

Tesis Doctoral

Movimientos locales en películas delgadas de polímeros amorfos

Araoz, Beatriz

2013-03-04

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Araoz, Beatriz. (2013-03-04). Movimientos locales en películas delgadas de polímeros amorfos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Araoz, Beatriz. "Movimientos locales en películas delgadas de polímeros amorfos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-03-04.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física

**Movimientos locales en películas delgadas de polímeros
amorfos**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área: Química Inorgánica,
Química Analítica y Química Física

Beatriz Araoz

Director de tesis: **Dr. Pedro F. Aramendía**

Consejero de estudios: **Dra. Lelia Dichelio**

Buenos Aires, 2012

RESUMEN

Movimientos locales en películas delgadas de polímeros amorfos

Resumen:

El objetivo de este trabajo de tesis es estudiar la dinámica de los entornos sonda-caja de polímero en películas nanométricas de polímeros amorfos. Para ello se utilizaron sondas fluorescentes, altamente sensibles a las propiedades fisicoquímicas de su entorno (Rojo Nilo) embebidas en polimetacrilatos de alquilo. La emisión de la sonda se estudió a escala macroscópica (ensamble de moléculas de colorante) y a nivel de moléculas individuales. En ambos casos se analizaron las propiedades espectrales y rotacionales de la sonda en la caja de polímero. La espectroscopía de emisión de fluorescencia de moléculas individuales de Rojo Nilo mostró fluctuaciones espectrales cuya frecuencia y amplitud son independientes del espesor y tipo de polímero, mientras que las reorientaciones de la sonda dependen del espesor de la película, que está asociado a cambios en el valor de la temperatura de transición vítrea por efecto del confinamiento. El fotoblanqueo se encuentra siempre presente en experimentos de este tipo, y con esta motivación, se propuso una solución al estudio de la dinámica rotacional del ensamble en presencia de fotoblanqueo bajo excitación linealmente polarizada. Se obtuvo así el coeficiente de difusión rotacional de la sonda en los polímeros, que explica la tendencia observada para la movilidad de moléculas individuales. Las medidas se realizaron con dos configuraciones de microscopio de fluorescencia: confocal con detección espectrográfica y de campo amplio con detección polarizada. Este último, se montó íntegramente en uno de los laboratorios de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Palabras claves: polímeros, nanoconfinamiento, procesos de relajación, fluorescencia, espectroscopía de fluorescencia de moléculas únicas, anisotropía de fluorescencia, heterogeneidad espacial, heterogeneidad temporal.

ABSTRACT

Local movements in amorphous polymer thin films

Abstract:

In this Thesis, we study the dynamics of probe-polymer cage environments in thin polymer films. For this purpose, we employed fluorescent probes with a high sensitivity to the physicochemical properties of its environment, as Nile Red. The selected polymer matrixes were the polyalkylmethacrylates. The distance and interactions between the probe and its near environment (polymer cage) affect some emission features of the dye. Examples of these features are: the emission spectrum and probe reorientation. Probe emission was studied at macroscopic (ensemble of dye molecules) and single molecule level. Spectral and reorientational properties of the emission were studied. At the single molecule level, fluorescence spectroscopy of individual Nile Red molecules shows spectral fluctuations whose frequency and amplitude are independent of the thickness and the polymer type. The rotational dynamics of single molecule in the ground state, followed by polarized emission measurements, showed a dependence of amplitude and frequency of reorientation events on polymer film thickness. A new method to study probe rotational diffusion, which combines anisotropy and photobleaching with linearly polarized excitation is presented. It is based on 1-photon photobleaching and isotropic rotation of the dye. The diffusion coefficient of Nile Red in the polymer matrix of different thickness was obtained and it was correlated to single molecule reorientations results. Two fluorescence microscopy configurations were used: confocal microscopy with spectrographic detection, and wide-field microscopy with polarized emission detection. The last setup was built up in the Faculty of Exact and Natural Sciences.

Keywords: polymers, nanoconfinement, relaxation processes, fluorescence, single molecule fluorescence spectroscopy, fluorescence anisotropy, spatial heterogeneity, temporal heterogeneity.

A mi familia

ÍNDICE

Resumen	I
Abstract	III
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 POLÍMEROS AMORFOS: TEMPERATURA DE TRANSICIÓN VÍTREA	1
1.1.1 Procesos de relajación	5
1.1.2 Polialquilmecrilatos	7
1.1.3 Factores que afectan los procesos de relajación	10
1.1.3.1 Estructura de la cadena lateral, masa molar y polidispersidad	10
1.1.3.2 Frecuencia de muestreo	11
1.1.3.3 Nanoconfinamiento e interfases	11
1.2 SONDAS FLUORESCENTES PARA EL ESTUDIO DE PROCESOS DE RELAJACIÓN EN POLÍMEROS	15
1.2.1 La caja de polímero	15
1.2.2 Sondas fluorescentes	16
1.2.3 Medidas que dependen de las interacciones sonda–caja de polímero	17
1.2.3.1 Energía espectral y solvatocromismo	18
1.2.3.2 Rendimiento cuántico y tiempo de vida de fluorescencia	19
1.2.3.3 Desplazamiento espectral por excitación en el flanco rojo del espectro de absorción	20
1.2.3.4 Anisotropía de fluorescencia	22
1.2.4 Espectroscopía de fluorescencia de moléculas únicas	27
1.3 REFERENCIAS	32
Capítulo 2. Materiales y métodos experimentales	39
2.1 INTRODUCCIÓN	39
2.2 PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS POLIMÉRICAS	40
2.2.1 Técnica de spin-coating	40

2.2.2 Preparación de películas delgadas	41
2.2.3 Preparación de películas de espesor micrométrico	42
2.2.4 Caracterización de películas delgadas	43
2.2.4.1 Determinación del espesor por Perfilometría	43
2.2.4.2 Microscopía electrónica de barrido	45
2.2.4.3 Microscopía de fuerza atómica	46
2.2.4.4 Espectroscopía Infrarroja	47
2.3 SONDAS FLUORESCENTES	49
2.3.1 Concentración de sonda	53
2.4 TECNICAS APLICADAS A MEDIDAS DE ENSAMBLE EN ESPECTROFLUORÍMETRO	54
2.4.1 Excitación en el flanco rojo del espectro de excitación/absorción	54
2.4.2 Anisotropía de fluorescencia	55
2.4.3 Control de la temperatura en experimentos de REE y de anisotropía	57
2.5 MICROSCOPIAS ÓPTICAS	58
2.5.1 Microscopía confocal	59
2.5.1.1 Adquisición de espectros de moléculas únicas	61
2.5.2 Microscopía de campo amplio	63
2.6 REFERENCIAS	66
Capítulo 3. Dinámica espectral de ensamble y moléculas únicas	69
3.1 INTRODUCCIÓN	69
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	71
3.2.1 Espectros de ensamble	71
3.2.1.1 Preparación de muestras	71
3.2.1.2 Adquisición de espectros	71
3.2.1.3 Corrección y ajuste de espectros	72
3.2.1.4 Medidas preliminares	75
3.2.1.4.1 Concentración de la sonda	75
3.2.1.4.2 Polaridad del sustrato	75
3.2.1.4.3 Otras sondas	76
3.2.2 Espectros de moléculas únicas	79

3.2.2.1 Preparación de muestras	79
3.2.2.2 Microscopio confocal	79
3.2.2.3 Análisis de datos	80
3.3 RESULTADOS	80
3.3.1 Espectros de emisión de ensamble de moléculas	80
3.3.1.1 Discusión	86
3.3.2 Espectros de emisión de moléculas únicas	88
3.3.2.1 Comportamiento de ensamble vs. comportamiento acumulado	93
3.3.3 Comportamiento espectral temporal de RN en matrices poliméricas de PAMA	94
3.3.4 Análisis por función de distribución acumulada	96
3.3.5 Simulaciones de un sistema de dos niveles de energía	98
3.3.6 Análisis de la FDAC para moléculas únicas con comportamiento espectral Tipo A y Tipo B-C	102
3.3.7 Análisis de tiempos de residencia	108
3.3.8 Enfoque según procesos de coalescencia	116
3.4 CONCLUSIONES	120
3.5 REFERENCIAS	123
Capítulo 4. Dinámica rotacional de ensamble y moléculas únicas	125
4.1 INTRODUCCIÓN	125
4.2 DINÁMICA DE ROTACIÓN EN EL ESTADO EXCITADO	126
4.3 DINÁMICA DE ROTACIÓN EN EL ESTADO FUNDAMENTAL	127
4.3.1 Ensamble de moléculas	127
4.3.1.1 Caso estático sin fotoblanqueo	127
4.3.1.2 Caso estático con fotoblanqueo	131
4.3.1.3 Caso difusional con fotoblanqueo	134
4.3.2 Moléculas únicas	136
4.4 MATERIALES Y METODOS	138
4.4.1 Condiciones experimentales: dinámica de rotación en el estado excitado	138
4.4.1.1 Adquisición de espectros y ajuste.	138
4.4.1.2 Medidas preliminares	141

4.4.2 Condiciones experimentales: dinámica de rotación en el estado fundamental	142
4.4.2.1 Preparación de muestras	142
4.4.2.2 Instrumentación	143
4.4.2.3 Adquisición de imágenes de moléculas únicas	144
4.4.2.4 Adquisición de imágenes de ensamble	145
4.4.2.5 Análisis de resultados	146
4.5 RESULTADOS	147
4.5.1 Dinámica de rotación en el estado excitado	147
4.5.2 Dinámica de rotación en el estado fundamental	149
4.5.2.1 Fluctuaciones de la orientación de moléculas individuales	149
4.5.2.1.1 Análisis de trazas temporales de intensidad polarizada y anisotropía de moléculas únicas	149
4.5.2.1.2 Análisis por la función de distribución acumulada de las fluctuaciones de orientación	157
4.5.2.2 Medidas de Ensamble de Moléculas	162
4.5.2.2.1 Resolución de la ecuación diferencial para el problema difusional con fotoblanqueo	162
4.5.2.2.2 Momentos de transición de absorción y emisión no paralelos	167
4.5.2.2.3 Resultados de ensamble en películas de PAMA de distinto espesor	168
4.5.2.2.4 Desplazamiento cuadrático medio angular aplicado al cálculo del coeficiente de difusión rotacional	178
4.6 CONCLUSIONES	180
4.7 REFERENCIAS	183
Capítulo 5. Conclusiones generales	189
5.1 CONCLUSIONES	189
Apéndice 1.A.1	i
Apéndice 1.A.2	v
Apéndice 1.A.3	ix

Glosario de términos y símbolos

xvii

Agradecimientos

“We must not forget that when radium was discovered no one knew that it would prove useful in hospitals. The work was one of pure science. And this is a proof that scientific work must not be considered from the point of view of the direct usefulness of it. It must be done for itself, for the beauty of science, and then there is always the chance that a scientific discovery may become like the radium a benefit for humanity.”

-Marie Curie, Lecture at Vassar College, May 14, 1921

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 POLÍMEROS AMORFOS: TEMPERATURA DE TRANSICIÓN VÍTREA

Los polímeros son moléculas largas formadas por bloques de átomos unidos covalentemente llamados monómeros. La mayoría de los polímeros sintéticos son parcial o totalmente amorfos y desde un punto de vista microscópico, desordenados.

Los polímeros amorfos pueden encontrarse principalmente en dos estados: *vítreo* y *gomoso*. El *estado vítreo* se presenta no solo en polímeros sino también en líquidos sobreenfriados, silicio amorfo, dióxido de silicio (vidrio), algunas aleaciones de metales e incluso en el agua. En los polímeros se llega a este estado cuando el sistema se enfría desde el estado líquido o *gomoso*. En el proceso de enfriamiento las cadenas pierden energía cinética y van quedando fijas espacialmente, con lo cual se incrementa la viscosidad. A partir de cierta temperatura, las moléculas se mueven tan lentamente que no pueden acomodarse lo suficientemente rápido mientras continúa el enfriamiento. Este hecho se pone de manifiesto en el estudio del volumen específico (V_{esp}) o de la entalpía con la temperatura. En la *Figura 1.1* se representa V_{esp} en función de la temperatura para un polímero [1].

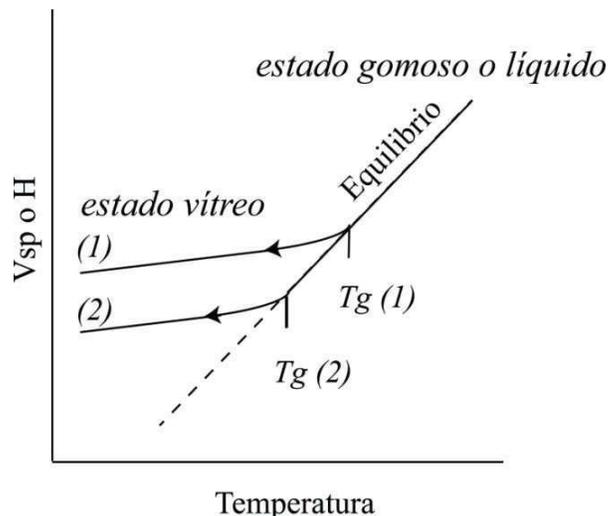


Figura 1.1: Representación esquemática de la dependencia del volumen específico (V_{esp}) con la temperatura. Los puntos (1) y (2) corresponden a curvas obtenidas con velocidades de enfriamiento diferentes. Esta figura es una adaptación de la referencia [1].

En la figura se grafican dos rectas, una para el *estado gomoso* y otra para el *estado vítreo*, cuya intersección es la *Temperatura de Transición Vítreo*, T_g . Al alcanzar T_g por enfriamiento, el sistema se vuelve estructuralmente rígido. Como los reajustes son necesarios para que el sistema alcance el equilibrio, si ellos no son posibles, el V_{esp} se desvía del valor de equilibrio. En este proceso, T_g comprende un pequeño intervalo de temperaturas más que un valor fijo. En la figura se muestran dos curvas con velocidades de enfriamiento diferentes que dan origen a dos valores de T_g . Este hecho pone de manifiesto que las propiedades del *estado vítreo* dependen de cómo se formó [2]. Así, la transición vítrea puede ser entendida como un fenómeno cinético ya que no se observa una discontinuidad en los parámetros físicos ni transcurre a una temperatura constante.

