmento Rojo 149 B) Pigmento Rojo 179 C) quinacridona en PV19 y D) quinacridona en PR206. Los ajustes se denotan como líneas sólidas de color.

- Muestreo a partir de fragmentos sólidos de tamaño microscópico

Continuando con los procesos de muestreo, en segundo lugar, se analizó cada uno de los fragmentos sólidos de tamaño microscópico de las formulaciones acrílicas depositadas en los sustratos. Por lo cual el objetivo de este estudio fue determinar el tamaño del fragmento muestreado mínimo necesario para detectar el cromóforo respectivo. La Figura 6.10 representa las trazas de TCSPC de los diferentes tamaños extraídos de las películas acrílicas sobre FB. En estas trazas al igual que en la Tabla 6.3 se distingue sin ambigüedad los diferentes tiempos característicos del estado emisor de cada pigmento. Esta detección puede realizarse, incluso, en tamaños de muestras con un diámetro de 100 μm o menos. Muestras en volúmenes de solución 10 veces más pequeños (5 μL) comparadas con las muestras de 0.75 mm y 0.18 mm en volúmenes de solución de 50 μL . Es importante mencionar que las trazas de TCSPC de las muestras micrométricas extraídas de PV19 y PR206 muestran un pequeño pico en tiempos cercanos a cero relacionados a la dispersión de la luz. Además, de comentar que con este estudio los tiempos característicos de cada pigmento no se ven afectados por la clase de sustrato, el cual no presenta fluorescencia y no causa interferencia en el análisis.

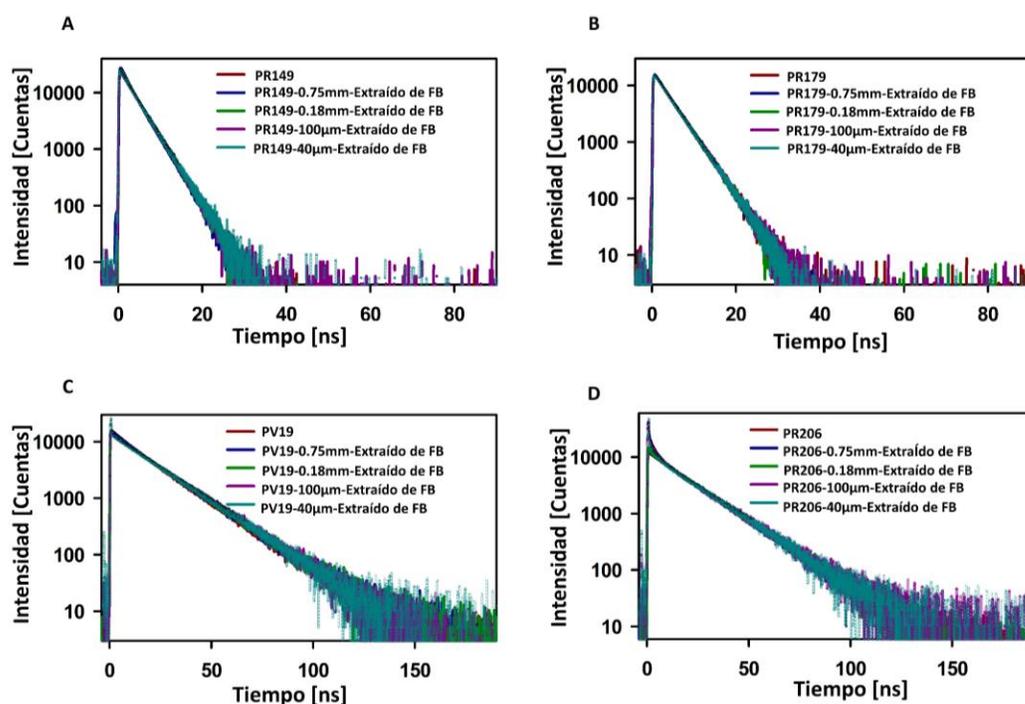


Figura 6.10. Trazas de TCSPC para los diferentes tamaños de muestra extraídos de las formulaciones acrílicas sobre sustratos de FB. Estas trazas obtenidas a partir de una longitud de onda de excitación de 485 nm. A) PR149 y B) PR179 en CH_2Cl_2 C) PV19 y D) PR206 en DMSO, cada formulación con sus respectivos tamaños

de extracción. Las leyendas de cada traza indican el diámetro de la muestra respectiva en volúmenes de solución de 50 μL para muestras de 0.75 mm y 0.18 mm y 5 μL para muestras de 100 μm y 40 μm .

Tabla 6.3. Parámetros obtenidos de los decaimiento de fluorescencia de los pigmentos para diferentes tamaños de muestra de formulaciones acrílicas sobre sustrato de fibrocemento (FC). Extracciones en CH_2Cl_2 para PR149 y PR179, y DMSO para PV19 y PR206.

	PR149		PR179		PV19		PR206	
	τ [ns]	X^2	τ [ns]	X^2	τ [ns]	X^2	τ [ns]	X^2
Puro	3.50 ± 0.25	1.02	3.90 ± 0.29	1.12	17.70 ± 0.24	1.26	17.70 ± 0.24	1.26
0.75 mm	3.47 ± 0.26	1.50	3.88 ± 0.15	1.01	17.81 ± 0.19	1.48	17.66 ± 0.31	1.43
0.18 mm	3.38 ± 0.27	1.71	3.87 ± 0.21	1.08	17.77 ± 0.26	1.23	17.82 ± 0.16	1.32
100 μm	3.55 ± 0.11	0.94	3.94 ± 0.25	0.90	17.64 ± 0.25	1.57	17.79 ± 0.27	1.06
40μm	3.51 ± 0.27	0.98	3.92 ± 0.12	1.02	17.69 ± 0.12	1.36	17.87 ± 0.19	1.45

En estos experimentos el muestreo de fragmentos muy pequeños requirió reducir el volumen del disolvente para obtener concentraciones más altas. Cabe mencionar en este caso, que el uso del CH_2Cl_2 para los perilenos no produjo resultados reproducibles debido a la alta volatilidad del disolvente. Este factor ocasionó una variación gradual de la concentración en el tiempo de medición (1 a 5 minutos). Por tal motivo, el ajuste de un nuevo esquema fue indispensable para dispersar las moléculas de los Pigmentos Rojos 149 y 179. Este esquema se basó en una solución final de 0.1 mL del pigmento en CH_2Cl_2 junto con 0.4 mL de tolueno. En donde los problemas de volatilidad y los fenómenos de precipitación fueron corregidos durante el proceso, y así se generaron diluciones estables durante los experimentos y por ende resultados confiables en las mediciones por TCSPC.

Detallando un poco más el esquema planteado para los fragmentos pequeños, este se generó por dos razones fundamentales:

- Los perilenos no son solubles en tolueno ya que el único disolvente en el que estos pigmentos pueden lograr concentraciones significativas es el CH_2Cl_2 .

- Las soluciones precipitan y aumentan su concentración durante el experimento a causa de la volatilidad del CH_2Cl_2 .

Como puede esperarse, los tiempos de vida de los pigmentos en tolueno mostraron diferencias con los tiempos de vida tomados en CH_2Cl_2 . El cambio de disolvente generó valores de 3.61 ± 0.11 ns para el Pigmento Rojo 149 y 4.10 ± 0.18 ns para el Pigmento Rojo 179. Datos ligeramente más altos a los referenciados en CH_2Cl_2 .

Por otra parte, el mismo procedimiento se realizó para los otros tres soportes de Y, CB y CG. Las Figuras 6.11, 6.12 y 6.13 muestran las trazas correspondientes a cada tamaño de extracción. Los resultados que se derivan de estas es positivo al igual que con las muestras de FB. En todos los casos se identifican los pigmentos en muestras micrométricas de hasta $40 \mu\text{m}$ y no se observan interferencias por parte de los sustratos, los resultados se resumen en las Tablas 6.4 a 6.6.

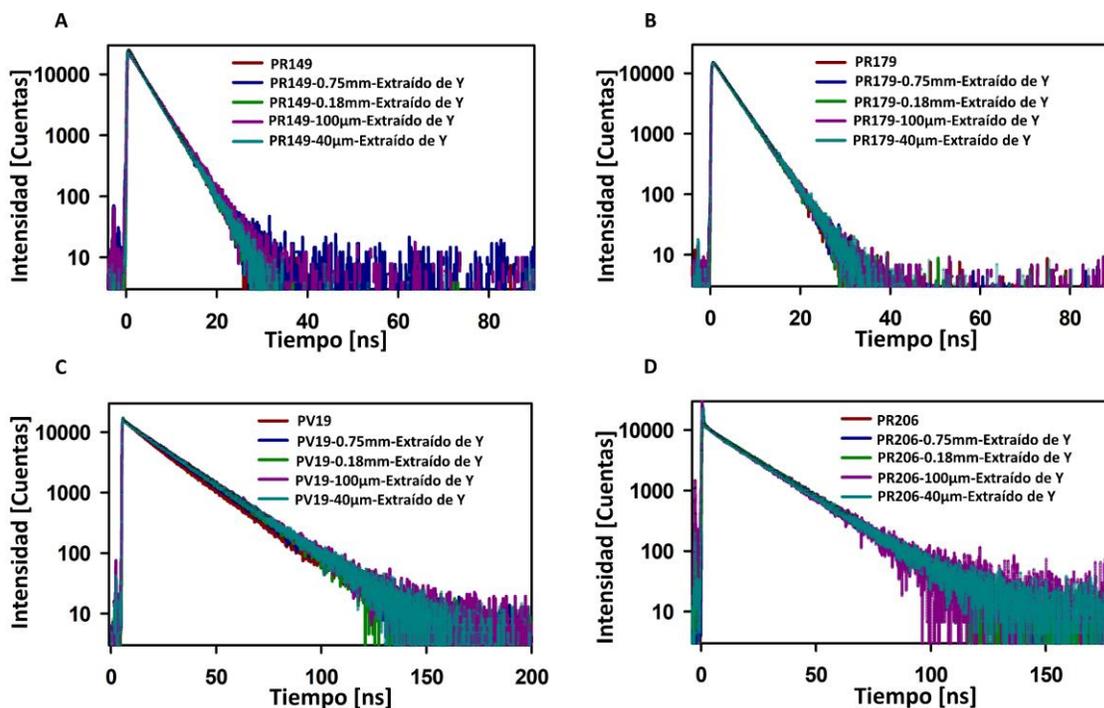


Figura 6.11. Trazas de TCSPC para los diferentes tamaños de muestra extraídos de las formulaciones acrílicas sobre sustratos de Y. Estas trazas obtenidas a partir de una longitud de onda de excitación de 485 nm. A) PR149 y B) PR179 en CH_2Cl_2 C) PV19 y D) PR206 en DMSO, cada formulación con sus respectivos tamaños de

extracción. Las leyendas de cada traza indican el diámetro de la muestra respectiva en volúmenes de solución de 50 μL para muestras de 0.75 mm y 0.18 mm y 5 μL para muestras de 100 μm y 40 μm .

Tabla 6.4. Parámetros obtenidos de los decaimiento de fluorescencia de los pigmentos para diferentes tamaños de muestra de formulaciones acrílicas sobre sustrato de yeso (Y). Extracciones en CH_2Cl_2 para PR149 y PR179, y DMSO para PV19 y PR206.

	PR149		PR179		PV19		PR206	
	τ [ns]	X^2	τ [ns]	X^2	τ [ns]	X^2	τ [ns]	X^2
Puro	3.50 ± 0.25	1.02	3.90 ± 0.29	1.12	17.70 ± 0.24	1.26	17.70 ± 0.24	1.26
0.75 mm	3.48 ± 0.18	1.54	3.81 ± 0.16	1.40	17.90 ± 0.24	1.05	17.53 ± 0.25	1.25
0.18 mm	3.47 ± 0.13	1.01	3.86 ± 0.24	1.01	17.89 ± 0.17	1.43	17.50 ± 0.33	1.22
100 μm	3.54 ± 0.13	1.08	3.91 ± 0.18	1.13	17.65 ± 0.20	1.39	17.88 ± 0.39	1.10
40 μm	3.42 ± 0.16	1.23	3.77 ± 0.18	1.08	17.56 ± 0.16	1.49	17.56 ± 0.20	1.24

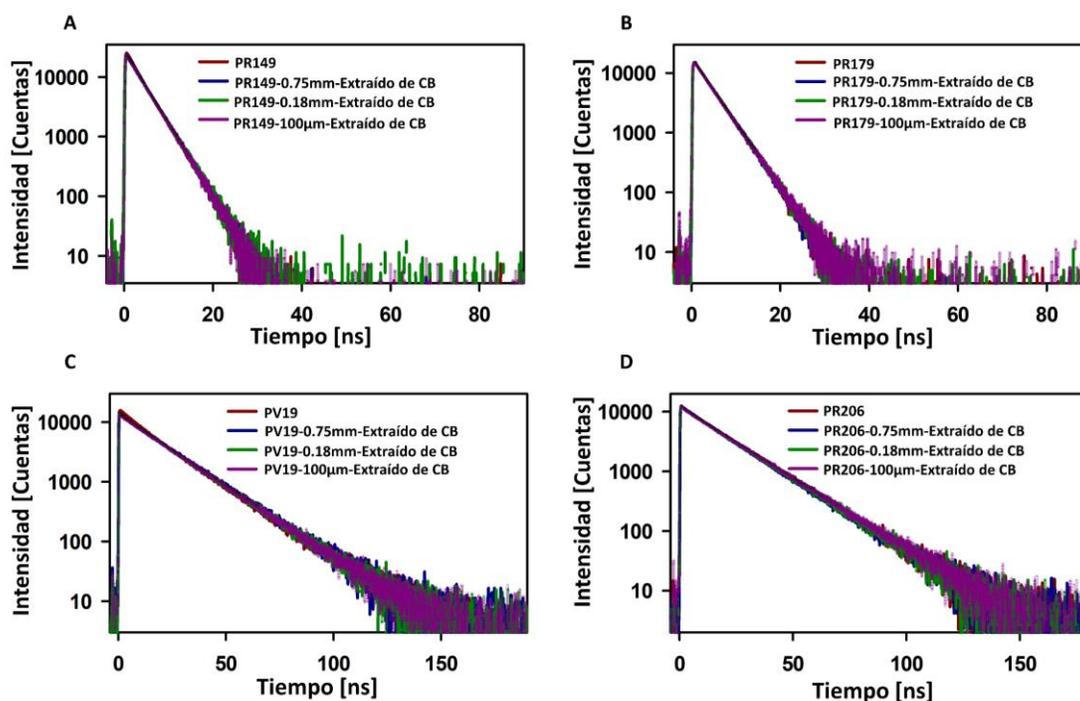


Figura 6.12. Trazas de TCSPC para los diferentes tamaños de muestra extraídos de las formulaciones acrílicas sobre sustratos de CB. Estas trazas obtenidas a partir de una longitud de onda de excitación de 485 nm. A) PR149 y B) PR179 en CH_2Cl_2 C) PV19 y D) PR206 en DMSO, cada formulación con sus respectivos tamaños de extracción. Las leyendas de cada traza indican el diámetro de la muestra respectiva en volúmenes de solución de 50 μL para muestras de 0.75 mm y 0.18 mm y 5 μL para muestras de 100 μm .

Tabla 6.5. Parámetros obtenidos de los decaimiento de fluorescencia de los pigmentos para diferentes tamaños de muestra de formulaciones acrílicas sobre sustrato de cemento blanco (CB). Extracciones en CH_2Cl_2 para PR149 y PR179, y DMSO para PV19 y PR206.

	PR149		PR179		PV19		PR206	
	τ [ns]	χ^2	τ [ns]	χ^2	τ [ns]	χ^2	τ [ns]	χ^2
Puro	3.50 ± 0.25	1.83	3.90 ± 0.29	1.02	17.70 ± 0.24	1.12	17.70 ± 0.24	1.26
0.75 mm	3.65 ± 0.18	1.08	3.87 ± 0.13	1.12	17.90 ± 0.22	1.02	17.52 ± 0.34	1.39
0.18 mm	3.54 ± 0.20	1.13	3.91 ± 0.16	0.94	17.69 ± 0.29	1.34	17.75 ± 0.28	1.37
100 μm	3.46 ± 0.22	1.32	3.92 ± 0.20	1.43	17.92 ± 0.46	1.59	17.61 ± 0.32	1.35

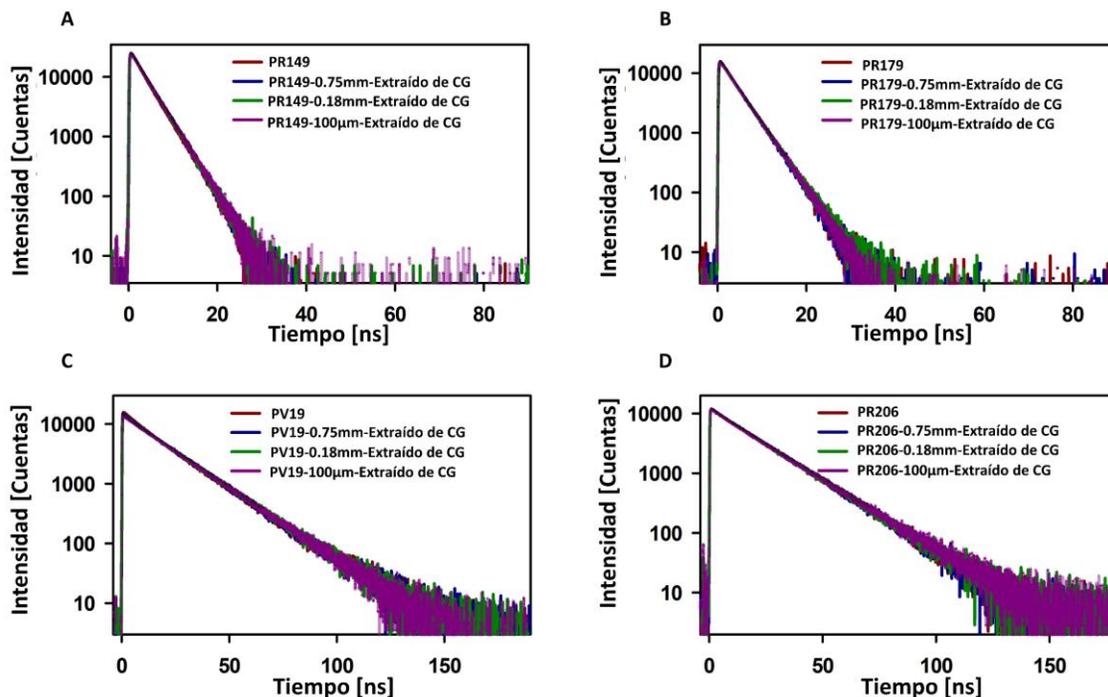


Figura 6.13. Trazas de TCSPC para los diferentes tamaños de muestra extraídos de las formulaciones acrílicas sobre sustratos de CG. Estas trazas obtenidas a partir de una longitud de onda de excitación de 485 nm. A) PR149 y B) PR179 en CH_2Cl_2 C) PV19 y D) PR206 en DMSO, cada formulación con sus respectivos tamaños de extracción. Las leyendas de cada traza indican el diámetro de la muestra respectiva en volúmenes de solución de $50 \mu\text{L}$ para muestras de 0.75 mm y 0.18 mm y $5 \mu\text{L}$ para muestras de $100 \mu\text{m}$.

Tabla 6.6. Parámetros obtenidos de los decaimiento de fluorescencia de los pigmentos para diferentes tamaños de muestra de formulaciones acrílicas sobre sustrato de cemento gris (CG). Extracciones en CH₂Cl₂ para PR149 y PR179, y DMSO para PV19 y PR206.

	PR149		PR179		PV19		PR206	
	τ [ns]	χ^2	τ [ns]	χ^2	τ [ns]	χ^2	τ [ns]	χ^2
Puro	3.50 ± 0.25	1.02	3.90 ± 0.29	1.12	17.70 ± 0.24	1.26	17.70 ± 0.24	1.26
0.75 mm	3.45 ± 0.14	1.20	3.84 ± 0.19	1.04	17.88 ± 0.42	1.81	17.83 ± 0.37	1.04
0.18 μm	3.51 ± 0.15	1.05	3.90 ± 0.12	1.28	17.73 ± 0.27	1.17	17.92 ± 0.21	1.14
100 μm	3.54 ± 0.27	1.56	3.85 ± 0.28	1.11	17.79 ± 0.32	1.11	17.85 ± 0.40	1.06

Cada parte desarrollada dentro del esquema propuesto por TCSPC permitió descubrir que es factible identificar los pigmentos. Esquema que siguió un orden adecuado dando a conocer primero el tiempo característico de cada pigmento, para con esta característica emisiva proceder a emplear diferentes procesos de muestreo que permitan discernir hasta donde es posible distinguir un pigmento de otro con la mínima cantidad de muestra obtenida por medio de micro-hisopos o fragmentos microscópicos.

6.3. Anisotropía de Fluorescencia

La técnica de Anisotropía de Fluorescencia se usó como método adicional en la identificación de pigmentos a través del sistema tipo confocal empleando los polarizadores respectivos. Por medio de esta la técnica se determinaron los tiempos de difusión rotacional de cada molécula en diferentes disolventes, los cuales son parámetros característicos de cada fluoróforo. Normalmente, en mediciones de moléculas con disolventes poco viscosos a temperatura ambiente, los decaimientos de la Anisotropía de Fluorescencia suceden en una escala de tiempo de algunos picosegundos. Estos valores caerían dentro de la función temporal de respuesta del instrumento por lo que no serían valores útiles para la identificación de los cromóforos. Por lo tanto, es indispensable para los pigmentos de este trabajo realizar un ajuste en la viscosidad del disolvente, con lo que los tiempos de decaimiento de las Anisotropías de Fluorescencia sucedan en el orden de nanosegundos. Lo anterior corresponde

a tiempos que se pueden medir fácilmente y con certeza pues corresponden a tres órdenes de magnitud mayores a la función de respuesta de este tipo de mediciones.

Los pigmentos Rojos 149 y 179 presentan τ similares tal y como se reportó por la técnica TCSPC. En este estudio se propone una estrategia con la finalidad de diferenciarlos por sus valores de tiempos de difusión rotacional, es decir los tiempos característicos del decaimiento de la Anisotropía de Fluorescencia. Las dos moléculas que se comparan presentan una particularidad y es que difieren significativamente en sus propiedades hidrodinámicas a pesar de tener el mismo núcleo cromofórico. La diferencia entre estos dos pigmentos es causada por los patrones de sustitución en los extremos de su estructura molecular, donde el Pigmento Rojo 149 tiene grupos dimetilfenilo comparado con los grupos metilo del Pigmento Rojo 179.

