

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA



**CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN
DE DOS FOTONES DE ESPECIES FLUORESCENTES**

Trabajo Especial de Grado presentado ante
la Ilustre Universidad Central de Venezuela,
por el **Br. David A. Hernández**, para optar
por el título de Licenciado en Química.

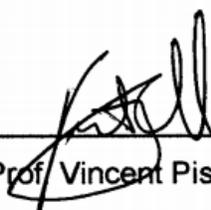
TUTORES:

Dr. Vincent Piscitelli

Dr. Lorenzo Echevarría

Caracas, mayo 2016

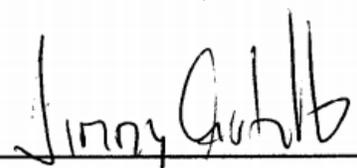
Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del trabajo Especial de Grado titulado: "CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE ABSORCIÓN DE DOS FOTONES DE ESPECIES FLUORESCENTES". Presentado por el **Br. David A. Hernández**, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.



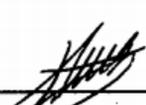
Prof. Vincent Piscitelli
(Tutor)



Prof. Lorenzo Echevarría
(Tutor)



Prof. Jimmy Castillo
(Jurado)



Prof. Héctor Gutiérrez
(Jurado)

RESUMEN

La respuesta óptica de las moléculas depende del momento dipolar creado como consecuencia de procesos de transferencia de carga. Esta respuesta óptica es altamente dependiente de la estructura molecular y está influenciada, entre otros factores, por los grupos funcionales que forman parte de la molécula. La absorción de dos fotones (TPA) es un fenómeno óptico no lineal que posee aplicaciones en campos como la biología, química, medicina, electrónica y nanotecnología. Este fenómeno se basa en la absorción de dos fotones a través de un estado electrónico virtual. En el presente trabajo se estudió la absorción de dos fotones y se evaluaron las propiedades fotofísicas de una molécula fluorescente perteneciente al grupo de las chalconas, la *(2E)-1-(5-chlorothiophen-2-yl)-3-[4-(dimethylamino)phenyl]prop-2-en-1-one*. Para esta molécula, sobre la cual no existía información reportada en la literatura, se estudió la respuesta óptica lineal mediante espectroscopia de absorción y fluorescencia. Chalconas con estructuras similares han sido reportadas por presentar aplicaciones como biomarcadores para identificar y hacer seguimiento a pacientes con riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer ⁽¹⁾. A partir de los análisis realizados en este trabajo se determinó el rendimiento cuántico de fluorescencia para determinar la eficiencia que posee la molécula para producir fluorescencia por la absorción lineal, obteniendo un valor de 0.35 ± 0.02 . De igual manera se determinó la sección eficaz de absorción de dos fotones con el propósito de obtener una medida de la capacidad que posee la muestra de generar fluorescencia proveniente de un proceso no lineal de absorción dos fotones, obteniendo valores similares que los reportados para la Rodamina B, (29 ± 10) GM. Con estos resultados se puede proponer a la molécula en estudio para aplicaciones como microscopia de fluorescencia de uno y dos fotones, entre otras aplicaciones.

Palabras clave: *Absorción de dos fotones, chalcona, rendimiento cuántico, sección eficaz de dos fotones, fluorescencia.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a los dos pilares fundamentales que me hicieron ser la persona que soy hoy en día: mis padres. Con su amor y apoyo incondicional me criaron de la mejor manera posible, siempre queriendo lo mejor para mí. Mi padre por ser un ejemplo a seguir en cuanto a perseverancia y dedicación, inculcándome siempre que no debo conformarme, que debo hacer lo posible por sobresalir y hacer las cosas lo mejor que pueda. A mi madre, por siempre preocuparse por mí, por mis estudios, por mi bienestar, por mi seguridad; por darme todo ese amor incondicional y consejos que a pesar de que no se sienta así, los hijos siempre escuchamos. Este trabajo y el título de Licenciado que pronto recibiré es para ustedes.

A mis amigos, todos y cada uno de ustedes hicieron que todo este camino desde la presentación de la prueba interna hasta la defensa de este trabajo, fuera una aventura llena de alegría y diversión. Debo agradecer especialmente a Génesis y a Sarah, quienes fueron desde el inicio grandes amigas y un apoyo a lo largo de la carrera.

También debo agradecer a los TimotoAmigos, con sus ocurrencias y locuras que los caracterizan, hicieron mucho más ligero este camino. Ustedes son de esos amigos que muy pocos tienen la fortuna de tener, yo en cambio, me enorgullezco y les agradezco infinitamente su amistad y apoyo.

A mis tutores, quienes me guiaron durante este último paso de mi carrera. En especial al Prof. Vincent Piscitelli, quien incansablemente me ayudó y asesoró en mil cosas durante los últimos semestres. Usted más que nadie sabe lo difícil que fueron estas últimas semanas. Gracias por siempre estar pendiente.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a Maru. Muchas gracias por todo lo que me has apoyado durante este largo camino que recorrimos juntos. Ahora vendrán muchos nuevos retos para cada uno de nosotros y espero que juntos podamos superarlos todos. Te amo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO.....	3
INTERACCIÓN RADIACIÓN - MATERIA	3
ABSORCIÓN DE DOS FOTONES.....	6
CHALCONAS.....	9
FLUORESCENCIA.....	11
RENDIMIENTO CUÁNTICO	14
SECCIÓN EFICAZ DE DOS FOTONES	16
ANTECEDENTES	22
OBJETIVOS	30
OBJETIVO GENERAL	30
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
SECCIÓN EXPERIMENTAL	31
REACTIVOS	31
METODOLOGÍA	33
SELECCIÓN DEL SOLVENTE	33
DETERMINACIÓN DE ESPECTRO DE FLORESCENCIA POR TPA	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
CONCLUSIONES.....	56
RECOMENDACIONES	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

INTRODUCCIÓN

Desde la invención del láser a mediados del siglo pasado, los experimentos en óptica no lineal comenzaron a jugar un papel importante en los avances científicos. Haciendo uso de esta fuente de energía que genera un haz de luz coherente en el espacio y en el tiempo, se lograron desarrollar técnicas de análisis químico que tienen incidencia en otras ramas de la ciencia como la biología. Una de las técnicas de análisis químico que se logró desarrollar a partir de la creación del láser fue la de absorción multifotónica ⁽²⁾.

Esta técnica, consiste en excitar los electrones de una molécula por medio de la absorción de dos o más fotones, en contraste con técnicas de absorción lineal donde la excitación es promovida por la absorción de un único fotón ⁽²⁾. La técnica de absorción multifotónica posee la gran ventaja de requerir el uso de una fracción de energía para la excitación de las moléculas en estudio, por lo que el análisis molecular es menos destructivo; además, la coherencia temporal que proporciona el uso de los láseres, en el sentido de que se puede hacer incidir una alta densidad de energía en tiempos menores a los nanosegundos, disminuye aún más el daño que se pueda hacer a la muestra a estudiar. El uso de esta técnica ha permitido obtener información relevante de un gran número de moléculas que podrían tener importancia directa en áreas como la biología y como consecuencia, en la medicina ⁽³⁾.

Existe un grupo no muy numeroso de moléculas que poseen propiedades particulares como lo es la fluorescencia. Estas moléculas, llamadas fluoróforos, han protagonizado gran variedad de investigaciones científicas por su propiedad de emitir radiación en el rango del visible del espectro electromagnético ⁽³⁾. Esta propiedad particular ha sido ampliamente utilizada en el ámbito científico debido a que permite realizar, entre otras cosas, marcaje molecular y de esta manera un seguimiento relativamente sencillo haciendo uso de estudios espectroscópicos.

Es de nuestro interés en este trabajo el estudio de moléculas orgánicas que poseen la propiedad de fluorescencia haciendo uso de técnicas de óptica lineal y no lineal para determinar parámetros cuánticos como lo son el rendimiento cuántico y la sección eficaz de dos fotones. Estos parámetros permitirán dilucidar la eficiencia del mecanismo de fluorescencia y la fracción superficial que es capaz de presentar el fenómeno de absorción de dos fotones para la molécula en estudio. Los resultados obtenidos en este trabajo podrían representar un gran impacto en la detección de biomoléculas debido a las características de las mismas y el uso conocido de moléculas fluorescentes en los estudios biológicos y médicos⁽³⁾.

MARCO TEÓRICO

INTERACCIÓN RADIACIÓN - MATERIA

La óptica es la rama de la física que estudia el comportamiento de la luz y su interacción con la materia, la cual se divide en dos grandes grupos como lo son la óptica lineal y la óptica no lineal. Los fenómenos ópticos donde la interacción con la materia no modifica las propiedades ondulatorias de la luz son conocidos como fenómenos ópticos lineales; algunos de estos fenómenos son la absorción, la difracción, la refracción, entre otros ⁽⁴⁾. Por otro lado, aquellos fenómenos ópticos donde las propiedades ondulatorias de la luz se ven modificadas al interactuar con la materia, son conocidos como fenómenos ópticos no lineales. Sin embargo, estos fenómenos sólo son evidentes cuando la fuente de radiación es suficientemente intensa ⁽⁵⁾.

Ahora bien, cuando una especie química se encuentra en su estado energético fundamental, es capaz de acceder a un estado de mayor energía tras la absorción de uno o más fotones. Serán procesos lineales aquellos en donde se excita la especie química tras la absorción de un único fotón, mientras que los procesos donde se excita la especie química tras la absorción de dos o más fotones serán no lineales ⁽⁶⁾. Luego de la absorción de un único fotón ocurre un proceso denominado emisión espontánea por el cual la especie química que se encuentra en un estado excitado se dirige al estado energético fundamental por medio de la generación de un fotón ⁽⁷⁾. Si la fuente de radiación es lo suficientemente intensa, el proceso de emisión espontánea compite con otro proceso de emisión conocido como emisión estimulada. Este proceso ocurre cuando una especie química excitada, absorbe un fotón de igual frecuencia que el fotón que se emitiría si la especie química volviera a su estado fundamental; de manera que esta especie emitirá dos fotones en lugar de uno (el fotón que excitó la especie química en primer lugar y el fotón que estimuló la emisión), véase Figura 1.

Debido a que la mayoría de los electrones tienden a retornar constantemente a su estado energético fundamental a través de un proceso de emisión espontánea, la probabilidad de que ocurra emisión estimulada es significativamente menor. Para aumentar la probabilidad de que el proceso de emisión estimulada ocurra, se requiere que el estado excitado de la especie química posea un tiempo de vida media suficientemente largo para que el segundo fotón estimule la emisión antes que la especie vuelva a su estado energético fundamental a través de un proceso de emisión espontánea⁽⁸⁾.

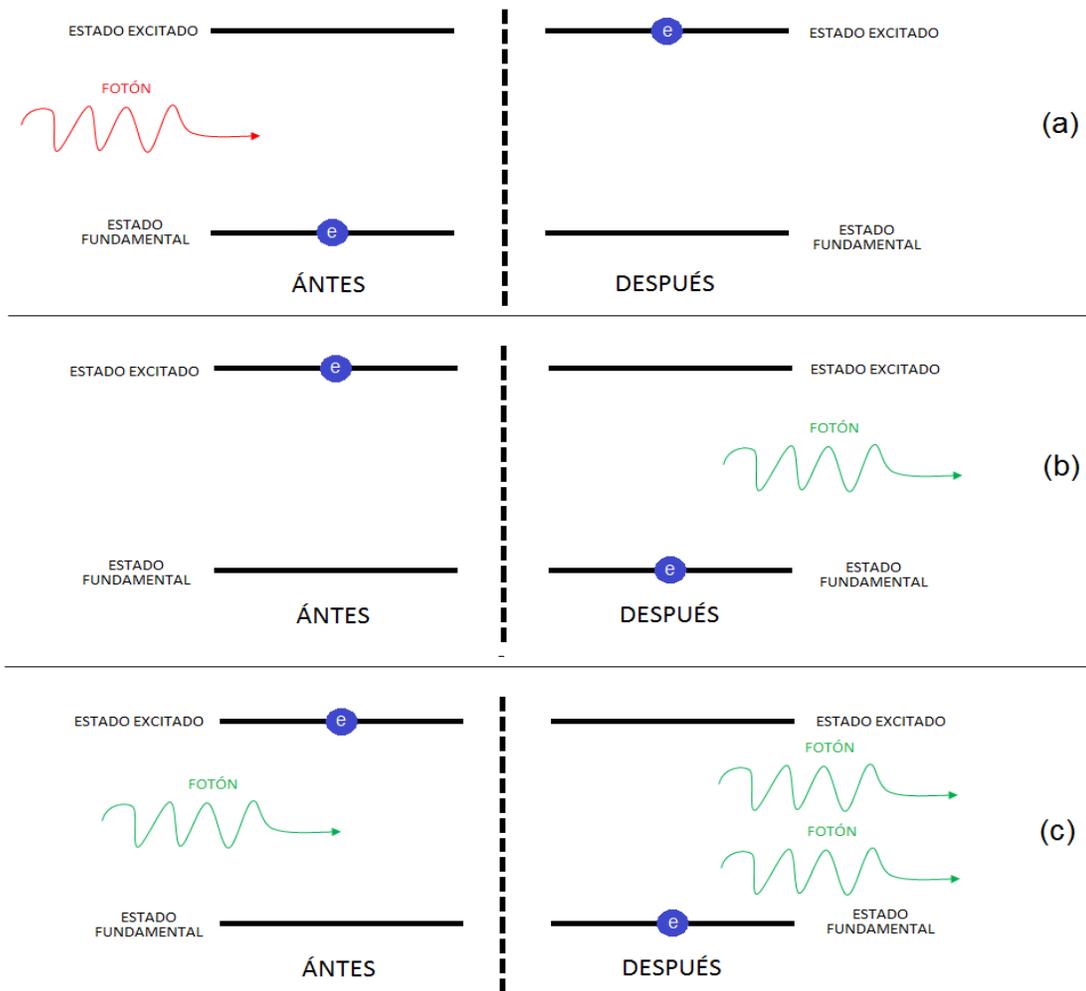


Figura 1. Procesos de absorción y emisión: (a) absorción, (b) emisión espontánea y (c) emisión estimulada.

La creación del láser (por sus siglas en inglés *light amplification by stimulated emission of radiation*), permitió el desarrollo científico en el área de óptica no lineal ya que concentra una mayor cantidad de energía por pulso en intervalos de tiempo menores a los nanosegundos, lo que hace que la potencia pico del pulso sea extremadamente alta incluso a energías moderadamente bajas. La combinación de alta energía por pulso en cortos intervalos de tiempo permite observar fenómenos ópticos no lineales con relativa facilidad sin necesidad de introducir una elevada cantidad de energía al medio ⁽⁹⁾.

Como mencionamos anteriormente, la óptica estudia el comportamiento de la luz o radiación y su interacción con la materia. Una propiedad de gran importancia cuando hablamos de radiación es el momento dipolar (μ) inducido por una onda electromagnética que posee un campo eléctrico (E). Esta propiedad puede ser representada a través de la siguiente ecuación:

$$\mu = \alpha E + \beta E^2 + \gamma E^3 + \dots + \xi E^n \quad [1]$$

Donde los coeficientes (α , β , γ y ξ) son los componentes de la polarizabilidad; siendo α el componente para la polarizabilidad lineal y β , γ y ξ los componentes de la polarizabilidad no lineal. Como es de esperarse, los fenómenos de primer orden son más comunes que los de segundo orden, y estos a su vez, más comunes que los de tercero. Por esta razón para que ocurran procesos no lineales se requiere una fuente de radiación coherente e intensa como lo son los láseres. Ahora bien, los procesos de segundo orden se clasifican de la siguiente manera:

- Generación del segundo armónico
- Suma de frecuencias
- Diferencia de frecuencias

La generación del segundo armónico no es más que la generación de un fotón de frecuencia $2w$ a partir de la absorción de dos fotones de una misma frecuencia w . Por otro lado, la suma de frecuencias es la generación de un fotón de frecuencia $w_1 + w_2$, mientras que la diferencia de frecuencias es la generación de dos fotones de frecuencias w_2 y $w_1 - w_2$ a partir de la absorción de un fotón de frecuencia w_1 ⁽¹⁰⁾, tal y como se aprecia en la Figura 2.

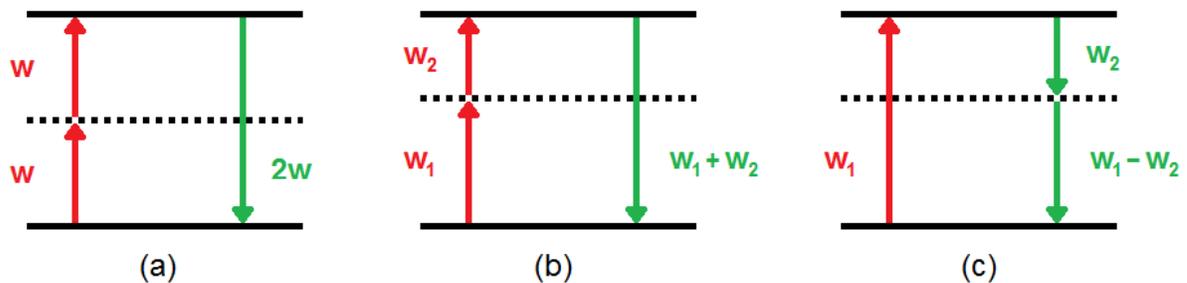


Figura 2. Diagrama de energía de los procesos de segundo orden:

(a) generación del segundo armónico, (b) suma de frecuencias y (c) diferencia de frecuencias.

ABSORCIÓN DE DOS FOTONES

La absorción de dos fotones o TPA (por sus siglas en inglés *Two Photon Absorption*) es un proceso de óptica no lineal de segundo orden donde la relación entre la cantidad de fotones absorbidos y emitidos es 2:1, es decir que por cada dos fotones que absorbe la especie química, se emite uno. La técnica de absorción multifotónica ha sido altamente estudiada y utilizada en múltiples investigaciones debido a su utilidad y sólo se puede llevar a cabo cuando la fuente de radiación es lo suficientemente energética para que dos o más fotones sean absorbidos simultáneamente. Para ejemplificar este proceso óptico no lineal, vemos en la Figura 3 un esquema comparativo entre la absorción lineal u OPA (por sus siglas en inglés *One Photon Absorption*) y la absorción multifotónica.