T_g es una propiedad fundamental del estado amorfo y sirve como parámetro para caracterizarlo. Los métodos clásicos para determinar T_g son: 1) el análisis térmico mecánico, donde la muestra es deformada bajo una carga estática a medida que se modifica la temperatura. 2) El análisis dinámico mecánico, que mide la respuesta del material a diferentes frecuencias de deformación, y 3) calorimetría diferencial de barrido (CDB) que mide el cambio de entalpía en función del tiempo para un dado programa de temperatura, dando una medida diferencial de T_g [3].

A escala macroscópica, al pasar por la transición vítrea disminuyendo la temperatura, se observa un aumento muy marcado de la viscosidad. Por encima de T_g , el sistema se encuentra en un *estado gomoso* en el que se producen fluctuaciones rápidas y el comportamiento de los entornos es similar al de los fluidos. De esta forma, el comportamiento dinámico es homogéneo y tiende a mostrar un solo tiempo característico. Por debajo de T_g , el sistema se encuentra en un *estado vítreo* donde las fluctuaciones son de

muy baja velocidad y el lapso en que se igualan los diferentes entornos puede ser de varios cientos de segundos, observándose una distribución de velocidades o frecuencias de los procesos dinámicos. Esta distribución es debida a la heterogeneidad dinámica [4] que tiene origen en las fluctuaciones espacio-temporales de la dinámica y que se manifiesta como un régimen cinético no-exponencial [5], [6]. La relajación puede ser localmente exponencial, pero los tiempos de relajación pueden variar espacialmente. Entonces, al promediar sobre la distribución espacial de tiempos de relajación, el régimen cinético es no-exponencial. Por otro lado, incluso la dinámica local puede cambiar en el tiempo y mostrar, también, una relajación no-exponencial [7].

Para entender el proceso de transición vítrea en polímeros amorfos es interesante contar con una teoría que considere todas las características de este fenómeno. Actualmente las teorías explican exitosamente los resultados experimentales en ciertas condiciones pero fallan en otras. Desde un punto de vista **termodinámico**, T_g no es una propiedad termodinámicamente estable y no está completamente definida por cambios de variables de estado como se esperaría en una transición de primer orden, por ejemplo, como la que tiene lugar en el punto de fusión de una sustancia. Tampoco es una transición de segundo orden ya que ambas fases entre las cuales se produce la transición no se encuentran en equilibrio. Por el contrario, estos estados son metaestables con varios mínimos locales en la superficie de energía de Gibbs. Estos mínimos pueden ser explorados por el sistema en su totalidad a tiempos muy prolongados a través de fluctuaciones. Así, la transición vítrea es considerada un proceso dinámico controlado cinéticamente más que una transición de fases. Por lo tanto, que un polímero se encuentre en el *estado gomoso* o *vítreo* depende de la escala temporal de los procesos que se miden

experimentalmente.

Por otro lado, existe una **relación empírica** que relaciona la dependencia con la temperatura de varios procesos de relajación, mecánicos y eléctricos, por encima de T_g , llamada ecuación de Williams-Landel-Ferry [8]:

$$\log(a_T) = -\frac{C_1^0(T - T_0)}{C_2^0 + (T - T_0)} \quad \text{Ec. 1.1}$$

donde a_T es la relación de una propiedad entre su valor a una temperatura T y a una T_0 de referencia. Esta ecuación es aplicable a propiedades como la viscosidad o los tiempos de relajación. Cuando se usa $T_0=T_g$, C_1^0 y C_2^0 valen 17,4 y 51,6 respectivamente, para prácticamente todos los polímeros amorfos.

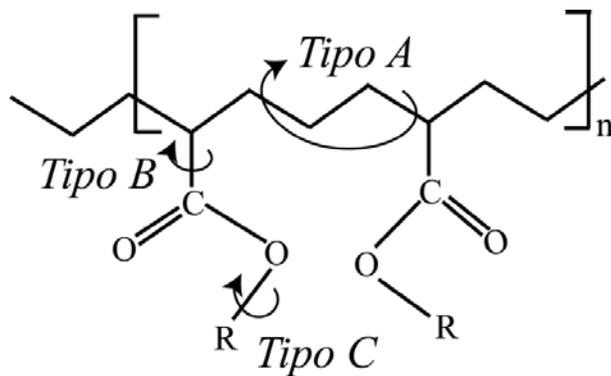
A pesar del esfuerzo colectivo de grupos de investigación dedicados a entender la naturaleza de la transición vítrea, aún no se cuenta con una teoría que considere todas las características del fenómeno.

1.1.1 Procesos de relajación

Aunque los polímeros en *estado vítreo* aparentan la rigidez del estado sólido, microscópicamente existen movimientos que dan origen a procesos de relajación. Estos pueden tener un efecto profundo en muchas de las propiedades de los polímeros. Por ejemplo, el proceso de envejecimiento produce cambios dependientes del tiempo en las propiedades físicas y

mecánicas del material con consecuencias importantes para su posterior diseño y aplicación.

Cuando un sistema polimérico se enfría, la pérdida de energía térmica y la consecuente agregación molecular, limita la dinámica de las cadenas y hace que los movimientos se vuelvan cooperativos. Como resultado, el movimiento de una cadena se ve afectado por la dinámica de las vecinas alcanzándose la transición vítrea. En este momento se produce una relajación estructural que involucra el movimiento de segmentos relativamente largos de la cadena principal. Este proceso se conoce como *relajación α* y puede ser detectada por medidas de espectroscopía de relajación dieléctrica [9], [10].



Esquema 1.1: Tipos de movimiento molecular de relajación secundaria en polímeros amorfos en estado vítreo.

A temperaturas por debajo de la transición vítrea existen relajaciones secundarias que involucran movimientos moleculares localizados. Estos han sido clasificados en tres tipos y los grupos involucrados se ejemplifican en el *Esquema 1.1* [1]. Los movimientos de Tipo A debidos a desplazamientos de

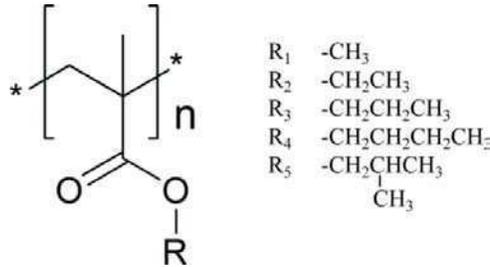
pequeños segmentos de la cadena principal, como rotaciones alrededor del eje del esqueleto principal, han sido observados en polivinilo, policarbonato y poliéster. Los de Tipo B involucran el movimiento de rotación (completo o incompleto) de la cadena lateral respecto de la cadena principal. En este movimiento, el grupo pasa de un mínimo local a otro en la superficie de energía potencial y puede requerir un pequeño movimiento cooperativo de la cadena principal. Finalmente, los de Tipo C, involucran el movimiento muy localizado de una pequeña unidad dentro de la cadena lateral. Los polialquilmacrilatos son excelentes ejemplos de polímeros en los que tienen lugar movimientos Tipo B y Tipo C, que dan origen a procesos de *relajación β* y *relajación γ* , respectivamente.

1.1.2 Polialquilmacrilatos

Los *Polimacrilatos de Alquilo* o *Polialquilmacrilatos* (PAMA) pertenecen a un grupo particular de polímeros de gran interés en ciencia e industria. Son polímeros sintetizados a partir de monómeros llamados *macrilatos de alquilo*. Tienen un esqueleto carbonado, o cadena principal, no polar y cadenas laterales flexibles no polares unidas por medio de grupos polares (éster). Esta familia de polímeros forma una serie donde la cadena lateral puede variar en la composición química. En el *Esquema 1.2* se representa por medio de R a la parte no polar de la cadena lateral de los PAMA que se estudiarán en esta tesis.

La elección de los PAMA para el estudio de los movimientos de cadenas poliméricas se basa en que la extensión de la cadena alquílica modifica las características dinámicas, como T_g , sin necesidad de perturbar

las propiedades químicas del sistema. Para esto se utilizarán técnicas de espectroscopía de fluorescencia aprovechando la buena calidad óptica de películas poliméricas preparadas a partir de solventes comunes.



Esquema 1.2: Estructura de los Polimetacrilatos de alquilo, R₁: metilo (polimetacrilato de metilo, PMMA), R₂: etilo (polimetacrilato de etilo, PEMA), R₃: propilo (polimetacrilato de propilo, PPMA) y R₄: butilo (polimetacrilato de butilo, PBMA).

Las características principales de los PAMA estudiados se presentan en la *Tabla 1.1*, donde se indican dos medidas promedio de la masa molar: 1) la masa molar promedio en peso, M_w ; y 2) la masa molar promedio en número, M_n . Estas medidas surgen de las diferencias en la cinética de polimerización, donde en una muestra corriente los polímeros son mezclas de especies cada una con una masa molar determinada, M_i , y que dan origen a una distribución de masas. Las medidas promedio de la masa molar se calculan según las *Ec. 1.2* y *Ec. 1.3* respectivamente:

$$M_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i} \quad \text{Ec. 1.2}$$

$$M_w = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i} \quad \text{Ec. 1.3}$$

donde N_i es el número de moléculas con masa molar M_i . La relación entre los valores promedio se considera en el índice de polidispersidad, I_{PD} , y caracteriza el ancho de la distribución de masas moleculares. Cuando toma valores entre 1-1,3 se dice que la muestra es monodispersa. En el caso de presentarse una muestra con alta polidispersidad, las cadenas cortas pueden actuar como plastificantes ablandando el material.

Tabla 1.1: Características generales de los polímeros utilizados. * Ver abreviaturas en el texto. ‡Valor informado por el proveedor.

Polímero*	T_g (CDB)‡	M_w (g/mol)	M_n (g/mol)
PMMA: polimetacrilato de metilo	388 K	350.000	
PEMA: polimetacrilato de etilo	334 K	377.000	101.400
PPMA: polimetacrilato de propilo	305 K	150.000	
PBMA: polimetacrilato de butilo	298 K	337.000	
PiBMA: polimetacrilato de isobutilo	320 K		

$$I_{PD} = \frac{M_w}{M_n} \quad \text{Ec. 1.4}$$

1.1.3 Factores que afectan los procesos de relajación

1.1.3.1 Estructura de la cadena lateral, masa molar y polidispersidad

Muchas de las propiedades de los materiales poliméricos amorfos están relacionadas con los movimientos moleculares que están restringidos a dimensiones en la escala de los nanómetros. En los PAMA T_g es influenciada por el tipo de cadena lateral unida al grupo éster. Cuanto mayor es el largo de la cadena lateral menor es la interacción entre cadenas principales disminuyendo T_g [11], [12]. Entre PBMA (T_g : 298 K) y PEMA (T_g : 334 K), existe una diferencia de 36 K en T_g . Si se compara el efecto de cadenas laterales isoméricas sobre T_g , como en el caso de PBMA y PIBMA, T_g es mayor para el polímero que contiene el grupo alquilo más voluminoso [13]. PMMA presenta una T_g tan alta que no es accesible experimentalmente en esta tesis y por lo tanto, sirve como referencia de entornos rígidos.

La masa molar no afecta considerablemente a T_g [14–17]. Sin embargo, cuanto menor es M_w mayor es el número de extremos de cadena principal, por lo que aumenta la movilidad por incremento del volumen libre [18]. La polidispersidad no afecta T_g en experimentos llevados a cabo en poliestireno (PS) por medidas de fluorescencia [16]. Sin embargo, por medidas de elipsometría, T_g parece ser mayor para muestras con mayor I_{PD} . Para $I_{PD} = 2,00$ e $I_{PD} = 1,05$ la diferencia en T_g es de 3 K en películas de espesor grueso (mayor a 200 nm) y prácticamente no hay diferencias en las

películas de espesor nanométrico [17]. En PMMA monodisperso ($M_w = 91000$ g/mol, $I_{PD} = 1,30$) T_g tiende a aumentar levemente al disminuir el espesor de la película en el intervalo de 200 nm a 10 nm, mientras que en PMMA polidisperso ($M_w = 71000$ g/mol, $I_{PD} > 3$) tiende a disminuir con el espesor de la película.

1.1.3.2 Frecuencia de muestreo

Las propiedades viscoelásticas del material se caracterizan por experiencias mecánicas dinámicas aplicando una deformación sinusoidal a una o varias frecuencias. Al aumentar la frecuencia aumenta la T_g medida [19]. Por lo tanto T_g depende fuertemente de la frecuencia de muestreo utilizada, o sea, de la escala temporal. Así al informar la temperatura a la cual se produce la transición vítrea es recomendable indicar la frecuencia de muestreo.

1.1.3.3 Nanoconfinamiento e interfaces

Una de las características más importantes de los materiales en general, son aquellas relacionadas con su uso final. Tal es el caso de dispositivos de diodos orgánicos y displays, donde se usan películas poliméricas luminiscentes de espesor nanométrico. El efecto del nanoconfinamiento puede llegar hasta una disminución de 30 K en T_g [20], influyendo en el desempeño de estos dispositivos. En la última década varios trabajos han puesto especial énfasis en el fenómeno de variación de T_g en función del espesor de la película de polímero, que surge cuando el tamaño

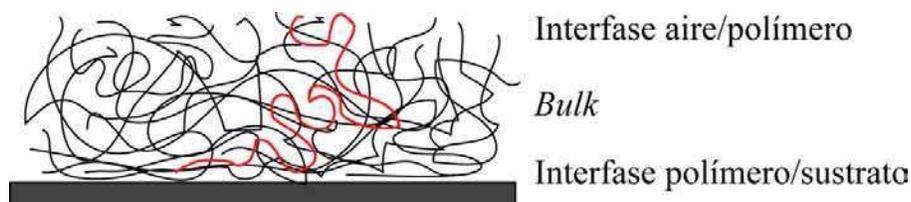
del dominio se vuelve comparable a la distancia característica de las fluctuaciones cerca de T_g . [11], [15], [21], [22].