Ahora bien, previo a la toma de las mediciones, los pigmentos se extrajeron en CH_2Cl_2 y se transfirieron a DMSO de la misma forma en que se llevó a cabo el proceso con el tolueno en las mediciones por TCSPC. Se hace hincapié en que este proceso se realizó debido a que en CH_2Cl_2 los perilenos alcanzan concentraciones significativas (mayor solubilidad en el disolvente). Así que, una vez se evaporó totalmente el CH_2Cl_2 , se prepararon diferentes mezclas con la adición de glicerina con el objetivo de tener una variación sistemática en la viscosidad de las soluciones. Las mezclas tuvieron un intervalo de fracción molar de 0 a 0.79 de glicerina (en DMSO). Estas composiciones favorecieron que los tiempos de relajación o difusión rotacional (τ_{rot}) se encuentren en la escala de los nanosegundos. Es importante recordar que el objetivo de estas mediciones es diferenciar fácilmente las muestras del Pigmento Rojo 149 de las del Pigmento Rojo 179. Como se podrá observar, la exploración de diferentes composiciones glicerina/DMSO permitirá encontrar un intervalo de composición donde se maximice la diferencia de los tiempos de difusión rotacional del Pigmento Rojo 149 en comparación con los del Pigmento Rojo 179.

Las trazas de anisotropía $r(t)$ a partir de las mediciones se muestran en la Figura 6.14. Esta figura ilustra la evolución de las constantes de tiempo de decaimiento de $r(t)$ de los dos

perilenos, desde valores de sub-nanosegundos (fracción molar de 0.19 de glicerina) hasta más de 7 ns en una fracción molar de 0.69 de glicerina.

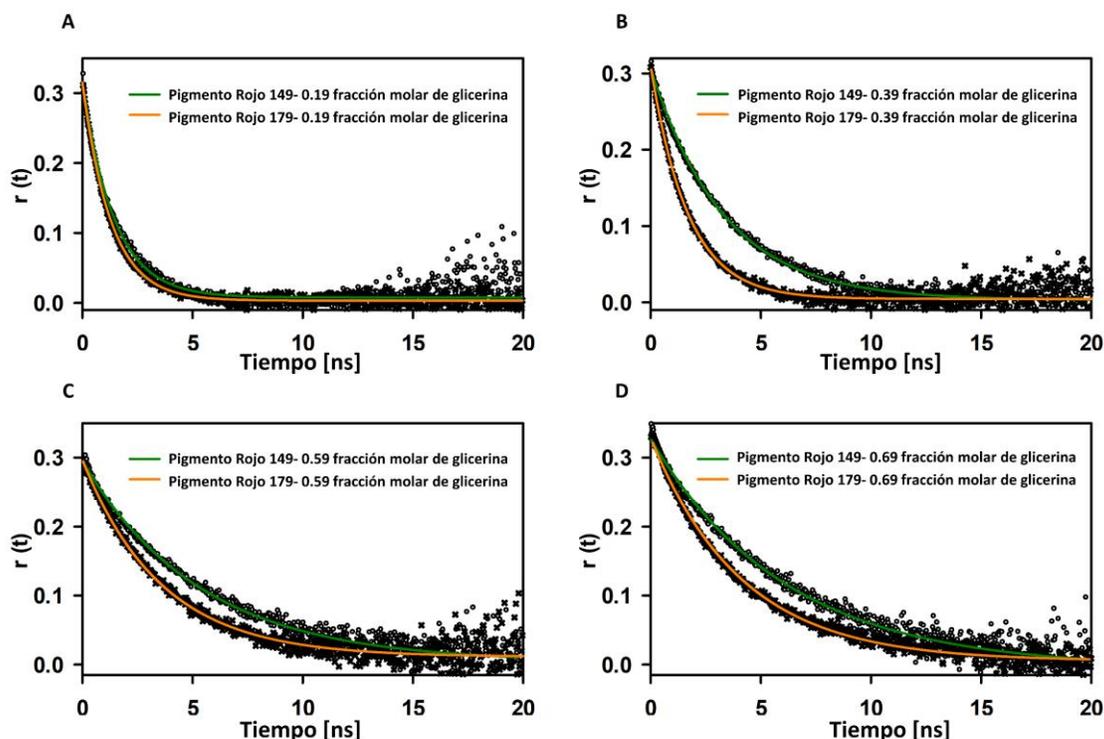


Figura 6.14. Trazas de anisotropía $r(t)$ para los perilenos Pigmentos Rojos 149 y 179 en mezclas de glicerina-DMSO. A) 0.19 fracción molar de glicerina B) 0.39 fracción molar de glicerina. C) 0.59 fracción molar de glicerina y D) 0.69 fracción molar de glicerina. La longitud de onda de excitación fue de 485 nm.

La Tabla 6.7 muestra los valores de τ_{rot} de los pigmentos derivados de las trazas de $r(t)$ de la Figura 6.14. En la tabla, estos tiempos aumentan con la fracción molar de glicerina. Aún más importante, la diferencia porcentual entre los valores de τ_{rot} de los dos pigmentos varía de una fracción molar a otra. En particular, para el valor de 0.39 de fracción mol de glicerina en DMSO se maximiza la diferencia porcentual entre ambos pigmentos con una diferencia de 86.8%. En otras palabras, con esta composición de disolventes la diferencia de valores de τ_{rot} es máxima. En particular esta diferencia es significativamente mayor que la diferencia entre sus tiempos de vida de fluorescencia (3.50 vs 3.90 ns es decir, del 12%). Este hecho indica que las mediciones de Anisotropía de Fluorescencia, con un nivel de detección similar a TCSPC, pueden emplearse para distinguir entre pigmentos con decaimientos de

emisión semejantes. Al igual que en TCSPC, estas determinaciones pueden realizarse con un volumen de solución muy bajo y a partir de cantidades de muestra mínimas.

Tabla 6.7. Tiempos de relajación rotacional (τ_{rot}) de los perilenos Pigmento Rojo 149 y Pigmento Rojo 179 en mezclas de DMSO y glicerina obtenidas a partir de ajustes monoexponenciales.

Fracción molar de glicerina	Pigmento Rojo 149		Pigmento Rojo 179		Diferencia Porcentual %
	$r(t = 0)$	$\tau_{rot}(ns)$	$r(t = 0)$	$\tau_{rot}(ns)$	
0.19	0.3	1.57 ± 0.11	0.3	1.40 ± 0.14	11.9
0.29	0.3	2.15 ± 0.23	0.3	1.44 ± 0.12	48.7
0.39	0.3	3.54 ± 0.14	0.3	1.90 ± 0.21	86.8
0.49	0.3	4.14 ± 0.19	0.3	2.63 ± 0.17	57.3
0.59	0.3	5.66 ± 0.27	0.3	3.63 ± 0.23	56.2
0.69	0.3	7.58 ± 0.21	0.3	4.52 ± 0.25	67.5
0.79	0.3	9.00 ± 0.18	0.3	5.68 ± 0.20	58.6

Cabe destacar que las diferencias entre las moléculas de Pigmento Rojo149 y la de Pigmento Rojo 179 se presentan en las dimensiones que corresponden al eje largo del pigmento. Este eje es paralelo al momento dipolar de transición de emisión lo cual da como resultado una gran sensibilidad del tiempo de relajación rotacional en el tamaño del eje longitudinal de la molécula.¹⁸⁰ Con el fin de verificar que la variación de los τ_{rot} de los pigmentos (Rojos 149 y 179) se debe a diferencias en su fricción hidrodinámica asociada a la diferencia de sus dimensiones en el eje paralelo al del momento dipolar de transición, a continuación se realizaron estimaciones de los parámetros de difusión hidrodinámica de estas dos moléculas.

6.3.1. Cálculos de contribuciones hidrodinámicas

Para determinar los tiempos de relajación rotacional puramente hidrodinámicos de los Pigmentos Rojo 149 y Rojo 179 fue necesario realizar procesos por TD-DFT como:

- Modelar las geometrías de las moléculas como elipsoides
- Calcular los vectores de momento dipolar de transición junto con los coeficientes de difusión rotacional

Lo anterior teniendo en cuenta las isosuperficies de densidad electrónica con metodologías estándar como se muestra en la Figura 6.15.¹⁸⁰

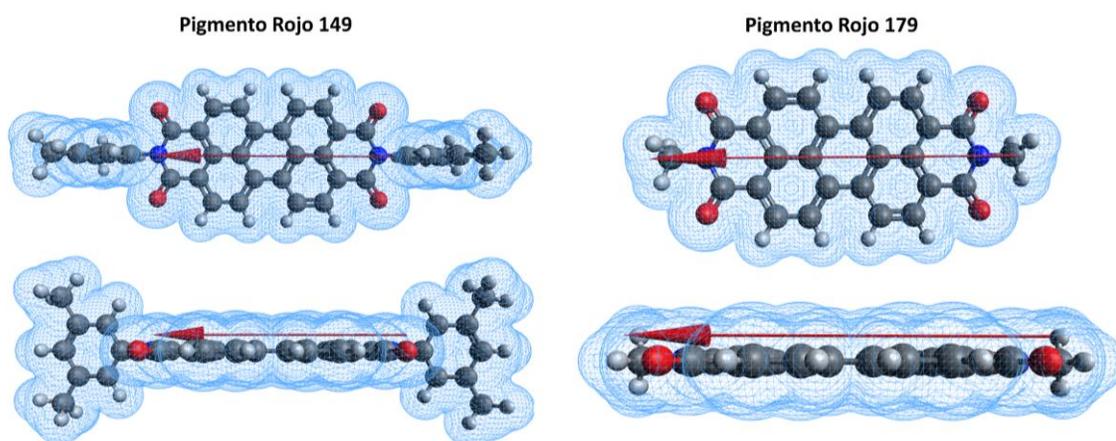


Figura 6.15. Isosuperficies de densidad electrónica de los pigmentos Pigmento Rojo 149 y Pigmento Rojo 179 con un valor de $0.0035e/\text{Bohr}^3$ que relacionan el volumen del elipsoide con el cálculo del coeficiente de difusión rotacional. El momento dipolar de transición se indica con la flecha roja para ambos casos.

Con los datos obtenidos se calcularon las contribuciones hidrodinámicas ($\tau_{hydrodyn}$) a los τ_{rot} según el método de Dutt y colaboradores.¹⁸¹ Para lo anterior se tuvo también en cuenta los valores de las viscosidades de las mezclas empleadas, las cuales se encuentran reportadas en la literatura.^{180,182,183}

La Figura 6.16 muestra los valores de τ_{rot} y $\tau_{hydrodyn}$ en función de la fracción molar de glicerina para los datos experimentales y estimados, respectivamente. Como se ilustra en las líneas continuas del recuadro de la figura, las dos moléculas difieren significativamente en su contribución hidrodinámica a la fricción. Este comportamiento sucede de forma paralela

a las variaciones de los tiempos de relajación rotacional experimentales de la figura principal, y que presentan un orden de magnitud mayor al predicho por el modelo hidrodinámico simple. Los valores experimentales indican -según se esperaba- que existen otras contribuciones a la fricción molecular además de la hidrodinámica. Lo anterior es común en disolventes como la glicerina y el DMSO donde estas interacciones corresponden a contribuciones tanto específicas como la formación de puentes de hidrógeno y electrostáticas asociadas principalmente a interacciones dipolares con el disolvente.^{97,184,185}

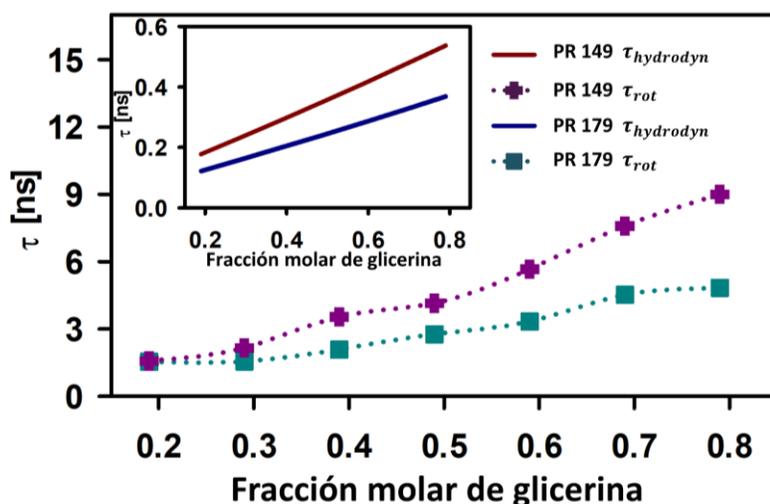


Figura 6.16. τ_{rot} y $\tau_{hydrodyn}$ en función de la fracción molar de glicerina en mezclas de DMSO/glicerina de las dos moléculas Pigmento Rojo 149 (PR149) y Pigmento Rojo (PR179). Las líneas punteadas con símbolos representan los tiempos de relajación rotacional determinados experimentalmente (τ_{rot}) y las líneas sólidas en el recuadro representan la contribución hidrodinámica estimada a los tiempos de relajación rotacional para la viscosidad de la mezcla ($\tau_{hydrodyn}$).

Según se observa en la Figura 6.15, a simple vista el Pigmento Rojo 149 tiene sustituyentes más voluminosos en los puntos finales de su eje largo implicando una mayor fricción hidrodinámica. Caso contrario a la fricción generada por los grupos metilo que son menos voluminosos en el Pigmento Rojo 179. Una manera simple de estimar el volumen molecular directamente (sin partir de un modelo de la geometría de las moléculas) a partir de los datos experimentales de difusión rotacional a diversas viscosidades se presenta en la Ecuación 6.1.¹⁸⁶ Esta ecuación relaciona los valores de τ_{rot} en función de la viscosidad de la mezcla donde el principal factor para definir el tiempo de difusión es el volumen de las moléculas.

Según la Ecuación 6.1, estos valores fueron de $8.0 \times 10^3 \text{ \AA}^3$ para el Pigmento Rojo 149 y de $3.8 \times 10^3 \text{ \AA}^3$ para el Pigmento Rojo 179, los cuales demuestran la diferencia en el volumen hidrodinámico y por ende en sus propiedades de difusión rotacional.

$$\tau_{rot} = \frac{V_{eff}}{k_B T} \eta + \tau_{rot}^0 \quad \text{Ecuación 6.1}$$

Por otra parte, los τ_{rot} para las formulaciones comerciales PV19 y PR206 también se detectaron por Anisotropía de Fluorescencia. Solo que en este caso se formó una mezcla de DMSO/glicerina equivalente a 0.79 de fracción molar. El objetivo del estudio consistió en conocer y distinguir a la quinacridona en las formulaciones, y de esta forma explorar otra forma de identificación de este pigmento. La Figura 6.17 muestra la traza de decaimiento característica del τ_{rot} de la quinacridona en su estado puro. El valor corresponde a $12.35 \pm 0.70 \text{ ns}$.

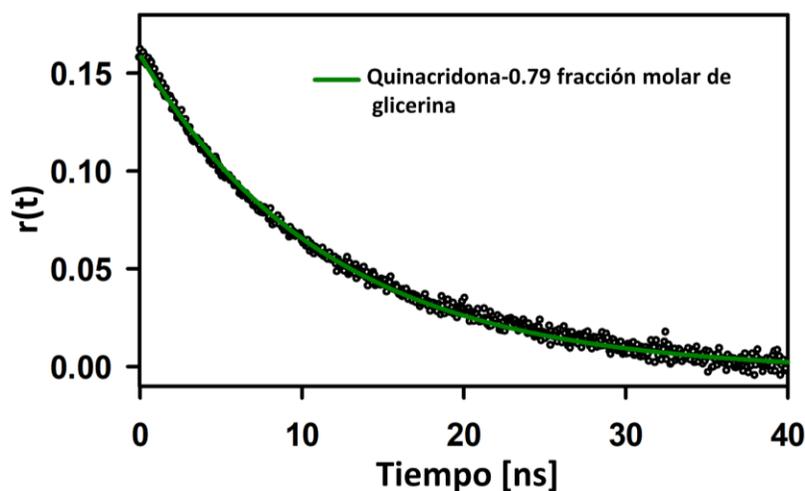


Figura 6.17. Trazas de decaimiento $r(t)$ característica de la quinacridona pura a una fracción molar de glicerina de 0.79 en DMSO.

En la Tabla 6.8 los τ_{rot} de PV19 y PR206 se encuentran dentro de la incertidumbre del valor real del τ_{rot} de la molécula, confirmando una vez más que la quinacridona es el único pigmento emisor en estas formulaciones comerciales.

Tabla 6.8. Tiempos τ_{rot} de ajustes monoexponenciales por Anisotropía de Fluorescencia de PV19 y PR206 en soluciones de $2 \times 10^{-4} M$.

	PV19		PR206	
Fración molar de glicerina	$r(t = 0)$	$\tau_{rot}(ns)$	$r(t = 0)$	$\tau_{rot}(ns)$
0.79	0.2	12.21 ± 0.75	0.2	12.59 ± 0.73

Finalmente, estudios adicionales de Anisotropía de Fluorescencia se añaden a este trabajo con el propósito de concluir las diferentes estrategias en la identificación de los pigmentos. Los estudios demostraron que los τ_{rot} no varían en función de la apertura numérica (NA) del objetivo tal como se ilustra en la Figura 6.18, la cual muestra las trazas de decaimiento $r(t)$ de la quinacridona pura tomadas con tres objetivos diferentes que abarcan una NA desde 0.5 a 1.4.

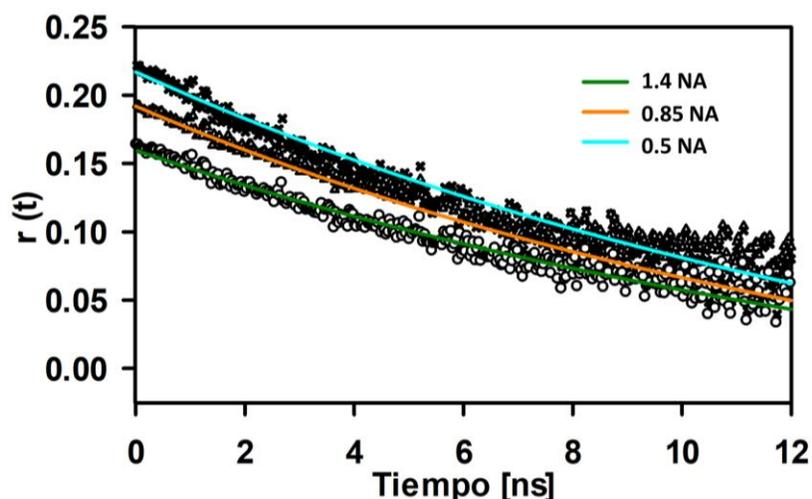


Figura 6.18. Influencia de la apertura numérica del objetivo en las trazas de anisotropía de soluciones de quinacridona con una fracción molar de glicerina de 0.79 y 0.21 de DMSO.

En la literatura se conoce que es posible obtener valores experimentales de $r(t = 0)$ diferentes para objetivos con una variación en la NA. Se observa que los valores de r disminuyen con el aumento de la NA tal y como se ilustra en la Figura 6.18. Específicamente en la traza que representa el objetivo de 1.4 NA, se tiene un $r(t = 0)$ igual a 0.16.^{137,187} Sin embargo, el hecho de que esto suceda no causa diferencias en los valores de τ_{rot} debido a

que los valores de anisotropía a tiempo cero $r(t = 0)$ no se relacionan con la rapidez a la cual rotan las moléculas. En la Tabla 6.9 se observan los diferentes valores que caen dentro del error experimental reportado por el τ_{rot} de la molécula pura (12.35 ± 0.70 ns).

Tabla 6.9. Tiempos de relajación rotacional τ_{rot} de ajustes monoexponenciales a trazas de Anisotropía de Fluorescencia de soluciones de quinacridona con una fracción molar de glicerina de 0.79 y 0.21 de DMSO con diferentes objetivos de apertura numérica.

	1.4 NA	0.85 NA	0.5 NA
Fracción molar de glicerina	$\tau_{rot}(ns)$	$\tau_{rot}(ns)$	$\tau_{rot}(ns)$
0.79	12.33 ± 0.65	12.20 ± 0.45	12.61 ± 0.90

Con estos resultados se argumenta que el objetivo con NA de 1.4 fue el más adecuado en nuestro sistema tipo confocal. Las razones de esta afirmación con base en la alta eficiencia de recolección de fotones en objetivos de amplia NA y sin efecto alguno con respecto al valor del τ_{rot} de la molécula.

7. CONCLUSIONES

- La manipulación de las condiciones del experimento permitió clasificar e identificar los pigmentos por tiempos de vida de fluorescencia y tiempos de relajación rotacional. Condiciones que incluyeron la adición de elementos ópticos en el sistema confocal, mezclas de disolventes y aumento en la viscosidad de la solución.
- El proceso sistemático empleado en este trabajo proporcionó los pasos iniciales para implementar procedimientos de identificación de otros cromóforos comúnmente utilizados en pinturas modernas con propiedades emisivas.
- Las propiedades emisivas de los cromóforos rojos presentes en formulaciones acrílicas representativas se exploraron por las diferentes técnicas. Estos fueron identificados a partir de volúmenes mínimos y con tiempos de decaimiento en concentraciones tan bajas como 10^{-9} M.
- La configuración tipo confocal permitió la distinción de los pigmentos. Cromóforos en muestras microscópicas de hasta 40 μm de tamaño lateral y obtenidas a partir de muestreo con micro-hisopos en sustratos representativos de murales.
- Con base en los estudios, matemáticamente se logró conocer la diferencia porcentual de fotones capturados por un objetivo entre un sistema pseudo-confocal y un arreglo lateral. Diferencia del 26% entre ambos sistemas, siendo más favorable en la captura de fotones nuestro sistema tipo confocal.
- Por medio de TCSPC y Anisotropía de Fluorescencia se estudiaron los efectos de la concentración de la muestra, la naturaleza, las dimensiones y el método de adquisición. Esto con el fin de sentar una base en el estudio integral de un conjunto más amplio de pigmentos y formulaciones compuestas por mezclas.

