

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA



**“DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO CUÁNTICO DE UN
FLUORÓFORO EN PRESENCIA DE NANOPARTICULAS
METÁLICAS, USANDO ESPECTROSCOPIA DE LENTE
TÉRMICA”**

Trabajo Especial de Grado
presentado ante la Ilustre
Universidad Central de
Venezuela, por el Br. Marco
Ferreira, para optar al título
de Licenciado en Química.

Tutor: Dr. Vincent Piscitelli

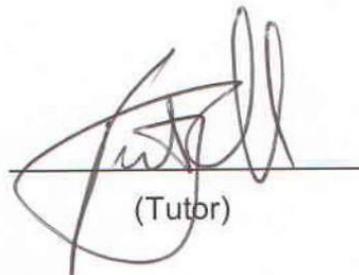
Caracas, Octubre, 2017

Yo, Profesor Vincent Piscitelli, Investigador del Laboratorio de Espectroscopia Laser de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, certifico que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

“DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO CUÁNTICO DE UN FLUORÓFORO EN PRESENCIA DE NANOPARTICULAS METALICAS, USANDO ESPECTROSCOPIA DE LENTE TÉRMICA”

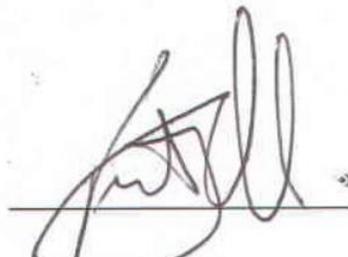
Que presenta el Br. Marco Ferreira, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Laboratorio de Investigación de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, bajo mi dirección, durante los años 2015 y 2017, y con esta fecha autorizo su presentación.

Caracas, Octubre de 2017



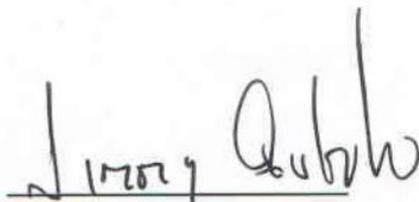
(Tutor)

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: "DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO CUÁNTICO DE UN FLUORÓFORO EN PRESENCIA DE NANOPARTICULAS METALICAS, USANDO ESPECTROSCOPIA DE LENTE TÉRMICA". Presentado por el Br. Marco Ferreira, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.



Vincent Piscitelli

(Director)



Jimmy Castillo

(Jurado)



Lorenzo Echevarria

(Jurado)

Resumen

Poder ajustar a conveniencia las propiedades de fluorescencia de un fluoróforo, como la longitud de onda de su máximo de emisión o su rendimiento cuántico, aumenta el número de aplicaciones donde ese fluoróforo es útil. Una forma de modificar estas propiedades es la presencia de campos plasmónicos cerca del fluoróforo, y cuyo origen pueden ser plasmones superficiales generados en nanopartículas metálicas, como oro o plata, cuando estas son excitadas. Normalmente estas propiedades son estudiadas por técnicas convencionales de espectroscopia de fluorescencia, pero estas son propensas a errores debido a reflexiones o refracción por parte de la muestra. Una forma de evitar esto es con el uso de técnicas indirectas como es el caso de la espectroscopia de lente térmica, ya que esta mide el cambio generado por la absorción de radiación por parte de la muestra, en vez de medir la absorción como métodos espectroscópicos más comunes. Esta técnica se basa en el cambio fotoinducido del índice de refracción de la muestra.

En el presente trabajo se estudiaron los cambios que causaban nanopartículas de plata en la emisión y rendimiento cuántico de fluorescencia del colorante Rodamina B en etanol, usando un sistema para espectroscopia de lente térmica de doble haz de modo desacoplado. Se encontró que la presencia de las nanopartículas de plata disminuye el rendimiento cuántico y desplaza el máximo de emisión de fluorescencia a menores longitudes de onda; esta disminución y desplazamiento va a depender tanto de la concentración de las nanopartículas de plata como de la concentración de la rodamina B, llegando a disminuir el rendimiento cuántico entre 4% y 38%. Adicionalmente, los valores de difusividad térmica calculados demostraron que el efecto por el cual las nanopartículas de plata disminuyen el rendimiento cuántico, en este sistema, es debido a que aumentan la velocidad de decaimiento no radiante de la rodamina B. Estos resultados dan información sobre las muestras estudiadas, y corroboran la capacidad de la espectroscopia de lente térmica para estudiar propiedades de fluorescencia.

Palabras clave: Espectroscopia, Lente Térmica, Rodamina B, Nanopartículas, Plata

A Él por mi vida

A ellos por el apoyo

A ella por nuestra vida

Tabla de Contenido

1-Introducción.....	1
2-Marco Teórico	2
2.1-Lente Térmica	2
2.1.2-General.....	2
2.1.2-Principio Básico	4
2.1.3-Fuente de excitación.....	8
2.1.4-Efecto del medio.....	9
2.1.5-Configuración óptica	9
2.1.6-Detección de imagen.....	10
2.2-Nanopartículas.....	11
2.2.1-General.....	11
2.2.2-Propiedades ópticas de las NPs.....	12
2.3-Fluorescencia.....	14
2.3.1-Luminiscencia	14
2.3.2-Diagramas Perrin-Jablonski.....	15
2.3.3-Conversion Interna (IC)	16
2.3.4-Fluorescencia	17
2.3.5-Cruce entre sistemas (ISC) y los procesos posteriores a este	17
2.3.6-Tiempo de Vida y Rendimiento Cuántico.....	19
2.3.7-Fluorescencia Mejorada por Metales (MEF)	21
2.3.8-Teoría de la interacción fluoróforo-coloide.....	24
2.3.9-Rodaminas	25

3-Antecedentes	27
3.1-Limitaciones	27
3.2-Solvente	27
3.3-Concentración del Fluoróforo.....	29
3.4-Energía del Haz de Excitación	30
3.5-Tamaño de las nanopartículas.....	30
3.6-Arreglo Óptico	31
3.7-Medición del Rendimiento Cuántico (Q)	31
3.8-Rendimiento cuántico	34
4-Objetivos	35
5-Sección Experimental	36
5.1-Reactivos	36
5.2-Metodología	36
5.2.1-Preparación de Muestras.....	36
5.2.2-Medición del Espectro de Absorbancia, Espectro de Fluorescencia y Señal de Lente Térmica	37
5.2.3-Determinación del Rendimiento Cuántico (Q)	39
5.3-Resultados y Discusiones	40
5.3.1-Lente Térmica.....	40
5.3.2-Absorbancia.....	43
5.3.3-Fluorescencia	45
5.3.4-Rendimiento cuántico	47
5.3.5-Difusividad Térmica	49

6-Conclusiones.....	53
7- Recomendaciones	54
8- Bibliografía	55

Tabla de Ilustraciones

Ilustración 1. Tipos de arreglos de la espectroscopia de lente térmica:	5
Ilustración 2. Efecto de la posición de la celda en el factor de mejora.	10
Ilustración 3. Espectros de extinción de las NPs de oro y plata a distintos tamaños.	13
Ilustración 4. Diagrama Perrin-Jablonski.....	15
Ilustración 5. Posiciones relativas de los espectros de Absorción, Fluorescencia y Fosforescencia con tiempos característicos.....	19
Ilustración 6. Relación de la velocidad de decaimientos radiantes con respecto a la distancia de separación entre el fluoróforo y la NP.	25
Ilustración 7. Estructura de la RB.....	26
Ilustración 8 Arreglo coaxial de lente térmica usado para la medición simultanea de lente térmica y fluorescencia.....	38
Ilustración 9. Figura típica de amplitud de lente térmica	40
Ilustración 10. Amplitud de lente térmica variando la concentración de RhB y manteniendo constante la concentración de AgNps	42
Ilustración 11. Amplitud de lente térmica variando la concentración de AgNps y manteniendo constante la concentración de RhB	42
Ilustración 12 Espectros de absorbancia variando la concentración de AgNps y manteniendo constante la concentración de RhB.	43
Ilustración 13. Espectros de absorbancia variando la concentración de RhB y manteniendo constante la concentración de AgNps.	44
Ilustración 17. Superficie de respuesta del Rendimiento Cuántico de fluorescencia de las soluciones muestra con respecto a la concentración de la RhB y las AgNps.....	49

Tabla de Tablas

Tabla 1: Factores de mejora. Medidos a 1W de poder del haz de excitación.	28
Tabla 2. Soluciones muestra	36
Tabla 3. Numeración de soluciones muestra	37
Tabla 4. Señales amplitud de lente térmica para soluciones muestra.....	41
Tabla 5. Señales de amplitud de lente térmica normalizadas por la energía de excitación para las soluciones muestra.....	41
Tabla 6. Promedio de Longitud de Onda de Absorbancia (nm).....	44
Tabla 7. Promedio de Longitud de Onda de Emisión de Fluorescencia.....	45
Tabla 8. Rendimiento cuántico de fluorescencia para soluciones muestra	48
Tabla 9. Difusividad térmica para soluciones muestra con concentraciones de RhB de 5 y 8 microM.....	50

Tabla de Ecuaciones

Ecuación 1. Intensidad de señal de lente térmica bajo excitación continua.	6
Ecuación 2. Intensidad de señal de lente térmica bajo excitación pulsada.	7
Ecuación 3. Intensidad de la señal en función de una distancia Z del punto focal del haz de excitación.	9
Ecuación 4. Rendimiento cuántico	20
Ecuación 5. Rendimiento cuántico y tiempo de vida de fluoróforos en presencia de metales.....	23
Ecuación 6. Rendimiento cuántico en sistemas similares al de lente térmica.	23
Ecuación 7. Cambio de fase del haz de prueba en la lente térmica, normalizado por la energía de excitación absorbida.....	32

Ecuación 8. Factor de las propiedades termo-ópticas y promedio de la longitud de onda de emisión.....	32
Ecuación 9. Conservación de la energía en una muestra fluorescente.....	33
Ecuación 10. Relación de la señal de lente térmica con la energía degradada en forma de calor por parte de la muestra.....	33
Ecuación 11. Rendimiento cuántico medido vía lente térmica	34
Ecuación 12. Señal de lente térmica en el régimen pulsado	49

1-Introducción

El rendimiento cuántico de la fluorescencia se define como la relación entre la luz emitida y la luz absorbida por el fluoróforo y éste se puede controlar al combinar el fluoróforo con las nanopartículas. Controlar el rango de emisión y la intensidad de la fluorescencia de los fluoróforos, al igual que su rendimiento cuántico, permite ampliar la cantidad de aplicaciones que posee el mismo fluoróforo.

Para determinar el valor de rendimiento cuántico usamos espectroscopía de lente térmica debido a las limitaciones que poseen las técnicas de fluorescencia convencionales comparadas a esta. Las técnicas de lente térmica poseen ventajas como la precisión, la sensibilidad y su ausencia de “contacto directo”.

Los fluoróforos han sido indispensables para la obtención de señales en sistemas de sensores ópticos e imagenología. Su emisión de fluorescencia puede ser mejorada o extinguida por campos plasmónicos que se generen, por cualquier razón, cerca del fluoróforo. Un posible origen de estos campos plasmónicos sería nanopartículas metálicas, nosotros elegimos las de oro y plata debido a su inactividad química y la enorme cantidad de aplicaciones biológicas, también poseen una intensa banda de absorción en el visible.

En este trabajo se determinó la influencia de las nanopartículas de plata, generadas por ablación láser, en el rendimiento cuántico del fluoróforo Rodamina B, a distintas concentraciones de este, usando la técnica de lente térmica de doble haz.

2-Marco Teórico

2.1-Lente Térmica

2.1.2-General

La espectrofotometría de lente térmica es un tipo de espectroscopia que comprende un grupo de métodos de alta sensibilidad usados para medir la absorción óptica y las características térmicas de una muestra. La base general de la espectroscopia fototérmica es un cambio fotoinducido en el estado térmico de la muestra, la energía lumínica es absorbida y, al no perderse en emisiones sucesivas, trae como resultado que la muestra se caliente. Este calentamiento de la muestra induce cambios en los parámetros termodinámicos que dependen de la temperatura [1], algunos de estos parámetros son la presión, la densidad, el índice de refracción, etc.

La espectroscopia fototérmica es un método “indirecto” para el análisis de la absorción óptica debido a que no se mide la transmisión de la radiación que se usa para excitar la muestra, sino el efecto que genera esta absorción en la muestra. El calentamiento de la muestra es una consecuencia de la absorción óptica, así que la señal de lentes térmicas es directamente dependiente de la absorción de la radiación [1]. En las técnicas basadas en transmisión puede existir la presencia de fenómenos de dispersión y reflexión, los cuales pueden afectar la veracidad de la señal. Estos fenómenos no son variables de la espectroscopia fototérmica debido a que ninguno varía la temperatura de la muestra, y por lo tanto no afectan la señal fototérmica obtenida.

Esta propiedad de “medición indirecta” convierte a la espectroscopia fototérmica en un método más sensible que aquellos métodos que miden absorción por transmisión. Gracias, entre otras cosas, a que los efectos fototérmicos de los solventes pueden amplificar la señal que se está midiendo, a esta amplificación se le llama “factor de mejora” y es la relación entre la señal obtenida por métodos fototérmicos y la señal obtenida por métodos de transmisión. Los factores de mejora no solo dependen de las

propiedades térmicas y ópticas de la muestra sino también de la energía suministrada por la fuente de excitación y el arreglo óptico del sistema [1]. Si se varían estos últimos, la mejora puede ser muy grande incluso en muestras con propiedades térmicas y ópticas “pobres”. De hecho, el problema en la espectroscopia fototérmica no es el límite de detección de la absorción, sino poder detectar la absorbancia del analito en presencia de la absorbancia del solvente.

Debido a que la magnitud de la señal de la espectroscopia fototérmica depende del método usado para medirla, de las propiedades termodinámicas y de transferencia de energía en la muestra, se reportan distintos límites de detección y es difícil establecer un límite absoluto. Se han llegado a medir absorbancias de 10^{-7} u.a usando arreglos ópticos optimizados [1]. Una limitante de la técnica fototérmica es que los cambios de temperatura debido a la absorción óptica están directamente relacionados a la capacidad calorífica y a la conductividad térmica [1] del sistema (muestra y solvente). Esto hace que medir la absorción absoluta de la muestra sea difícil, ya que las propiedades térmicas y ópticas de la muestra deben ser conocidas con exactitud o la respuesta del instrumento debe ser calibrada con muestras de composición y absorbancia conocida.

Las fuentes láseres son la principal fuente de excitación y control en los arreglos fototérmicos esto se debe principalmente a dos razones. La primera es la alta pureza espectral (monocromaticidad) lo cual permite elegir la longitud de onda de interés para la muestra a estudiar. En segundo lugar, a su potencia de salida [1] (vista como número de fotones por unidad de área). Ya que el cambio en la intensidad de la señal fototérmica es proporcional a la energía absorbida y finalmente a la coherencia espacial [1], es decir, el cambio de temperatura no es solamente proporcional a la energía suministrada sino también es inversamente proporcional al volumen que absorbe la radiación incidente ya que la capacidad calorífica varía con la cantidad de sustancia, la propiedad de coherencia espacial que poseen los láseres permite enfocar la radiación en pequeños volúmenes, y estos mejoran la magnitud de la señal fototérmica [1].