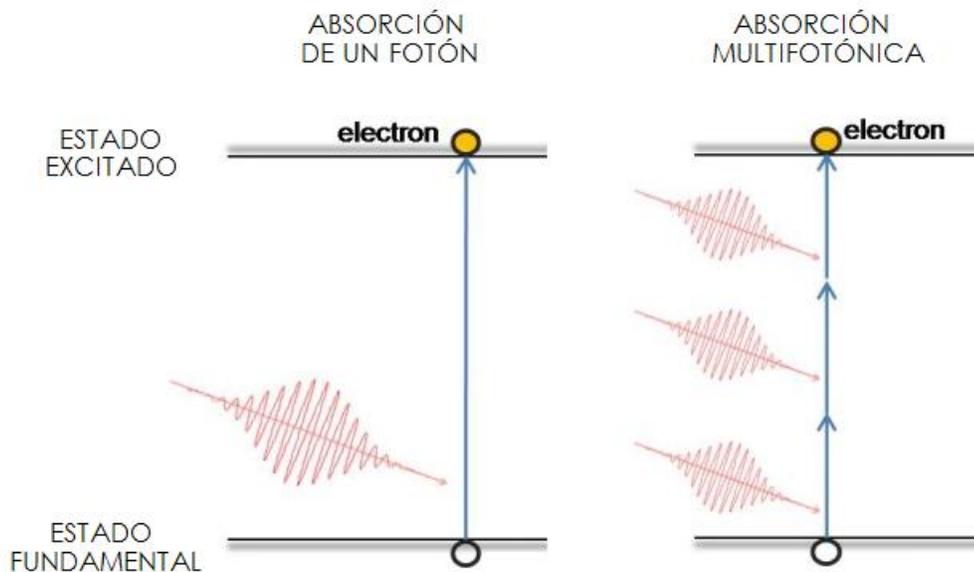


Figura 3. Esquema comparativo entre absorción lineal y absorción multifotónica.

La absorción simultánea de dos o más fotones permite la promoción de electrones desde su estado fundamental de energía hasta un nivel energético superior. Este proceso puede ocurrir de dos maneras, a través de un proceso resonante o a través de un proceso no resonante. El proceso resonante ocurre cuando la energía del fotón absorbido corresponde a la energía de separación entre el estado fundamental y algún estado excitado real; este estado excitado se conoce como estado intermediario real. En contraste, el proceso de absorción multifotónica no resonante ocurre cuando la energía del fotón absorbido no corresponde a la energía de separación entre el estado fundamental y algún estado excitado real, por lo que se crea un estado energético intermediario virtual cuya energía de separación con respecto al estado fundamental es igual a la energía del fotón absorbido ⁽¹¹⁾.

La manera a través de la cual ocurrirá el proceso de absorción multifotónica vendrá dada por la energía del fotón incidente e intrínsecamente por la estructura energética del compuesto que se estudie, véase la Figura 4.

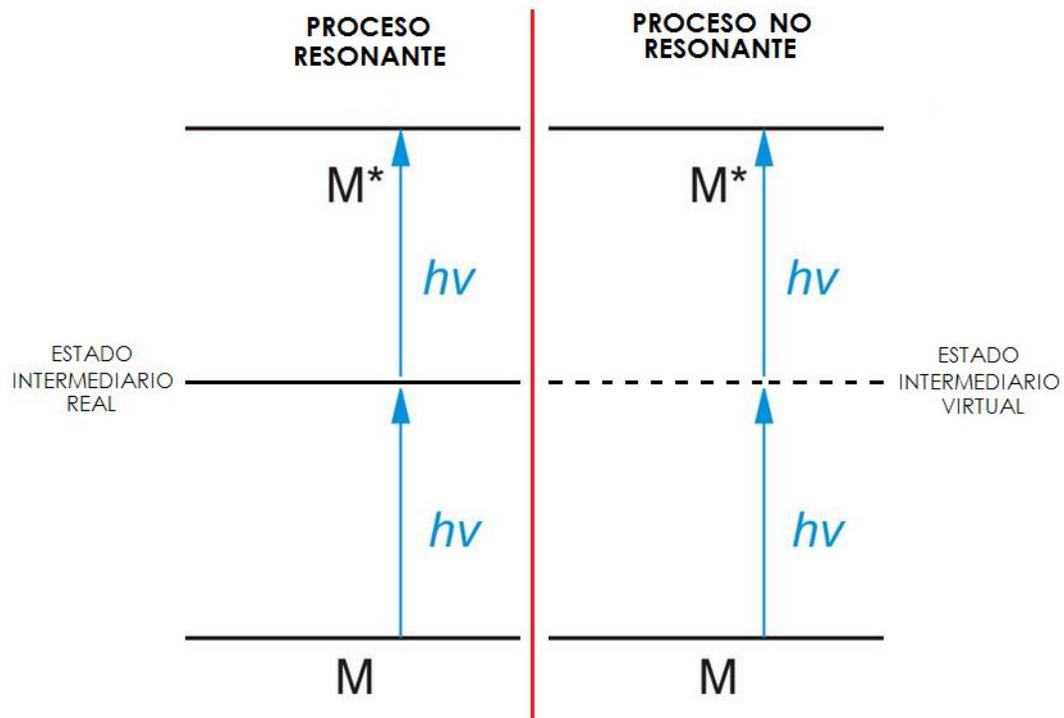


Figura 4. Esquema comparativo entre un proceso resonante y uno no resonante para la absorción de dos fotones.

Las aplicaciones de la absorción de dos fotones han ganado una gran popularidad en la comunidad biológica y médica, entre otras áreas ⁽²⁾. La terapia fotodinámica es un ejemplo de ello, la cual es un método utilizado para provocar la destrucción celular dirigida en tejidos biológicos con aplicaciones actuales en el tratamiento de tumores ⁽¹²⁾. Por otra parte, la absorción de dos fotones ofrece una mayor profundidad de penetración en los tejidos debido a la reducción de las pérdidas por dispersión y a la reducción del daño por el efecto de la radiación, debido a la excitación en la región del infrarrojo cercano ⁽¹²⁾.

Aquellas moléculas que presentan un gran número de enlaces dobles conjugados y electrones π deslocalizados generan una extensa deslocalización electrónica que resulta en altas polarizaciones y fuertes absorciones en el espectro visible y sustancialmente en la absorción de dos fotones.

De particular importancia ha sido el estudio de la fluorescencia para determinar la estructura y la dinámica de las proteínas, los péptidos, las membranas de las células, el ADN y los pigmentos fotosintéticos, entre otros debido a su impacto en el diagnóstico clínico ⁽³⁾.

CHALCONAS

Uno de los grupos de moléculas que presentan un gran número de enlaces dobles conjugados y electrones π deslocalizados son las chalconas, que no son más que dos anillos aromáticos unidos por tres enlaces de carbono, en los cuales se presenta un grupo cetona y un enlace α,β insaturado, tal y como se observa en la Figura 5.

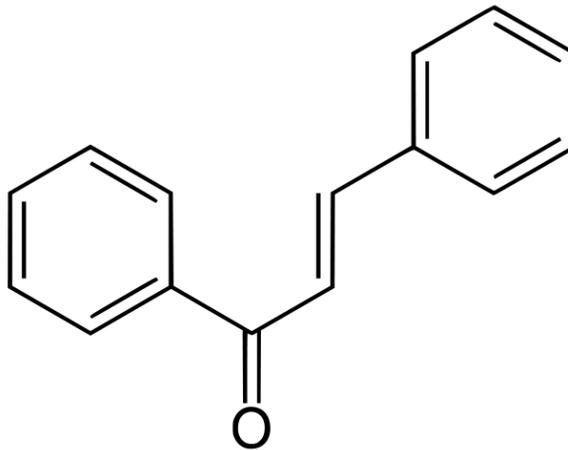


Figura 5. Estructura molecular de una Chalcona.

Este tipo de moléculas puede ser encontrado en plantas comestibles y se consideran precursores de flavonoides e isoflavonoides ⁽¹³⁾. Típicamente, las chalconas son obtenidas a través de una condensación de Claisen-Schmidt a partir de un aldehído aromático y una acetofenona aromática bajo catálisis básica o ácida ⁽¹⁴⁾. Tanto el isómero *cis* como el *trans* han sido observados para chalconas, sin embargo, el isómero *trans* es termodinámicamente más estable ⁽¹⁵⁾.

Debido a su origen natural y su amplio rango de actividad biológica y sintética, las chalconas han sido ampliamente estudiadas y se han desarrollado desde compuestos terapéuticos hasta preservativos de alimentos. Numerosos reportes que destacan la significancia medicinal de los derivados de las chalconas han sido documentados en la literatura ⁽¹⁶⁾. Entre las aplicaciones biológicas se incluyen usos como agente antimicrobiano, antipalúdico, antioxidante, antiinflamatorio, antitumoral, antiviral, antiparasitario, antidepresivo y anticonvulsivo ⁽¹⁷⁾.

Los compuestos emisores en estado sólido han atraído una considerable atención recientemente debido al amplio rango de aplicaciones en dispositivos optoelectrónicos, sensores y sistemas de captación de luz. En este sentido, los compuestos orgánicos luminiscentes con emisión en estado sólido son de alto interés, sin embargo, no existen muchos compuestos con esta propiedad. A pesar de que muchos cromóforos exhiben una excelente emisión por fluorescencia en soluciones diluidas, son muy limitados los ejemplos de cromóforos que emiten en estado sólido; esto debido a que la mayoría de ellos tienden a agregarse en la fase condensada ⁽¹⁸⁾, lo que lleva a una desactivación no radiativa inducida por torsión o empaquetamiento planar inducido por acoplamiento de los momentos dipolares de transición electrónica ⁽¹⁹⁾.

Este fenómeno, conocido como ACQ (por sus siglas en inglés *aggregation-caused quenching*), no es más que la disminución de fluorescencia causada por la agregación de las partículas y ha sido altamente investigado, sin embargo, son necesarios más estudios en este campo para producir colorantes con un alto rendimiento de emisión en estado sólido ⁽²⁰⁾. La estructura química de las chalconas, con un sistema extendido de electrones π conjugados, las hace unas buenas candidatas para exhibir esta propiedad de emisión.

FLUORESCENCIA

Si bien es fundamental entender los procesos tras los cuales una especie química absorbe radiación y es excitada, bien sea por fenómenos ópticos lineales o no lineales, es igual de importante entender los procesos de emisión que hace que la especie química retorne a su estado fundamental. Como vimos anteriormente, los procesos de emisión que nos interesarán para este trabajo son aquellos en donde se genere un fotón como consecuencia de la relajación electrónica de la especie química. Estos procesos de emisión son conocidos como fotoluminiscencia y puede ser clasificada de acuerdo al modo de excitación, véase Tabla 1 ⁽²¹⁾.

Tabla 1. Tipos de luminiscencia de acuerdo al modo de excitación.

TIPO DE LUMINISCENCIA	MODO DE EXCITACIÓN
Fotoluminiscencia (fluorescencia y fosforescencia)	Absorción de luz (fotones)
Radioluminiscencia	Radiación ionizante (Rayos X, α , β , γ)
Cátodoluminiscencia	Rayos catódicos
Electroluminiscencia	Campo eléctrico
Termoluminiscencia	Calentamiento
Quimioluminiscencia	Procesos químicos (ej. Oxidación)
Bioluminiscencia	Procesos bioquímicos
Sonoluminiscencia	Ultrasonido

Vemos entonces que la fotoluminiscencia engloba dos tipos particulares de emisión radiativa como son la fluorescencia y la fosforescencia. Este último no es más que la emisión correspondiente a una transición desde el estado triplete T_1 hasta el estado fundamental S_0 (considerando que la transición directa desde el estado S_0 hasta el estado T_1 está prohibida); mientras que la fluorescencia es la emisión correspondiente al decaimiento radiativo desde un estado excitado S_1 hasta un estado fundamental S_0 , véase la Figura 6.

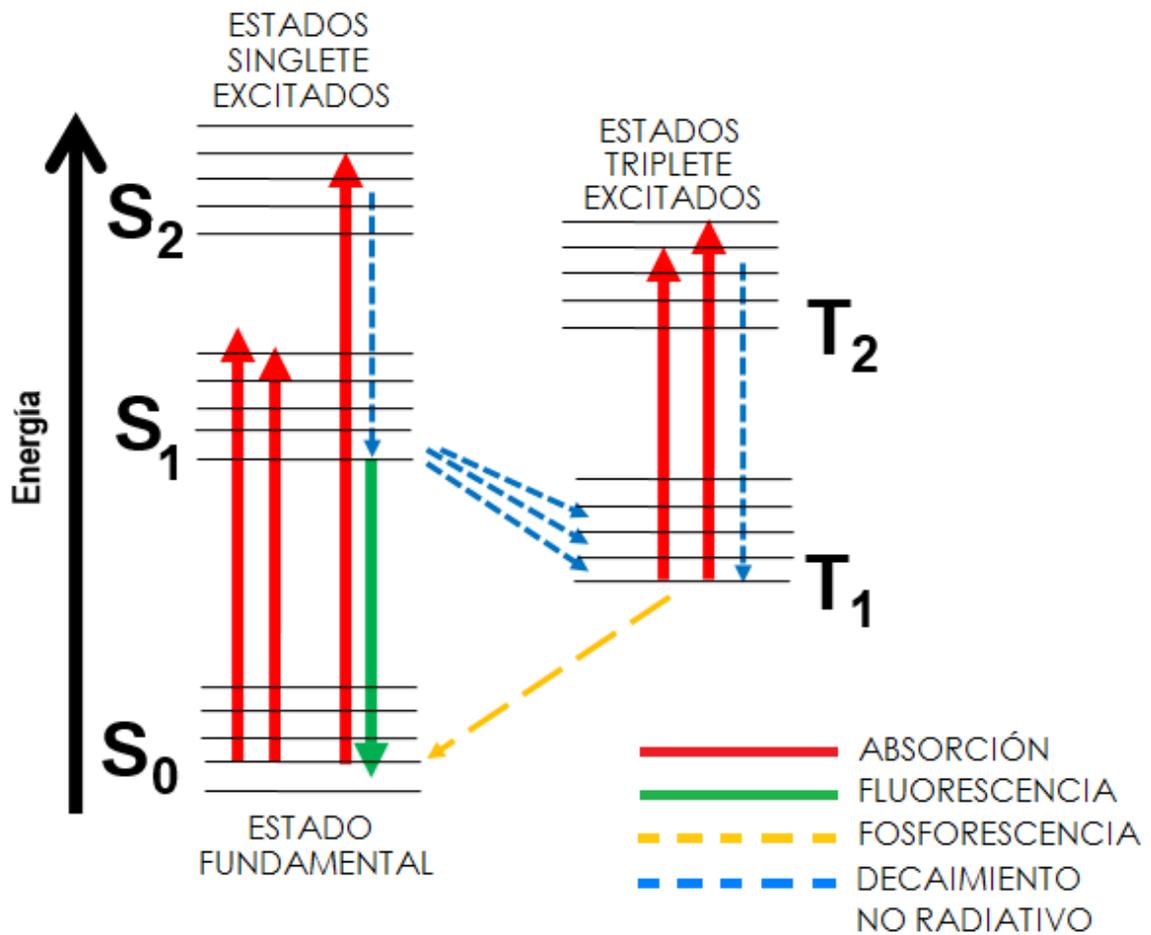


Figura 6. Procesos de emisión por fotoluminiscencia.

Como vemos, el fenómeno de fluorescencia ocurre debido a que los electrones se excitan pasando desde el estado fundamental S_0 hasta un estado excitado de mayor energía S_1 por efecto de la absorción de radiación. Luego se presenta una relajación electrónica no radiativa en la cual los electrones excitados descienden a niveles de energía inferiores sin emitir radiación. Por último, una vez que el estado de menor energía S_1 está suficientemente poblado, los electrones descenderán hasta el estado fundamental S_0 emitiendo radiación ⁽²²⁾.

El éxito de la fluorescencia como una herramienta de investigación en el estudio de la estructura y dinámica de la materia o de los sistemas vivos surge de la alta sensibilidad de las técnicas fluorométricas. Las técnicas analíticas basadas en la detección de fluorescencia son muy populares debido a su alta sensibilidad y selectividad, junto con las ventajas de resolución espacial y temporal, y la posibilidad de la percepción remota utilizando fibras ópticas. Cuando un analito es fluorescente, la detección fluorométrica directa es posible por medio de un espectrofluorómetro que opera a una longitud de onda de excitación y observación apropiada. Sin embargo, la mayoría de los iones y moléculas no son fluorescentes, por esta razón es común el uso de métodos indirectos tales como la derivatización, que no es más que la reacción entre la molécula de interés y un analito que conduzca a la formación de un compuesto fluorescente ⁽²²⁾.

Los fluoróforos y su fluorescencia brindan una forma extremadamente poderosa para realizar contraste en imágenes microscópicas, especialmente en ambientes biológicos. Se pueden obtener imágenes simultáneas entre diferentes estructuras celulares y moléculas usando fluoróforos múltiples mientras sus emisiones o tiempos de vida fluorescente se puedan distinguir claramente. Los fluoróforos también son importantes en identificación de minerales, contaminantes e impurezas en la ciencia de materiales, geología, inspección de semiconductores, y aplicaciones de ciencias ambientales, sin embargo, en el campo de la biología es donde podemos encontrar mayores aplicaciones para los compuestos fluorescentes.

De acuerdo con la regla de Stokes, la longitud de onda en la emisión de fluorescencia siempre será mayor que en la absorción; sin embargo, en muchos casos el espectro de absorción parcialmente solapa el espectro de fluorescencia, es decir, la energía que emite la molécula por un proceso de emisión por fluorescencia será igual o menor que la energía de excitación siempre y cuando la relación entre la cantidad de fotones absorbidos y emitidos sea 1:1 ⁽²³⁾.

RENDIMIENTO CUÁNTICO

El rendimiento cuántico de fluorescencia es una medida de la eficiencia que posee una especie química para producir fluorescencia y se expresa como la relación de fotones emitidos en función del número de fotones absorbidos por la especie química. La medición de los rendimientos cuánticos de fluorescencia absolutos presenta diversas complejidades experimentales, por ello se determina experimentalmente el rendimiento cuántico relativo en función a un patrón cuyos valores de rendimiento cuántico son conocidos⁽²⁴⁾. La señal de fluorescencia de la absorción de un fotón (S) en función de la longitud de onda (λ) puede ser escrita de la siguiente manera:

$$S(\lambda) = \frac{dI}{d\lambda} \quad [2]$$

Desarrollando esta expresión para obtener el valor de I , se formula la integral:

$$I = \int_0^\lambda S(\lambda) d\lambda \quad [3]$$

Al desarrollar esta integral se obtiene la siguiente ecuación:

$$I = K I S_0(\lambda) \Phi(\lambda) \sigma(\lambda) n e^{-x[\sigma(\lambda) n]} \quad [4]$$

Donde K es una constante adimensional que depende de la configuración óptica del arreglo experimental, I es la longitud del camino que recorre la luz que es absorbida, $S_0(\lambda)$ es el flujo de fotones incidentes a la longitud de onda de excitación λ , $\Phi(\lambda)$ es el rendimiento cuántico de absorción lineal a la longitud de onda de excitación, $\sigma(\lambda)$ es la sección eficaz de absorción de un fotón a la longitud de onda de excitación, n es el índice de refracción del solvente y x es la longitud del camino óptico hasta el centro de la cubeta.