- Con los dos métodos de ajuste propuestos como estrategia en este trabajo se identificó de forma más confiable el tiempo de vida del pigmento por medio del ajuste de tiempo completo de los datos con la IRF. Un ajuste que determinó un decaimiento exponencial más certero comparado con el ajuste que solo se enfoca en el tiempo largo de la traza. Ajuste que presenta un tiempo 1.2 veces mayor que la constante de decaimiento real del pigmento.
- El uso apropiado de mezclas dio fin al problema de baja reproducibilidad en las mediciones de TCSPC de los perilenos causado por la alta volatilidad del CH_2Cl_2 . Por lo tanto, esta propuesta permitió una mayor estabilidad de la solución en la escala temporal de medición de los experimentos.
- Las diferentes técnicas empleadas en este trabajo comprobaron la presencia de la mezcla quinacridona y quinacridonaquinona en la formulación comercial PR206. Incluso, las técnicas lograron demostrar cómo la quinacridonaquinona no influye en el análisis de identificación. Primero por su baja solubilidad y segundo por no favorecerse una vía de desactivación radiativa a causa de un cruce entre sistemas.
- Las mediciones de decaimiento de la Anisotropía de Fluorescencia dependen en gran medida de la estructura molecular y, por lo tanto, proporcionaron diferencias de más del 50% para los cromóforos con tiempos de vida de fluorescencia semejantes. Esta identificación de cromóforos se logró con el sistema tipo confocal con detección de luz polarizada paralela y perpendicular, y con solventes altamente viscosos como la glicerina.
- Por medio de cálculos teóricos a nivel TD-DFT se validó la diferencia de la contribución hidrodinámica por parte de los perilenos Pigmento Rojo 149 y Pigmento Rojo 179. Esta diferenciación de la contribución hidrodinámica se demostró experimentalmente por resultados obtenidos a partir de las mediciones de Anisotropía de Fluorescencia en mezclas DMSO/glicerina.

- A partir de los excelentes resultados del pequeño conjunto base de pigmentos rojos con características emisivas se puede llegar a promover la vinculación de algunos grupos de investigación que sean expertos en patrimonio cultural, mantenimiento de murales y con propósitos de conservación.

8. ANEXOS

8.1. Análisis por DART de las formulaciones acrílicas y pigmentos comerciales

A continuación se muestran los espectros de masas de los perilenos obtenidos por la técnica DART, cada uno muestra la señal correspondiente al pico $[M+H]^+$ característico.

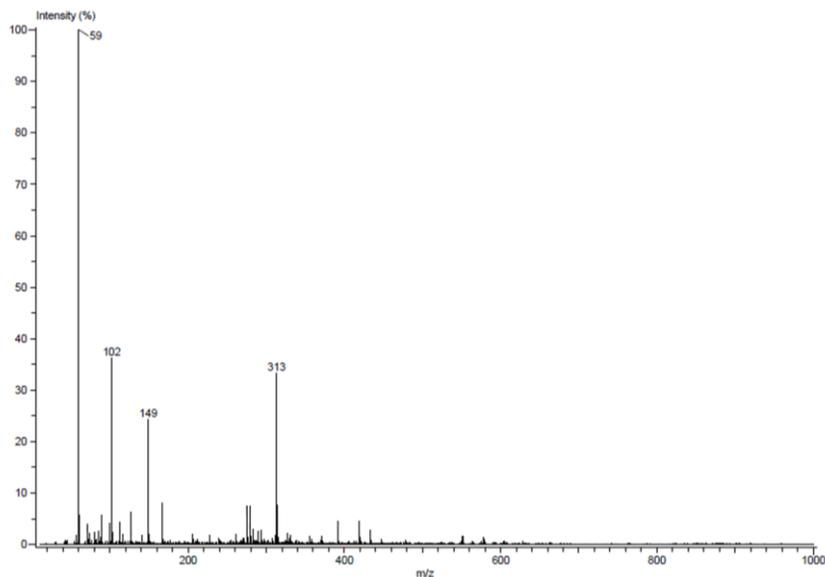


Figura 8.1. Espectro de masas DART de la molécula quinacridona purificada a partir del pigmento comercial PR206.

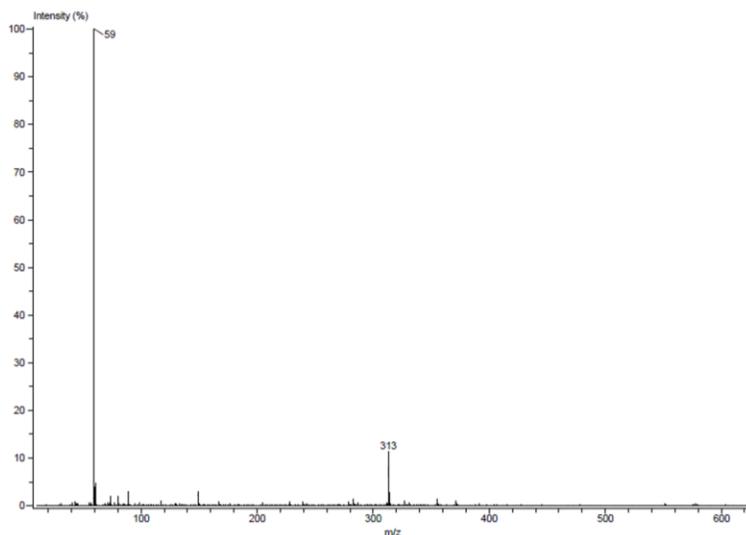


Figura 8.2. Espectro de masas DART de la molécula quinacridona purificada a partir del pigmento comercial PV19.

La señal de la molécula de quinacridona $[M+H]^+$ está presente en m/z 313 en las Figuras 8.1 y 8.2. La forma pura de esta molécula se obtuvo en ambos casos a partir de la separación cromatográfica del extracto como se explicó en la metodología.

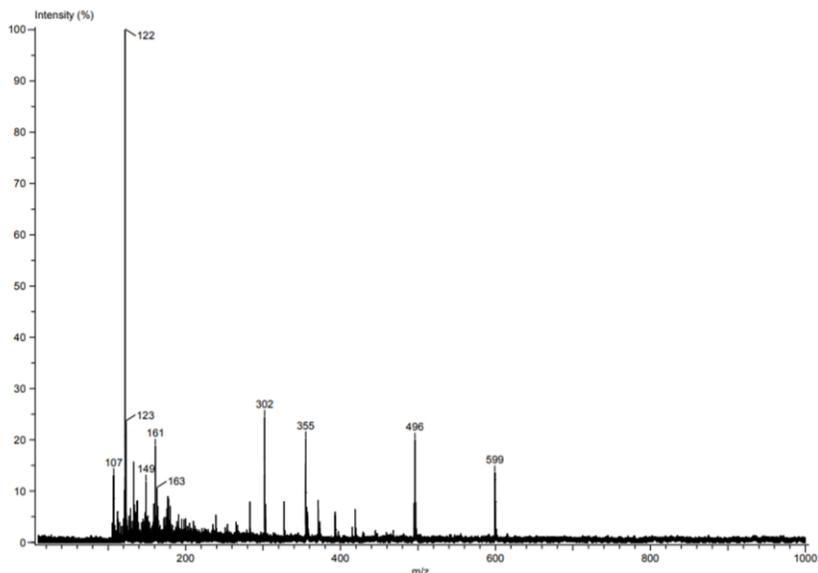


Figura 8.3. Espectro de masas DART de la molécula Pigmento Rojo 149 a partir de la formulación PR149.

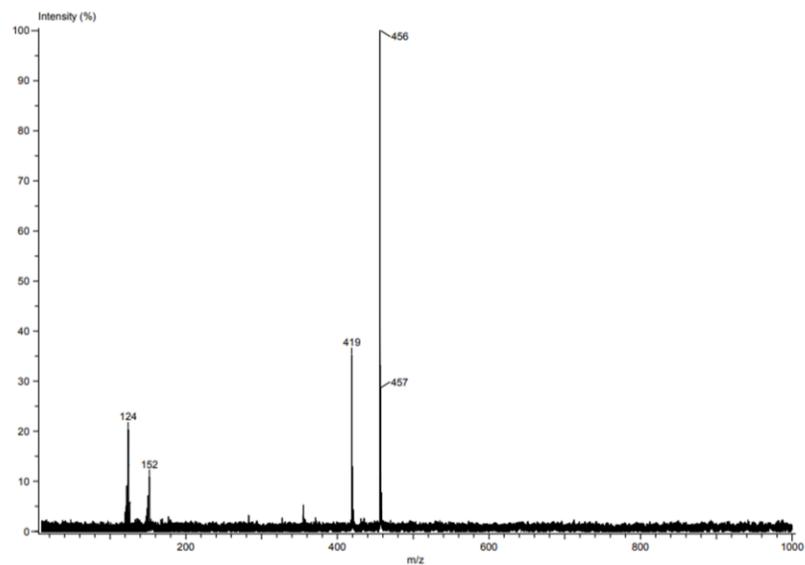


Figura 8.4. Espectro de masas DART de la molécula Pigmento Rojo 179 a partir de la formulación PR179.

Además, los espectros de masas DART de los perilenos Pigmento Rojo 149 y Pigmento Rojo 179 se ilustran en las Figuras 8.3 y 8.4. En la Figura 8.3, la señal correspondiente al

Pigmento Rojo 149 se muestra como un pico $[M+H]^+$ en m/z 599 y en la Figura 8.4, la señal correspondiente al Pigmento Rojo 179 se muestra como un pico $[M+H]^+$ en m/z 419.

8.2. Análisis por RMN- 1H de los pigmentos comerciales PV19 y PR206

En la Figura 8.5 se observan los desplazamientos químicos de los protones en partes por millón (ppm) correspondientes a la quinacridona. Molécula única dentro de la formulación comercial PV19 y con desplazamientos correspondientes a: δ 11.89 (s, 2H), 8.50 (d, $J = 1.8$ Hz, 2H), 8.25 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.77 (td, $J = 7.6, 6.8, 1.6$ Hz, 2H), 7.54 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H) y 7.25 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H). Por otro lado, en la Figura 8.6 las señales de PR206 no se pudieron resolver ya que esta formulación comercial se basa en la mezcla de quinacridona y quinacridonaquinona (explicación a continuación).

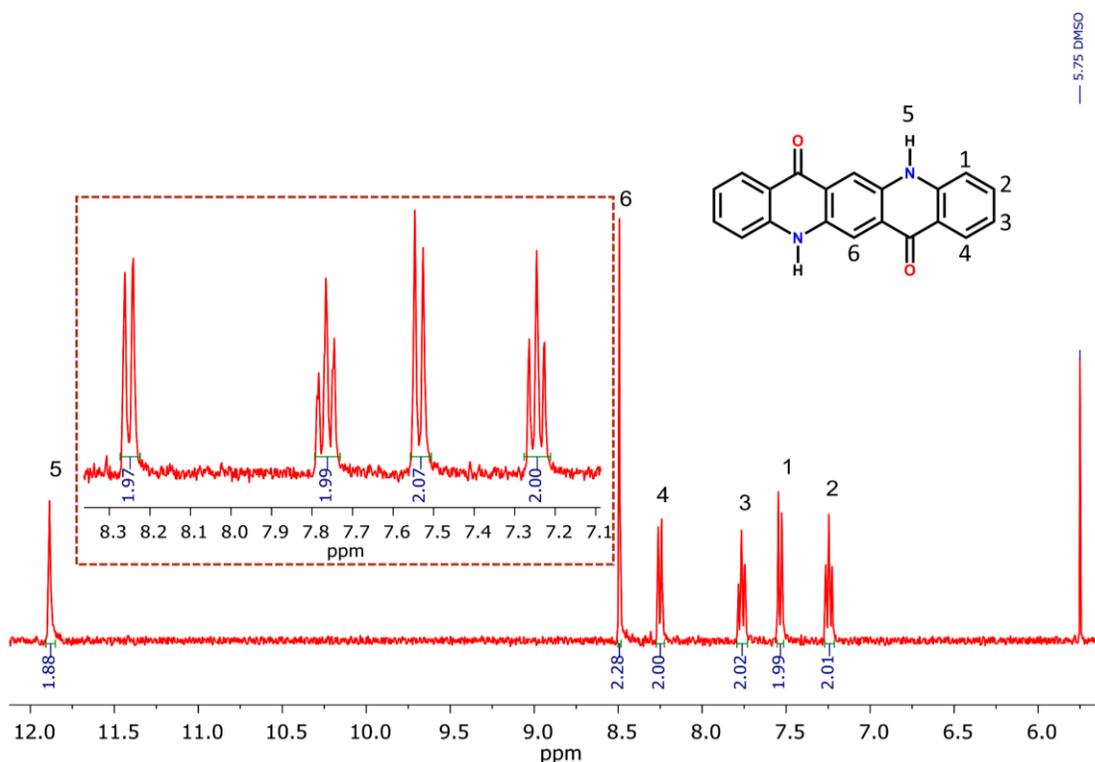


Figura .8.5. Espectro de RMN- 1H del pigmento comercial PV19 (400 MHz, $DMSO-d_6$, 298 K)

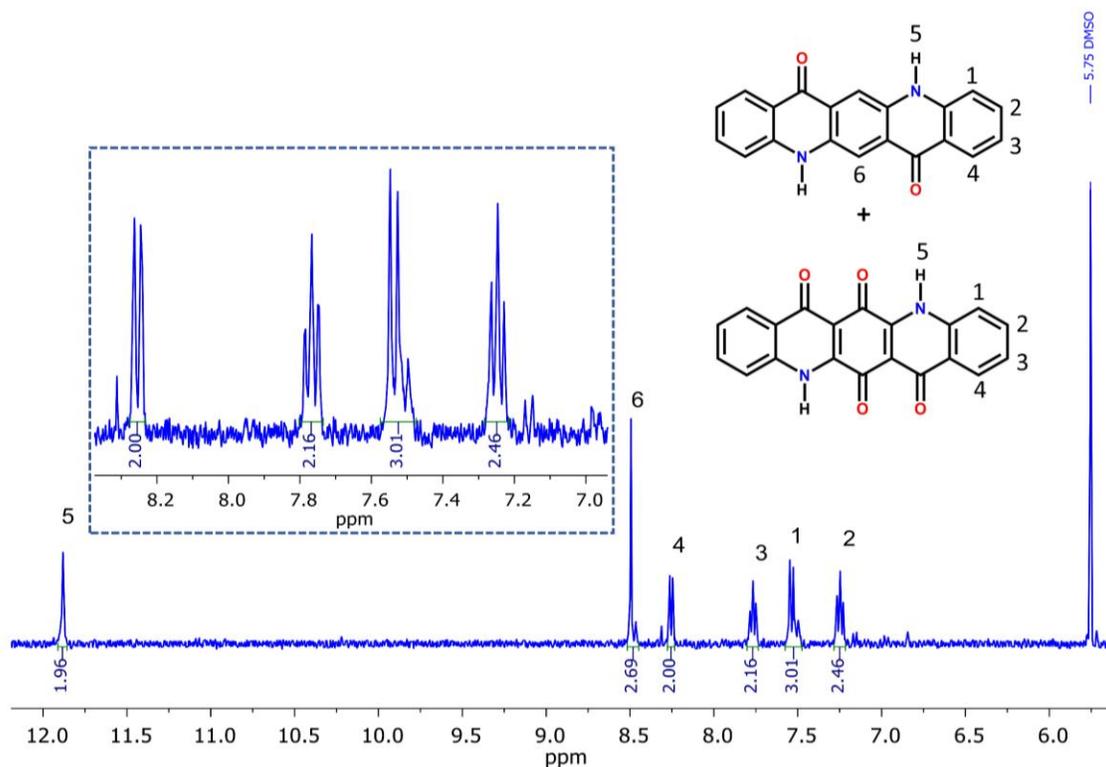


Figura 8.6. Espectro de RMN-¹H del pigmento comercial PR206 (400 MHz, DMSO-d₆, 298 K)

Con la comparación de los espectros de RMN-¹H de PV19 y PR206 (Figura 8.7) se estimó el porcentaje de quinacridonaquinona como segundo componente en la formulación PR206. En primer lugar, la señal doblete correspondiente a H₄ en 8.25 ppm se usó como referencia en la integración de las señales de 8.50 y 7.54 ppm para ambas formulaciones. Tal y como se muestra en la Figura 8.5, cada señal integra para dos protones. Caso contrario a lo que sucede en la Figura 8.6 donde la primera señal integra para 2.69 protones y la segunda para 2.46 protones. Diferencia del valor de integración que se ve representado en la Figura 8.7 con la superposición de las señales y que permite estimar la relación quinacridona:quinacridonaquinona en la formulación comercial PR206. Relación de aproximadamente un 80:20.

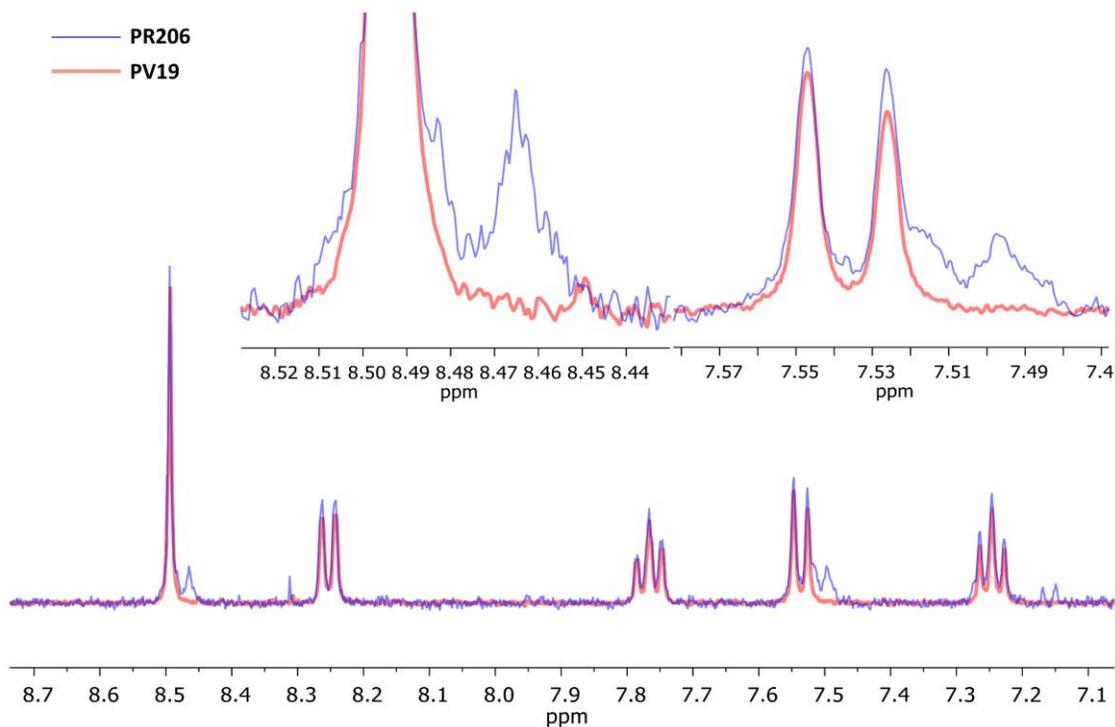


Figura 8.7. Espectro superpuestos de RMN-¹H de los pigmentos comerciales PR206 y PV19 (400 MHz, DMSO-d₆, 298 K).

8.3. Parámetros obtenidos de los decaimientos fluorescencia de los pigmentos a varios niveles de dilución hechas a extracciones de películas de las formulaciones acrílicas.

Las Tablas 8.1 a 8.4 muestran los tiempos de vida obtenidos por el ajuste con la IRF para diferentes diluciones. Diluciones hechas a partir de las extracciones de $\sim 0.4 \times 0.4$ mm de las formulaciones acrílicas. Además, se representan con color rojo los valores que tienen tiempos de vida que no caen dentro de la incertidumbre del valor real. Sumándole también las altas residuales obtenidos por el ajuste.

Tabla 8.1. Parámetros obtenidos de los decaimientos de fluorescencia del Pigmento Rojo 149 a varios niveles de dilución de la extracción de la película de la formulación acrílica PR149 en CH₂Cl₂.

Pigmento	τ [ns]	Contribución [%]	χ^2
Pigmento Rojo 149	3.50 ± 0.25	100	1.83
PR149 [4.5 × 10 ⁻⁶ M]	3.44 ± 0.13	100	1.31
PR149 Dilución 1/10	3.55 ± 0.24	100	1.30
PR149 Dilución 1/100	3.65 ± 0.19	100	2.25
PR149 Dilución 1/1000	3.57 ± 0.23 15.28 ± 0.94	98 2	4.43
PR149	3.81 ± 0.28	42	6.52
Dilución 1/10000	14.95 ± 0.83	58	

Tabla 8.2. Parámetros obtenidos de los decaimientos de fluorescencia del Pigmento Rojo 179 a varios niveles de dilución de la extracción de la película de la formulación acrílica PR179 en CH₂Cl₂.

Pigmento	τ [ns]	Contribución [%]	χ^2
Pigmento Rojo 179	3.90 ± 0.29	100	1.02
PR179 [1.02 × 10 ⁻⁶ M]	3.83 ± 0.19	100	1.18
PR179 Dilución 1/10	3.95 ± 0.25	100	1.39
PR179 Dilución 1/100	3.91 ± 0.21	100	2.08
PR179	4.24 ± 0.22	20	2.56
Dilución 1/1000	13.62 ± 0.71	80	

Tabla 8.3. Parámetros obtenidos de los decaimientos de fluorescencia de la quinacridona a varios niveles de dilución de la extracción de la película de la formulación acrílica PV19 en DMSO.

Pigmento	τ [ns]	Contribución [%]	χ^2
Quinacridona	17.70 ± 0.24	100	1.12
PV19 [1.03×10^{-5} M]	17.76 ± 0.30	100	1.77
PV19 Dilución 1/10	17.81 ± 0.33	100	1.50
PV19 Dilución 1/100	17.64 ± 0.27 1.40 ± 1.09	68 32	2.03
PV19 Dilución 1/1000	17.85 ± 0.29 2.36 ± 0.69	67 33	2.80
PV19 Dilución 1/10000	18.01 ± 0.25 2.05 ± 0.91	41 59	3.62

Tabla 8.4. Parámetros obtenidos de los decaimientos de fluorescencia de la quinacridona a varios niveles de dilución de la extracción de la película de la formulación acrílica PR206 en DMSO.