El efecto de nanoconfinamiento puede aparecer en sistemas con nanoporosidades [23] o en películas de espesor nanométrico. Por ejemplo, en este último caso, los trabajos del grupo de Torkelson muestran que existe una dependencia de la emisión de fluorescencia de pireno en función de la temperatura en PS para distintos espesores de película [22]. La fluorescencia de la sonda se usa para monitorear los cambios en la movilidad local del polímero. Por encima de T_g , disminuye la intensidad de la fluorescencia de pireno ya que se incrementan los movimientos de las cadenas poliméricas y de la sonda, que conducen a un aumento de la probabilidad de desexcitación no radiativa del pireno.

En los PAMA el efecto del nanoconfinamiento sobre T_g es diferente para distintas cadenas laterales. En PIBMA no hay dependencia de T_g con el espesor; en PMMA aumenta con la disminución del espesor, mientras que en PEMA y PPMA disminuye [20]. Este efecto puede desaparecer con el agregado de pequeñas moléculas que actúen como plastificantes por disminución de la longitud características de las fluctuaciones [24].

El efecto de nanoconfinamiento depende fuertemente de las interfases. Al disminuir el espesor de las películas las interfases influyen cada vez más en la dinámica de las cadenas. Este hecho se ha estudiado ampliamente en la literatura tanto experimentalmente como por simulaciones. Baschnagel y Theodorou [25–27] realizaron simulaciones computacionales de las cuales obtuvieron una distribución en la densidad del polímero dependiente de la distancia al soporte (sustrato). De estos cálculos, predijeron una disminución de la densidad desde la interfase sustrato/polímero hacia la interfase polímero/aire. Entre ambas interfases, la densidad calculada, es similar a la

de una película polimérica gruesa (*bulk*).



Esquema 1.3: diagrama de distribución espacial de cadenas de polímero en la película delgada. En este se muestra la influencia de las interfases en la disposición espacial de las cadenas. En la interfaz aire/polímero el volumen libre es mayor debido a una mayor cantidad de extremos de cadena principal. En el medio la disposición es similar a la que podría observarse en una película de espesor mayor a 200 nm, (*bulk*=seno). En la interfaz polímero/sustrato, dependiendo de las interacciones entre ambos, la densidad de cadenas puede aumentar. La línea roja representa una cadena que puede experimentar las tres secciones debido al nanoconfinamiento. El largo típico promedio para una cadena de polímero única es del orden de los 100 nm.

A partir de estos resultados propusieron la existencia de una densidad anisotrópica en películas de polímero ultra delgadas (espesor < 3 nm), donde en sustratos con interacciones atractivas con el polímero los enlaces C-C tienden a orientarse paralelos al sustrato. Una posible distribución espacial de cadenas poliméricas que responden a esta organización se presenta en el *Esquema 1.3*.

En la literatura se encuentran numerosos trabajos sobre la influencia de la composición del sustrato en T_g . Por ejemplo, en PS, a través de medidas de elipsometría y dispersión de luz de Brillouin, se mostro que T_g de películas autosustentadas (sin sustrato) es mayor que la de películas preparadas sobre sustratos de SiO_x . En forma similar, la T_g de la película de

PS sobre SiO_x es menor cuando la capa de polímero se recubre con otra de SiO_x [28]. T_g de películas de PMMA aumenta en SiO_x probablemente debido a interacciones tipo puente de hidrógeno con la superficie, mientras que sobre oro, disminuye [29]. Torkelson *et al.* estudiaron las interfaces aire/polímero y polímero/sustrato de una serie de PAMA [20]. Prepararon las películas poliméricas sobre cubreobjetos de vidrio y determinaron el valor de T_g por medidas de intensidad de emisión de fluorescencia. En la interfase aire/polímero, T_g disminuye, pero en la interfase polímero/sustrato siempre aumenta. Concluyeron que la diferencia de T_g entre ambas interfaces define el comportamiento de T_g medida globalmente. En resumen, la dirección en el cambio de T_g del polímero depende de las interacciones con las superficies, y dichas interacciones a su vez de la naturaleza química de los grupos en las interfaces.

La bibliografía es extensa y en algunos casos contradictoria. Por ejemplo, técnicas como espectroscopía de aniquilación de positrones lentos [30], resonancia de plasmón superficial [31], dispersión de luz de Brillouin y elipsometría [28] predicen una disminución de T_g medida cerca de sustrato. Mientras que trabajos en los que se utiliza espectroscopía de absorción fina de rayos X cercanos (NEXAFS) [32], difracción de rayos X y microscopía de fuerza (SFM), sugieren lo contrario. En PAMA se obtuvo por elipsometría una reducción en T_g respecto del valor en películas gruesas según el siguiente orden: PMMA>PEMA>PPMA [33]. Este orden es inverso al publicado por Torkelson en medidas de fluorescencia [20].

Estos resultados indican que es necesario prestar especial atención a la información que puede obtenerse de cada técnica y las características de preparación de las muestras a fin de caracterizar el estado amorfo confinado.

1.2 SONDAS FLUORESCENTES PARA EL ESTUDIO DE PROCESOS DE RELAJACIÓN EN POLÍMEROS

1.2.1 La caja de polímero

El estado amorfo, al ser desordenado, posee una gran cantidad de entornos con características diferentes. El marcado o dopaje de este sistema con moléculas fluorescentes (sondas) permite, a través de técnicas de espectroscopía de fluorescencia, obtener información sobre el conjunto de las moléculas adicionadas o sobre cada una en particular. En estos sistemas la sonda se ubica en zonas llamadas cajas de polímero, que se forman en torno a ella en el momento de preparación de la película. La información que se obtiene está directamente relacionada con las interacciones entre la caja y la sonda. Por ejemplo, los movimientos de la sonda se deben a oscilaciones limitadas por el volumen de la caja y a movimientos de las paredes que la rodean. Esto genera fluctuaciones pequeñas, debidas a la agitación térmica y otras mayores debidas a cambios grandes en la conformación de la caja. Así, las propiedades espectrales de la sonda dependen de la rigidez y de la composición química de los grupos que conforman las paredes de la caja.

En los polímeros en *estado vítreo*, las cajas son heterogéneas en espacio y fluctúan en el tiempo [34], [35]. En espacio, la heterogeneidad está relacionada con diferentes entornos moleculares; en tiempo, la heterogeneidad se asocia a fluctuaciones en la conformación de la sonda-caja de polímero.

1.2.2 Sondas fluorescentes

Actualmente se ha avanzado en la síntesis de moléculas fluorescentes con características casi ideales para cada sistema a estudiar. Existen sondas fluorescentes cuya emisión es altamente sensible a diferentes características fisicoquímicas de su entorno. Para cavidades llamadas “pasivas” el comportamiento de la sonda depende puramente de la forma, el tamaño y la flexibilidad de la caja. En cavidades “activas”, la orientación de la sonda y su variación temporal afectan las propiedades de la emisión debido a la direccionalidad de las interacciones entre la sonda y las paredes de la caja. Estas interacciones pueden variar entre débiles (tipo van der Waals) y fuertes (tipo puente de Hidrógeno o electrostáticas) [36], [37]. Esta propiedad es la que hace a la espectroscopía de fluorescencia una herramienta útil para entender la estructura de la caja y los procesos de relajación en polímeros. La selección de la sonda adecuada es un paso fundamental en cualquier experimento de fluorescencia. Las sondas deben presentar preferentemente las siguientes características generales:

- 1) Alto coeficiente de absorción molar, ϵ . Para lograr igual frecuencia de luz absorbida con menor concentración.
- 2) Alto rendimiento cuántico de fluorescencia, Φ_F . Para proveer mayor concentración de fotones emitidos.
- 3) Gran desplazamiento de Stokes. Para disminuir el efecto de la luz dispersa en especial en medidas de anisotropía de emisión.
- 4) Alta fotoestabilidad. La poca cantidad de moléculas de colorante en las películas delgadas limita la intensidad de fluorescencia que puede colectarse durante una medición. Para mejorar la relación señal/ruido

en muestras delgadas son necesarios tiempos de integración largos (2 s/nm). La fotoestabilidad puede mejorarse trabajando en vacío, ya que el O₂ es normalmente el agente que limita la fotoestabilidad; también desde la selección de la sonda, eligiendo fluoróforos con constantes bajas de cruce entre sistemas (k_{isc}), ya que el estado triplete suele ser reactivo en la fotooxidación.

- 5) Alta solubilidad en mezclas tolueno/polímero, ya que las películas poliméricas se preparan a partir de estas soluciones.
- 6) Estabilidad térmica en el intervalo de trabajo (en esta tesis: 278 K–363 K) y baja dependencia de Φ_F con la temperatura.

Las sondas que presentan sistemas dadores y aceptores de electrones son quizás las más interesantes. Para estas moléculas, luego de la absorción de un fotón, el estado excitado singulete de menor energía es un estado de transferencia de carga intramolecular (TCI). Desde éste estado se emite la fluorescencia que es sensible a los cambios de interacción con el entorno. Debido a la gran diferencia de interacciones con estos, entre el estado fundamental y el excitado, la sonda presenta un gran solvatocromismo. Incluso algunos compuestos llegan a mostrar emisión desde dos estados interconvertibles durante el tiempo de vida del estado excitado (fluorescencia dual).

1.2.3 Medidas que dependen de las interacciones sonda-caja de polímero

La alta sensibilidad de las sondas fluorescentes a los cambios en el entorno ha convertido a la espectroscopía de fluorescencia en una

herramienta única para estudiar propiedades de la materia, en particular polímeros. Las interacciones sonda-caja pueden estudiarse por espectroscopía de estado estacionario o resuelta en el tiempo obteniéndose información promedio sobre el ensamble. Cuando se desea estudiar las interacciones individualmente se recurre alternativamente a técnicas avanzadas de microscopía de fluorescencia [38–40]. Así se pueden obtener distribuciones de valores de una propiedad en vez de su valor promedio [41].

En los siguientes incisos se detallan propiedades espectrales de la sonda que se ven afectadas por las interacciones con la caja de polímero.

1.2.3.1 Energía espectral y solvatocromismo

En el proceso de absorción de un fotón la sonda pasa de un estado fundamental a un estado excitado Franck-Condon (FC). En esta transición vertical no ocurren cambios en la posición de los núcleos de la sonda ni de su entorno. En el estado excitado se produce una reorganización de la densidad electrónica casi inmediata, y dado que algunas sondas pueden sufrir procesos de TCI, el momento dipolar del estado excitado suele ser mayor al del estado fundamental, $\mu_E > \mu_F$. Paralelamente, el entorno se reorganiza conduciendo a un estado relajado de mínima energía, por lo que la energía del estado emisor es menor a la del estado FC.

La relajación de los entornos depende de la viscosidad del material. Si el tiempo requerido para la reorganización de las moléculas del entorno es rápido comparado con el tiempo de vida de fluorescencia, τ_F , la emisión se produce desde estados relajados. Esto se manifiesta como un desplazamiento del espectro de emisión hacia mayores longitudes de onda, resultando en un

aumento del desplazamiento de Stokes. Si el tiempo de reorganización es lento en comparación a τ_F , la emisión se produce desde estados cercanos al estado FC y prácticamente no hay desplazamiento del espectro de emisión. Si los tiempos son comparables los primeros fotones emitidos son de mayor energía que los últimos.

Dentro de la caja de polímero el fluoróforo se encuentra rodeado de grupos con composición química diferente. El estado fundamental y el excitado son estabilizados, en mayor o menor medida, dependiendo de las interacciones sonda-caja que pueden ser explicadas en términos de las interacciones de Van der Waals, dipolares y de puente de hidrógeno. La determinación de la posición energética del espectro de emisión de la sonda da cuenta de las diferencias entre interacciones del estado fundamental y del estado excitado emisor con el entorno. Así, cambios en la composición de la caja generan cambios en la polaridad del entorno que se traducen como desplazamientos de la posición de una banda de absorción o emisión electrónica. Este fenómeno se denomina *solvatocromismo*.

Existen compuestos de referencia que permiten construir escalas empíricas de polaridad. En particular, la escala de polaridad $E_T(30)$ se describirá y aplicará en el *Capítulo 3*.

1.2.3.2 Rendimiento cuántico y tiempo de vida de fluorescencia

El rendimiento cuántico de fluorescencia es la relación entre el número de fotones emitidos y el número de fotones absorbidos; y se calcula a partir de la ecuación:

$$\Phi_F = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = k_r \tau_s \quad \text{Ec. 1.5}$$

donde k_r y k_{nr} son las constantes asociadas a los procesos radiativos y no radiativos, respectivamente. En entornos rígidos los procesos no radiativos son menos probables que los radiativos, conduciendo a Φ_F mayores que en entornos flexibles [42], [43].

El tiempo de vida de un fluoróforo, τ_F , también es sensible al entorno, debido a las vías de desactivación de la emisión que pueden verse favorecidas dependiendo de la viscosidad del solvente o la fricción con la caja de polímero [44], [45].

1.2.3.3 Desplazamiento espectral por excitación en el flanco rojo del espectro de absorción

Los sistemas amorfos presentan una distribución de interacciones sonda-caja debido a la existencia de entornos con dinámica, energía y configuración espacial a nivel atómico diferentes. Como el momento dipolar es distinto en el estado fundamental que en el excitado, se genera una distribución de energías para cada estado en el *ensamble*. Esto se manifiesta experimentalmente como un *ensanchamiento inhomogéneo* del espectro. Este tipo de ensanchamiento es, en general, mayor que el *ensanchamiento homogéneo* originado por los distintos niveles vibracionales de cada nivel electrónico [46].

El efecto sobre el espectro de emisión por la excitación en el flanco rojo del espectro de absorción (REE, por sus siglas en inglés: red edge effect) fue originalmente observado por Chen en 1967 [47], Fletcher en 1968 [48], Galley *et al.* en 1970 [49] y finalmente descrito por Azumi *et al.* en 1975 [50] quien lo aplicó al estudio de la rigidez de polímeros en 1988 [51]. REE se basa en la selección de moléculas que interaccionan fuertemente con el entorno, por ejemplo, en las que los procesos de TCI se encuentran favorecidos. Si se irradia con una energía menor a la de la transición 0-0, una parte de la distribución de fluoróforo se excita selectivamente. Esto da origen a una *fotoselección de sitios* [52], [53].