Si la sección eficaz de la de absorción de un fotón a la longitud de onda de excitación $\sigma(\lambda)$ es conocida se puede escribir el rendimiento cuántico de la absorción de un fotón $\Phi(\lambda)$ para una especie química con la siguiente expresión:

$$\Phi(\lambda) = \frac{1}{K I} \frac{S}{S_0(\lambda)} \frac{1}{\sigma(\lambda) n} e^{x[\sigma(\lambda) n]} \quad [5]$$

De esta manera, para determinar el rendimiento cuántico para una muestra m , se utiliza la ecuación [5]. Por ello considerando que el subíndice m se refiere a la muestra y el subíndice p se refiere a un patrón podemos escribir las siguientes expresiones:

$$\Phi_m(\lambda) = \frac{1}{K I} \frac{S_m}{S_0(\lambda)} \frac{1}{\sigma_m(\lambda) n_m} e^{x[\sigma_m(\lambda) n_m]} \quad [5.1]$$

$$\Phi_p(\lambda) = \frac{1}{K I} \frac{S_p}{S_0(\lambda)} \frac{1}{\sigma_p(\lambda) n_p} e^{x[\sigma_p(\lambda) n_p]} \quad [5.2]$$

Ahora bien, el rendimiento cuántico relativo representa una medida cuantitativa de la relación entre el rendimiento cuántico de una muestra con respecto a un patrón, y se puede representar de la siguiente manera:

$$\Phi_{\text{relativo}}(\lambda) = \frac{\Phi_m(\lambda)}{\Phi_p(\lambda)} \quad [6]$$

$$\Phi_{\text{relativo}}(\lambda) = \frac{K I S_0(\lambda)}{K I S_0(\lambda)} \frac{S_m \sigma_p(\lambda) n_p e^{x[\sigma_p(\lambda) n_p]}}{S_p \sigma_m(\lambda) n_m e^{x[\sigma_m(\lambda) n_m]}} \quad [7]$$

Desarrollando esta ecuación y cancelando términos iguales se obtiene la siguiente expresión:

$$\Phi_{\text{relativo}}(\lambda) = \frac{S_m \sigma_p(\lambda) n_p e^{x[\sigma_p(\lambda) n_p]}}{S_p \sigma_m(\lambda) n_m e^{x[\sigma_m(\lambda) n_m]}} \quad [8]$$

Al igualar las ecuaciones [6] y [8], y conociendo el rendimiento cuántico del patrón $\Phi_p(\lambda)$, se puede calcular el rendimiento cuántico de la muestra $\Phi_m(\lambda)$ de la siguiente manera:

$$\Phi_m(\lambda) = \Phi_p(\lambda) \frac{S_m \sigma_p(\lambda) n_p e^{x[\sigma_p(\lambda) n_p]}}{S_p \sigma_m(\lambda) n_m e^{x[\sigma_m(\lambda) n_m]}} \quad [9]$$

Finalmente, si la longitud del camino que recorre la luz que es absorbida l , la sección eficaz de absorción de un fotón a la longitud de onda de excitación $\sigma(\lambda)$, el índice de refracción del solvente n y la longitud del camino óptico hasta el centro de la cubeta x es el mismo tanto para la muestra como para el patrón, estos términos se anularán y obtendremos la ecuación final para el rendimiento cuántico de una muestra ⁽²⁵⁾:

$$\Phi_m(\lambda) = \Phi_p(\lambda) \frac{S_m}{S_p} \quad [10]$$

SECCIÓN EFICAZ DE DOS FOTONES

La absorción de dos fotones considera que la probabilidad de colisión de dos fotones en un área extendida de la nube electrónica de una molécula determina la tasa de absorción de dos fotones. Una medida de esa probabilidad es la sección eficaz de la absorción de dos fotones o el coeficiente de absorción de dos fotones (δ), la cual es una cantidad que relaciona la probabilidad de transición (p) por unidad de tiempo (t), con el cuadrado de la densidad del flujo de fotones (F) por medio de la siguiente expresión ⁽²⁶⁾:

$$F^2 \delta = \frac{dp}{dt} \quad [11]$$

La sección eficaz de absorción de dos fotones se caracteriza por la probabilidad de que ocurra la absorción simultánea de dos fotones cuyas energías se suman para que coincidan con la energía de transición molecular. Esta magnitud es medida en unidades Göppert-Mayer, en reconocimiento a María Göppert-Mayer quien en 1931 propuso la absorción multifotónica. Esta unidad se abrevia (GM) donde 1GM equivale a $10^{-50} \text{cm}^4 \text{s}$.

Existen diversos métodos de cálculo de la sección eficaz de absorción de dos fotones reportados en la literatura. Sin embargo, un aspecto de interés en dicho cálculo es que la sección eficaz de dos fotones depende en gran medida de los índices de refracción, y estos a su vez de la distribución espacial y coherencia temporal del haz de excitación. Por ello el conocimiento de la relación entre las intensidades de fluorescencia, potencia de excitación y distribución espacial del haz es de gran importancia en la determinación de la sección eficaz. Un análisis de la sección eficaz de dos fotones propuesto por Xu y Webb ⁽²⁷⁾, considera la dependencia de la forma temporal y espacial del haz de excitación, a diferencia de otros análisis propuestos donde consideran la influencia de la magnitud de las intensidades de excitación.

En este análisis se considera igualmente que debido a que la absorción de dos fotones es un proceso de segundo orden, el número de fotones absorbidos es proporcional a la sección eficaz de dos fotones δ y al cuadrado de la intensidad incidente I_0 . El número de fotones absorbidos por unidad de tiempo N_{abs} es función de la concentración de fluoróforo C y el volumen de iluminación de la muestra V :

$$N_{\text{abs}}(t) = \int \delta C(r, t) I_0^2(r, t) dV \quad [12]$$

En la expresión anterior la intensidad incidente en función de la distancia y tiempo se puede escribir como dos funciones separadas; una con respecto a la distribución de la luz incidente $R(r)$, y la otra respecto a tiempo de intensidad $I_0(t)$, por lo que la expresión quedaría de la siguiente manera:

$$N_{\text{abs}}(t) = \int \delta C(r, t) [I_0(t) R(r)]^2 dV \quad [13]$$

Se puede considerar que la concentración C , la sección eficaz de dos fotones δ y el tiempo de intensidad $I_0(t)$ son constantes en función al volumen de iluminación de la muestra, por lo que la ecuación puede ser reescrita de la siguiente forma:

$$N_{\text{abs}}(t) = \delta C [I_0(t)]^2 \int [R(r)]^2 dV \quad [14]$$

Con respecto a la intensidad, se considera una distribución en tres dimensiones en el punto focal del límite de una lente de difracción. Donde I_0 es la intensidad en la geometría del punto focal y la relación entre la potencia incidente $P(t)$ e $I_0(t)$ se desprende de la ley de la conservación de la energía:

$$I_0(t) = \frac{\pi (NA)^2 P(t)}{\lambda^2} \quad [15]$$

En la expresión anterior el término NA se refiere a la apertura numérica y λ a la longitud de onda de excitación. Introduciendo el término anterior en la expresión [14] se obtiene:

$$N_{\text{abs}}(t) = \delta C \left[\frac{\pi (NA)^2 P(t)}{\lambda^2} \right]^2 \int [R(r)]^2 dV \quad [16]$$

Por último, para escribir el número de fotones absorbidos N_{abs} en términos de parámetros experimentales, se debe escribir la solución a la integral del volumen de la región iluminada en el foco. Para ello se utiliza el siguiente resultado obtenido para la forma paraxial de la función normalizada de propagación del punto de intensidad de la siguiente manera:

$$\int [R(r)]^2 dV = \frac{8n\lambda^3}{\pi^3(NA)^4} \quad [17]$$

En el término anterior n se refiere al índice de refracción del fluoróforo. Ahora bien, al introducir la ecuación [17] en la [16] tenemos que:

$$N_{\text{abs}}(t) = \delta C \left[\frac{\pi (NA)^2 P(t)}{\lambda^2} \right]^2 \left[\frac{8n\lambda^3}{\pi^3(NA)^4} \right] \quad [18]$$

Simplificando términos en la ecuación anterior obtenemos que:

$$N_{\text{abs}}(t) = \delta C \left[\frac{8 n P(t)^2}{\lambda \pi} \right] \quad [19]$$

Por otro lado, el número de fotones absorbidos se puede utilizar para determinar el número de fotones emitidos debido a la absorción de dos fotones con la siguiente expresión:

$$F(t) = \frac{1}{2} \eta \Phi N_{\text{abs}} \quad [20]$$

Donde η corresponde a la eficiencia de recolección de las medidas de fluorescencia del sistema, y Φ al rendimiento cuántico de fluorescencia de un fotón del fluoróforo. Haciendo una combinación entre este término y la ecuación [19] se obtiene:

$$F(t) = \frac{1}{2} \eta \Phi \delta C \left[\frac{8 n P(t)^2}{\lambda \pi} \right] \quad [21]$$

Reordenando esta última ecuación se obtiene una expresión que describe el número de fotones emitidos en un proceso de absorción de dos fotones en términos de la potencia de la excitación incidente y la longitud de onda de mismo haz:

$$F(t) = \frac{4 \eta \Phi \delta C n P(t)^2}{\lambda \pi} \quad [22]$$

Sin embargo, la expresión anterior se puede reescribir considerando dos elementos importantes. El primero es que $F(t)$ se puede escribir como el número de fotones correspondiente al espectro de fluorescencia de fotones, y el segundo que la función $P(t)$ se puede escribir como la potencia P medida en el instante en que la fluorescencia se lleva a cabo, por lo tanto, la ecuación anterior adquiere la siguiente forma:

$$F = \frac{4 \eta \Phi \delta C n P^2}{\lambda \pi} \quad [23]$$

Utilizando la ecuación anterior se puede obtener la sección eficaz de absorción de dos fotones para una muestra como una medida relativa utilizando un patrón. Por ello se escribe el número de fotones asociado a los procesos de absorción de dos fotones tanto de muestra m como para el patrón p :

$$F_m = \frac{4 \eta_m \Phi_m \delta_m C_m n_m P_m^2}{\lambda_m \pi} \quad [23.1]$$

$$F_p = \frac{4 \eta_p \Phi_p \delta_p C_p n_p P_p^2}{\lambda_p \pi} \quad [23.2]$$

Dividiendo las ecuaciones anteriores y despejando la sección eficaz de absorción de dos fotones obtenemos que:

$$\delta_m = \left[\frac{F_m \lambda_m \eta_p \Phi_p C_p n_p P_p^2}{F_p \lambda_p \eta_m \Phi_m C_m n_m P_m^2} \right] \delta_p \quad [24]$$

Inicialmente, considerando que tanto muestra como patrón fueron sometidos a los mismos parámetros experimentales: misma concentración, mismo sistema de detección de fluorescencia, mismo solvente y misma longitud de onda de excitación, se pueden eliminar los términos: η , C , n y λ . Por último, reorganizando la expresión se obtiene la sección eficaz de absorción de dos fotones en términos de los parámetros experimentales utilizados en este trabajo de investigación ⁽²⁵⁾:

$$\delta_m = \left[\frac{F_m \Phi_p P_p^2}{F_p \Phi_m P_m^2} \right] \delta_p \quad [25]$$

ANTECEDENTES

La técnica en la cual se basa la absorción multifotónica fue desarrollada teóricamente por María Göppert-Mayer en 1931 donde se predijo que las transiciones electrónicas desde un nivel fundamental hasta un nivel excitado podían venir dadas por la absorción simultánea de dos o más fotones. Esto sólo podría ocurrir cuando la energía de la fuente de excitación con la que se irradiara la molécula fuese lo suficientemente alta como para promover un electrón desde el estado fundamental de energía hasta un estado excitado más energético, real o virtual, e inmediatamente excitar este electrón nuevamente hasta un estado real aún más energético, del doble de energía que el primero. Este proceso, que fue plasmado hace más de 80 años en papel no se logró demostrar hasta la invención de fuentes de radiación lo suficientemente energéticas y como para promover la absorción simultánea de dos o más fotones ⁽²⁸⁾.

El primer instrumento desarrollado utilizando el principio de la emisión estimulada fue el Maser (por sus siglas en inglés *Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation*). Este instrumento construido en 1954 por Gordon y Townes en los Estados Unidos tenía la capacidad de operar en la región de las microondas ⁽²⁹⁾. Posteriormente apareció el Láser de Rubí (por sus siglas en inglés *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) realizado por Theodore Maiman en el año 1960 ⁽³⁰⁾. El desarrollo del láser tuvo un gran impacto en la investigación en óptica puesto que esta fuente de excitación tenía la capacidad de acceder a intensidades de radiación mayores en comparación con las fuentes de excitación convencionales de luz utilizadas anteriormente.

Las intensidades de la luz generadas por las fuentes láser poseen campos electromagnéticos con energías de magnitud comparables a los campos electrostáticos que mantienen unidos los electrones de un átomo a su núcleo.

Los usos de los campos electromagnéticos generados por las fuentes láser permitieron observar en algunas especies químicas fenómenos ópticos que anteriormente no habían sido reportados, tal como la generación del segundo armónico. Este tipo de fenómenos son conocidos como fenómenos de óptica no lineal debido a que dependen de la intensidad y potencia de excitación de la radiación incidente en la especie química.

Para el año 1961 P. A. Franken reportó la primera observación del efecto de la generación del segundo armónico, en el cual un haz coherente generaba un nuevo haz igualmente coherente ⁽³¹⁾, como vemos en la Figura 7. Para el año 1962 R.W. Terhune reportó la primera observación de la generación de un tercer armónico THG ⁽³²⁾.

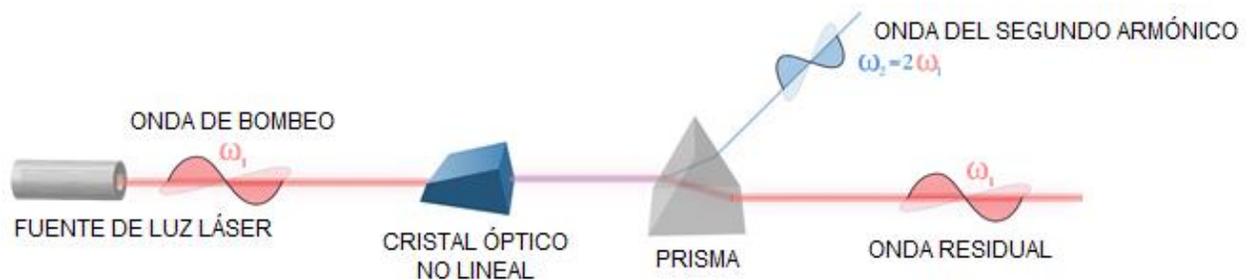


Figura 7. Diagrama del proceso de generación del segundo armónico.

De igual manera, en el año 1961 Kaiser y Garret logran reportar la medición de fluorescencia emitida por la relajación de electrones que fueron promovidos a niveles excitados por la absorción de dos fotones. Este experimento se realizó con una muestra sólida de $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{+2}$ la cual fue irradiada por un láser de rubí que emite una radiación correspondiente a una longitud de onda de 694nm. Esta radiación se hizo incidir sobre una pastilla de 1mm de espesor y se midió la radiación emitida con un detector óptico, la cual poseía una energía correspondiente a una longitud de onda de 425nm ⁽³³⁾.

Como se puede observar en la Figura 8, la intensidad de la radiación emitida debido al proceso de relajación por fluorescencia se graficó con respecto a la intensidad de la radiación incidente en la muestra.

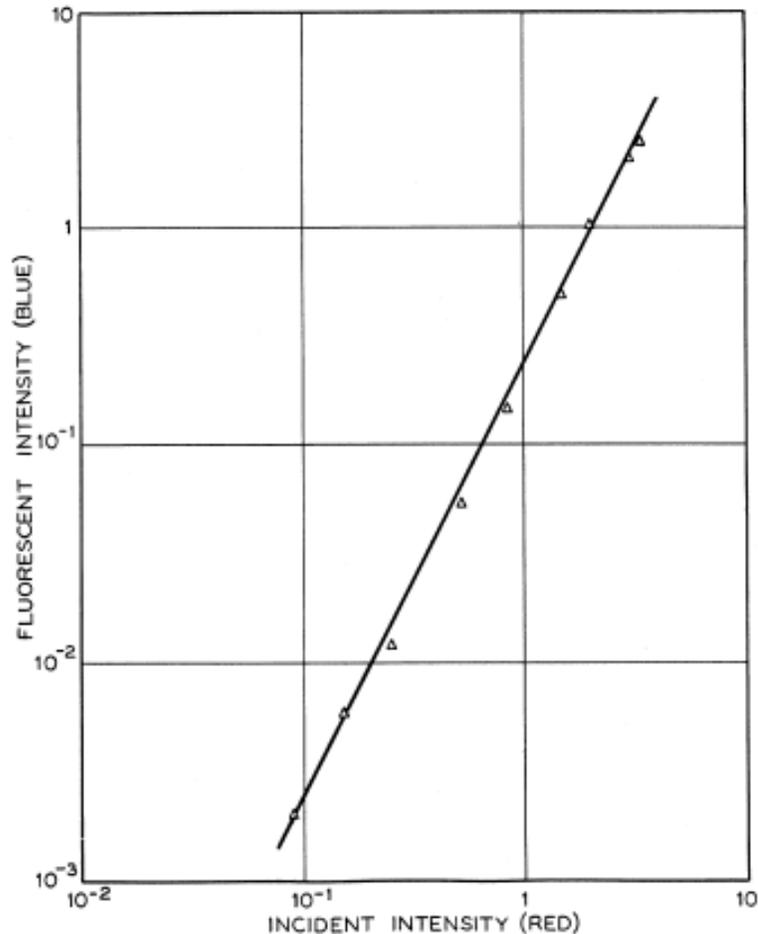


Figura 8. Intensidad de fluorescencia vs. Intensidad incidente. Experimento de Kaiser y Garret⁽³³⁾.

Esta evidencia experimental permitió confirmar la relación lineal cuadrática que existe entre la intensidad de la radiación que se hace incidir a la muestra con respecto a la intensidad de radiación que se emite por fluorescencia. Esta dependencia cuadrática permite determinar que la absorción fue de dos fotones, es decir, por cada dos fotones absorbidos por la molécula se emitió uno.

Cabe destacar que por esta razón se observa que la radiación incidente posee una energía menor (correspondiente al color rojo, longitud de onda de aproximadamente 700nm) que la radiación emitida por fluorescencia (correspondiente al color azul, longitud de onda de aproximadamente 400nm).