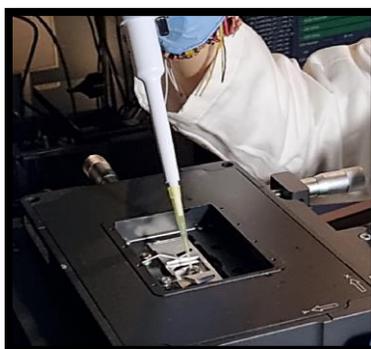
Pigmento	τ [ns]	Contribución [%]	χ^2
Quinacridona	17.70 ± 0.24	100	1.26
PR206 [6.3×10^{-6} M]	17.79 ± 0.37	100	1.51
PR206 Dilución 1/10	17.61 ± 0.29	100	1.87
PR206 Dilución 1/100	17.84 ± 0.32 2.21 ± 0.89	83 17	2.66
PR206 Dilución 1/1000	17.90 ± 0.35 2.76 ± 0.98	45 55	2.03
PR206 Dilución 1/10000	18.08 ± 0.30 3.02 ± 0.83	30 70	3.54

8.4. Protocolo de recolección de micro-muestra extraída con micro-hisopos

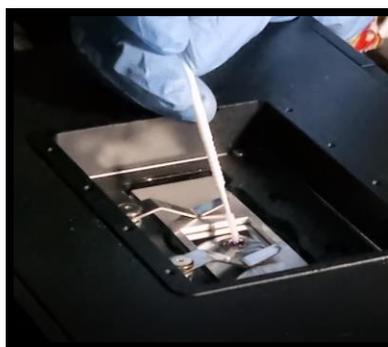
- Muestrear la superficie con un micro-hisopo embebido con una cantidad mínima de disolvente. Cabe mencionar que la superficie que se desea analizar no se ve afectada por el muestreo.



- Colocar una gota de disolvente tan pequeña como $2 \mu\text{L}$ sobre un cubreobjetos posicionado en el montaje óptico tipo confocal descrito en la metodología.



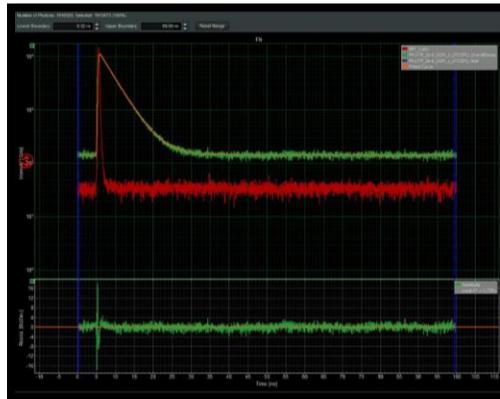
- La muestra recolectada en el micro-hisopo de muestreo llevarla a la gota de $2 \mu\text{L}$ para posterior análisis por la técnica TCSPC.



- Tomar la traza de decaimiento de fluorescencia por medio de los detectores APD altamente sensibles y el software de adquisición de datos SymphoTime 64.



- Procesar los datos y realizar el ajuste exponencial respectivo junto con la IRF. Cabe mencionar que esta función de respuesta del instrumento previamente fue obtenida bajo las mismas condiciones del experimento.



8.5. Parámetros obtenidos de los decaimientos de fluorescencia de pigmentos extraídos con micro-hisopos.

La Tabla 8.5 muestra los tiempos de vida obtenidos por el ajuste con la IRF para diferentes diluciones. Diluciones hechas a partir del muestreo con micro-hisopos y que presentan valores muy cercanos a los valores reportados por cada uno de los pigmentos en su estado puro.

Tabla 8.5. Parámetros obtenidos de los decaimiento de fluorescencia de los pigmentos extraídos con microhisopos. Las muestras se tomaron de las superficies de fibrocemento (FC) pintadas con las diferentes formulaciones acrílicas.

Pigmento	τ [ns]	Contribución [%]	χ^2
PR149	3.71 ± 0.13	100	0.99
PR179	3.99 ± 0.31	100	1.00
PV19	17.83 ± 0.40	100	1.37
PR206	17.93 ± 0.36	100	1.70

9. REFERENCIAS

1. Rainer, L. & Manning, L. *The Siqueiros Legacy, Challenges of Conserving the Artist's Monumental Murals: Proceedings of a Symposium Organized by the Getty Conservation Institute*. (Getty Conservation Institute, 2013).
2. Goldschmidt, A. & Streitberger, H. J. *BASF Handbook on Basics of Coating Technology*. (Vincentz Network, 2003).
3. Hogan, M. F. Gender and Fluid: A Reconsideration of the Stain in the Painting of Helen Frankenthaler. *Theses* (2020).
4. Galenson, D. *The Rise and (Partial) Fall of Abstract Painting in the Twentieth Century*. (2008).
5. Rooney, M. & Meldrum, T. Effect of pigment concentration on NMR relaxometry in acrylic paints. *Magn. Reson. Chem.* **58**, 880–888 (2020).
6. Aceto, M. Pigments — the palette of organic colourants in wall paintings. *Archaeol. Anthropol. Sci.* **3**, 1–23 (2021).
7. Gutierrez, J. & Roukes, N. *Painting with Acrylics*. *Watson-Guption Publications* vol. 9 (1966).
8. Squires, A. D., Kelly, M. & Lewis, R. A. Terahertz Analysis of Quinacridone Pigments. *J. Infrared, Millimeter, Terahertz Waves* **38**, 314–324 (2017).
9. Romani, A., Clementi, C., Miliani, C. & Favaro, G. Fluorescence spectroscopy: A powerful technique for the noninvasive characterization of artwork. *Acc. Chem. Res.* **43**, 837–846 (2010).
10. Clark, R. J. H. Pigment identification by spectroscopic means: an arts/science interface. *Comptes Rendus Chim.* **5**, 7–20 (2002).
11. Whitney, A. V., Casadio, F. & Van Duyne, R. P. Identification and characterization of artists' red dyes and their mixtures by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **61**, 994–1000 (2007).

12. Sanyova, J. Mild extraction of dyes by hydrofluoric acid in routine analysis of historical paint micro-samples. *Microchim. Acta* **162**, 361–370 (2008).
13. Gottschaller, P. *et al.* The evolution of Lucio Fontana's painting materials. *Stud. Conserv.* **57**, 76–91 (2012).
14. Menke, C. A., Rivenc, R. & Learner, T. The use of direct temperature-resolved mass spectrometry (DTMS) in the detection of organic pigments found in acrylic paints used by Sam Francis. *Int. J. Mass Spectrom.* **284**, 2–11 (2009).
15. Jin, Y. An Examination of the Place of Fresco in Contemporary Art Practice. *PhD thesis, Univ. Arts, London* (2004).
16. Mejía-González, A. *et al.* NMR and other molecular and elemental spectroscopies for the characterization of samples from an outdoor Mural painting by Siqueiros. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **274**, 121073 (2022).
17. Platania, E. *et al.* Identification of green pigments and binders in late medieval painted wings from Norwegian churches. *Microchem. J.* **156**, 104811 (2020).
18. Colombini, M. P., Andreotti, A., Lanterna, G. & Rizzi, M. A novel approach for high selective micro-sampling of organic painting materials by Er:YAG laser ablation. *J. Cult. Herit.* **4**, 355–361 (2003).
19. Zhang, X. & Laursen, R. A. Development of mild extraction methods for the analysis of natural dyes in textiles of historical interest using LC-diode array detector-MS. *Anal. Chem.* **77**, 2022–2025 (2005).
20. Hendriks, L. *et al.* Uncovering modern paint forgeries by radiocarbon dating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 13210–13214 (2019).
21. Longoni, M., Freschi, A., Cicala, N. & Bruni, S. Non-invasive identification of synthetic organic pigments in contemporary art paints by visible–excited spectrofluorimetry and visible reflectance spectroscopy. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **229**, (2020).

22. Lomax, S. Q. Phthalocyanine and quinacridone pigments: their history, properties and use. *Stud. Conserv.* **50**, 19–29 (2005).
23. Cortea, I. M. *et al.* Characterization of spray paints used in street art graffiti by a non-destructive multi-analytical approach. *Color Res. Appl.* 1–12 (2020).
24. Guineau, B. Non-destructive analysis of organic pigments and dyes using raman microprobe, microfluorometer or absorption microspectrophotometer. *Stud. Conserv.* **34**, 38–44 (1989).
25. Billmeyer, F. W., Kumar, R., & Saltzman, M. Identification of Organic Colorants in Art Objects by Solution spectrophotometry: Pigments. *J. Chem. Educ.* **58**, 307–313 (1981).
26. Ferreira, E. S. B., Hulme, A. N., McNab, H. & Quye, A. The natural constituents of historical textile dyes. *Chem. Soc. Rev.* **33**, 329–336 (2004).
27. Scherrer, N. C., Stefan, Z., Françoise, D., Annette, F. & Renate, K. Synthetic organic pigments of the 20th and 21st century relevant to artist's paints: Raman spectra reference collection. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **73**, 505–524 (2009).
28. Halpine, S. M. An improved dye and lake pigment analysis method for high-performance liquid chromatography and diode-array detector. *Stud. Conserv.* **41**, 76–94 (1996).
29. Rafaëly, L., Héron, S., Nowik, W. & Tchapla, A. Optimisation of ESI-MS detection for the HPLC of anthraquinone dyes. *Dye. Pigment.* **77**, 191–203 (2008).
30. Pronti, L. *et al.* Spectral Behavior of White Pigment Mixtures Using Reflectance , Ultraviolet-Fluorescence Spectroscopy , and Multispectral Imaging. *Appl. Spectrosc.* **71**, 2616–2625 (2018).
31. Poldi, G. & Caglio, S. Phthalocyanine Identification in Paintings by Reflectance Spectroscopy. A Laboratory and In Situ Study. *Opt. Spectrosc.* **114**, 929–935 (2013).

32. Degano, I., Ribechini, E., Modugno, F. & Colombini, M. P. Analytical methods for the characterization of organic dyes in artworks and in historical textiles. *Appl. Spectrosc. Rev.* **44**, 363–410 (2009).
33. A. Romani, C. Clementi, C. Miliani, B. G. Brunetti, A. Sgamelloti, G. F. Portable Equipment for Luminescence Lifetime Measurements on Surfaces A. *Appl. Spectrosc.* **62**, 1395–1399 (2008).
34. Nevin, A., Spoto, G. & Anglos, D. Laser spectroscopies for elemental and molecular analysis in art and archaeology. *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* **106**, 339–361 (2012).
35. Clementi, C. *et al.* Vibrational and electronic properties of painting lakes. *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* **92**, 25–33 (2008).
36. Verri, G., Clementi, C., Comelli, D., Cather, S. & Piqué, F. Correction of ultraviolet-induced fluorescence spectra for the examination of polychromy. *Appl. Spectrosc.* **62**, 1295–1302 (2008).
37. Sarmiento, A. *et al.* Classification and identification of organic binding media in artworks by means of Fourier transform infrared spectroscopy and principal component analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **399**, 3601–3611 (2011).
38. Piñar, G. & Sterflinger, K. Natural sciences at the service of art and cultural heritage: an interdisciplinary area in development and important challenges. *Microb. Biotechnol.* **14**, 806–809 (2021).
39. Kahrim, K. *et al.* The application of in situ mid-FTIR fibre-optic reflectance spectroscopy and GC-MS analysis to monitor and evaluate painting cleaning. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **74**, 1182–1188 (2009).
40. Bao, B. *et al.* Recent Advances in Microfluidics-Based Chromatography — A Mini Review. *Separations* **8**, 1–19 (2021).
41. Kamanna, S., Henry, J., Voelcker, N., Linacre, A. & Paul Kirkbride, K. A complementary forensic ‘proteo-genomic’ approach for the direct identification of

- biological fluid traces under fingernails. *Anal. Bioanal. Chem.* **410**, 6165–6175 (2018).
42. Moussa, A., Badawy, M. & Saber, N. Chromatic alteration of Egyptian blue and Egyptian green pigments in pharaonic late period tempera murals. *Sci. Cult.* **7**, 1–15 (2021).
 43. Zarzycki, P. K., Ślaogonekczka, M. M., Zarzycka, M. B., Włodarczyk, E. & Baran, M. J. Application of micro-thin-layer chromatography as a simple fractionation tool for fast screening of raw extracts derived from complex biological, pharmaceutical and environmental samples. *Anal. Chim. Acta* **688**, 168–174 (2011).
 44. O'Connor, D. & V. and Phillips, D. *Time-correlated single photon counting*. (Academic Press, 2012).
 45. Butron, D. Using SNR Simulation to Select a Photodetector. (2020).
 46. Hadfield, R. H. Single-photon detectors for optical quantum information applications. *Nat. Photonics* **3**, 696–705 (2009).
 47. Lim, Z. J. J. Characterisation of Single Photon Avalanche Detectors. (2016).
 48. PicoQuant. PicoHarp 300 User's Manual and Technical Data. **2.3**, H110–H113 (2001).
 49. Defeyt, C., Mazurek, J., Zebala, A. & Burchett-Lere, D. Insight into Sam Francis' painting techniques through the analytical study of twenty-eight artworks made between 1946 and 1992. *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* **122**, 1–6 (2016).
 50. Maugy, S. *Colours of Nature: Botanical Painting*. (Crowood Press, 2021).
 51. Becker, W. *Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Applications*. (Springer International Publishing, 2015).
 52. Bury, C. R. Auxochromes and Resonance. *J. Am. Chem. Soc.* **57**, 2115–2117 (1935).
 53. Learner, T. & Institute, G. C. *Analysis of Modern Paints*. (Getty Conservation

- Institute, 2004).
54. Lewis, P. A. *Organic Pigments*. (Federation of Societies for Coatings Technology, 1995).
 55. Herbst, W. & Hunger, K. *Industrial Organic Pigments: Production, Properties, Applications*. (Wiley, 2006).
 56. T. E. et al. *Colour Index*. (Society of Dyers and Colourists, 1978).
 57. Hao, Z. & Iqbal, A. Some aspects of organic pigments. *Chem. Soc. Rev.* **26**, 203 (1997).
 58. Parikh, M. & Shah, S. S. Preparation of new pigments of quinacridone group and their pigmentary properties. *Int. J. ChemTech Res.* **2**, 1391–1396 (2010).
 59. Learner, T. & Institute, G. C. *Modern Paints Uncovered: Proceedings from the Modern Paints Uncovered Symposium*. (Getty Conservation Institute, 2007).
 60. Jablonski, E., Learner, T., Hayes, J. & Golden, M. Conservation concerns for acrylic emulsion paints. *Stud. Conserv.* **48**, 3–12 (2003).
 61. Learner, T. A review of synthetic binding media in twentieth-century paints. *Conserv.* **24**, 96–103 (2000).
 62. Hurlburt, L. P. The Siqueiros Experimental Workshop: New York, 1936. *Art J.* **35**, 237–246 (1976).
 63. Thompson, G. *Limitlessness and the Sublime : illuminating notions*. (2008).
 64. Anfam, D. *Abstract Expressionism*. (Thames & Hudson, 2015).
 65. La Nasa, J. et al. 60 years of street art: A comparative study of the artists' materials through spectroscopic and mass spectrometric approaches. *J. Cult. Herit.* **48**, 129–140 (2021).
 66. Kirby, D. P., Khandekar, N., Sutherland, K. & Price, B. A. Applications of laser desorption mass spectrometry for the study of synthetic organic pigments in works of

- art. *Int. J. Mass Spectrom.* **284**, 115–122 (2009).
67. René De La Rie, E. The influence of varnishes on the appearance of paintings. *Stud. Conserv.* **32**, 1–13 (1987).
 68. Lomax, S. Q. & Learner, T. A review of the classes, structures, and methods of analysis of synthetic organic pigments. *J. Am. Inst. Conserv.* **45**, 107–125 (2006).
 69. Madden, O., Abraham, M., Scheerer, S. & Werden, L. The Effects of Laser Radiation on Adhesives, Consolidants, and Varnishes. *Lasers Conserv. Artworks* 247–254 (2006).
 70. Padfield, T. & Landi, S. The light fastness of the natural dyes. *Stud. Conserv.* **11**, 181–196 (1966).
 71. Crews, P. C. The influence of mordant on the lightfastness of yellow natural dyes. *J. Am. Inst. Conserv.* **21**, 43–58 (1982).
 72. Wouters, J. High performance liquid chromatography of anthraquinones: Analysis of plant and insect extracts and dyed textiles. *Stud. Conserv.* **30**, 119–128 (1985).
 73. Bosakova, Z., Stulik, K., Novotna, P. & Stulik, K. High-performance liquid chromatographic determination of some anthraquinone and naphthoquinone dyes occurring in historical textiles. *J. Chromatogr. A* **863**, 235–241 (1999).
 74. Van Elslande, E., Lecomte, S. & Le Hô, A. S. Micro-Raman spectroscopy (MRS) and surface-enhanced Raman scattering (SERS) on organic colourants in archaeological pigments. *J. Raman Spectrosc.* **39**, 1001–1006 (2008).
 75. Sonoda, N., Rioux, J. P. & Duval, A. R. Identification des matériaux synthétiques dans les peintures modernes. II. Pigments organiques and matière picturale. *Stud. Conserv.* **38**, 99–127 (1993).
 76. Russell, J., Singer, B. W., Perry, J. J. & Bacon, A. The identification of synthetic organic pigments in modern paints and modern paintings using pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **400**, 1473–1491 (2011).

77. Anglos, D. *et al.* Laser-induced fluorescence in artwork diagnostics: An application in pigment analysis. *Appl. Spectrosc.* **50**, 1331–1334 (1996).
78. Faulkner, E. B. & Schwartz, R. J. *High Performance Pigments.* (2009).
79. Trigueiro, P. *et al.* When anthraquinone dyes meet pillared montmorillonite: Stability or fading upon exposure to light? *Dye. Pigment.* **159**, 384–394 (2018).
80. Miliani, C., Romani, A. & Favaro, G. A spectrophotometric and fluorimetric study of some anthraquinoid and indigoid colorants used in artistic paintings. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **54**, 581–588 (1998).
81. Miliani, C., Romani, A. & Favaro, G. hydroxyanthraquinones . A spectrophotometric and fluorimetric study. *J. Phys. Org. Chem.* 141–150 (2000).
82. Favaro, G., Miliani, C., Romani, A. & Vagnini, M. Role of protolytic interactions in photo-aging processes of carminic acid and carminic lake in solution and painted layers. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2**, 192–197 (2002).
83. Clementi, C., Miliani, C., Romani, A. & Favaro, G. In situ fluorimetry: A powerful non-invasive diagnostic technique for natural dyes used in artefacts. Part I. Spectral characterization of orcein in solution, on silk and wool laboratory-standards and a fragment of Renaissance tapestry. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **64**, 906–912 (2006).
84. Kinoshita, S. & Kushida, T. Laser-Induced fluorescence of oil colours and its application to the identification of pigments in oil paintings. *Jpn. J. Appl. Phys.* **21**, 1032–1036 (1982).
85. Nevin, A., Cather, S., Anglos, D. & Fotakis, C. Analysis of protein-based binding media found in paintings using laser induced fluorescence spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **573–574**, 341–346 (2006).
86. Sundberg, B. N. *et al.* Analytical approaches for the characterization of early synthetic organic pigments for artists' paints. *Microchem. J.* **170**, 106708 (2021).

87. Colombini, M. P., Modugno, F., Giacomelli, M. & Francesconi, S. Characterisation of proteinaceous binders and drying oils in wall painting samples by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **846**, 113–124 (1999).
88. Perez-Rodriguez, J. L., Robador, M. D., Centeno, M. A., Siguenza, B. & Duran, A. Wall paintings studied using Raman spectroscopy: A comparative study between various assays of cross sections and external layers. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **120**, 602–609 (2014).
89. Paiva de Carvalho, H. *et al.* Combining an innovative non-invasive sampling method and high-throughput sequencing to characterize fungal communities on a canvas painting. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **145**, 104816 (2019).
90. Klessinger, M. & Michl, J. *Excited states and photochemistry of organic molecules.* (VCH, 1995).
91. Rodríguez, A. R. & Román, J. Z. *Espectroscopía.* (Pearson Educación, 2004).
92. Parson, W. W. *Modern Optical Spectroscopy: With Examples from Biophysics.* Springer: New York, USA (2009).
93. Levine, I. N., Rodríguez, A. R., Pascual, A. B. & Román, J. Z. *Química cuántica.* (Pearson Educación, 2001).
94. Valeur, B. *Analytical Atomic Spectrometry with Flames and Plasmas Handbook of Analytical Techniques Single-Molecule Detection in Solution . Methods and Applications. Methods* vol. 8 (2001).
95. Rendell, D., Mowthorpe, D. J. & (Project), A. *Fluorescence and Phosphorescence Spectroscopy.* (ACOL, London by Wiley, 1987).
96. Bahnemann, D. & Patrocínio, A. O. T. *Springer Handbook of Inorganic Photochemistry.* (Springer International Publishing, 2022).
97. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* Springer: New York, USA, 3rd edn, (Springer: New York, 2006).

98. Engel, T., Hehre, W. & Angerhofer, A. *Physical Chemistry, Quantum Chemistry, and Spectroscopy*. (Pearson, 2019).
99. Al-rawashdeh, N. Current Achievement and Future Potential of Fluorescence Spectroscopy. *Macro to Nano Spectrosc.* 209–250 (2012).
100. Ma, H., Peng, Q., An, Z., Huang, W. & Shuai, Z. Efficient and Long-Lived Room-Temperature Organic Phosphorescence: Theoretical Descriptors for Molecular Designs. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 1010–1015 (2019).
101. Del Valle, J. C. & Catalán, J. Kasha's rule: A reappraisal. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **21**, 10061–10069 (2019).
102. Cowan, D. O. & Drisko, R. L. *Elements of organic photochemistry*. (Plenum Press, 1976).
103. Turro, N. J. *Modern Molecular Photochemistry*. (University Science Books, 1991).
104. Tkachenko, N. V. Steady State Emission Spectroscopy. *Opt. Spectrosc.* 107–127 (2006).
105. Tkachenko, N. V. Steady State Absorption Spectroscopy. *Opt. Spectrosc.* 89–106 (2006).
106. Berlman, I. *Handbook of fluorescence spectra of Aromatic Molecules*. (Elsevier Science, 2012).
107. Parker, V. C. A. Photoluminescence of Solutions. *Elsevier Amsterdam, London, New York* 3–4 (1969).
108. Albani, J. R. *Structure and Dynamics of Macromolecules: Absorption and Fluorescence Studies*. (Elsevier Science, 2011).
109. Demchenko, A. P., Tomin, V. I. & Chou, P. T. Breaking the Kasha Rule for More Efficient Photochemistry. *Chem. Rev.* **117**, 13353–13381 (2017).
110. Lodge, J. P. *Encyclopedia of Life Science. Fluorescence Spectrophotometry* (2009).