La mayoría de los estudios que usan la espectroscopia fototérmica en el análisis químico se basan en la medición del índice de refracción [1], el cual es dependiente de la temperatura, y para ello se usan distintos métodos para estudiar el cambio de este índice de refracción, sin embargo todos estos se basan en los principios básicos de la propagación de la luz: los cambios de la distancia del camino óptico, la difracción y la refracción [1]. Perfiles dependientes de la distancia para el índice de refracción pueden resultar en el enfoque o desenfoque de un rayo de luz que pase por la muestra [1]. Esto ocurre cuando los perfiles son curvos y así la muestra, alterada térmicamente, puede comportarse como lente. Un haz de luz transmitido a través de esta lente fototérmica variara con la fuerza de esta. Los métodos basados en la medición de la fuerza de este lente son los que se conocen como “Espectroscopia o Espectrofotometría de Lente Térmica”.

2.1.2-Principio Básico

La espectroscopia de lente térmica fue el primer método de espectroscopia fototérmica aplicado para el análisis químico de alta sensibilidad. El lente fototérmico ocurre debido a la absorción óptica y el calentamiento de la muestra en los puntos donde interactúa la fuente de excitación. El lente se crea debido a la dependencia del índice de refracción con la temperatura [1] y generalmente el lente posee una distancia focal negativa ya que la mayoría de los materiales se expanden al calentarse y el índice de refracción es proporcional a la densidad. Este lente negativo genera la divergencia de un haz incidente (que puede o no ser el mismo haz de excitación) y la señal se mide como una disminución, dependiente del tiempo, de la intensidad del centro de este haz incidente.

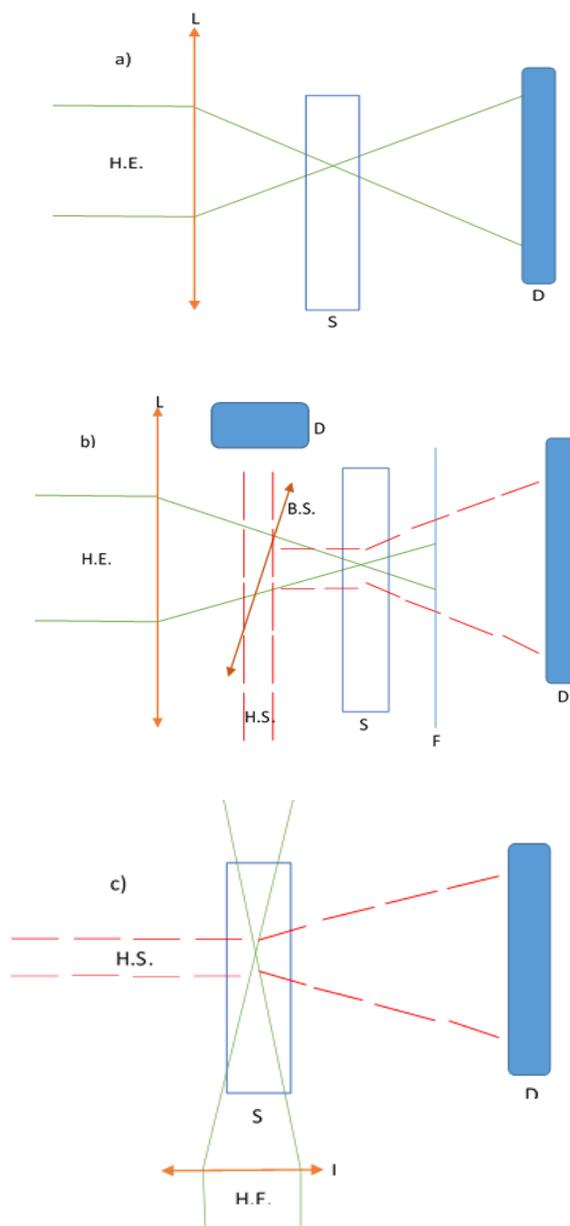


Ilustración 1. Tipos de arreglos de la espectroscopia de lente térmica:

a) Arreglo de haz simple. b) Arreglo de haz doble colineal. c) Arreglo de haz doble transverso. Siendo H.E. el haz de excitación, L la lente de enfoque, B.S. el separador de haces, S la celda de muestra, D el detector, H.S. el haz de sondeo y F el filtro.

En la ilustración 1, se muestran algunos arreglos tradicionales de espectroscopia de lente térmica. En todos los arreglos, el haz de excitación se enfoca en la muestra gracias a una lente. Se puede observar que en el arreglo de haz simple se mide la expansión del haz de excitación. Por otra parte, en el arreglo de haz doble colineal se usa un segundo haz, llamado haz de sondeo, y es la expansión de este haz la que se mide, además se usa un filtro, para absorber al haz de excitación y de esta forma se impide que llegue al detector, y un separador de haces que se usa, no solo para hacer que ambos haces estén coaxiales, sino también para poder estudiar las variaciones del haz de sondeo, aunque siempre se busca usar uno muy estable. Finalmente, en el arreglo de haz doble transverso el haz de sondeo no es coaxial al haz de excitación, sino que incide en la muestra perpendicular a este, este arreglo es particularmente útil para volúmenes muy pequeños de muestra y para el uso en cromatografía líquida y electroforesis capilar [2].

Los sistemas de haz doble son más complejos desde el punto de vista instrumental, pero presentan varias ventajas como que con estos se puede obtener una alta intensidad de la señal y se pueden medir señales muy pequeñas [3]. En un arreglo transversal la señal no depende de la longitud de la muestra, pero se obtienen buenos límites de detección en términos de absorbancia por unidad de longitud. Por el contrario, el arreglo de haz doble colineal arroja mejores sensibilidades absolutas debido a que la muestra interactúa con los haces a lo largo de una mayor distancia [2]. La intensidad de la señal de lente térmica bajo excitación continua puede ser expresada, a bajas absorbancias, como:

$$S_c = \frac{(I_0 - I_\infty)}{I_\infty} \cong -2,3 \times \frac{P_c}{\lambda k} \times \left(\frac{dn}{dT} \right) \times A = 2,3 \times E_c \times A$$

Ecuación 1. Intensidad de señal de lente térmica bajo excitación continúa.

Donde I_0 y I_∞ son las intensidades del centro del haz de sondeo sin y con la irradiación del haz de excitación, respectivamente; P_c es el pulso de la energía del haz

de excitación, λ es la longitud de onda del haz de sondeo; k es la conductividad térmica $\left(\frac{dn}{dT}\right)$ es la variación del índice de refracción con respecto a la temperatura y E_C es el factor de mejora [3].

Podemos expresar la intensidad de la señal bajo condiciones de excitación pulsada como:

$$S_p = \frac{(I_\infty - I_0)}{I_0} \cong -3^{\left(\frac{3}{2}\right)} \times \frac{P_p}{\lambda_p (\omega_{0p})^2} \times \frac{1}{\rho C_p} \times \left(\frac{dn}{dT}\right)$$

Ecuación 2. Intensidad de señal de lente térmica bajo excitación pulsada.

Donde I_0 y I_∞ son las intensidades del centro del haz de sondeo justo después y justo antes de la irradiación por el haz de excitación respectivamente; P_p es el pulso de la energía del haz de excitación, λ_p y ω_{0p} son la longitud de onda y el radio del haz (la distancia entre el centro del haz y el punto en donde la intensidad del haz sea $\frac{1}{e^2}$) en la cintura del haz (el punto en el que el haz está enfocado) de la fuente de excitación pulsada; ρ es la densidad del medio en el que esta la muestra; y C_p es la capacidad calórica de ésta [3].

Las ecuaciones anteriores son aproximaciones y solo funcionan cuando se considera un cambio parabólico en el radio [4], lo que permite considerar la lente térmica creada como una lente delgada ideal. Esto mantiene una muy buena concordancia si el haz de excitación tiene un ancho menor o igual que el haz de sondeo [4]. Sin embargo, cuando el ancho del haz de excitación es mayor que el ancho del haz de sondeo, aunque se mejora la señal de lente térmica, los resultados experimentales no concuerdan con los modelos [5].

Se han desarrollado modelos basándose en la óptica geométrica de la lente térmica y esta aproximación sí permite explicar su formación y características principales (como distancia focal, dimensiones, etc.), pero solo concuerda con los resultados

experimentales en condiciones de baja potencia y soluciones diluidas [5]. También muestra la naturaleza aberrante de la lente térmica (que las aproximaciones parabólicas asumen una lente no aberrante).

Otros modelos propuestos consideran gaussiano al haz de sondeo y a la lente térmica como un corrector de fase. Así se considera al haz saliente como un conjunto de haces gaussianos con diferentes fases y estos modelos si concuerdan perfectamente con los resultados experimentales sin importar las condiciones [5]. Para los efectos de este trabajo usaremos un haz de excitación pulsado y consideraremos que las condiciones permiten una aproximación parabólica.

Para la detección sensible de absorciones pequeñas, es necesario usar una fuente laser con una alta potencia de salida, un medio con un gran factor de mejora, un haz estable de sondeo, y un equipo de procesamiento de la señal que permita la detección de la pequeña señal bajo todo el ruido [3].

Para este estudio, consideraremos las siguientes variables: la fuente de excitación, el efecto del medio, el arreglo óptico y la detección de la imagen

2.1.3-Fuente de excitación

La fuente de radiación para la espectroscopia de lente térmica debe estar bien enfocada en la muestra. Por esta razón, a pesar de que es posible generar el fenómeno de lente térmica con otras fuentes como radiación solar bien enfocada (a pesar de su incoherencia), los láseres son la fuente perfecta para esta técnica y por lo tanto la más utilizada. Como ya vimos, la señal de lente térmica es proporcional a la potencia de la fuente de excitación. Esto se ha confirmado experimentalmente y no se observa saturación, por lo menos hasta 1 W, mientras la intensidad de la señal normalizada (S) sea menor a los 0,1 [3].

2.1.4-Efecto del medio

El factor de mejora para una muestra en fase condensada se ve muy afectada por los parámetros físicos del solvente en el que este disuelta. Por ejemplo, el agua es un mal solvente para observar efecto de lente térmica ya que tiene un bajo factor de mejora debido a su alta conductividad térmica y baja variación del índice de refracción con respecto a la temperatura a diferencia de los solventes orgánicos como el tetracloruro de carbono (TCC) y el cloroformo poseen un gran factor de mejora. Generalmente, un solvente con una pequeña constante dieléctrica tiene un gran factor de mejora [3].

2.1.5-Configuración óptica

La señal de lente térmica es muy dependiente de la posición de la celda. Se puede expresar la intensidad de la señal a una distancia Z del punto focal del láser como:

$$\frac{(I_0 - I_\infty)}{I_\infty} \cong -2,3 \times E_c \times A \times \frac{(2ZZ_c)}{(Z^2 + Z_c^2)}$$

Ecuación 3. Intensidad de la señal en función de una distancia Z del punto focal del haz de excitación.

Donde Z_c es la distancia confocal en donde el radio es $\sqrt{2\omega_0^2}$. La curva teórica de esta ecuación se muestra en la ilustración 2. Cuando la celda se coloca entre la lente de enfoque y el punto focal vemos un “efecto de enfoque térmico”, una lente térmica convergente, pero cuando la celda se coloca después del punto focal vemos un “efecto de desenfoque termal”, una lente térmica divergente. Las máximas señales se obtienen cuando $Z = \pm Z_c$. Los signos de las señales de enfoque y desenfoque termal son opuestos pero sus intensidades absolutas son idénticas en un montaje de haz único [3].

Terazima reporta que la intensidad de la señal de lente térmica es dependiente del soluto utilizado y por lo tanto en esta ecuación debería estar presente un parámetro que describa el soluto [6].

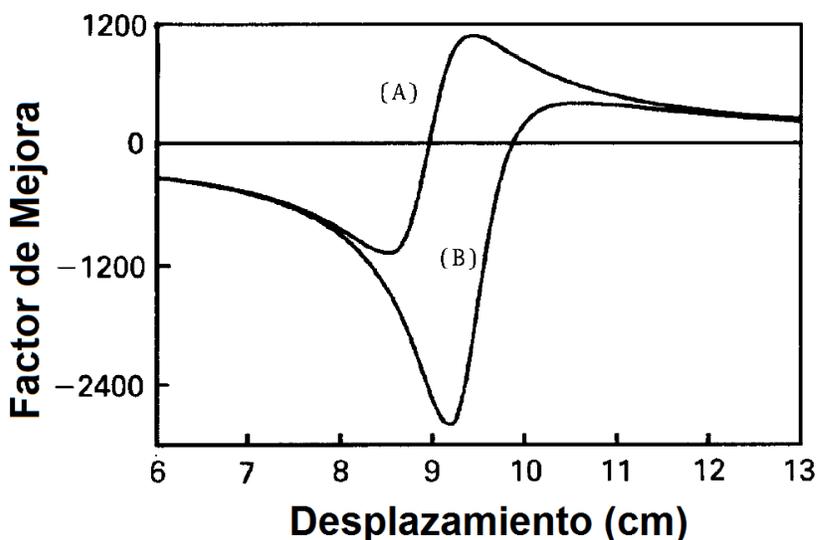


Ilustración 2. Efecto de la posición de la celda en el factor de mejora.

(A) método de haz simple (B) método de haz doble. Se asume que la separación de las cinturas del haz de sondeo y del haz de excitación son 5 mm.ⁱ

El comportamiento de la señal de lente térmica en un sistema de haz doble es similar siempre y cuando los haces estén completamente superpuestos, pero esto no siempre ocurre. En los sistemas de haz doble, el haz de sondeo y el haz de excitación tienen diferentes diámetros de haz y divergencias así que la posición de la cintura del haz, es decir el punto en la dirección de propagación del haz donde su radio es el mínimo, no es idéntica para ambos. En este caso la sensibilidad del enfoque y desenfoque termal es distinta entre ellas como puede notarse en la ilustración2 [3].

2.1.6-Detección de imagen

La generación del efecto de lente térmica se puede ver claramente solo colocando una hoja blanca detrás de la celda de muestra. En la mayoría de los estudios

ⁱTomado y traducido de "Thermal lens spectrophotometry" T. Imasaka y I. N, TrAC-Trends Analyt Chem, vol. I, nº 12, pp. 273-277, 1982. p 275.

cuantitativos, la medición de la señal de lente térmica se basa en evaluar cuantitativamente la intensidad del centro del haz de sondeo usando un fotodetector con una apertura delante. El uso de un sistema de detección de imagen permite monitorear todo el perfil de intensidad del haz y a la vez que todos los datos obtenidos sean precisos [3]. También remueve cualquier dispersión ocasional de luz generada por las partículas en la muestra.

