

TESIS DEFENDIDA POR

Bonifacio Alejandro Can Uc

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Raúl Rangel Rojo

Director del Comité

Dra. Meritxell Riquelme Pérez

Miembro del Comité

Dr. Eugenio Rafael Méndez Méndez

Miembro del Comité

Dr. Santiago Camacho López

Miembro del Comité

Dr. Víctor Ruiz Cortés

Miembro del Comité

Dr. Pedro Negrete Regagnon

*Coordinador del programa de
posgrado en Óptica*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales

Director de Estudios de Posgrado

Noviembre de 2010

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE
EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN ÓPTICA**

**ESTUDIO DE LA FLUORESCENCIA INDUCIDA POR ABSORCIÓN
DE DOS FOTONES EN PIGMENTOS ORGÁNICOS**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

BONIFACIO ALEJANDRO CAN UC

Ensenada, Baja California, México, noviembre de 2010

RESUMEN de la tesis de **BONIFACIO ALEJANDRO CAN UC**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en ÓPTICA con orientación en ÓPTICA FÍSICA. Ensenada, Baja California, noviembre de 2010.

ESTUDIO DE LA FLUORESCENCIA INDUCIDA POR ABSORCIÓN DE DOS FOTONES EN PIGMENTOS ORGÁNICOS

Resumen aprobado por:

Dr. Raúl Rangel Rojo

Director de Tesis

En este trabajo se presenta un estudio de la fluorescencia de pigmentos orgánicos excitados mediante el proceso de absorción de dos fotones, utilizando un láser infrarrojo pulsado en el régimen de femtosegundos. Los pigmentos estudiados, fueron escogidos con base al espectro de absorción, de manera que pudieran ser excitados resonantemente a 410 nm , permitiendo también la posible excitación no resonante a 820 nm mediante el proceso de absorción de dos fotones. Estos pigmentos fueron: cumarina 480 y el dicianometileno, también conocido como DCM. Los estudios realizados son de gran interés para la implementación de técnicas novedosas en microscopía por procesos no lineales. Se presentan resultados para el espectro de fluorescencia de estos pigmentos cuando son excitados resonantemente a 410 nm y cuando son excitados en el régimen no resonante a 820 nm , en los que se observa el fenómeno de absorción de dos fotones. Los resultados muestran diferencias significativas entre los espectros obtenidos por ambos métodos. Se estudió la eficiencia y el espectro de emisión de los pigmentos fluorescentes como función de diferentes parámetros de excitación, como la irradiancia pico, la longitud de onda, entre otros. Se caracterizó también la respuesta óptica no lineal de los pigmentos, usando para ello la técnica de barrido en z abierto (*open z-scan* en inglés) con el mismo láser de femtosegundos. Esto permitió obtener el valor del coeficiente de absorción de dos fotones y la sección transversal de absorción dos fotones.

Palabras Clave: Fluorescencia, Absorción de dos fotones, Pigmentos orgánicos.

ABSTRACT of the thesis presented by **BONIFACIO ALEJANDRO CAN UC**, in partial fulfillment of the requirements of the degree of **MASTER IN SCIENCE** in **OPTICS** with orientation in **PHYSICAL OPTICS**. Ensenada, Baja California, november 2010.

STUDIES OF THE FLUORESCENCE INDUCED BY TWO PHOTON ABSORPTION IN ORGANIC DYES

In this work we present a study of the fluorescence in organic dyes excited by the two photon absorption process, using a femtoseconds pulsed laser in the infrared. The dyes studied were chosen by their absorption spectra, picking those that made direct resonant excitation at 410 nm possible, allowing in this way, the possibility of nonresonant excitation at 820 nm by the two photon absorption process. The dyes studied are: coumarin 480 and the dycyanometilene also known as DCM. These studies are of great interest for the implementation of novel techniques in microscopy based on nonlinear optical processes. Here we present results for the fluorescence spectra of these pigments when they are excited both resonantly at 410 nm , and nonresonantly at 820 nm , where two photon absorption is observed. The results show significant differences between the spectra obtained by both methods. The efficiency and the emission were studied as a function of different excitation parameters, such as peak irradiance, wavelength, etcetera. The nonlinear optical response of the dyes was also characterized, using the open aperture z-scan technique, with the same femtosecond pulse source. A fit to the data allowed the determination of the two photon absorption coefficient and the two photon absorption cross section.

Keywords: Fluorescence, Two photon absorption, Organic dyes.

A mis padres:

Valerio y Melba

A mis hermanos:

Valerio, José y Saidy

A mis sobrinos:

David y Saidy

Y siempre, a mi novia Juanita.

Agradecimientos

Son muchas las personas que les debo un extenso agradecimiento, ya que sin su ayuda sea cual fuere, este trabajo hubiera sido más laborioso.

Agradezco a mis padres, por su comprensión y apoyo, que durante todo este trayecto han sido y siempre serán los pilares de mi formación como persona. A mis hermanos, porque siempre han tenido esa manera de enseñarme que las cosas se consiguen con base a mucho sacrificio. A Juanita por su compañía, sus consejos y opiniones, sobre todo por su cariño y amor, que ha significado mucho durante los momentos más difíciles en la realización de mis estudios de maestría.

Ampliamente al Dr. Raúl Rangel por su paciencia al brindarme sus conocimientos, consejos y duras críticas, así como también su ánimo hacia la investigación, amistad y compañerismo en el plan de trabajo y fuera de este.

A la Dra. Meritxell Riquelme y a los Dr's Eugenio Méndez, Victor Ruiz y Santiago Camacho, por ser parte de mi comité, por sus comentarios, opiniones y observaciones durante la realización de este trabajo.

Por su apoyo, consejos y amistad, a los Dr's Eliseo Hernandez e Israel Rocha.

A mis compañeros de generación, Aleksei Miridonov, Alejandro Alatorre, David Noriega, Gabriel Castillo, José Zamorano y José Palomares. También a Sergio de la Cruz y Miroslava Cano.

A mis amigos de Ensenada, Miguel Martínez, Fernanda Rivera y Claudia García.

A mis amigos y casi hermanos, Carolina Castro, Lizbeth Ayala, Gerardo Pech, Gustavo Domínguez, Gustavo Pacheco, David Ortíz, Guadalupe Ortíz, Martha Gurubel, Luis Reséndiz, Manuel Iris, Francisco Méndez, Mirza Campos, Edith Kuh, Roberto

Vázquez, Hector Herrera y Luis Farfan.

Al CICESE, por darme la oportunidad de hacer los estudios de maestría en ciencias y al CONACyT por el apoyo económico otorgado mediante la beca No. 221750.

Contenido

	Página
Resumen en español	i
Resumen en inglés	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de Figuras	viii
Lista de Tablas	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Antecedentes.	1
I.2 Fenómenos ópticos no lineales.	3
I.3 Microscopía por procesos multifotónicos.	5
I.4 Objetivos de la tesis.	8
I.5 Estructura de la tesis.	9
II. MATERIALES ORGÁNICOS.	11
II.1 Pigmentos orgánicos	11
II.2 Propiedades electrónicas	12
II.3 Propiedades ópticas	16
II.4 Materiales estudiados	20
II.4.1 Preparación de las muestras.	22
II.4.2 Espectros de absorción.	23
II.5 Absorción no lineal.	24
III. FLUORESCENCIA POR ABSORCIÓN DE DOS FOTONES	30
III.1 Dispositivo experimental.	30
III.1.1 Fluorescencia por absorción de un fotón.	35
III.1.2 Fluorescencia por absorción de dos fotones.	38
III.2 Resultados de fluorescencia por absorción de un fotón.	39
III.3 Resultados para la fluorescencia por absorción de dos fotones.	41
III.3.1 Medición de la fluorescencia como función de la potencia de entrada.	43

Contenido (continuación)

	Página
III.3.2 Medición de la fluorescencia como función de la longitud de onda.	46
III.4 Comparación de los espectros de fluorescencia por absorción de un fotón y dos fotones.	47
IV. MEDICIÓN DE LOS COEFICIENTES NOLINEALES.	50
IV.1 Descripción de la técnica <i>z-scan</i>	50
IV.1.1 <i>Z-scan</i> abierto	53
IV.2 Resultados experimentales	55
IV.2.1 Medición del perfil del haz.	55
IV.2.2 Resultados del <i>z-scan</i> abierto.	58
IV.2.3 Sección transversal de dos fotones	61
V. RESUMEN Y CONCLUSIONES.	63
REFERENCIAS	67

Lista de Figuras

Figura		Página
1	Localización del volumen de fluorescencia de un haz enfocado en una muestra fluorescente: a) excitación inducida por absorción de un fotón, b) excitación inducida por el proceso de absorción de dos fotones. . . .	7
2	Formación del orbital molecular sigma a partir de los orbitales atómicos individuales <i>s</i>	12
3	Formación del orbital molecular pi a partir de los orbitales atómicos individuales <i>p</i>	13
4	Representación de la molécula de metano y los enlaces moleculares que la mantienen.	14
5	Representación de la molécula de etileno y los enlaces moleculares simples y doble.	15
6	Cadenas de moléculas orgánicas. El butano tiene una cadena no conjugada, mientras que los tres restantes son cadenas conjugadas al tener sus enlaces sencillos y múltiples alternados.	16
7	Cadena de una molécula de pigmento de cianina vista desde: a) arriba, b) de lado. c) Energía de potencial <i>V</i> de un electrón pi moviéndose a lo largo de la cadena de la molécula, d) energía de potencial simplificada con longitud <i>L</i> de la molécula.	17
8	Diagrama de niveles y transiciones de energía de una molécula de pigmento.	19
9	Espectros de absorción y emisión de un pigmento orgánico.	21
10	Estructura química de los pigmentos utilizados: a) Cumarina 480, b) DCM.	21
11	Espectro de absorción para los pigmentos: cumarina (o) y DCM (+). Para estas mediciones se usó la concentración C_1 de cada pigmento en cuestión.	23
12	Espectros de extinción para los pigmentos: cumarina (o) y DCM (+). .	25
13	Comportamiento de la transmitancia ante irradiancias bajas en un material.	26

Lista de Figuras (continuación)

Figura		Página
14	Comportamiento de la transmitancia ante irradiancias altas en un material. a) Absorción saturable, b) Absorción inducida.	27
15	Excitación y emisión de un material con dos niveles de energía usando: absorción de un fotón de alta energía (izquierda) y absorción de dos fotones de baja energía (derecha).	29
16	Espectro de los pulsos del láser de Ti:zafiro. La línea continua (-) es el ajuste gaussiano teórico a los datos experimentales (o).	31
17	Esquema del sistema de autocorrelación, cuyo espejo que se encuentra en la horizontal, genera un retraso en el pulso que se quiere medir. . . .	32
18	Traza de autocorrelación en intensidad de los pulsos de femtosegundos del láser de Ti:zafiro.	35
19	Sistema empleado para la obtención de fluorescencia por absorción de un fotón usando el segundo armónico del láser de Ti:zafiro.	36
20	Esquema experimental para la generación de fluorescencia a través de la absorción de dos fotones.	38
21	Espectros de fluorescencia para ambas concentraciones de los dos pigmentos, presentados con diferentes factores de normalización: a) cumarina 480 y b) DCM. Los pigmentos en solución son excitados con el segundo armónico del láser de Ti:zafiro a una potencia promedio de excitación de 120 mW.	40
22	Espectros de fluorescencia por absorción de dos fotones para las concentraciones C_1 (en negro) y C_2 (en rojo) del DCM en solución con metanol.	41
23	Espectros normalizados de fluorescencia por absorción de dos fotones para las concentraciones 1 (en negro) y 2 (en rojo) del DCM.	42
24	Espectro de fluorescencia por absorción de dos fotones para la concentración 2 de la cumarina 480 en solución con etanol.	43
25	Espectros de fluorescencia por absorción de dos fotones como función de la potencia de excitación para el DCM.	44
26	Espectros de fluorescencia por absorción de dos fotones como función de la potencia de excitación para el cumarina 480.	45

Lista de Figuras (continuación)

Figura		Página
27	Comportamiento de la intensidad pico de los espectros de fluorescencia por absorción de dos fotones como función de la potencia de excitación. a) DCM y b) cumarina 480.	46
28	Gráfica log-log para la intensidad pico como función de la potencia de excitación: a) DCM y b) cumarina 480. En ambas gráficas se muestra el valor de la pendiente de la recta ajustada.	47
29	Intensidad máxima de fluorescencia como función de la longitud de onda de excitación, y los espectros de absorción escalados. a) DCM y b) cumarina 480.	48
30	Comparación espectral entre procesos de absorción para uno y dos fotones entre los pigmentos: a) DCM y b) cumarina 480. El corrimiento espectral tomado con respecto a la longitud de onda central es de 7 nm para el DCM y 24 nm para la cumarina 480.	49
31	Espectros de absorción de los pigmentos usados, marcando la longitud de onda correspondiente a la energía de excitación por absorción de dos fotones.	49
32	Esquema experimental de la técnica <i>z-scan</i> abierto.	51
33	Comportamiento de la transmitancia debida a la presencia de absorción no lineal: a) absorción de dos fotones, b) absorción saturable.	53
34	Propagación del haz dentro de la muestra bajo estudio.	53
35	Esquema para la medición de la cintura del haz a lo largo del eje de propagación de un haz enfocado con la técnica de la navaja.	57
36	Medición del perfil espacial del haz. a) Variación de la potencia de entrada al detector como función de la posición de la navaja, b) perfil del haz, obtenida de la derivada de los valores obtenidos para a).	58
37	Datos experimentales del ancho del haz a $w(z)$ con tres ajustes teóricos, mostrando un mejor ajuste la $M^2 = 1.5$ para los datos experimentales obtenidos.	59

38	Resultados de la técnica de <i>z-scan</i> para los pigmentos usados en solución con metanol; a)cumarina 480, b)DCM. Los puntos en el gráfico muestran los datos experimentales, mientras que la línea constante representa el ajuste teórico.	60
----	---	----

Lista de Tablas

Tabla		Página
I	Características físicas de los pigmentos utilizados.	22
II	Concentraciones de la soluciones en metanol de los pigmentos utilizados.	22
III	Relación entre los anchos de los pulsos de láseres de femtosegundos para envolventes conocidas en la autocorrelacion.	34
IV	Características de emisión de los pigmentos utilizados.	40
V	Coefficiente de absorción de dos fotones y la sección transversal de absorción de dos fotones para los pigmentos: cumarina 480 y DCM.	62

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

I.1 Antecedentes.

Con la invención del láser en 1960 se pudo acceder a irradiancias ópticas muy altas, antes difíciles de lograr con las fuentes convencionales de luz. Estas irradiancias equivalen a campos electromagnéticos de magnitud comparable al campo electrostático que mantiene unido al electrón con su núcleo. Las altas irradiancias y los altos campos eléctricos asociados, permitieron observar en algunos materiales efectos ópticos nunca antes vistos, tales como la generación del segundo armónico, el autoenfocamiento, el efecto Raman estimulado, etc. A estos efectos se les conoce como efectos ópticos no lineales, debido a que dependen de la irradiancia de la luz.

En la actualidad existe una serie de aplicaciones prácticas de estos fenómenos y varias aplicaciones importantes en campos como la medicina, el procesamiento óptico de información y el procesamiento de materiales, por mencionar algunas. Por ejemplo la aplicación de materiales no lineales de tercer orden, en sistemas de procesamiento de información óptica es un campo de investigación muy activo, en donde se explotan las altas velocidades de respuesta de los fenómenos ópticos no lineales.

Por otro lado, el desarrollo de láseres de pulsos ultracortos, es también un área muy activa de investigación. La principal característica de estos láseres, es que la energía por pulso puede ser concentrada en un intervalo de tiempo muy corto, lo cual hace que la potencia pico del pulso sea extremadamente alta, aún para energías moderadamente

bajas (Diels y Rudolph, 1996). La irradiancia pico I_p de un pulso con energía E_p , duración τ_p , que ilumina un área A , está dada por:

$$I_p = \frac{E_p}{A\tau_p}. \quad (1)$$

La combinación de una duración muy corta (menor a 1 *ps*) y una potencia pico muy alta, permite observar fenómenos ópticos no lineales con relativa facilidad sin depositar mucha energía en el medio. La corta duración de los pulsos permite también estudiar la dinámica de los procesos a escalas de tiempo que no son accesibles por otros medios. Así, es posible estudiar diferentes procesos químicos, electrónicos y biológicos con resolución temporal de solo algunos femtosegundos. Por otro lado, se ha explorado extensamente el uso de pulsos ultracortos en la transmisión y procesamiento de información a tasas muy altas de repetición, donde la corta duración de los pulsos resulta fundamental.

Más recientemente se ha comenzado a implementar el uso de láseres de pulsos ultracortos y óptica no lineal en técnicas novedosas de microscopía (Zipfel *et al.*, 2003). En este caso se pretende generar imágenes con mejor resolución espacial, con técnicas que tienen la capacidad de aislar la información proveniente de diferentes elementos funcionales y moléculas específicas, y la posibilidad de inducir diferentes efectos no lineales con energías pequeñas que no dañan el tejido vivo. Algunos ejemplos de estas técnicas son: la generación de segundo armónico, generación de tercer armónico, el efecto CARS (*Coherent Anti-Stokes Raman Scattering*, por sus siglas en inglés), la fluorescencia por absorción de dos fotones (Gryczynski *et al.*, 1995; Barad *et al.*, 1997; Duncan *et al.*, 1982), por mencionar algunas.

Los pulsos de femtosegundos son generados comúnmente por láseres de Ti:zafiro (Titanio-zafiro) a través de la técnica de amarre de modos (mode-locking, en inglés) por efecto Kerr óptico. En general, los láseres de Ti:zafiro emiten pulsos con una

duración de alrededor de 100 *fs*. Debido a su corta duración, los pulsos no se pueden medir con base a sistemas convencionales, pero si con técnicas como la autocorrelación óptica de segundo orden (Diels y Rudolph, 1996).

En este trabajo se estudió la fluorescencia inducida por absorción de dos fotones en dos pigmentos orgánicos. Los pigmentos fueron excitados con el láser de femtosegundos con que cuenta el laboratorio de pulsos ultracortos y procesamiento de materiales del Departamento de Óptica del CICESE. La idea es que estos pigmentos puedan resultar útiles en la implementación de un sistema de microscopía de fluorescencia inducida por el proceso de absorción de dos fotones.

I.2 Fenómenos ópticos no lineales.

Cuando la luz se propaga a través de un medio óptico, el campo eléctrico \mathbf{E} asociado genera en el material una polarización eléctrica \mathbf{P} . Para irradiancias bajas, \mathbf{P} es linealmente proporcional a \mathbf{E} . Sin embargo, para irradiancias altas, la polarización inducida deja de ser una función lineal del campo incidente y se puede expresar como una serie de potencias de \mathbf{E} , que en el sistema MKSA de unidades puede escribirse de la siguiente forma (Butcher y Cotter, 1990):

$$\mathbf{P}_{NL} = \varepsilon_0(\chi^{(1)}\mathbf{E} + \chi^{(2)}\mathbf{E}^2 + \chi^{(3)}\mathbf{E}^3 + \dots), \quad (2)$$

donde ε_0 es la permitividad eléctrica del vacío, $\chi^{(1)}$ denota la susceptibilidad lineal y $\chi^{(n)}$ con $n \geq 2$, representa la susceptibilidad de orden n del material. La susceptibilidad lineal del material es en realidad una cantidad compleja, $\chi^{(1)} = Re\chi^{(1)} + Im\chi^{(1)}$, donde la parte real está relacionada con los fenómenos de refracción y birrefringencia, mientras que la parte imaginaria está relacionada con los fenómenos de absorción y dicroísmo.