111. Paul Worsfold, Alan Townshend, Colin F. Poole, M. M. Spectrophotometry. in *Encyclopedia of Analytical Science* 318–321 (2005).
112. Brand, L. & Johnson, M. L. An Introduction to Fluorescence Spectroscopy. in *Fluorescence spectroscopy* 1–34 (2008).
113. Wypych, G. *Handbook of UV Degradation and Stabilization*. (Elsevier Science, 2015).
114. Scaiano, J. C. *CRC Handbook of Organic Photochemistry*. (CRC Press, 1989).
115. Rhys Williams, A. T., Winfield, S. A. & Miller, J. N. Relative fluorescence quantum yields using a Computer-controlled luminescence spectrometer. *Analyst* **108**, 1067–1071 (1983).
116. Lakowicz, J. R. *Topics in Fluorescence Spectroscopy*. (Plenum Press, 1991).
117. Birks, J. B. *Photophysics of Aromatic Molecules*. (Wiley-Interscience, 1970).
118. Toptygin, D. Effects of the Solvent Refractive Index and Its Dispersion on the Radiative Decay Rate and Extinction Coefficient of a Fluorescent Solute. *J. Fluoresc.* **13**, 201–219 (2003).
119. Jain, A., Blum, C. & Subramaniam, V. *Fluorescence Lifetime Spectroscopy and Imaging of Visible Fluorescent Proteins. Advances in Biomedical Engineering* (Elsevier, 2009).
120. Nijegorodov, N. I. & Downey, W. S. The influence of planarity and rigidity on the absorption and fluorescence parameters and intersystem crossing rate constant in aromatic molecules. *J. Phys. Chem.* **98**, 5639–5643 (1994).
121. He, W. & Guo, Z. Comprehensive Inorganic Chemistry II. in *Molecular Imaging: Chemistry and Applications* vol. 8 733–780 (2013).
122. Millar, D. P. Time resolved fluorescence spectroscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 637–642 (1996).

123. Becker, W. *Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Techniques*. (Springer Berlin Heidelberg, 2005).
124. Prummer, M., Hübner, C. G., Beate Sick, B. H., Renn, A. & Wild, U. P. Single-molecule identification by spectrally and time-resolved fluorescence detection. *Anal. Chem.* **72**, 443–447 (2000).
125. O'Connor, D. V., Ware, W. R. & Andre, J. C. Deconvolution of fluorescence decay curves. A critical comparison of techniques. *J. Phys. Chem.* **83**, 1333–1342 (1979).
126. Köllner, M. & Wolfrum, J. How many photons are necessary for fluorescence-lifetime measurements? *Chem. Phys. Lett.* **200**, 199–204 (1992).
127. Ballew, R. M. & Demas, J. N. An Error Analysis of the Rapid Lifetime Determination Method for the Evaluation of Single Exponential Decays. *Anal. Chem.* **61**, 30–33 (1989).
128. Becker, W. *Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Applications*. (2015).
129. Rottenfusser, R. *Proper alignment of the microscope. Methods in Cell Biology* vol. 114 (Elsevier Inc., 2013).
130. Hungerford, G. & Birch, D. J. S. Single-photon timing detectors for fluorescence lifetime spectroscopy. *Meas. Sci. Technol.* **7**, 121–135 (1996).
131. Ripoche, G. & Harari, J. Avalanche photodiodes. *Optoelectron. Sensors* 58–109 (2010).
132. Benham, G. S. Practical aspects of objective lens selection for confocal and multiphoton digital imaging techniques. *Methods Cell Biol.* **2002**, 245–299 (2002).
133. Zhao, Q., Young, I. T. & de Jong, J. G. S. Photon budget analysis for fluorescence lifetime imaging microscopy. *J. Biomed. Opt.* **16**, 086007 (2011).
134. Sheppard, C. & Shotton, D. *Confocal Laser Scanning Microscopy: Principles*. Carl Zeiss 37 (1998).

135. Scanning, T. H. E., *Microscope, O. & Principle*, T. H. E. C. The confocal microscope. *Opt. Imaging Tech. Cell Biol. Second Ed.* 63–82 (2012).
136. Valeur, B. & Berberan-Santos, M. N. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. (Wiley, 2013).
137. Ströhl, F., Wong, H. H. W., Holt, C. E. & Kaminski, C. F. Total internal reflection fluorescence anisotropy imaging microscopy: Setup, calibration, and data processing for protein polymerization measurements in living cells. *Methods Appl. Fluoresc.* **6**, (2018).
138. Vogel, S. S., Thaler, C., Blank, P. S. & Koushik, S. V. Time-resolved fluorescence anisotropy. *Flim Microsc. Biol. Med.* 245–288 (2009) doi:10.1201/9781420078916-17.
139. Fleming, G. R. *Chemical Applications of Ultrafast Spectroscopy*. (Oxford University Press, 1986).
140. Simon, J. D. *Ultrafast Dynamics of Chemical Systems*. (Springer Netherlands, 2012).
141. Jimenez, R., Fleming, G. R., Kumar, P. V. & Maroncelli, M. Femtosecond solvation dynamics of water. *Nature* **369**, 471–473 (1994).
142. Perrin, F. Mouvement brownien d'un ellipsoïde - I. Dispersion diélectrique pour des molécules ellipsoïdales. *J. Phys. le Radium* **5**, 497–511 (1934).
143. Dutt, G. B. & Sachdeva, A. Temperature-dependent rotational relaxation in a viscous alkane: Interplay of shape factor and boundary condition on molecular rotation. *J. Chem. Phys.* **118**, 8307–8314 (2003).
144. Perrin, F. Mouvement brownien d'un ellipsoïde - I. Dispersion diélectrique pour des molécules ellipsoïdales. *Le J. Phys. le Radium* **5**, (1934).
145. Hu, C. M. & Zwanzig, R. Rotational friction coefficients for spheroids with the slipping boundary condition. *J. Chem. Phys.* **4354**, 4354–4357 (1974).
146. Small, E. W. & Isenberg, I. Hydrodynamic properties of a rigid molecule: Rotational

- and linear diffusion and fluorescence anisotropy. *Biopolymers* **16**, 1907–1928 (1977).
147. Bax, A. & Davis, D. G. Practical aspects of two-dimensional transverse NOE spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **63**, 207–213 (1985).
 148. Dimitrov, V. I. Breakdown of the Stokes-Einstein relation in supercooled liquids. *J. Metastable Nanocrystalline Mater.* **20–21**, 541–545 (2004).
 149. Simon, J. D. Time-Resolved Studies of Solvation in Polar Media. *Acc. Chem. Res.* **21**, 128–134 (1988).
 150. Srivastava, A. & Doraiswamy, S. Rotational diffusion of rose bengal. *J. Chem. Phys.* **103**, 6197–6205 (1995).
 151. Dillon, C. E., Lagalante, A. F. & Wolbers, R. C. Acrylic emulsion paint films: The effect of solution pH, conductivity, and ionic strength on film swelling and surfactant removal. *Stud. Conserv.* **59**, 52–62 (2014).
 152. Horn, M. B. *Acrylic Resins*. (Reinhold Publishing Corporation, 1960).
 153. Morgan. *Outlines of Paint Technology*. (Halsted Press, 1990).
 154. Mizuguchi, J. & Tojo, K. Electronic structure of perylene pigments as viewed from the crystal structure and excitonic interactions. *J. Phys. Chem. B* **106**, 767–772 (2002).
 155. Sakamoto, T. & Pac, C. A ‘green’ route to perylene dyes: Direct coupling reactions of 1,8-naphthalimide and related compounds under mild conditions using a ‘new’ base complex reagent, t-BuOK/DBN. *J. Org. Chem.* **66**, 94–98 (2001).
 156. Del Puerto, E., Domingo, C., Garcia Ramos, J. V. & Sanchez-Cortes, S. Adsorption study and detection of the high performance organic pigments quinacridone and 2,9-dimethylquinacridone on Ag nanoparticles by surface-enhanced optical spectroscopy. *Langmuir* **30**, 753–761 (2014).
 157. Tsutsui, T., Kusaba, S., Yamashina, M., Akita, M. & Yoshizawa, M. Open versus Closed Polyaromatic Nanocavity: Enhanced Host Abilities toward Large Dyes and Pigments. *Chem. - A Eur. J.* **25**, 4320–4324 (2019).

158. ASTM International. Standard Practices for Producing Films of Uniform Thickness of Paint, Coatings and Related Products on Test Panels D823–95. 1–8 (2018).
159. Arvizu, M. *et al.* Materiales fabriles como recurso plástico: estudio sobre recubrimientos industriales para la conservación de paneles de fibrocemento empleados en pintura mural. *Conservación y restauración* **20**, 43–52 (2020).
160. Frisch, M. J. *et al.* G16_a03. Gaussian 16, Revision A.03, Gaussian, Inc., Wallin (2016).
161. Guido, C. A., Knecht, S., Kongsted, J. & Mennucci, B. Benchmarking time-dependent density functional theory for excited state geometries of organic molecules in gas-phase and in solution. *J. Chem. Theory Comput.* **9**, 2209–2220 (2013).
162. Jacquemin, D., Wathelet, V., Perpète, E. A. & Adamo, C. Extensive TD-DFT benchmark: Singlet-excited states of organic molecules. *J. Chem. Theory Comput.* **5**, 2420–2435 (2009).
163. Oltean, M. *et al.* Absorption spectra of PTCDI: A combined UV-Vis and TD-DFT study. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **97**, 703–710 (2012).
164. Fortino, M. *et al.* On the simulation of vibrationally resolved electronic spectra of medium-size molecules: The case of styryl substituted BODIPYs. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **21**, 3512–3526 (2019).
165. Gupta, S. & Samal, N. Application of direct analysis in real-time mass spectrometry (DART-MS) in forensic science: a comprehensive review. *Egypt. J. Forensic Sci.* **12**, (2022).
166. Kremer Pigmente GmbH & Co. KG. Quinacridone Chestnut Brown, PR 206, SDS No. 23480. *accessed June 29, 2021* Aichstetten, Germany https://shop.kremerpigments.com/elements/resources/products/files/23480_SDS.pdf (2016).
167. Del Puerto, E., Sánchez-Cortés, S., García-Ramos, J. V. & Domingo, C. Solution SERS of an insoluble synthetic organic pigment-quinacridone quinone-employing

- calixarenes as dispersive cavitands. *Chem. Commun.* **47**, 1854–1856 (2011).
168. Morris, J. V., Mahaney, M. A. & Huber, J. R. Fluorescence quantum yield determinations. 9,10-Diphenylanthracene as a reference standard in different solvents. *J. Phys. Chem.* **80**, 969–974 (1976).
169. Taniguchi, M., Du, H. & Lindsey, J. S. PhotochemCAD 3: Diverse Modules for Photophysical Calculations with Multiple Spectral Databases. *Photochem. Photobiol.* **94**, 277–289 (2018).
170. Gentili, P. L., Clementi, C. & Romani, A. Ultraviolet-visible absorption and luminescence properties of quinacridone-barium sulfate solid mixtures. *Appl. Spectrosc.* **64**, 923–929 (2010).
171. Jia, T., Huang, S., Bohra, H. & Wang, M. Examining derivatives of quinacridone, diketopyrrolopyrrole and indigo as the visible-light organic photocatalysts for metal-free atom transfer radical polymerization. *Dye. Pigment.* **165**, 223–230 (2019).
172. Yokoyama, Y. The synthesis and color of Pyrido [1',2':1,2]pyrimido[4,5-b]-acridine-7,15-diones. *Chem. Soc. Japan* **56**, 1775–1779 (1983).
173. IÇLI, S. & Icil, H. Fluorescence quantum yields of perylene 3,4,9,10-tetracarboxylic acid-bis-n,n' aryl(alkyl)diimides. *Spectrosc. Lett.* **27**, 323–332 (1994).
174. Binant, C. & Lautie, A. Identification of quinacridone pigment mixtures using resonance Raman microspectrometry. *Appl. Spectrosc.* **43**, 851–855 (1989).
175. Lomax, S. Q. The application of x-ray powder diffraction for the analysis of synthetic organic pigments. Part 1: Dry pigments. *J. Coatings Technol. Res.* **7**, 331–346 (2010).
176. Plaza-Medina, E. F., Rodríguez-Córdoba, W. & Peon, J. Role of upper triplet states on the photophysics of nitrated polyaromatic compounds: S1 lifetimes of singly nitrated pyrenes. *J. Phys. Chem. A* **115**, 9782–9789 (2011).
177. El-Sayed, M. A. Spin-orbit coupling and the radiationless processes in nitrogen heterocyclics. *J. Chem. Phys.* **38**, 2834–2838 (1963).

178. Lower, S. K. & El-Sayed, M. A. The triplet state and molecular electronic processes in organic molecules. *Chem. Rev.* **66**, 199–241 (1966).
179. White, R. The application of gas-chromatography to the identification of waxes. *Stud. Conserv.* **23**, 57–68 (1978).
180. Dutt, G. B. & Doraiswamy, S. Picosecond reorientational dynamics of polar dye probes in binary aqueous mixtures. *J. Chem. Phys.* **96**, 2475–2491 (1992).
181. Dutt, G. B. & Ghanty, T. K. Is molecular rotation really influenced by subtle changes in molecular shape? *J. Chem. Phys.* **121**, 3625–3631 (2004).
182. Hartman, R. S., Konitsky, W. M., Waldeck, D. H., Chang, Y. J., & Castner, E. W. Probing solute – solvent electrostatic interactions: Rotational diffusion studies of 9,10-disubstituted anthracenes. *J. Chem. Phys.* **106**, 7920–7930 (1997).
183. Esquivelzeta-Rabell, M., Peon, J. & Cuevas, G. Rotational diffusion of dihydroxy coumarins: effect of OH groups and their relative position on solute-solvent interactions. *J. Phys. Chem. B* **113**, 8599–8606 (2009).
184. Mateo, C. R. *et al.* Rotational Dynamics of 1,6-Diphenyl- 1,3,5-hexatriene and Derivatives from Fluorescence Depolarization. *J. Phys. Chem.* **97**, 3486–3491 (1993).
185. Gudgin Templeton, E. F., Quitevis, E. L. & Kenney-Wallace, G. A. Picosecond reorientational dynamics of resorufin: Correlations of dynamics and liquid structure. *J. Phys. Chem.* **89**, 3238–3243 (1985).
186. Turton, D. A. & Wynne, K. Stokes – Einstein – Debye Failure in Molecular Orientational Diffusion: Exception or Rule? *J. Phys. Chem. B* **118**, 4600–4604 (2014).
187. Axelrod, D. Carbocyanine dye orientation in red cell membrane studied. *Biophys. J.* **26**, 557–573 (1979).

10. ARTÍCULO PUBLICADO



Time-resolved fluorescence and anisotropy studies of red pigments present in acrylic formulations

Andrea Cadena-Caicedo, Mario González-Gutiérrez, Óscar Guzmán-Méndez, Mariana M. Reza, Jesús Durán-Hernández, Jorge Peon*

Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Pigments
Fluorescent
Perylene
Quinacridone
Time-correlated single photon counting
Time-Resolved Emission Anisotropy
Minimal sample

ABSTRACT

Red organic pigments are frequently found in modern paintings and murals based on acrylic formulations. The detection of these molecules is valuable to guide investigations about cultural heritage and for restoration efforts. These studies usually employ microscopic amounts of materials that are obtained through swabbing or micro-sampling. In this contribution we describe the time-resolved emission properties of a set of red pigments with the objective of characterizing their excited state properties and developing strategies to identify their presence through fluorescence lifetime measurements, even in concentrations of the order of 10^{-9} M. As we show, using different solvent systems, the emission decay measurements can be setup to be a robust identification technique that avoids problems with evaporation or partial solubility. We also show that the sensitivity of these determinations is improved using a confocal type of setup with a high numerical aperture lens to ensure a high photon capture. This setup also allows for the samples to be prepared in microliter level volumes which implies a relatively high concentration of the pigments. In addition, we show that the lifetime measurements can be complemented with determinations of the emission anisotropy decays with the same experimental setup, which provides an additional property specific to each pigment, permitting an accurate differentiation between fluorophores.

1. Introduction

The development of acrylic paints as an artistic medium emerged in Mexico in the 1920s. With these materials, artists like David Alfaro Siqueiros, Diego Rivera and José Clemente Orozco found a solution to the problem of an environment-resistant media to shape public large-scale artworks [1]. Acrylics are still in use nowadays by modern artists due to their coloring effects, fast drying and permanence qualities [2]. A frequent motif of artwork based on acrylic paints is the use of bright red organic pigments which frequently appear as a single coloring agent in the formulation which can be dispersed through large areas of a mural [3,4]. The study and identification of these pigments, which are defined as non-soluble dyes in the medium and provide opacity and color properties [3], can be important for conservation and restoration purposes [5–11]. Usually, the historical background of a particular art piece or mural will yield a small set of options to discern the specific pigment [12]. Recent developments in separative analytical chemistry have made it possible to identify organic pigments in artworks [13–15].

However, in most cases, the analysis of historical samples by methods based in chromatographic analysis is affected by the requirement of relatively large samples (0.5–1 mg) since the content of the organic colorants only corresponds to a few percent of the sample mass [16].

In recent years, techniques based on the use of visible light have been advanced to determine the presence of specific components in artworks [12,14,15,17–28]. Optical spectroscopic techniques have specific advantages for some of these applications, which may include portability and direct use on the art piece, or the possibility of combining different methods like reflectance, absorbance and emission spectroscopies [12, 20,29–32]. Despite the availability of different optical methods, the unparallel sensitivity of fluorescence spectroscopy has not been fully taken advantage of, due to the fact that the emission bands of conjugated systems tend to be broad and featureless [29,33,34]. In this regard, time-resolved fluorescence measurements can provide significant additional information for microscopic samples dissolved in small solvent volumes, which may be obtained from minimal-contact swabbing [35–37], microscopic flakes, or as fractions from micro-scale separation

* Corresponding author. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Química, Ciudad Universitaria, 04510, México, DF, Mexico.
E-mail address: jpeon@unam.mx (J. Peon).

methods [38].

Time-resolved emission measurements through Time-Correlated Single Photon Counting (TCSPC) is based on the correlation of individually detected photons to build a histogram of their emission times after a short excitation light pulse. Due to the high sensitivity of modern avalanche photodiode detectors (APDs), and the high fraction of photons that can be brought to the detector with high numerical aperture (NA) objectives (see below), TCSPC is among the spectroscopic techniques with the highest sensitivity for emissive molecules [29,39,40]. Of importance for the present study, the use of high numerical aperture objectives -where the excitation and light collection is made with the same lens system-also allows for a drastic reduction of the volume of the dissolved sample, down the order of a microliter. With this volume level, a high concentration of the fluorophores can be achieved even when the original sample might be of the order of a few picomoles [39,41], including cases where the sample is obtained through the use of a small sampling swab (micro-swab) dabbed on the surface of the material by an expert art restorer (also, see video linked through the Supporting Info.) [35–37,42,43]. In addition, if the sample is obtained as a chromatographic fraction, the solvent can be appropriately evaporated to increase the concentration of the emissive pigment [38,44].

In this contribution we highlight several issues related to the use of TCSPC to identify the presence of emissive organic red pigments in acrylic formulations. Nowadays, TCSPC is a common technique available in commercial fluorimeters and has been used previously for heritage studies [29]. We seek to comment on the sensitivity of this technique, and to explore different variables and strategies for the use of setups which are similar to a confocal setup but without a detection pinhole to increase sensitivity. This arrangement makes it possible to time-resolve fluorescence signals with excellent signal-to-noise ratio in concentrations of the order of 10^{-9} M from sample sizes less than $100 \mu\text{m}^2$, in volumes of the order of microliters. As we show, depending on the sample, the combination of different solvents for extraction and detection of the TCSPC sample can greatly improve the robustness of the method. In addition to TCSPC traces, we performed Time-Resolved Emission Anisotropy (TREA) measurements using the same setup to have an additional method to corroborate the presence of a given pigment and to differentiate between pigments that have similar decay times. The TREA decays are directly related to the rotational diffusion of the molecules in the solution. Thus, they are an additional signature of each molecule with a strong dependence on the solvent system. In fact, from proper adjustment of solvent mixtures, the anisotropy decays can

be made to fit in different time-regimes. This allows for a proper determination window which should be adequate for both the fluorescence lifetime of the molecule, and the time resolution of the instruments [39,41].

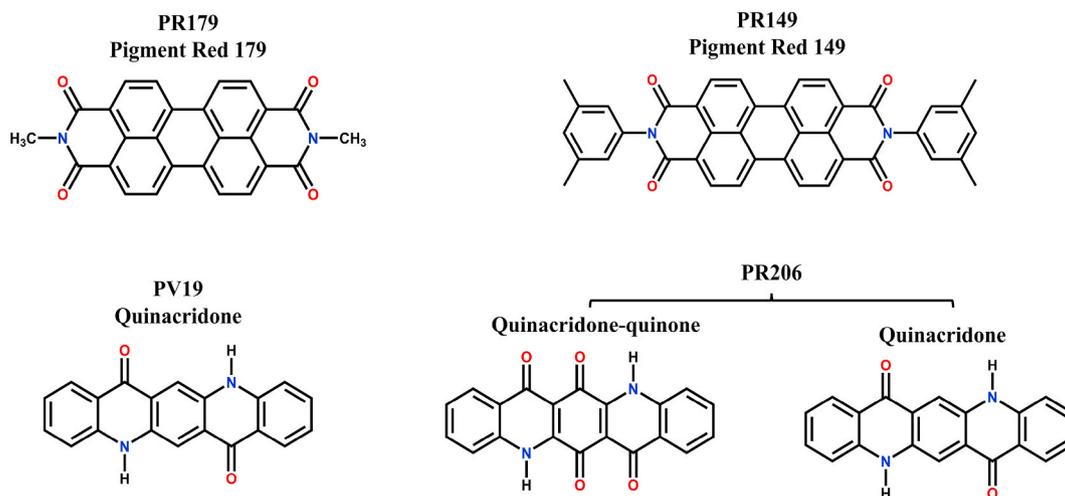
For this opening study, we have chosen a small set of red pigments, including quinacridones and diimides of the perylene tetracarboxylic acid contained in acrylic formulations frequently used in modern paintings. The molecular structures are included in Scheme 1. These compounds make up a test-set of pigments, which actually have been used in modern art works [8,18,45–48], and that were selected in order to foresee general strategies for the use of TCSPC in these purposes. Some examples of the specific use of these pigments by modern artists is documented in the Supporting Info.