REE depende del tiempo de reorganización del medio y se observa preferentemente en sistemas con baja movilidad estructural. En sistemas rígidos, donde la dinámica de relajación del sistema es suficientemente lenta, la energía de emisión se vuelve dependiente del tipo de solvatación y del tiempo de relajación del polímero. En polímeros amorfos se espera que por debajo de T_g los entornos no lleguen a equilibrarse en el tiempo de vida del estado excitado y que REE sea apreciable. Al excitar la muestra con energías menores a la del máximo de absorción se observa entonces, un desplazamiento del espectro de fluorescencia hacia longitudes de onda mayores respecto de la excitación en el máximo de absorción. Por encima de T_g la movilidad del medio aumenta, los entornos pueden equilibrarse y el sistema puede reorganizarse disminuyendo considerablemente el desplazamiento del espectro. REE se ha utilizado para el estudio de la rigidez, volumen libre y viscosidad de matrices poliméricas [51], [54].

En esta tesis, REE se cuantifica por medio de dos parámetros:

- 1) La variación de la posición del máximo de emisión, $\Delta\nu_{\max}$ (cm^{-1}), al cambiar la longitud de onda de excitación, $\Delta\lambda_{\text{exc}}$ (nm), cuando se

excita más allá del máximo de excitación:

$$\text{REE} = |v_{\text{max}}^{\lambda_1} - v_{\text{max}}^{\lambda_2}| \quad \text{Ec. 1.6}$$

donde λ_1 es la menor longitud de onda de excitación y λ_2 la mayor.

2) La dependencia de REE con la temperatura:

$$\Delta\text{REE}_T = \frac{\text{REE}(T_{\text{max}}) - \text{REE}(T_{\text{min}})}{T_{\text{max}} - T_{\text{min}}} \quad \text{Ec. 1.7}$$

donde T_{min} es la mínima temperatura y T_{max} la máxima temperatura a la cual se mide el sistema. Este parámetro depende de la variación del tiempo de relajación del polímero con la temperatura.

1.2.3.4 Anisotropía de fluorescencia

Según Jablonski la anisotropía de fluorescencia puede ser caracterizada por:

$$r^2 = \frac{(I_1 - I_2)^2 + (I_2 - I_3)^2 + (I_3 - I_1)^2}{2I_{\text{tot}}^2} \quad \text{Ec. 1.8}$$

donde I_1 , I_2 e I_3 son las intensidades de las distintas componentes de la luz en la dirección de los ejes cartesianos, e $I_{tot} = I_1 + I_2 + I_3$ [55]. Generalmente la anisotropía se determina a 90° del eje de propagación de la luz incidente, que está linealmente polarizada. En estas condiciones se miden las componentes paralela, I_{par} , y perpendicular, I_{per} de la emisión. Por la simetría axial del sistema $I_2 = I_3 = I_{per}$ e $I_1 = I_{par}$, y r se reduce a:

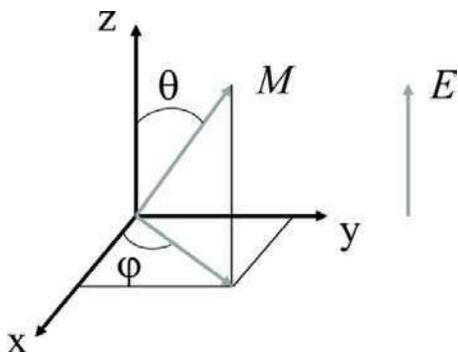
$$r = \frac{I_{par} - I_{per}}{I_{par} + 2 \cdot I_{per}} \quad Ec. 1.9$$

donde $I_{tot} = I_{par} + 2 \cdot I_{per}$.

La anisotropía resuelta en el tiempo luego de la excitación con un pulso de luz se define como:

$$r(t) = \frac{I_{par}(t) - I_{per}(t)}{I_{tot}(t)} \quad Ec. 1.10$$

Cuando una población de fluoróforos es iluminada con luz linealmente polarizada, \mathbf{E} , son excitados preferentemente aquellos con el momento de transición de absorción, \mathbf{M}_A , orientado en dirección cercana a \mathbf{E} . Este fenómeno se conoce como *fotoselección*.



Esquema 1.4: Sistema de coordenadas para un fluoróforo con momento dipolar de transición, \mathbf{M} , y excitación linealmente polarizada, \mathbf{E} . Donde θ es el ángulo entre \mathbf{M} y \mathbf{E} . φ es el ángulo que forma la proyección de \mathbf{M} en el plano xy medido con respecto al eje x .

Como la distribución de fluoróforos excitados es anisotrópica, también lo es la emisión [56]. Cuando \mathbf{M}_A es paralelo al momento de transición de emisión (\mathbf{M}_E) el momento de la transición se representa con el parámetro \mathbf{M} . En este caso el ángulo, β , entre ambos momentos es cero. La absorción de luz se produce a lo largo de un eje preferencial y su probabilidad es proporcional a $\cos^2\theta$, donde θ es el ángulo entre \mathbf{M} y \mathbf{E} (ver *Esquema 1.4*).

En una muestra macroscópica, debido a la difusión rotacional durante el tiempo de vida del estado excitado se produce una despolarización parcial de la fluorescencia traducida en una disminución de r .

Existen varios factores que despolarizan la fluorescencia: las vibraciones torsionales, la conversión interna entre estados electrónicos de la sonda, la transferencia de energía entre moléculas de colorante y la difusión rotacional. En particular, esta última se origina por el movimiento térmico desordenado y al azar de las moléculas (*movimiento Browniano*). Si una sonda esférica experimenta rotaciones isotrópicas, el tiempo en el que se despolariza la emisión depende del tiempo de correlación rotacional, τ_{rot} ,

según la ecuación:

$$r(t) = r_0 e^{-t/\tau_{\text{rot}}} \quad \text{Ec. 1.11}$$

donde τ_{rot} está relacionado con el coeficiente de difusión rotacional, D , a través de la ecuación:

$$\tau_{\text{rot}} = \frac{1}{6D} \quad \text{Ec. 1.12}$$

Si el tiempo de vida del estado excitado, τ , es mucho mayor a τ_{rot} entonces \mathbf{M} puede rotar varias veces durante el tiempo de vida del estado excitado y la emisión se despolariza completamente ($r \approx 0$). Si $\tau \ll \tau_{\text{rot}}$, la molécula permanece inmóvil durante el tiempo de vida de fluorescencia y la anisotropía permanece casi constante (caso sin difusión rotacional, $r \approx r_0$). Cuando $\tau \sim \tau_{\text{rot}}$ la anisotropía puede sentir cambios que afectan la rotación de \mathbf{M} ya que ambos se encuentran en la misma ventana temporal.

Si se conoce el valor de τ y de r_0 (valor límite de $\langle r \rangle$ en ausencia de giro) se puede conocer D realizando medidas de anisotropía de estado estacionario utilizando la ecuación de Perrin:

$$r = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{rot}}}} \quad \text{Ec. 1.13}$$

A partir de la ecuación de Stokes-Einstein se puede determinar la fricción del entorno molecular:

$$D = \frac{RT}{6V_h\eta} \quad \text{Ec. 1.14}$$

donde V_h es el volumen hidrodinámico de la sonda y η , la viscosidad del solvente. Esta ecuación ha sido ampliamente utilizada para describir la rotación de moléculas, modeladas como una esfera que rota en un solvente fluido continuo, donde el tamaño de la esfera es mayor al de las moléculas del solvente. Es más difícil de usar el valor de D , obtenido por medio de sondas fluorescentes, para calcular la viscosidad del solvente debido a que el tamaño de la sonda es comparable al de las moléculas del entorno y hay interacciones específicas o no hay rotaciones libres en todas las configuraciones posibles como es el caso de las matrices poliméricas.

En los polímeros la sonda encuentra zonas rígidas donde difícilmente puede moverse, y otras donde puede experimentar movimientos de mayor amplitud, dependiendo de la relación de tamaño y de las interacciones específicas sonda-caja. Se ha probado experimentalmente, por generación de segundo armónico [57], espectroscopía dieléctrica [58] y espectroscopía de fluorescencia de moléculas únicas [59], que los movimientos de la sonda están acoplados a desplazamientos de segmentos de cadenas lo que demuestra la amplitud y/o flexibilidad del entorno.

A nivel microscópico, se pueden considerar las interacciones sonda-caja a partir del coeficiente de fricción introducido en la ecuación de Langevin (Ec. 1.15).

$$m \frac{d^2 x}{d^2 t} = F(t) - f \frac{dx}{dt} \quad \text{Ec. 1.15}$$

En esta ecuación una partícula de masa m experimenta una fuerza $F(t)$ debida a los choques con el entorno cercano. Además, existe una fuerza que se opone al movimiento ($-f \frac{dx}{dt}$), donde f es el coeficiente de fricción. La fuerza que se resiste al movimiento es proporcional a la velocidad de la partícula y el coeficiente de fricción esta asociado a la viscosidad del sistema en el llamado régimen hidrodinámico habitualmente usado [60].

En resumen, a partir de medidas de anisotropía de fluorescencia es posible conocer los cambios de orientación de la sonda y asociar la amplitud y frecuencia de estos cambios a la rigidez de la caja de polímero.

1.2.4 Espectroscopía de fluorescencia de moléculas únicas

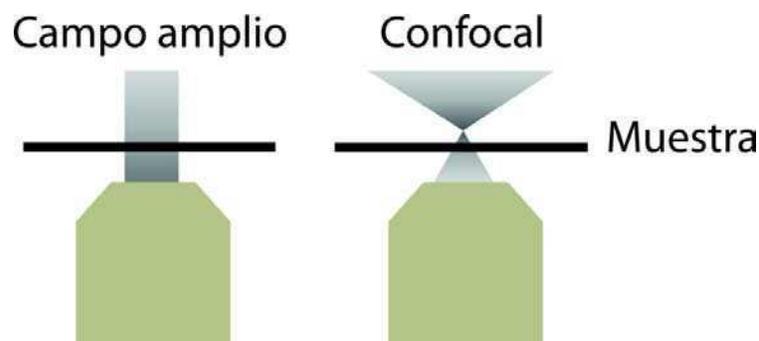
La espectroscopía de moléculas únicas (EMU) permite seleccionar la emisión de una molécula, seguir su evolución temporal local, obteniendo información indirecta del entorno de la molécula [61]. Esto es posible ya que se combinan: alta sensibilidad de detección, alta especificidad y baja invasión, lo que permite estudiar, por ejemplo, sistemas condensados complejos. Esta técnica pone en evidencia la existencia de una distribución de individualidades más que un comportamiento único promedio y permite una medida directa de la distribución de comportamientos.

En los polímeros cada molécula da información acerca de la caja en la

que se encuentra, pudiendo evidenciar la heterogeneidad dinámica y espacial del sistema. Por el contrario, en las medidas de *ensamble* se obtiene información promedio del sistema realizando medidas sobre un conjunto de moléculas. La detección de fluorescencia de *moléculas únicas* por microscopía confocal es una técnica que se ha utilizado desde los últimos 20 años en el estudio de polímeros [40], [62–64]. Siendo el gran desafío de las técnicas de *moléculas únicas* garantizar que la muestra elegida es representativa del conjunto.

Las técnicas de microscopía de fluorescencia de *moléculas únicas*, en comparación con otras técnicas de fluorescencia, presentan la ventaja de cubrir escalas temporales amplias. Siendo una técnica útil para estudiar sistemas que poseen un amplio espectro de tiempos característicos, como en el caso de los polímeros amorfos [40], [65], [66]. En estos la escala temporal involucrada en los procesos de relajación se da en el intervalo 10^{-7} – 10^4 s [2]. Una de estas técnicas ampliamente utilizada, es la espectroscopía de correlación de fluorescencia (ECF), que posee gran resolución espacial y muy bajo límite de detección. Así permite realizar medidas en condiciones de equilibrio y cubrir más de 5 órdenes de magnitud temporal con una sola determinación [67].

Las dos configuraciones de microscopía más utilizadas son: la **confocal** y la de **campo amplio**. Ambas se basan en la posibilidad de detectar un bajo número de fotones emitidos separados eficientemente de la fuente de excitación (generalmente Láser), ambas difieren principalmente en el área iluminada, *Esquema 1.5*. Estas técnicas se describen en el *Capítulo 2*.



Esquema 1.5: Volumen de excitación sobre la muestra en microscopías de campo amplio y microscopía confocal [68], las zonas grises representan el haz de excitación.

A pesar de los beneficios aportados por la espectroscopía de *moléculas únicas*, existen factores inherentes al método que deben ser tenidos en cuenta. Un ejemplo es la limitación espacial (que es del orden de $\lambda/2$ en la dirección transversal) dada por el límite de difracción debido al uso de lentes y luz visible. Además, en el proceso de adquisición de imágenes o de trazas temporales de *moléculas únicas*, se tiende a observar y seleccionar la fluorescencia de aquellas moléculas que tienen alta intensidad y estabilidad, obteniéndose un panorama incompleto de los procesos. Es por esto que pueden surgir discrepancias entre el comportamiento promedio, medido en un fluorímetro convencional, y el resultado acumulado de las moléculas individuales. Otro factor a considerar es el fotoblanqueo de la sonda que limita el tiempo total de un experimento de EMU.

En esta tesis se estudian los procesos de relajación en películas poliméricas delgadas mediante las propiedades de emisión de sondas fluorescentes embebidas en el polímero. La ubicación de la sonda en la matriz define una cavidad (caja de polímero) con paredes flexibles y de polaridad variable, cuyas propiedades fisicoquímicas gobiernan las

características espectrales locales y temporales de la sonda, así como sus movimientos de reorientación. La naturaleza heterogénea de la dinámica, tanto en tiempo como en espacio, se pone de manifiesto con técnicas de espectroscopía que permiten seleccionar poblaciones de fluoróforos con características diferentes en la emisión. El gran avance en las técnicas espectroscópicas, permite hoy en día, estudiar las interacciones no solo a nivel de conjunto de moléculas sino también, seleccionar las moléculas individualmente y analizar su evolución local temporal. Aplicando ambas visiones del sistema, en esta tesis, se han utilizado técnicas de espectroscopía de fluorescencia convencionales y de moléculas únicas, que permiten el estudio global, macroscópico y microscópico, de las interacciones sonda-caja de polímero y su relación con el fenómeno de relajación polimérica. Con este fin, la tesis se estructura de la siguiente forma: en el *Capítulo 2* se describen los materiales y métodos utilizados en la preparación de muestras, así como las técnicas de medición aplicadas en el desarrollo de los experimentos elaborados en los *Capítulos 3 y 4*.