Los fenómenos relacionados con la susceptibilidad de segundo orden, son observados únicamente en materiales no centrosimétricos, ya que debido a las propiedades de simetría de los materiales centrosimétricos, éstos no permiten la existencia de los términos pares de la susceptibilidad no lineal (Boyd, 1992). Ejemplos de efectos no lineales de orden dos son: la generación del segundo armónico, en la que se genera un campo electromagnético a frecuencia 2ω a partir de un campo de alta irradiancia a frecuencia ω , donde el coeficiente no lineal relevante es $\chi^{(2)}(-2\omega; \omega, \omega)$, esta notación se puede nos dice que se tiene una respuesta a 2ω de dos haces de entrada a frecuencia ω ; la generación paramétrica, en donde un campo a frecuencia ω_B puede generar dos haces a frecuencias ω_S y ω_I , donde la suma de estas últimas es igual a la frecuencia del campo de excitación, asociado a $\chi^{(2)}(-\omega_S; \omega_B, -\omega_I)$; etc.

Ejemplos de fenómenos relacionados con la susceptibilidad de tercer orden, son: la generación del tercer armónico, análogo a la generación del segundo armónico, sólo que ahora un haz a frecuencia ω genera un haz a 3ω , caracterizado por $\chi^{(3)}(-3\omega; \omega, \omega, \omega)$; la mezcla de cuatro ondas degenerada (FWM, *Four-Wave Mixing* en inglés), en donde tres haces a frecuencia ω interactúan en el material no lineal para generar un cuarto haz también a la frecuencia ω , pero viajando en general en una dirección diferente, y está asociado a $\chi^{(3)}(-\omega; \omega, \omega, \omega)$; la refracción no lineal, en la cual, el índice de refracción característico del material cambia como función de la irradiancia del campo incidente, caracterizada por $\chi^{(3)}(-\omega; \omega, -\omega, \omega)$; la absorción de dos fotones que se puede asociar a $\chi^{(3)}(-\omega; \omega, \omega, -\omega)$; etc.

Lejos de resonancia, un fotón por si sólo no puede excitar un sistema material, ya que la energía no es lo suficientemente alta comparada con la energía del estado excitado, por lo que el material será transparente. Sin embargo, para haces de luz suficientemente intensos, existe la probabilidad finita de que haya dos fotones en el

mismo lugar y al mismo tiempo. Estos dos fotones altamente coherentes pueden ser simultáneamente absorbidos en el mismo evento cuántico. La energía de los fotones superpuestos (comparable a la energía de excitación), puede promover a uno de los átomos o moléculas al estado excitado, proceso conocido como absorción de dos fotones. Para tener una mayor probabilidad de excitación por dos fotones, es necesario el uso de irradiancias altas, en donde la probabilidad del proceso es proporcional al cuadrado de la irradiancia de excitación (Göppert Mayer, 1931). Los láseres de pulsos ultracortos son una fuente muy utilizada para ver este fenómeno no lineal de tercer orden, ya que con las irradiancias altas alcanzadas debido a lo corto de los pulsos, se puede obtener una mayor probabilidad de absorción de dos fotones (Zipfel *et al.*, 2003).

Con respecto a los fenómenos relacionados con la susceptibilidad de tercer orden, cabe mencionar que de la misma manera que $\chi^{(1)}$, $\chi^{(3)}$ también es en general una cantidad compleja, que podemos escribir como $\chi^{(3)} = Re\chi^{(3)} + Im\chi^{(3)}$. La parte real de $\chi^{(3)}$ está relacionada con la refracción no lineal $n(I)$ y la parte imaginaria está relacionada con la absorción no lineal $\alpha(I)$ y en particular con el coeficiente de absorción de dos fotones.

La observación de fenómenos ópticos no lineales de tercer orden asociados a $(\chi^{(3)})$, puede ocurrir en materiales con cualquier tipo de simetría.

I.3 Microscopía por procesos multifotónicos.

Desde hace ya cientos de años, la observación de objetos microscópicos ha sido objeto de gran interés. Con la invención del microscopio óptico en el siglo XVI, la microscopía tuvo un creciente avance en el estudio de objetos pequeños que no podían ser observados a simple vista. Así, ha habido un esfuerzo continuo para mejorar las imágenes obtenidas

con los microscopios, lo que incluye mejorar la resolución lateral, la capacidad de resolver secciones específicas y composición química. Esto ha llevado a la implementación de diferentes técnicas: la microscopía de contraste de fase, que permite discriminar materiales con diferente índice de refracción; la microscopía de fluorescencia, que permite observar partes específicas que han sido marcadas con un material fluorescente; la microscopía confocal que mejora la resolución axial y permite construir imágenes en tres dimensiones de los especímenes, por mencionar algunas.

Estas técnicas siguen teniendo algunas limitaciones: la microscopía de fluorescencia requiere la introducción de fluoróforos que pueden ser tóxicos para el tejido que se estudia. La irradiación continua de luz ultravioleta, puede causar daño al tejido y hacer que la eficiencia de emisión de los fluoróforos decaiga considerablemente con el tiempo (fenómeno llamado fotoblanqueo) entre otros (Masters, 2005).

Debido a esto, en los últimos años se han propuesto nuevas técnicas de microscopía basadas en el uso de efectos no lineales observables con relativa facilidad con pulsos de láser ultracortos, que pretenden superar algunas de las limitaciones de la microscopía convencional. El empleo de pulsos ultracortos, permite ver estos efectos no lineales sin depositar demasiada energía en las muestras, evitando un posible daño. Algunos ejemplos son: microscopía CARS (*Coherent Anti-Stokes Raman Scattering*), microscopía por generación de segundo armónico, microscopía de fluorescencia por absorción de dos fotones, etc. La microscopía CARS y la microscopía por generación de segundo armónico, son técnicas que no usan tintes para generar una imagen. Debido a esto, los especímenes no sufren fototoxicidad o efectos de fotoblanqueo, que son limitantes típicos de la microscopía de fluorescencia.

La microscopía de fluorescencia por absorción de dos fotones, está basada en que una molécula fluorescente puede ser excitada por la absorción simultánea de dos fo-

tones. En este caso, un fotón por sí sólo no puede ser absorbido, debido a que su energía no es suficiente para excitar a un fluoróforo¹ y a causa de esto, no se genera fluorescencia. Sin embargo, si la irradiancia luminosa es alta, existe una probabilidad finita de encontrar otro fotón en la misma posición y al mismo tiempo (dentro de un margen de 10^{-15} s), que permita llevar a la molécula hasta su estado excitado. No es sorprendente que esta absorción simultánea tenga una probabilidad muy pequeña para irradiancias moderadas. Para tener una idea de cómo es la tasa de absorción por dos fotones; una molécula de Rodamina B absorberá un fotón aproximadamente cada segundo con la irradiancia del sol, pero absorberá dos fotones una vez cada 10 millones de años (Denk y Svoboda, 1997). Esto es porque la probabilidad de absorción de dos fotones es proporcional al cuadrado de la irradiancia de excitación. Por tanto,

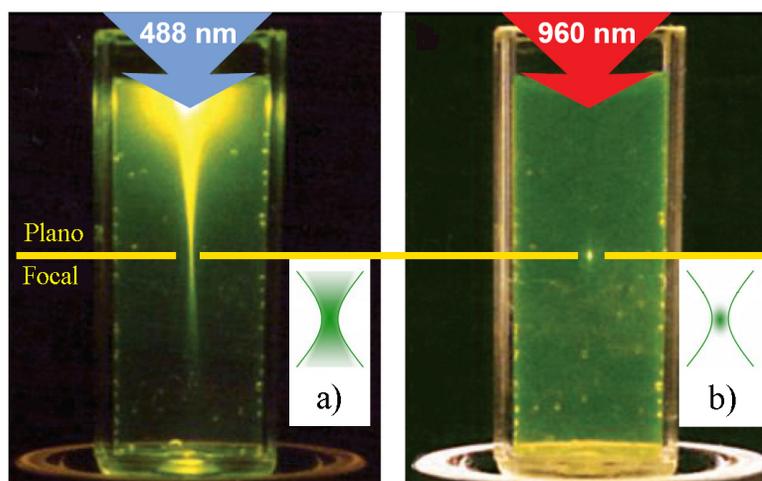


Figura 1. Localización del volumen de fluorescencia de un haz enfocado en una muestra fluorescente: a) excitación inducida por absorción de un fotón, b) excitación inducida por el proceso de absorción de dos fotones.

para generar fluorescencia por absorción de dos fotones de forma eficiente, se necesitan fuentes de luz con irradiancias pico muy altas, como los láseres de pulsos ultracortos.

¹Un fluoróforo o fluorocromo, por analogía con los cromóforos, es un componente de una molécula que hace que ésta sea fluorescente (Lakowicz, 2006).

Tales láseres pueden ser operados usando potencias promedio bajas, por ejemplo, unos cinco órdenes de magnitud más bajos que las usadas en microscopía confocal. Entre las ventajas de la fluorescencia por absorción de dos fotones, está el hecho que la irradiancia de las muestras se hace con luz infrarroja, lo que evita la foto-toxicidad. Debido a que la excitación es sólo eficiente para irradiancias altas, cuando se usa un haz fuertemente enfocado (lo usual en un microscopio de barrido), la señal solo provendrá de un volumen muy pequeño alrededor del plano focal (Diaspro y Sheppard, 2002; Masters, 2005). En contraste con la microscopía de fluorescencia convencional, la señal proviene de todo el volumen iluminado del espécimen, como se muestra en la figura 1 (Zipfel *et al.*, 2003). Esto implica una mejor resolución axial para el caso de absorción de dos fotones, que permite la obtención de imágenes tridimensionales (Lakowicz, 2006). La microscopía confocal resuelve este problema permitiendo aumentar la resolución axial, pero generalmente a un costo de señal mas débil. Esto implica tiempos de adquisición de imágenes más largos o una relación señal a ruido mas baja.

I.4 Objetivos de la tesis.

El objetivo principal de este trabajo de tesis es estudiar la emisión de fluorescencia en pigmentos orgánicos inducida por el proceso de absorción de dos fotones, usando pulsos de luz ultracortos. Este proceso es importante para la implementación de técnicas novedosas en microscopía por procesos no lineales. Por lo que para lograr este objetivo necesitamos cumplir los siguientes objetivos particulares:

- Determinar los mecanismos físicos que influyen en la eficiencia de la fluorescencia por absorción de dos fotones, así como la dependencia con la irradiancia de bombeo y otros parámetros de operación.

- ver si hay diferencias entre la fluorescencia obtenida por absorción de un fotón y con la obtenida por absorción de dos fotones.
- Caracterización de la respuesta no lineal de los pigmentos y determinación de los coeficientes no lineales asociados

I.5 Estructura de la tesis.

Este trabajo de tesis está desarrollado en 5 capítulos. En el primer capítulo se presenta una breve introducción sobre la óptica no lineal y el uso de láseres pulsados, así como algunos fenómenos no lineales que incluyen el proceso de absorción de dos fotones. Se mencionan también las técnicas de microscopía basadas en fenómenos ópticos no lineales, como la microscopía por absorción de dos fotones.

En el capítulo II, se presentan las propiedades ópticas y electrónicas de materiales orgánicos, así como los mecanismos de excitación y de emisión. También se presenta una descripción sobre los pigmentos utilizados y su método de preparación. Al final se hace una descripción teórica del fenómeno de absorción no lineal y se discute la determinación de la sección transversal de absorción de dos fotones.

El capítulo III contiene una descripción de los sistemas usados para la obtención de los espectros de fluorescencia inducidos por el proceso de absorción de un fotón y por absorción de dos fotones. Se muestran los resultados de emisión obtenidos con los sistemas empleados, en donde se estudiaron las características de emisión para algunos parámetros de operación. Al final de este capítulo se presenta una comparación de los espectros de fluorescencia obtenidos con las dos distintas formas de excitación, es decir, por absorción de un fotón y por absorción de dos fotones.

En el capítulo IV se presenta un estudio de la respuesta óptica no lineal de los

pigmentos estudiados. Se caracteriza la absorción no lineal producida por el fenómeno de absorción de dos fotones utilizando la técnica de *z-scan* abierto. También, para completar el estudio de la absorción no lineal de las muestras, se presentan los resultados de un estudio sobre la caracterización del haz utilizado en los experimentos.

Finalmente, en el capítulo V se mencionan las conclusiones obtenidas en este trabajo de tesis.

Capítulo II

MATERIALES ORGÁNICOS.

En este capítulo se presenta una descripción de la estructura química de los pigmentos orgánicos conjugados, así como de las características electrónicas y ópticas que son consecuencia de esta estructura. Dichas características nos servirán para entender los mecanismos físicos de absorción y emisión de luz que son objeto de este trabajo de tesis. Esta descripción incluye el proceso de absorción no lineal que se observa bajo la excitación de luz intensa de la longitud de onda adecuada.

II.1 Pigmentos orgánicos

Un pigmento orgánico es un compuesto formado por enlaces covalentes perteneciente a los hidrocarburos, los cuales se dividen en dos grupos: los saturados y los insaturados. El grupo de los saturados se distingue por tener sólo enlaces sencillos, mientras que los insaturados tienen enlaces dobles o enlaces triples, los que tienen una gran influencia sobre las propiedades espectroscópicas del material. Existen compuestos que están formados por enlaces sencillos y dobles alternados, los cuales se conocen como compuestos conjugados. Los pigmentos orgánicos, en un sentido estricto, son compuestos conjugados dobles (también son conocidos como materiales π conjugados), que usualmente tienen una banda de absorción en la parte visible del espectro electromagnético (Schäfer *et al.*, 1973).

II.2 Propiedades electrónicas

La formación de enlaces covalentes se puede entender con base a la teoría cuántica de orbitales moleculares. Según esta teoría, cuando se forma una molécula los orbitales atómicos pierden su individualidad y se transforman en orbitales moleculares, que son orbitales que dejan de pertenecer a un solo núcleo para depender de dos o más núcleos. El tratamiento matemático utilizado para el cálculo de los orbitales moleculares es un método de combinación lineal de orbitales atómicos, que considera que el orbital molecular es el resultado de la suma o resta de los dos orbitales atómicos implicados. El caso más sencillo de los enlaces moleculares, está en la interacción de dos átomos con un sólo orbital atómico (orbital s) que resulta en un orbital σ . Los electrones en un enlace σ se encuentran simétricamente distribuidos alrededor del eje internuclear y tienen un grado de deslocalización muy pequeño, lo que indica que los electrones implicados se encuentran fuertemente ligados a su núcleo, como se muestra en la figura 2.

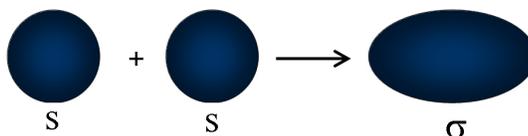


Figura 2. Formación del orbital molecular sigma a partir de los orbitales atómicos individuales s .

De acuerdo con el *principio de exclusión de Pauli*, los dos electrones que ocupan el orbital molecular deben tener espines opuestos para poder agruparse en el enlace molecular, de lo contrario, formarán un antienlace molecular (denotado con $*$). Asimismo, en el orbital enlazante, la densidad electrónica se concentra simétricamente en la región comprendida entre los dos núcleos, es decir, la máxima probabilidad de encontrar los

electrones se tiene en dicha zona, donde son más atraídos electrostáticamente por ambos núcleos, disminuyendo así la energía del sistema. Los electrones situados en un orbital σ tienden a mantener unidos los dos núcleos de los átomos a los que pertenecen. Otro tipo de enlace molecular ocurre cuando dos orbitales p se superponen con sus ejes de simetría paralelos para constituir al enlace π . Como los orbitales p tienen dos lóbulos, uno negativo y otro positivo, la orientación en la unión de los orbitales atómicos es importante para la formación del orbital π . El orbital molecular π se muestra en la figura 3.

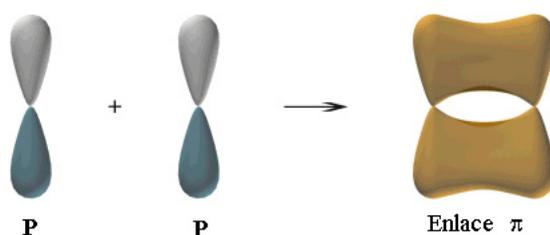


Figura 3. Formación del orbital molecular pi a partir de los orbitales atómicos individuales p .

En la formación de moléculas poliatómicas, determinados elementos químicos establecen enlaces covalentes, en donde se crean configuraciones electrónicas diferentes que no son previstas por la configuración electrónica de los átomos. Para explicar esto, debemos introducirnos en la teoría de hibridación, que explica esto como una mezcla en el orden de los electrones entre orbitales de un átomo, creando una configuración electrónica nueva; es decir, una mezcla de orbitales no equivalentes como s y p . Como consecuencia de esta mezcla, un orbital híbrido no es un orbital atómico puro.

En las moléculas orgánicas, la hibridación del carbono juega un papel importante ya que sufre varios tipos de hibridación (sp , sp^2 y sp^3), es decir, puede reacomodar sus electrones del mismo nivel de energía del orbital s al orbital p (Morrison y Boyd, 2005). Debido a que el carbono tiene 4 electrones desapareados, es tetravalente, lo

que resulta útil en la formación de enlaces moleculares en la cadena de una molécula orgánica en combinación con el hidrógeno (Roberts y Caseiro, 1963). Para ejemplificar la hibridación sp^3 , usaremos al metano, el hidrocarburo saturado más sencillo, cuya fórmula molecular es CH_4 , que consiste en un átomo de carbono con cuatro orbitales y que se traslapa con los orbitales s de cuatro átomos de hidrógeno para formar cuatro enlaces σ fuertes carbono-hidrógeno, como se ve en la figura 4.

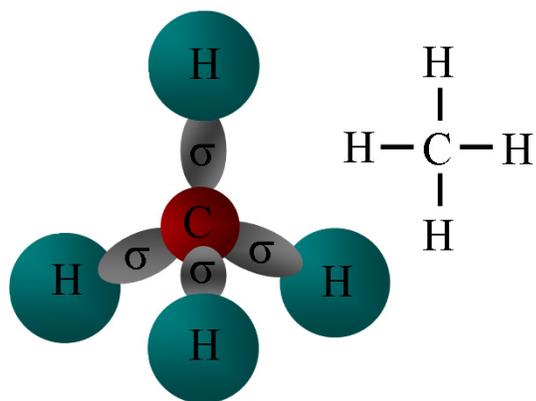


Figura 4. Representación de la molécula de metano y los enlaces moleculares que la mantienen.

Otro ejemplo de formación de enlaces moleculares, es la hibridación sp^2 del carbono en la molécula de etileno, que es el alqueno más sencillo. El etileno posee dos átomos de carbono y cuatro de hidrógeno (C_2H_4), por lo que los dos átomos de carbono están unidos entre sí por un enlace doble (un enlace π y otro σ) y cada uno unido a dos átomos de hidrógeno en un enlace σ . Cada carbono utiliza uno de los tres orbitales híbridos que posee para formar un enlace σ con el otro átomo de carbono, y los dos orbitales híbridos restantes para traslaparse con los orbitales s de dos átomos de hidrógeno, formándose así cuatro orbitales moleculares σ carbono-hidrógeno. La molécula de etileno consta, por tanto, de cinco enlaces fuertes de tipo σ , uno de ellos carbono-carbono y cuatro carbono-hidrógeno, mientras que también se forma un enlace π con los orbitales P_z de

cada carbono. La figura 5 muestra la naturaleza de los enlaces formados en la molécula de etileno.

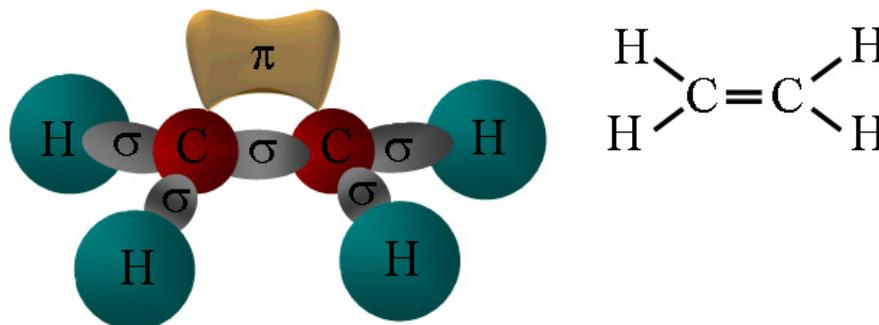


Figura 5. Representación de la molécula de etileno y los enlaces moleculares simples y doble.