The typical signals of these pigments were also determined from extractions of the respective commercial acrylic formulations: PR149, PR179, PR206 and PV19. Finally, these acrylics were sampled from dry surfaces using different substrates to explore the effects of the base surface on the measurements. As substrates we included plaster (P), fiber cement (FC), gray cement (GC) and white cement (WC).

2. Experimental

2.1. Materials and sample preparations

Pure pigments, commercial forms of the pigments and acrylic formulations were examined in this work. The pure pigments were either purchased directly or isolated from one of the commercial formulations. The commercial pigments were quinacridone chestnut brown-PR206 (Kremer Pigmente) and quinacridone red magenta-PV19 (Kremer Pigmente). The molecules purchased directly in pure form correspond to Pigment Red 149: N, N'-bis(3,5 dimethylphenyl)-3,4,9,10-perylenetetracarboxylic diimide, which was obtained from TCI AMERICA, and Pigment Red 179: N, N'-dimethyl-3,4,9,10-perylenedicarboximide which was obtained from Sigma Aldrich (also known as perylene maroon). The acrylic formulations of this study correspond to: Quinacridone red-PV19 (#7310, Golden acrylics), perylene maroon-PR179 (#507, Winsor & Newton acrylics), perylene red-PR149 (#464, Winsor & Newton acrylics), and quinacridone burnt orange-PR206 (#549, Winsor & Newton acrylics). For solvents we used dichloromethane (Sigma Aldrich, HPLC, $\geq 99.8\%$), dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Aldrich, for inorganic trace analysis, $\geq 99.99995\%$), glycerin (Sigma Aldrich, $\geq 99.5\%$) and toluene (Sigma Aldrich, 99.9%). For the cases of



Scheme 1. Structures of the pigments considered in this study. The labels indicate the formulation which contains the respective chromophore. In commercial products, it is frequent that the acrylic is directly labeled from the common or commercial name of the pigment. This is the case of PR179 (Pigment Red 179) and PR149 (Pigment Red 149). For the case of the PR206 formulation, it contains two chromophores: quinacridone-quinone (left) and quinacridone (right). For PV19 the only pigment present is quinacridone.

PV19 and PR206 the pure forms of the pigments were obtained by isolation from the commercial samples. The molecules were purified by column chromatography using dichloromethane and methanol for the elution procedure. The identity of the molecules purified by chromatography (quinacridones), as well as the pure perylenes (Pigment Red 149 and Pigment Red 179), were verified by mass spectrometry (see Supporting Info.), and steady-state spectroscopy [49–52]. Scheme 1 can be used for reference to these pigments and the respective acrylic formulations through this text. Pure and commercial pigment solutions at concentrations of 2×10^{-6} M, and the respective dilutions were prepared daily.

2.2. Acrylic samples from surfaces

200 μm thick films were formed of each acrylic formulation. This was done following the ASTM D823-25 standard on a glass slide (“Blade” method) [53]. Each film was left to dry in the dark for one week. Sample extraction and handling were made with a needle. The samples ($\sim 0.4 \times 0.4$ mm) were placed in microtubes with 2 mL of dichloromethane for PR149 and PR179, or DMSO for PV19 and PR206 depending on the solubility of the pigment. Then, the solutions were sonicated for 15 min and kept for 24 h in the dark. In all cases the supernatant was taken directly from the extract.

Cement surfaces (white and gray) with a size of 80×20 mm were made from a water/cement mixture of 50 g of water and 125 g of cement. Rapid curing was carried out for these samples using a water bath at a temperature of 25 ± 3 °C for 3 h. Curing took place in the laboratory in a humid place to avoid sudden changes in temperature that would impair the curing of the cement for a few days. For the plaster surfaces, one part of water was mixed with three parts of dry plaster. Then, 80×20 mm plates were formed by applying the mixture onto cardboard surfaces, and dried for 48 h.

A fiber cement panel manufactured by the Cenpanel brand company model Procovers was used. Cenpanel is a registered trademark of Mexalit Industrias S.A. de C.V. and Grupo Eureka, a company that provided the painter David Alfaro Siqueiros with fiber cement panels for his production of mural works during the sixties and seventies. 30×15 cm cuts were made by moistening the panel surface with distilled water to avoid the formation of fiber cement particles.

The acrylic formulations were applied to each surface obtaining coatings of approximately 200 μm . Once dry, the extraction and manipulation of the sub-100 μm lateral size samples were performed with the help of a Nikon SMZ 1500 zoom stereomicroscope with final magnifications of 7.5–112 X. The samples were dissolved in 500 μL of the respective solvent for the time-resolved emission measurements. The size of the samples is shown in the Supporting Info. For the microscopic samples (below 100 μm lateral size) that use dichloromethane as solvent, specific transfers into other solvents were made in order to eliminate changes in concentration during the measurements from evaporation effects. This is further described in the results section.

2.3. Steady-state spectroscopy

Absorption and fluorescence spectra were measured in a Cary-50 (Varian) spectrophotometer and a Cary Eclipse (Varian) fluorimeter respectively. All spectra were recorded at room temperature (20 ± 1 °C) in a 1 cm pathlength quartz cell. The fluorescence yields (φ_f) of pigments in CH_2Cl_2 or DMSO were obtained using the comparative method of Williams et al. [54], where 9,10-diphenylanthracene in ethanol has been used as a standard solution (fluorescence yield: 0.95) [55,56]. Finally, molar extinction coefficients (ϵ) at the maximum peak of pigments were determined considering the Lambert-Beer law.

2.4. Time-correlated single photon measurements

The measurements were made on a setup similar to a confocal

microscope built in conjunction with a TCSPC system [57–59]. A detailed diagram of the setup is included in Fig. S3 in the Supporting Info. In order to maximize the light brought into the detectors, these setups do not use a pinhole in the focal plane of the tube lens. A 485 nm ps pulsed-laser with a repetition frequency of 10 MHz (LDHD-C-485, PicoQuant) was used to excite the pigment solutions which were placed between a pair of cover slides in order to minimize the required sample volume which easily can be as small as a microliter. The pigment's fluorescence was collected with a 1.4 NA objective lens (Nikon Plan Apo VC 60 \times /1.4 oil immersion DIC N2). The emission was filtered through a 510 nm long pass dichroic mirror (Chroma T510lpxrt-UF2). It should be noted that this dichroic is appropriate for the emission of all the pigments of this study as their emission wavelength falls within 25 nm of each other. Once the residual excitation photons were removed, the emission beam was directed and focused into an avalanche photodiode-APD (PD-050-CTE, Micro Photon Devices). The focusing was made with a 30 mm focal length lens in order to fit the entire focused spot on the active area of the detectors. The laser controller (PDL-800-D, PicoQuant) and the APDs were connected to a counting card TCSPC (PicoHarp 300) for synchronization. Finally, the Sympho-Time 64 (PicoQuant) data acquisition software allowed the histograms to be recorded. The analysis of the traces was made considering exponential decays convoluted with the instrument response function (IRF) using a Levenberg-Marquardt numerical iteration algorithm [39]. The IRF was obtained with quenched sodium fluorescein in a pH = 10 phosphate buffer saturated with sodium iodide. The IRF showed a full width at half maximum of 200 ps. [60].

2.5. Fluorescence anisotropy measurements

The fluorescence anisotropy experiments were carried out with the same optical arrangement. The 485 nm excitation beam was sent through a film polarizer placed before dichroic separator. The emission was split into its parallel and perpendicular components with a polarizing beam splitter cube (Thorlabs) and sent to identical APDs. Finally, the fluorescence anisotropy evolution for each pigment was obtained from equation (1), where $I_{\perp}(t)$ is the time dependent intensity of the perpendicular polarization component and $I_{\parallel}(t)$ is the intensity in the parallel direction [61].

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)} \quad (1)$$

2.6. Computational methods

The hydrodynamic contribution to the diffusional reorientation times of Pigment Red 149 and Pigment Red 179 were estimated using the respective molecular rotational diffusion coefficients. These calculations allowed for an approximation of the differences in rotational diffusion times of these two molecules which have similar emission lifetimes but different hydrodynamic volumes. These calculations give the dimensions of the three axial radii for the rotational relaxation coefficients (see below). We also calculated the transition moment directions and other geometric parameters for both molecules. The calculations were taken from structures obtained with the Gaussian 16 software package [62]. The ground state equilibrium geometries were optimized using the PBE0 functional and the 6–311++ G (d,p) basis set [63–66]. All calculations were performed with an implicit solvation model, PCM (Polarizable Continuum Model) in DMSO. The direction of the S_1-S_0 transition dipoles were obtained with the TD-DFT method with the same functional and basis set [63–66]. For this, the equilibrium geometries were optimized in the first singlet excited state. The molecular volumes and axis sizes were calculated considering a constant electron density contour at 0.0035 electrons/bohr³. Details of the calculations of the hydrodynamic contribution to the overall rotational relaxation time can be found in the Supporting Info., page 10. [67,68].

3. Results and discussion

The four acrylic formulations chosen for this study are among the most common components for red coloring in murals and artistic works and are present in several examples from notable modern painters (see the Supporting Info. for a brief perspective in section Preface: Examples of red pigment used by modern artists) [8,18,45–48,69]. Applications of these acrylics are shown in Fig. 1. As can be seen, the dry paints span a range of red tonalities, but clearly show pairwise similarities between them. This highlights the importance of detecting the specific pigment used in each case. For example, the color in PR149 is similar to the one produced by the PV19 acrylic, while the PR179 one resembles the PR206 formulation.

As a starting point for the emission studies, the molecular identity of the analyzed pigments was confirmed by direct-analysis in real time mass spectrometry (DART). Additionally, for the commercial pigments PR206 and PV19, we recorded ^1H NMR spectra in DMSO- d_6 solution as shown in the Supporting Info. This was done to determine the relative amounts of the components in the PR206 formulation (see below).

For all four acrylic paints, there is a single long-lived emissive species with distinct static emission signals at concentrations above 10^{-5} M. All these samples also produce reproducible TCSPC traces at concentrations up to four orders of magnitude smaller. We start by describing the spectroscopic features of the emissive chromophores and show that in the acrylic samples the respective component is present as a unique long-lived emissive species.

3.1. Steady-state spectroscopy

Fig. 2A to 2D show the static absorption, emission, and excitation spectra of the chromophores of this study. The insets include comparisons of the excitation and emission spectra of the pure chromophores with samples directly extracted from the respective acrylic films. The emission yields and other spectroscopic data are included in Table 1. The spectra of the perylene type chromophores, Pigment Red 149 (PR149) and Pigment Red 179 (PR179), are shown in Fig. 2A and B. These molecules are the only emissive species detected from the respective acrylic film extractions. As shown, the band position and progressions are nearly identical for the two molecules, differing only by a 4 nm shift. The emissions from dichloromethane solutions have maxima at 536 nm for the molecule with the dimethylphenylenic substitutions (PR149), and 532 nm in the dimethylperylimide compound (PR179). It should be mentioned that for the two perylenic systems, dichloromethane is the only solvent where significant concentrations can be achieved from extractions of the films.

Fig. 2C and D shows results for the PV19 and PR206 samples. For both these systems the only emissive component present in DMSO or dichloromethane extracts is the quinacridone pigment, whose spectrum is included in the main graph of Fig. 2C. The main graph of Fig. 2D contains the spectra from quinacridone isolated from the PR206 acrylic

formulation. From the characterization of the extract (see Figs. S10, S13 and S14 in the Supporting Info.), and also according to the manufacturer's formula, quinacridone is the only pigment in the PV19 case, while in the PR206 formulation, quinacridone is mixed with the quinonic form of the molecule (quinacridone-quinone) to adjust the color into a maroon tone [70]. For the PR206 acrylic samples, the quinonic molecule is highly insoluble and is not extracted from the films using dichloromethane, appearing only in the DMSO extractions as a minor component. This observation is consistent with a previous report with regards to the analysis of PR206 [71]. Furthermore, the quinacridone-quinone component does not show any appreciable fluorescence as shown in the inset of Fig. 2D which compares the purified quinacridone spectra with those of the PR206 extraction, showing a match between the excitation and emission signals of the extracts with quinacridone (this will be further supported even at concentrations at the 10^{-9} M level through TCSPC measurements).

Figs. S11 to S14 in the Supporting Info. show the absorption spectra obtained directly from dissolving a small piece of the film of the acrylic formulation in the respective solvents. The absorption spectra of some of these acrylic formulations can differ from that of the pure compound due to the presence of additional components which are dispersed into the solutions. In particular, for the PR206 commercial formulation, the absorption spectrum in Fig. S14 actually shows the characteristic band of the quinacridone-quinone compound centered at 430 nm [71] overlapped with the absorption spectrum of the quinacridone molecule.

3.2. Time-Correlated Single Photon measurements

The chromophores of this study have highly emissive first singlet excited states with decay times in the range of several nanoseconds. The TCSPC traces are typical of the respective chromophore and correspond to single exponential decays as we show in the following study which includes the concentration dependence of the traces. As we show, these concentrations can be several orders of magnitude smaller than those of the steady-state spectra.

Fig. 3A to 3D show the TCSPC traces from solutions of the pure pigments. The decays correspond to single exponentials of 3.50 ± 0.25 ns for Pigment Red 149 (PR149) and 3.90 ± 0.29 ns for Pigment Red 179 (PR179) in dichloromethane solutions. The quinacridone molecule also shows a single exponential decay with a much longer decay time of 17.70 ± 0.24 ns in DMSO. In these measurements, the uncertainties were determined from the repetition of at least three independently prepared samples and TCSPC alignments and measurements.

We also characterized the emission decays for a series of dilutions from the samples extracted from films of the four acrylic formulations. The decays at several dilution levels are included in Fig. 4A to 4D. As a technical note, the confocal type of setup used for these determinations with the use of a 1.4 NA objective, allows for three to four orders of magnitude better sensitivity in comparison with arrangements which use a perpendicular excitation-detection setup with an imaging lens for

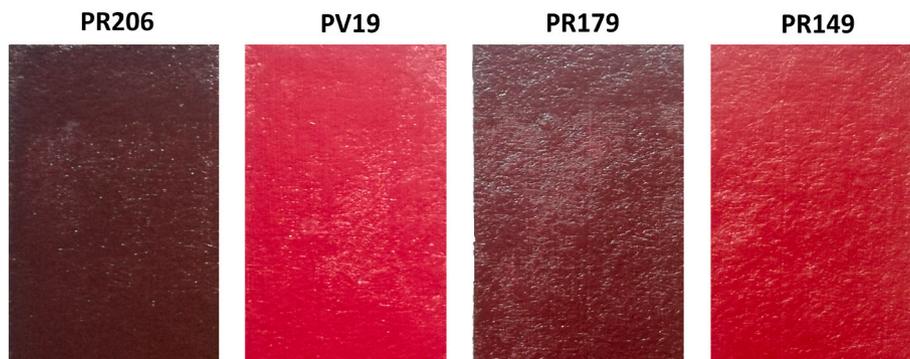


Fig. 1. Samples of acrylic paints used in this study. Acrylic formulations applied on a fiber cement panel are shown, each acrylic is indicated in the top label.

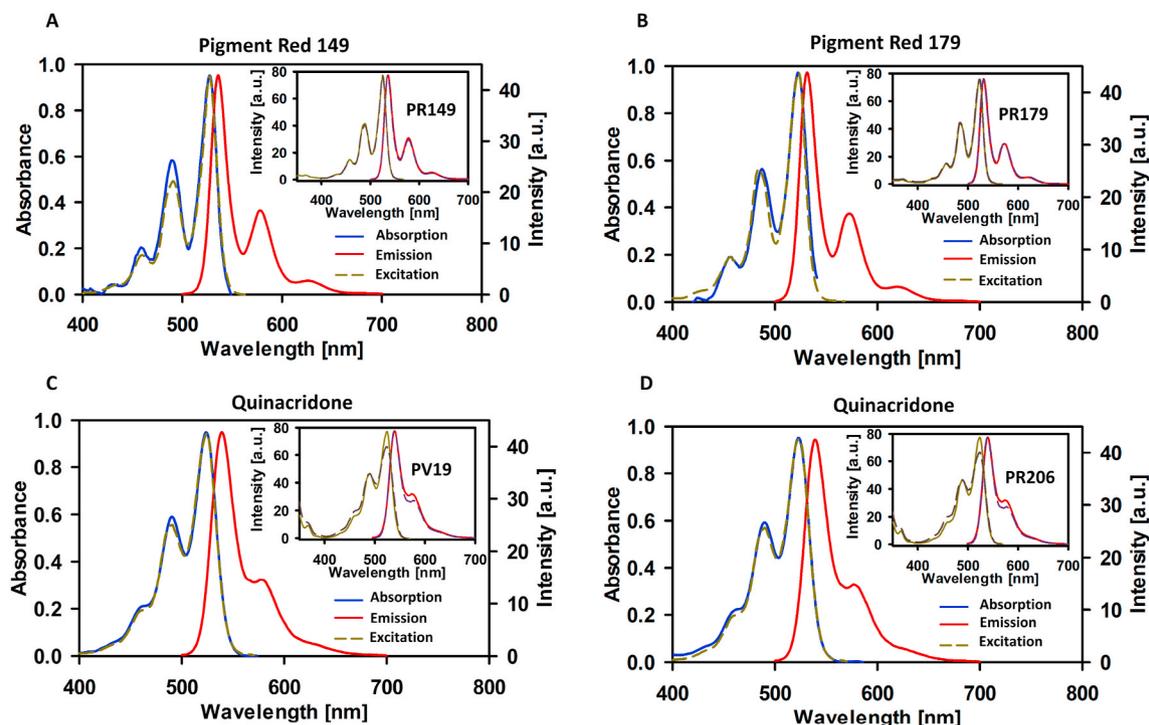


Fig. 2. Absorption (solid blue lines), emission (solid red lines) and excitation (dashed green lines) spectra of the pigments of this study. The insets show a comparison between the emission and excitation spectra of the pure pigments (solid lines) and the solutions that result from extractions from the films of the acrylic formulations (dark dashed lines). A) Pigment Red 149 and B) Pigment Red 179 in dichloromethane C) quinacridone and D) extracted quinacridone from the PR206 acrylic formulation in DMSO. The main graph in D) corresponds to the quinacridone molecule purified from the commercial formulation. The inset in D compares the emission and excitation spectra of the quinacridone molecule with that from the extracted sample from PR206. The excitation wavelength was 490 nm and the emission wavelength was 580 nm.

Table 1

Molar extinction coefficients ϵ ($\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) at the maximum peak, and fluorescence yields ϕ_f of the emissive pigments of this study.

	Absorption		Emission	
	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	$\epsilon(\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1})$	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	ϕ_f
Pigment Red 149 (PR149)	527	11048 (490)	536	0.96
Pigment Red 179 (PR179)	523	2891 (490)	532	0.96
Quinacridone (PV19 and PR206)	524	7036 (490)	539	0.99

light collection (data not shown). We also determined that for this series of dilutions, fits to the convoluted exponential traces using the full time-trace of the data and careful measurement of the instrument response function for each experiment, produces more reliable identification of the exponential decay in comparison with fitting methods that focus only on the long-time part of the traces ($t > 0.2$ times the decay constant). This is illustrated in Fig. S15 in the Supporting Info.

The concentration of the chromophores from the original extracts (0.4 mm by 0.4 mm of the acrylic film) using 2 mL of the respective solvent were determined from absorption measurements and are all in the range of 10^{-5} to 10^{-6} M. As can be seen, the solutions extracted from films of the acrylic formulations have an excellent correspondence with the decay times of the pure compounds and can easily be identified from the traces. The decay times from the convoluted single exponential fits correspond to the 3.50 ± 0.25 ns decay of PR149 in dilutions down to the order of 10^{-9} M, and down to the 10^{-8} M level for the 3.90 ± 0.29 ns decay of PR179. On the other hand, for PV19 samples, the 17.70 ± 0.24 ns emission decay was reliably observed down to the order of 10^{-9} M.

As mentioned, the PR206 formulation is composed of two chromophores, quinacridone and quinacridone-quinone [71–73]. As indicated in Fig. 2D, the emission and excitation spectra from PR206 extracts

shows that the quinacridone chromophore is the only emissive species upon 485 nm excitation. This is confirmed from the TCSPC measurements which clearly show that for extracts of films from PR206, the only decay time corresponds to the same 17.70 ± 0.24 ns decay observed in quinacridone and in the PV19 samples. From this observation it can be concluded that the quinacridone-quinone molecule (see Fig. S14), with an absorption band at 430 nm does not possess a long-lived emissive S_1 state. This is consistent with the presence of carbonyl groups in the quinone structure which promote efficient intersystem crossing into the triplet manifold of the molecule, therefore limiting the formation of the fluorescent state [74–76]. The single 17.70 ns decay indicates that even with the maroon color of the PR206 sample (which can be distinguished clearly from PV19 but easily confused with PR179), this commercial pigment can be readily identified. This decay is reliably detected down at least to 10^{-9} M, although at such low concentrations the traces show a biexponential behavior where the long lifetime remains within experimental error of 17.70 ns (quinacridone). The additional lifetime corresponds to a fast sub-200 ps components which arises from scattering from the DMSO solution. Tables S2 to S5 in the Supporting Info. include the results of the observed decays for concentrations below the mentioned ones, where the traces start to deviate from those of the pure substances, indicating a limit for the identification of the characteristic time constant.

Next, we turn to the characterization of dried samples of the acrylic formulations deposited on the surface of different substrates. In large-format paintings such as murals, the possibility might arise to have microscopic samples of the dried material obtained from the edges of the mural or from small flakes [77,78]. Alternatively, a minimal amount of material can be obtained through the use of micro-swabs, either dry or infused with small amounts of a solvent. These kinds of samples can be used to produce solutions in a volume of the order of a few microliters [35–37,42,43].