Slaby encontró que la presencia de un filtro espacial, que bloquee el centro del haz de sondeo después de salir de la muestra, puede mejorar la relación señal/ruido de la técnica hasta 3 veces en arreglos de haz doble transversal donde los haces incidían con ángulos menores a 90° [7]. Por su parte, Estupiñán-López encontró la misma mejora, con un filtro espacial similar, pero en arreglos de haz simple; y en los arreglos de haz doble transversal (en donde el ángulo de incidencia entre los haces era cercano a 3°) encontró una mejora de 14 veces. A este método le llamó lente térmica eclipsante [8].

2.2-Nanopartículas

2.2.1-General

Las nanopartículas (NPs) son agrupaciones de átomos, iones o moléculas que poseen dimensiones entre 1 y 100 nm. Las NPs constituyen un nuevo tipo de “material” ya que poseen muchas propiedades diferentes a las de las moléculas individuales o a los sólidos “grandes” a los que estamos acostumbrados. En las últimas décadas ha aumentado el interés en la “nanoquímica”, y por ello se han sintetizado una variedad de conjuntos supramoleculares, supramoléculas multifuncionales, nanotubos de carbono y NPs metálicas y de semiconductores, para proponerlas como partes fundamentales de dispositivos ópticos y electrónicos [9].

Las NPs atraen particular interés debido a la facilidad con las que pueden ser sintetizadas y modificadas. También poseen una ventaja desde el punto de vista de la comprensión de sus efectos ópticos y electrónicos ya que sus constantes dieléctricas se

asemejan a las de los mismos materiales a gran escala hasta muy pequeñas dimensiones [9].

Seguramente su propiedad más interesante es que, generalmente poseen fuertes bandas de extinción de resonancia plasmónica en el espectro visible, y por esto muestran colores parecidos a los colorantes moleculares. Sin embargo, aunque el espectro de las moléculas solo se puede entender en términos mecánico cuánticos, las bandas de resonancia plasmónica de partículas metálicas nanoscópicas se pueden racionalizar en términos clásicos de la teoría de electrón libre y modelos electrostáticos simples para polarizabilidad de partículas. Hay que añadir que, aunque la composición de las partículas metálicas se mantenga constante, su máximo de extinción de resonancia plasmónica se puede desplazar cientos de nanómetros al cambiar su forma y/u orientación del campo incidente [9]. Así que sus propiedades de óptica lineal pueden cambiarse significativamente sin un cambio esencial en la composición química.

Las propiedades eléctricas de las partículas metálicas también son similares a sus contrapartes a macroescala. Los procesos de carga superficial y transporte de electrones en partículas metálicas individuales y arreglos bidimensionales de partículas se pueden entender con expresiones simples y clásicas de carga [9]. Esto no quiere decir que se entiendan completamente las propiedades ópticas y eléctricas de las NPs metálicas o que hemos alcanzado un control total sobre su geometría o la forma como se arreglan. De hecho, es lo contrario, todavía no se logran relacionar sus propiedades de óptica lineal con su geometría.

2.2.2-Propiedades ópticas de las NPs

Las NPs han sido usadas para hacer vidrios de colores durante siglos [10]. Sin embargo, la razón por la cual se observaba color no se entendió hasta 1857 cuando Faraday descubrió que los colores se debían a partículas de oro o plata finamente divididas. La luz incidente interactúa con las pequeñas partículas metálicas e induce oscilaciones de los electrones, el campo oscilante puede generar radiación de un campo

lejano a la misma longitud de onda [10]. El resultado es que la luz incidente es dispersada por las NPs así que el vidrio parece del color de la luz no dispersada. La verdad es un poco más compleja ya que las NPs pueden absorber la radiación.

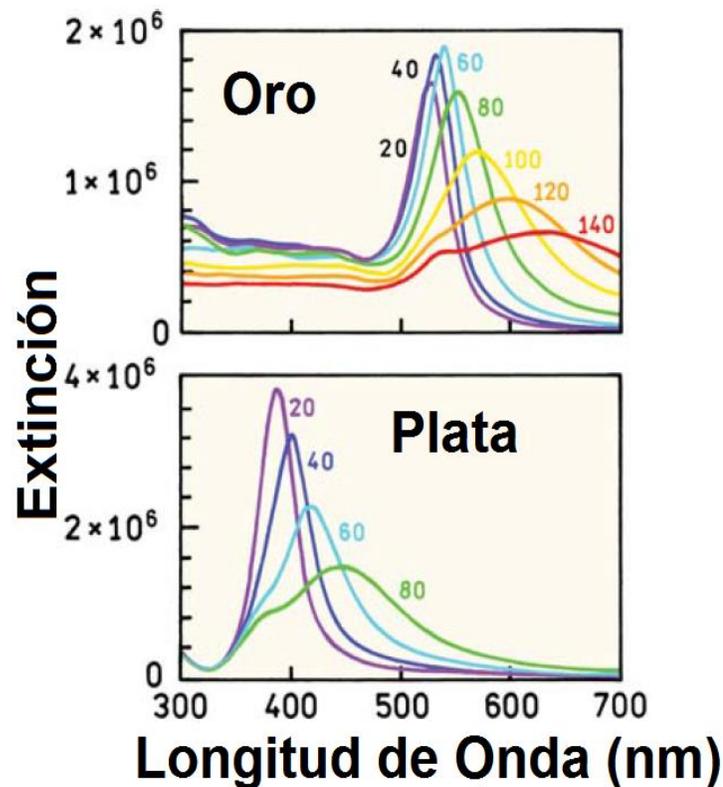


Ilustración 3. Espectros de extinción de las NPs de oro y plata a distintos tamaños.ⁱⁱ

El término extinción se refiere a la atenuación de la radiación al pasar por la muestra [10]. Esta se debe tanto a la absorción como a la dispersión de la radiación y se desplaza a longitudes de onda mayores al aumentar el tamaño de las NPs. Las NPs de oro pueden absorber a longitudes de onda mayores que las de plata, pero la absorción también depende fuertemente de la forma de las NPs [10]. Las NPs tienen una gran

ⁱⁱTomado y Traducido de "Principles of Fluorescence Spectroscopy". J. Lakowicz, 3th ed., New York: Springer, 2011. p 845

sección transversal para interactuar con la radiación y coeficientes de extinción del orden de los $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [10].

Distintas investigaciones afirman que las NPs de metales nobles (ej.: Ag, Au, Pd, Pt, etc.) con diámetros mayores a los 10 nm, poseen una alta estabilidad química dado su inactividad química, cuando estas miden entre 2-4 nm, es mucho más fácil oxidarlas [11]. Por otra parte, las NPs de otros metales de transición son generalmente más sensibles al oxígeno [12].

Una síntesis exacta de NPs nunca es sencilla ya que pequeños cambios en los procesos de síntesis puedes alterar mucho los resultados. Además, las vías químicas para prepararlas pueden producir nanocristales que poseen una estructura cristalina totalmente distinta a sus contrapartes macroscópicas [12]. Las NPs de metales nobles se pueden preparar por vías químicas y físicas, esta preparación (para obtener una forma y tamaño definidos) es una meta importante para los químicos y físicos que buscan volver sus posibles aplicaciones una realidad.

Uno de los métodos más sencillos para generar muchas NPs de metales nobles es la ablación laser: se coloca una placa metálica en una solución que contenga un estabilizante, luego se irradia la placa con el haz de un láser enfocado por una lente. Los átomos metálicos se evaporan dentro de la solución debido a la interacción de la materia con el láser y posteriormente se condensan cuando la interacción cese. Lamentablemente, la distribución de tamaño de las NPs que se generan por vía de ablación laser suele ser muy amplia debido a que ocurren procesos de agregación de los átomos que son muy difíciles de controlar [12].

2.3-Fluorescencia

2.3.1-Luminiscencia

La luminiscencia es la emisión espontanea de radiación desde una especie electrónicamente excitada o vibracionalmente excitada que no se encuentre en equilibrio

térmico con el ambiente [13]. Los distintos tipos de luminiscencia se clasifican por su modo de excitación (calor, químicos, ultrasonido, etc.), en esta investigación se considerará la fotoluminiscencia, es decir la luminiscencia excitada por absorción de luz, en especial la fluorescencia y fosforescencia (enfocándonos en la fluorescencia).

2.3.2-Diagramas Perrin-Jablonski

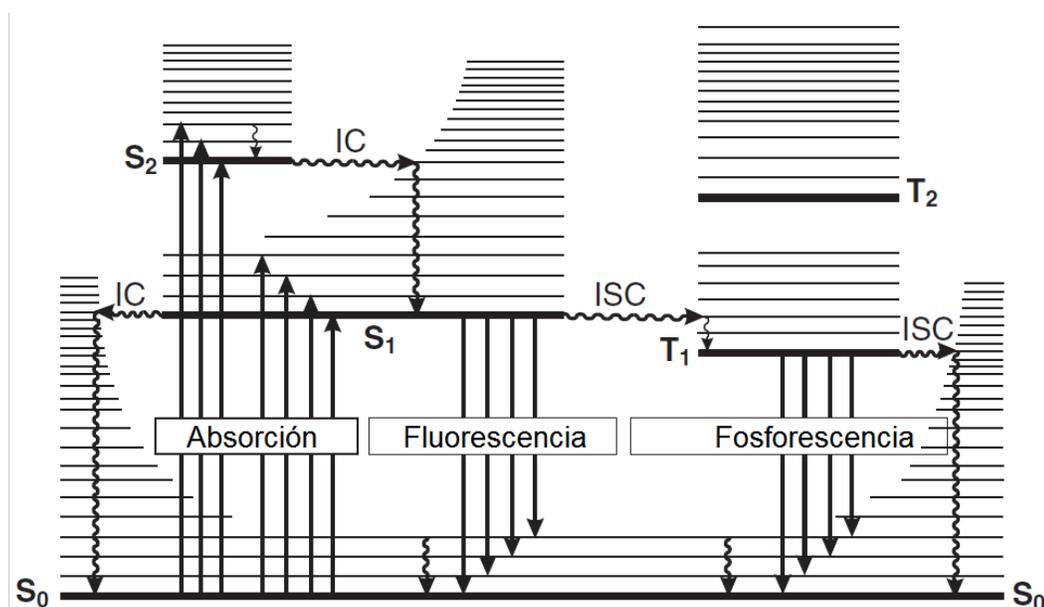


Ilustración 4. Diagrama Perrin-Jablonski.ⁱⁱⁱ

Los diagramas Perrin-Jablonski son una forma conveniente de visualizar los posibles procesos, posteriores a la absorción de luz, que puede sufrir una molécula: absorción de fotones, conversión interna, fluorescencia, cruce entre sistemas, fosforescencia, fluorescencia retardada y transiciones triplete-triplete. Los estados electrónicos de singlete se denotan por S_0 (el electrónico fundamental), S_1 , S_2 , ..., S_n y los

ⁱⁱⁱTomado y traducido de "Molecular Fluorescence: Principles and Applications". B. Valeur y M. Berberan-Santos, 2nd ed., Weinheim: Wiley-VCH, 2012. p 54

estados de triplete se denotan T_1, T_2, \dots, T_n . Hay niveles vibracionales asociados a cada estado electrónico [13].

Las flechas que corresponden a las absorciones van desde el menor de los estados vibracionales de S_0 , ya que la mayoría de las moléculas se encuentran en este nivel si se está a temperatura ambiente, hasta cualquiera de los niveles vibracionales de los singletes.

A las sustancias que fluorescen se les conoce como fluoróforos, los cuales generalmente poseen estructuras aromáticas [10]. La mayoría de los fluoróforos poseen bandas de absorción y de emisión anchas y sin estructura [13], esto muestra que cada estado electrónico consiste en un continuo de niveles vibracionales. Una consecuencia de ello es que la excitación se puede dar desde uno de los niveles vibracionales de S_0 , esto explica por qué el espectro de absorción puede solaparse parcialmente con el de fluorescencia.

2.3.3-Conversion Interna (IC)

La conversión interna son transiciones no-radiantes entre dos estados electrónicos que tengan la misma multiplicidad de espín. En una solución, este proceso es seguido por una relajación vibracional hasta el nivel más bajo del estado electrónico alcanzado en la excitación [13]. El exceso de energía vibracional puede transferirse al solvente por colisiones del fluoróforo con él.

Cuando una molécula es excitada a un nivel energético más alto que el nivel vibracional más bajo del primer estado excitado, una relajación vibracional conduce a la molécula al estado vibracional 0 del singlete S_1 en un tiempo entre 10^{-13} y 10^{-11} s [13].

Desde S_1 , la conversión interna a S_0 es menos eficiente que de S_2 a S_1 ya que la diferencia de energía es mayor entre S_1 y S_0 . Por esto, la conversión interna entre S_1 y S_0 compite con la fluorescencia y la fosforescencia.

2.3.4-Fluorescencia

La emisión de fotones acompañada de la relajación de S_1 a S_0 es lo que conocemos como fluorescencia [13]. Se debe notar que en la gran mayoría de los casos la emisión de la fluorescencia ocurre desde S_1 y por esto no depende de la longitud de onda de excitación, lo cual se conoce como la regla de Kasha [10].

En general, las diferencias entre los niveles vibracionales, en el estado base y los estados excitados, son similares así que el espectro de fluorescencia generalmente es similar a la primera banda de absorción, a esto se le conoce como regla de la imagen especular (mirror image rule) [13]. La separación entre el máximo de la primera banda de absorción y el máximo de la fluorescencia es lo que se conoce como el desplazamiento de Stokes [13]. Investigaciones han encontrado que los tiempos de vida de la fluorescencia son del orden de los 10 ns, por lo que generalmente ya ha ocurrido la conversión interna [10].

2.3.5-Cruce entre sistemas (ISC) y los procesos posteriores a este

Otro posible proceso de des-excitación es la transición no radiante entre dos niveles vibracionales isoenergéticos que pertenezcan a estados electrónicos con diferente multiplicidad. Por ejemplo, el estado vibracional 0 de S_1 podría moverse a un estado vibracional isoenergético de cualquier triplete T_n y luego por relajación vibracional bajar al estado vibracional más bajo de T_1 [13]. Este cruce entre sistemas también puede competir con la conversión interna y la fluorescencia.

En principio este evento está prohibido, pero cuando el acoplamiento entre los momentos magnéticos del orbital y del espín es muy grande, esto se vuelve posible [13]. La probabilidad que ocurra depende de los singletes y tripletes que estén involucrados. A esto lo pueden seguir varios procesos:

3.3.5.1-Fosforescencia

La fosforescencia es el proceso de des-excitación radiante desde el triplete T_1 . A temperatura ambiente la misma des-excitación pero no-radiante domina sobre la fosforescencia debido a que la transición desde T_1 a S_0 está prohibida pero el gran acoplamiento de los momentos magnéticos lo hace posible. Esto hace que la velocidad de radiación sea muy baja, del orden de los 1000 y 10 s^{-1} [13].

El espectro de fosforescencia se encuentra a mayores longitudes de onda que el de fluorescencia ya que la energía del nivel vibracional más bajo del triplete T_1 es menor que la del singlete S_1 .