En el orbital π los electrones están débilmente amarrados a sus átomos, por lo que tienen un alto grado de deslocalización y se distribuyen como nubes electrónicas por encima y debajo del plano del enlace, formando lo que llamamos el enlace doble (un enlace π y un enlace σ como se ve en la figura 5) y el enlace triple (dos enlaces π y un enlace σ). Para moléculas orgánicas con cadenas más largas, que incluyen una mayor cantidad de átomos de carbono y de hidrógeno, la hibridación del carbono juega un papel importante, ya que puede dar una mayor estabilidad a la molécula con los enlaces σ permitiendo la deslocalización de los electrones π en la molécula. A esto se le conoce como conjugación y se puede ver como la alternación de enlaces sencillos y múltiples en la molécula (ver figura 6). Normalmente, debido a su fácil deslocalización, los electrones π son los que determinan la respuesta de los materiales π -conjugados a la iluminación con luz. Un pigmento es entonces un compuesto orgánico que posee ligaduras dobles o triples conjugadas y cuya respuesta electrónica genera bandas de absorción en el visible.

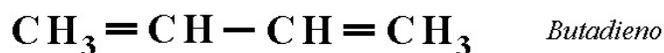
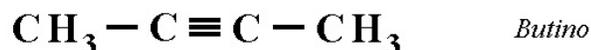


Figura 6. Cadenas de moléculas orgánicas. El butano tiene una cadena no conjugada, mientras que los tres restantes son cadenas conjugadas al tener sus enlaces sencillos y múltiples alternados.

II.3 Propiedades ópticas

En los compuestos orgánicos, la estructura de estados de los materiales conjugados (conjugación π) se puede explicar desde un punto de vista simplificado mediante un modelo de gas de electrones libres, ya que el cálculo cuántico de los niveles de energía de una molécula es complicado por contar con muchos átomos. Este modelo se basa en que las moléculas de pigmento son esencialmente planas con todos sus átomos situados en la cadena conjugada en un plano común, y unidos con enlaces σ . A su vez, los electrones π tienen un nodo en el plano de la molécula y forman una nube de cargas arriba y abajo del plano a lo largo de la cadena conjugada. En primera aproximación, el potencial electrostático que sienten los electrones π moviéndose en el campo a través de la molécula puede ser considerado constante, siempre y cuando las longitudes de los enlaces entre los átomos sean las mismas.

Asumimos que este potencial electrostático se mantiene constante en toda la cadena

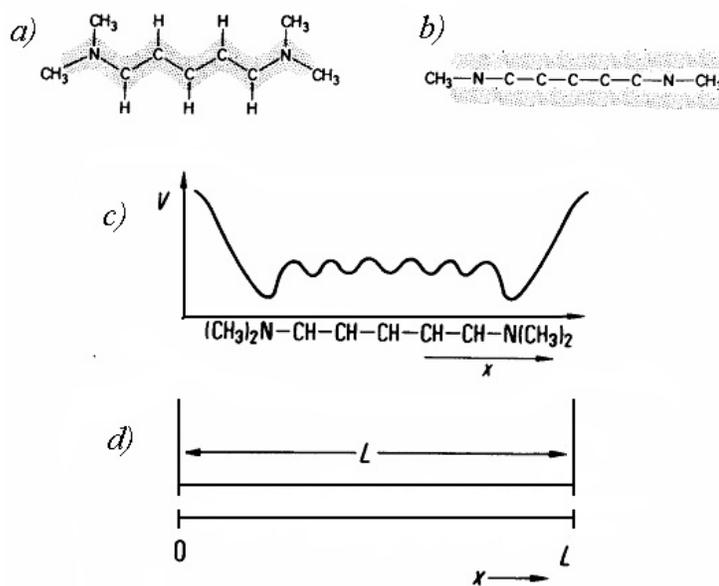


Figura 7. Cadena de una molécula de pigmento de cianina vista desde: a) arriba, b) de lado. c) Energía de potencial V de un electrón pi moviéndose a lo largo de la cadena de la molécula, d) energía de potencial simplificada con longitud L de la molécula.

conjugada de la molécula, que se extiende aproximadamente una longitud L (ver figura 7). Entonces la energía del n -ésimo eigenestado de un electrón está dada por $E_n = h^2 n^2 / 8mL^2$ donde h es la constante de Planck, m es la masa del electrón y n es un número entero. De acuerdo al principio de exclusión de Pauli, cada estado puede ser ocupado por dos electrones. Así, si se tienen N electrones, los $N/2$ estados más bajos estarán ocupados con dos electrones cada uno, mientras que los estados más altos estarán vacíos (N es normalmente un número par). La absorción de un fotón de energía $E = hc_0/\lambda$ (donde λ es la longitud de onda de la radiación absorbida y c_0 es la velocidad de la luz en el vacío) hace que un electrón pase del estado ocupado más alto (HOMO, *Highest Occupied Molecular Orbital*, por sus siglas en inglés) al estado desocupado más bajo (LUMO, *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*, ideem). La longitud de onda de absorción más larga corresponde a una transición entre el HOMO y el LUMO con

ΔE_{min} dada por la ecuación 3:

$$\Delta E_{min} = \frac{h^2}{8mL^2}(N + 1), \quad (3)$$

donde el HOMO es el estado $N/2$ y el LUMO es el estado $N/2 + 1$. Desde el punto de vista de la longitud de onda, esta relación implica que esta transición corresponde a una λ_{max} dada por:

$$\lambda_{max} = \frac{8mc_0}{h} \frac{L^2}{N + 1}. \quad (4)$$

Esto indica que a primera aproximación la posición de la banda de absorción está determinada sólo por la longitud de la cadena y el número N de electrones π en la molécula.

Como las moléculas de pigmento contienen un número par de electrones debido a la naturaleza de sus enlaces, los posibles estados originados tendrán espín total $S = 0$ (espines antiparalelos) o $S = 1$ (espines paralelos) dando por tanto origen a dos ramas de estados, una de estados singuletes (S_n) y otra de tripletes (T_n). El modelo de electrones libres también da una explicación simple sobre la posición de los estados tripletes respecto a los singuletes. En general, los niveles T_n tendrán energías menores a las de los niveles S_n correspondientes (figura 8). Las transiciones radiativas de un nivel singulete a uno triplete son fuertemente prohibidas ($\Delta S = 1$) y por tanto, con vidas medias muy largas, lo que puede producir poblaciones apreciables en estados tripletes metaestables.

Cuando las moléculas de pigmento son excitadas, puede presentar luminiscencia, es decir, la emisión de luz. La luminiscencia está formalmente dividida en dos categorías, la fosforescencia y la fluorescencia. Normalmente, el electrón pasa del estado base

(S_0) a su primer estado singlete excitado (S_1) conservando la misma orientación de espín. Debido a que la transición es permitida por espín ($\Delta S = 0$), el estado excitado S_1 decae rápidamente a S_0 emitiéndose un fotón. La tasa de fluorescencia es típicamente de $10^8 s^{-1}$, así que el tiempo de vida de fluorescencia típica es cercano a 10 ns. Normalmente la transición de S_1 a T_1 es prohibida, pero debido a que la diferencia de energías es muy pequeña, la probabilidad de transición es finita (proceso conocido como *intersystem crossing*). La transición T_1 a S_0 es prohibida por espín, por lo que la vida media del estado T_1 es muy larga, de μs a s . El decaimiento de T_1 puede ir acompañado de emisión de luz con vida media muy larga, llamada comúnmente fosforescencia.

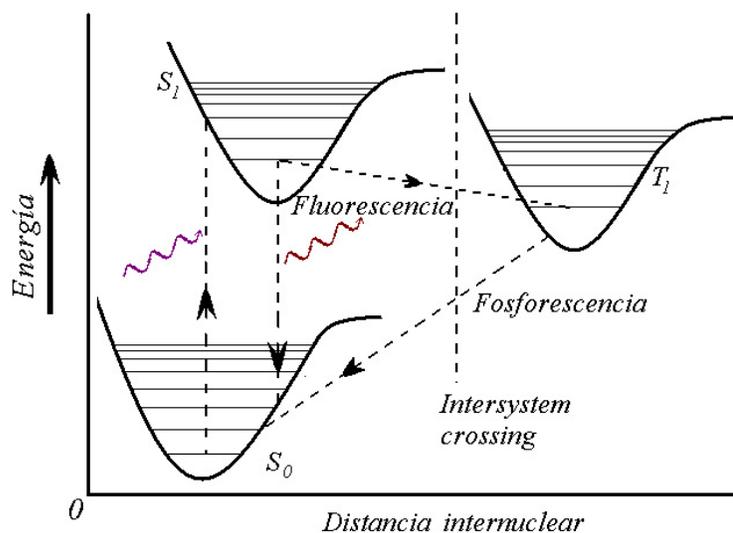


Figura 8. Diagrama de niveles y transiciones de energía de una molécula de pigmento.

Cada estado electrónico tendrá a su vez una serie de subniveles vibracionales. En primera aproximación, se puede considerar a la molécula como un oscilador armónico, por lo que cada estado tendrá una forma parabólica. Para cada estado electrónico, los fluoróforos pueden existir en un número de niveles de energía vibracionales descritos en la figura 8 para cada estado energético como líneas horizontales. Las transiciones entre

estados electrónicos son descritas como líneas punteadas para ilustrar la naturaleza instantánea de la absorción y emisión de luz. Estas transiciones ocurren en alrededor de 10^{-15} s, un tiempo muy corto para un desplazamiento significativo de los núcleos, por lo que la transición es representada por una línea vertical en el diagrama. Éste es el principio de *Franck Condon* (Valeur, 2002). Clásicamente la transición ocurre cuando las distancias entre los núcleos son iguales a las longitudes de enlace de equilibrio de la molécula en el estado base vibracional. Mientras la transición está en progreso, la posición de los núcleos sigue sin alterarse por lo que estos no se aceleran, consecuentemente la transición termina donde la línea vertical desde el estado base interseca a la curva de energía potencial en el estado excitado más bajo. En cuanto la transición se completa, la molécula empieza a vibrar, lo que explica el corrimiento (Stokes) entre los picos de absorción y emisión (Valeur, 2002; Lakowicz, 2006). La diferencia energética entre S_0 y S_1 es lo suficientemente grande para que no exista una población térmica de S_1 , es por esta razón que se usa luz y no calor para provocar la emisión de luz (fluorescencia) en las moléculas de pigmento. Una consecuencia interesante de la emisión a estados vibracionales altos, es que el espectro de emisión es típicamente una imagen de espejo (ver figura 9) de la absorción por la transición $S_0 \rightarrow S_1$, esta similitud ocurre porque la excitación electrónica no altera grandemente la geometría nuclear.

II.4 Materiales estudiados

Los materiales estudiados en este trabajo son dos pigmentos láser que fueron seleccionados de entre un grupo de cinco pigmentos con los que se cuenta en el laboratorio. Se escogieron los pigmentos con una absorción apreciable alrededor de 410 nm, lo que implica una probabilidad alta de ser excitados por el láser de femtosegundos a 820 nm

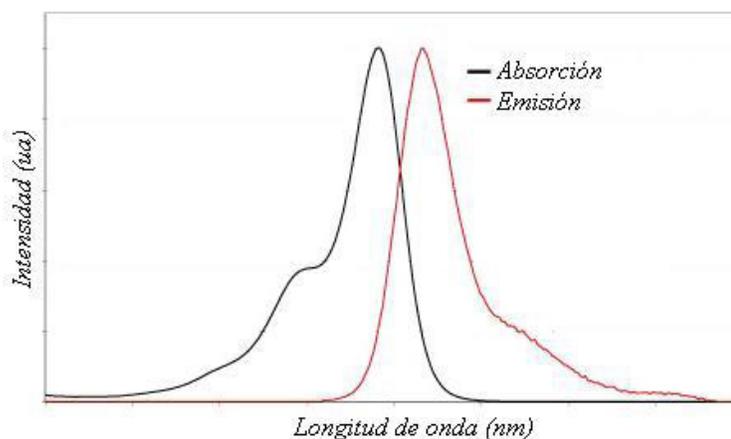


Figura 9. Espectros de absorción y emisión de un pigmento orgánico.

con que se cuenta en el laboratorio, mediante el proceso de absorción de dos fotones. Los pigmentos son: dicianometileno o DCM (de ahora en adelante nos referiremos a este pigmento como DCM) y cumarina 480 cuyas estructuras químicas se muestran en la figura 10.

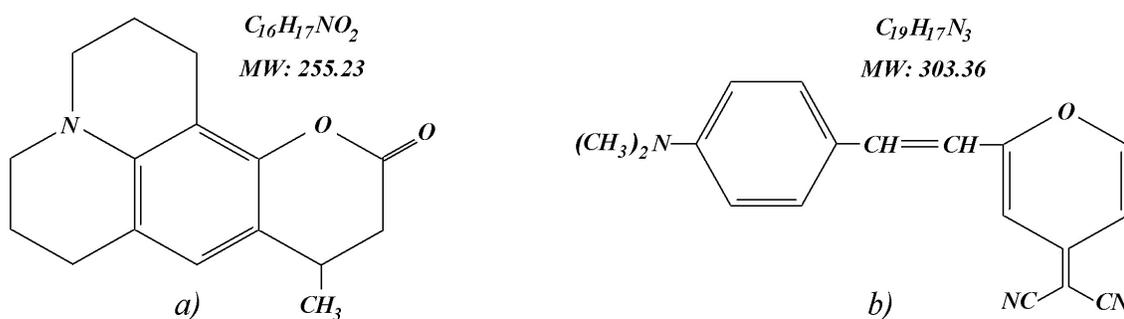


Figura 10. Estructura química de los pigmentos utilizados: a) Cumarina 480, b) DCM.

Los pigmentos que se estudian comúnmente son usados como medios activos para generar luz láser y generalmente se encuentran disueltos en solución líquida. Las características de estos materiales se muestran en la tabla I.

Las muestras de estos materiales fueron disueltas en metanol y contenidas en cubetas

Tabla I. Características físicas de los pigmentos utilizados.

Pigmento	DCM	Cumarina 480
Apariencia	Rojo cristalino	Amarillo cristalino
Máximo de absorción (nm)	472	389
Absorción molar ($Lmol^{-1}cm^{-1}$)	4.25×10^{-8}	2.15×10^{-8}
Máximo de fluorescencia en etanol (nm)	644	465

de vidrio óptico de 1 mm de espesor para su estudio. Las muestras en solución facilitan el estudio de la respuesta no lineal al igual que el estudio de la eficiencia de fluorescencia.

II.4.1 Preparación de las muestras.

Existen concentraciones sugeridas para las soluciones que se usan en láseres de pigmento. Estas concentraciones son típicamente de $10^{-3} M$ a $10^{-4} M$ en soluciones en metanol. Debido a esto, las concentraciones que decidimos usar, son cercanas a las que se muestran en la tabla II, que garantizan una absorción casi total de la luz de bombeo.

Tabla II. Concentraciones de la soluciones en metanol de los pigmentos utilizados.

Pigmento / Concentración	C_1 (M)	C_2 (M)
DCM	1.31×10^{-4}	2×10^{-3}
Cumarina 480	2.34×10^{-4}	2×10^{-3}

Dichas soluciones fueron preparadas en 50 ml de metanol con grado reactivo en un matraz aforado de acuerdo a la relación $M = mol_{soluta}/Lt_{solucion}$ y basándonos en el

peso molecular (gr/mol) de la sustancia para la cantidad de moles de soluto que se necesitan.

II.4.2 Espectros de absorción.

En la figura 11 se muestran los espectros de absorción para los pigmentos utilizados, medidos en una cubeta de vidrio óptico de 1 mm de espesor. Estos espectros de absorción en el visible y cercano infrarrojo fueron tomados con un espectrómetro marca HACH, modelo $DR/4800$, con una resolución de 0.1 nm en el intervalo de 190 a 1100 nm y que usa una fuente de Tungsteno y Deuterio.

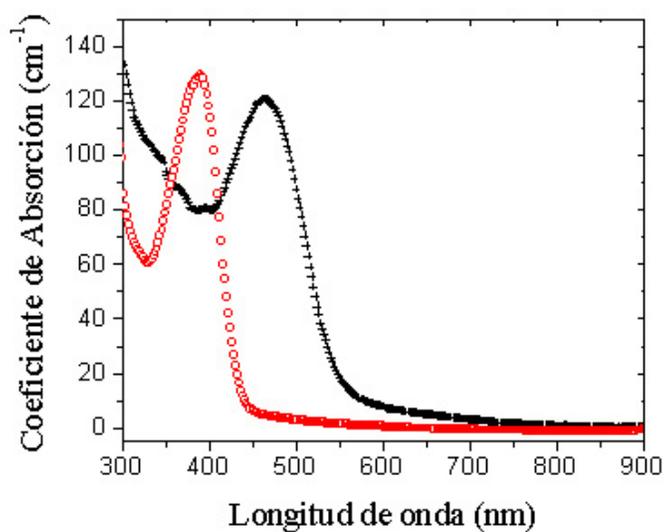


Figura 11. Espectro de absorción para los pigmentos: cumarina (o) y DCM (+). Para estas mediciones se usó la concentración C_1 de cada pigmento en cuestión.

El espectrómetro utilizado, mide la transmitancia T de la muestra y presenta, como resultado, la densidad óptica (OD) o absorbancia, definida como:

$$T = 10^{-OD}. \quad (5)$$

A través de la ley de Lambert-Beer, la transmitancia puede escribirse en términos del coeficiente de absorción lineal α , de la siguiente manera:

$$T = e^{-\alpha L}, \quad (6)$$

donde L es el espesor de la muestra bajo estudio (en nuestro caso, es el espesor de la cubeta). Por lo que el coeficiente de absorción se puede obtener de las ecuaciones 5 y 6 como función de la densidad óptica:

$$\alpha = \frac{OD \ln(10)}{L}. \quad (7)$$

Para soluciones, claramente se tiene que tanto α como OD son función de la concentración del soluto. Debido a esto, se utiliza el coeficiente de extinción molar ϵ del soluto, que está definido a través de:

$$T = 10^{-\epsilon c L}, \quad (8)$$

donde c es la concentración de la solución. El coeficiente de extinción molar es una propiedad del soluto directamente relacionada con la sección transversal de absorción, que determina cuán eficiente es el material para absorber luz de una longitud de onda dada y es independiente de la concentración. La figura 12 muestra este parámetro para los pigmentos utilizados.

II.5 Absorción no lineal.

De la ley de Lambert Beer (ecuación 6) se observa que la irradiancia de salida es linealmente proporcional a la irradiancia de entrada, como se muestra gráficamente en

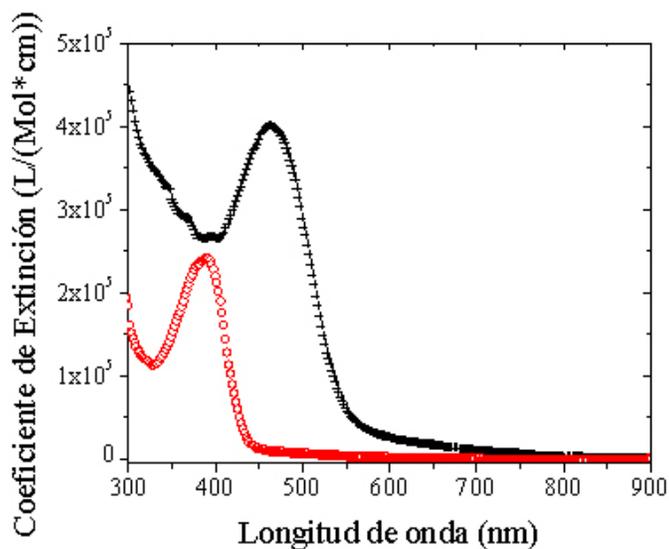


Figura 12. Espectros de extinción para los pigmentos: cumarina (o) y DCM (+).

la figura 13. Para irradiancias altas, la respuesta de los materiales se desvía de este comportamiento lineal. Para ciertos materiales, usualmente con transmitancia lineal (T_{lineal}) baja, ésta aumenta para irradiancias de entrada (I_{ent}) altas. A este comportamiento se le conoce como absorción saturable y el mecanismo físico que produce este comportamiento es la población de estados excitados por absorción en resonancia, en la que la promoción de una porción significativa de población al estado excitado hace que disminuya la población del estado base, por lo que la absorción disminuirá y la transmitancia se incrementará (ver figura 14).