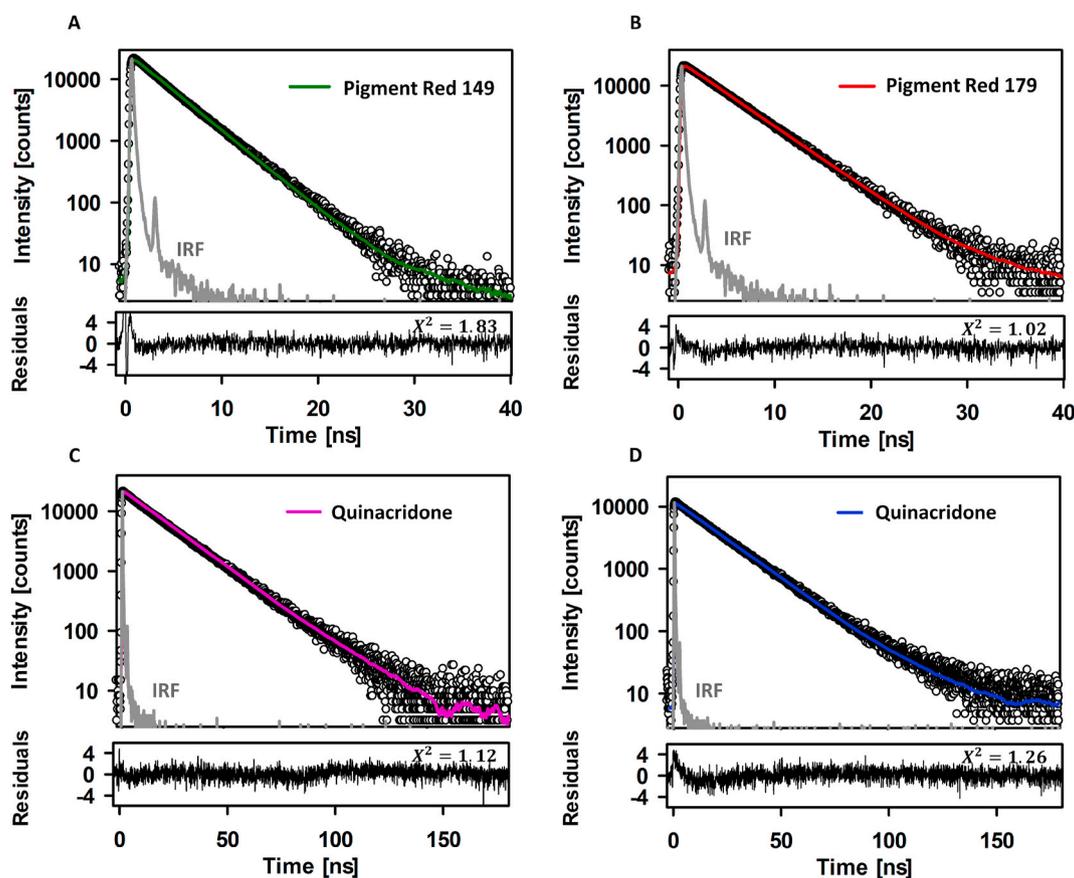


Fig. 3. TCSPC measurements of the pigments excited at 485 nm. A) Pigment Red 149 B) Pigment Red 179 C) quinacridone in PV19 and D) quinacridone in PR206. Convoluted fits are shown as colored lines, the instrumental response function (IRF) is shown in gray. Also, residuals and chi-squared values are shown at the bottom of TCSPC measurements.

We first carried out micro-swab sampling of the surface of the dry acrylic applications on fiber cement surfaces showing how it is indeed easy to identify the respective pigment from TCSPC measurements of a solution formed directly from this method. The procedure to obtain the samples is highlighted in Fig. 5 and in a video for which a link is included in the Supporting Info (see caption of Fig. S16). The respective decay traces of the four acrylics are included in Fig. S16. These traces show decay times well within the standard deviation of the pure pigment and the acrylic film extracts. The respective concentrations of these samples correspond approximately to 10^{-7} M from the observed photon count rate. The decay results from the swabbing technique are summarized in Table S6.

Second, we attempted to determine which is the minimal solid fragment size (flake) which still can be used to detect the respective chromophore (see Fig. S2 in the Supporting Info. for images of the flakes). Once more, the sensitivity of TCSPC is highlighted in the measurements of the microscopic flakes. Figs. 6A to D shows the decay traces observed from different dry sample sizes using the FC substrate. For the other substrates, the plots are included in the Supporting Info. For sample sizes of 40 μm lateral size (or likely smaller), the characteristic time constant of the excited state decay is distinguished unambiguously for the pigments and falls within the experimental uncertainty of the pure samples or the ones extracted from the films. These samples in all cases correspond to microscopic flakes which carry with them a certain amount of the substrate (plaster, etc.). The results of Fig. 6 support the idea that, for these dry micro-samples, the presence of substrate material does not impede the appropriate measurement of the lifetimes.

As a central issue for these measurements, it should be mentioned that, due to the small volumes, the use of dichloromethane as solvent does not give reproducible results for microscopic samples due to its

high volatility, which gradually changes the pigment concentration during the TCSPC measurements (1–5 min). This difficulty required a new scheme to disperse the pigment molecules for PR149 and PR179 which only can be initially dissolved in this solvent. A reliable scheme was to bring the initial extractions with dichloromethane into toluene. The toluene solution (after rapid evaporation of the dichloromethane component) produces reliable results for the TCSPC measurements since aggregation or precipitation does not take place to any extent in the time scale of the experiment. The toluene solutions show emission lifetimes that are different from those from dichloromethane, as expected, due to the change in the solvent environment (3.61 ± 0.11 ns for toluene vs 3.50 ± 0.25 ns in dichloromethane for PR149; and 4.10 ± 0.18 ns for toluene vs 3.90 ± 0.29 ns in dichloromethane for PR179).

3.3. Fluorescence anisotropy decays

As an additional method to confirm the presence of specific pigments through their TCSPC traces, we measured the decay of the emission anisotropy $r(t)$, since the rotational diffusion in a specific solvent or mixture is also characteristic of the fluorophore. This can be taken as an advantage as we show next: Typically, for low viscosity solvents at room temperature the decay of the emission anisotropy occurs in the picoseconds time scale. Such times can fall within the instrumental response of most TCSPC setups which could make this an unreliable way to detect a pigment in the solution. However, upon adjustment of the solvent viscosity, the decay times for the emission anisotropies can easily be brought into the nanoseconds time range.

We have highlighted this strategy to differentiate chromophores by comparisons of the anisotropy decays of the two perylenic pigments of this study (Pigment Red 149 (PR149) and Pigment Red 179 (PR179)).

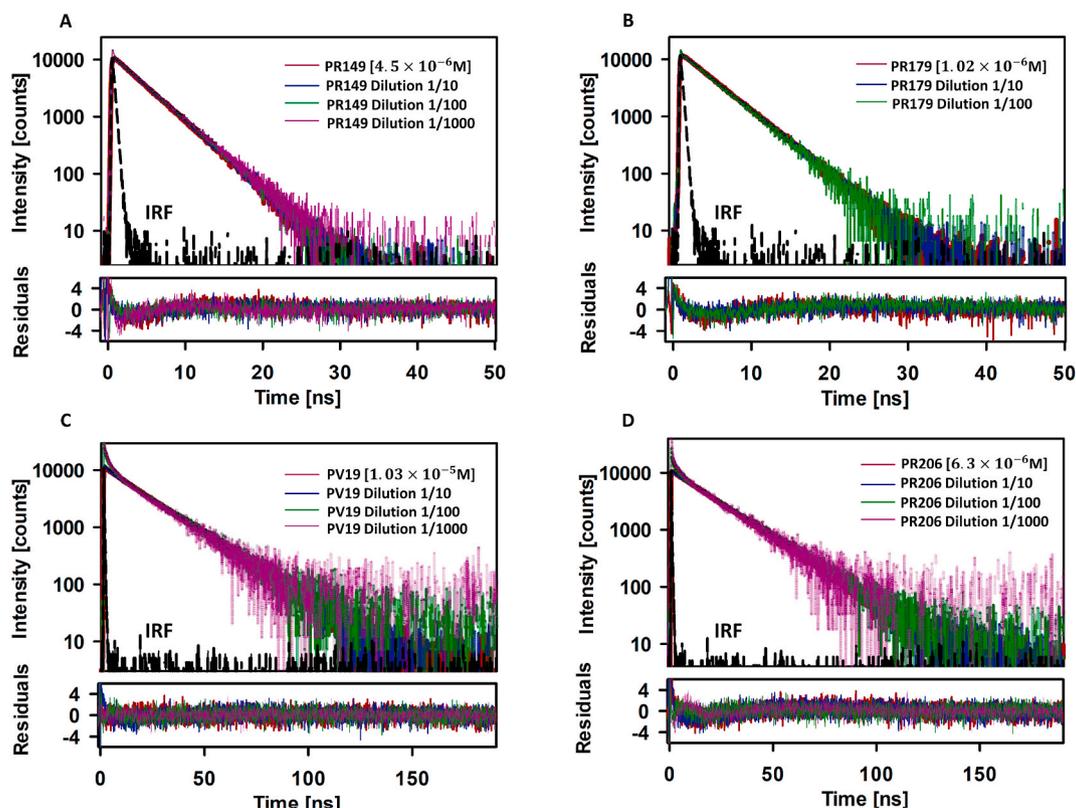


Fig. 4. TCSPC measurements at several dilution levels of extracts from films of the acrylic formulations. In all cases, the excitation wavelength was 485 nm. A) pigment PR149 and B) pigment PR179 in dichloromethane C) pigment PV19 and D) pigment PR206 in DMSO. The traces corresponding to the dilutions are shown as colored lines. The instrumental response function (IRF) is shown in black, and residuals are shown at the bottom of TCSPC measurements. The original concentration of each pigment was determined from the respective absorption coefficient.

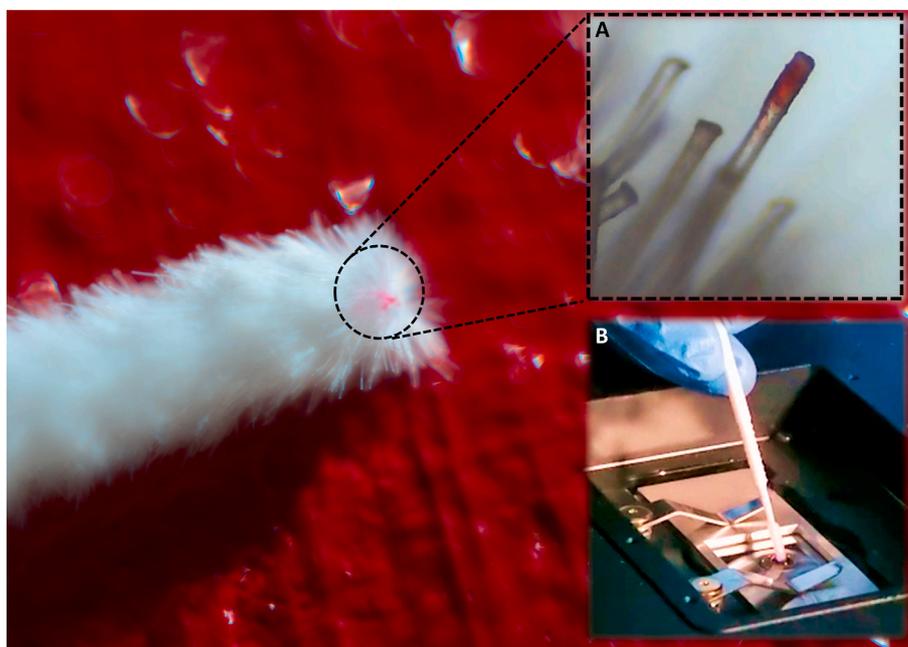


Fig. 5. Micro-swab sampling of dried surfaces of the acrylics deposited on fiber cement. The insets show A) micro-swab, image taken under a microscope with a 10 \times objective B) sample deposited in the surface of the observation slide where, previously, a 2 μ L drop of the appropriate solvent was placed.

These two molecules have similar emission lifetimes making it difficult to differentiate them. The two molecules, however, differ significantly in their hydrodynamic properties despite having the same chromophoric core. On one hand, Pigment Red 149 has two dimethylphenyl groups at

the long axis ends of the molecule, while Pigment Red 179 only has methyl groups. Such structural differences suggest that the two systems will have different hydrodynamic contributions to their rotational diffusion coefficients. A series of solutions of increasing viscosity were

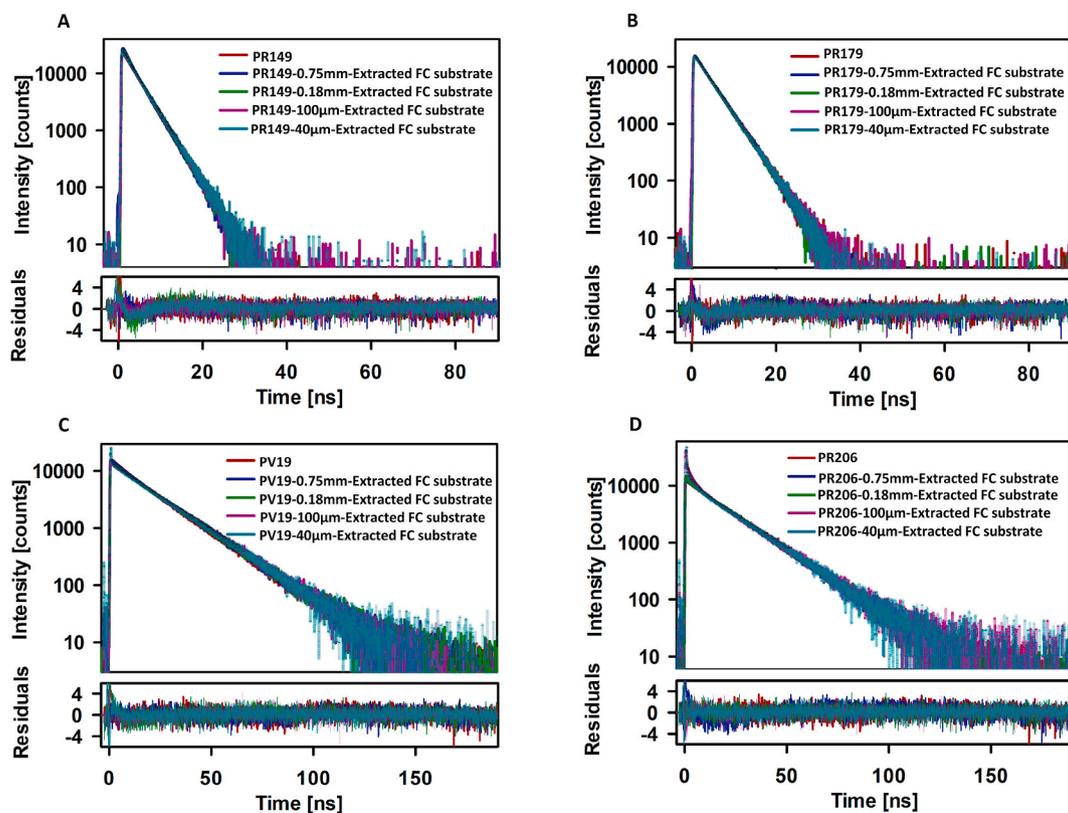


Fig. 6. TCSPC measurements for different sample sizes of dry acrylic paints applied on a fiber cement (FC) substrate. The solutions were excited with a wavelength of 485 nm. A) extracted pigment PR149 and B) extracted pigment PR179 in dichloromethane and then diluted in toluene C) extracted pigment PV19 and D) extracted pigment PR206 in DMSO. Residuals are shown at the bottom of the respective TCSPC measurements.

prepared as follows. Pigments were extracted with dichloromethane, then were transferred into DMSO as described previously for toluene. After complete evaporation of dichloromethane, from the stock DMSO solution, glycerin was added thus increasing its molar fraction in the mixture, from 0 to 0.79 in steps of 0.10 units. The experimental anisotropy traces are shown in Fig. 7. As can be seen, the $r(t)$ decay traces and time constants evolve from a sub-nanosecond range (0.19 mol fraction of glycerin in DMSO) to more than 7 ns for the mixtures with the higher molar fraction of glycerin. The characteristic rotational relaxation times are included in Table 2 [61].

Importantly, not only the $r(t)$ exponential decay times increase upon elevating the glycerin mole fractions, but also the difference between the $r(t)$ decays of PR149 and PR179 varies gradually. This variation is also included in Table 2 as a percent difference in the $r(t)$ decay times. As can be seen, for a glycerin mole fraction of 0.39, the difference is maximal: 3.54 ± 0.14 ns for PR149 vs 1.90 ± 0.21 ns for PR179. This example clearly indicates that anisotropy measurements (with a similar detection level as the TCSPC method) can be used to unambiguously differentiate between two molecules with the same chromophoric core (and therefore similar fluorescence decay times), but a different substitution pattern, which in turn result in differences in their rotational diffusion.

In order to further support the notion that the differences between the anisotropy decays in the PR149 vs PR179 samples are due to differences in their hydrodynamic friction, we have estimated their purely hydrodynamic rotational relaxation times. The molecules' geometries were modelled as ellipsoids, and their diffusion coefficients were calculated from DFT studies considering electron density isosurfaces using standard procedures [71]. The direction of the transition dipole moment vectors of both molecules was obtained from TD-DFT calculations.

We made estimations of the hydrodynamic contributions to the rotational relaxation times following the method by Dutt et al. [68]; and

the solvent mixture viscosities were taken from the literature [67,79, 80]. Details of these calculations can be found in the Supporting Info., on page 10. As we show in the solid lines of the inset of Fig. 8, the two molecules differ significantly in their hydrodynamic contribution to friction. This is of course also reflected in the observed rotational relaxation times of the main graph of Fig. 8, although it is well known that solvents that contain glycerin have other sources of friction, including specific and electrostatic interactions, and therefore, the observed times are up to an order of magnitude smaller than the prediction of the simple hydrodynamic model (see Supporting Info. page 11) [61,81,82]. It should be noted that the Pigment Red 149 molecule has larger substituents at the end points of its long axis. This implies a larger hydrodynamic friction in comparison with the methyl groups in Pigment Red 179. In addition, Plotting the experimental rotational relaxation times as a function of the mixture viscosity according to:

$$\tau_{rot} = \frac{V_{eff}}{k_B T} \eta + \tau_{rot}^0 \quad (2)$$

gives a value of $8.0 \times 10^3 \text{ \AA}^3$ for Pigment Red 149 and $3.8 \times 10^3 \text{ \AA}^3$ for Pigment Red 179, highlighting the fact that these two molecules have different hydrodynamic volumes which result in clear differences in their observed rotational diffusion properties. Importantly, the differences in the molecular dimensions are due mainly to the long axis of the molecule which is parallel to the emission transition dipole moment. This feature in turn results on a large sensitivity of the rotational decays on the size of the long axis of the molecules [79]. Clearly, such structural variation induces significant differences in the experimental $r(t)$ decay times which can be as large as 80% depending on the exact DMSO/glycerin mixture. In summary, the $r(t)$ measurements clearly serve as an additional method to differentiate the two pigments which are otherwise very similar in their fluorescence lifetimes.

The anisotropy decay times of the PV19 and PR206 samples were

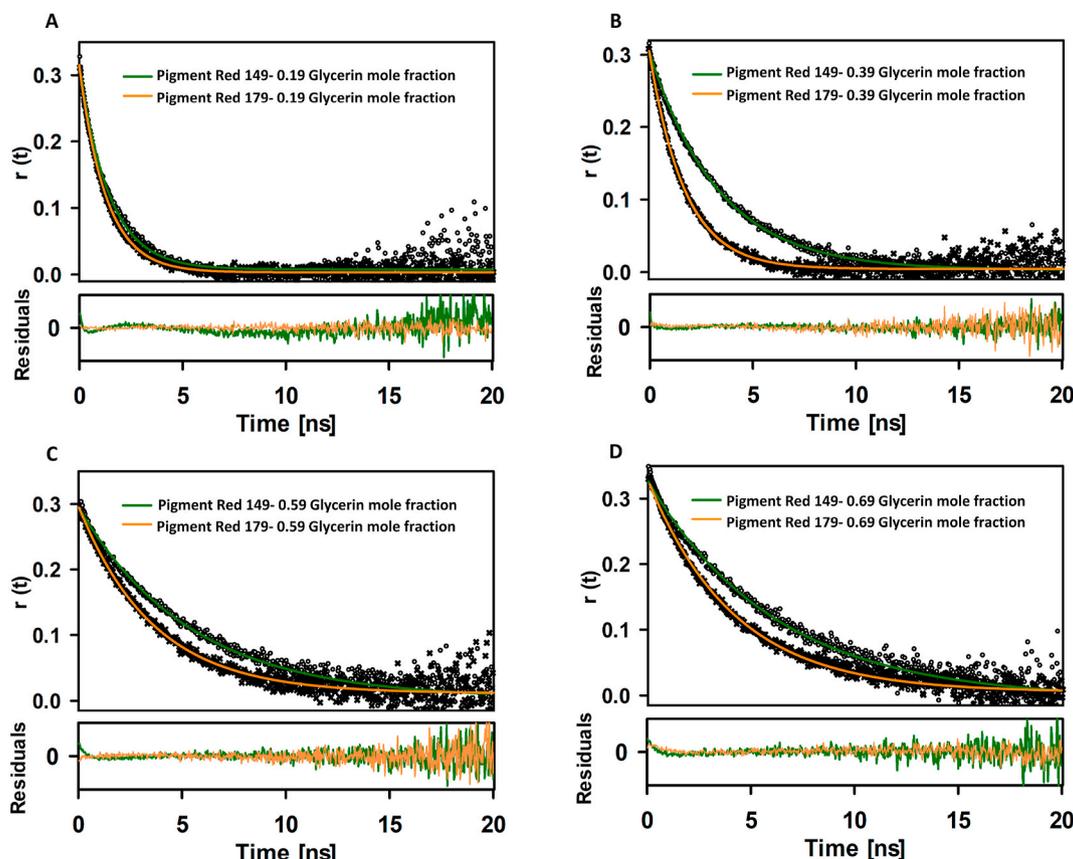


Fig. 7. Anisotropy ($r(t)$) traces for extracts of PR149 and PR179 in glycerin-DMSO mixtures. A) 0.19 glycerin mole fraction B) 0.39 glycerin mole fraction. C) 0.59 glycerin mole fraction and D) 0.69 glycerin mole fraction. The excitation wavelength was 485 nm and residuals are shown at the bottom of the respective anisotropy ($r(t)$) traces.

Table 2

Rotational relaxation times (τ_{rot}) of perylenes PR149 and PR179 in DMSO-glycerin mixtures obtained from single exponential fits to the fluorescence anisotropy decays. The percent difference column indicates the difference between the rotational relaxation times of the two molecules.