En el *Capítulo 3* se describen y discuten medidas asociadas a la heterogeneidad espectral. A nivel de *ensamble*, la heterogeneidad se pone de manifiesto seleccionando poblaciones de fluoróforos que interaccionan de forma diferente con el entorno por medio del efecto de excitación en el flanco rojo del espectro de absorción y su dependencia con la temperatura. Las interacciones sonda-caja de polímero dependen de la ubicación de la sonda en el ensamble heterogéneo de entornos. Las distintas configuraciones de la caja de polímero afectan la dinámica espectral de la sonda, y se ponen de manifiesto siguiendo la traza temporal del espectro de emisión de cada molécula. Las fluctuaciones espectrales se estudian, a nivel de *moléculas únicas*, por medio del análisis de la función de distribución acumulada complementaria (FDAC) y de los tiempos de residencia.

En el *Capítulo 4* la anisotropía de fluorescencia se utiliza como parámetro de la dinámica rotacional de la sonda e informa acerca de la rigidez de los entornos. La anisotropía de fluorescencia de estado estacionario o resuelta en el tiempo, brinda información de los movimientos de rotación de la sonda que ocurren en el estado excitado y que sensan procesos que ocurren en una ventana temporal muy pequeña. Por otro lado, los cambios de orientación de la sonda en el estado fundamental se pueden medir en una amplia escala temporal, limitada por el sistema de detección y la fotoestabilidad de la sonda. Esto se lleva a cabo adquiriendo trazas temporales de la intensidad de fluorescencia polarizada de moléculas únicas, excitando con luz linealmente polarizada y analizando las fluctuaciones de orientación por medio de la FDAC. Debido a la degradación fotoquímica se encuentra siempre presente en este tipo de experimentos, se propone un método para determinar el coeficiente de difusión rotacional aprovechando el fotoblanqueo de la sonda en condiciones de irradiación continua linealmente polarizada. En estas condiciones, se registra en función del tiempo la anisotropía estacionaria del conjunto de moléculas fotoseleccionadas y se la relaciona con la difusión rotacional.

Por último, en el *Capítulo 5* se presentan las conclusiones de la tesis.

1.3 REFERENCIAS

- [1] R. J. Young and R. N. Haward, *Physics of Glassy Polymers*, 2da. ed. Springer, 1997.
- [2] M. D. Ediger, C. A. Angell y S. R. Nagel, "Supercooled Liquids and Glasses," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 100, no. 31, pp. 13200–13212, 1996.
- [3] J. A. Grulke and E. A. Rodney, "Glass Transition Temperatures of Polymers," in *Polymer Handbook*, Wiley, Ed. 1999, pp. VI–213.
- [4] C. a. Angell, K. L. Ngai, G. B. McKenna, P. F. McMillan y S. W. Martin, "Relaxation in glassforming liquids and amorphous solids," *Journal of Applied Physics*, vol. 88, no. 6, pp. 3113–3157, 2000.
- [5] R. Richert, "Origin of dispersion in dipolar relaxations of glasses," *Chemical Physics Letters*, vol. 216, no. 1–2, pp. 223–227, 1993.
- [6] M. D. Ediger, "Spatially heterogenous dynamics in supercooled liquids," *Annual Review of Physical Chemistry*, vol. 51, pp. 99–128, 2000.
- [7] P. G. Debenedetti y F. H. Stillinger, "Supercooled liquids and the glass transition.," *Nature*, vol. 410, no. 6825, pp. 259–67, 2001.
- [8] M. L. Williams, R. F. Landel y J. D. Ferry, "The Temperature Dependence of Relaxation Mechanisms in Amorphous Polymers and Other Glass-forming Liquids," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 77, no. 14, pp. 3701–3707, 1955.
- [9] K. Fukao y Y. Miyamoto, "Glass transitions and dynamics in thin polymer films: Dielectric relaxation of thin films of polystyrene," *Physical Review E*, vol. 61, no. 2, pp. 1743–1754, 2000.
- [10] V. Lupascu, S. Picken y M. Wubbenhorst, "Cooperative and non-cooperative dynamics in ultra-thin films of polystyrene studied by dielectric spectroscopy and capacitive dilatometry," *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 352, no. 52–54, pp. 5594–5600, 2006.
- [11] C. L. Jackson y G. B. McKenna, "The glass transition of organic liquids confined to small pores," *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 131–133, P, pp. 221–224, 1991.
- [12] S. Rogers y L. Mandelkern, "Glass Transitions of the Poly-(n-Alkyl Methacrylates)," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 61, no. 7, pp. 985–991, 1957.

-
- [13] C. Mennissez, B. Sixou, L. David y G. Vigier, "Dielectric and mechanical relaxation behavior in poly(butyl methacrylate) isomers," *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 351, no. 6–7, pp. 595–603, 2005.
- [14] O. K. C. Tsui y H. F. Zhang, "Effects of Chain Ends and Chain Entanglement on the Glass Transition Temperature of Polymer Thin Films," *Macromolecules*, vol. 34, no. 26, pp. 9139–9142, 2001.
- [15] J. L. Keddie, R. A. L. Jones y R. A. Cory, "Size-Dependent Depression of the Glass Transition Temperature in Polymer Films," *Europhysics Letters*, vol. 27, no. 1, p. 59, 1994.
- [16] C. J. Ellison, M. K. Mundra y J. M. Torkelson, "Impacts of Polystyrene Molecular Weight and Modification to the Repeat Unit Structure on the Glass Transition-Nanoconfinement Effect and the Cooperativity Length Scale," *Macromolecules*, vol. 38, pp. 1767–1778, 2005.
- [17] L. Singh, P. J. Ludovice y C. L. Henderson, "Influence of molecular weight and film thickness on the glass transition temperature and coefficient of thermal expansion of supported ultrathin polymer films," *Thin Solid Films*, vol. 449, pp. 231–241, 2004.
- [18] K. L. Ngai, T. R. Gopalakrishnan y M. Beiner, "Relaxation in poly(alkyl methacrylate)s: Change of intermolecular coupling with molecular structure, tacticity, molecular weight, copolymerization, crosslinking, and nanoconfinement," *Polymer*, vol. 47, no. 20, pp. 7222–7230, 2006.
- [19] A. F. Lewis, "The frequency dependence of the glass transition," *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters*, vol. 1, no. 12, pp. 649–654, 1963.
- [20] R. D. Priestley, M. K. Mundra, N. J. Barnett, L. J. Broadbelt y J. M. Torkelson, "Effects of Nanoscale Confinement and Interfaces on the Glass Transition Temperatures of a Series of Poly(n-methacrylate) Films," *Australian Journal of Chemistry*, vol. 60, no. 10, pp. 765–771, 2007.
- [21] G. Reiter, "Mobility of Polymers in Films Thinner than Their Unperturbed Size," *Europhysics Letters*, vol. 23, no. 8, p. 579, 1993.
- [22] C. J. Ellison y J. M. Torkelson, "The distribution of glass-transition temperatures in nanoscopically confined glass formers," *Nature Materials*, vol. 2, no. 10, pp. 695–700, 2003.
- [23] I. M. Kalogeras y E. R. Neagu, "Interplay of surface and confinement effects on the molecular relaxation dynamics of nanoconfined poly(methyl methacrylate) chains," *The European physical journal. E, Soft matter and Biological Physics*, vol. 14, no. 2, pp. 193–204, 2004.

- [24] C. Ellison, R. Ruszkowski, N. Fredin y J. Torkelson, "Dramatic Reduction of the Effect of Nanoconfinement on the Glass Transition of Polymer Films via Addition of Small-Molecule Diluent," *Physical Review Letters*, vol. 92, no. 9, pp. 1–4, 2004.
- [25] C. Mischler, J. Baschnagel y K. Binder, "Polymer films in the normal-liquid and supercooled state: a review of recent Monte Carlo simulation results," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 94, no. 1–3, pp. 197–227, 2001.
- [26] K. Binder, A. Milchev y J. Baschnagel, "Simulation studies on the dynamics of polymers at interfaces," *Annual Review of Materials Research*, vol. 26, pp. 107–134, 1996.
- [27] C. Mischler, J. Baschnagel, S. Dasgupta y K. Binder, "Structure and dynamics of thin polymer films: a case study with the bond-fluctuation model," *Polymer*, vol. 43, no. 2, pp. 467–476, 2002.
- [28] J. A. Forrest y J. R. Dutcher, "Interface and chain confinement effects on the glass transition temperature of thin polymer films," *Physical Review E*, vol. 56, no. 5, pp. 5705–5716, 1997.
- [29] J. L. Keddie, R. A. L. Jones y R. A. Cory, "Interface and surface effects on the glass-transition temperature in thin polymer films," *Faraday Discussions*, vol. 98, no. 98, p. 219, 1994.
- [30] Y. C. Jean, R. Zhang, H. Cao, J.-P. Yuan, C.-M. Huang, B. Nielsen y P. Asoka-Kumar, "Glass transition of polystyrene near the surface studied by slow-positron-annihilation spectroscopy," *Physical Review B*, vol. 56, no. 14, pp. 8459–8462, 1997.
- [31] O. Prucker, S. Christian, H. Bock, J. R uhe, C. W. Frank y W. Knoll, "On the glass transition in ultrathin polymer films of different molecular architecture," *Macromolecular Chemistry and Physics*, vol. 199, no. 7, pp. 1435–1444, 1998.
- [32] Y. Liu, T. P. Russell, M. G. Samant, J. St ohr, H. R. Brown, A. Cossy-Favre y J. Diaz, "Surface Relaxations in Polymers," *Macromolecules*, vol. 30, no. 25, pp. 7768–7771, 1997.
- [33] C. G. Campbell y B. D. Vogt, "Examination of the influence of cooperative segmental dynamics on the glass transition and coefficient of thermal expansion in thin films probed using poly(n-alkyl methacrylate)s," *Polymer*, vol. 48, no. 24, pp. 7169–7175, 2007.
- [34] R. Richert, "Evidence for Dynamic Heterogeneity near T_g from the Time-Resolved Inhomogeneous Broadening of Optical Line Shapes," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 101, no. 33, pp. 6323–6326, 1997.
- [35] R. Richert y A. Heuer, "Rate-Memory and Dynamic Heterogeneity of First-Order Reactions in a Polymer Matrix," *Macromolecules*, vol. 30, no. 14, pp. 4038–4041, 1997.

- [36] V. Ramamurthy, R. G. Weiss y G. S. Hammond, "A Model for the Influence of Organized Media on Photochemical Reactions," in *Advances in Photochemistry*, John Wiley & Sons, Inc., 2007, pp. 67–234.
- [37] R. G. Weiss, V. Ramamurthy y G. S. Hammond, "Photochemistry in organized and confining media: a model," *Accounts of Chemical Research*, vol. 26, no. 10, pp. 530–536, 1993.
- [38] M. Orrit, "Single-molecule spectroscopy: The road ahead," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 117, no. 24, pp. 10938–10946, 2002.
- [39] W. E. Moerner y D. P. Fromm, "Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy," *Review of Scientific Instruments*, vol. 74, no. 8, pp. 3597–3619, 2003.
- [40] D. Wöll, E. Braeken, A. Deres, F. C. De Schryver, H. Uji-i y J. Hofkens, "Polymers and single molecule fluorescence spectroscopy, what can we learn?," *Chemical Society Reviews*, vol. 38, no. 2, pp. 313–28, 2009.
- [41] X. Sunney Xie, "Single-Molecule Spectroscopy and Dynamics," *Accounts of Chemical Research*, vol. 29, no. 12, pp. 598–606, 1996.
- [42] R. S. H. Liu y G. S. Hammond, "Reflection on Medium Effects on Photochemical Reactivity," *Accounts of Chemical Research*, vol. 38, no. 5, pp. 396–403, 2005.
- [43] J. M. Drake, M. L. Lesiecki, J. Sansregret y W. Thomas, "Organic dyes in PMMA in a planar luminescent solar collector: a performance evaluation," *Applied optics*, vol. 21, pp. 2945–2952, 1982.
- [44] V. P. Biju, J. Y. Ye y M. Ishikawa, "Spatial Heterogeneity in a Polymer Thin Film Probed by Single Molecules," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 107, no. 39, pp. 10729–10735, 2003.
- [45] M. Ishikawa, J. Y. Ye, Y. Maruyama y H. Nakatsuka, "Triphenylmethane Dyes Revealing Heterogeneity of Their Nanoenvironment: Femtosecond, Picosecond, and Single-Molecule Studies," *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 103, no. 22, pp. 4319–4331, 1999.
- [46] B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH, 2001.
- [47] R. F. Chen, "Some characteristics of the fluorescence of quinine," *Analytical Biochemistry*, vol. 19, no. 2, pp. 374–387, 1967.
- [48] A. N. Fletcher, "Fluorescence emission band shift with wavelength of excitation," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 72, no. 8, pp. 2742–2749, 1968.
- [49] W. C. Galley and R. M. Purkey, "Role of Heterogeneity of the Solvation Site in Electronic Spectra in Solution *," vol. 67, no. 3, pp. 1116–1121, 1970.