Para otros materiales, usualmente con T_{lineal} alta, la transmitancia disminuirá con el incremento de la irradiancia de entrada. A este comportamiento se le conoce como absorción inducida, absorción saturable inversa ó absorción multifotónica. Los mecanismos físicos responsables pueden ser la absorción de estados excitados o la absorción de dos fotones.

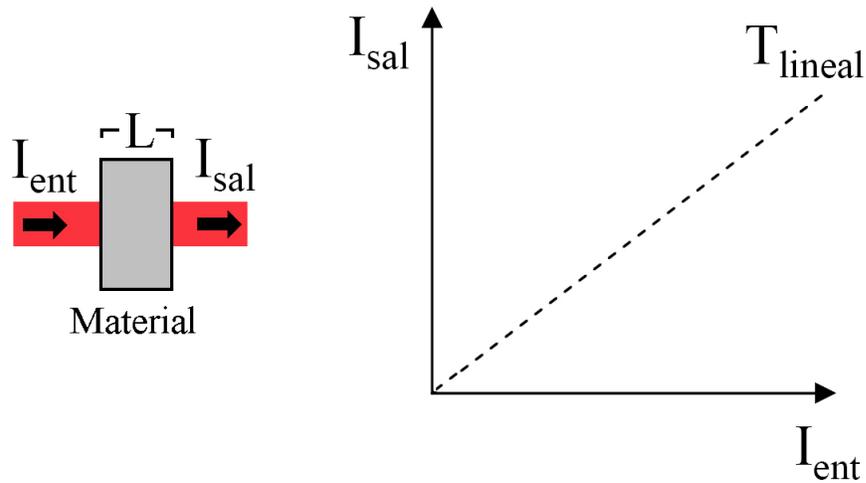


Figura 13. Comportamiento de la transmitancia ante irradiancias bajas en un material.

La absorción de dos fotones es un proceso óptico no lineal de tercer orden y el coeficiente no lineal relevante es proporcional a $Im\chi^{(3)}$ (generalmente lejos de resonancia con irradiancias altas). En este proceso dos fotones altamente coherentes pueden ser simultáneamente absorbidos en el mismo evento cuántico. La energía de los fotones superpuestos puede promover a uno de los átomos o moléculas al estado excitado (figura ??), dando como resultado un aumento en la absorción del material o una disminución en la transmitancia como se muestra en la figura 14b.

Para calcular como es la transmitancia no lineal es necesario calcular la propagación de la luz a lo largo del medio no lineal. Para esto, consideremos un material con una polarización no lineal de tercer orden dada por:

$$\mathbf{P}_{NL} = \varepsilon_0\chi^{(3)}|\mathbf{E}|^2\mathbf{E}. \quad (9)$$

El cálculo de la propagación, consiste en escribir las ecuaciones de Maxwell en conjunto con esta ecuación constitutiva (9), para deducir una ecuación de onda que

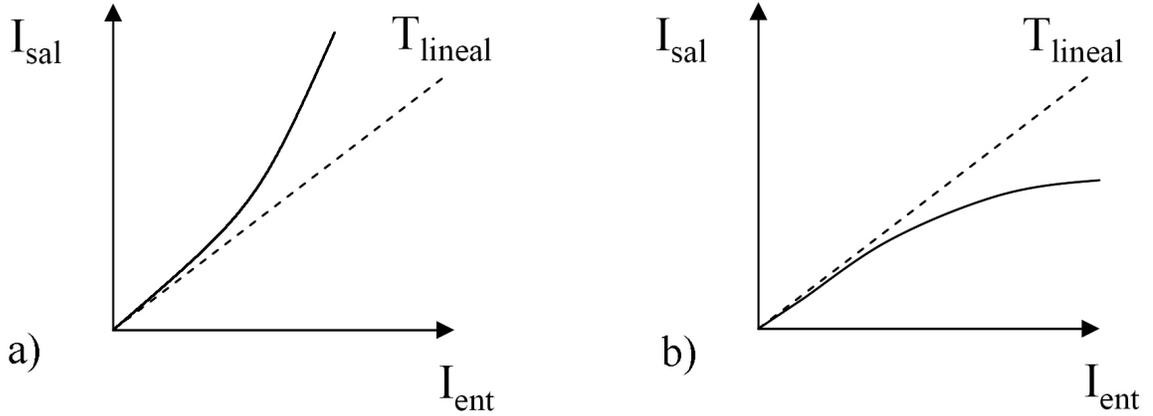


Figura 14. Comportamiento de la transmitancia ante irradiancias altas en un material. a) Absorción saturable, b) Absorción inducida.

resulta en:

$$\nabla^2 \mathbf{E}(r, t) - \frac{n_0^2}{c^2} \frac{\partial^2 \mathbf{E}}{\partial t^2}(r, t) = \mu_0 \frac{\partial^2 \mathbf{P}_{NL}}{\partial t^2}(r, t). \quad (10)$$

Emplearemos un campo incidente cuasi-monocromático de frecuencia ω , con envolvente \mathcal{E} dependiente de la posición y del tiempo, y con dirección de propagación en z .

$$\mathbf{E} = \frac{1}{2} [\mathcal{E}(r, t) e^{i(kz - \omega t)} + c.c.]. \quad (11)$$

La evolución de la envolvente $\mathcal{E}(z)$ cuya polarización no lineal oscila a la misma frecuencia ω del campo incidente, a través de la ecuación de onda (10), está dada por la expresión:

$$\frac{\partial \mathcal{E}}{\partial z} = -\frac{\alpha_0}{2} \mathcal{E} + i \frac{\omega}{2cn_0} \chi^{(3)} |\mathcal{E}|^2 \mathcal{E}. \quad (12)$$

Para ver los cambios que se generan en amplitud y fase de la onda incidente debido a la polarización resultante, tomaremos la envolvente $\mathcal{E}(r, t) = \mathbf{A} e^{i\phi}$ (con amplitud \mathbf{A} y fase ϕ) del campo eléctrico y lo sustituiremos en la ecuación 12, usando explícitamente la forma de \mathcal{E} en términos de la amplitud y de la fase. El resultado de la evolución de la envolvente del campo eléctrico en términos de la amplitud y de la fase, separando

parte real e imaginaria, es:

$$\frac{d\mathbf{A}}{dz} = -\frac{\alpha_0}{2}\mathbf{A} - \frac{\omega}{2cn_0}Im\chi^{(3)}\mathbf{A}^3, \quad (13)$$

y

$$\mathbf{A}\frac{d\phi}{dz} = \frac{\omega}{2cn_0}Re\chi^{(3)}\mathbf{A}^3. \quad (14)$$

La ecuación 13 permite calcular los cambios de la amplitud \mathbf{A} en propagación a través del medio y la ecuación 14 permite calcular los cambios en fase en propagación producidos por la refracción no lineal, pero ésta, no será objeto de estudio en este caso. Utilizaremos la irradiancia en lugar de la amplitud del campo para conocer dichos cambios en amplitud, donde la irradiancia $I = \varepsilon_0cn_0|\mathcal{E}|^2/2 = \varepsilon_0cn_0\mathbf{A}^2/2$. Si sustituimos el valor de \mathbf{A}^2 y multiplicamos por un factor de $2\mathbf{A}$ en la ecuación (13) se puede encontrar que la razón de cambio para la irradiancia en propagación está gobernada por:

$$\frac{dI}{dz} = -\alpha_0I - \frac{2k}{c\varepsilon_0n_0^3}Im\chi^{(3)}I^2, \quad (15)$$

donde se toma en cuenta el coeficiente de absorción lineal α_0 y además, si introducimos el coeficiente de absorción de dos fotones $\beta \equiv 2k/(c\varepsilon_0n_0^3)Im\chi^{(3)} = 4\pi/(\lambda_0c\varepsilon_0n_0^2)Im\chi^{(3)}$, la ecuación 15 se reduce a:

$$\frac{dI}{dz} = -\alpha_0I - \beta I^2 = -I(\alpha_0 + \beta I). \quad (16)$$

El factor entre paréntesis en la ecuación 16 representa el coeficiente de absorción efectivo del material que puede expresarse como función de la irradiancia:

$$\alpha(I) = \alpha_0 + \beta I. \quad (17)$$

La solución a la ecuación diferencial para la irradiancia a través de una longitud L de la muestra (ecuación 16), con la condición inicial de $I_0 = I(z = 0)$ es:

$$I(z = L) = \frac{I_0 e^{-\alpha_0 L}}{1 + \beta I_0 L_{ef}}, \quad (18)$$

donde $L_{ef} = (1 - e^{-\alpha_0 L})/\alpha_0$ es el espesor efectivo de la muestra y que tiende a L cuando la absorción lineal tiende a cero ($\alpha_0 \rightarrow 0$). Esta expresión permite describir la absorción de la muestra para irradiancias altas considerando la contribución no lineal de $Im\chi^{(3)}$; sin embargo, para irradiancias muy altas es posible que exista una contribución de diferentes procesos al fenómeno de absorción no lineal, tal como absorción de tres o más fotones y/o formación de excitones, etc.

Entonces, un pigmento orgánico con dos ramas de estados puede ser excitado sustituyendo de un fotón de alta energía por dos fotones de baja energía, usando únicamente irradiancias altas (ver figura 15), ya que el proceso de absorción se vuelve función de la irradiancia como se ve en la ecuación 17. Una vez en el estado excitado, la molécula podrá emitir un fotón de fluorescencia, independientemente del modo de excitación.

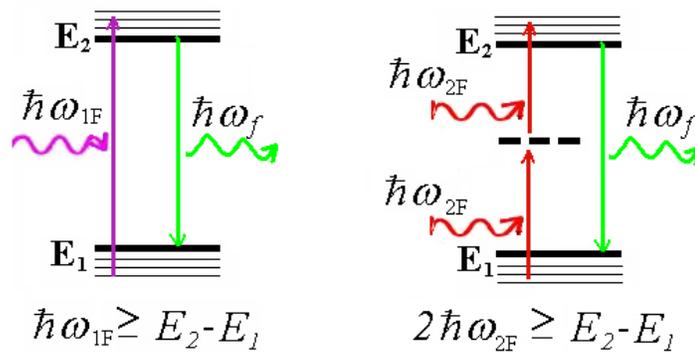


Figura 15. Excitación y emisión de un material con dos niveles de energía usando: absorción de un fotón de alta energía (izquierda) y absorción de dos fotones de baja energía (derecha).

Capítulo III

FLUORESCENCIA POR ABSORCIÓN DE DOS FOTONES

Los pigmentos escogidos para los experimentos, fueron sintetizados para usarse como medios láser, por lo que tienen una alta eficiencia de fluorescencia. Dentro de los pigmentos disponibles, escogimos los que presentan absorción significativa a 410 *nm*, porque implica que tienen una resonancia para el proceso de absorción de dos fotones a la longitud de onda del láser de Ti:zafiro con el que contamos. Esta resonancia (a uno y a dos fotones) hace que el proceso de fluorescencia que se desea observar tenga una alta eficiencia.

En este capítulo presentamos un estudio experimental del proceso de fluorescencia por absorción de dos fotones, usando pulsos de femtosegundos en el infrarrojo cercano. Este estudio incluye la caracterización de la potencia y el espectro de emisión como función de distintos parámetros del láser. Se incluye también una caracterización de la fluorescencia obtenida bombeado directamente con fotones a 410 *nm*, obtenidos utilizando el segundo armónico del láser.

III.1 Dispositivo experimental.

Los experimentos realizados constan de dos partes, en la primera se obtuvieron espectros de fluorescencia por absorción de un sólo fotón, que llamaremos fluorescencia convencional, en donde la excitación es producida con luz de una longitud de onda cercana al pico de absorción del pigmento, es decir, una longitud de onda corta. Para la

fluorescencia por absorción de dos fotones, las pruebas realizadas se hicieron mediante excitación por fotones de baja energía o de longitud de onda larga. Ambos dispositivos experimentales usan el láser pulsado en el régimen de femtosegundos disponible en el laboratorio. El láser usado es un láser de modos amarrados (mode-locked) de Ti:zafiro que permite obtener pulsos de muy corta duración en el régimen de femtosegundos. Este es un modelo N JA-4 fabricado por CLARK-MXR, INC. (USA) y es bombeado por un láser continuo de 5 W a una longitud de onda de 532 nm. Los pulsos producidos están centrados alrededor de 820 nm, y una frecuencia de repetición de 94 MHz, con una potencia promedio máxima de 310 mW, esto equivale a una energía por pulso máxima de $E_p = 3.3 \text{ nJ}$ aproximadamente. Para analizar y medir los espectros se usa

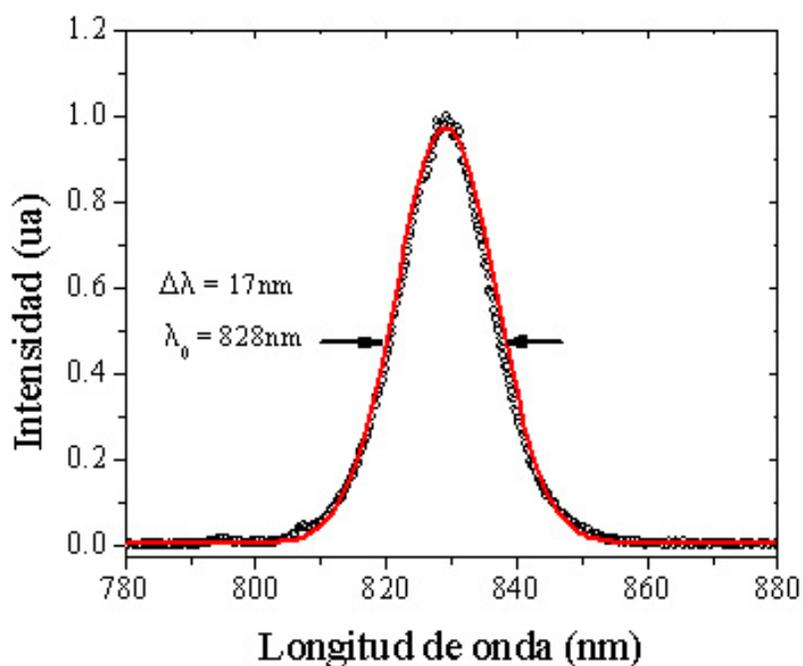


Figura 16. Espectro de los pulsos del láser de Ti:zafiro. La línea continua (-) es el ajuste gaussiano teórico a los datos experimentales (o).

un espectrómetro modelo USB 4000 (OCEAN OPTICS) con una resolución de 0.3nm

y con un rango de 400 a 900 nm . El espectro de los pulsos del láser se muestra en la figura 16, este tiene una forma gaussiana centrada en $\lambda = 828nm$, con un ancho espectral FWHM (full width at half maximum, $FWHM$, por sus siglas en inglés) $\Delta\lambda = 17 nm$.

Para caracterizar la duración de los pulsos, es necesario utilizar técnicas basadas en procesos ópticos no lineales, ya que las técnicas convencionales no funcionan a esta escala de tiempo. En este caso, usamos la técnica de autocorrelación óptica que considera el caso límite, donde la señal tiene que ser usada también como referencia para medirse a si misma (Diels y Rudolph, 1996). En esta técnica se generan dos replicas del pulso mediante un divisor de haz y se utiliza una como señal y la otra como referencia, con un retardo variable entre ellas (figura 17). Los pulsos se traslapan espacialmente y se

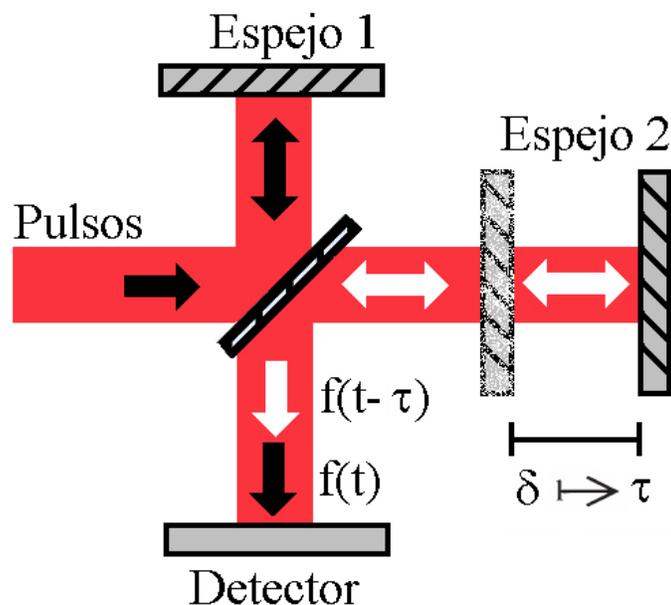


Figura 17. Esquema del sistema de autocorrelación, cuyo espejo que se encuentra en la horizontal, genera un retraso en el pulso que se quiere medir.

les hace incidir en un material con una no linealidad instantánea, como la generación

de segundo armónico, fluorescencia o absorción de dos fotones. La señal obtenida como función del retraso entre los pulsos τ es proporcional a la autocorrelación en intensidad $A(\tau)$, la cual está definida por:

$$A(\tau) = \int_{-\infty}^{\infty} I(t)I(t - \tau)dt, \quad (19)$$

con $I(t)$ la envolvente temporal de la irradiancia de los pulsos (García Arthur *et al.*, 2003).

La autocorrelación en intensidad tiene una desventaja, y es que provee muy poca información acerca de la forma del pulso, y nada acerca de la fase del campo eléctrico. Para pulsos con envolvente conocida, el ancho temporal de autocorrelación en intensidad nos permite determinar la duración del pulso, mediante una relación de proporcionalidad sencilla (Diels y Rudolph, 1996). El factor numérico (ver tabla III) que relaciona ambas duraciones, depende de la forma específica del perfil temporal del pulso. Para láseres de femtosegundos, los perfiles más utilizados son el gaussiano y el de secante hiperbólica, definidos como:

$$I(t) = I_0 e^{-2t^2/\tau_g^2}, \quad (20a)$$

y

$$I(t) = I_0 \operatorname{sech}^2(t^2/\tau_s^2), \quad (20b)$$

siendo 20a la ecuación que representa al perfil gaussiano, mientras que 20b es para la secante hiperbólica. Para el perfil gaussiano, τ_g es la duración de $E(t)$, mientras que τ_s es la duración del perfil de secante hiperbólico, ambas medidas a HW1/eM.

En la figura 18 se muestra la traza de autocorrelación para los pulsos del láser de femtosegundos del laboratorio, que se obtuvo mediante un autocorrelador basado en absorción de dos fotones en un LED (García Arthur *et al.*, 2003). Con base a la tabla

Tabla III. Relación entre los anchos de los pulsos de láseres de femtosegundos para envolventes conocidas en la autocorrelación.

Envolvente	Irradiancia (<i>FWHM</i>)	Campo E (<i>FWHM</i>)	Autocorrelación de 2 ^{do} orden
Gauss	$t = \sqrt{2 \ln 2} \tau_{gauss}$	$\tau_p = \sqrt{2} t_p$	$\tau_{auto} = \sqrt{2} t$
Sech	$t = 1.763 \tau_{sech}$	$\tau_p = 1.495 t_p$	$\tau_{auto} = 1.542 t$

III y a la envolvente de la traza de autocorrelación obtenida, se puede determinar el ancho temporal de los pulsos del láser de Ti:zafiro, considerando que los pulsos tienen una forma de sech^2 . Si $\tau_{auto} = 120 \text{ fs}$, entonces, el ancho temporal del pulso es de $t = 78 \text{ fs}$.