Glycerin mole fraction	PR149		PR179		Percent difference (%)
	$r(t=0)$	$\tau_{rot}(ns)$	$r(t=0)$	$\tau_{rot}(ns)$	
0.19	0.3	1.57 ± 0.11	0.3	1.40 ± 0.14	11.9
0.29	0.3	2.15 ± 0.23	0.3	1.44 ± 0.12	48.7
0.39	0.3	3.54 ± 0.14	0.3	1.90 ± 0.21	86.8
0.49	0.3	4.14 ± 0.19	0.3	2.63 ± 0.17	57.3
0.59	0.3	5.66 ± 0.27	0.3	3.63 ± 0.23	56.2
0.69	0.3	7.58 ± 0.21	0.3	4.52 ± 0.25	67.5
0.79	0.3	9.00 ± 0.18	0.3	5.68 ± 0.20	58.6

also determined. In these cases, the solvent mixture was formed directly with DMSO and glycerin. The respective time constants are included in Table 3. Fig. S20 shows the $r(t)$ trace characteristic of pure quinacridone with a time of 12.35 ± 0.70 ns. As shown in Table 3, the $r(t)$ decay values are within uncertainty for the PV19 and PR206 samples. This is again consistent with the fact that quinacridone is the only emissive pigment in these formulations.

Finally, as a technical note for the anisotropy experiments, we

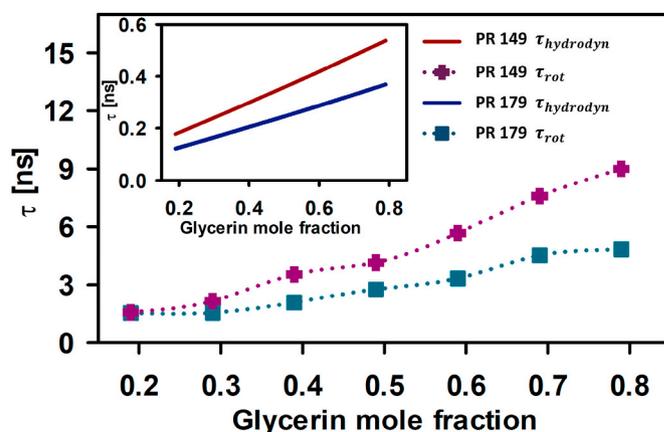


Fig. 8. Dotted lines with symbols: Experimentally determined rotational relaxation times (τ_{rot}) as a function of the glycerin mole fraction in DMSO-glycerin mixtures for Pigment Red 149 (PR149) and Pigment Red 179 (PR179). Inset: estimated hydrodynamic contribution to the rotational relaxation times ($\tau_{hydrodyn}$) for the viscosity of the mixture. The respective calculations are included in the Supporting Info.

showed that the anisotropy decay times do not vary as a function of the objective's NA. Specifically, it is well known that different experimental $r(t=0)$ values will be obtained for objectives with different NA's (with smaller $r(t=0)$ values for the larger NA lenses) [83,84]. However, as we show in Figs. S21 and S22 for PV19 samples, the traces taken with three different lenses (with NA's ranging from 0.5 to 1.4), show the same $r(t)$ decay times.

Table 3

Rotational relaxation times τ_{rot} from single exponential fits to fluorescence anisotropy traces of quinacridone in PV19 and PR206.

Glycerin mole fraction	PV19		PR206	
	$r(t=0)$	$\tau_{rot}(ns)$	$r(t=0)$	$\tau_{rot}(ns)$
0.79	0.2	12.21 ± 0.75	0.2	12.59 ± 0.73

4. Conclusions

We explored the emissive properties of red chromophores present in four representative acrylics. The objective of this study was to define a set of strategies to differentiate red pigments through the time resolution of their fluorescence signals. TCSPC is a high sensitivity technique which can be applied to the four acrylics. These red pigments can be identified from their decay times in concentrations as low as 10^{-9} M. This method also allows for the detection of the pigments in microscopic samples of 40 μ m lateral size and those obtained through micro-swab sampling in representative substrates of murals. The use of confocal-type setups allows for the use of minimal volumes so that the chromophore concentration is relatively high.

These studies indicate that the problem of high volatility of the solvents that facilitate the pigment extraction but hinder the TCSPC measurements can be solved by transferring the sample into a different solvent system where the solution is stable in the time scale of the experiments. Also, using the same set up but allowing for parallel and perpendicular polarization detections, together with highly viscous solvent mixtures, the chromophores can be identified from their anisotropy decay times. The anisotropy measurements are highly dependent on the molecular structure and therefore can differentiate molecules that have similar fluorescence decays but different hydrodynamic behavior for reorientation. With this strategy, the time constants of the anisotropy decays can be brought to have differences of more than 50% for chromophores which have fluorescence lifetimes times within 5% of each other. The procedures highlighted in this study are the initial steps to implement identification procedures for emissive chromophores commonly used in modern paintings. The main objective of this contribution was to study the effects of sample concentration, sample nature and dimensions, and acquisition method, to serve as the basis of a comprehensive study with a much broader set of pigments and mixtures. These strategies also can promote the integration of research groups with experience in time-resolved emission measurements with experts in cultural heritage and maintenance of murals and paintings for conservation efforts.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

Author statement

Cadena-Caicedo Andrea, Conceptualization, Methodology, Data Curation, Writing, Reviewing and Editing. González-Gutiérrez Mario, Methodology, implementation of Time-resolved Fluorescence. Guzmán-Méndez Óscar, Methodology, purification and identification of organic compounds. M. Reza Mariana, Methodology, implementation of anisotropy measurements. Durán-Hernández Jesús. Prediction of hydrodynamic properties of two compounds. Jorge Peon, Conceptualization, Writing- Reviewing and Editing, Funding.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgment

Authors acknowledge CONACyT-Mexico grant Fronteras de la Ciencia 2019–51496, CONACyT-Mexico 285722, and PAPIIT/DGAPA/UNAM IG200621 for financial support, DGTIC-UNAM project LANCAD-UNAM-DGTIC-210 for computer time. The authors are thankful for the NMR measurements at LURMN and DART spectra at LEM Mass Spectrometry Laboratory, and Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural at UNAM's Instituto de Química.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2022.118913>.

References

- [1] L. Rainer, L. Manning, The Siqueiros Legacy, Challenges of Conserving the Artist's Monumental Murals: Proceedings of a Symposium Organized by the Getty Conservation Institute, Getty Conservation Institute, 2013.
- [2] M. Rooney, T. Meldrum, Effect of pigment concentration on NMR relaxometry in acrylic paints, *Magn. Reson. Chem.* 58 (2020) 880–888.
- [3] M. Aceto, Pigments — the palette of organic colourants in wall paintings, *Archaeol. Anthropol. Sci.* 3 (2021) 1–23.
- [4] J. Gutiérrez, N. Roukes, *Painting with Acrylics*, vol. 9, Watson-Guipill Publications, 1966.
- [5] R.J.H. Clark, Pigment identification by spectroscopic means: an arts/science interface, *Compt. Rendus Chem.* 5 (2002) 7–20.
- [6] A. Romani, C. Clementi, C. Miliani, G. Favaro, Fluorescence spectroscopy: a powerful technique for the noninvasive characterization of artwork, *Acc. Chem. Res.* 43 (2010) 837–846.
- [7] A.V. Whitney, F. Casadio, R.P. Van Duyne, Identification and characterization of artists' red dyes and their mixtures by surface-enhanced Raman spectroscopy, *Appl. Spectrosc.* 61 (2007) 994–1000.
- [8] A.D. Squires, M. Kelly, R.A. Lewis, Terahertz analysis of quinacridone pigments, *J. Infrared, Millim. Terahertz Waves* 38 (2017) 314–324.
- [9] A. Nevin, et al., Time-resolved photoluminescence spectroscopy and imaging: new approaches to the analysis of cultural heritage and its degradation, *Sensors* 14 (2014) 6338–6355.
- [10] M. Ghirardello, et al., Photoluminescence imaging of modern paintings: there is plenty of information at the microsecond timescale, *Microchem. J.* 154 (2020) 104618.
- [11] A. Dal Fovo, et al., Fluorescence lifetime phasor analysis and Raman spectroscopy of pigmented organic binders and coatings used in artworks, *Appl. Sci.* 12 (2022).
- [12] M. Longoni, A. Freschi, N. Cicala, S. Bruni, Non-invasive identification of synthetic organic pigments in contemporary art paints by visible-excited spectrofluorimetry and visible reflectance spectroscopy, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 229 (2020).
- [13] J. Wouters, High performance liquid chromatography of anthraquinones: analysis of plant and insect extracts and dyed textiles, *Stud. Conserv.* 30 (1985) 119–128.
- [14] J. Sanyova, Mild extraction of dyes by hydrofluoric acid in routine analysis of historical paint micro-samples, *Microchim. Acta* 162 (2008) 361–370.
- [15] X. Zhang, R.A. Laursen, Development of mild extraction methods for the analysis of natural dyes in textiles of historical interest using LC-diode array detector-MS, *Anal. Chem.* 77 (2005) 2022–2025.
- [16] M.P. Colombini, A. Andreotti, G. Lanterna, M. Rizzi, A novel approach for high selective micro-sampling of organic painting materials by Er:YAG laser ablation, *J. Cult. Herit.* 4 (2003) 355–361.
- [17] P. Gottschaller, et al., *The Evolution of Lucio Fontana's Painting Materials*, vol. 57, 2012, pp. 76–91.
- [18] S.Q. Lomax, Phthalocyanine and quinacridone pigments: their history, properties and use, *Stud. Conserv.* 50 (2005) 19–29.
- [19] I.M. Cortea, et al., Characterization of Spray Paints Used in Street Art Graffiti by a Non-destructive Multi-Analytical Approach Employed in the Work of Representative Artists Such as, 2020, pp. 1–12.
- [20] L. Pronti, A.C. Felici, M. Me, C. Vieillescazes, M. Piacentini, Spectral Behavior of White Pigment Mixtures Using Reflectance, Ultraviolet — Fluorescence Spectroscopy, and Multispectral Imaging, 2017, pp. 1–10, 0.
- [21] B. Guineau, Non-destructive analysis of organic pigments and dyes using Raman microprobe, microfluorometer or absorption microspectrophotometer, *Stud. Conserv.* 34 (1989) 38–44.
- [22] F.W. Billmeyer, R. Kumar, M. Saltzman, Identification of Organic Colorants in Art Objects by Solution Spectrophotometry: Pigments vol. 58, 1981, pp. 307–313.
- [23] E.S.B. Ferreira, A.N. Hulme, H. McNab, A. Quye, The natural constituents of historical textile dyes, *Chem. Soc. Rev.* 33 (2004) 329–336.
- [24] Z. Bosakova, K. Stulik, P. Novotna, K. Stulik, High-performance liquid chromatographic determination of some anthraquinone and naphthoquinone dyes occurring in historical textiles, *J. Chromatogr. A* 863 (1999) 235–241.
- [25] J.C. Shearer, D.C. Peters, The art of FTIR microsampling, *Fourier Comput. Infrared Spectrosc.* (1985) 285, 0553.

- [26] S.M. Halpine, An improved dye and lake pigment analysis method for high-performance liquid chromatography and diode-array detector, *Stud. Conserv.* 41 (1996) 76–94.
- [27] L. Razaely, S. Héron, W. Nowik, A. Tchaplá, Optimisation of ESI-MS detection for the HPLC of anthraquinone dyes, *Dyes Pigments* 77 (2008) 191–203.
- [28] J. Zucker, National gallery technical bulletin, *Color Res. Appl.* 26 (2005).
- [29] A. Romani, et al., Portable equipment for luminescence lifetime measurements on surfaces, *Appl. Spectrosc.* 62 (2008) 1395–1399.
- [30] I. Degano, E. Ribechini, F. Modugno, M.P. Colombini, Analytical methods for the characterization of organic dyes in artworks and in historical textiles, *Appl. Spectrosc. Rev.* 44 (2009) 363–410.
- [31] D. Anglos, et al., Laser-induced fluorescence in artwork diagnostics: an application in pigment analysis, *Appl. Spectrosc.* 50 (1996) 1331–1334.
- [32] G. Poldi, S. Caglio, Phthalocyanine identification in paintings by reflectance spectroscopy, *Lab. In Situ Stud.* 114 (2013) 929–935, 1.
- [33] C. Clementi, et al., Vibrational and electronic properties of painting lakes, *Appl. Phys. Mater. Sci. Process* 92 (2008) 25–33.
- [34] G. Verri, C. Clementi, D. Comelli, S. Cather, F. Piqué, Correction of ultraviolet-induced fluorescence spectra for the examination of polychromy, *Appl. Spectrosc.* 62 (2008) 1295–1302.
- [35] K. Kahrim, et al., The application of in situ mid-FTIR fibre-optic reflectance spectroscopy and GC-MS analysis to monitor and evaluate painting cleaning, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 74 (2009) 1182–1188.
- [36] A. Sarmiento, et al., Classification and identification of organic binding media in artworks by means of Fourier transform infrared spectroscopy and principal component analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 3601–3611.
- [37] G. Piñar, K. Sterflinger, Natural sciences at the service of art and cultural heritage: an interdisciplinary area in development and important challenges, *Microb. Biotechnol.* 14 (2021) 806–809.
- [38] B. Bao, et al., Recent Advances in Microfluidics-Based Chromatography — A Mini Review, vols. 1–19, 2021.
- [39] D. O'Connor, D. Phillips, Time-correlated Single Photon Counting, Academic Press, 2012.
- [40] L.M. Hirvonen, K. Suhling, Fast timing techniques in FLIM applications, *Front. Physiol.* 8 (2020) 1–20.
- [41] W. Becker, Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Techniques, Springer Berlin Heidelberg, 2005.
- [42] S. Kamanna, J. Henry, N. Voelcker, A. Linacre, K. Paul Kirkbride, A complementary forensic 'proteo-genomic' approach for the direct identification of biological fluid traces under fingernails, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 6165–6175.
- [43] A. Moussa, M. Badawy, N. Saber, Chromatic alteration of Egyptian blue and Egyptian green pigments in pharaonic late period tempera murals, *Sci. Cult.* 7 (2021) 1–15.
- [44] P.K. Zarzycki, M.M. Ślaogonekczka, M.B. Zarzycka, E. Włodarczyk, M.J. Baran, Application of micro-thin-layer chromatography as a simple fractionation tool for fast screening of raw extracts derived from complex biological, pharmaceutical and environmental samples, *Anal. Chim. Acta* 688 (2011) 168–174.
- [45] C.A. Menke, R. Rivenc, T. Learner, The use of direct temperature-resolved mass spectrometry (DTMS) in the detection of organic pigments found in acrylic paints used by Sam Francis, *Int. J. Mass Spectrom.* 284 (2009) 2–11.
- [46] C. Defeyt, J. Mazurek, A. Zebala, D. Burchett-Lere, Insight into Sam Francis' painting techniques through the analytical study of twenty-eight artworks made between 1946 and 1992, *Appl. Phys. Mater. Sci. Process* 122 (2016) 1–6.
- [47] Y. Jin, An Examination of the Place of Fresco in Contemporary Art Practice, *PhD thesis*, Univ. Arts, London, 2004.
- [48] N.C. Scherrer, Z. Stefan, D. Francoise, F. Annette, K. Renate, Synthetic organic pigments of the 20th and 21st century relevant to artist's paints: Raman spectra reference collection, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 73 (2009) 505–524.
- [49] J. Mizuguchi, K. Tojo, Electronic structure of perylene pigments as viewed from the crystal structure and excitonic interactions, *J. Phys. Chem. B* 106 (2002) 767–772.
- [50] T. Sakamoto, C. Pac, A 'green' route to perylene dyes: direct coupling reactions of 1,8-naphthalimide and related compounds under mild conditions using a 'new' base complex reagent, t-BuOK/DBN, *J. Org. Chem.* 66 (2001) 94–98.
- [51] E. Del Puerto, C. Domingo, J.V. García Ramos, S. Sanchez-Cortes, Adsorption study and detection of the high performance organic pigments quinacridone and 2,9-dimethylquinacridone on Ag nanoparticles by surface-enhanced optical spectroscopy, *Langmuir* 30 (2014) 753–761.
- [52] T. Tsutsui, S. Kusaba, M. Yamashina, M. Akita, M. Yoshizawa, Open versus closed polyaromatic nanocavity: enhanced host abilities toward large dyes and pigments, *Chem. Eur. J.* 25 (2019) 4320–4324.
- [53] ASTM, Standard practices for producing films of uniform thickness of paint, *Coating Relat. Prod. Test Panels* 1. i (2018) 9.
- [54] A.T. Rhys Williams, S.A. Winfield, J.N. Miller, Relative fluorescence quantum yields using a Computer-controlled luminescence spectrometer, *Analyst* 108 (1983) 1067–1071.
- [55] J.V. Morris, M.A. Mahaney, J.R. Huber, Fluorescence quantum yield determinations. 9,10-Diphenylanthracene as a reference standard in different solvents, *J. Phys. Chem.* 80 (1976) 969–974.
- [56] M. Taniguchi, H. Du, J.S. Lindsey, PhotochemCAD 3: diverse modules for photophysical calculations with multiple spectral databases, *Photochem. Photobiol.* 94 (2018) 277–289.
- [57] J. Rodríguez-Romero, et al., Fluorophore release from a polymethinic photoremovable protecting group through a nonlinear optical process, *ChemPhotoChem* 1 (2017) 397–407.
- [58] L. Gutiérrez-Arzaluz, R. López-Arteaga, F. Cortés-Guzmán, J. Peon, Nitrated fluorophore formation upon two-photon excitation of an azide with extended conjugation, *J. Phys. Chem. B* 121 (2017) 9910–9919.
- [59] R. López-Arteaga, J. Peon, Ultrafast photoluminescence kinetics from hot excitonic states in CdSe nanocrystals, *J. Phys. Chem. C* 122 (2018) 26698–26706.
- [60] M. Liu, et al., Instrument response standard in time-resolved fluorescence spectroscopy at visible wavelength: quenched fluorescein sodium, *Appl. Spectrosc.* 68 (2014) 577–583.
- [61] J.R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, third ed., Springer, New York, USA, 2006. Springer: New York.
- [62] M.J. Frisch, et al., G16_a03. Gaussian 16, Revision A.03, Gaussian, Inc., Wallin, 2016.
- [63] C.A. Guido, S. Knecht, J. Kongsted, B. Mennucci, Benchmarking time-dependent density functional theory for excited state geometries of organic molecules in gas-phase and in solution, *J. Chem. Theor. Comput.* 9 (2013) 2209–2220.
- [64] D. Jacquemin, V. Wathelet, E.A. Perpète, C. Adamo, Extensive TD-DFT benchmark: singlet-excited states of organic molecules, *J. Chem. Theor. Comput.* 5 (2009) 2420–2435.
- [65] M. Oltean, et al., Absorption spectra of PTCDI: a combined UV-Vis and TD-DFT study, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 97 (2012) 703–710.
- [66] M. Fortino, et al., On the simulation of vibrationally resolved electronic spectra of medium-size molecules: the case of styryl substituted BODIPYs, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 21 (2019) 3512–3526.
- [67] M. Esquivelzeta-Rabell, J. Peon, G. Cuevas, Rotational diffusion of dihydroxy coumarins: effect of OH groups and their relative position on solute-solvent interactions, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 8599–8606.
- [68] G.B. Dutt, T.K. Ghanty, Is molecular rotation really influenced by subtle changes in molecular shape? *J. Chem. Phys.* 121 (2004) 3625–3631.
- [69] M.B. Kasiri, N.A. Babaylou, H. Zandkarimi, Photo-oxidative stability of a series of red acrylic paints, *Prog. Color. Color. Coating* 7 (2014) 177–185.
- [70] Kremer Pigmente GmbH & Co, KG, Quinacridone Chestnut Brown, PR 206, 2016. SDS No. 23480. accessed June 29, 2021 Aichstetten, Germany.
- [71] E. Del Puerto, S. Sánchez-Cortés, J.V. García-Ramos, C. Domingo, Solution SERS of an insoluble synthetic organic pigment-quinacridone quinone-employing calixarenes as dispersive cavitands, *Chem. Commun.* 47 (2011) 1854–1856.
- [72] C. Binant, A. Lautie, Identification of quinacridone pigment mixtures using resonance Raman microspectrometry, *Appl. Spectrosc.* 43 (1989) 851–855.
- [73] S.Q. Lomax, The application of x-ray powder diffraction for the analysis of synthetic organic pigments. Part 1: dry pigments, *J. Coating Technol. Res.* 7 (2010) 331–346.
- [74] E.F. Plaza-Medina, W. Rodríguez-Córdoba, Peon, J. Role of upper triplet states on the photophysics of nitrated polyaromatic compounds: 51 lifetimes of singly nitrated pyrenes, *J. Phys. Chem.* 115 (2011) 9782–9789.
- [75] M.A. El-Sayed, Spin-orbit coupling and the radiationless processes in nitrogen heterocycles, *J. Chem. Phys.* 38 (1963) 2834–2838.
- [76] S.K. Lower, M.A. El-Sayed, The triplet state and molecular electronic processes in organic molecules, *Chem. Rev.* 66 (1966) 199–241.
- [77] R. White, The application of gas-chromatography to the identification of waxes, *Stud. Conserv.* 23 (1978) 57–68.
- [78] A. Mejía-González, et al., NMR and other molecular and elemental spectroscopies for the characterization of samples from an outdoor Mural painting by Siqueiros, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 274 (2022) 121073.
- [79] G.B. Dutt, S. Doraiswamy, Picosecond reorientational dynamics of polar dye probes in binary aqueous mixtures, *J. Chem. Phys.* 96 (1992) 2475–2491.
- [80] R.S. Hartman, W.M. Konitsky, D.H. Waldeck, Y.J. Chang, E.W. Castner, Probing solute – solvent electrostatic interactions: rotational diffusion studies of 9,10-disubstituted anthracenes, *J. Chem. Phys.* 106 (1997) 7920–7930.
- [81] C.R. Mateo, et al., Rotational dynamics of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene and derivatives from fluorescence depolarization, *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 3486–3491.
- [82] E.F. Gudgin Templeton, E.L. Quitevis, G.A. Kenney-Wallace, Picosecond reorientational dynamics of resorufin: correlations of dynamics and liquid structure, *J. Phys. Chem.* 89 (1985) 3238–3243.
- [83] F. Ströhl, H.H.W. Wong, C.E. Holt, C.F. Kaminski, Total internal reflection fluorescence anisotropy imaging microscopy: setup, calibration, and data processing for protein polymerization measurements in living cells, *Methods Appl. Fluoresc.* 6 (2018).
- [84] D. Axelrod, Carbocyanine dye orientation in red cell membrane studied, *Biophys. J.* 26 (1979) 557–573.