En 1966 Schafer y Schmidt reportaron las primeras medidas de absorción de dos fotones para la Rodamina B en etanol, y propusieron un modelo geométrico simple para explicar el fenómeno de la absorción de dos fotones ⁽³⁴⁾. En 1969 M. Galanin reportó que en la absorción de dos fotones podía ocurrir extinción de la fluorescencia. Este estudio de extinción de la fluorescencia fue realizado para una solución acuosa de fluoresceína utilizando un láser de rubí como fuente de excitación ⁽³⁵⁾. Un comportamiento similar fue reportado por D. J. Bradley para Rodaminas ⁽³⁶⁾ y por Hermann y Ducuing con la excitación de láseres de rubí y neodimio ⁽³⁷⁾.

Más recientemente, en 2011, Mikhail Drobizhev y colaboradores presentaron un trabajo sobre las propiedades de absorción de dos fotones para proteínas fluorescentes. Conociendo las ventajas crecientes que presenta la excitación de dos fotones para proteínas fluorescentes, estos investigadores realizaron un estudio de las propiedades de absorción para una amplia variedad de proteínas, esto con el objetivo de conocer cuáles de estas presentan mayor fluorescencia y cuál es la mejor longitud de onda de excitación. Entre otras cosas, los autores presentan una figura comparativa entre el espectro de absorción de un fotón y de dos fotones, donde se puede observar que la forma del espectro es diferente, sin embargo, algunos de los picos de absorción coinciden entre ambos métodos ⁽³⁸⁾, como vemos en la Figura 9.

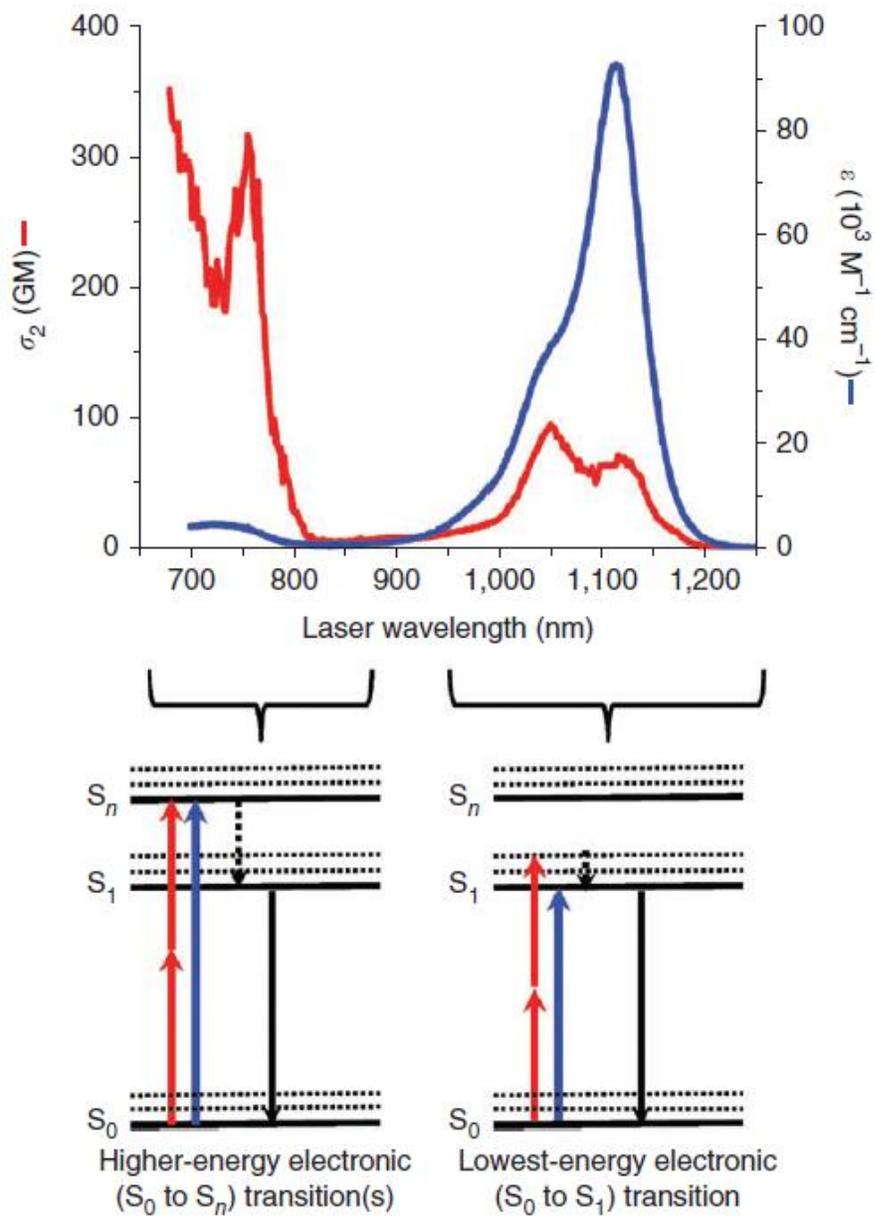


Figura 9. Espectro de OPA y TPA para la proteína TagRFP (arriba).

Diagrama de Jablonski para transiciones correspondientes a OPA y TPA respectivamente. (abajo)⁽³⁸⁾.

Por otro lado, Mikhail Drobizhev y colaboradores presentan una gráfica donde se ejemplifica el hecho de que los espectros de absorción de un fotón no permiten predecir la longitud de onda a la cual la intensidad de fluorescencia será mayor.

Como vemos, en la gráfica (a) de la Figura 10, la proteína DsRed2 es la que posee una mayor intensidad para la absorción de un fotón, sin embargo, en la gráfica (b) vemos que la proteína tdTomato es la que posee mayor intensidad para la absorción de dos fotones; cabe destacar que en este estudio se trabajó con soluciones equimolares para todas las muestras.

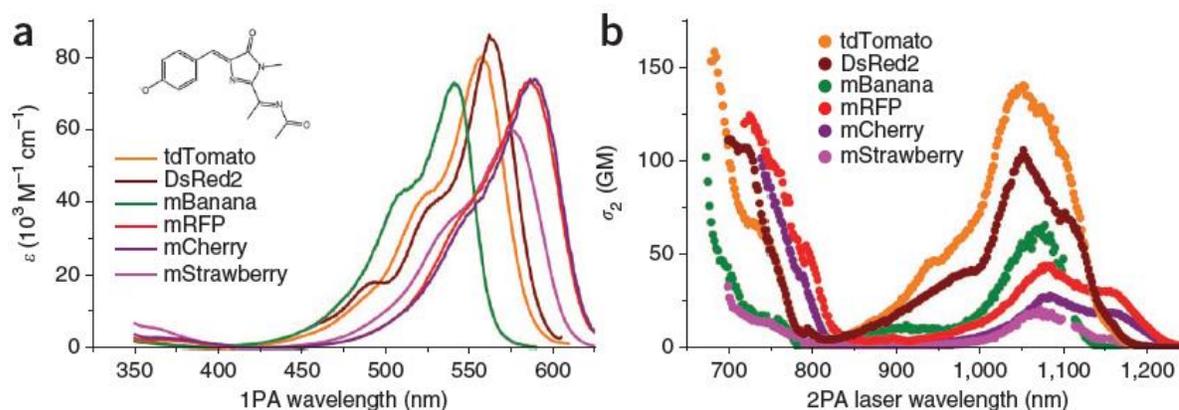


Figura 10. Espectro de absorción de un fotón (a) y de dos fotones (b) para proteínas fluorescentes⁽³⁸⁾.

Uno de los trabajos más recientes en el estudio molecular por la absorción de dos fotones y emisión por fluorescencia fue el realizado por Lorenzo Echevarría y colaboradores en el 2012 donde reportan la absorción de dos fotones para el 2-[4-(dimetilamino)fenil]-1,3-benzotiazole-6-carbonitrilo (DBC) en solución de DMSO. Los resultados obtenidos con respecto a su sección eficaz fueron considerablemente altos, lo que hace que las expectativas con respecto al impacto de este compuesto en la detección de biomoléculas y en el diagnóstico y tratamiento del cáncer sea alto, esto se debe a que estructuras similares al DBC han sido anteriormente reportadas por mostrar efectos antitumorales⁽³⁹⁾. En la Figura 11 se presenta el espectro de emisión de fluorescencia uno y dos fotones para el DBC en solución de DMSO (2 mM).

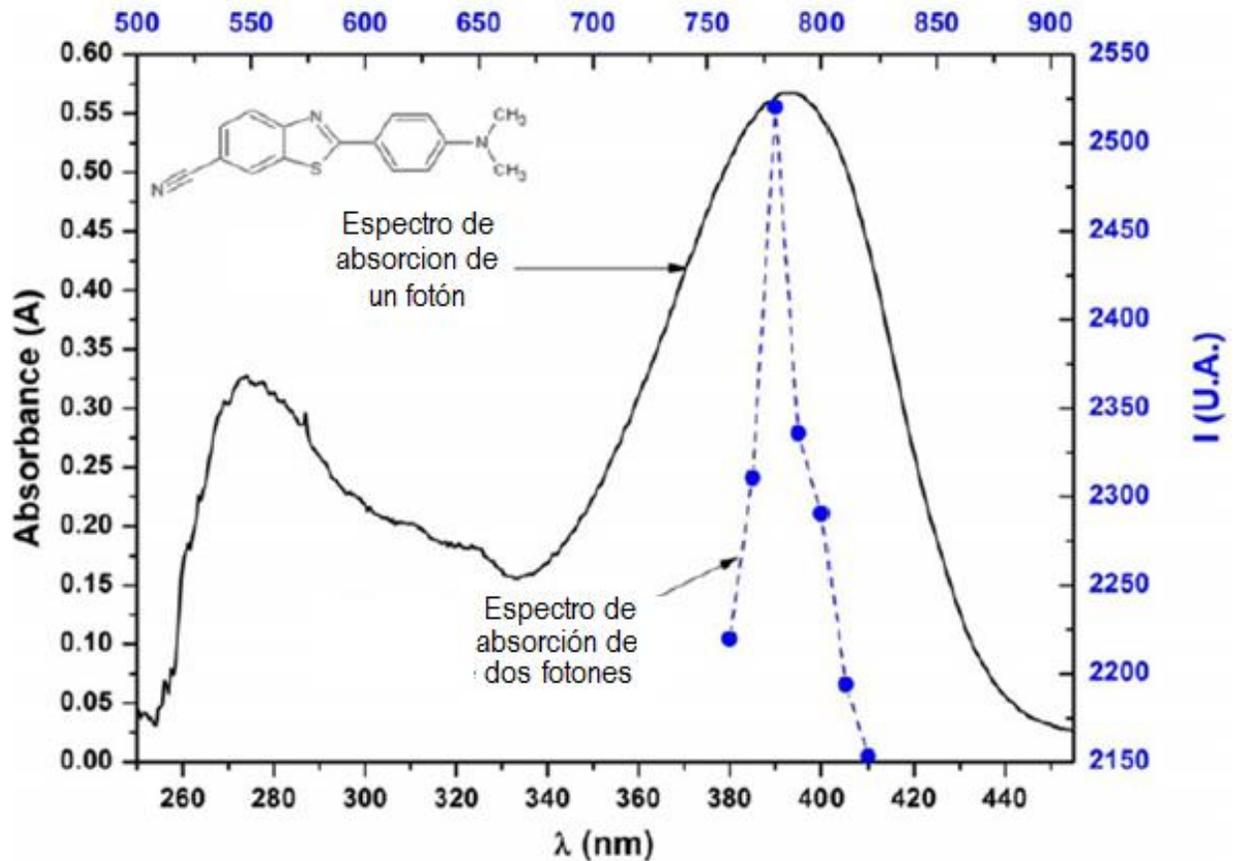


Figura 11. Espectro de absorción lineal y de fluorescencia por TPA del colorante DBC en DMSO⁽⁸⁹⁾.

En esta grafica se puede apreciar que el máximo de intensidad de fluorescencia en la absorción de dos fotones está centrado en los 780nm aproximadamente mientras que para la absorción de un fotón está centrado en 390nm aproximadamente. El hecho de que se utilice la mitad de la energía en los estudios por absorción de dos fotones permite que los análisis sean menos agresivos sobre las muestras, de igual manera, al usar una fuente de radiación como son los láseres, la zona de incidencia es muy puntual en tiempo y espacio con respecto a lo que podría ser el uso de lámparas. Por estas razones observamos que esta técnica ha tomado una gran importancia en el estudio de células vivas.

Por otro lado, se deben resaltar algunos antecedentes que justifican el interés en el estudio de la muestra que se trabajará en esta investigación. De esta manera, resaltamos el trabajo realizado por Ono y colaboradores, en el cual se estudió una chalcona, véase la Figura 12, para probar potenciales aplicaciones como biomarcador para identificar y hacer seguimiento a pacientes con riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer ⁽¹⁾. Cabe destacar que existe una fuerte similitud entre la muestra de interés en este trabajo y la estudiada por Ono y colaboradores.

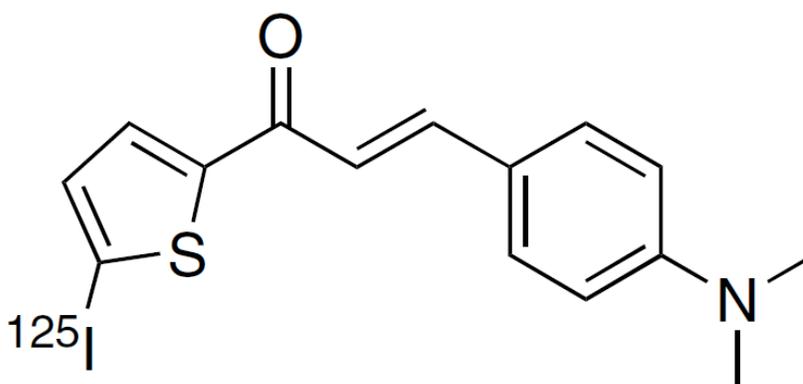


Figura 12. Chalcona trabajada por Ono y colaboradores⁽¹⁾.

Finalmente, debemos resaltar el trabajo realizado en 2015 por Rodríguez-Lugo y colaboradores en donde se sintetizó la muestra que se estudiará en esta investigación. Este trabajo presenta información estructural de la molécula y abre las puertas a estudios avanzados en cuanto a actividad y aplicaciones biológicas, el efecto del empaquetamiento de estado sólido en la intensidad de fluorescencia y modelados de procesos potenciales de absorción de dos fotones ⁽⁴⁰⁾.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Estudiar la absorción de dos fotones en colorantes orgánicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar la respuesta óptica lineal de colorantes mediante espectroscopia UV-Visible y de fluorescencia.
- Evaluar la absorción de dos fotones mediante fluorescencia inducida por radiación láser.
- Determinar la sección eficaz de dos fotones mediante la técnica de espectroscopia de absorción de dos fotones.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

REACTIVOS

La muestra que se utilizó en este trabajo fue sintetizada por el profesor Neudo Urdaneta en el Laboratorio de Síntesis Orgánica de la Universidad Simón Bolívar, en Sartenejas, estado Miranda, Venezuela.

La *(2E)-1-(5-chlorothiophen-2-yl)-3-[4-(dimethylamino)phenyl]prop-2-en-1-one* es un compuesto sólido de color anaranjado intenso perteneciente al grupo de moléculas orgánicas conocido como chalconas. Posee un peso molecular de 291.78 g/mol. Su fórmula molecular es $C_{15}H_{14}ClNOS$ y su estructura química se presenta en la Figura 13. Por practicidad, de ahora en adelante se referirá a este compuesto como Chalcona.

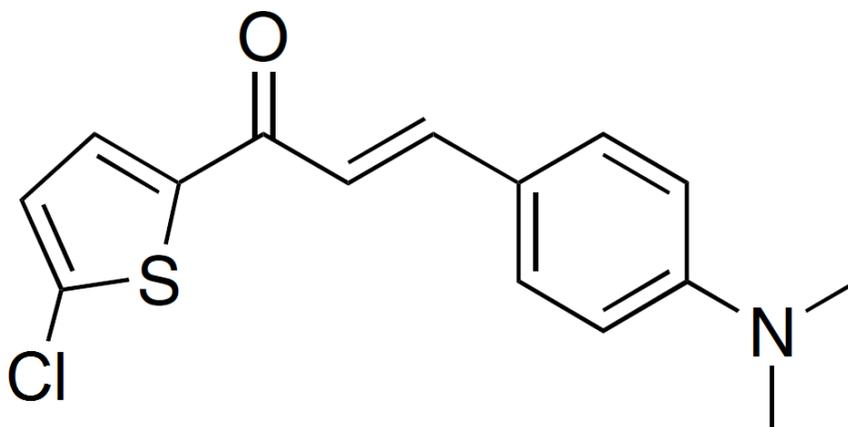


Figura 13. Estructura química de la *(2E)-1-(5-chlorothiophen-2-yl)-3-[4-(dimethylamino)phenyl]prop-2-en-1-one*.

Por otro lado, el patrón utilizado fue la Rodamina B, cuya fórmula molecular es $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$ con peso molecular de 479.02 g/mol, fabricada por la compañía *Merck*. Este compuesto es un sólido granulado de color verde intenso, con una pureza igual o mayor al 90%, y densidad de 1.31g/cm^3 a 20°C según el empaque. En la Figura 14 se presenta su estructura química.

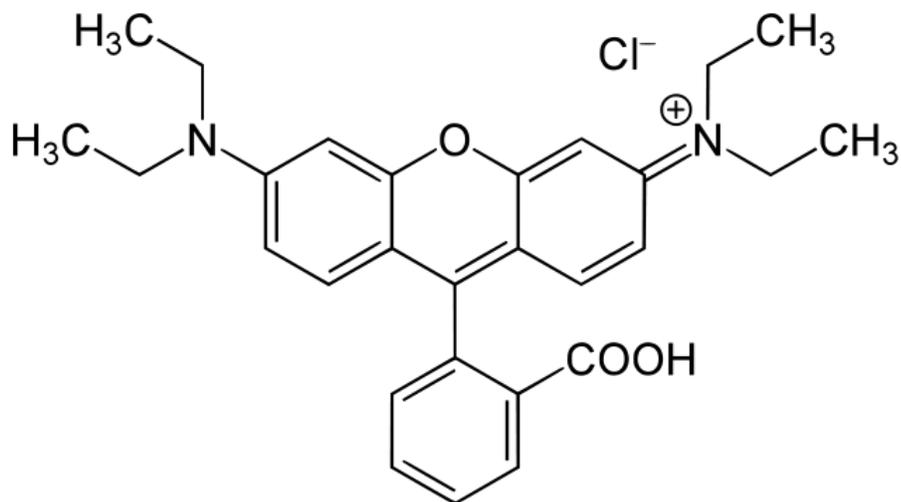


Figura 14. Estructura química de la Rodamina B.

Finalmente, se utilizaron la acetona, el dimetilsulfóxido y el metanol como solventes, los dos primeros fabricados por la compañía *Merck*, con un porcentaje de pureza mayor al 99.5%, mientras que el metanol fue fabricado por la compañía *Sigma Aldrich* con una pureza del 99.9%. En la Tabla 2 se presentan algunas propiedades fisicoquímicas de estos solventes y en la Figura 15 se pueden observar sus estructuras químicas.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de la acetona, DMSO y metanol⁽⁴¹⁾.