El ancho espectral y el ancho temporal del pulso, están mutuamente relacionadas por la transformada de Fourier, de manera que para un pulso se cumple que:

$$t_p \Delta\nu \geq C, \quad (21)$$

donde t es duración del pulso y C es una constante numérica que depende otra vez de la forma del perfil temporal del pulso. El ancho espectral $\Delta\nu$ puede relacionarse con el ancho en longitud de onda $\Delta\lambda$ y la velocidad de la luz c , a través de:

$$\Delta\nu = c\Delta\lambda/\lambda^2, \quad (22)$$

La desigualdad 21 puede interpretarse como consecuencia del principio de incertidumbre; entre más ancho sea el espectro, más corto puede ser el pulso, siendo precisamente este límite el valor de la constante C (Diels y Rudolph, 1996). Para una distribución gaussiana $C = 0.441$, mientras que para una distribución de secante hiperbólica, se tiene un valor de $C = 0.315$. La igualdad en la expresión 21, se cumple para pulsos sin ninguna modulación temporal de fase, llamados limitados por transformada de

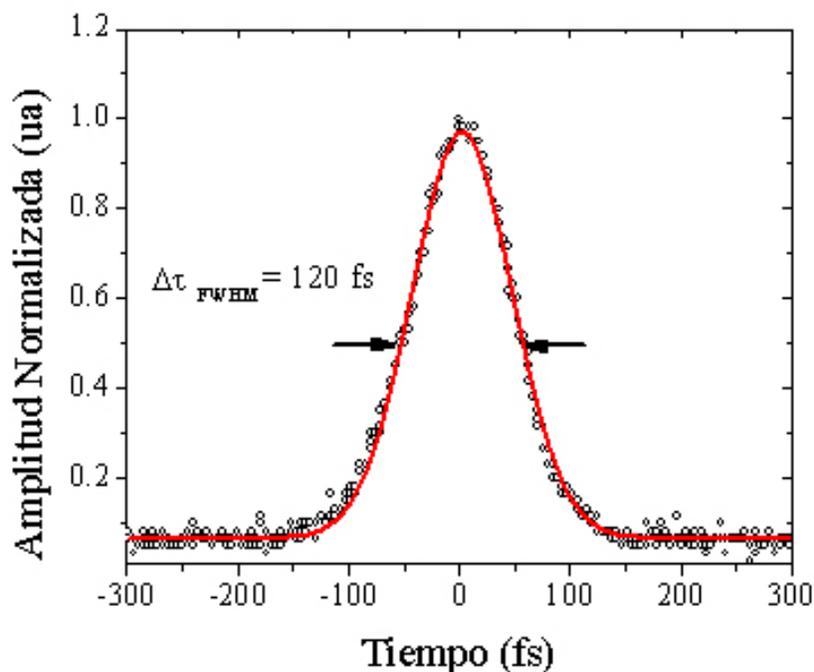


Figura 18. Traza de autocorrelación en intensidad de los pulsos de femtosegundos del láser de Ti:zafiro.

Fourier, y los pulsos con una mayor o menor componente de modulación temporal de fase, tendrán un producto $\Delta\tau\Delta\nu$ mayor a este límite inferior.

Entonces, para saber si los pulsos del láser de Ti:zafiro están alejados de un pulso limitado por transformada de Fourier, sustituimos los valores experimentales encontrados y el resultado es de $C = 0.577$, un valor mayor a $C = 0.315$ para pulsos con perfil de secante hiperbólica. Esto nos indica que los pulsos tienen una modulación temporal de las componentes en frecuencia.

III.1.1 Fluorescencia por absorción de un fotón.

Para los experimentos de fluorescencia, se usaron los pigmentos orgánicos DCM y cumarina 480, cuyas características se mostraron en la sección 2.4 del capítulo anterior, y

cuyos espectros de absorción se muestran en la figura 11. Las bandas de absorción de estos son compatibles con 410 nm (el segundo armónico 2ω de la longitud de onda del láser de Ti:zafiro) que cae cerca de los máximos de absorción. Esta longitud de onda permite una excitación eficiente y por lo tanto se puede obtener fluorescencia para ambos pigmentos. Para obtener los espectros de fluorescencia por absorción fundamental o absorción de un fotón, usamos el sistema que se muestra en la figura 19.

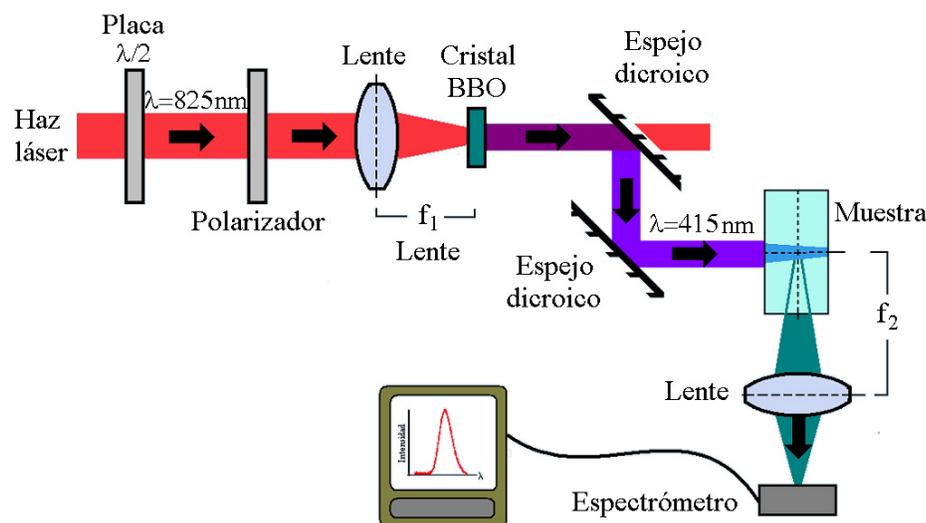


Figura 19. Sistema empleado para la obtención de fluorescencia por absorción de un fotón usando el segundo armónico del láser de Ti:zafiro.

Para variar la potencia del haz a la entrada de la muestra se usa una placa $\lambda/2$ y un polarizador lineal como un atenuador variable que conserva la polarización del haz. Una vez que el haz pasa por el polarizador lineal se enfoca en un cristal de BBO (beta borato de bario, BaB_2O_4) con una lente de $f = 20 \text{ cm}$ de distancia focal para generar el segundo armónico¹.

¹La generación de segundo armónico es un proceso no lineal de segundo orden, en el que la luz a frecuencia ω interacciona con el medio y produce luz a 2ω . Cabe mencionar que este término (2ω) sólo existe en medios no-centrosimétricos y que la respuesta no lineal es generada usualmente en condiciones lejos de resonancia y en general debida a deformaciones en la nube electrónica.

El cristal de BBO es un medio no lineal cuyas características principales se mencionan a continuación: apertura de $12 \times 12 \text{ mm}$; longitud de 2 mm ; estructura cristalina trigonal, grupo espacial $R3c$, grupo puntual $3m$; rango para emparejamiento de fases para generación de segundo armónico (GSA) de $189 - 1750 \text{ nm}$; coeficientes no lineales de segundo orden distintos de cero $d_{22} = 1.6$ y $d_{31} = 0.08 \text{ pm/V}$; alto umbral de daño y poca absorción. Con esto, se puede obtener un haz con una longitud de onda correspondiente a $\lambda_{2\omega} = 415 \text{ nm}$, que puede ser usado para la excitación de los pigmentos en solución y con ello obtener fluorescencia por absorción de un sólo fotón. Los espejos dichroicos colocados después del cristal de BBO en la figura 19, son usados para separar la luz del segundo armónico de la luz infrarroja remanente que viaja en la misma dirección. La idea de utilizar dos divisores fue para tener la menor cantidad posible del campo fundamental junto con el armónico.

El haz resultante se hace incidir sobre la muestra de pigmento en solución para así generar la fluorescencia del pigmento bajo estudio. Para obtener los espectros de emisión obtenidos, se colocó la fibra del espectrómetro USB 4000 con orientación de detección normal al eje de propagación del haz de excitación. Esto, debido a que la intensidad de fluorescencia es más débil que el haz de excitación y que a 90° la intensidad de bombeo esperada, es mínima, por lo que la intensidad de fluorescencia sería más fácil de medir y también se evitaría la saturación del detector. Los resultados de fluorescencia que se obtienen, se mostrarán en las secciones subsiguientes para los pigmentos cumarina 480 y DCM que son excitados con el haz de 2ω .

III.1.2 Fluorescencia por absorción de dos fotones.

El sistema que se emplea para generar la fluorescencia por absorción de dos fotones, a diferencia del que se muestra en la figura 19, usa directamente el haz de la fuente para generar fluorescencia. El proceso de absorción de dos fotones fue descrito en la sección 2.5 del capítulo 2, donde la población del estado excitado depende del cuadrado de la irradiancia (Göppert Mayer, 1931) y como la fluorescencia depende de la población en el estado excitado, entonces, la fluorescencia se vuelve dependiente del cuadrado de la irradiancia del haz de excitación.

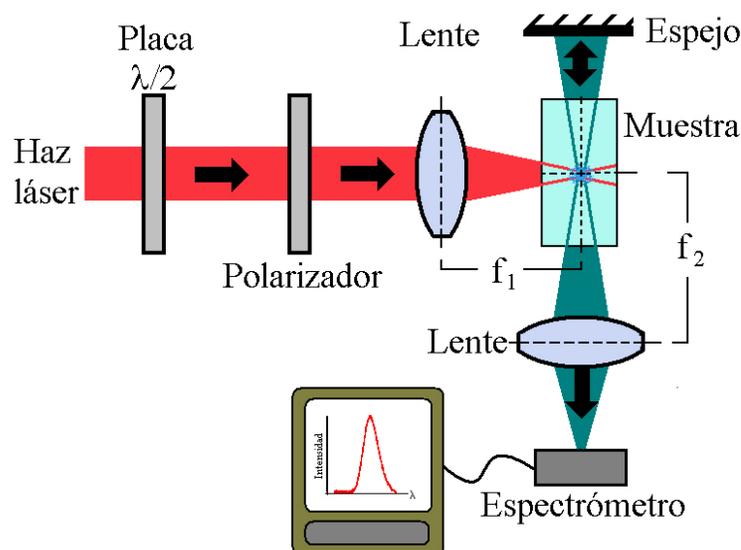


Figura 20. Esquema experimental para la generación de fluorescencia a través de la absorción de dos fotones.

El sistema para la medición de fluorescencia por absorción de dos fotones (figura 20) usado es un tanto similar al sistema de fluorescencia por absorción de un fotón, en donde el sistema de atenuación con polarización fija es el mismo. En este caso se excita la muestra directamente con fotones infrarrojos del láser de Ti:zafiro a 820 nm . Para ambos pigmentos hay absorción apreciable a 410 nm (figura 11), lo que corresponde a la energía de dos fotones ($2\omega_{IR}$ o $\lambda_{IR}/2$), por lo que el proceso de absorción de dos fotones

es posible para los pigmentos en solución. La eficiencia del proceso de absorción de dos fotones aumenta con la irradiancia de haz, por lo que los pulsos del láser son enfocados fuertemente en la muestra con una lente de 6 *mm* de distancia focal y apertura numérica de 0.5.

De la misma manera que en el sistema anterior (figura 19), la fibra de alimentación del espectrómetro es colocada a un ángulo de 90° con la dirección del haz. Con esto se evita la entrada de luz infrarroja al espectrómetro, que por ser más intensa, puede saturarlo. El espejo que se encuentra en la parte opuesta al espectrómetro, permite dirigir un poco más de fluorescencia al espectrómetro con el fin de obtener una mayor señal.

III.2 Resultados de fluorescencia por absorción de un fotón.

Los resultados obtenidos de fluorescencia por absorción de un fotón, se muestran en la figura 21, donde los espectros tomados son para dos concentraciones diferentes de los dos pigmentos. Los espectros de fluorescencia para las concentraciones C_1 y C_2 de cada pigmento, se muestran en una misma gráfica, habiendo sido normalizados con diferentes factores para detectar posibles diferencias entre ellos. Las concentraciones utilizadas de los pigmentos en solución se muestran en la tabla II del capítulo anterior.

Para ambos pigmentos, los resultados muestran que no existen cambios en los espectros de emisión con la concentración, al menos en el rango de concentraciones utilizado. Estos experimentos ayudaron para saber cual es la longitud de onda central de emisión para las soluciones en metanol grado reactivo con las concentraciones señaladas, para

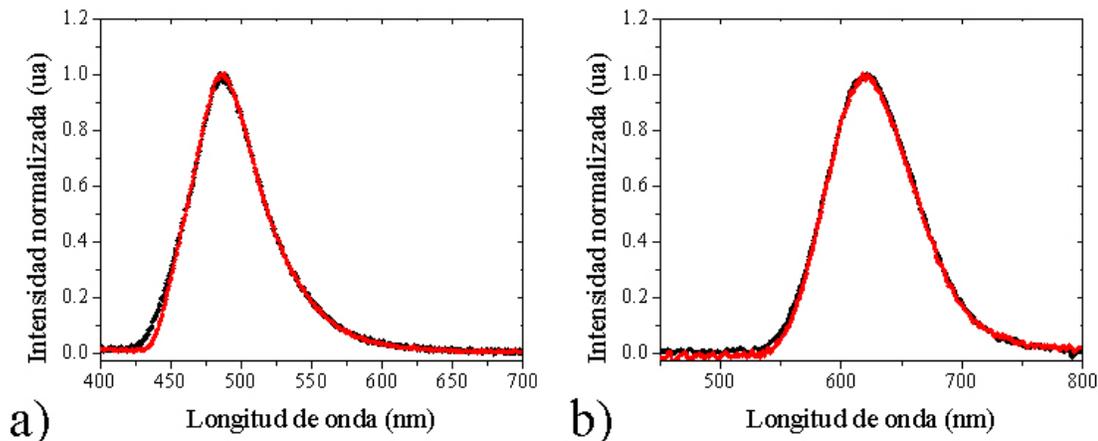


Figura 21. Espectros de fluorescencia para ambas concentraciones de los dos pigmentos, presentados con diferentes factores de normalización: a) cumarina 480 y b) DCM. Los pigmentos en solución son excitados con el segundo armónico del láser de Ti:zafiro a una potencia promedio de excitación de 120 mW.

luego compararlas con los experimentos por absorción de dos fotones. De los espectros de fluorescencia por absorción de un fotón se pueden obtener las características que se muestran en la tabla IV.

Tabla IV. Características de emisión de los pigmentos utilizados.

Pigmento	Concentración (M)	λ_c (nm)	$\Delta\lambda_{FWHM}$ (nm)
DCM	1.31×10^{-4}	622	84
	2×10^{-3}	621	84
Cumarina 480	2.34×10^{-4}	485	58
	2×10^{-3}	486	58

La diferencia en el valor de la longitud de onda central (λ_c) para las dos concentraciones de un pigmento dado, está dentro del margen de error experimental.

III.3 Resultados para la fluorescencia por absorción de dos fotones.

Los resultados obtenidos para la fluorescencia por absorción de dos fotones para el pigmento DCM a las dos concentraciones diferentes, usando el sistema previamente descrito, se muestran en la figura 22. La potencia promedio utilizada para estos experimentos fue de 120 mW , aunque también se varió hasta encontrar la señal a una potencia promedio de excitación de 220 mW . En este caso se presentan las señales medidas sin ninguna normalización, para mostrar la diferencia en amplitud para las mismas condiciones. Claramente la señal aumenta considerablemente con la concentración. Para ver

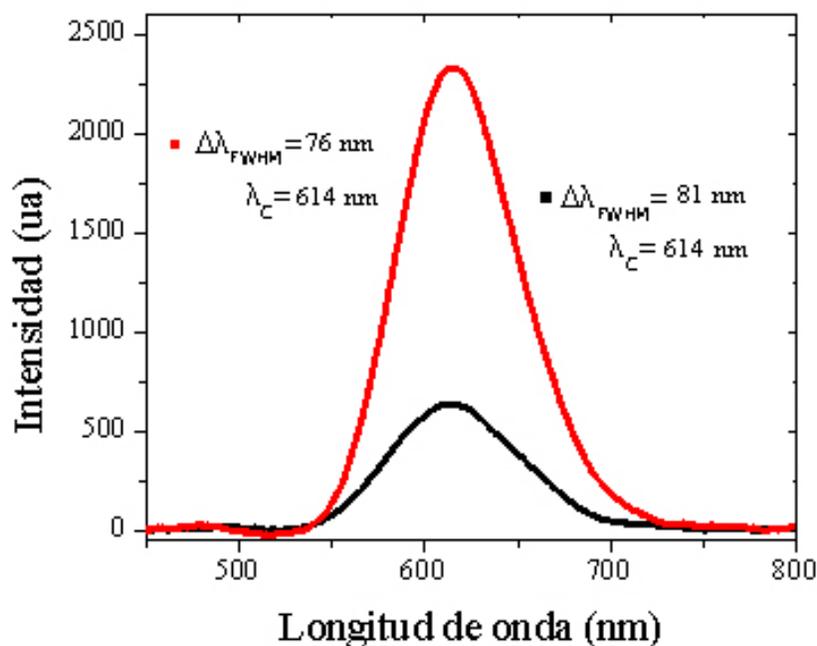


Figura 22. Espectros de fluorescencia por absorción de dos fotones para las concentraciones C_1 (en negro) y C_2 (en rojo) del DCM en solución con metanol.

en el caso del DCM si existen cambios en el espectro con la concentración, la figura 23

muestra los mismos espectros de la figura 22 con diferentes factores de normalización, escogidos de manera tal que el valor máximo coincida para ambas concentraciones. De la misma figura se ve que aunque la longitud de onda central no cambia, el ancho espectral sí, con una diferencia de 5 nm aproximadamente. Para la cumarina 480 sólo se muestra

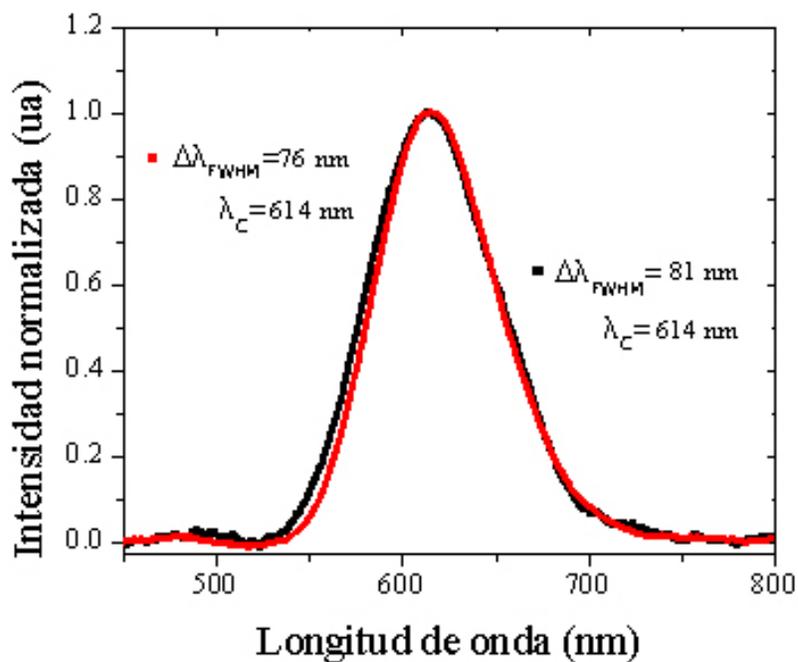


Figura 23. Espectros normalizados de fluorescencia por absorción de dos fotones para las concentraciones 1 (en negro) y 2 (en rojo) del DCM.

el espectro de emisión para una sola concentración, ya que para la concentración más baja, no se pudo medir una señal apreciable. Debido a esto, solo se mostrarán resultados de fluorescencia por absorción de dos fotones para las concentraciones C_2 de cada pigmento.