- [50] K.-I. Itoh and T. Azumi, "Shift of the emission band upon excitation at the long wavelength absorption edge. II. Importance of the solute-solvent interaction and the solvent reorientation relaxation process," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 62, no. 9, pp. 3431–3438, 1975.
- [51] K. A. Al-Hassan and T. Azumi, "Red edge effect (REE) phenomena of flexible solute molecules as a probe for polymer rigidity and/or free volume.," *Chemical Physics Letters*, vol. 145, no. 1, pp. 49–54, 1988.
- [52] A. P. Demchenko, *Advanced Fluorescence Reporters in Chemistry and Biology II*, vol. 9. Springer Berlin Heidelberg, 2010, pp. 107–132.
- [53] A. P. Demchenko, "The red-edge effects: 30 years of exploration.," *Luminescence*, vol. 17, no. 1, pp. 19–42, 2002.
- [54] B. C. Barja, C. Chesta, T. D. Z. Atvars y P. F. Aramendia, "Relaxations in Poly (vinyl alcohol) and in Poly (vinyl acetate) Detected by Fluorescence Emission of 4-Aminophthalimide and Prodan," pp. 16180–16187, 2005.
- [55] A. Kowski, "Fluorescence Anisotropy: Theory and Applications of Rotational Depolarization," *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 23, no. 6, pp. 459–529, 1993.
- [56] B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 1st ed., vol. 8. Wiley-VCH, 2002.
- [57] A. Dhinojwala, J. C. Hooker y J. M. Torkelson, "Retardation of rotational reorientation dynamics in polymers near the glass transition: a novel study over eleven decades in time using second-order non-linear optics," *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 172–174, pp. 286–296, 1994.
- [58] R. D. Priestley, L. J. Broadbelt, J. M. Torkelson y K. Fukao, "Glass transition and α -relaxation dynamics of thin films of labeled polystyrene," *Physical Review E*, vol. 75, no. 6, p. (61806) 1–10, 2007.
- [59] A. Bartko, K. Xu y R. Dickson, "Three-Dimensional Single Molecule Rotational Diffusion in Glassy State Polymer Films," *Physical Review Letters*, vol. 89, no. 2, p. (026101) 1–4, 2002.
- [60] I. N. Levine, *Fisicoquímica*, 5ta. ed. McGraw-Hill, 2004.
- [61] W. E. Moerner and L. Kador, "Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid," *Physical Review Letters*, vol. 62, no. 21, pp. 2535–2538, 1989.
- [62] A. B. Myers, P. Tchenio y W. E. Moerner, "Dynamics and vibrational spectra of individual molecules in polymer glasses," in *Advanced Optical Methods for Ultrasensitive Detection*, 1995, vol. 2385, no. 1, pp. 103–114.

- [63] E. Barkai, Y. Jung y R. Silbey, “Theory of single-molecule spectroscopy: beyond the ensemble average.,” *Annual Review of Physical Chemistry*, vol. 55, pp. 457–507, 2004.
- [64] W. P. Ambrose and W. E. Moerner, “Fluorescence spectroscopy and spectral diffusion of single impurity molecules in a crystal,” *Nature*, vol. 349, no. 6306, pp. 225–227, 1991.
- [65] A. Casoli and M. Schönhoff, “Fluorescence Correlation Spectroscopy as a Tool to Investigate Single Molecule Probe Dynamics in Thin Polymer Films,” *Biological Chemistry*, vol. 382, no. 3, pp. 363–369, 2005.
- [66] F. Kulzer and M. Orrit, “Single-molecule optics,” *Annual Review of Physical Chemistry*, vol. 55, no. 3, pp. 585–611, 2004.
- [67] W. Denk, J. H. Strickler y W. W. Webb, “Two-photon laser scanning fluorescence microscopy,” *Science*, vol. 248, no. 4951, pp. 73–76, 1990.
- [68] N. S. Claxton, T. J. Fellers y M. W. Davidson, “LASER SCANNING CONFOCAL MICROSCOPY,” *Department of Optical Microscopy and Digital Imaging, National High Magnetic Field Laboratory, Florida State University, Unpublished <http://www.olympusfluoview.com/theory/LSCMIntro.pdf>*, no. 21, p. 37, 1979.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

2.1 INTRODUCCIÓN

Con el fin de estudiar las propiedades espectroscópicas de sondas embebidas en películas poliméricas a nivel de *ensamble* y de *moléculas únicas* es necesario que las películas presenten alta calidad óptica. El estudio de las propiedades de la materia confinada en la escala de los nanómetros requiere de muestras preparadas bajo un exhaustivo control de las dimensiones, rugosidad y homogeneidad. Una técnica aplicada a la preparación de películas poliméricas, tanto en ciencia como en industria, es la de **spin-coating** ya que permite alta reproducibilidad de deposición de

película sobre áreas de diversos tamaños.

En este capítulo se describen los métodos usados para la preparación de muestras a partir de los insumos básicos, así como las técnicas de medición.

2.2 PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS POLIMÉRICAS

2.2.1 Técnica de spin-coating

Esta técnica se basa en esparcir un fluido viscoso en un disco horizontal que rota a gran velocidad (miles de rpm). Durante la deposición del fluido el disco puede estar estático o girando a una baja velocidad angular. Posteriormente, el disco es rápidamente acelerado a una mayor velocidad. En este proceso actúan fuerzas adhesivas en la interfaz polímero/sustrato y fuerzas centrífugas que resultan en un movimiento del fluido hacia los laterales del soporte. Debido a esto parte del líquido es eyectado. Al mismo tiempo, la evaporación del solvente causa un aumento en la concentración del polímero y por lo tanto en la viscosidad, resultando en una disminución del espesor de la película. La técnica permite obtener películas uniformes sobre sustratos planos en una gran área ($\phi \geq 30$ cm) y con la posibilidad de variar el espesor de la película de manera controlable y reproducible [1]. Los parámetros más relevantes a tener en cuenta son:

- Velocidad angular.
- Viscosidad de la solución.

- Concentración de la solución.
- Volatilidad del solvente (“*chilling*”).

Otros parámetros menos influyentes:

- Cantidad de líquido depositada inicialmente.
- Velocidad con la que se lo deposita.
- Tiempo total de giro.
- Aceleración rotacional previa a la inicial.

La concentración de polímero, que cambia la viscosidad de la solución, es el principal factor para tener un control sobre el espesor (ver *Tabla 2.1*). Para asegurar una alta reproducibilidad es necesario controlar posibles corrientes de aire, temperatura y humedad relativa ambiente.

2.2.2 Preparación de películas delgadas

En este trabajo las películas se prepararon por la técnica de spin-coating a partir de soluciones en tolueno (Merck-UVASOL-grado espectroscópico) de cada PAMA.

Para las medidas espectroscópicas se agrega a la solución polimérica el colorante en concentración necesaria según se realicen medidas de *ensamble* de moléculas o de *moléculas únicas*.

Se utilizó un spin-coater marca Laurell WS-400-6NPP. Las condiciones de operación del spin-coater se fijaron en dos pasos. El primero de 5 s a 500 rpm con aceleración 3 (según especificaciones del equipo, AC 3), y el segundo paso de 45 s a 2500 rpm con AC9. 50 μ L de muestra se esparcen uniformemente sobre un cubreobjetos de vidrio (Menzel-Glaser # 1,5) con ayuda de una micropipeta de vidrio. Todo el material de vidrio es previamente tratado según el protocolo del *Apéndice 1.A.1.1*. Variando la concentración de polímero se obtienen distintos espesores (entre 25 nm y 500 nm) como se detalla en la *sección 2.2.4.1*. Las películas obtenidas se mantienen en estufa de vacío a $T > T_g$ entre 15 y 20 h para eliminar el tolueno remanente y tensiones producto de la evaporación rápida del solvente. Luego se enfrían lentamente hasta temperatura ambiente dentro de la estufa. Las muestras se miden dentro del día de preparación.

2.2.3 Preparación de películas de espesor micrométrico

Las películas de 350 μ m de espesor se prepararon por evaporación de solvente en placas de Petri, silanizadas con $\text{Si}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$, a partir de un volumen adecuado de solución de polímero (7 % p/p) y sonda fluorescente en tolueno (*Apéndice 1.A.3*). Se deja evaporar lentamente el solvente bajo campana y el tolueno remanente se extrae en estufa de vacío por 16 h. Al igual que en las películas delgadas, la temperatura de la estufa se ajusta por encima de T_g para permitir al polímero liberar tensiones y borrar la historia térmica previa. De esta forma todas las medidas se realizan en películas en condiciones iniciales similares.

2.2.4 Caracterización de películas delgadas

Las películas obtenidas fueron caracterizadas en el laboratorio de la Dra. Teresa Atvars, en el Instituto de Química, Universidad de Campinas, Sao Paulo, Brasil.

2.4.4.1 Determinación del espesor por Perfilometría

El espesor de las muestras puede determinarse por microscopía de fuerza atómica (AFM) o por Perfilometría. En ambos casos se genera mecánicamente un desnivel desde la superficie del polímero hasta el sustrato. En la perfilometría se mide el movimiento vertical de una punta durante el desplazamiento lineal sobre la muestra a fuerza constante. Mediante el uso de un Perfilómetro (marca Veeco, Dektak 3ST) es posible abarcar una longitud de muestra de 50 μm a 50 mm, y en alto 10 nm a 130 μm , con resolución vertical de 0,1 nm, aplicando fuerzas de barrido entre 1 y 40 mg. En la técnica de AFM la distancia máxima que puede recorrerse es de 150 μm . La perfilometría ofrece una superficie de barrido, velocidad de acercamiento y de medición mayores comparado con AFM. Además con el Perfilómetro es posible medir espesores de hasta 45 mm de alto, en cambio, en el AFM, un cambio abrupto de altura de más de 1 μm puede dañar la punta. Por estos motivos se utilizó la perfilometría para determinar el espesor de las películas de PEMA sobre cubreobjetos de vidrio común y silanizado, los resultados se presentan en la *Tabla 2.1*.

Tabla 2.1: Espesor de las películas obtenidas por spin-coating de soluciones de distinta concentración de PEMA en tolueno sobre cubreobjetos de vidrio común y silanizado. Medidas realizadas por perfilometría (los valores resultan de un promedio sobre 10 mediciones por muestra).

PEMA	Espesor (nm) \pm 5%			
	Concentración % p/p	1500 rpm	2500 rpm	Silanizado 2500 rpm
0,25	–	23	24	
0,50	55	50	52	
1,00	106	99	104	
2,00	–	200	–	
4,00	564	554	–	
5,00		863		

Al comparar los valores de espesor para muestras preparadas sobre vidrio común y silanizado no se observan diferencias significativas. Considerando los estos resultados de la Tabla 2.1, las películas delgadas de 200 nm, 100 nm, 50 nm y 25 nm de espesor se preparan a partir de soluciones de los diferentes PAMA en tolueno de concentración 2,00 % p/p, 1,00 % p/p, 0,50 % p/p y 0,25 % p/p, respectivamente.

2.2.4.2 Microscopía electrónica de barrido

Una vez determinadas las condiciones óptimas para obtener espesores de películas de PAMA controlables y reproducibles se estudiaron, a través de la microscopía electrónica de barrido (SEM), las características de la superficie de las muestras. En la *Figura 2.1.A* se muestra la superficie de una película de 50 nm de espesor de PEMA obtenida sobre un cubreobjeto de vidrio. En ella se observa que el cubrimiento de la zona estudiada es total y homogéneo. Al aumentar la magnificación de 10^4 a 10^5 pueden verse islas generadas debido al tratamiento de recubrimiento de la superficie de la película con una capa de carbono y oro de 10 nm de espesor, *Figura 2.1.B*. Este tratamiento es necesario ya que la potencia del haz de electrones destruye la muestra durante la adquisición de la imagen. Para detectar la presencia de irregularidades superficiales se tomaron imágenes con la muestra inclinada 65° respecto del detector, *Figura 2.1.C*.

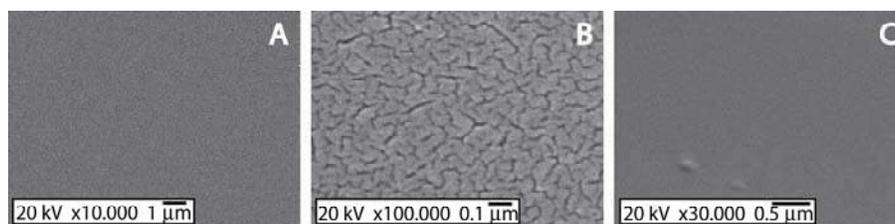


Figura 2.1: Imágenes de SEM de una película de PEMA de 50 nm de espesor obtenida por spin-coating sobre cubreobjeto de vidrio. Cuadros A y B: magnificación $\times 10^4$ y $\times 10^5$, respectivamente. Cuadro C: Imagen tomada con una inclinación de 65° para observar rugosidad.

Estas mediciones se repitieron para películas de PEMA de distinto espesor a distintas magnificaciones. En todos los casos las películas presentan un cubrimiento total y homogéneo de la superficie de vidrio tratada.

2.2.4.3 Microscopía de fuerza atómica

Por microscopía de fuerza atómica se estudió la rugosidad superficial de las películas de PEMA de 50 nm. Las determinaciones se realizaron a fuerza constante (0,852 N) y con una velocidad de barrido de 1,02 Hz. El equipo tiene una distancia de barrido máxima de 20 μm . A distancias de barrido mayores se observan líneas periódicas en la imagen debidas a interferencias que causan resultados artificiales de rugosidad.

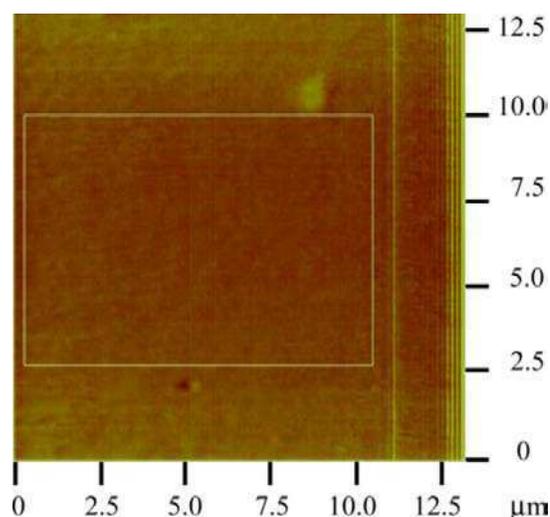


Figura 2.2: Imagen de AFM de una película de PEMA de 50 nm de espesor. El análisis de las imágenes se llevó a cabo con el programa Nanoscope II: área del recuadro seleccionado = 73,29 μm^2 , rugosidad promedio = 1,02 nm del área seleccionado, máxima altura (Rmax)=12,10 nm.