3.3.5.2-Fluorescencia Retardada

Cuando la diferencia de energías entre T_1 y S_1 es muy pequeña (o el tiempo de vida en T_1 es muy grande), se puede dar un cruce entre sistemas inverso, el cual es activado térmicamente, para volver de T_1 a S_1 seguido por una emisión [13]. El resultado es una fluorescencia con un espectro idéntico a aquel de una fluorescencia normal, pero con un tiempo de decaimiento mucho mayor.

3.3.5.3-Transiciones Triplete-Triplete

Ya cuando una molécula esta excitada y alcanza un estado de triplete T_1 , puede absorber otro fotón de otra longitud de onda ya que las transiciones triplete-triplete están permitidas por espín [13]. Estas transiciones se pueden observar ya que la población de moléculas en el estado triplete es suficientemente grande, lo cual se puede lograr con un pulso muy intenso de radiación.

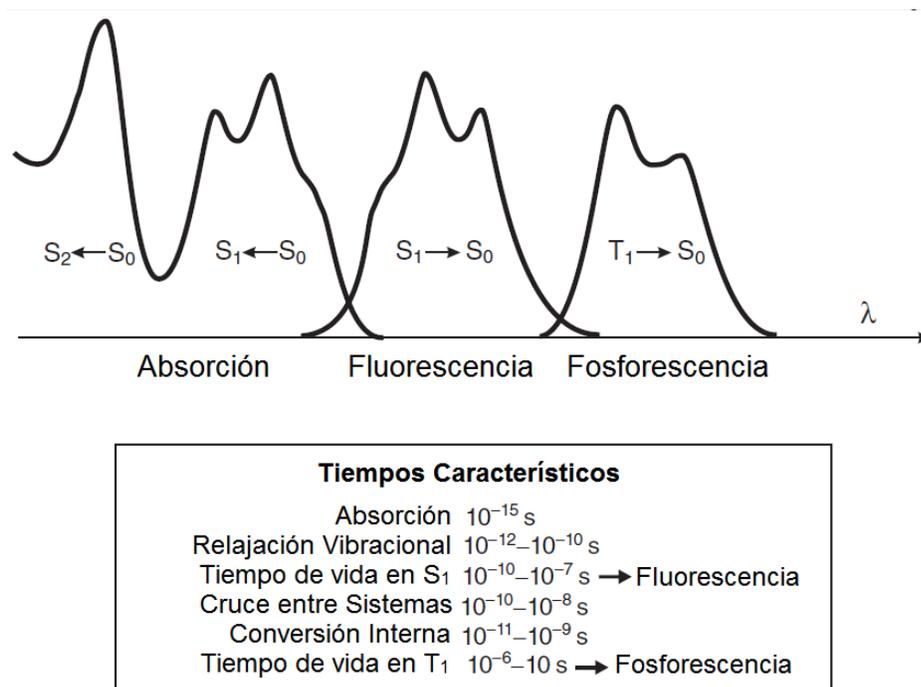


Ilustración 5. Posiciones relativas de los espectros de Absorción, Fluorescencia y Fosforescencia con tiempos característicos.^{iv}

2.3.6-Tiempo de Vida y Rendimiento Cuántico

Se puede considerar al tiempo de vida de la fluorescencia de un fluoróforo y su rendimiento cuántico como sus características más importantes.

El tiempo de vida de los fluoróforos es el tiempo promedio entre la excitación y el retorno al estado base [10]. Es de gran ayuda considerar un tiempo de vida medio de 1 ns, en el contexto de la velocidad de la luz, en este nanosegundo la luz viaja unos 30 cm. Muchos fluoróforos poseen tiempos de vida de subnanosegundos y debido a esta corta duración de la fluorescencia, se necesitan sistemas ópticos y electrónicos avanzados para medirla. Pero a pesar de esta complejidad intrínseca, mediciones de la fluorescencia

^{iv}Tomado y traducido de "Molecular Fluorescence: Principles and Applications". B. Valeur y M. Berberan-Santos, 2nd ed., Weinheim: Wiley-VCH, 2012. p 54

con respecto al tiempo se usan mucho debido a la gran cantidad de información que podemos obtener, comparándola con las mediciones de estado estacionario [10].

El rendimiento cuántico es el número de fotones emitidos relativo al número de fotones absorbidos [10]. Las sustancias donde el rendimiento cuántico se aproxime a 1, como es el caso de las rodaminas, muestran emisiones muy brillantes. El tiempo de vida también es importante ya que determina el tiempo que posee el fluoróforo para interactuar con su ambiente y por esto la cantidad de información que se puede obtener de su emisión.

Se puede definir al rendimiento cuántico como la fracción de fluoróforos excitados que decaen por emisión, entonces se escribe como:

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}}$$

Ecuación 4. Rendimiento cuántico

Siendo Γ la velocidad de emisión del fluoróforo y k_{nr} la velocidad de decaimiento no radiante al estado fundamental [10].

Al tiempo de vida lo definimos como el tiempo en que la molécula pasa en el estado excitado antes de regresar al estado fundamental. Este puede ser $\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}}$ y puede variar con cada fluoróforo. Por otra parte, el tiempo de vida de un fluoróforo en ausencia de procesos no radiantes es lo que se llama tiempo de vida intrínseco o natural y se define como $\tau_n = \frac{1}{\Gamma}$. Generalmente este se puede calcular de una manera simple a partir del tiempo de vida medido y el rendimiento cuántico ($\tau_n = \frac{\tau}{Q}$) pero en ciertos fluoróforos (especialmente los bioquímicos) esto no es muy exacto [10].

Cualquier factor que afecte Γ y k_{nr} modificará el tiempo de vida y el rendimiento cuántico del fluoróforo [10]. Por ejemplo, una molécula puede dejar de ser fluorescente debido a una alta velocidad de conversión interna o una baja velocidad de emisión.

La intensidad de la fluorescencia puede ser disminuida por una amplia gama de procesos, a estas disminuciones en intensidad se les llama *Quenching* [10]. Éste puede ocurrir por distintos mecanismos, por ejemplo, el *quenching* de colisiones ocurre cuando el estado excitado de un fluoróforo se desactiva por el contacto con otra molécula. Estas moléculas, las que generan *quenching*, también pueden formar complejos no fluorescentes con los fluoróforos, a este proceso se le llama *quenching* estático debido a que ocurre en el estado basal [10]. El *quenching* también puede ocurrir por mecanismos no moleculares, como la atenuación de la radiación incidente por el mismo fluoróforo u otra especie que absorba [10].

2.3.7-Fluorescencia Mejorada por Metales (MEF)

Un fluoróforo en su estado excitado posee las propiedades de un dipolo oscilante [10] y puede inducir oscilaciones en los electrones de un metal que se encuentre en el medio. El campo eléctrico creado por el metal puede interactuar con el fluoróforo excitado y alterar su emisión [10], esta interacción es bidireccional así que oscilaciones fotoinducidas en el metal pueden afectar al fluoróforo. A este efecto se le llama Fluorescencia Mejorada por Metal (MEF por sus siglas en ingles). Los mecanismos de MEF no se entienden en su totalidad y sus aplicaciones apenas están desarrollándose. Las interacciones de los fluoróforos con las superficies metálicas tienen varios efectos útiles, incluyendo el aumento del rendimiento cuántico, aumento de la fotoestabilidad, aumento de las distancias para transferencia de energía resonante y disminución del tiempo de vida [10].

Un fluoróforo es un dipolo oscilante que oscila a una alta frecuencia e irradia longitudes de onda cortas [10]. Superficies metálicas cercanas pueden responder a este dipolo oscilante y modificar la velocidad de emisión y la distribución espacial de la energía

irradiada. El campo eléctrico que siente el fluoróforo será afectado por las interacciones de la luz incidente con las superficies metálicas cercanas y también por las interacciones entre el dipolo oscilante del fluoróforo y las superficies metálicas [10]. Adicionalmente, el dipolo oscilante del fluoróforo induce un campo en el metal [10]. Estas interacciones pueden aumentar o disminuir el campo incidente en el fluoróforo y la velocidad de decaimiento radiante.

Parece inusual usar superficies metálicas para mejorar la fluorescencia ya que se conoce que los metales generan *quenching*. Pero sabemos que hay mecanismos con los cuales los metales pueden mejorar la fluorescencia. Las partículas metálicas pueden aumentar la velocidad de excitación debido a que poseen un campo eléctrico más concentrado alrededor [10]. Los metales también aumentan la velocidad de decaimiento radiante (Γ) [10]. Consideraremos esto una verdad ya que la física del porqué ocurre es compleja y no está muy claro quien emite la radiación, si el fluoróforo o el metal.

En la ausencia de metales el rendimiento cuántico y el tiempo de vida están dados por $Q_0 = \frac{\Gamma}{\Gamma+k_{nr}}$ y $\tau_0 = \frac{1}{\Gamma+k_{nr}}$ respectivamente [10]. Ya que la velocidad de decaimiento radiante es prácticamente constante para cualquier fluoróforo, el rendimiento cuántico solo aumentara si se disminuye el valor de k_{nr} .

Ahora consideremos el efecto del metal. Si el metal aumenta la velocidad de excitación ($E + E_m$) esto generara un aumento en el brillo de la fluorescencia sin cambiar el rendimiento cuántico o el tiempo de vida. Esto es un efecto muy útil ya que permite usar menores intensidades para la radiación incidente y genera menos ruido de fondo. La mejora que dan los metales a la excitación también puede generar una excitación selectiva de solo los fluoróforos que estén cerca del metal. Otro efecto es el aumento de la velocidad de decaimiento radiante. En este caso el rendimiento cuántico aumentara y el tiempo de vida vienen dados por:

$$Q_m = \frac{\Gamma + \Gamma_m}{\Gamma + \Gamma_m + k_{nr}}$$

$$\tau_m = \frac{1}{\Gamma + \Gamma_m + k_{nr}}$$

Ecuación 5. Rendimiento cuántico y tiempo de vida de fluoróforos en presencia de metales

siendo Γ la velocidad de decaimiento radiante en ausencia del metal y Γ_m la misma, pero en presencia del metal [10]. Estas ecuaciones dan predicciones inusuales cuando el fluoróforo este cerca de las superficies metálicas. Al aumentar Γ_m , aumenta el rendimiento cuántico y disminuye el tiempo de vida. El aumento del rendimiento cuántico se da debido a que los fluoróforos emiten antes de poder decaer por medios no radiantes. Este efecto es mayor en fluoróforos con bajo rendimiento cuántico. La disminución del tiempo de vida generalmente se asocia con una disminución en el rendimiento cuántico. Sin embargo, esto es debido a que generalmente una disminución del tiempo de vida se da por un aumento de k_{nr} [10].

En sistemas térmicos similares al de lente térmica, el rendimiento cuántico se escribe como:

$$Q = \frac{P_f}{AP_0} \times \frac{\lambda_f}{\lambda}$$

Ecuación 6. Rendimiento cuántico en sistemas similares al de lente térmica.

Donde P_f es la energía de la emisión lumínica, P_0 es la energía del haz de excitación, A es la absorbancia, λ_f la longitud de onda del máximo de fluorescencia y λ la longitud de onda de excitación [14, 15].

2.3.8-Teoría de la interacción fluoróforo-coloide

Una explicación completa de la interacción fluoróforo-coloide necesitaría un extenso conocimiento de las teorías electrodinámicas y probablemente todavía estaría incompleta, así que solo daremos una visión general de los resultados relevantes en MEF. Generalmente se consideran solo 3 interacciones importantes de los fluoróforos con los metales. Los fluoróforos pueden sufrir *quenching* a corta distancia del metal (k_{nr}). Puede haber un aumento en la velocidad de excitación (E_m), esto se debe al efecto “lightening rod” que es como se llama al fenómeno de que en los objetos que poseen carga eléctrica, los campos eléctricos son más fuertes en sus lados más puntiagudos [10]. También puede darse un aumento en la velocidad de decaimiento radiante (Γ_m) [10]. La distancia de la interacción probablemente aumente a la par que el *quenching*, el aumento de la excitación y el aumento de la velocidad radiante. Sin embargo, no se llega a una conclusión definitiva sobre la dependencia de la distancia en estas interacciones.

Las interacciones entre los fluoróforos y los coloides metálicos se han estudiado mucho teóricamente. Para un modelo típico de un esferoide alargado con radios a y b (siendo a mayor que b) se asume que la partícula es un elipsoide metálico con un fluoróforo cercano a ella. El fluoróforo se coloca a una distancia d de la superficie de la partícula. Colocaremos al fluoróforo en un eje imaginario, el cual corta al elipsoide pasando por el mayor de los radios, y en este eje puede estar paralelo o perpendicular a la superficie metálica [10]. Esta teoría se puede usar para calcular el efecto de una partícula metálica en un fluoróforo cercano.

La ilustración 6 muestra las velocidades radiantes esperadas para un fluoróforo a varias distancias de la superficie de una partícula de plata y para diferentes orientaciones del momento de transición del fluoróforo. Vemos que en la partícula donde $a/b=1,75$ hay una excelente velocidad. En este caso la velocidad radiante se mejora en un factor de 1000 o más. El efecto es mucho menor en las partículas donde $a=b$ y $a/b=3$. Para esta última la transición óptica no está en resonancia con el fluoróforo. En este caso la

velocidad de decaimiento radiante disminuye en un factor de 100. Si el fluoróforo muestra un alto rendimiento cuántico o un bajo valor de k_{nr} , este efecto podría dar mayores tiempos de vida. La magnitud de estos efectos depende de la posición del fluoróforo con respecto a la partícula y la orientación del su momento dipolar relativo a la superficie de la partícula [10].

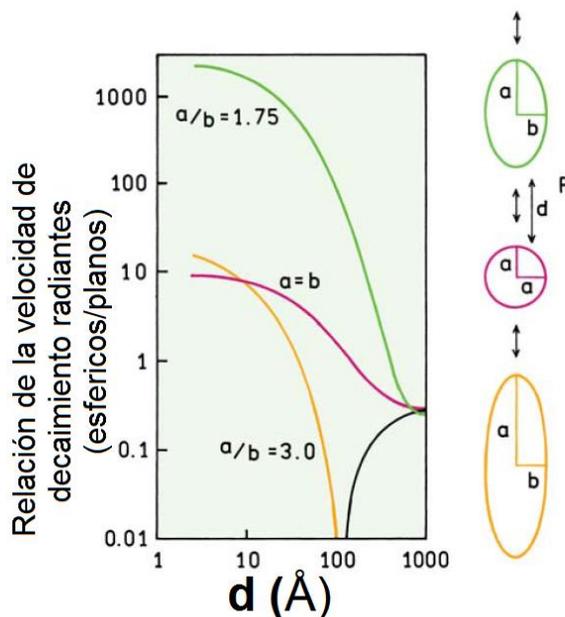


Ilustración 6. Relación de la velocidad de decaimientos radiantes con respecto a la distancia de separación entre el fluoróforo y la NP.^v

2.3.9-Rodaminas

Las rodaminas son colorantes básicos que pertenecen a la clase del xanteno, junto a las fluoresceínas y eosinas. No solo se usan como colorantes sino también como medio

^vTomado y Traducido de “Principles of Fluorescence Spectroscopy”. J. Lakowicz, 3th ed., New York: Springer, 2011. p 847

activo de los láseres de colorante. El rango de color de las rodaminas va desde un rojo amarillento hasta el azul. Una de las rodaminas básicas más usadas es la rodamina B (RB). Esta posee un máximo de absorción en 542 nm y un máximo de emisión en 564 nm [16].