Propiedad Fisicoquímica	ACETONA	DIMETILSULFÓXIDO	METANOL
<i>Fórmula Molecular</i>	C ₃ H ₆ O	C ₂ H ₆ OS	CH ₄ O
<i>Peso Molecular (g/mol)</i>	58.08	78.13	32.04
<i>Densidad a 20°C (g/cm³)</i>	0.791	1.10	0.792
<i>Punto de ebullición (°C)</i>	56.1	189	64.5
<i>Presión de vapor (hPa)</i>	240	----	128
<i>Índice de refracción</i>	1.3587	1.4793	1.3284
<i>Polaridad relativa</i>	0.355	0.444	0.762

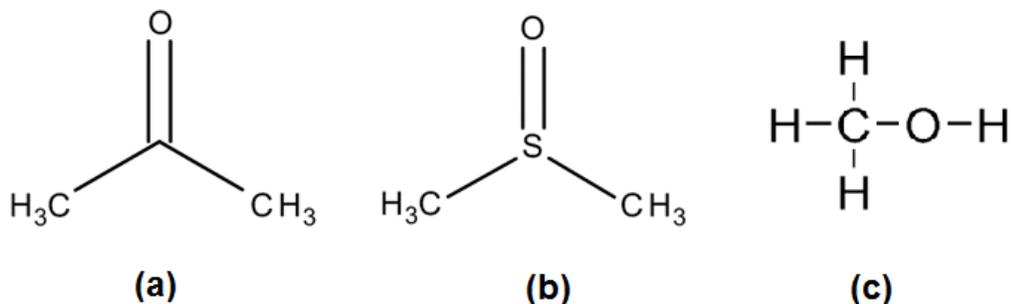


Figura 15. Estructura química de la acetona (a), DMSO (b) y metanol (c).

METODOLOGÍA

SELECCIÓN DEL SOLVENTE

Los solventes utilizados fueron acetona, dimetilsulfóxido y metanol. Se realizó una prueba de solubilidad y posteriormente se obtuvieron los espectros de fluorescencia lineal para la muestra en aquellos solventes donde fue soluble. Las soluciones a las que se les determinó el espectro se realizaron a concentraciones iguales de manera de seleccionar aquel solvente en el cual la muestra presentara mayor intensidad de fluorescencia.

DETERMINACIÓN DE ESPECTROS DE ABSORCIÓN Y FLUORESCENCIA

Se prepararon soluciones de igual concentración tanto de la muestra como del patrón seleccionado y se obtuvieron los espectros de absorción UV-Visible y de fluorescencia. Para la obtención del espectro de absorción UV-Visible se utilizó un montaje que se presenta en la Figura 16 corrigiendo la señal de fondo del entorno y del equipo; los datos fueron procesados con el programa Ocean Optics™ SpectraSuite.

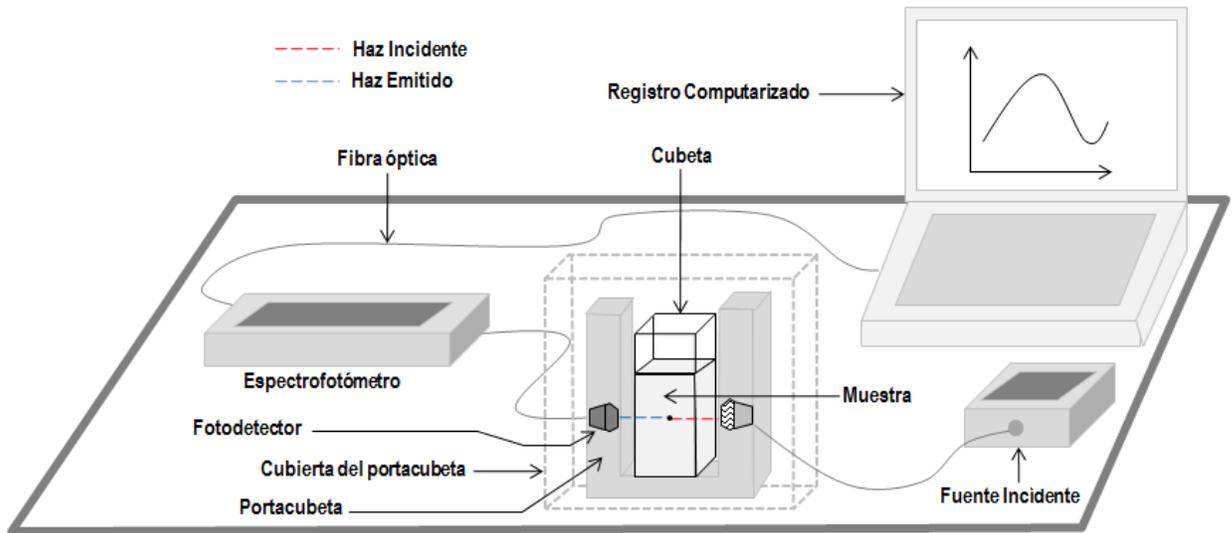


Figura 16. Montaje experimental para la espectroscopía de absorción UV-Visible⁽²⁵⁾.

Por otro lado, el montaje para la obtención del espectro de fluorescencia se presenta en la Figura 17. Para ello se utilizó como fuente de excitación el haz de una lámpara UV a 350nm. Dicho haz se dirigió hacia una cubeta de cuarzo para medidas de fluorescencia de 1cm de longitud donde se encontraba la solución. La cubeta de cuarzo se encontraba fija por medio de un portacubetas de 1cm de longitud, acoplado con fibra óptica de alta sensibilidad. Después de que la muestra interactuó con el haz, se recopilaron las señales de absorción en el detector de un espectrofotómetro CCD. A partir del procesamiento de los datos se realizó el cálculo de las áreas de los espectros de fluorescencia, obtención de máximos de las curvas y los suavizados de las mismas.

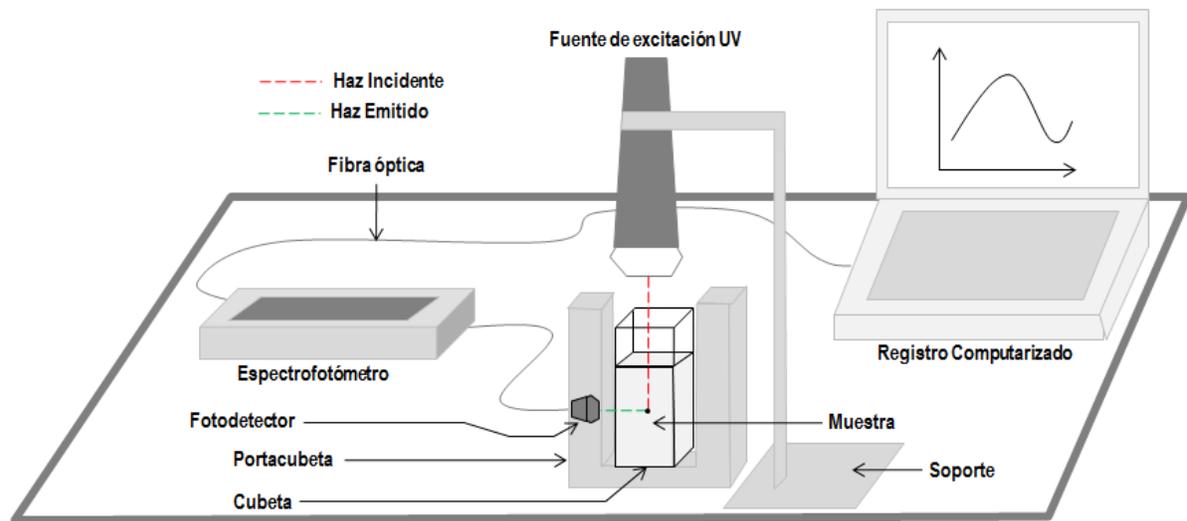


Figura 17. Montaje experimental para la espectroscopía de fluorescencia ⁽²⁵⁾.

DETERMINACIÓN DE ESPECTRO DE FLORESCENCIA POR TPA

En la Figura 18 se presenta el montaje experimental utilizado para la obtención de los espectros de emisión de fluorescencia correspondiente a la absorción de dos fotones. Para el estudio de la muestra se trabajó a longitudes de onda entre (840-900)nm, y la determinación de la sección eficaz y la dependencia en potencia para el espectro de dos fotones fue llevada a cabo a una longitud de onda de excitación de 870nm.

Como fuente de excitación se empleó un haz de un láser pulsado de Neodimio Nd:YAG (Continuum™ SLII-10) con pulsos de 10ns y energías promedio entre (100-160) μ J, con longitudes de onda de salida de 355nm. Este dispositivo estaba acoplado a un oscilador óptico paramétrico OPO (por sus siglas en inglés *Optical Parametric Oscillator*) (Continuum™ Surelite OPO Plus), que permitió utilizar el haz de excitación con longitud de onda variable entre (450-950)nm.

El haz se dirigió a un obturador (Thor Labs™) el cual redujo el tamaño del haz. Posteriormente, se dirigió a un espejo (Edmund Optics™) el cuál desvió en ángulo recto el haz hacia otro obturador para disminuir adicionalmente el tamaño del mismo. Luego el haz se dirigió hacia un atenuador linealmente polarizado (Newport RS™), el cual vario la potencia del haz con el cambio de la polaridad. Después el haz continuó hacia una lente (Edmund Optics™), la cual lo enfocó antes de que alcanzara un divisor de haz (Newport RS™), el cual desvió una parte del mismo hacia un detector de energía (ThorLabs™ DET 110) que estaba conectado a un medidor de potencia (Coherent™ Field Max) de rango de energía entre (0,5-0,7) mJ. Una parte del haz fue hacia una lente antes de alcanzar la cubeta con la muestra. La emisión de fluorescencia de la muestra se detectó con un fotodetector que transmitió la señal por fibra óptica a un espectrofotómetro CCD (Ocean Optics™ USB 2000) y de allí al registro computarizado.

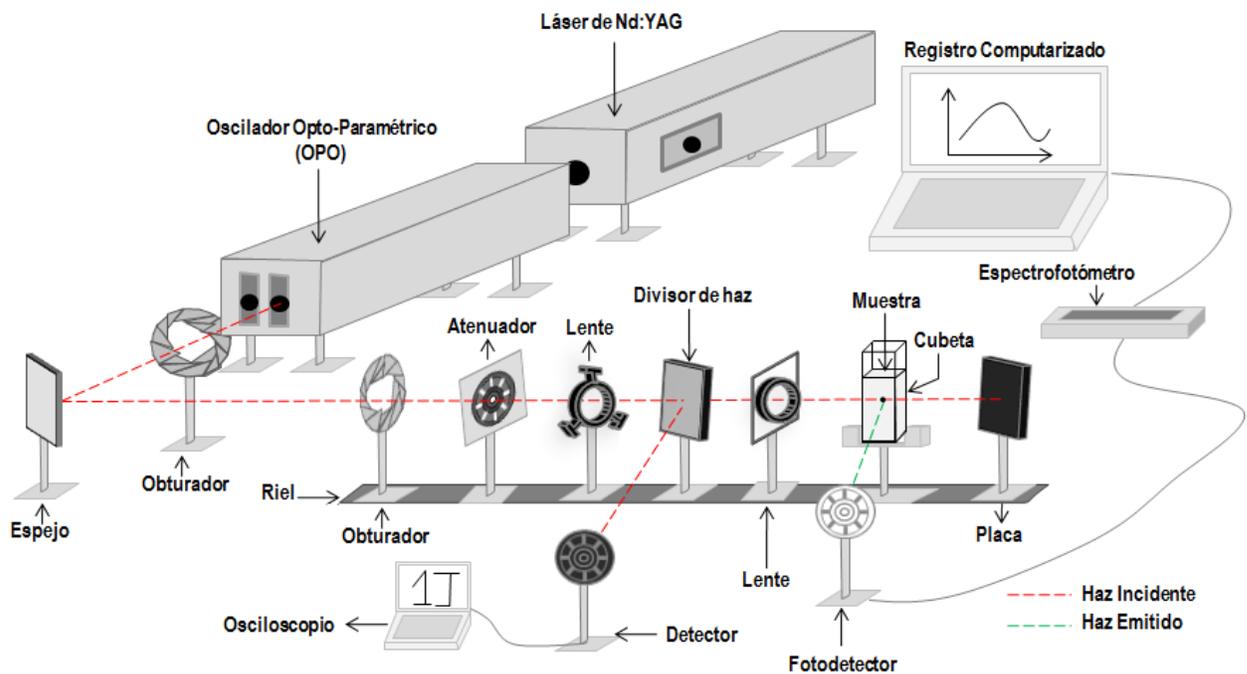


Figura 18. Montaje experimental para la espectroscopía de fluorescencia de dos fotones ⁽²⁵⁾.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La determinación del rendimiento cuántico de fluorescencia y la sección eficaz de absorción de dos fotones de la chalcona fue realizado con el propósito de evaluar si esta molécula puede ser propuesta para ser utilizada en aplicaciones de óptica no lineal tales como la terapia fotodinámica ⁽¹²⁾, microscopía confocal ⁽⁴²⁾, marcadores fluorescentes de dos fotones ⁽⁴³⁾, entre otros. Por medio del tratamiento experimental propuesto anteriormente se analizaron los espectros de absorción y de emisión por fluorescencia de uno y dos fotones de la muestra estudiada. En el análisis de los resultados obtenidos, es necesario evaluar la ecuación [10] para determinar el rendimiento cuántico de fluorescencia y la ecuación [25] para determinar la sección eficaz de dos fotones, así como sus respectivos errores asociados.

En primer lugar, se realizó la caracterización de la muestra con la que se trabajó durante esta investigación de manera de verificar la estructura y pureza de la misma. Para esto se realizó un análisis espectroscópico de resonancia magnética nuclear de protones, en cual presentó el espectro que se muestra en la Figura 19.

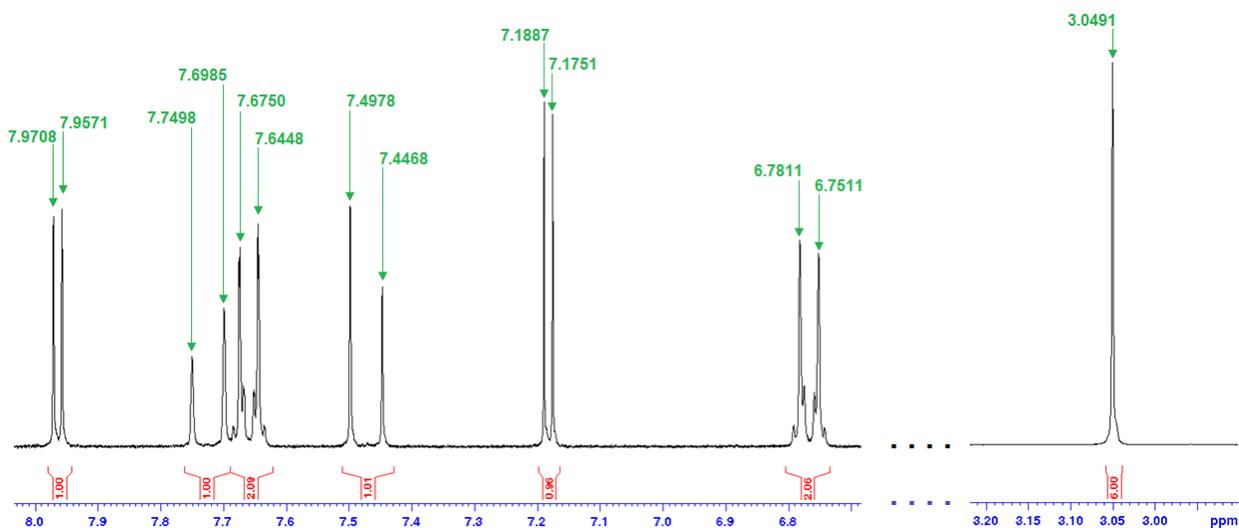


Figura 19. Espectro de RMN- ^1H para la muestra.

Del espectro anterior se obtuvieron los valores reportados en la Tabla 3, con los cuales se lograron identificar los protones pertenecientes a la molécula en estudio, tal y como se presenta en la Figura 20.

Tabla 3. Valores e información obtenida del espectro RMN- H^1 para la muestra.

PROTÓN	ppm	Multiplicidad	Hidrógenos equivalentes	Constante de acoplamiento J (Hz)
<i>H3</i>	7.9708	Doblete	1	4.11
<i>H7</i>	7.7498	Doblete	1	15.39
<i>H10</i>	7.6985	Doblete	2	9.06
<i>H8</i>	7.4978	Doblete	1	15.30
<i>H4</i>	7.1887	Doblete	1	4.08
<i>H11</i>	6.7811	Doblete	2	9.00
<i>H14</i>	3.0491	Singlete	6	-----

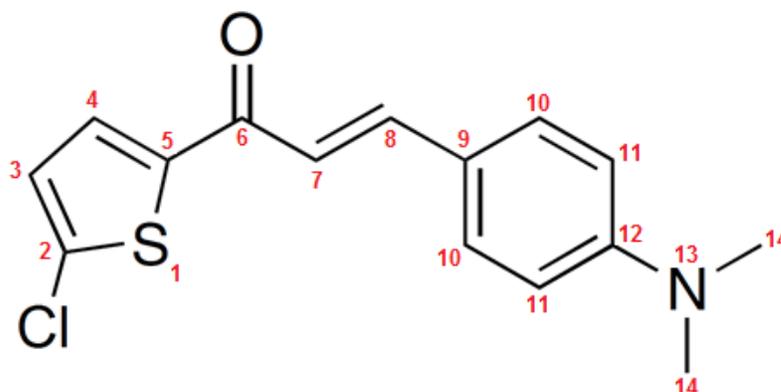


Figura 20. Representación de los átomos de hidrógenos numerados para la muestra.

Debemos destacar que a aquellos protones que son equivalentes se les identificó con la misma numeración. Ahora bien, una vez que se calcularon las constantes de acoplamiento para los respectivos picos se observó que existe una alta similitud entre los valores para los protones H3 y H4, H7 y H8, y H10 y H11, los que nos permite determinar que son protones vecinales mostrados en la Figura 20.

Al comparar los valores obtenidos con los reportados por Rodríguez-Lugo y colaboradores ⁽⁴⁰⁾ en 2015 en el estudio cristalográfico de la muestra en estudio, vemos que efectivamente la molécula con la que se realizó este trabajo es la presentada en la Figura 13 y presenta una alta pureza al observar una gran resolución en el espectro de RMN- H^1 presentado en la Figura 19.