Se realizaron medidas de las películas de PEMA preparadas sobre sustrato de vidrio común y de vidrio silanizado. En ambas muestras se observó una baja rugosidad superficial y una cobertura continua de la película polimérica. En ningún caso se observó evidencia de procesos que generen ruptura de la película (“dewetting”, [2]). Del procesamiento de las imágenes obtenidas (Programa: Nanoscope II), área: $73,29 \mu\text{m}^2$, se obtuvo una rugosidad promedio de 1,02 nm, calculada como el promedio de las desviaciones respecto del plano central (*Figura 2.2*).

Con estos análisis se ha probado que las películas fabricadas por spin-coating pueden obtenerse con un espesor controlado tanto sobre vidrio común como vidrio silanizado. Las películas resultaron estar homogéneamente distribuidas sobre los cubreobjetos de vidrio, con espesor reproducible y rugosidad superficial baja, menor al 2 % respecto del espesor total de la muestra, cuando se observa un área del orden de $70 \mu\text{m}^2$.

2.2.4.4 Espectroscopía Infrarroja

Se adquirieron espectros IR de películas obtenidas por evaporación de soluciones al 5 % p/p en tolueno sobre pastillas de NaBr, *Figura 2.3* en un FTIR Nicolet 8700 20 SXC.

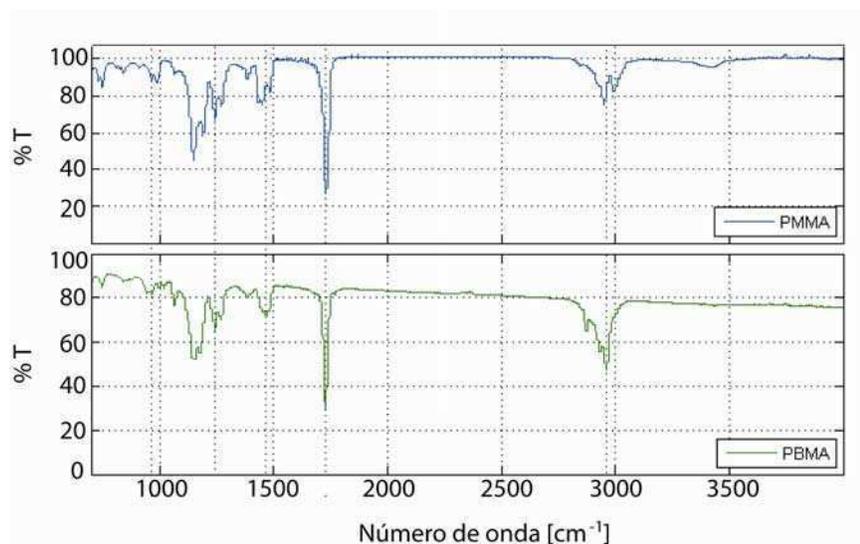


Figura 2.3: Espectro IR de películas de PMMA y PBMA de 1 μm de espesor depositados sobre NaBr.

Las muestras se mantuvieron en estufa de vacío para eliminar el tolueno remanente. Se observaron bandas entre 3000 cm^{-1} y 2800 cm^{-1} características de los PAMA debidas al estiramiento C-H y un pico intenso en 1734 cm^{-1} debido al estiramiento C=O de la cadena lateral [3]. No se observaron bandas alrededor de 3500 cm^{-1} , por lo cual no se espera la presencia de grupos -OH que pudiesen provenir de la hidrólisis del grupo éster.

De la misma forma pero sobre sustratos de vidrio se intentaron tomar espectros de IR de las películas de 100 nm. Sin embargo, la ventana espectral que permite observar el sustrato de vidrio y la baja cantidad de material limitan el análisis. Se adquirió el espectro de IR a 293 K de una muestra de PBMA antes y después de un tratamiento térmico de 30 min a 363 K.

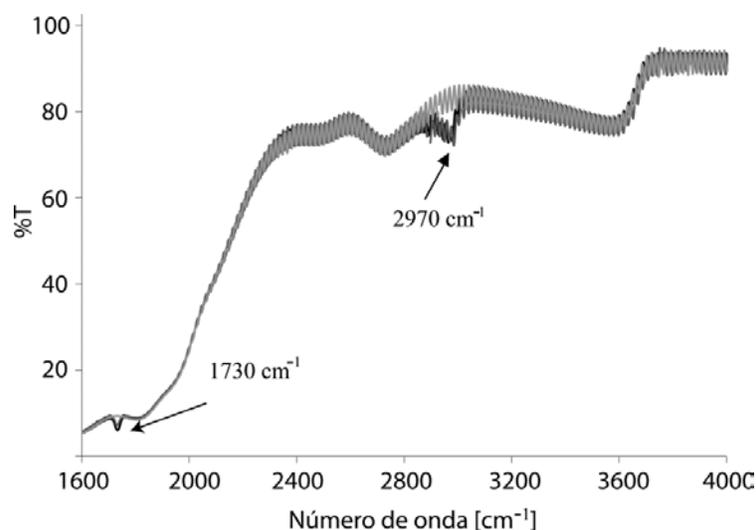
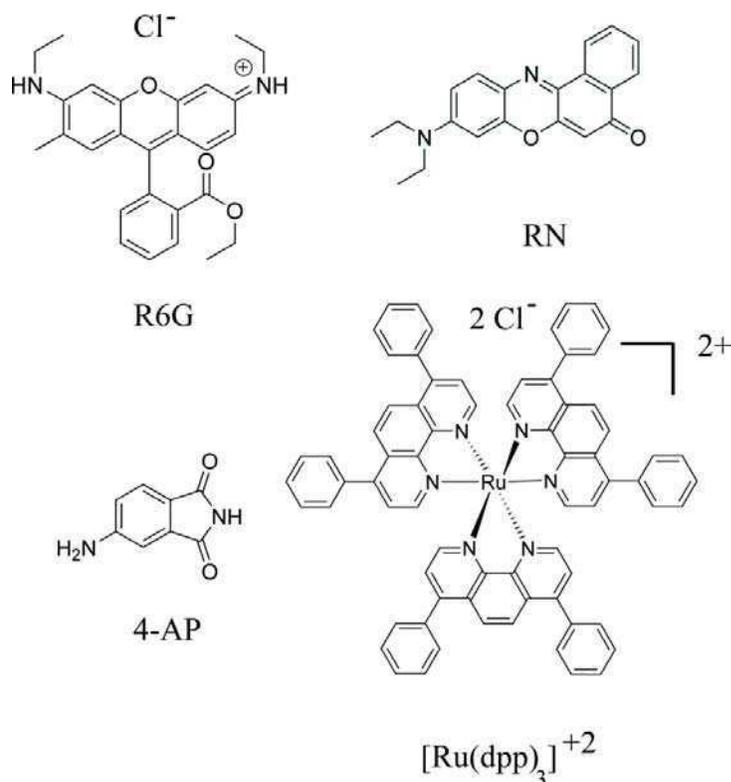


Figura 2.4: Espectro IR de PBMA de 100 nm de espesor sobre sustrato de vidrio. Línea gris: sustrato limpio. Línea negra: PBMA a 298 K. Línea gris oscura: PBMA después de un tratamiento a 363 K durante 30 min.

En la *Figura 2.4* se muestran los resultados, las flechas indican las bandas de estiramiento de C-H de la cadena lateral y de C=O. Si bien la intensidad de las bandas es pequeña debido a la baja cantidad de material, luego del tratamiento térmico no aparecen nuevas bandas, ni corrimientos de las preexistentes. Esto confirma que la película de polímero es estable en las condiciones en que se realizarán algunas medidas espectroscópicas.

2.3 SONDAS FLUORESCENTES

A continuación se detallan las características principales y estructuras de las sondas aplicadas al estudio de la dinámica de las cadenas de polímero, *Esquema 2.1*.



Esquema 2.1: Estructuras de sondas fluorescentes.

Rodamina 6G (R6G): es un colorante xanténico, catiónico, utilizado como colorante Laser. Posee un alto rendimiento cuántico de fluorescencia y estabilidad, lo que permite su aplicación en microscopías de fluorescencia y como trazador biológico [4–7]. Sus propiedades espectroscópicas son similares en solución y en matrices poliméricas, incrementando su estabilidad en estas últimas [8], [9]. La fotofísica de R6G depende de la deslocalización de la carga positiva de los grupos amino en el sistema π del anillo xanténico. Posee un tiempo de vida de estado singlete excitado de 4 ns en agua. Las dimensiones de la sonda estimadas por métodos de mecánica cuántica AM1 son: 13,8 Å×11,5 Å×9,0 Å [10]. El radio de la esfera de Onsager es de

5,6 Å [11]. R6G fue comprado en Aldrich y utilizado sin purificación adicional.

Rojo Nilo (RN): 7-diethylamino-3,4-benzophenoxazine-2-ona. Es una oxazina, neutra e hidrofóbica con un alto rendimiento cuántico de fluorescencia y fotoestabilidad, empleada como colorante Laser. Ha sido ampliamente utilizada para estudiar la polaridad local y microheterogeneidad de zeolitas [12], micelas [13], películas poliméricas [14–16] y como material activo en LEDs de emisión blanca [17]. Presenta características solvatocrómicas que resultan en un corrimiento del espectro de emisión en función de la polaridad del entorno. Este comportamiento se debe a un gran incremento en el momento dipolar del estado excitado respecto del fundamental [18]. Esta diferencia es de aproximadamente 11,6 D, calculada a partir de corrimientos espectrales [19]. Entornos más polares estabilizan mejor el estado excitado de RN, que el fundamental, disminuyendo la energía de emisión. El cambio en el momento dipolar se debe a procesos de TCI [20], [21] desde los grupos dialquilamino al grupo carbonilo [22]. La existencia de un segundo estado emisivo en RN se encuentra actualmente en discusión [23]. El espectro de absorción de RN es poco sensible a la polaridad del polímero. Sin embargo, el espectro de emisión de fluorescencia no es especular con el espectro de absorción. En solventes no polares, RN muestra un espectro de emisión con estructura vibracional parcialmente resuelta. En solventes polares, el ensanchamiento inhomogéneo de las bandas hace desaparecer la estructura vibracional observada en solventes no polares. Esto sugiere que el estado excitado es mucho más sensible a la polaridad del entorno que el fundamental. En solventes no polares el tiempo de vida de fluorescencia es de ~ 4,5 ns [24].

En solventes polares, los procesos de transferencia de carga en ambas direcciones están favorecidos termodinámicamente con una consecuente disminución del rendimiento cuántico de fluorescencia y del tiempo de vida del estado excitado [25]. Esta disminución se observa también en solventes próticos. Las dimensiones de la sonda estimadas por Corey-Pauling-Koltum son: $16,8 \text{ \AA} \times 9,4 \text{ \AA} \times 3,9 \text{ \AA}$ [19]. RN fue comprado en Bio Chemika (Sigma for Fluorescence) y utilizado sin purificación adicional. Se determinó el coeficiente de absorción molar de RN en tolueno a 521 nm resultando $(3,5 \times 10^4 \pm 0,1 \times 10^4) \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Este valor es cercano al informado en otros solventes como 1,4-dioxano, $\epsilon = 3,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [26], en metanol, $\epsilon = 4,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [27].

4-Aminofталimida (4-AP): Es una sonda fluorescente altamente sensible a la polaridad del medio y sobre todo a la capacidad donora de uniones puente hidrógeno del mismo. La energía del máximo de emisión de fluorescencia, la intensidad del espectro y el tiempo de vida se ven afectados. Por ejemplo, el rendimiento cuántico de fluorescencia disminuye drásticamente en entornos polares y especialmente en los próticos. Esta sensibilidad se debe al proceso de TCI entre el grupo amino y el carbonilo. Tiene un tiempo de vida de 15 ns en tolueno [28] y 18 ns en PAMA [29], lo cual incrementa la ventana temporal para observar procesos que ocurren en el estado excitado comparado con R6G y RN, siendo una sonda ideal para estudiar los procesos de relajación de entornos. Presenta un gran corrimiento de Stokes.

Ru (II) batofenantrolina ($[Ru(dpp)_3]^{+2}$): Rutenio (II) tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina). La espectroscopía de este complejo octaédrico está

dominada por la transferencia de carga metal ligando (TCML), que involucra el pasaje de un electrón del orbital d del metal a un orbital π^* del ligando. Presenta una gran diferencia práctica entre la excitación y la emisión debido a que ésta tiene carácter de fosforescencia desde un estado formalmente triplete excitado con un tiempo de vida largo $\sim \mu\text{s}$ [30], [31]. Debido a esta característica, ha sido utilizado como sensor de oxígeno por desactivación de la luminiscencia [32], [33]. $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]^{+2}$ fue comprado a G. Frederik Smith Chemical y se lo utilizó sin purificación adicional.

2.3.1 Concentración de sonda

Las películas poliméricas se preparan según se detalla de la *sección 2.2.2*. La concentración de sonda utilizada depende del tipo de experimento a realizar. En los *Capítulos 3 y 4* se presentan resultados de medidas adquiridas de ensamble realizadas en un espectrofluorímetro. Se probaron muestras con 4-AP, R6G, RN y $\text{Ru}(\text{Bph})_3^{2-}$.

La mínima intensidad de fluorescencia de R6G y RN, que puede medirse en el fluorímetro en las películas poliméricas, se obtiene para una concentración de 2×10^{-5} mol de colorante/kg polímero en películas de 25 nm de espesor, teniendo en cuenta el uso de polarizadores para las medidas de anisotropía. A esta concentración la distancia promedio entre moléculas de colorante es de 200 nm. La transferencia de energía (TE) de tipo Förster entre moléculas de colorante despolariza la emisión y afecta las medidas espectroscópicas. A partir de la ecuación *Ec. 2.1* se calcula la eficiencia de transferencia de energía, Φ_{TE} , para la distancia promedio entre moléculas:

$$\Phi_{ET} = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad \text{Ec. 2.1}$$

donde para R6G, $R_0=5$ nm, distancia crítica de transferencia entre dador y aceptor, [4]. En estas condiciones la TE es despreciable.