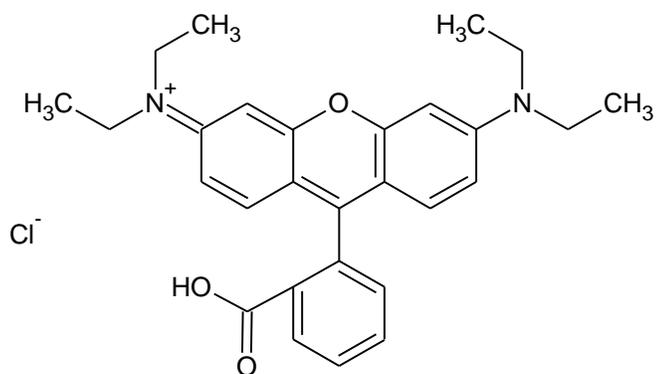


Ilustración 7. Estructura de la RB.

El interés particular de esta investigación fue estudiar el rendimiento cuántico de la Rodamina B, en presencia de nanopartículas de plata, usando la espectroscopia de lente térmica. Se han reportado los beneficios de la lente térmica para este tipo de estudios debido a que podemos medir valores absolutos de rendimiento cuántico [14, 15, 17].

3-Antecedentes

En estudios similares en rodaminas se han encontrado como variables de investigación el solvente de la muestra [14, 19], la concentración del fluoróforo [14, 20, 19], la energía del haz de excitación [21, 22, 19, 14], el tamaño de las nanopartículas [23, 24] y el arreglo óptico del sistema [8]. También se refieren varias limitaciones del uso de esta técnica para medir rendimiento cuántico, especialmente en fluoróforos con alto rendimiento como los colorantes [25].

Chartier *et al*, encontraron variaciones de la señal de lente térmica de la Fluoresceína por el pH de la solución [22], pero esta molécula posee diferencias notables con la R6G y en este estudio no se midió el rendimiento cuántico de la fluorescencia para la Fluoresceína. El pH de la solución a estudiar no es objetivo de este estudio.

3.1-Limitaciones

En las investigaciones desarrolladas por Chartier *et al* se encontró que para que la medición del rendimiento cuántico del fluoróforo por lente térmica sea válido, se necesita que, para cualquier solvente dado y para la misma cantidad de energía térmica, la intensidad de la señal de lente térmica sea la misma para cualquier soluto [25], esto requiere considerar todos los posibles procesos fotofísicos asociados a la relajación del fluoróforo [14].

3.2-Solvente

Los trabajos de Bindhu *et al* y Magde y col demostraron que el solvente de la muestra afectará cuál es la longitud de onda del máximo de la fluorescencia, el rendimiento cuántico, la intensidad y el tiempo de vida de esta fluorescencia [14, 26, 19]. Por otra parte, Imasaka concluye que también afectará la intensidad de la señal de lente térmica [3]. La Tabla 1 muestra valores interesantes para la lente térmica de solventes comunes:

Solvente	Factor de Mejora (E)	Conductividad Térmica (k)(10 ⁻⁴ cal/s.cm.°C)	Variación del índice de refracción con la temperatura (dn/dT)(10 ⁻⁴ °C)	Constante dieléctrica
Heptano	6300	3	5	1,92
Ciclohexano	6920	2,95	5,4	2,02
Etanol	3680	4	3,9	24,3
Tolueno	6650	3,18	5,6	2,4
Nitrobenceno	4830	3,6	4,6	34,82
Cloroformo	8000	2,74	5,8	4,81
Tetracloruro de Carbono	8940	2,45	5,8	2,2
Acetona	4970	3,8	5	20,7
Agua	207	14,6	0,8	78,54

Tabla 1: Factores de mejora. Medidos a 1W de poder del haz de excitación.^{vi}

Generalmente se espera que la interacción de los fotones emitidos durante la fluorescencia con el solvente de la muestra no afecte a la señal de la lente térmica. Sin embargo, los trabajos de Bindhu *et al* demuestran que en medios fuertemente absorbentes existe un límite superior para el poder del haz de excitación, en el cual se da una señal de lente térmica “libre de ruido” si se usa un arreglo de haz doble [14, 19]. Estas investigaciones también arrojaron como resultado que el rendimiento cuántico está

^{vi}Tomado y traducido de “Thermal lens spectrophotometry” T. Imasaka y I. N, TrAC-Trends Analyt Chem, vol. I, nº 12, pp. 273-277, 1982. p 274.

influenciado por el ambiente en el que se encuentre el fluoróforo y por procesos como la conversión interna no radiante, la absorción en un estado excitado y la agregación del analito estudiado, los cuales dependen en gran medida de la fuente de excitación, características del solvente y la concentración del analito. Ambos trabajos hablan que la interacción solvente-soluto juega un rol considerable al modificar las constantes de decaimiento para estados excitados [14, 19].

3.3-Concentración del Fluoróforo

Las investigaciones de Fischer *et al* demostraron que el rendimiento cuántico y tiempo de vida de la Rodamina B (RhB) en etanol es invariante de la concentración en el rango de 10^{-6} a $1,5 \times 10^{-4}$ M [27]. Es importante señalar que el mismo trabajo indica que, a las concentraciones trabajadas, el método de lente térmica no presenta efectos internos del filtro [27] refiriéndose a cuando, a concentraciones altas de moléculas (incluyendo el fluoróforo), la intensidad de la radiación excitadora no es constante en toda la solución. Esto hace que no toda la radiación llegue a los fluoróforos que son visibles al sistema de detección. Esto cambia el espectro y la intensidad de la radiación emitida. Por otra parte, Bindhu *et al* y Shanti *et al* han encontrado que el rendimiento cuántico es inversamente proporcional a la concentración de la Rodamina 6G (R6G) y de RhB, sin importar el solvente usado, mientras se trabaje a concentraciones grandes [14, 21, 19]. Esto se conoce como *quenching* por concentración y afecta más a los fluoróforos con pequeños desplazamientos de Stokes. Los trabajos de Kumar *et al* reportan [20] que la concentración del fluoróforo es un factor en el efecto de las nanopartículas sobre el rendimiento cuántico, donde la presencia de las nanopartículas disminuye el rendimiento cuántico mientras la rodamina este en concentraciones entre 10^{-6} y 5×10^{-4} M, a partir de esta concentración la presencia de las nanopartículas genera un mayor rendimiento cuántico que en las muestras de misma concentración que no poseen nanopartículas.

3.4-Energía del Haz de Excitación

Shanti *et al* demostraron que la energía de excitación puede variar el máximo del espectro de emisión de fluorescencia (tanto en presencia como en ausencia de las nanopartículas) [21]. También que, a bajas concentraciones de la R6G (entre 10^{-6} y 10^{-5} M) se observa que, al aumentar la energía de excitación, disminuye el *quenching* que originan las nanopartículas metálicas [21]. El *quenching* prácticamente no varía con la energía de excitación a concentraciones más altas (mayores de 10^{-4} M).

Investigaciones realizadas por Bindhu *et al* señalan que a energías muy altas de excitación (mayor a 8 mJ) empiezan a aparecer procesos no lineales (como absorción del estado excitado o absorción de dos fotones), pero a menores se mantiene una dependencia lineal de la señal de lente térmica con la energía del láser [14, 19].

3.5-Tamaño de las nanopartículas

Tanto para nanopartículas de oro como para nanopartículas de plata se ha demostrado que un aumento en el tamaño de la nanopartícula genera una disminución del rendimiento cuántico de la R6G para concentraciones entre 10^{-6} M y 5×10^{-4} M. Los trabajos de Kumar *et al* [23, 24] han demostrado que esto se debe a un par de factores: Al aumentar el tamaño de la nanopartícula aumenta el ancho espectral del espectro de absorción de esta, esto genera un mayor solapamiento con el espectro de fluorescencia de la R6G, disminuyendo el rendimiento cuántico, y a su vez permite que la transferencia de energía no radiante sea mucho más eficiente entre la nanopartícula y el tinte lo cual se refleja en un aumento de la intensidad de la señal de lente térmica [24]. Adicionalmente, el aumento del tamaño de las nanopartículas genera un aumento en el área superficial de ésta lo que permite que una sola nanopartícula interactúe con más moléculas del tinte al mismo tiempo, esto también ayuda a disminuir el rendimiento cuántico [23].

3.6-Arreglo Óptico

Los grupos de Cruz y Estupiñán-López [28, 8] usaron el arreglo óptico propuesto por Marcano [29], en el cual se expande el haz de sondeo para que su cintura sea mucho mayor que la del haz de excitación, y lo implementaron para la medición de rendimiento cuántico en R6G [8].

Estupiñán-López *et al* encontraron que usando un método de lente térmica eclipsante se puede mejorar la sensibilidad de la medición del rendimiento cuántico en la R6G hasta 3 veces si se usa un sistema de haz simple y hasta 14 veces si se usa un sistema de haz doble transversal con un ángulo cercano a 3° [8]. En este trabajo la R6G no estaba en presencia de las nanopartículas, pero es de igual consideración.

3.7-Medición del Rendimiento Cuántico (Q)

La espectroscopia de lente térmica se puede usar para medir el rendimiento cuántico (Q) porque permite medir la fracción de la energía absorbida (F), por la muestra, que se convierte en calor. Generalmente se han usado dos enfoques al medir Q por lente térmica: muestra de referencia (MR) y por múltiples longitudes de onda (MLO).

Para el enfoque de muestra de referencia se deben conocer las propiedades termo-ópticas de la muestra o se debe usar como muestra de referencia el solvente de la muestra a estudiar, y a la vez este debe poseer una fluorescencia despreciable.

Para poder usar el enfoque de múltiples longitudes de onda MLO, el rendimiento cuántico de la muestra tiene que ser independiente de la longitud de onda de excitación, por lo menos en un rango conocido [28]. Lo cual es común en los fluoróforos con anchas bandas de absorción como la R6G. En este caso, como se usan las transiciones no radiantes como una referencia interna, los parámetros termo-ópticos y Q se obtienen directamente de la dependencia de la señal de lente térmica con la longitud de onda de excitación.

Cruz *et al* reportaron que para materiales fluorescentes estudiados por lente térmica podemos escribir la siguiente ecuación [28]:

$$\Theta = -\frac{\theta}{P_{abs}} = \Theta_0 \times \left(1 - Q \frac{\lambda_{ex}}{\langle \lambda_{em} \rangle}\right)$$

Ecuación 7. Cambio de fase del haz de prueba en la lente térmica, normalizado por la energía de excitación absorbida

Donde $\langle \lambda_{em} \rangle$ es el promedio de las longitudes de onda de emisión y λ_{ex} es la longitud de onda de excitación. Θ_0 (el cual es un factor que depende de las propiedades termo-ópticas de la solución) y $\langle \lambda_{em} \rangle$ vienen dados por las siguientes ecuaciones:

$$\Theta_0 = \frac{\left(\frac{dn}{dT}\right)}{k\lambda_p}$$

$$\langle \lambda_{em} \rangle = \frac{\int \lambda_{em} dN(\lambda_{em})}{\int dN(\lambda_{em})}$$

Ecuación 8. Factor de las propiedades termo-ópticas y promedio de la longitud de onda de emisión

Donde $\left(\frac{dn}{dT}\right)$ es la variación del índice de refracción con la temperatura, k es la conductividad térmica, λ_p es la longitud de onda del haz de sondeo, θ es la amplitud del desfase termal (la cual está relacionada con la señal de lente térmica de distintas formas según el arreglo óptico pero para arreglos ópticos donde la cintura del haz de sondeo es mucho mayor que el haz de excitación se relaciona como $S_p = \frac{(I_\infty - I_0)}{I_0} = -\left(\frac{\pi}{2}\right) \times \theta$) [29], $dN(\lambda_{em})$ es el número de fotones emitidos por segundo en una longitud de onda que va en aumento, centrada en λ_{em} y, por último, P_{abs} es la energía del haz de excitación que fue absorbida, dada por $P_{abs} = P_{ex}(1 - e^{-\alpha L})$ donde α es el coeficiente lineal de absorción

óptica a la longitud de onda de excitación (λ_{ex}) y L es el camino óptico recorrido (el grosor de la muestra).

En muchos casos el espectro de emisión no cambia durante cierto rango de longitud de onda de excitación, entonces $\langle \lambda_{em} \rangle$ es constante y podemos obtener Q y θ_0 de la dependencia lineal entre θ y λ_{ex} . Este es el método MOL.

Por otra parte, Hung *et al* consideran que la absorción de la energía de excitación por parte de la muestra genera en ésta sólo dos tipos de efectos: fluorescencia y calentamiento térmico [30]. Debido a esto se consideran despreciables las pérdidas por reflexión, dispersión y cualquier posible reacción fotoquímica. Usando el principio de conservación de la energía podemos escribir:

$$P_0 = P_T + P_F + P_{Th}$$

Ecuación 9. Conservación de la energía en una muestra fluorescente

Donde P_0 es la energía de excitación incidente, P_T es la energía transmitida, P_F es la energía emitida por la fluorescencia y P_{Th} es la energía degradada en forma de calor. Esta última la podemos relacionar directamente con la señal de lente térmica (S) mediante una constante que llamamos G.

$$S = GP_{Th}$$

Ecuación 10. Relación de la señal de lente térmica con la energía degradada en forma de calor por parte de la muestra

G es un parámetro de proporcionalidad que tiene un factor dependiente del montaje de lente térmica y un factor dependiente de las propiedades termo-ópticas de la muestra.

El rendimiento cuántico (Q) se determina con la siguiente ecuación:

$$Q = \frac{\langle \lambda_{em} \rangle}{\lambda_e} x \left(1 - \frac{P_{Th}}{P_0 - P_T} \right)$$

Ecuación 11. Rendimiento cuántico medido vía lente térmica

3.8-Rendimiento cuántico

Weber y Teale reportan que para la RhB en etanol Q tiene un valor de 0,97 para una longitud de onda de excitación de 535 nm [31]. Alentsev también reporta que la RhB posee un rendimiento cuántico prácticamente igual a 1 para soluciones en etanol y energías de excitación de 532 nm [32]. Ambas medidas fueron hechas usando métodos calorimétricos distintos.

Bindhu *et al* reportan un valor de 0,84 para la RhB en metanol con una excitación de 514 nm. Esta medida fue realizada usando un sistema de lente térmica mode-matched [17].

Nombramos principalmente los métodos calorimétricos debido a que son los más similares a nuestro experimento ya que para la RhB en etanol hay distintos valores de Q reportados que van desde 0,43 hasta 1 [33, 34, 35] [referencia]. López-Arbeloa *et al* creen que estas diferencias son en parte a las variaciones del grupo COOH de la RhB [36], donde pequeñas variaciones en el pH de la solución o en la cantidad de agua presente pueden hacer que este grupo se desprotone o se esterifique a COOC₂H₅, donde la forma desprotonada tiene un valor de Q de 0,7 y la forma esterificada un valor de 0,44.