Por otro lado, se determinó la pureza de la Rodamina B para comprobar si este reactivo sería apropiado para ser el patrón a utilizar. Para esto se determinaron los espectros de absorción UV-Visible para soluciones equimolares de Rodamina B en acetona y DMSO tal y como se observa en la Figura 21. Cabe destacar que previo a esta medida se realizaron pruebas de solubilidad de la muestra en diferentes solventes tales como etanol, metanol, agua, acetona y DMSO; obteniendo que para los tres primeros la solubilidad era baja. Por esta razón los solventes con los que se trabajó fueron acetona y DMSO.

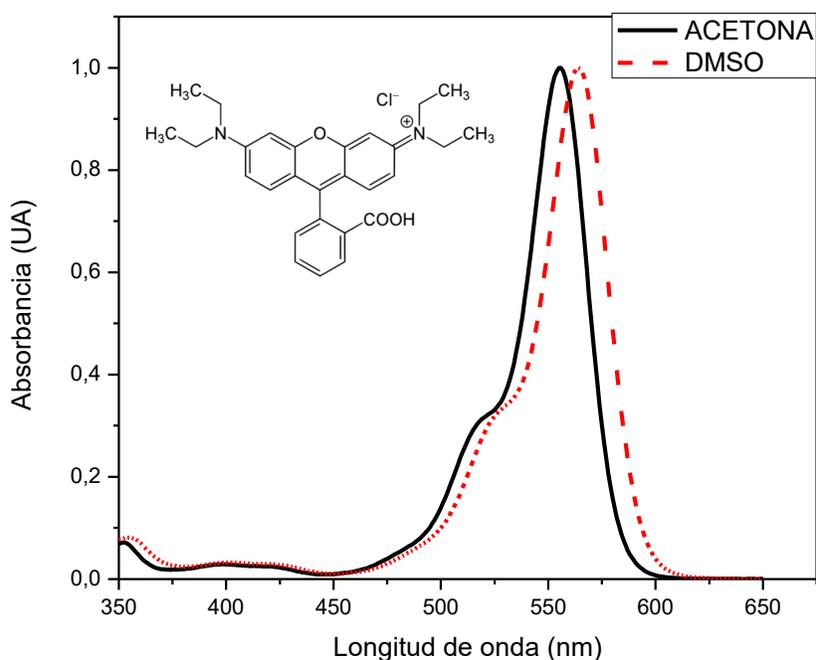


Figura 21. Espectros normalizados de absorción UV-Visible para Rodamina B en acetona y DMSO.

Comparando estos espectros con los reportados en la literatura ⁽⁴⁴⁾, vemos que la correspondencia en forma y pico máximo de absorción determinan una alta pureza del compuesto, lo que nos permite concluir que es un reactivo apropiado para ser utilizado como patrón en esta investigación. Una vez que se determinó la pureza de la Chalcona y de la Rodamina B, se procedió a seleccionar el solvente apropiado. El parámetro de selección del solvente fue aquel en el cual la muestra presentara una mayor fluorescencia. Para esto se prepararon soluciones equimolares de la muestra en acetona y DMSO, y se midió el espectro de fluorescencia.

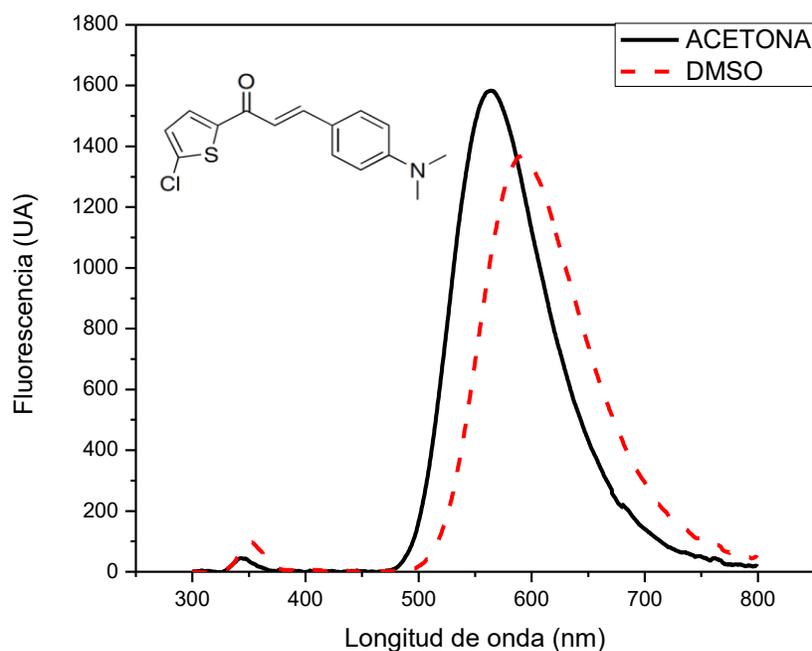


Figura 22. Espectros de fluorescencia para la Chalcona en acetona y DMSO. Longitud de onda de excitación de 350nm.

En la Figura 22 vemos que el solvente en el cual se presenta mayor fluorescencia es la acetona. En la literatura ⁽⁴⁵⁾ encontramos que la relación entre la polaridad del solvente y la intensidad de fluorescencia es directamente proporcional debido a que se promueve la formación de cargas y por ende la resonancia en el sistema π conjugado.

A pesar de esto vemos que la mayor fluorescencia se presenta utilizando la acetona como solvente. Esto se debe a que la molécula de DMSO es de mayor tamaño que la de acetona, impidiendo así una interacción eficiente. Ahora bien, con los resultados obtenidos se determinó que la acetona sería el solvente a utilizar y se procedió a realizar las soluciones respectivas. Además, en esta misma figura se puede apreciar una diferencia entre las longitudes de onda correspondientes a los picos máximos de fluorescencia haciendo uso de cada uno de los solventes. La acetona presenta un desplazamiento hacia el azul o desplazamiento hipsocrómico con respecto al DMSO debido a que la acetona promueve una separación mayor entre el estado fundamental y el primer estado electrónico excitado de la muestra. Una vez que se seleccionó el solvente a utilizar se prepararon soluciones equimolares tanto de patrón como de muestra en acetona y se determinaron los espectros de absorción UV-Visible en función del tiempo para verificar si existe algún tipo de descomposición tanto para la muestra como para el patrón. En la Figura 23 se puede observar que la muestra no presenta cambios significativos respecto a la forma de la curva ni respecto a la intensidad del pico máximo de absorción.

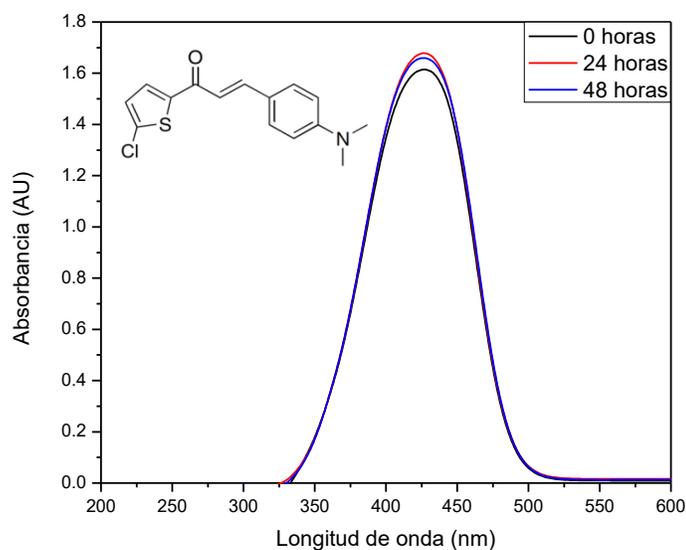


Figura 23. Espectros de absorción UV-Vis para Chalcona en acetona en función del tiempo.

Sin embargo, en la Figura 24 vemos que para el patrón si hay cambios significativos en cuanto a la intensidad del pico máximo de absorción.

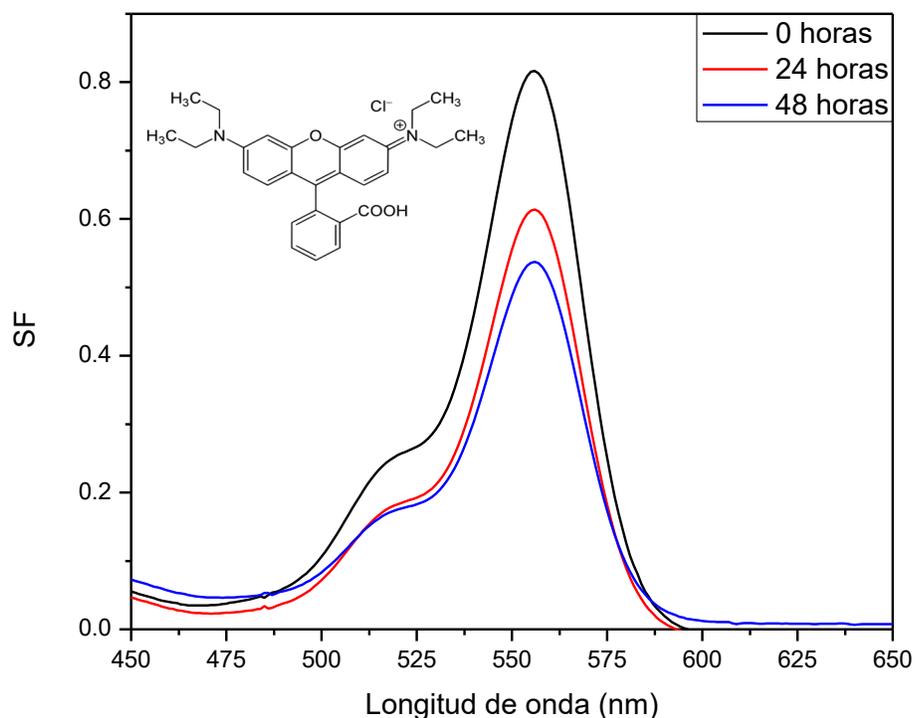


Figura 24. Espectros de absorción UV-Visible para la Rodamina B en acetona en función del tiempo.

Vemos entonces que para la Chalcona existe un ligero aumento en la intensidad del pico máximo del espectro de absorción en función del tiempo que puede ser consecuencia de la ligera evaporación del solvente, sabiendo que la acetona es altamente volátil. A pesar de esto, vemos que para la solución de Rodamina B existe una disminución significativa en cuanto a la intensidad del pico máximo del espectro de absorción. A través de estos resultados podemos decir que existe algún cambio en la estructura molecular de la Rodamina B, mientras que la Chalcona no sufre ningún cambio estructural en función del tiempo.

Este cambio puede ser explicado a través estudio realizado por Stevens y Mingham en 1963 ⁽⁴⁶⁾, el cual indica que la Rodamina B en solución de acetona puede sufrir una isomerización, transformándose a una especie incolora tal y como se muestra en la Figura 25. Según este estudio, esta isomerización ocurre si existe al menos un pequeño porcentaje de agua en el medio, el cual, en nuestro experimento, puede ser una consecuencia de la humedad del ambiente en donde se almacenaban las muestras día tras día. Sin embargo, para corregir este hecho, los experimentos de absorción de dos fotones y de fluorescencia que se presentarán a continuación fueron realizados con soluciones preparadas el mismo día de manera que la isomerización de la Rodamina B no afectara los resultados experimentales.

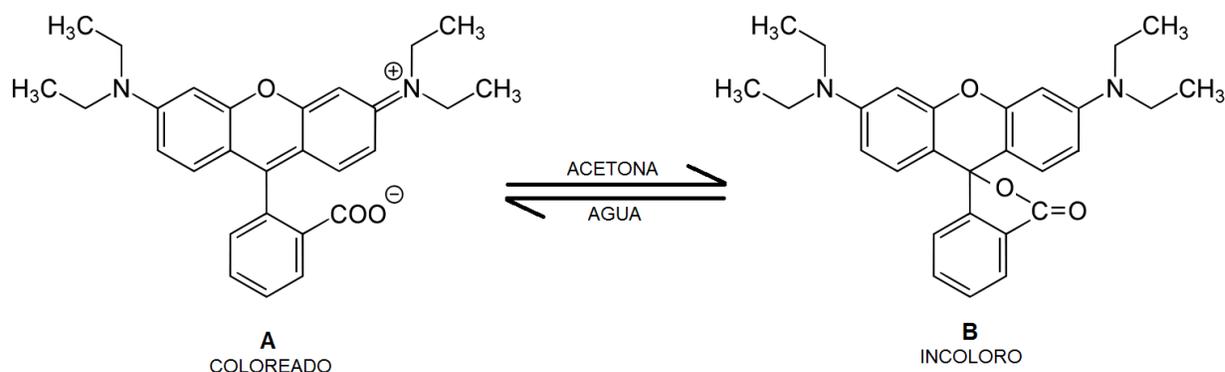


Figura 25. Reacción de isomerización de la Rodamina B en solución de acetona y agua ⁽⁴⁶⁾.

De esta manera se prepararon soluciones madres de Chalcona y Rodamina B a una concentración de aproximadamente 0.5 mM, y a partir de ellas soluciones diluidas a una concentración de 0.2 μ M aproximadamente. A estas últimas, se les determinó el espectro de absorción lineal UV-Visible, véase Figura 26, así como el espectro de fluorescencia, véase Figura 27.

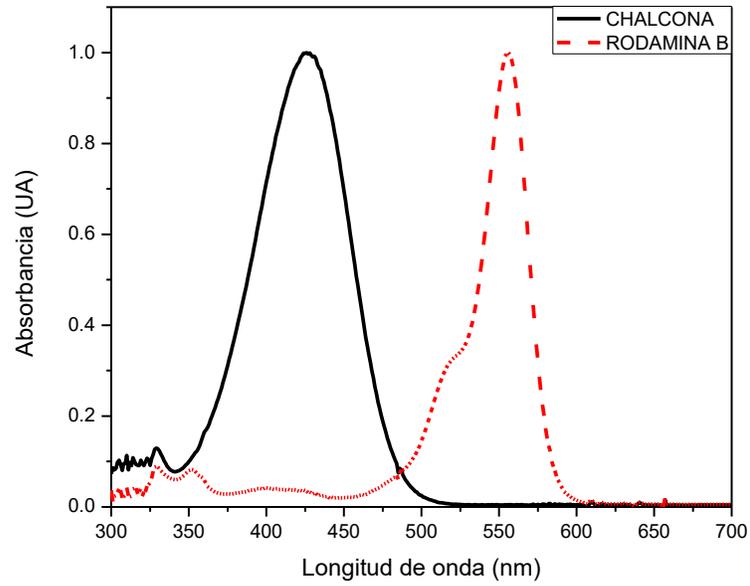


Figura 26. Espectros normalizados de absorción UV-Visible para Chalcona y la Rodamina B en acetona [0.2 μM].

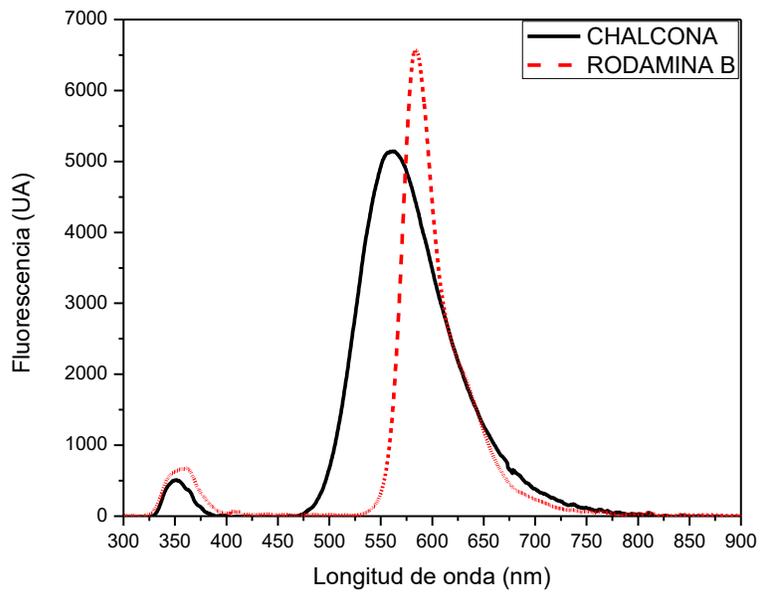


Figura 27. Espectros de fluorescencia para Chalcona y Rodamina B en acetona [0.2 μM] a una longitud de onda excitación de 350nm.

Los espectros de fluorescencia nos permiten ver que la intensidad del pico máximo del espectro la fluorescencia para la Rodamina B es mayor que para la Chalcona, sin embargo, el área bajo la curva que viene dada por la integral es mayor para la Chalcona tal y como vemos en Tabla 4. Estos valores corresponden con lo esperado experimentalmente ya que una de las características que se busca en el patrón es que la intensidad de fluorescencia sea mayor o al menos comparable con la de la muestra a estudiar.

Tabla 4. Intensidades del pico máximo y áreas de la señal de fluorescencia para la Chalcona y Rodamina B en acetona a una longitud de onda de excitación de 350nm y concentración de 0.2μM.

	INTENSIDAD PICO _{MAX}	ÁREA
<i>CHALCONA</i>	5100 ± 35	525873 ± 5636
<i>RODAMINA B</i>	6527 ± 39	386631 ± 682

Ahora bien, tomando los valores del área podemos calcular el rendimiento cuántico de fluorescencia haciendo uso de la ecuación [10], reiterando que las medidas espectroscópicas fueron realizadas estrictamente bajo las mismas condiciones experimentales, de manera que el sentido relativo de la medida se cumple a cabalidad.

$$\Phi_m(\lambda) = \Phi_p(\lambda) \frac{S_m}{S_p} \quad [10]$$

Recordamos que Φ representa el rendimiento cuántico por fluorescencia y S la señal de fluorescencia de la absorción de un fotón. Los subíndices m y p corresponden a la muestra y el patrón respectivamente. De esta manera calculamos el rendimiento cuántico de fluorescencia, véase la Tabla 5. El rendimiento cuántico del patrón fue calculado de igual manera utilizando el valor del rendimiento cuántico de la Rodamina B en metanol reportado en el trabajo de Bindhu y colaboradores ⁽⁴⁷⁾. En la Figura 28 vemos los espectros de fluorescencia para la Rodamina B en acetona y metanol en condiciones iguales de concentración y fuente de excitación.