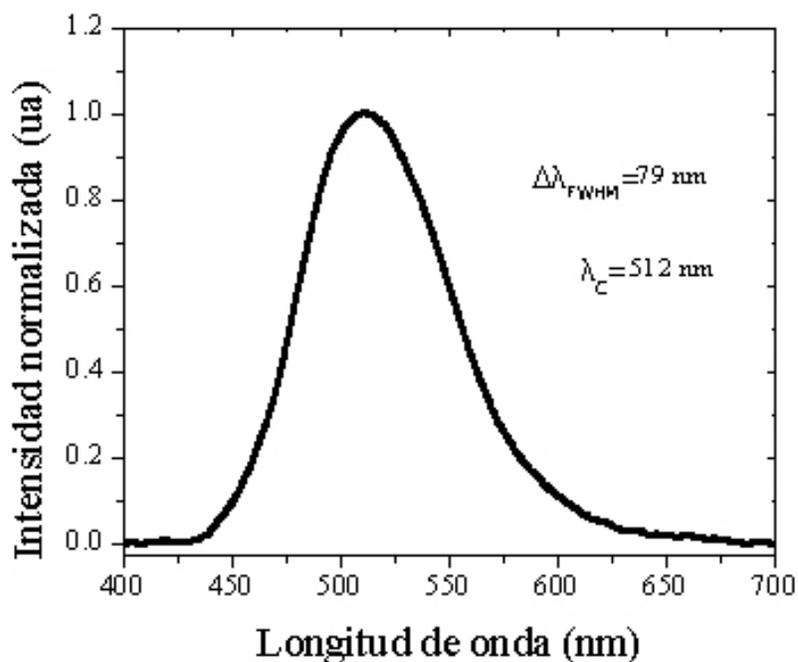


Figura 24. Espectro de fluorescencia por absorción de dos fotones para la concentración 2 de la cumarina 480 en solución con etanol.

III.3.1 Medición de la fluorescencia como función de la potencia de entrada.

Como se mencionó anteriormente, para el proceso de absorción de dos fotones, la población del estado excitado es una función cuadrática de la irradiancia de excitación. Puesto que la intensidad de fluorescencia es proporcional a la población del estado excitado, es de esperar que la señal de fluorescencia sea una función que depende cuadráticamente de la irradiancia de excitación. Para estudiar experimentalmente esta dependencia, se varió la potencia del haz a la entrada de la muestra con el sistema de atenuación con polarización fija. La fluorescencia fue medida como función de la potencia manteniendo constantes el ancho espectral del pulso (24 nm) así como la longitud de onda central de emisión del pulso (826 nm). La figura 25 muestra los espectros de

emisión para el DCM, para potencias promedio de 80 a 240 mW , mientras que la figura 26, muestra los espectros de emisión para la cumarina 480 con potencias promedio de excitación de 200 a 450 mW .

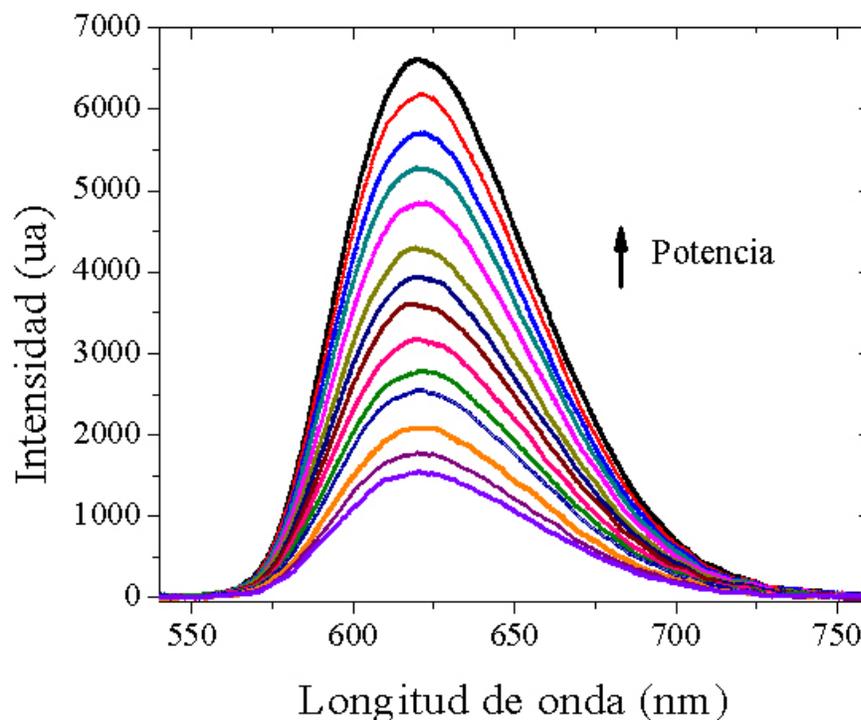


Figura 25. Espectros de fluorescencia por absorción de dos fotones como función de la potencia de excitación para el DCM.

Los resultados obtenidos para el DCM y para la cumarina 480 son mostrados en las figuras 25 y 26 respectivamente. La potencia pico para cada medida se grafica como función de la potencia de entrada en la figura 27.

De la figura 27 es fácil de observar que la intensidad de fluorescencia muestra un comportamiento no lineal como función de la potencia de excitación. Como ya se mencionó, la dependencia esperada debería ser cuadrática con la potencia de entrada. Los datos de la figura 27 parecen conformarse a este criterio, pero para asegurarnos, los

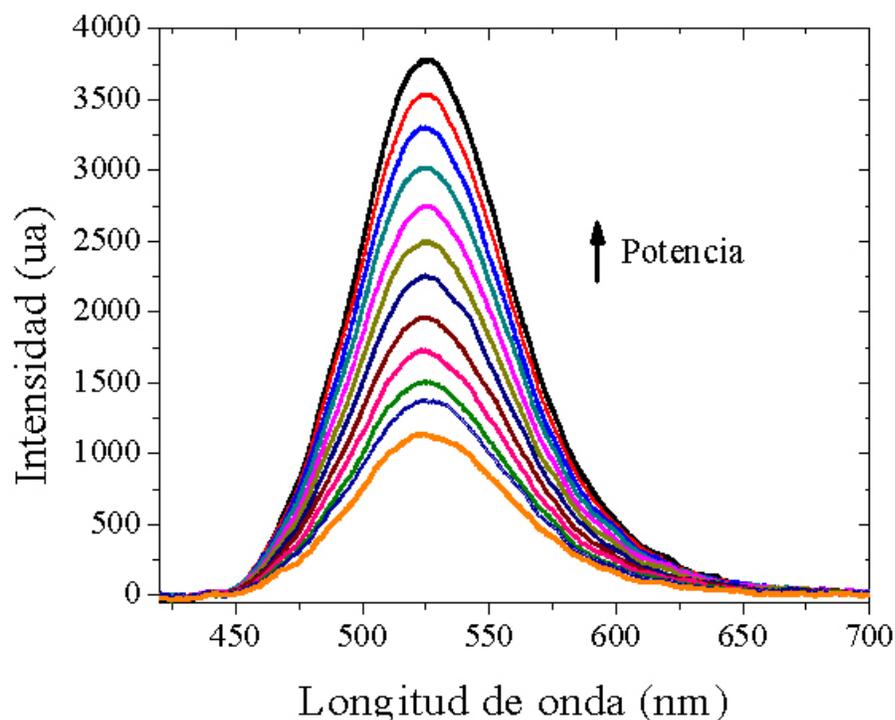


Figura 26. Espectros de fluorescencia por absorción de dos fotones como función de la potencia de excitación para el cumarina 480.

mismos datos serán presentados en una gráfica log-log en la figura 28. Así, si asumimos una dependencia $I_{fluo} = cte \cdot I_0^2$, los valores de la figura 28 deben de ajustarse a una recta con pendiente $m = 2$. El ajuste a los valores experimentales, resulta en un valor de $m = 1.56$ para el DCM y de $m = 1.76$ para la cumarina 480. La razón por la que estos valores son ligeramente menores al esperado de 2, es porque probablemente nuestra señal está contaminada con un poco de luz de bombeo (mucho más intensa) esparcida hacia el detector. Esta señal esparcida tendrá una dependencia lineal con la potencia de entrada, lo que equivale a una contribución con una pendiente 1 en las gráficas de la figura 28. El hecho de que la señal para la cumarina 480 se desvíe menos del comportamiento esperado, indica que hay menos contaminación por esparcimiento.

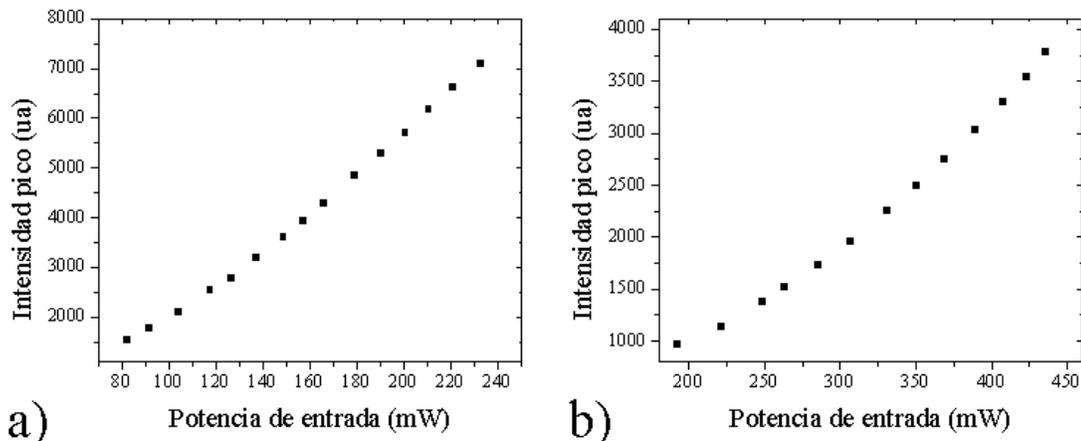


Figura 27. Comportamiento de la intensidad pico de los espectros de fluorescencia por absorción de dos fotones como función de la potencia de excitación. a) DCM y b) cumarina 480.

III.3.2 Medición de la fluorescencia como función de la longitud de onda.

Otro experimento que se realizó, fue la medición del espectro de fluorescencia por absorción de dos fotones como función de la longitud de onda de excitación. El láser de Ti:zafiro tiene cierto intervalo de sintonización, por lo que se puede estudiar el espectro de fluorescencia para diferentes longitudes de onda de excitación, manteniendo constante la potencia de incidencia (200 *mW*) en la muestra, así como el ancho espectral del pulso (16 *nm*). La intensidad pico de fluorescencia como función de la longitud de onda de bombeo, se muestra en la figura 29. Para el DCM se puede ver un máximo bien definido para una longitud de onda de 805, mientras que para la cumarina 480 parece haber un máximo en 810, pero no está bien definido.

En la misma gráfica se muestran los espectros de absorción para ambos pigmentos, con la longitud de onda escalada para que coincida con la energía $2\hbar\omega_{exc}$ del espectro de absorción de dos fotones. Cabe mencionar que no se pudo hacer un barrido más amplio

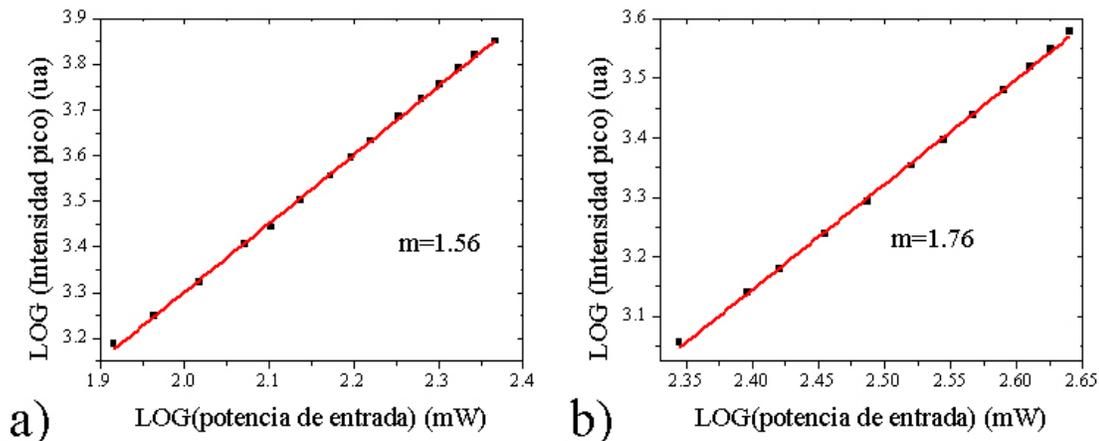


Figura 28. Gráfica log-log para la intensidad pico como función de la potencia de excitación: a) DCM y b) cumarina 480. En ambas gráficas se muestra el valor de la pendiente de la recta ajustada.

de la longitud de onda de excitación, debido al margen estrecho de sintonización de longitud de onda del láser de Ti:zafiro.

III.4 Comparación de los espectros de fluorescencia por absorción de un fotón y dos fotones.

El espectro de fluorescencia de un pigmento depende de su estructura de niveles, la cual está íntimamente relacionada con la forma de las curvas de potencial en la figura 8. En principio, la única diferencia entre el proceso por absorción de un fotón y absorción de dos fotones, es la forma a la que se llega al primer estado excitado, como se muestra en la figura 15. De hecho, Xu (Xu y Webb, 1996) asegura que los espectros obtenidos para ambos procesos de absorción deben de ser idénticos. La figura 30 muestra los espectros de emisión (adecuadamente escalados) obtenidos mediante absorción de luz violeta (absorción de un fotón) y por absorción de luz infrarroja (absorción de dos fotones).

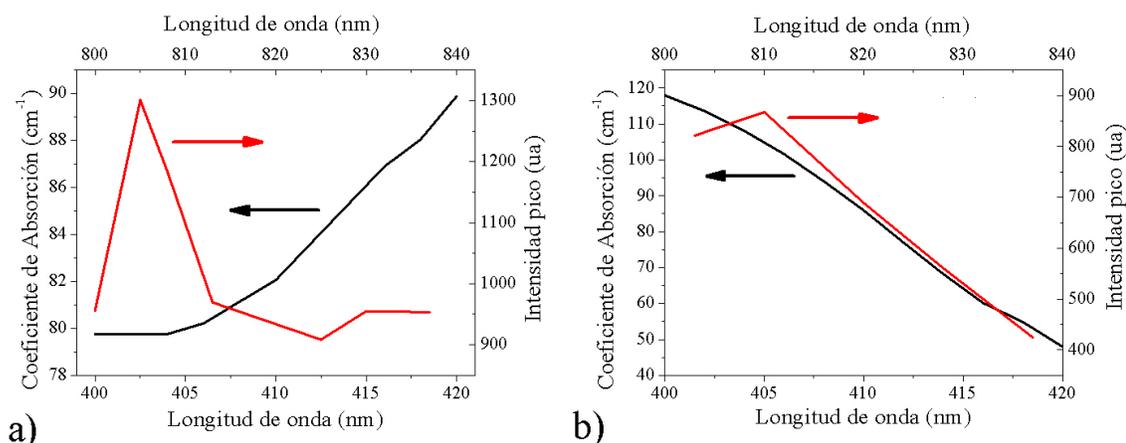


Figura 29. Intensidad máxima de fluorescencia como función de la longitud de onda de excitación, y los espectros de absorción escalados. a) DCM y b) cumarina 480.

De la figura se ve que para el DCM el máximo del espectro obtenido por absorción de dos fotones, está ligeramente corrido hacia longitudes de onda más cortas, con respecto al obtenido por absorción de un fotón. Para la cumarina, existe un corrimiento mucho más pronunciado, pero esta vez hacia longitudes de onda más largas.

En muchos trabajos se supone que los espectros obtenidos en ambas formas deben de ser idénticos (Xu y Webb, 1996), pero existe al menos un trabajo en que se menciona que existe cierta diferencia en dichos espectros (Yun-Jing *et al.*, 2001). Una posible explicación para este corrimiento, que tiene diferente signo para los dos pigmentos estudiados, es que en un caso, la energía de los dos fotones $2\hbar\omega_{exc}$ es mayor a la energía de resonancia y en el otro caso es menor, como se puede ver en la figura 31. Para comprobar esta hipótesis, tendríamos que estudiar a un pigmento con energías de $2\hbar\omega_{exc}$ de ambos lados de resonancia, o estudiar otros pigmentos bajo diferentes condiciones de resonancia.

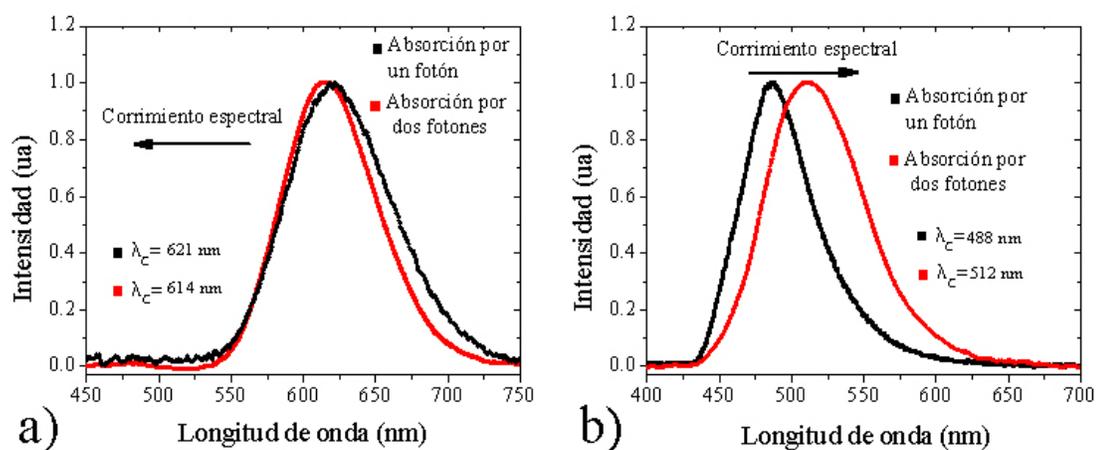


Figura 30. Comparación espectral entre procesos de absorción para uno y dos fotones entre los pigmentos: a) DCM y b) cumarina 480. El corrimiento espectral tomado con respecto a la longitud de onda central es de 7 nm para el DCM y 24 nm para la cumarina 480.

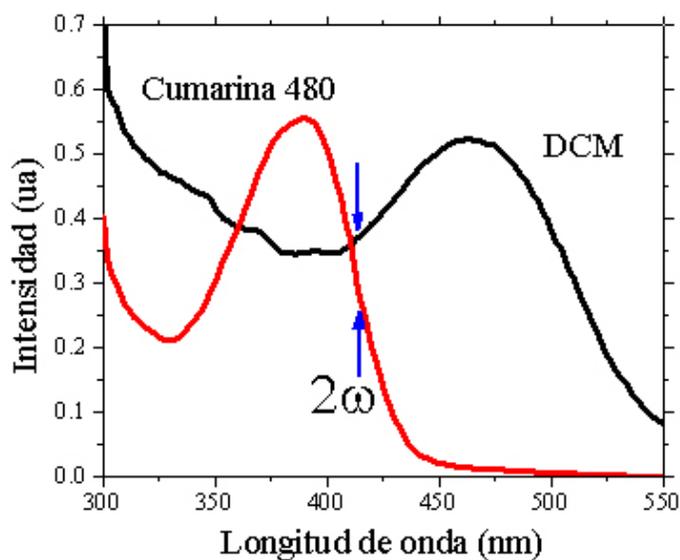


Figura 31. Espectros de absorción de los pigmentos usados, marcando la longitud de onda correspondiente a la energía de excitación por absorción de dos fotones.

Capítulo IV

MEDICIÓN DE LOS COEFICIENTES NOLINEALES.