Como se mencionó anteriormente Kumar *et al* han reportado distintos efectos en R6G por parte de nanopartículas de metales nobles [20, 24, 23] encontrando que la presencia de las nanopartículas de oro o plata disminuye entre 10% y 80% el rendimiento cuántico dependiendo del tamaño de las nanopartículas, el metal y la concentración de la R6G.

4-Objetivos

Objetivo principal:

Estudiar de los rendimientos cuánticos de fluorescencia para sistemas fluoróforo – nanopartículas.

Objetivos específicos

1. Generar de las nanopartículas metálicas por ablación láser.
2. Estudiar la absorción de los fluoróforos en los sistemas de nanopartículas
3. Estudiar los espectros de absorción de los sistemas de nanopartículas y fluoróforo- nanopartícula.
4. Estudiar los espectros de fluorescencia de los sistemas antes mencionados.
5. Estudiar la señal de lentes térmicas de los sistemas antes mencionados.

5-Sección Experimental

5.1-Reactivos

Se trabajó con Rodamina B (RhB) como fluoróforo a estudiar, usando como solvente etanol y plata como material precursor para la creación de nanopartículas metálicas.

5.2-Metodología

5.2.1-Preparación de Muestras

Se generó una solución madre de nanopartículas plata mediante ablación láser con un Nd: YAG. Para generar las nanopartículas se colocó una placa de plata en un beaker que contenía 50 mL de etanol, luego se le hizo incidir el láser a la placa metálica por un intervalo de 50 min. Esta solución madre se nombró SM1.

Por otra parte, se hizo una solución madre de RhB en etanol con una concentración final de 10,17 microM. Esta solución madre se nombró SM2.

Se combinaron distintas fracciones de SM1 y de SM2 a distintas concentraciones y se obtuvieron 10mL de las siguientes mezclas:

1,02 microM RhB (A)	A con 1 mL de SM1	A con 2 mL de SM1	A con 4 mL de SM1
3,05 microM RhB (B)	B con 1 mL de SM1	B con 2 mL de SM1	B con 4 mL de SM1
5,09 microM RhB (C)	C con 1 mL de SM1	C con 2 mL de SM1	C con 4 mL de SM1
8,14 microM RhB (D)	D con 1 mL de SM1	D con 2 mL de SM1	D con 4 mL de SM1

Tabla 2. Soluciones muestra

Estas nuevas soluciones RhB-AgNps serán las muestras para el estudio. Fueron etiquetadas con números para facilitar su estudio:

	RhB (microM)				
Ag Nps (mL)	0	1	3	5	8
0	0	1	2	3	4
1	5	6	7	8	9
2	10	11	12	13	14
4	15	16	17	18	x

Tabla 3. Numeración de soluciones muestra

5.2.2-Medición del Espectro de Absorbancia, Espectro de Fluorescencia y Señal de Lente Térmica

Para la medición de los espectros de absorbancia se usó el espectrofotómetro y fuente de luz blanca de la empresa Ocean Optics USB 2000, con su programa de característico.

La señal de lente térmica y el espectro de fluorescencia de cada muestra se midieron al mismo tiempo usando el montaje que se presenta en la figura 8. La fuente de excitación fue el segundo armónico de un láser Nd:YAG (532 nm) pulsado a 10 Hz y el haz de prueba fue un láser He-Ne (632 nm).

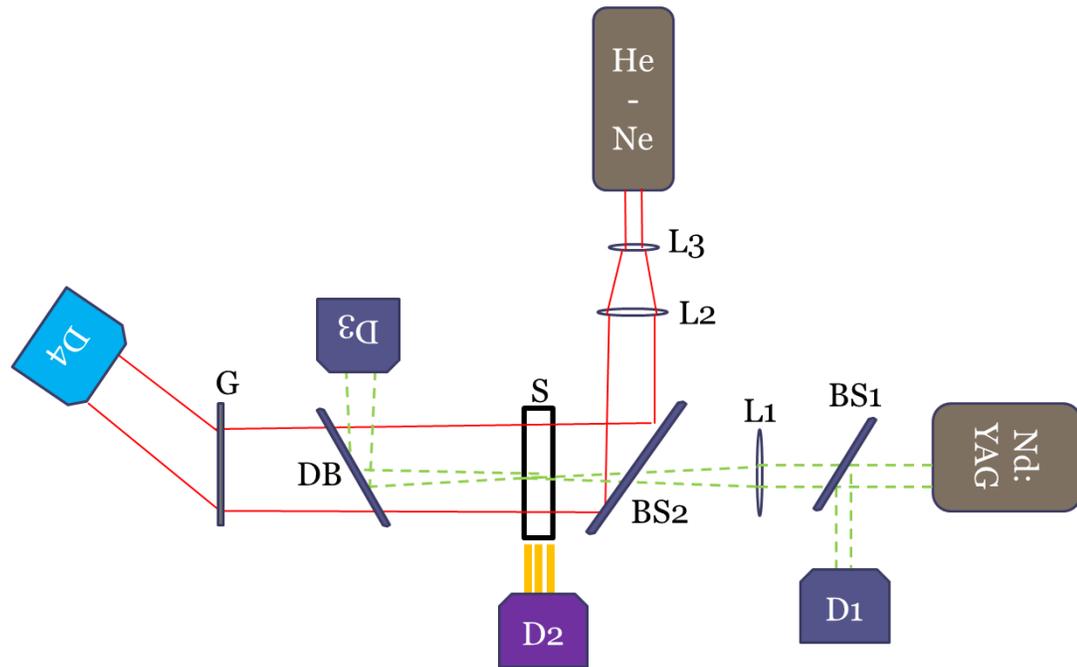


Ilustración 8 Arreglo coaxial de lente térmica usado para la medición simultánea de lente térmica y fluorescencia.

En la ilustración 8 las líneas rojas representan el haz de prueba He-Ne, las líneas punteadas verdes el haz de excitación Nd:YAG, L1 la lente de enfoque del haz de excitación, L2 y L3 las lentes colimadoras del haz de prueba, BS1 y BS2 los separadores de haces, DB el espejo dichroico a 532 nm, D1 y D3 los detectores de referencia, S la muestra, G la red de difracción, D2 el detector de espectro de fluorescencia y D4 el detector de señal de lente térmica.

Los detectores D1 y D3 permitían determinar la transmitancia de la muestra usando una curva de calibración que se realizaba a distintas energías.

Este esquema experimental está basado en el arreglo optimizado de modo desacoplado o mode-mismatched de Marcano *et al* [29]. Se escogió este montaje por la alta sensibilidad ya que las configuraciones acopladas o mode-matched, ignoran el hecho

de, por la difusión térmica, la lente térmica generada se expande a un volumen muchas veces mayor que el volumen de interacción definido por el haz de excitación.

5.2.3-Determinación del Rendimiento Cuántico (Q)

Para determinar el rendimiento cuántico se usó el método reportado por Hung *et al* [29] previamente descrito.

Debido a la baja concentración de las soluciones SM1 y SM2 asumiremos que el parámetro G es relativamente constante para todas las soluciones. El factor del montaje no varió ya que el diseño del montaje se mantuvo constante, por lo que se considera que las propiedades termo-ópticas de las muestras no varían considerablemente entre las muestras.

Se conoce que el valor de rendimiento cuántico esperado para las soluciones de 1 a 4 es de 0,9 [31] por lo que se usa este valor y las señales de lente térmica medidas en esta investigación para determinar un valor promedio de G para nuestro sistema. Una vez conocido este valor promedio de G se procedió a determinar el rendimiento cuántico de todas las muestras.

El valor de transmitancia de las soluciones que no poseían RhB (5, 10 y 15) se usó para ajustar la pérdida por dispersión que daban las AgNps.

5.3-Resultados y Discusiones

5.3.1-Lente Térmica

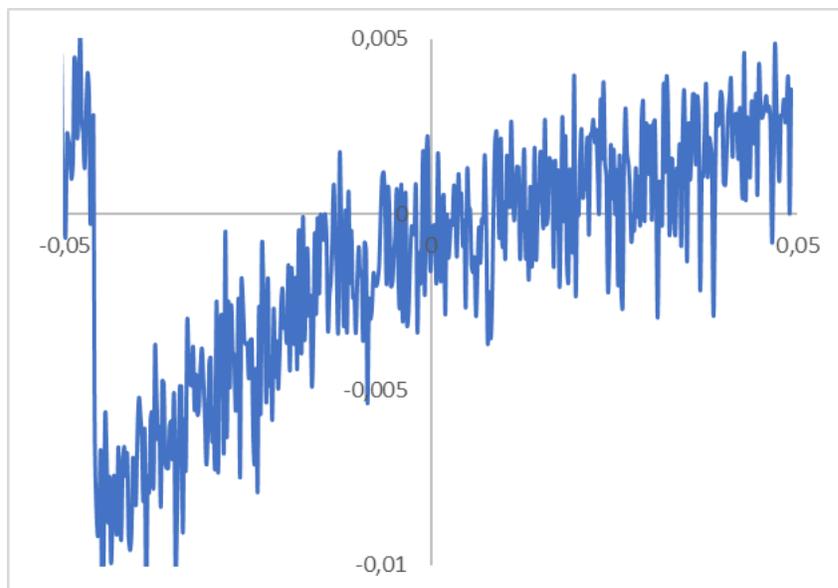


Ilustración 9. Figura típica de amplitud de lente térmica

Amplitud de Lente Térmica (mV)				
	Ag Nps (mL)			
RhB (microM)	0	1	2	4
1	1,927 ± 0,152	1,907 ± 0,31	1,886 ± 0,575	2,39 ± 0,133
3	2,427 ± 0,124	2,752 ± 0,268	2,433 ± 0,261	2,867 ± 0,146
5	3,017 ± 0,167	3,192 ± 0,219	3,352 ± 0,139	3,365 ± 0,231

8	3,892 ± 0,246	4,129 ± 0,211	3,838 ± 0,071	
----------	---------------	---------------	---------------	--

Tabla 4. Señales amplitud de lente térmica para soluciones muestra

No se observa un patrón en las amplitudes de lente térmica, pero esto se debe a las fluctuaciones de la energía de excitación ya que al analizar la amplitud dividida entre P_o se pudo observar fácilmente un patrón:

Amplitud de Lente Térmica/P_o ($\times 10^{-3}$)				
	Ag Nps (mL)			
RhB (microM)	0	1	2	4
1	8,398 ± 0,288	8,795 ± 1,208	9,014 ± 2,734	10,392 ± 0,479
3	10,485 ± 0,378	11,133 ± 1,024	11,548 ± 1,203	12,316 ± 0,539
5	11,599 ± 0,448	13,536 ± 0,145	14,048 ± 0,477	14,721 ± 0,702
8	16,802 ± 0,713	17,567 ± 0,178	18,132 ± 0,27	

Tabla 5. Señales de amplitud de lente térmica normalizadas por la energía de excitación para las soluciones muestra

Ahora es posible observar que la amplitud de lente térmica no solo crece con la concentración de RhB sino también con la concentración de AgNps. Esto se debe a que hay más moléculas presentes (tanto de RhB como de AgNps) que ayudan a transferir el calor al solvente en menor tiempo. Aunque las AgNps no absorban en la longitud de onda de excitación, existe una transferencia de calor entre las moléculas de RhB y estas, las

cuales a su vez transfieren el calor al solvente. Las figuras 10 y 11 muestran estas tendencias. Las señales de amplitud de lente térmica de las soluciones 0, 5, 10 y 15 eran muy pequeñas como para registrarlas con el equipo.

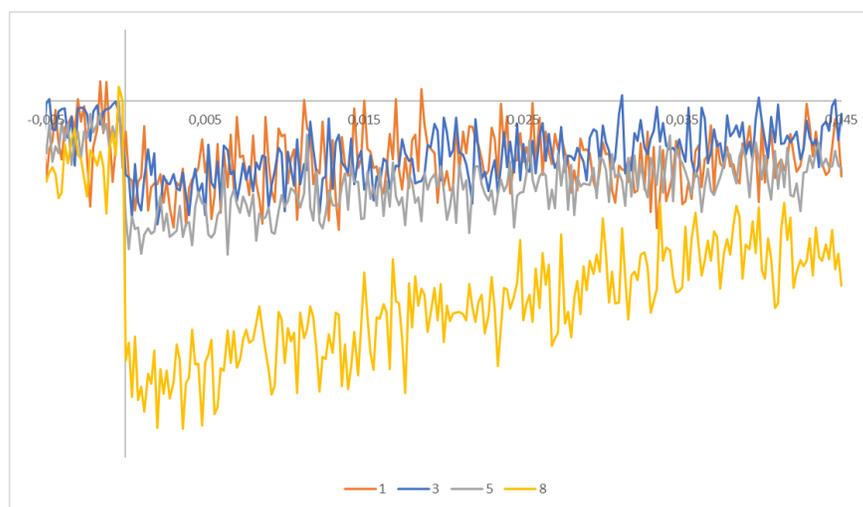


Ilustración 10. Amplitud de lente térmica variando la concentración de RhB y manteniendo constante la concentración de AgNps

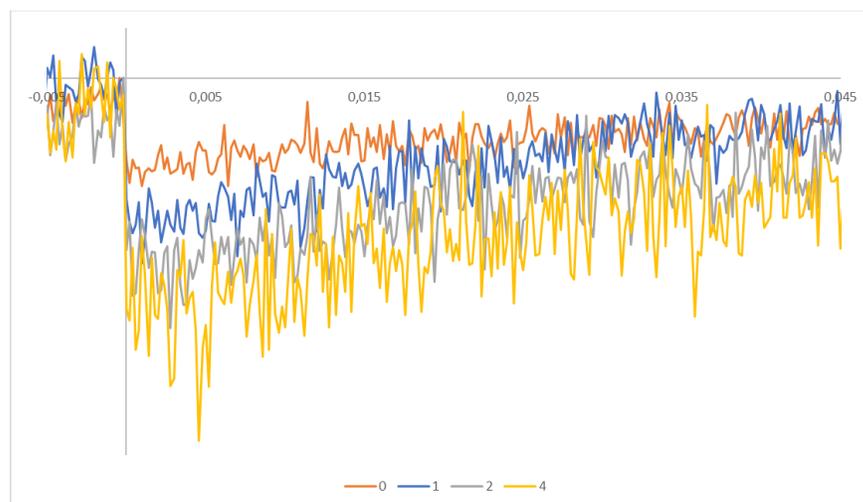


Ilustración 11. Amplitud de lente térmica variando la concentración de AgNps y manteniendo constante la concentración de RhB

5.3.2-Absorbancia

Al comparar los espectros de absorbancia no se observaron cambios dependientes de la concentración de AgNps, pero sí cambios dependientes de la concentración de RhB. Al aumentar la concentración el máximo de absorbancia se desplaza a menores longitudes de onda, cerca de 2 nm absorbancia por cada 2 microM que aumenta la concentración, en total variando cerca de 7 nm entre 1 microM y 8 micro M. La presencia de AgNps sólo parece agregar su propia banda de absorción característica en 400 nm a los espectros ya que el máximo de absorbancia prácticamente no varía entre las muestras con la misma concentración de RhB, pero distintas concentraciones de AgNps. Las figuras 12 y 13 muestran estas tendencias. Los espectros se registraron como el promedio de 3 espectros, lo cual fue realizado por el programa SpectraSuite y el promedio de absorbancia fue calculado usando la ecuación 8.