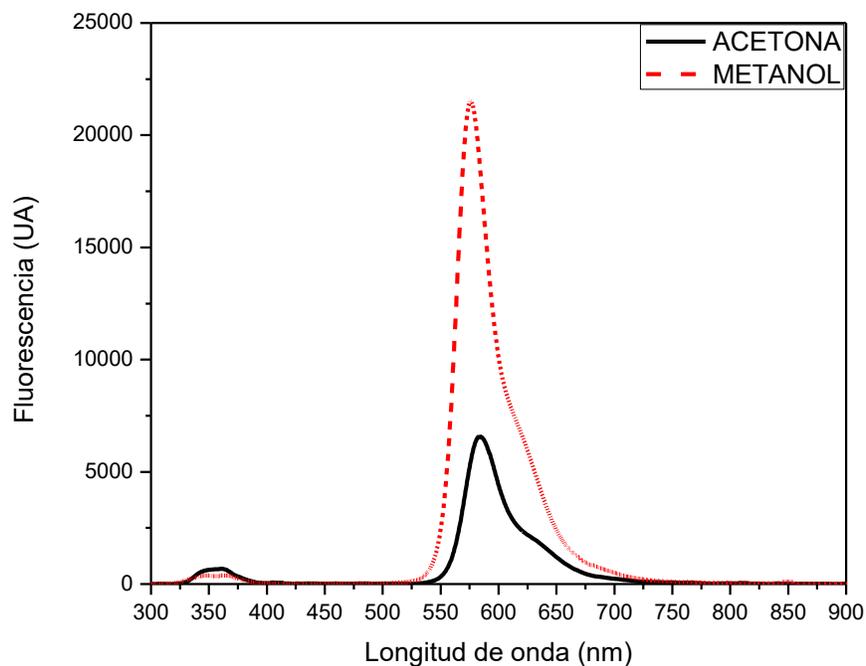


Figura 28. Espectros de fluorescência para Rodamina B em acetona y metanol [0.2 μ M] a una longitud de onda excitación de 350nm.

Observamos que existe una diferencia significativa entre los espectros de fluorescencia de la Rodamina B en metanol y acetona, donde este último presenta una disminución respecto al primero. Realizando la misma comparación que vimos en la Figura 22, cuando comparamos los espectros de fluorescencia de la Chalcona en acetona y DMSO, vemos que debido a que el metanol es un solvente de mayor polaridad que la acetona, se promueve una mayor formación de cargas y por ende una mayor resonancia en el sistema π conjugado. Además, el tamaño de la molécula de metanol es mucho menor que el de la acetona, permitiendo que exista una mayor interacción entre el solvente y el soluto ⁽⁴⁵⁾. Ahora bien, una vez que se determinó el rendimiento cuántico de la Rodamina B en acetona, haciendo uso de los valores reportados para la misma molécula en metanol, se calculó el rendimiento cuántico para la Chalcona.

Tabla 5. Rendimientos cuánticos de fluorescencia para la Chalcona y Rodamina B en acetona a una longitud de onda de excitación de 350nm y concentración de 0.2 μ M.

REACTIVO (solvente)	Rendimiento Cuántico
<i>Rodamina B (metanol)</i>	0.76 \pm 0.03 ⁽⁴⁷⁾
<i>Rodamina B (acetona)</i>	0.26 \pm 0.01
CHALCONA (acetona)	0.35 \pm 0.02

En la Tabla 5 observamos que el valor obtenido para el rendimiento cuántico de la Rodamina B en acetona es bastante bajo en comparación con el de la misma molécula en metanol. Como consecuencia a esto vemos que el rendimiento cuántico de la Chalcona también es bajo. Sin embargo, vemos que el rendimiento cuántico obtenido para la muestra es mayor que para el patrón, lo que nos da un indicio de que sus propiedades fotofísicas podrían ser de utilidad en aplicaciones como elaboración de sensores ⁽⁴⁸⁾, microscopia de fluorescencia ⁽⁴⁹⁾, entre otros; áreas donde la Rodamina B tiene un amplio y comprobado uso.

Una vez que hemos calculado el rendimiento cuántico de fluorescencia para la muestra, debemos determinar la sección eficaz de dos fotones, recordando que la determinación de este parámetro permite obtener una medida de la capacidad que poseen las muestras de generar fluorescencia proveniente de un proceso de absorción dos fotones. Para esto se determinaron los espectros de fluorescencia por TPA para varias longitudes de onda de excitación y se calculó el área bajo la curva para cada uno de los espectros de fluorescencia obtenidos. En la Figura 29 se presenta el espectro de fluorescencia por TPA para la Chalcona y la Rodamina B a una longitud de onda de excitación de 870 nm, longitud de onda en la cual se observó la mayor intensidad de emisión por fluorescencia para la muestra y el patrón.

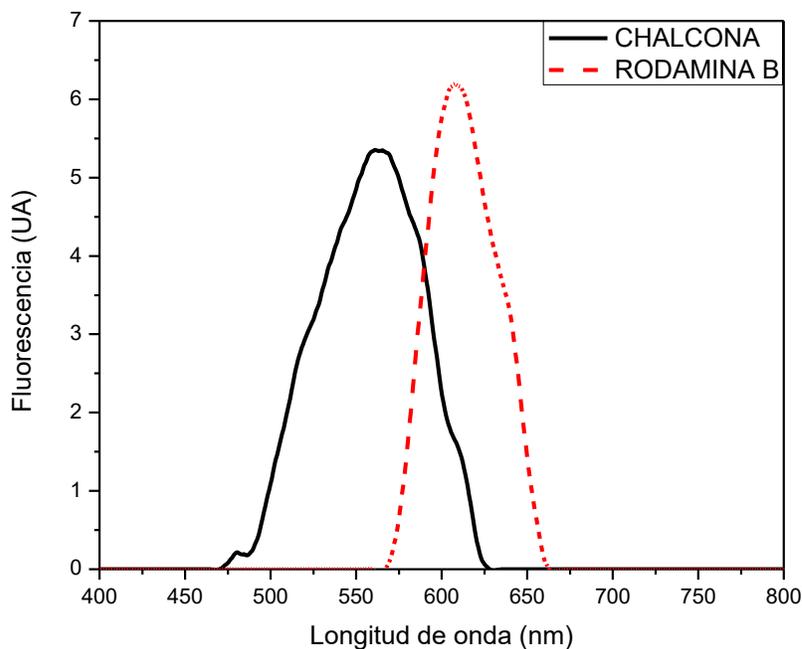


Figura 29. Espectro de fluorescencia para la Chalcona y Rodamina B en acetona [0.5 mM] para una longitud de onda de excitación de 870nm.

Inicialmente se determinó el espectro de fluorescencia a una longitud de onda de excitación del doble de la longitud de onda correspondiente al máximo de intensidad del espectro de absorción de la Chalcona para promover la mayor absorción posible por parte de la molécula. Como vemos en la Figura 21, el pico máximo de absorción para la muestra corresponde a la longitud de onda de 435nm aproximadamente, por lo que el primer espectro de fluorescencia de dos fotones se midió a 870nm para determinar primeramente si existe una señal correspondiente a la absorción de dos fotones.

Al ver la Figura 29 vemos que efectivamente si existe una señal de fluorescencia de dos fotones tanto para la Chalcona como para la Rodamina B. Además, vemos que la banda de la señal de la muestra no se solapa con la banda correspondiente a la señal del láser de excitación, evitando interferencias y manteniendo una buena relación señal ruido.

De esta manera, se realizó un barrido de longitudes de onda de excitación obteniendo que la intensidad de fluorescencia disminuía a medida que nos alejábamos de los 870nm. Adicionalmente, las bandas a distintas longitudes de onda de excitación no presentaron variaciones en términos de desplazamientos batocrómicos o hipsocrómicos, pues todos los espectros tuvieron la misma banda de emisión de fluorescencia por TPA, a 560nm para la Chalcona y 615nm para la Rodamina B. Además, se observó que no hay diferencias sustanciales en la forma de los espectros, al contrario, muchos de ellos se solapan, sólo destacando los adquiridos a 870nm, los cuales fueron de un tamaño mayor al resto de los espectros registrados. Al obtener todos los espectros de fluorescencia por TPA a las distintas longitudes de onda se calculó el área bajo las curvas para cada uno de ellos y se realizó una gráfica de estas áreas en función de la longitud de onda de excitación. En la Figura 30 se presenta la gráfica para la Chalcona y en la Figura 31 para la Rodamina B.

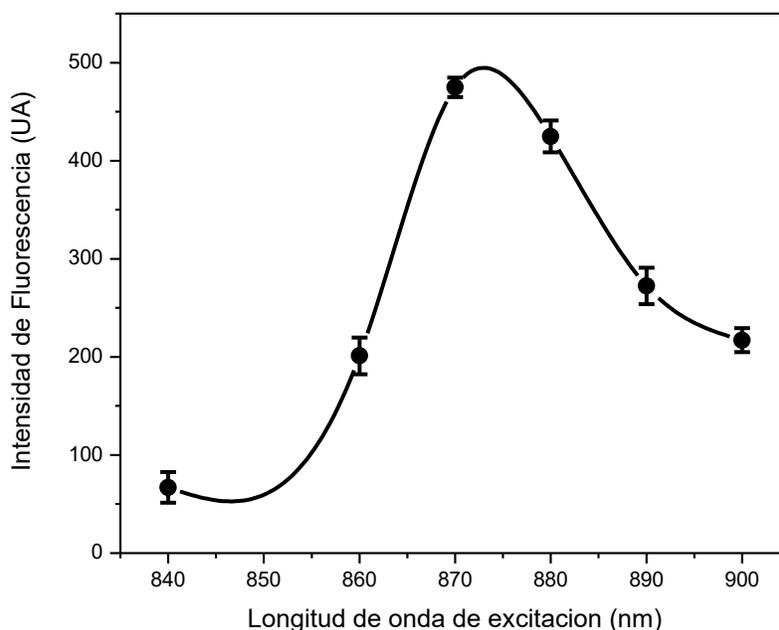


Figura 30. Intensidad de fluorescencia por TPA en función de la longitud de onda de excitación para la Chalcona en acetona.

Vemos entonces que el pico de intensidad de fluorescencia por TPA en función de la longitud de onda de excitación corresponde a 870nm. Esta longitud de onda de excitación corresponde al doble de la longitud de onda máxima de absorción lineal, lo que nos da un indicio de que efectivamente ocurrió la absorción de dos fotones.

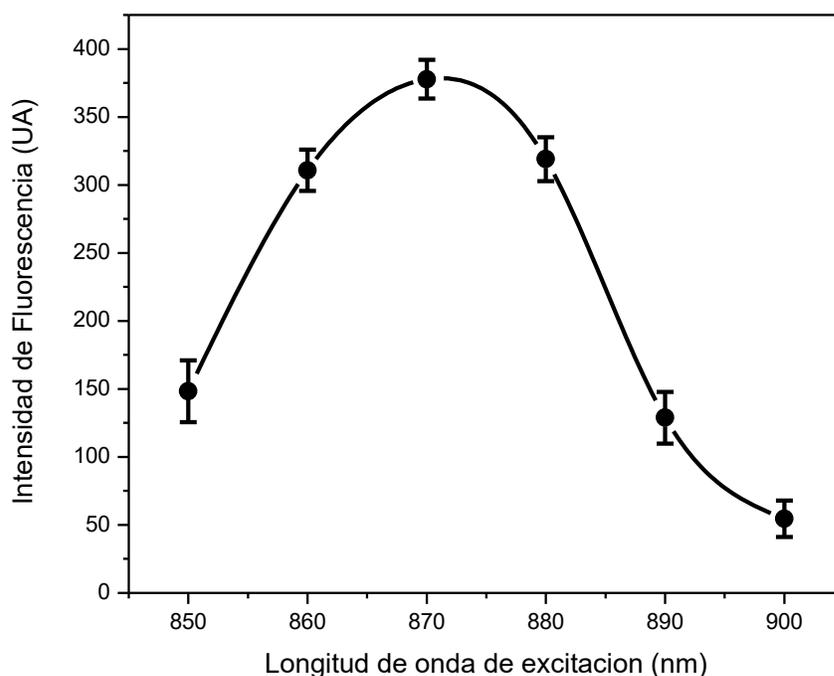


Figura 31. Intensidad de fluorescencia por TPA en función de la longitud de onda de excitación para la Rodamina B en acetona.

En el caso de la Rodamina B también se observa que el pico de intensidad de fluorescencia por TPA en función de la longitud de onda de excitación corresponde a 870nm. En la Figura 32 se compara el espectro de absorción lineal y el de fluorescencia por TPA para la Chalcona. De igual manera en la Figura 33 se presenta la misma comparación para la Rodamina B.

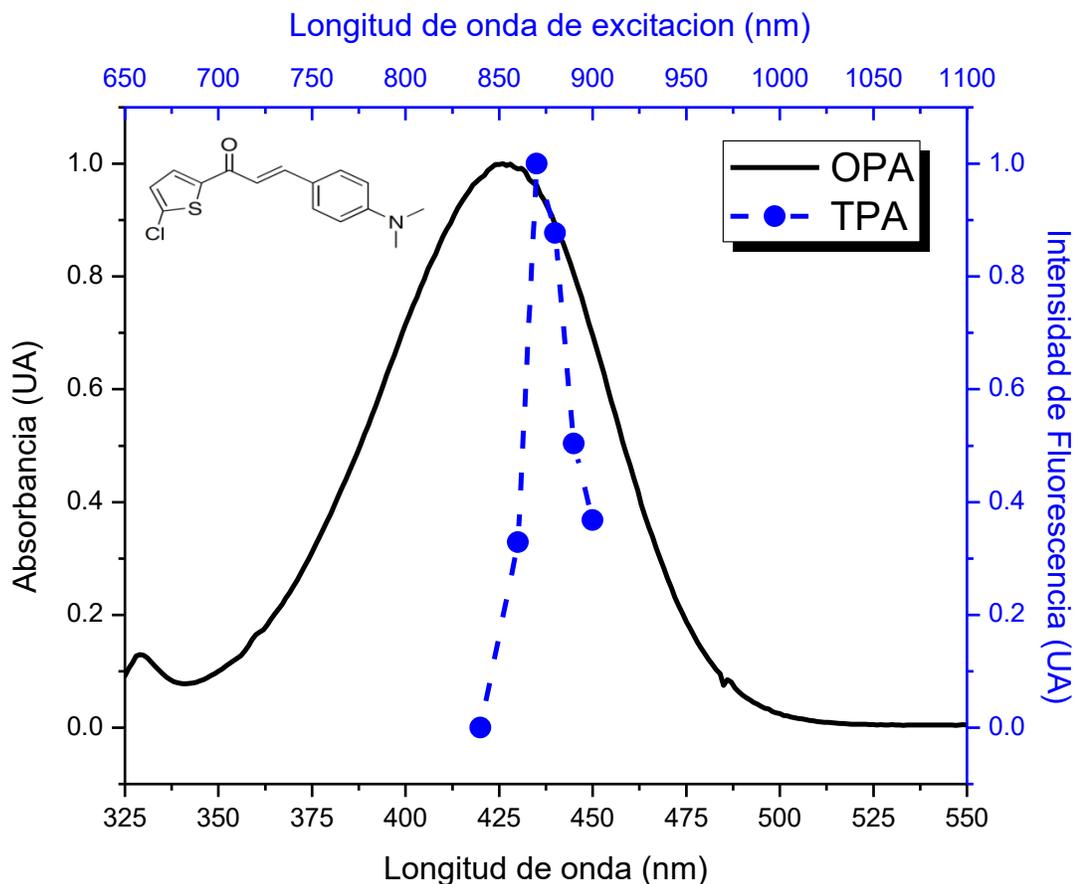


Figura 32. Espectros normalizados de absorción lineal (OPA) y de fluorescencia por TPA para la Chalcona en acetona.

Vemos entonces que efectivamente la longitud de onda de excitación correspondiente al pico del espectro de intensidad de fluorescencia por TPA corresponde aproximadamente al doble de la longitud de onda que el pico máximo del espectro de absorción lineal. Esta grafica nos da un indicio de que efectivamente la molécula logró absorber dos fotones de la mitad de la energía de los absorbidos en proceso lineal, para promover los electrones a un nivel excitado y así lograr la emisión por fluorescencia. Sin embargo, en el caso del patrón vemos que la longitud de onda correspondiente al pico máximo del espectro de absorción lineal no corresponde con el doble de la longitud de onda de excitación para el espectro de fluorescencia por TPA.

Esto sucede debido a que la longitud de onda de excitación seleccionada para el estudio fue en función a la muestra y no al patrón. Aun así, se puede observar una respuesta por parte de la Rodamina B, es decir, a pesar de que la energía de los fotones incidentes no correspondía exactamente a la mitad de energía óptima para la absorción, la molécula logró absorberlos y emitir por fluorescencia.

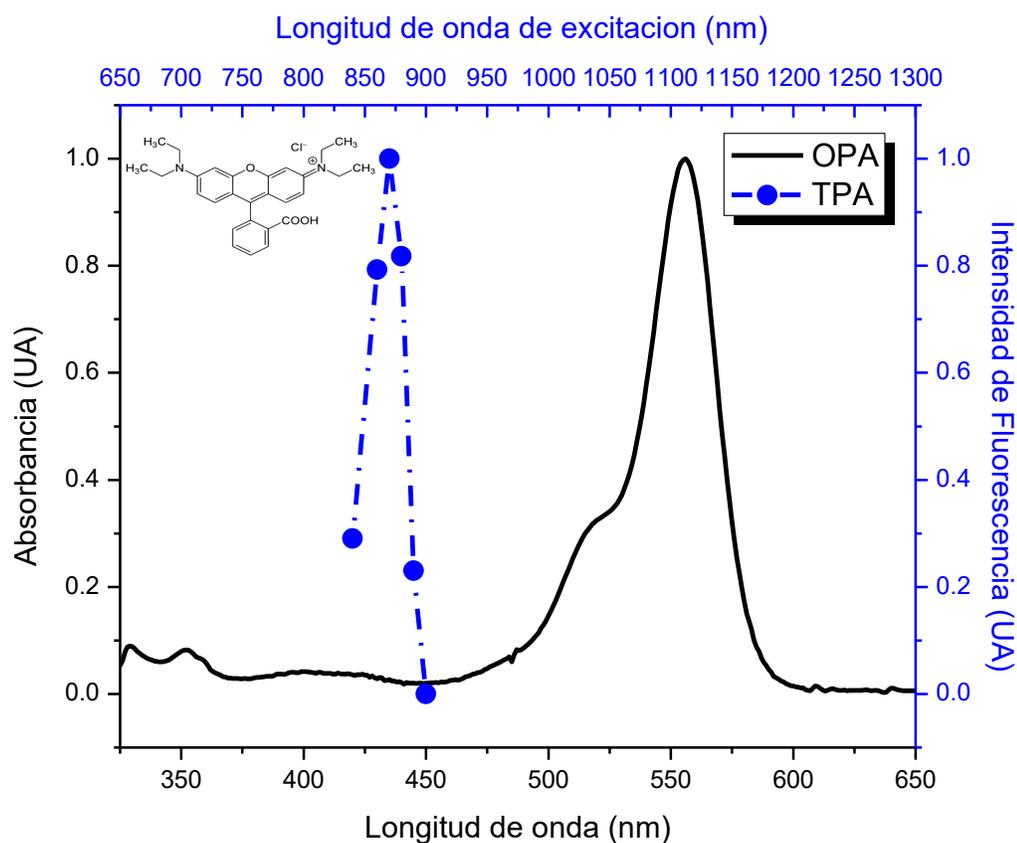


Figura 33. Espectros normalizados de absorción lineal (OPA) y de fluorescencia por TPA para la Rodamina B en acetona.