En este capítulo se presentan los resultados de la medición de la absorción no lineal para los pigmentos utilizados en los estudios de fluorescencia. La población en el estado excitado depende de la eficiencia del proceso de absorción de dos fotones, por lo que la señal de fluorescencia dependerá fuertemente de esto. Resulta entonces importante caracterizar la respuesta no lineal de los pigmentos de manera independiente. La absorción no lineal debida al proceso de absorción de dos fotones, es estudiada usando la técnica conocida como barrido en z abierto (*open z-scan* en inglés). En la implementación de esta técnica, se usaron los pulsos de femtosegundos, mismos que fueron utilizados en los estudios de fluorescencia anteriormente descritos. También se presenta la teoría necesaria para hacer el análisis de los resultados experimentales que se obtienen. El ajuste teórico a los datos obtenidos, permite conocer el valor del coeficiente de absorción de dos fotones y la sección transversal de dos fotones para ambos pigmentos.

IV.1 Descripción de la técnica *z-scan*

La técnica conocida como *z-scan* o barrido en z (nos referiremos a ésta técnica como *z-scan* por facilidad), es un método sencillo para la medición del signo y magnitud de la respuesta no lineal, tanto de la parte refractiva como de la parte absorptiva (refracción y absorción no lineal) de un material. El *z-scan* está basada en la observación del cambio del patrón o perfil del haz gaussiano en el campo lejano, debido a la distorsión causada

por la respuesta no lineal del material durante la propagación del haz a través de la muestra bajo estudio (Sheik-Bahae *et al.*, 1990).

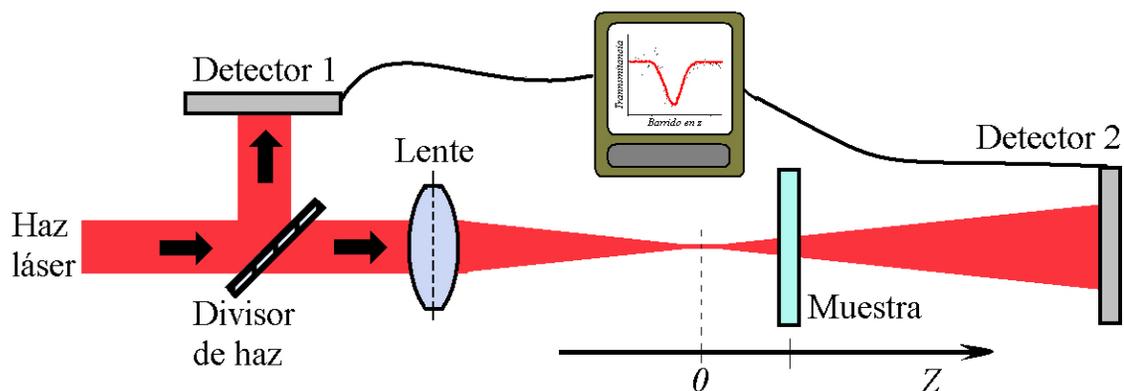


Figura 32. Esquema experimental de la técnica *z-scan* abierto.

La técnica de *z-scan* puede describirse de la siguiente manera: la posición de una muestra es barrida a lo largo del eje de propagación de un haz gaussiano fuertemente enfocado y la irradiancia de la luz transmitida es medida usando un detector en el campo lejano. Esta técnica tiene dos variantes. En el *z-scan* cerrado, se mide la transmitancia a través de una abertura colocada en el campo lejano. En este caso la distorsión del frente de onda producida por la refracción no lineal se traduce en cambios en amplitud que finalmente pueden ser medidos por un detector. En la segunda variante, se mide la transmitancia de la muestra sin ninguna abertura. En este caso la transmitancia solo puede cambiar por los efectos de la absorción no lineal, que cambia debido a que la irradiancia del haz enfocado cambia con la posición de la muestra con respecto al plano focal del haz. A esta segunda variante del *z-scan* se le conoce como *z-scan* abierto. Cabe mencionar que para ambos casos de *z-scan*, la muestra bajo estudio debe tener un espesor menor a la distancia de Rayleigh del haz enfocado (Van Stryland *et al.*,

1985). Puesto que sólo estamos interesados en caracterizar la absorción no lineal de los pigmentos, solo se implementó la técnica de *z-scan* abierto.

En la figura 32 se presenta el sistema experimental para la técnica de *z-scan* abierto. El detector 1 se utiliza para medir la irradiancia del pulso incidente, mientras que el detector 2 (un detector de área grande) es colocado en el campo lejano y que capta toda la luz que se transmite a través de la muestra. El haz enfocado tiene una irradiancia máxima en el plano focal, ya que el haz es concentrado en una región muy pequeña, la cual decrece al alejarse del plano focal. Si la muestra bajo estudio presenta absorción no lineal, la transmitancia cambiará como función de la posición con respecto al plano focal, habiendo para ello dos posibilidades. Una de ellas ocurre cuando la transmitancia tiene un incremento, en el caso de absorción saturable, en donde una porción significativa de población es promovida al estado excitado, haciendo que ésta disminuya en el estado base; por lo que disminuirá la absorción y hará que se incremente la transmitancia, como se explicó en la sección 2.5 del capítulo II .

En la segunda posibilidad, hay una disminución en la transmitancia con el incremento de la irradiancia, a esto se le conoce como absorción inducida, absorción saturable inversa o absorción multifotónica, y el mecanismo físico responsable de este efecto, puede ser la absorción de estados excitados o la absorción de dos fotones. En la absorción por dos fotones, la disminución de la transmitancia debido al aumento de la absorción, es provocada por la excitación de una molécula o átomo, por la absorción simultánea de dos fotones. De esta manera, como la irradiancia transmitida se vuelve función de la posición, la traza de la transmitancia para el *z-scan* abierto, se espera sea simétrico con respecto al foco ($z = 0$), que tendrá un mínimo de transmitancia para absorción de dos fotones y un máximo en transmitancia para saturación de absorción, como se puede ver en la figura 33.

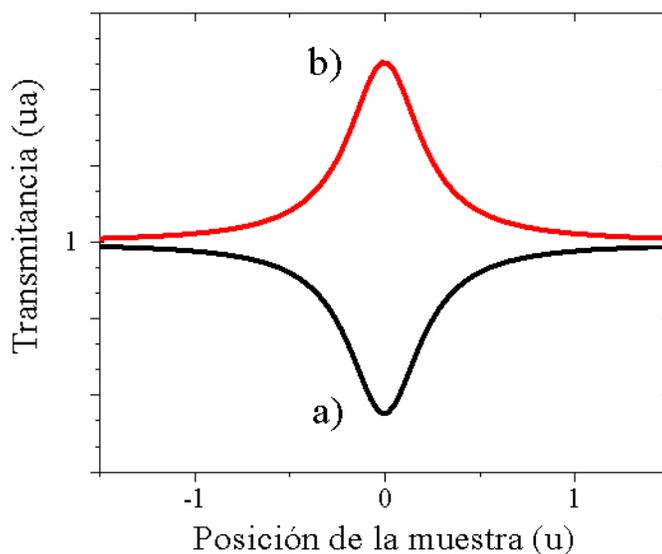


Figura 33. Comportamiento de la transmitancia debido a la presencia de absorción no lineal: a) absorción de dos fotones, b) absorción saturable.

IV.1.1 *Z-scan* abierto

Para analizar los resultados del *z-scan* abierto, hay que analizar primero la propagación del campo dentro de una muestra con coeficiente de absorción $\alpha(I)$ dada por la ecuación 17, como se puede ver en la figura 34. La ecuación de propagación como función de la posición z' dentro de la muestra es:

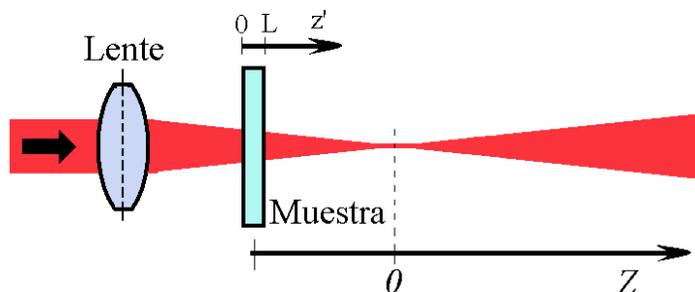


Figura 34. Propagación del haz dentro de la muestra bajo estudio.

$$\frac{dI}{dz'} = \alpha_0 I - \beta I^2, \quad (23)$$

donde $\beta = 4\pi Im\chi^{(3)}/\lambda\varepsilon_0 n_0^2 c$ es el coeficiente de absorción de dos fotones y α_0 es el coeficiente de absorción lineal. La solución de la ecuación 23 se obtiene integrando de $z' = 0$ a $z' = L$, con L el espesor del medio, para obtener:

$$I(L, r, t) = \frac{(1 - R)I(0, r, t)e^{-\alpha_0 L}}{1 + q(L, r, t)} \quad (24)$$

donde $q(L, r, t) = \beta(1 - R)I(0, r, t)L_{ef}$ y $L_{ef} \equiv (1 - e^{-\alpha_0 L})/\alpha_0$ es el espesor efectivo del medio. Puesto que tenemos un haz gaussiano enfocado en el plano $z = 0$, consideraremos a la irradiancia incidente en la muestra, la del haz gaussiano en la posición z :

$$I(0, r, t) = I_0 e^{-2r^2/w^2(z)} \quad (25)$$

donde $w(z)$ es el radio del campo eléctrico en la posición z . Para calcular la curva del z -scan abierto, sólo hay que integrar la irradiancia a la salida de la muestra $I_{sal}(L, r, t)$ sobre r . La transmitancia normalizada con la irradiancia lineal está dada por:

$$T(z, S = 1) = \frac{\int_{-\infty}^{\infty} \int_0^{\infty} I_{sal}(L, z, r, t) r dr dt}{\int_{-\infty}^{\infty} \int_0^{\infty} I(z, r, t) r dr dt}. \quad (26)$$

Integrando la ecuación anterior:

$$T(z, S = 1) = \frac{(1 - R)^2 e^{-\alpha_0 L}}{\sqrt{\pi} q_0(z, t = 0)} \int_{-\infty}^{\infty} \ln [1 + q_0(z, 0) f(t)] dt, \quad (27)$$

donde $q_0(z, t) = \beta(1 - R)I_0(z, t)L_{ef}$ y $f(t)$ es la forma temporal del pulso.

Para calcular la traza del z -scan abierto, hay que resolver en principio la ecuación 27 para cada posición en z de la muestra. En la literatura hay sin embargo diferentes aproximaciones que facilitarían el cálculo. Poornesh *et al.* (2009) muestra que la traza de transmitancia se puede aproximar mediante:

$$T(z) = 1 - \frac{1}{2\sqrt{2}} \frac{\beta I_0 (1 - e^{-\alpha_0 L})}{(1 + z^2/z_0^2)\alpha_0}, \quad (28)$$

donde βI_0 es la irradiancia del haz en el plano focal de la lente, z es la posición de la muestra con respecto al foco de la lente y z_0 es el rango de Rayleigh del haz enfocado.

IV.2 Resultados experimentales

Para la medición de la no linealidad presente en las muestras fluorescentes, es decir, el coeficiente de absorción de dos fotones, utilizaremos el sistema de *z-scan* abierto. Con los resultados obtenidos en la traza de *z-scan*, será sencillo obtener los valores del coeficiente de absorción de dos fotones y de la sección transversal de absorción de dos fotones en los pigmentos cumarina 480 y DCM.

Como la técnica de *z-scan* necesita un haz gaussiano enfocado, hay que caracterizar el haz gaussiano. Esto también es importante para hacer los ajustes teóricos, por lo que es necesario tener en cuenta las características del haz de incidencia en la muestra tales como: la distancia de Rayleigh, el radio del haz en la cintura y la distancia focal de la lente que se usa en el sistema. Por lo que es importante la medición de estos parámetros.

IV.2.1 Medición del perfil del haz.

Es importante conocer las características del haz láser para saber como es el comportamiento de enfoque en la propagación de éste, además de que resulta esencial para el cálculo de la fluencia o la irradiancia a la entrada de una muestra material. Las aproximaciones de propagación de haces gaussianos describen haces ideales (TEM_{00}) que son prácticamente imposibles de conseguir en el laboratorio. Un parámetro que se conoce como factor M^2 puede dar información sobre la calidad del haz, que determina cuán alejado se encuentra un haz real de uno gaussiano en el modo fundamental

TEM_{00} . El parámetro M^2 está acotado por $M^2 \geq 1$, e indica que para una cintura de haz dada, que tanto más diverge el haz real con respecto al modo TEM_{00} . De esta manera, conociendo el tamaño de un haz que incide en una lente convergente de distancia focal conocida, y tomando en cuenta el factor M^2 , se puede determinar con exactitud el tamaño de haz enfocado, la irradiancia en la región de enfoque, la distancia de Rayleigh y la divergencia del haz en campo lejano (Roundy, 1999).

Uno de los métodos empleados para la caracterización del haz gaussiano es la medición del radio del haz por medio de la técnica de la navaja en distintos puntos de su eje de propagación al ser enfocado por una lente convergente. La medición del tamaño del haz, se realiza mediante la obtención de la irradiancia o potencia del haz en un barrido transversal de la posición de una navaja con respecto al eje de propagación del haz, como se muestra en la figura 35. De esta manera se puede obtener el perfil de intensidad del haz para cada posición (M_1 hasta M_n en la figura 35). Para un haz gaussiano, la irradiancia está dada por:

$$I(z) \propto |E(z)|^2 = |E_0 e^{-r^2/w(z)^2}|^2, \quad (29)$$

donde $w(z)$ es el radio del campo eléctrico y r_0 su correspondiente en irradiancia, es decir.

$$I(z) = I_0 e^{-2r^2/w(z)^2} = I_0 e^{-r^2/r_0^2}. \quad (30)$$

Claramente $r_0 = w/\sqrt{2}$, debido a esto, al medir el valor de $HW1/e^2 M$ de la irradiancia, obtenemos directamente el valor de $w(z)$. La señal transmitida por la navaja en la posición x , es proporcional a:

$$\int_{-\infty}^x e^{-x^2/r_0^2} dx, \quad (31)$$

por lo que para obtener el perfil del haz, habrá que derivar la curva de irradiancia obtenida. La figura 36a muestra resultados típicos obtenidos para una posición z de la

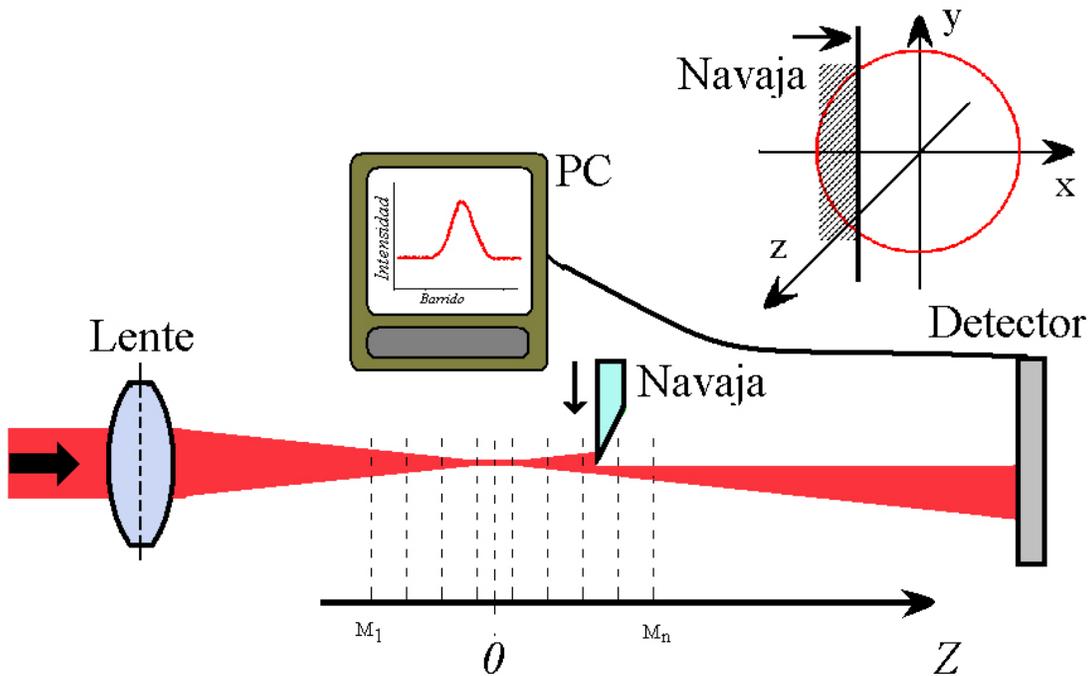


Figura 35. Esquema para la medición de la cintura del haz a lo largo del eje de propagación de un haz enfocado con la técnica de la navaja.

navaja, y en la figura 36b, se muestra el resultado de dicha derivación, donde se ve la forma gaussiana del haz y su ancho.

Los distintos valores del tamaño del haz usando una lente convergente de 19 *cm* de distancia focal, son graficados como función de la posición de la navaja en el eje de propagación. A estos datos obtenidos, se les aplica un ajuste con la expresión:

$$w(z) = w_0 \left[1 + \left(\frac{M^2 \lambda (z - z_0)}{\pi w_0^2} \right)^2 \right]^{1/2}, \quad (32)$$

que es la expresión de propagación de haces reales que tiene implícito el parámetro en cuestión (M^2). De esta manera, se obtiene el valor de M^2 con el que presenta el mejor ajuste a los datos (Silfvast, 1999). Donde w es el radio del haz a lo largo de z , w_0 es el radio del haz en la cintura, λ la longitud de onda, z la posición de la medición en el eje de propagación y z_0 la posición del foco de la dirección de propagación. La gráfica que

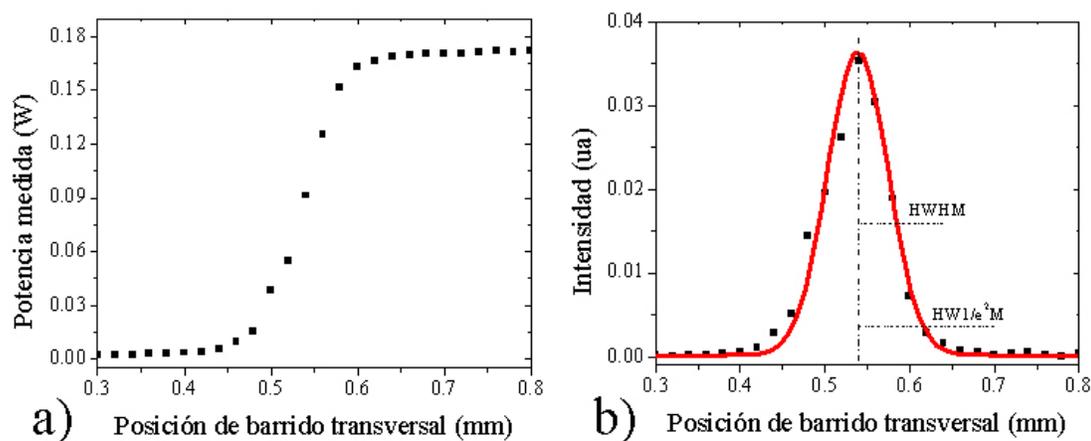


Figura 36. Medición del perfil espacial del haz. a) Variación de la potencia de entrada al detector como función de la posición de la navaja, b) perfil del haz, obtenida de la derivada de los valores obtenidos para a).

se presenta en la figura 37, muestra los distintos valores del tamaño del haz y el ajuste teórico usando la expresión de la ecuación 32 para tres distintos valores de M^2 , donde $M^2 = 1.5$ es el que mejor ajusta a los datos experimentales.

De los resultados obtenemos la distancia de Rayleigh del haz, que es aproximadamente 7.5 mm , lo que corresponde a una cintura del haz de aproximadamente $50 \mu\text{m}$, que serán útiles en el cálculo de la irradiancia para el análisis del *z-scan* abierto.

IV.2.2 Resultados del *z-scan* abierto.