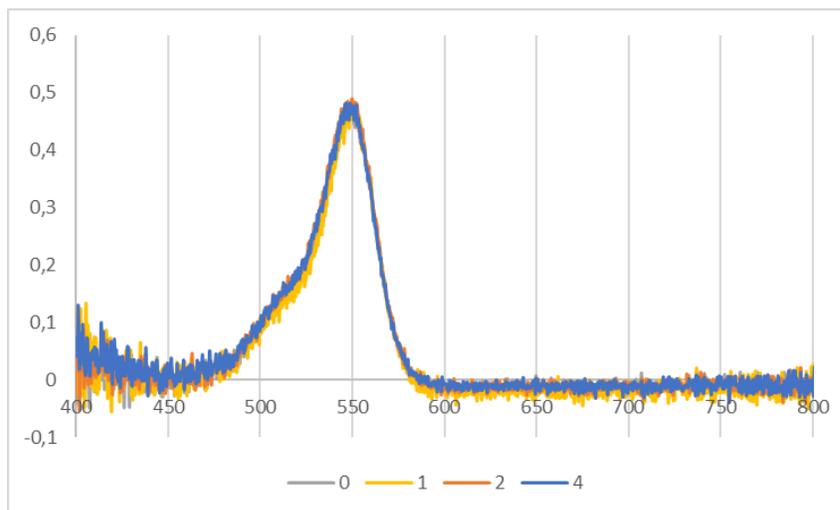


Ilustración 12 Espectros de absorbancia variando la concentración de AgNps y manteniendo constante la concentración de RhB.

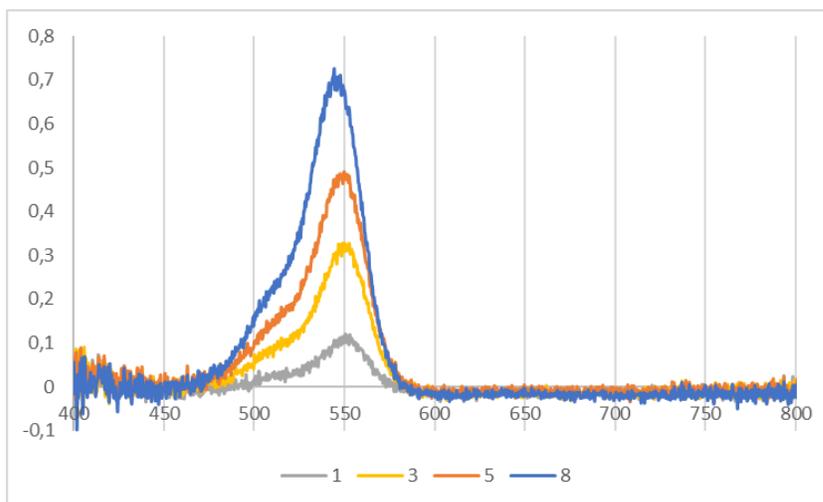


Ilustración 13. Espectros de absorción variando la concentración de RhB y manteniendo constante la concentración de AgNps.

Al calcular el promedio de longitud de onda de absorción usando la ecuación 8 podemos ver que la tendencia es a disminuir el promedio de longitud de onda de absorción al crecer tanto la concentración de RhB como de AgNps, aunque visualmente no pareciera disminuir la longitud de onda con el cambio en concentración de AgNps.

Promedio de Longitud de Onda de Absorbancia (nm)				
	Ag Nps (mL)			
RhB (microM)	0	1	2	4
1	537,50	537,31	538,07	535,40
3	537,97	535,00	534,19	531,91
5	536,03	535,73	535,23	534,72
8	533,21	533,37	533,81	

Tabla 6. Promedio de Longitud de Onda de Absorbancia (nm)

5.3.3-Fluorescencia

Al comparar los espectros de fluorescencia pareciera ocurrir un desplazamiento a mayores longitudes de onda al aumentar la concentración de RhB. Este resultado se esperaba debido a la “regla del espejo” entre los espectros de absorbancia y fluorescencia. Este desplazamiento concuerda con lo reportado en los estudios de RhB y R6G usando lente térmica realizados por Bindhu que lo adjudican a reabsorciones y reemisiones de fluorescencia [14, 17]. De igual forma pareciera que la presencia de las AgNps tiene el mismo efecto en los espectros de fluorescencia, aparte de disminuir la intensidad de estos al dispersar la emisión también el máximo de emisión se desplaza a menores longitudes de onda. Las figuras 14 y 15 muestran estas tendencias. Los espectros se registraron como el promedio de 3 espectros, lo cual fue realizado por el programa SpectraSuite y el promedio de emisión fue calculado usando la ecuación 8.

Promedio de Longitud de Onda de Emisión de Fluorescencia (nm)				
	Ag Nps (mL)			
RhB (microM)	0	1	2	4
1	579,98	577,89	574,31	575,62
3	580,97	578,66	575,64	577,49
5	581,65	579,22	578,45	580,77
8	584,33	579,68	580,77	

Tabla 7. Promedio de Longitud de Onda de Emisión de Fluorescencia

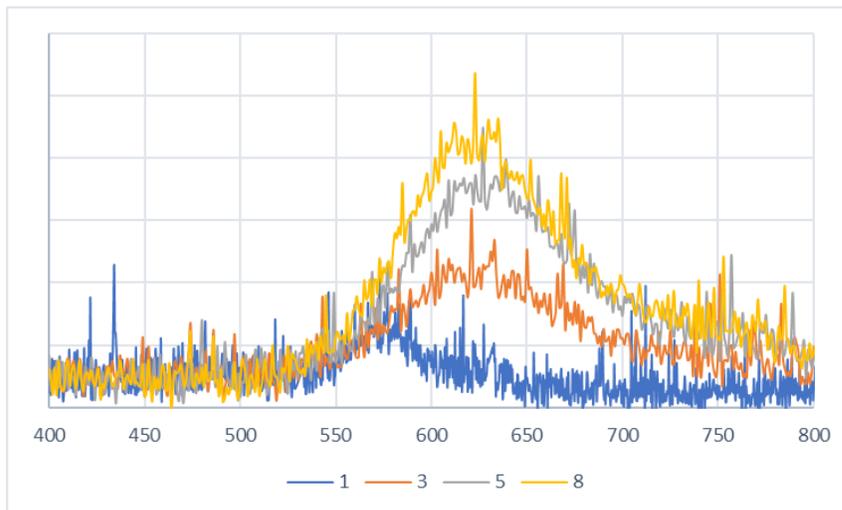


Ilustración 14. Espectros de fluorescencia variando la concentración de RhB y manteniendo constante la concentración de AgNps.

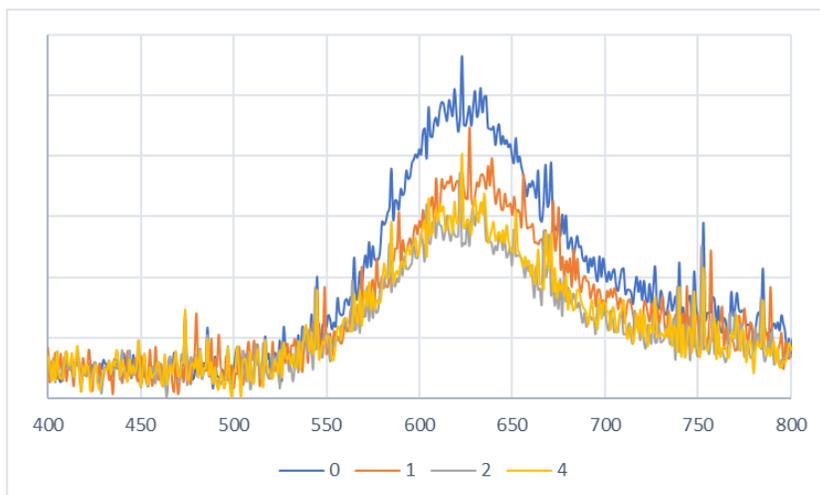


Ilustración 15. Espectros de fluorescencia variando la concentración de AgNps y manteniendo constante la concentración de RhB.

Es necesario destacar el hecho de que la banda de absorción de las AgNps no solapa ni coincide con las bandas de absorción ni de fluorescencia de la RhB, así que se descartó una “competencia” en cuanto a la absorción y también la presencia de un efecto de transferencia de energía de resonancia.

También se sabe que, para la RhB en este montaje, la absorción del estado triplete puede ser despreciada, lo cual se puede cuando el ancho de pulso es mucho menor que $1/k_{st}$ donde k_{st} es la velocidad de cruce entre sistemas $S1 \rightarrow T1$. Para este montaje el ancho de pulso es aproximadamente 9 ns y k_{st} para la RhB es $1,4 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ [36].

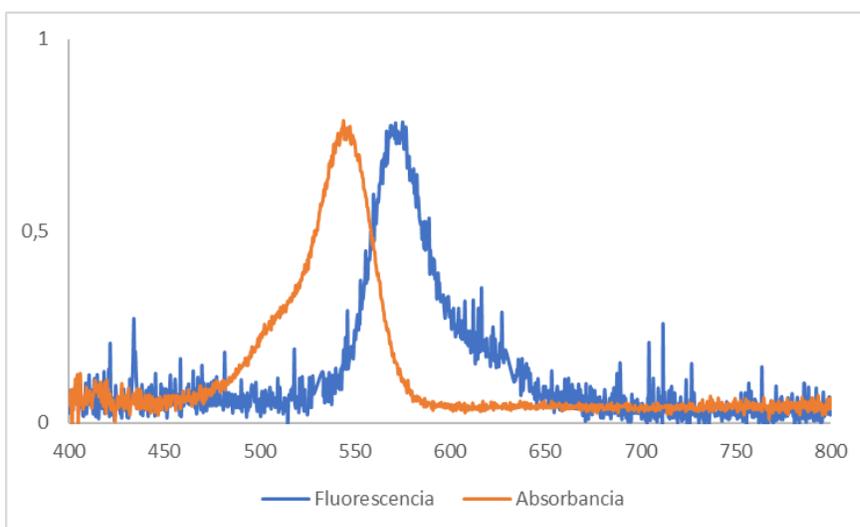


Ilustración 16. Espectros normalizados de fluorescencia y absorbancia

En la Ilustración 16 se observa que la forma del espectro de fluorescencia es muy similar a la imagen especular del espectro de absorbancia.

5.3.4-Rendimiento cuántico

Rendimiento Cuántico				
	Ag Nps (mL)			
RhB (microM)	0	1	2	4

1	0,8334 ± 0,0047	0,8139 ± 0,0878	0,6681 ± 0,1615	0,5238 ± 0,0351
3	0,8868 ± 0,0079	0,8337 ± 0,0057	0,7138 ± 0,0819	0,5716 ± 0,0272
5	0,9137 ± 0,0099	0,8513 ± 0,0280	0,751 ± 0,0128	0,6481 ± 0,0153
8	0,969 ± 0,0058	0,9308 ± 0,0107	0,846 ± 0,0085	X

Tabla 8. Rendimiento cuántico de fluorescencia para soluciones muestra

Se observó que el rendimiento cuántico es directamente proporcional a la concentración de RhB e inversamente proporcional a la concentración de AgNps. Esta disminución en el rendimiento cuántico se debe a que las AgNps aumentan la velocidad de decaimiento no radiante de la RhB.

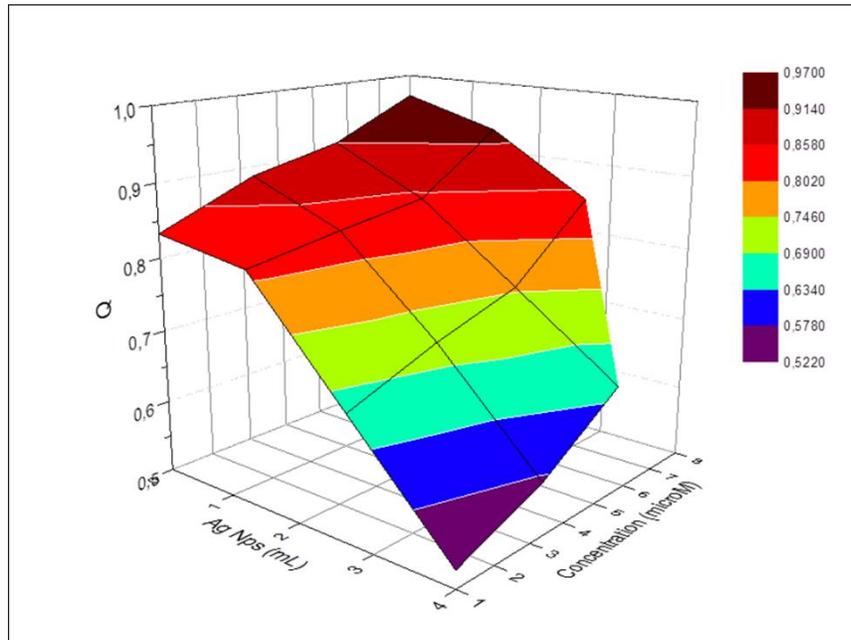


Ilustración 14. Superficie de respuesta del Rendimiento Cuántico de fluorescencia de las soluciones muestra con respecto a la concentración de la RhB y las AgNps

5.3.5-Difusividad Térmica

Para confirmar que el efecto de las AgNps sobre la RhB era un efecto térmico, se determinó la difusividad térmica de las muestras. Esto se hizo ajustando las señales de lente térmica al modelo teórico encontrado en la bibliografía:

$$S^P(z, t) = \frac{4\Phi_0^P m(z)v(z)}{\left[\left\{ \left[1 + \frac{2t}{t_c(z)} + 2m(z) \right]^2 + v(z)^2 \left[1 + \frac{2t}{t_c(z)} \right]^2 \right\} \left(1 + \frac{z^2}{z_e^2} \right) \right]}$$

Ecuación 12. Señal de lente térmica en el régimen pulsado

Donde $S^P(z, t)$ es la señal de lente térmica en el régimen pulsado la cual depende de z y t los cuales son la posición de la muestra y el tiempo respectivamente, Φ_0^P es la amplitud del cambio inducido térmicamente en la fase del haz de prueba en el régimen

pulsado, $m(z)$ es el parámetro que representa el acoplamiento de los dos haces, $v(z)$ es el parámetro que representa la relación entre las características del haz de prueba y la posición del detector, z_e es el parámetro de Rayleigh del haz de prueba, $t_c(z)$ es la constante de tiempo térmico, es decir la representación del tiempo que tarda en generarse la lente térmica, el cual es igual a $t_c(z) = \frac{\omega_e^2(z)}{4D}$ donde $\omega_e(z)$ es radio del haz de excitación y D es la difusividad térmica.