Con el fin de comprobar si efectivamente la absorción fue de dos fotones, se realizó una gráfica del logaritmo de la intensidad incidente en función al logaritmo de la intensidad de emisión por fluorescencia a una longitud de onda de 870nm para la Chalcona y la Rodamina B, véase Figura 34 y Figura 35 respectivamente.

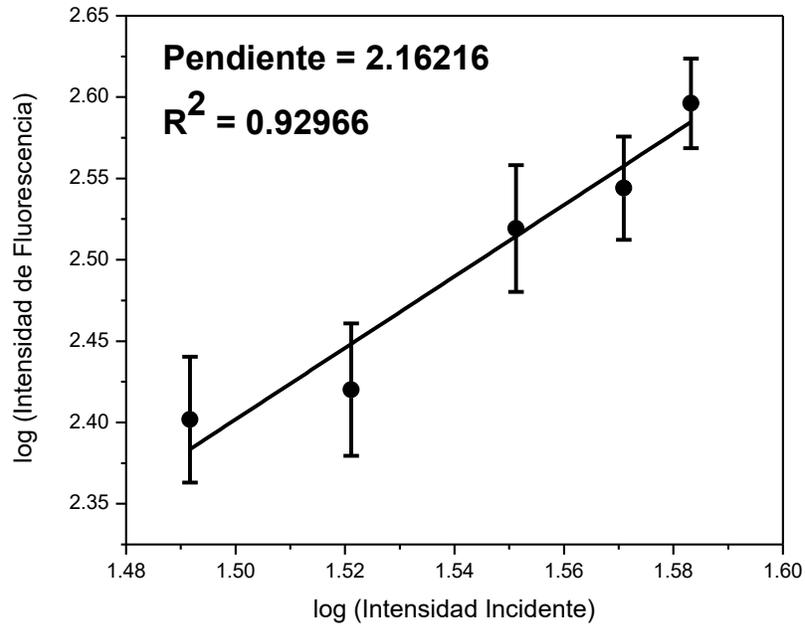


Figura 34. Logaritmo de la Intensidad de fluorescencia vs. logaritmo de la intensidad incidente para la Chalcona en acetona.

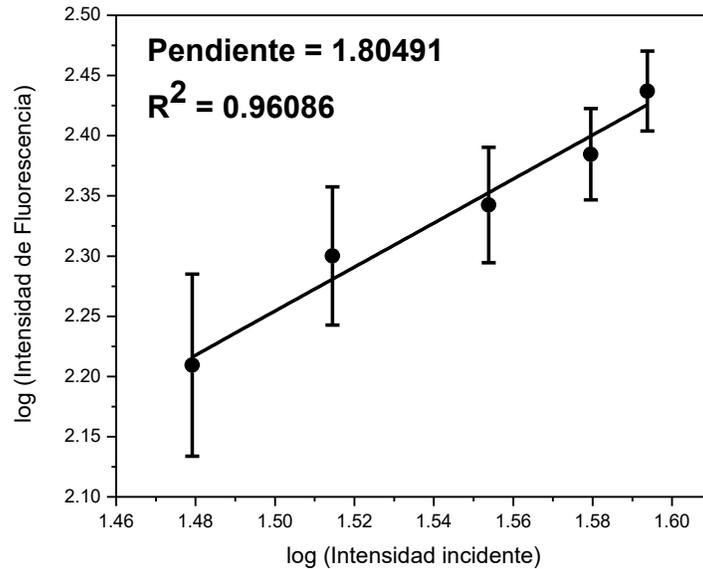


Figura 35. Logaritmo de la Intensidad de fluorescencia vs. logaritmo de la intensidad incidente para la Rodamina B en acetona.

Tal y como vimos anteriormente con el experimento de Kaiser y Garret⁽³³⁾, al realizar una gráfica como las anteriores se puede comprobar la relación entre los fotones absorbidos y los fotones emitidos. De esta manera, vemos que tanto para la muestra como para el patrón existe una relación cuadrática entre la energía de absorción y emisión, lo que determina que efectivamente ocurrió una absorción de dos fotones.

Finalmente, una vez comprobado que la muestra es capaz de presentar absorción de dos fotones debemos calcular la sección eficaz. Recordemos que las secciones eficaces son determinadas con el propósito de obtener una medida de la capacidad que poseen las muestras de generar fluorescencia proveniente de un proceso de absorción dos fotones. Para el cálculo de la sección eficaz de dos fotones se utilizará el rendimiento cuántico calculado anteriormente y el valor de la sección eficaz será el tomado por la literatura⁽⁴⁴⁾, tomando en cuenta que para solventes de diferente polaridad la sección eficaz de dos fotones de la Rodamina B no varía significativamente. De esta manera, se utilizará la ecuación [25] para determinar este parámetro con sus respectivos errores asociados. Este valor junto con los de intensidad de fluorescencia de dos fotones y energía del haz láser antes de ingresar en la muestra se encuentran en la Tabla 6, así como también la sección eficaz de dos fotones para la Rodamina B.

$$\delta_m = \left[\frac{F_m \Phi_p P_p^2}{F_p \Phi_m P_m^2} \right] \delta_p \quad [25]$$

Tabla 6. Parámetros para calcular la sección eficaz de dos fotones de la Chalcona.

PARÁMETRO	Símbolo	Rodamina B	Chalcona
<i>Rendimiento cuántico</i>	Φ	0.26 ± 0.01	0.35 ± 0.02
<i>Sección eficaz de dos fotones (GM)</i>	δ	28 ± 4	29 ± 10

A partir de los valores anteriores podemos ver que la muestra estudiada posee una respuesta similar a la absorción de dos fotones que la Rodamina B, por lo que lo podemos proponerla como un colorante eficaz en el proceso de absorción de dos fotones y en el conjunto de aplicaciones vinculadas tales como microscopia de fluorescencia de dos fotones⁽⁵⁰⁾, entre otras áreas donde la Rodamina B tiene un amplio y comprobado uso.

CONCLUSIONES

Con el estudio espectroscópico de fluorescencia lineal y de dos fotones realizado a la chalcona *(2E)-1-(5-chlorothiophen-2-yl)-3-[4-(dimethylamino)phenyl]prop-2-en-1-one* se conocieron sus propiedades fotofísicas, obteniendo que la especie química en estudio presenta fluorescencia en solución de acetona y dimetilsulfóxido. A través de la determinación del rendimiento cuántico, utilizando una excitación continua de aproximadamente 355nm, se determinó que su eficiencia a presentar fluorescencia en solución de acetona es mayor que la de la Rodamina B bajo las mismas condiciones experimentales de concentración, solvente y fuente de excitación. Los valores obtenidos fueron (0.35 ± 0.02) para la Chalcona y (0.26 ± 0.01) , para la Rodamina B.

Por otro lado, se verificó a través de una gráfica del logaritmo de la intensidad de fluorescencia en función del logaritmo de la intensidad incidente, la relación entre el proceso de absorción y emisión de fluorescencia, dando como resultado que efectivamente la relación es 2 a 1. Lo que evidencia que por cada dos fotones absorbidos se emite uno por emisión de fluorescencia. De esta manera se determinó la sección eficaz de absorción de dos fotones con el propósito de obtener una medida de la capacidad que posee la muestra de generar fluorescencia proveniente de un proceso no lineal de absorción dos fotones, obteniendo valores similares de los reportados para la Rodamina B, (29 ± 10) GM y (28 ± 4) GM, respectivamente.

Con estos resultados se puede proponer a la molécula en estudio para aplicaciones como microscopia de fluorescencia de uno y dos fotones, entre otras aplicaciones.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar trabajos similares con la misma muestra en diferentes solventes para determinar una posible relación entre la interacción de la molécula con solventes de diferente polaridad. De igual manera se recomienda realizar el estudio fotofísico de uno y dos fotones a través de análisis teórico para comparar los resultados obtenidos en este trabajo. Finalmente se propone continuar con las investigaciones para el desarrollo de métodos espectroscópicos de análisis como el que se llevó a cabo en este trabajo, pero con un mayor número de compuestos orgánicos con estructuras similares a las estudiadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. *Structure–activity relationship of chalcones and related derivatives as ligands for detecting of β -amyloid plaques in the brain.* **Ono, M., Hori, M., Haratake, M., Tomiyama, T., Mori, H., & Nakayama, M.** 19, s.l. : Bioorganic & medicinal chemistry, 2007, Vol. 15.
2. **Belfield, Kevin.** *Multiphoton absorption and nonlinear transmission processes: materials, theory, and applications.* Seattle, Washington, USA : Society of Photo Optical, 2003.
3. **Lakowicz, J. R.** *Principles of fluorescence spectroscopy.* s.l. : Springer Science & Business Media, 2013.
4. **Heavens, O. S., & Ditchburn, R. W.** *Insight into optics.* Chichester, West Sussex : England: Wiley, 1991.
5. **Galaup, J.** *Curso de óptica no lineal.* Orsay, Francia : Laboratorio Aimé Cotton. Universidad Paris-Saclay , 2007.
6. **Butcher, P. N., & Cotter, D.** *The elements of nonlinear optics.* s.l. : Cambridge University Press, 1991.
7. **Günter, P.** *Nonlinear optical effects and materials.* s.l. : Springer, 2012.
8. **Cabrera, J. M., Agulló-López, F., & López, F. J.** *Óptica electromagnética. Volumen I: fundamentos.* s.l. : Addison-Wesley, 2000.
9. **Andrews, D. L.** *Lasers in chemistry.* s.l. : Springer Science & Business Media, 2012.
10. **Boyd, R. W.** *Nonlinear optics.* s.l. : Academic press, 2003.
11. **Díez-Guerra, F. J.** *Técnicas de microscopía óptica.* s.l. : Dilema, 2004.
12. *Clinical and preclinical photodynamic therapy.* **Fisher, A. M., Murphree, A. L., & Gomer, C. J.** 1, s.l. : Lasers in surgery and medicine, 1995, Vol. 17.

13. *A comparative study on synthesis of some novel α,β -unsaturated carbonyl derivatives and their antioxidant potential.* **Ahmad, M. R., Khan, M. H. R., Sastry, V. G., Bano, N., Anwar, S., & Prasad, Y. R.** 2, s.l. : European Journal of Chemistry, 2012, Vol. 3.
14. *Chalcones: Synthesis, structure diversity and pharmacological aspects.* **Suwito, H., Jumina, J., Mustofa, M., Kristanti, A. N., Puspaningsih, T., & Nyoman, N.** 7, s.l. : ChemInform, 2015, Vol. 46.
15. *Effects of α -substitutions on structure and biological activity of anticancer chalcones.* **Lawrence, N. J., Patterson, R. P., Ooi, L. L., Cook, D., & Ducki, S.** 22, s.l. : Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2006, Vol. 16.
16. *Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review.* **Singh, P., Anand, A., & Kumar, V.** s.l. : European journal of medicinal chemistry, 2014, Vol. 85.
17. *The role of chalcones in suppression of NF- κ B-mediated inflammation and cancer.* **Yadav, V. R., Prasad, S., Sung, B., & Aggarwal, B. B.** 3, s.l. : International immunopharmacology, 2011, Vol. 11.
18. *Efficient synthesis of solid-emissive Boron–Fluorine derivatives.* **Chen, X., Xiao, S., Wang, S., Cao, Q., Zou, K., Huang, N., & Deng, Z.** 31, s.l. : Tetrahedron Letters, 2013, Vol. 54.
19. *Solid state optical properties of 4-alkoxy-pyridine butadiene derivatives: Reversible thermal switching of luminescence.* **Kumar, N. S., Varghese, S., Rath, N. P., & Das, S.** 22, s.l. : The Journal of Physical Chemistry C, 2008, Vol. 112.
20. *Creation of Bifunctional Materials: Improve Electron-Transporting Ability of Light Emitters Based on AIE-Active 2, 3, 4, 5-Tetraphenylsiloles.* **Chen, L., Jiang, Y., Nie, H., Lu, P., Sung, H. H., Williams, I. D., ... & Tang, B. Z.** 23, s.l. : Advanced Functional Materials, 2014, Vol. 24.
21. **Ronda, C. R.** *Luminescence: from theory to applications.* s.l. : John Wiley & Sons., 2007.
22. **Harris, D. C.** *Análisis químico cuatitativo.* s.l. : Reverté, 2003.
23. **Olsen, E. D.** *Modern optical methods of analysis.* s.l. : McGraw-Hill Companies, 1975.

24. *Are fluorescence quantum yields so tricky to measure? A demonstration using familiar stationary products.* **Fery-Forgues, S. & Lavabre, D.** 9, s.l. : Journal of Chemical Education, 1999, Vol. 76.
25. **Moreno Pérez, Ivan Daniel.** *Estudio de la absorción de dos fotones en colorantes orgánicos.* Sartenejas, Caracas : Tesis de Grado. Universidad Simón Bolívar, 2011.
26. *Absolute measurement of two-photon cross sections.* **Hermann, J. P., & Ducuing, J.** 6, s.l. : Physical Review A, 1972, Vol. 5.
27. *Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm.* **Xu, C., & Webb, W. W.** 3, s.l. : JOSA B, 1996, Vol. 13.
28. *Über elementarakte mit zwei quantensprüngen.* **Göppert-Mayer, M.** 3, s.l. : Annalen der Physik, 1931, Annalen der Physik, Vol. 401, pp. 273-294.
29. *The maser—new type of microwave amplifier, frequency standard, and spectrometer.* **Gordon, J. P., Zeiger, H. J., & Townes, C. H.** 4, s.l. : Physical Review, 1955, Vol. 99.
30. *Stimulated optical radiation in ruby.* **Maiman, T. H.** 1960.
31. *Generation of optical harmonics.* **Franken, P. A., Hill, A. E., Peters, C. E., & Weinreich, G.** 4, s.l. : Physical Review Letters, 1961, Vol. 7.
32. *Optical harmonic generation in calcite.* **Terhune, R. W., Maker, P. D., & Savage, C. M.** 10, s.l. : Physical Review Letters, 1962, Vol. 8.
33. *Two-photon excitation in Ca F 2: Eu 2+.* **Kaiser, W., & Garrett, C. G. B.** 6, s.l. : Physical review letters, 1961, Vol. 7.
34. *3C3-Geometrical model and experimental verification of two-photon absorption in organic dye solutions.* **Schäfer, F. P., & Schmidt, W.** 9, s.l. : IEEE Journal of Quantum Electronics, 1966, Vol. 2.
35. *Luminescence quenching of complex molecules in a strong laser field.* **Galanin, M. D., Kirsanov, B. P., & Chizhikova, Z. A.** s.l. : Soviet Journal of Experimental and Theoretical Physics Letters, 1969, Vol. 9.

36. *Interactions of picosecond laser pulses with organic molecules. I. Two-photon fluorescence quenching and singlet states excitation in rhodamine dyes.* **Bradley, D. J., Hutchinson, M. H. R., Koetser, H., Morrow, T., New, G. H. C., & Petty, M. S.** 1572, s.l. : Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 1972, Vol. 328.
37. *Dispersion of the two-photon cross section in rhodamine dyes.* **Hermann, J. P., & Ducuing, J.** 2, s.l. : Optics Communications, 1972, Vol. 6.
38. *Two-photon absorption properties of fluorescent proteins.* **Drobizhev, M., Makarov, N. S., Tillo, S. E., Hughes, T. E., & Rebane, A.** 5, s.l. : Nature methods, 2011, Vol. 8.
39. *A fluorescent benzothiazole probe with efficient two-photon absorption.* **Echevarria, L., Moreno, I., Camacho, J., Salazar, M. C., & Hernández, A.** s.l. : Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2012, Spectrochimica Acta, Vol. 97.
40. *The solid-state emissive chalcone (2E)-1-(5-chlorothiophen-2-yl)-3-[4-(dimethylamino) phenyl] prop-2-en-1-one.* **Rodriguez-Lugo, R. E., Urdaneta, N., Pribanic, B., & Landaeta, V. R.** 9, s.l. : Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry, 2015, Vol. 71.
41. **Reichardt, C., & Welton, T.** *Solvents and solvent effects in organic chemistry.* s.l. : John Wiley & Sons, 2011.
42. *Confocal scanning optical microscopy and its applications for biological specimens.* **Shotton, D. M.** 2, s.l. : Journal of Cell Science, 1989, Vol. 94.
43. *A highly selective fluorescence turn-on sensor for cysteine/homocysteine and its application in bioimaging.* **Zhang, M., Yu, M., Li, F., Zhu, M., Li, M., Gao, Y., ... & Yi, T.** 34, s.l. : Journal of the American Chemical Society, 2007, Vol. 129.
44. *Solvent effect on two-photon absorption and fluorescence of rhodamine dyes.* **Nag, A., & Goswami, D.** 2, s.l. : Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2009, Vol. 206.

45. *Fluorescence spectroscopy of Rhodamine 6G: Concentration and solvent effects.* **Zehentbauer, F. M., Moretto, C., Stephen, R., Thevar, T., Gilchrist, J. R., Pokrajac, D., ... & Kiefer, J.** s.l. : Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2014, Vol. 121.
46. *The fading of Rhodamine B in aqueous acetone solutions.* **Stevens, B., & Bingham, W. S. W.** 12, s.l. : Journal of the Society of Dyers and Colourists, 1963, Vol. 79.
47. *Measurement of the absolute fluorescence quantum yield of rhodamine B solution using a dual-beam thermal lens technique.* **Bindhu, C. V., Harilal, S. S., Varier, G. K., Issac, R. C., Nampoori, V. P. N., & Vallabhan, C. P. G.** 4, s.l. : Journal of Physics D: Applied Physics, 1996, Vol. 29.
48. *A new trend in rhodamine-based chemosensors: application of spirolactam ring-opening to sensing ions.* **Kim, H. N., Lee, M. H., Kim, H. J., Kim, J. S., & Yoon, J.** 8, s.l. : Chemical Society Reviews, 2008, Vol. 37.
49. *Fluorescence microscopy: reduced photobleaching of rhodamine and fluorescein protein conjugates by n-propyl gallate.* **Giloh, H., & Sedat, J. W.** 4566, s.l. : Science, 1982, Vol. 217.
50. *Two-photon excitation fluorescence microscopy.* **So, P. T., Dong, C. Y., Masters, B. R., & Berland, K. M.** 1, s.l. : Annual review of biomedical engineering, 2000, Vol. 2.
51. *Clinical laser photodynamic therapy in the treatment of bladder carcinoma.* **Shumaker, B. P., & Hetzel, F. W.** 5, s.l. : Photochemistry and photobiology, 1987, Vol. 46.
52. *Simultaneous Two-photon Excitation of Photofrin in Relation to Photodynamic Therapy.* **Karotki, A., Khurana, M., Lepock, J. R., & Wilson, B. C.** 2, s.l. : Photochemistry and photobiology, 2006, Vol. 82.