El esquema utilizado para la medición del coeficiente de absorción de dos fotones β se muestra en la figura 32, donde el láser empleado es un láser de pulsos ultracortos en el régimen de femtosegundos de Ti:Zafiro. Para estas pruebas, el pulso del láser tenía una duración de 80 fs , con una potencia a la salida de la cavidad de 289 mW , lo que corresponde a una energía aproximada por pulso de 3 nJ . Para medir la transmitancia se utilizó un medidor de potencia (Newport modelo 2832C) con dos detectores calibrados

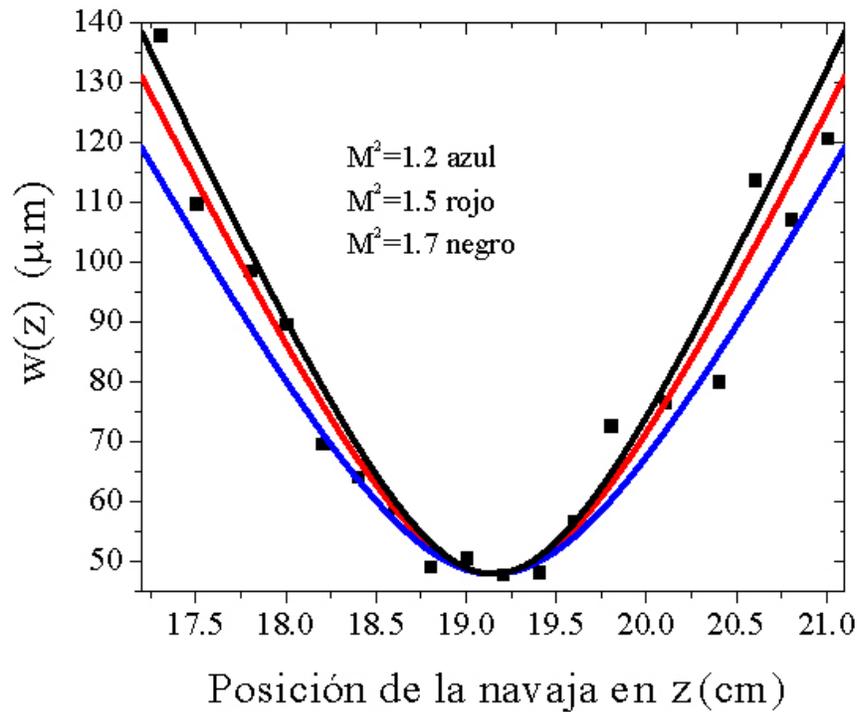


Figura 37. Datos experimentales del ancho del haz a $w(z)$ con tres ajustes teóricos, mostrando un mejor ajuste la $M^2 = 1.5$ para los datos experimentales obtenidos.

a la longitud de onda que se desea medir (en este caso a 826 nm), uno a la entrada del haz a la lente por medio de un divisor de haz (caracterizado en el laboratorio con una transmitancia de 85 por ciento aproximadamente) y el otro colocado en el campo lejano a la salida de la lente. La transmitancia de la muestra medida fue graficada como función de su posición a lo largo del eje de propagación. El movimiento de la muestra se hizo a través de una platina de traslación micrométrica modelo Newport, Esp300, con una una resolución de $1 \mu\text{m}$ por paso. Las lecturas del medidor de potencia y el movimiento de la mesa de traslación son controlados con un programa hecho en MatLab a través de una interfase GPIB.

El haz del láser de femtosegundos es enfocado con una lente de 19 cm de distancia

focal, que produce una irradiancia I_0 en la cintura del haz de 85 y 140 MW/cm^2 para la cumarina 480 y DCM respectivamente; una distancia de Rayleigh $Z_R = 7.5 \text{ mm}$ obtenida con el procedimiento previamente descrito.

Los trazos de la transmitancia obtenidos para cada pigmento fluorescente usando la técnica de *z-scan* abierto, se pueden ver en la figura 38a para la cumarina 480 y para el DCM en la figura 38b. Estos comportamientos de la traza de transmitancia, sugieren que nos encontramos ante un efecto de absorción inducida inversa o absorción de dos fotones, ya que la transmitancia decrece para una irradiancia alta y es simétrica con respecto al plano focal del haz. El ajuste teórico a los datos experimentales se hizo con la ecuación 28, en la que se utilizaron los parámetros encontrados en la sección anterior.

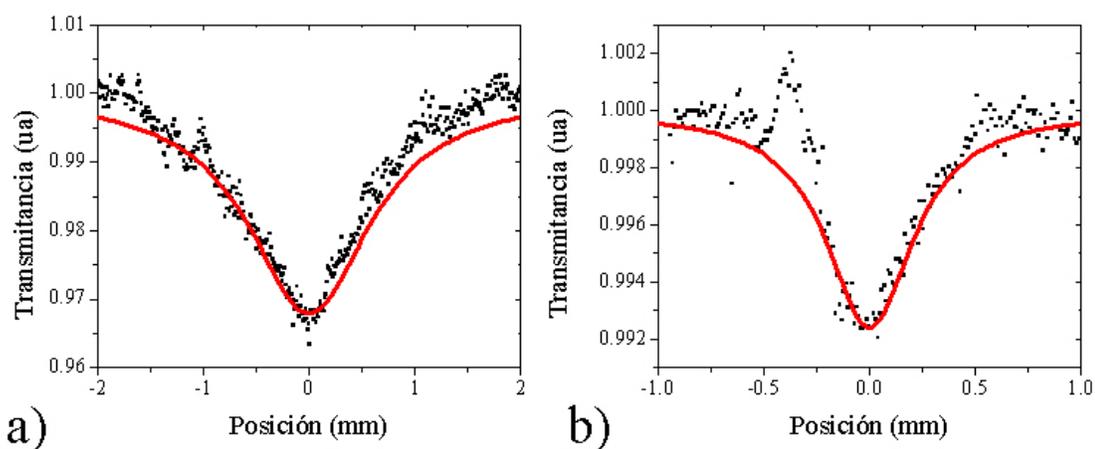


Figura 38. Resultados de la técnica de *z-scan* para los pigmentos usados en solución con metanol; a)cumarina 480, b)DCM. Los puntos en el gráfico muestran los datos experimentales, mientras que la línea constante representa el ajuste teórico.

El valor que mejor ajusta al coeficiente de absorción de dos fotones con respecto a la ecuación 28, se muestra en la tabla V para cada pigmento en cuestión, en donde el valor de β fue iterado hasta encontrar el mejor ajuste lo que se logra minimizando el error residual. Con estos valores de β se puede obtener el valor de la sección transversal

de la absorción de dos fotones σ_2 .

IV.2.3 Sección transversal de dos fotones

Como trabajamos con una solución, β es función de la concentración del material, por lo que para tener una cantidad característica del pigmento independiente de la concentración, definimos la sección transversal de absorción de dos fotones σ_2 , que también es conocida como el coeficiente molecular de absorción de dos fotones (He *et al.*, 1995).

Este parámetro es importante para las aplicaciones de los pigmentos en sistemas de microscopía por procesos de absorción multifotónica, ya que es un indicador de que tan fácil es lograr el proceso de absorción de dos fotones. Entre más alto sea su valor, se necesitará menos potencia para excitar la fluorescencia del pigmento (Albota *et al.*, 1998).

La expresión que relaciona al coeficiente de absorción de dos fotones con la sección transversal de absorción de dos fotones, es la siguiente (Dharmadhikari *et al.*, 2004; He *et al.*, 1995):

$$h\nu\beta = \sigma_2 N_0 = \sigma_2 N_A C_i \times 10^{-3}, \quad (33)$$

donde N_0 es la densidad molecular del compuesto, C_i es la concentración del mismo compuesto en solución en M/L , y finalmente N_A es el número de Avogadro. De esta manera, es fácil encontrar el valor de la sección transversal de absorción de dos fotones σ_2 dados la concentración C_i y el coeficiente de absorción de dos fotones β . Las unidades de σ_2 son $cm^4 \cdot s/foton$ y se ha definido una unidad con magnitud más manejable, que es el Goepert Mayer, donde $1GM = 1 \times 10^{-50} cm^4 \cdot s/foton$). Los resultados obtenidos para el coeficiente de absorción de dos fotones y la sección transversal de absorción de

dos fotones son:

Tabla V. Coeficiente de absorción de dos fotones y la sección transversal de absorción de dos fotones para los pigmentos: cumarina 480 y DCM.

Pigmento	β (cm/GW)	σ_2 ($cm^4 \cdot s/foton$)/ GM
cumarina 480	11 ± 1	$2.14 \times 10^{-45} / 2.14 \times 10^5$
DCM	1.6 ± 0.1	$3.01 \times 10^{-46} / 3.01 \times 10^4$

Los resultados encontrados de la sección transversal de absorción dos fotones para el pigmento cumarina 480, difieren en aproximadamente tres órdenes de magnitud en unidades de GM de los resultados reportados en la literatura. Siendo este valor de 146 GM reportado por Fisher *et al.* (1998).

Capítulo V

RESUMEN Y CONCLUSIONES.

En este capítulo se hará un recuento de los resultados que se obtuvieron en el desarrollo de este trabajo de tesis. El objetivo general era estudiar la emisión de fluorescencia en pigmentos orgánicos inducida por el proceso de absorción de dos fotones, usando pulsos de luz ultracortos de un láser de Ti:zafiro. Como se menciona en el capítulo II, los pigmentos cumarina 480 y dicianometileno, fueron elegidos de un grupo de 5 con los que se cuenta en el laboratorio. Se eligieron los pigmentos que presentan una absorción significativa a 410 nm , lo que posibilita su excitación por el proceso de absorción de dos fotones con luz de longitud de onda de 820 nm . El láser utilizado produce pulsos de femtosegundos a esta longitud de onda. El carácter ultracorto de los pulsos permite producir potencias pico lo suficientemente altas para lograr el proceso de absorción de dos fotones eficientemente.

Posteriormente se hizo el estudio de la fluorescencia inducida por el proceso de absorción de un fotón y por el proceso de absorción de dos fotones. Se estudió la dependencia de la emisión de fluorescencia por absorción de dos fotones con algunos parámetros de excitación, tales como la potencia y la longitud de onda del láser de Ti:zafiro. Presentamos ahora un resumen y lo que se concluye de los experimentos realizados:

- Se obtuvieron los espectros de fluorescencia mediante la excitación de un fotón, con la generación del segundo armónico del láser de Ti:zafiro, cuya longitud de onda fue de $\lambda_{\omega} = 410 \text{ nm}$. Se estudiaron los dos pigmentos empleados a dos

concentraciones distintas mostradas en la tabla II. La comparación de los espectros con diferentes parámetros de normalización, muestran que no hay un efecto notable en el rango de concentraciones estudiado, es decir, que el ancho espectral ni la longitud de onda central cambian con las concentraciones estudiadas.

- Para los resultados de la fluorescencia obtenida por la absorción de dos fotones, el haz de femtosegundos fue enfocado fuertemente en las muestras bajo estudio. La obtención de los espectros de fluorescencia por absorción de dos fotones, fue más eficiente para las concentraciones más altas, en comparación con las concentraciones más bajas. La comparación de los resultados obtenidos a diferentes factores de normalización para el DCM, también sugieren que los espectros de fluorescencia no presentan cambios espectrales con la concentración.
- Se obtuvo la eficiencia de fluorescencia por absorción de dos fotones de cada pigmento como función de la potencia de excitación. Los resultados para ambos pigmentos muestran una dependencia no lineal de la señal en el pico de emisión de fluorescencia como función de la potencia de excitación. Esta dependencia debería ser cuadrática, pero un ajuste de los datos experimentales muestran que si escribimos a $\text{Log}(I_{fluor}) = cte\text{Log}(P_{exc})$, la constante tiene un valor ligeramente menor a 2. La razón de esto es probablemente a que se detecte luz esparcida en la muestra, ya que la luz de excitación sigue siendo mucho más grande que la intensidad de fluorescencia obtenida.
- La variación de la longitud de onda de excitación produjo un cambio en la eficiencia de emisión de los pigmentos. En el caso del DCM se encontró un máximo pronunciado de emisión para excitación a 805 nm, mientras que para la cumarina 480 se nota una variación suave que parece correlacionarse con el espectro de

absorción de pigmento.

- En la comparación de los espectros de emisión obtenidos por las distintas formas de excitación, notamos que existe un corrimiento del máximo de emisión de la fluorescencia de absorción de dos fotones con respecto al espectro obtenido por absorción de un fotón. Observamos que para el caso del DCM, la excitación por dos fotones se ubica por debajo de de resonancia, exactamente lo opuesto para la cumarina 480. Una posible explicación para este corrimiento, que tiene diferente signo para los dos pigmentos estudiados, es que en un caso, la energía de excitación de los dos fotones $2\hbar\omega_{exc}$ es mayor a la energía de resonancia y en el otro caso es menor. Para comprobar esta hipótesis, tendríamos que estudiar un pigmento con energía de $2\hbar\omega_{exc}$ de ambos lados de resonancia, o estudiar otros pigmentos bajo diferentes condiciones de resonancia.

Además de los experimentos sobre el comportamiento de la emisión como función de diferentes parámetros, se caracterizó la absorción no lineal producida por el fenómeno de absorción de dos fotones utilizando la técnica de *z-scan* abierto. Esto con el fin de determinar el valor de los coeficientes no lineales asociados

- Trabajando con la medición de la no linealidad, utilizamos la técnica de *z-scan* abierto. Para esto, enfocamos el haz del láser de Ti:zafiro en las muestras bajo estudio contenidas en cubetas de 1 *mm* de espesor. Realizando un barrido de la muestra a lo largo del eje de propagación del haz, obtuvimos una traza de la transmitancia que indica que nos encontramos ante un efecto de absorción inducida inversa o absorción de dos fotones, ya que la transmitancia decrece para una irradiancia alta y es simétrica con respecto al plano focal del haz.
- Con el análisis teórico de la traza de *z-scan* abierto, obtuvimos los valores de los

coeficientes de absorción por dos fotones. Estos son: 11.1×10^{-9} y 1.61×10^{-9} cm/W para cumarina 480 y DCM respectivamente. Con ello se obtuvieron los valores de la sección transversal de absorción de dos fotones, siendo estos: 2.14×10^{-45} para la cumarina 480 y 3.01×10^{-46} para el DCM. Estos resultados indican, que la cumarina ofrece una mayor probabilidad de absorción por dos fotones que el DCM.

- Antes de los cálculos pertinentes para el coeficiente de absorción no lineal, fue necesario caracterizar el haz del láser y determinar el factor M^2 , cuyo resultado fue de 1.5 para el haz del láser de femtosegundos de Ti:zafiro. Con estos cálculos encontramos los valores de la distancia de Rayleigh y del tamaño del haz en la cintura, variables que fueron necesarias para el cálculo de β .

Los resultados encontrados en el desarrollo de esta tesis, muestran que la cumarina 480 tiene mejor respuesta a la absorción por dos fotones que el DCM. Esto es, de los resultados de β , σ_2 , así como la eficiencia de absorción obtenidos, dado que se manejaron las mismas concentraciones para estos dos experimentos.

Referencias

- Albota, M. A., Xu, C., y Webb, W. W. (1998). Two-photon fluorescence excitation cross sections of biomolecular probes from 690 to 960 nm. *Applied Optics*, **37**(31): 7352–7356.
- Barad, Y., Eisenberg, H., Horowitz, M., y Silberberg (1997). Nonlinear scanning laser microscopy by third harmonic generation. *Applied Physics Letters*, **70**(1): 922–924.
- Boyd, R. W. (1992). *Nonlinear Optics*. Academic Press, San Diego. 439 pp.
- Butcher, P. N. y Cotter, D. (1990). *The Elements of Nonlinear Optics*, Vol. 1. Cambridge University Press, Sydney, primera edición. 344 pp.
- Denk, W. y Svoboda, K. (1997). Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron*, **18**: 351–357.
- Dharmadhikari, A. K., Sandhu, A. S., Dharmadhikari, J. A., Mishra, A., y Kumar, G. R. (2004). Measurement of two-photon absorption cross-section in organic molecular salt with linear and circular polarized radiation. *Applied Physics B*, **79**(1): 235–238.
- Diaspro, W. y Sheppard, C. (2002). *Confocal and two-photon microscopy: foundations, applications, and advances*. Número 8. Willey-Liss, Inc, New York.
- Diels, J. C. y Rudolph, W. (1996). *Ultrashort Laser Pulse Phenomena*. Academic Press, USA. 581 pp.
- Duncan, M. D., Reintjes, J., y Manuccia, T. J. (1982). Scanning coherent anti-stokes raman microscope. *Optics Letters*, **7**(1): 350–352.
- Fisher, W. G., Wachter, E. A., Lytle, F. E., Armas, M., y Seaton, C. (1998). Source-corrected two-photon excited fluorescence measurements between 700 and 880 nm. *Applied Spectroscopy*, **52**(4): 536–545.
- García Arthur, M. A., Rangel Rojo, R., Jamasbi, N., y Mohebi, M. (2003). Diseño y construcción de un autocorrelador de pulsos de femtosegundos usando absorción de dos fotones en un diodo luminiscente. *Revista Mexicana de Física*, **49**(3): 258–263.
- Göppert Mayer, M. (1931). Über elemntarakte mit zwei quantensprüngen. *Annalen der Physik*, **9**: 273–295.
- Gryczynski, I., Szmecinski, H., y Lakowicz (1995). On the possibility of calcium imaging using Indo-1 with three-photon excitation. *Photochemistry and Photobiology*, **62**(1): 804–808.

- He, G. S., Xu, G. C., Prasad, P. N., Reinhardt, B. A., Bhatt, J. C., y Dillard, A. G. (1995). Two-photon absorption and optical-limiting properties of novel organic compounds. *Optics Letters*, **20**(5): 435–437.
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, USA. 5,19, 63-88.
- Masters, B. R. (2005). *Confocal Microscopy and Multifoton Excitation Microscopy, The genesis of Live Cell Imaging*. SPIE, USA. 13 pp.
- Morrison, R. T. y Boyd, R. N. (2005). *Organic Chemistry*. Allyn and Bacon. Inc., USA. 1-36.
- Poornesh, P., Umesh, G., Hegde, P. K., Manjunatha, M. G., Manjunatha, K. B., y Adhikari, A. V. (2009). Studies on third-order nonlinear optical properties and reverse saturable absorption in polythiophene (methylmethacrylate) composites. *Applied Physics B*, **97**(1): 117–124.
- Roberts, J. D. y Caseiro, M. C. (1963). *Basic Principles of Organic Chemistry*. W. A. Benjamin, Inc., California. 3-17.
- Roundy, C. (1999). Propagation factor quantifies laser beam performance. *Journal Laser focused world*, **35**(12): 119–122.
- Schäfer, F. P., Snavely, B. B., Schank, C. V., Ippen, E. P., Drexhage, K. H., y HÄansch, T. W. (1973). *Topics in Applied Physics, Dye Lasers*. Springer-Verlag, New York, primera edición. 6-12 pp.
- Sheik-Bahae, M., Said, T. T., Wei, T., Hagan, D. J., y Van Stryland, E. W. (1990). Sensitive measurement of optical nonlinearities using a simple beam. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, **26**(4): 760–769.
- Silfvast, W. (1999). *Laser Fundamentals*. Cambridge University Press, Cambridge UK. 630.
- Valeur, B. (2002). *Molecular Fluorescence*, Vol. 1. Willey-VCH, New York, primera edición. 31ff pp.
- Van Stryland, E. W., Vanherzeele, H., woodall, M. A., Soileau, M. J., y Smirl, A. L. (1985). Two photon absorption, nonlinear refraction, and optical limiting in semiconductors. *Optical Engineering*, **24**(4): 613–623.
- Xu, C. y Webb, W. W. (1996). Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. *Journal of the Optical Society of America B*, **13**(3): 481–491.

Yun-Jing, L., Chuan-Lang, Z., Li-Zeng, Z., Duo-Yuan, W., Zhen-Zhong, L., y Yu-Xin, N. (2001). Two-photon absorption and fluorescence of a novel compound trans-1,3,5-tri-(4-n,n-dimethylaminobenzylstyryl)-acetylacetone. *Chinese Physics Letters*, **18**(2): 205–207.

Zipfel, W. R., Williams, R. M., y Webb, W. W. (2003). Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature Biotechnology*, **21**(11): 1369–1376.