Las señales de lente térmica más pequeñas (para las soluciones de 1 y 3 microM) nunca llegaron a converger, pero las señales mayores (5 y 8 microM) sí lograron converger y todas con R^2 mayores de 0,5, obteniendo así los siguientes resultados:

Difusividad Térmica ($\times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$)		
RhB/AgNps	5	8
0	0,553 \pm 0,014	1,353 \pm 0,034
1	0,537 \pm 0,011	0,722 \pm 0,009
2	0,527 \pm 0,014	0,391 \pm 0,005
4	0,492 \pm 0,019	X

Tabla 9. Difusividad térmica para soluciones muestra con concentraciones de RhB de 5 y 8 microM

Se observó que la difusividad térmica es directamente proporcional a la concentración de RhB e inversamente proporcional a la concentración de AgNps, lo cual demuestra que el efecto de las AgNps en la fluorescencia es un efecto de decaimiento no radiante debido a que la difusividad térmica sigue el mismo comportamiento que el rendimiento cuántico.

Aunque no se lograron conseguir valores reportados de difusividad térmica para RhB en etanol a estas concentraciones, estos valores son muy cercanos a valores reportados para R6G en etanol en presencia de nanopartículas de plata [37].

Si bien las señales de lente térmica generalmente crecen al crecer la difusividad térmica, aquí se encuentra el caso opuesto. Las señales de lente térmica y la difusividad térmica son directamente proporcionales a la concentración de RhB, pero poseen comportamientos opuestos con respecto a la concentración de AgNps, donde crece la señal de lente térmica al aumentar la concentración de AgNps, pero la difusividad térmica disminuye al aumentar esta concentración.

Nampoori *et al* consideran que esto se debe a que el calor emitido por las moléculas de RhB se deposita en las AgNps en vez de difundirse a través de las moléculas del solvente, lo cual resulta en una menor velocidad de transferencia de calor total en la muestra, es decir una menor difusividad térmica. También consideran la posibilidad de la fotocoagulación de las AgNps, debida a la alta energía de excitación, resultando en un movimiento más lento de las AgNps lo que lleva a una menor velocidad de difusión del calor.

Seok *et al* reportan cuatro vías de transferencia de calor normalmente consideradas para nanofluidos metálicos [38]: (1) La colisión entre las moléculas del solvente, lo que físicamente representaría la conductividad térmica del solvente. (2) La difusión térmica en nanopartículas presentes en el fluido, la cual está relacionada a la conductividad térmica de las nanopartículas y la velocidad media de los electrones o fonones. (3) La colisión entre las nanopartículas debido a movimientos brownianos, el cual es un proceso bastante lento y también produce efectos similares a la convención, pero a escala nanométrica. (4) El último son las interacciones térmicas de las nanopartículas con las moléculas del solvente.

De las cuatro vías de transferencia de calor consideradas, el movimiento browniano es el más lento. Ya que agregar las AgNps a la RhB disminuye la difusividad

térmica, el movimiento Browniano puede considerarse como el principal proceso de enfriamiento, y en ese caso, la fotocoagulación resulta en una disminución de colisión de partículas y una menor velocidad de transferencia de calor.

Recapitulando, las moléculas de RhB absorben la energía de excitación y la liberan en forma de calor a las AgNps, ya que la presencia de las partículas hace que éste proceso sea energéticamente favorable, aumentando así la velocidad de decaimiento no radiante lo cual a su vez disminuye el rendimiento cuántico. Este proceso ocurre si las AgNps están en cercanía de las moléculas de RhB, pero es aún más probable si las AgNps están formando agregados con las moléculas de RhB.

Por nuestros resultados vemos que al aumentar la cantidad de AgNps en el medio no sólo aumenta la velocidad de decaimiento no radiante (disminución del rendimiento cuántico) sino también aumenta la cantidad de calor total depositado en las AgNps (disminución de la difusividad térmica).

También podemos considerar que al aumentar la cantidad de AgNps crece la probabilidad de formación del agregado, ya que estas tienden a agregarse en etanol. Al crecer la cantidad presente de estos agregados, o su tamaño, las AgNps se desplazan más lentamente por el medio lo que a su vez lleva a una menor velocidad de difusión del calor.

Podemos ver a los agregados como focos de calor que mantienen contenido una parte del calor emitido por las moléculas de RhB, en vez de liberarlo al medio. La cantidad de estos focos aumenta al aumentar la concentración de las AgNps y al haber más puntos levemente disipando calor, aun cuando hay una menor difusión del calor por todo el medio, aumenta la intensidad de la señal de lente térmica. Esto puede interpretarse como una lente térmica volumétricamente más pequeña pero más divergente.

6-Conclusiones

El control de las propiedades de la fluorescencia de un fluoróforo con variaciones pequeñas de su concentración o añadiendo un agente que genere quenching al medio tiene muchas ventajas en distintos campos, como por ejemplo la imagenología. Y usar un método que no altere la muestra para medir estas propiedades aumenta el rango de aplicaciones.

Se demostró que el arreglo mode-mismatched de lente térmica funciona para determinar rendimientos cuánticos de soluciones muy diluidas de Rodamina B (RhB), con y sin la presencia de nanopartículas de plata sintetizadas por vía de ablación laser.

Las nanopartículas de plata crearon un aumento en las señales de lente térmica como se esperaba. También crearon un efecto de quenching en las propiedades de fluorescencia de la RhB. Este efecto se debe a una interacción entre la nanopartícula y la rodamina, como por ejemplo procesos de transferencia de energía del fluoróforo a la nanopartícula, en vez de ser simplemente que la nanopartícula aumenta la velocidad de decaimiento no radiante de la rodamina, lo cual demostramos por la variación de los valores de difusividad térmica de las muestras estudiadas.

Las nanopartículas de plata no solo afectan el rendimiento cuántico sino también el máximo de emisión de fluorescencia, lo cual es una de las principales propiedades de la fluorescencia cuyo control aumenta drásticamente las aplicaciones de ese fluoróforo. El hecho de que las nanopartículas afecten el máximo de emisión de fluorescencia, pero no el máximo de absorción es otro factor que ayuda a estas aplicaciones.

7- Recomendaciones

Continuar los estudios con la finalidad de demostrar la utilidad del arreglo mode-mismatched para determinar el rendimiento cuántico de un fluoróforo que se encuentre en un sistema en flujo, como en los actuales sistemas de microflujo.

Realizar un estudio que considere la presencia de nanopartículas metálicas o de arreglos de nanopartículas metálicas dentro de este flujo.

Realizar un estudio que considere las propiedades de la fluorescencia de materiales dopados con fluoróforos como es el caso de las actuales películas de vidrio creadas por el método sol-gel dopadas con rodaminas y nanopartículas de cobre.

8- Bibliografía

- [1] S. Bialkowski, *Photothermal Spectroscopy Methods for Chemical Analysis*, New York: John Wiley, 1996.
- [2] M. Franko y C. Tran, «Thermal Lens Spectroscopy,» de *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley, 2010, pp. 1-32.
- [3] T. Imasaka y I. N. «Thermal Lens Spectrophotometry,» *TrAC-Trends Analyt Chem*, vol. I, nº 12, pp. 273-277, 1982.
- [4] J. Gordon, R. Leite, R. Moore, S. Porto y J. Whinnery, «Long Transient Effects in Lasers with Inserted Liquid Samples,» *Appl. Phys*, vol. 36, nº 1, pp. 3-8, 1965.
- [5] J. Castillo, *Espectroscopía de lente térmica: modelos teóricos y su comparación con los experimentos*, Caracas, DC, 1994.
- [6] M. Terazima, M. Horiguchi y T. Azumi, «Limitation of Absorbance Measurements Using the Thermal Lens Method,» *Anal Chem*, vol. 61, nº 8, pp. 883-888, 1989.
- [7] J. Slaby, «Application Of Spatial Filtering In Thermal Lensing Detection,» *Opt Commun*, vol. 64, nº 2, pp. 89-93, 1987.
- [8] C. Estupiñán-López, C. Tolentino Dominguez y R. de Araujo, «Eclipsing thermal lens spectroscopy for fluorescence quantum yield measurement,» *Opt Express*, vol. 21, nº 15, pp. 18592-18601, 2013.
- [9] D. Fedlheim y C. Foss, *Metal Nanoparticles: Synthesis Characterization & Applications*, New York: Marcel Dekker, 2001.
- [10] J. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3th ed., New York: Springer, 2011.
- [11] G. Schmid, «Large clusters and colloids. Metals in the embryonic state,» *Chem Rev*, vol. 92, nº 8, pp. 1709-1727, 1992.
- [12] Y. Tan, Y. Li y D. Zhu, «Noble Metal Nanoparticles,» de *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 8, H. S. Nalwa, Ed., American Scientific Publishers, 2004, pp. 9-40.

- [13] B. Valeur y M. Berberan-Santos, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 2nd ed., Weinheim: Wiley-VCH, 2012.
- [14] C. Bindhu, S. Harilal, V. Nampori y C. Vallabhan, «Solvent effect on absolute fluorescence quantum yield of Rhodamine 6G determined using transient thermal lens technique,» *Mod Phys Lett B*, vol. 13, nº 16, pp. 563-576, 1999.
- [15] J. Brannon y D. Madge, «Absolute Quantum Yield Determination by Thermal Blooming: Fluorescein,» *J Phys Chem*, vol. 82, nº 6, pp. 705-709, 1978.
- [16] R. Sabnis, *Handbook of Biological Dyes and Stains: Synthesis and Industrial Applications*, New York: John Wiley, 2010.
- [17] C. Bindhu, S. Harilal, G. Varier, R. Isaac y V. V. C. Nampoori, «Measurement of the absolute fluorescence quantum yield of rhodamine B solution using a dual-beam thermal lens technique,» *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 29, pp. 1074-1079, 1996.
- [18] J. Shen y R. Snook, «Thermal Lens Measurement Of Absolute Quantum Yields Using Quenched Fluorescent Samples as References,» *Chem Phys Lett*, vol. 155, nº 6, pp. 583-586, 1989.
- [19] C. Bindhu y S. Harilal, «Effect of the Excitation Source on the Quantum-Yield Measurements of Rhodamine B Laser Dye Studied Using Thermal-Lens Technique,» *Analytical Sciences*, vol. 17, pp. 141-144, 2001.
- [20] B. Kumar, N. Basheer, A. Kurian y S. George, «Study of concentration-dependent quantum yield of Rhodamine 6G by gold nanoparticles using thermal-lens technique,» *Applied Physics B Laser and Optics*, vol. 115, pp. 335-342, 2014.
- [21] A. Shanti, M. Umadevi, V. Ramakrishnan, P. Radhakrishnan y V. Nampoori, «Effect of silver nanoparticles on the fluorescence quantum yield of Rhodamine 6G determined using dual beam thermal lens method,» *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 60, nº 5, pp. 1077-1083, 2004.
- [22] A. Chartier, J. Georges y J. Mermet, «pH and excitation wavelength dependence of the thermal lens signal of fluorescein in aqueous solutions,» *Spectrochim Acta A*, vol. 47, nº 11, pp. 1505-1510, 1991.

- [23] B. Kumar, N. Basheer, S. George y A. Kurian, «Effect of Gold Nanoparticle Size on Fluorescence Quenching of Rhodamine 6G Measured Using Dual Beam Thermal Lens Technique,» de *2012 IEEE 3rd International Conference of Photonics (ICP)*, Penang, 2012.
- [24] N. Basheer, B. Kumar, A. Kurian y S. George, «Silver nanoparticle size-dependent measurement of quantum efficiency of Rhodamine 6G,» *Appl Phys B*, vol. 113, nº 4, pp. 581-587, 2013.
- [25] A. Chartier, J. Georges y J. Mermet, «Limitation of the thermal-lens method in fluorescence quantum-yield measurements,» *Chem Phys Lett*, vol. 171, nº 4, pp. 347-352, 1990.
- [26] D. Magde, G. Rojas y P. Seybold, «Solvent Dependence of the Fluorescence Lifetimes of Xanthene Dyes,» *Photochem Photobiol*, vol. 70, nº 5, pp. 737-744, 1999.
- [27] M. Fischer y J. Georges, «Fluorescence quantum yield of rhodamine 6G in ethanol as a function of concentration using thermal lens spectrometry,» *Chem Phys Lett*, vol. 260, nº 1-2, pp. 115-118, 1996.
- [28] R. Cruz, V. Pilla y T. Catunda, «Quantum yield excitation spectrum (UV-visible) of CdSe/ZnS core-shell quantum dots by thermal lens spectrometry,» *J Appl Phys*, vol. 107, nº 8, pp. 083504-083504-6, 2010.
- [29] A. Marcano, H. Cabrera, M. Guerra, R. Cruz, C. Jacinto y T. Catunda, «Optimizing and calibrating a mode-mismatched thermal lens experiment for low absorption measurement,» *J Opt Soc Am B*, vol. 23, nº 7, pp. 1408-1413, 2006.
- [30] J. Hung, A. Marcano, J. Castillo, J. Gonzalez, V. Piscitelli, A. Reyes y A. Fernandez, «Thermal lensing and absorbance spectra of a fluorescent dye solution,» *Chemical Physics Letters*, nº 386, pp. 206-210, 2004.
- [31] G. Weber y T. FWJ, «Determination of the Absolute Quantum Yield of Fluorescent Solutions,» *Transactions of the Faraday Society*, vol. 53, pp. 646-655, 1957.
- [32] M. Alentsev, «Calorimetric Measurement of Fluorescence Yield,» *Journal of Experimental and Theoretical Physics*, vol. 133, p. 21, 1951.
- [33] K. Casey y E. Quitevis, «Effect of solvent polarity on nonradiative processes in xanthene dyes: Rhodamine B in normal alcohols,» *Journal of Physical Chemistry*, vol. 92, nº 23, pp. 6590-6594, 1988.

- [34] R. Kellogg y R. Bennett, «"Radiationless Intermolecular Energy Transfer. III. Determination of Phosphorescence Efficiencies,» *Journal of Chemical Physics*, vol. 41, nº 10, pp. 3042-3045, 1964.
- [35] R. Kubin, «Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes,» *Journal of Luminescence.*, vol. 27, nº 4, pp. 455-462, 1983.
- [36] I. Lopez-Arbeloa y K. Rohatgi-Mukherjee, «Correlation of liquid structure with the photophysics of rhodamine B (acidic, basic and ester forms) in water-ethanol mixed solvent,» *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 58, pp. 277-288, 1991.
- [37] S. Joseph, M. Hari, S. Mathew, G. Sharma, Soumya, V. Hadiya, P. Radhakrishnan y V. Nampoori, «Thermal diffusivity of rhodamine 6G incorporated in silver nanofluid measured using mode-matched thermal lens technique,» *Optics Communications*, nº 283, pp. 313-317, 2010.
- [38] S. Jang y S. Choi, «Role of Brownian motion in the enhanced thermal conductivity of nanofluids,» *Applied Physics Letters*, nº 84, pp. 4316-4318, 2004.