2.4 TECNICAS APLICADAS A MEDIDAS DE ENSAMBLE EN ESPECTROFLUORÍMETRO

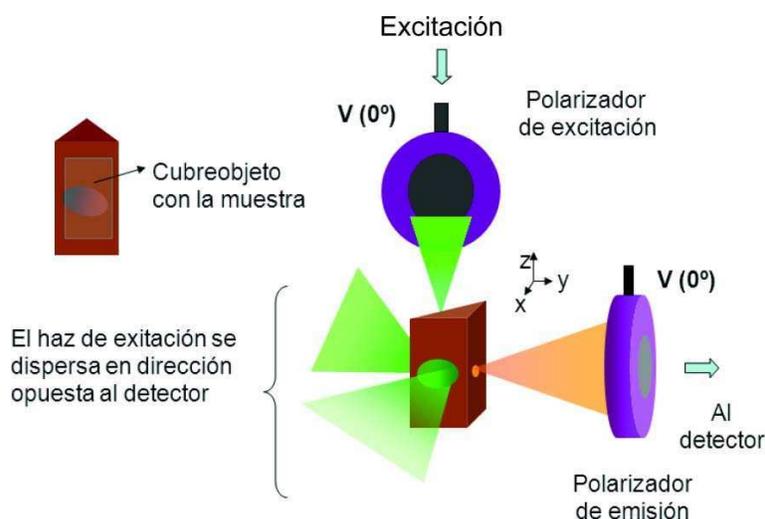
2.4.1 Excitación en el flanco rojo del espectro de excitación/absorción

Para estudiar el efecto de la excitación de la sonda en el flanco rojo del espectro de absorción/excitación se colectó la fluorescencia de las muestras en un espectrofluorímetro PTI-Quantmaster. Se adquieren los espectros de emisión variando la longitud de onda de excitación (λ_{exc}) en un intervalo adecuado. La cota inferior del intervalo de excitación en experiencias de este tipo, corresponde habitualmente a la longitud de onda del máximo del espectro de excitación. Normalmente no se observa cambio en el espectro de emisión al excitar el flanco azul del espectro de excitación. La cota superior del intervalo corresponde al máximo valor de λ_{exc} al que se puede coleccionar el espectro de emisión de fluorescencia con una buena relación señal a ruido (operativamente en este equipo se tomó $I_F^{max} > 1 \times 10^4$ cuentas). La longitud del intervalo depende del corrimiento de Stokes de la sonda en la matriz. Cuanto mayor es este corrimiento, mayor es el intervalo de λ_{exc} accesible experimentalmente. La magnitud del efecto de REE para RN en películas de PAMA se mide como la diferencia entre

la posición de los respectivos máximos de emisión cuando la muestra se excita a 540 nm y a 480 nm, según la *Ec. 1.6* en el *Capítulo 1*.

2.4.2 Anisotropía de fluorescencia

La sonda confinada en una caja de solvente esta sujeta a interacciones con el entorno cercano. Las reorientaciones en la caja pueden estudiarse a través de la anisotropía de fluorescencia.



Esquema 2.2: Esquema para la determinación de la anisotropía de emisión de fluorescencia adaptable a un fluorímetro convencional. Sistema de medición: porta muestra y polarizadores. Es posible rotar la posición del eje de cada polarizador para obtener las componentes de la emisión horizontal y verticalmente polarizadas, y el factor de corrección G .

Las medidas de anisotropía se llevaron a cabo en un espectrofluorímetro PTI-Quantmaster. En un soporte adecuado se coloca

un polarizador de película de polímero con un mecanismo que permite girarlo de manera tal que se puede orientar el eje del polarizador perpendicular o paralelamente con respecto al plano de incidencia. En la detección se coloca un segundo polarizador con el mismo sistema de referencia, *Esquema 2.2*.

Para la medida de anisotropía se excita la muestra con luz linealmente polarizada y se colecta la emisión a distintas posiciones de los polarizadores. Con el polarizador de excitación en posición vertical (0°) y el de emisión en posición vertical (0°) el espectro obtenido corresponde a la componente verticalmente polarizada de la emisión, I_{VV} . Luego el polarizador de emisión se coloca en posición horizontal (90°) y se colecta la componente horizontalmente polarizada, I_{HV} . Debido a que el sistema de detección tiene diferente sensibilidad a la luz vertical y horizontalmente polarizada, es necesario determinar el factor de corrección de sensibilidad, $G(\lambda)$. Esto se logra aprovechando la simetría cilíndrica de la excitación de una muestra isotrópica con luz polarizada en el plano de incidencia (horizontal). En este caso, cuando la detección se realiza a 90° de la excitación (configuración habitual), I_{HH} e I_{HV} son iguales por simetría y las diferencias en la medida se deben a la sensibilidad diferente del canal de detección.

$$G(\lambda) = \frac{I_{HV}(\lambda)}{I_{HH}(\lambda)} \quad \text{Ec. 2.2}$$

A partir de estos 4 espectros se calcula $r(\lambda)$ donde, por la simetría del sistema, $I_{VH}=I_{\text{per}}$ e $I_{VV}=I_{\text{par}}$ según:

$$r(\lambda) = \frac{I_{\text{par}}(\lambda) - G(\lambda)I_{\text{per}}(\lambda)}{I_{\text{par}}(\lambda) + 2G(\lambda)I_{\text{per}}(\lambda)} \quad \text{Ec. 2.3}$$

Debido a que el espesor de las muestras es muy pequeño es fundamental encontrar condiciones de medición en las que se pueda obtener la mejor relación señal a ruido. Para esto se desarrolló un protocolo de medición para minimizar la dispersión de luz de excitación que pudiese llegar al detector y maximizar la colección de la fluorescencia. La muestra se ubica entre dos soportes de bronce cada uno con 2 orificios perpendiculares entre sí, de manera que la luz dispersa esté direccionada opuesta al detector (configuración *back face*) y que la transmitida no sea reflejada por las paredes del soporte. De esta forma la mayor parte de la luz que llega al detector es debida a la fluorescencia del colorante. Para mejorar la relación señal a ruido se utilizaron filtros ubicados entre el polarizador de emisión y el sistema de detección. Esto elimina la luz proveniente de la excitación que pudiese llegar al detector. El soporte para muestra tiene un ángulo respecto del haz de excitación de 30° y la emisión se registra a 90°. El ángulo de 30° se elige para minimizar la luz reflejada que llega al detector y maximizar el ángulo sólido de colección de luz emitida.

2.4.3 Control de la temperatura en experimentos de REE y de anisotropía

Para estudiar la dependencia de la anisotropía y de REE con la temperatura se adaptó al sistema de medición un porta cubeta de bronce

dentro de un recipiente provisto de una camisa para circulación de agua de un baño termostatzado. La temperatura sobre la película de polímero se determinó con una resistencia calibrada de platino para superficies (Pt100, modelo RS). La máxima temperatura alcanzable es de 90 °C debido a la composición del líquido del baño termostático (glicerol + agua), las pérdidas de energía en forma de calor y la estabilidad mecánica del sistema de flujo.

2.5 MICROSCOPIAS ÓPTICAS

En esta tesis se utilizaron dos técnicas básicas de microscopía: confocal y de campo amplio.

En general, el límite de detección de las medidas de fluorescencia depende de las características espectroscópicas de las moléculas fluorescentes, de la intensidad y estabilidad de la fuente de excitación (Laser), la eficiencia en la colección de la luz de emisión, la colección de luz espuria y la sensibilidad del detector.

La microscopía de campo amplio tiene la ventaja, con respecto al arreglo confocal, de la adquisición simultánea de eventos que ocurren en distintas zonas de la muestra, pero el tiempo mínimo de lectura de estos eventos esta limitado a 4 ms por el sistema de detección, que es generalmente una cámara CCD¹ (Dispositivos acoplados a Carga). La cámara CCD consiste en un arreglo en dos dimensiones de una gran cantidad de sensores de luz sobre un sustrato de silicio delgado. La unidad

¹ Del inglés Charge-coupled Device

de sensado es un capacitor de oxido metálico semiconductor (MOS) que actúa como fotodiodo y como sistema de almacenamiento de carga.

En la microscopía confocal se enfoca el haz de excitación sobre la muestra al límite de difracción, aumentando la densidad fotónica respecto del sistema de campo amplio. El sistema de detección, altamente sensible, de Fotodiodos de Avalancha, APDs, posibilita registrar los fotones de a uno en un tiempo de integración de 0,1 μ s.

En ambas técnicas cuando se desea estudiar el comportamiento de las moléculas individualmente es necesario asegurar la presencia de una única molécula en el mínimo volumen discernible. Este está limitado en el microscopio confocal por el límite de difracción y el diafragma confocal, típicamente a 1 fL. En campo amplio está limitado por la difracción de un círculo de diámetro del orden de la longitud de onda de excitación. Para evitar el conglomerado de moléculas, la concentración de la muestra debe ser muy baja (\sim nM). Teniendo en cuenta que la señal medida proviene de los fotones emitidos por la sonda fluorescente, para maximizar la relación señal a ruido es necesario seleccionar moléculas fluorescentes con un alto rendimiento cuántico de fluorescencia y solventes o matrices con una baja cantidad de impurezas. Gran parte de la luz espuria que llega al detector proviene de la dispersión elástica de la fuente de excitación (Rayleigh) y de la dispersión Raman del soporte, solvente o matriz. La selección de filtros de excitación y emisión adecuados minimiza esta fuente de ruido de fondo.

2.5.1 Microscopía confocal

Esta técnica de microscopía se basa principalmente en eliminar la

fluorescencia proveniente de planos fuera del plano focal. Para esto una fuente de luz es reflejada por un espejo dicroico, y es enfocada sobre la muestra al límite de difracción, según la ecuación de Ernst K. Abbe (1873):

$$d = \frac{\lambda}{2NA} \quad \text{Ec. 2.4}$$

donde d es el diámetro del haz enfocado y λ la longitud de onda de la luz incidente. La luz es enfocada a través de un objetivo de apertura numérica, NA , (donde $NA = n \sin \theta_c$, n es el índice de refracción y θ_c es la mitad del ángulo del cono de luz que sale o entra del objetivo). Con un objetivo de NA alta se colecta más luz y se tiene mayor poder de resolución que con uno de NA baja. La fluorescencia es colectada por el mismo objetivo (sistema de epi-iluminación), transmitida por el espejo dicroico y seleccionada por los filtros de fluorescencia. El espejo dicroico refleja la luz de excitación y transmite la luz de emisión de fluorescencia, que está corrida hacia mayores longitudes de onda que la de excitación. Como el bloqueo del haz de excitación por parte del espejo dicroico no es tan eficiente (generalmente OD3, 3 ordenes de magnitud) se necesitan filtros adicionales. Por ejemplo, los filtros pasabanda que se adaptan a las propiedades de emisión del fluoróforo asegurando que solo llegue al detector la emisión proveniente del intervalo de longitudes de onda donde emite la sonda.

Para limitar el volumen de detección en la dirección axial, se introduce un estenopo (*pinhole*, $\emptyset_{\text{diametro}} \sim 30 \mu\text{m}$) en el plano focal, bloqueando la luz proveniente de otros planos, incrementándose ampliamente el contraste. El estenopo actúa como un filtro espacial y solo

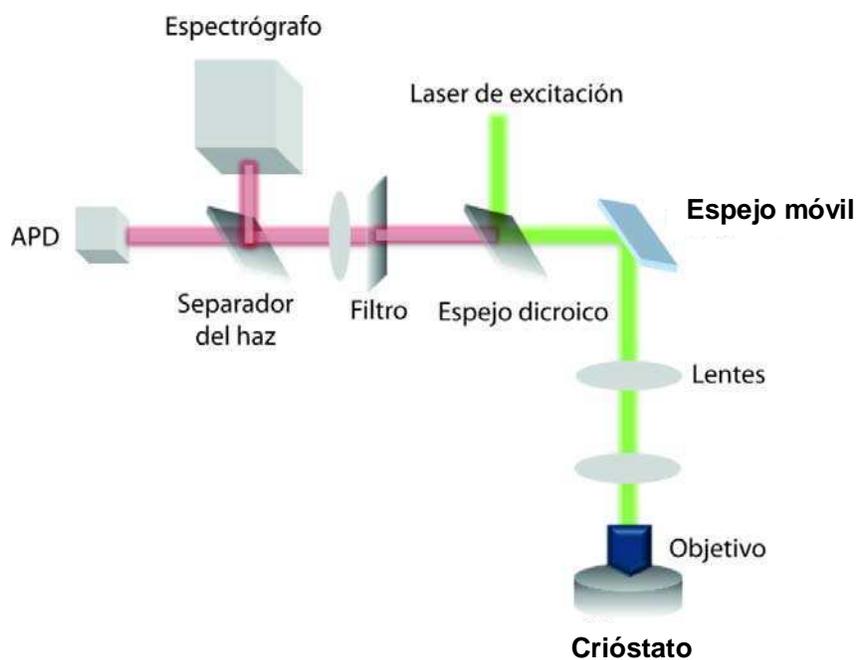
la luz que está dentro de este plano puede ser detectada. De esta forma el volumen de observación resultante ($\sim 1\text{fL}$) es mucho menor al excitado. Mediante esta técnica se obtiene una alta resolución temporal, que es normalmente limitada por el sistema de adquisición de datos. Una de las ventajas principales de la microscopía confocal es la posibilidad de realizar seccionados ópticos de entre 0,5 y 1,5 μm a diferentes alturas en un intervalo de hasta 50 μm . Sin embargo solo una pequeña porción de la muestra puede analizarse a la vez.

El sistema puede adaptarse para la detección de las polarizaciones perpendiculares y paralelas de la emisión. Para ello, se ubica un cubo divisor de dos estados de polarización del haz antes de los detectores.

2.5.1.1 Adquisición de espectros de moléculas únicas

En este trabajo se utilizó un microscopio confocal para la detección de espectros de emisión de moléculas individuales, *Capítulo 3*. El equipo fue montado en el laboratorio del Dr. Christian von Borczyskowski, OSMP Group, TU-Chmenitz, Alemania. Este consiste en una fuente Láser continua, 488 nm (Innova 70C Spectrum, Coherent) linealmente polarizada, que se enfoca sobre la muestra con un objetivo (Zeiss LD PLAN-NEOFLUAR 63X/ NA:0,75 Korr, inmersión en aire) excitando la sonda fluorescente, *Esquema 2.3*. Los fotones emitidos por la sonda son colectados por el mismo objetivo y enfocados sobre dos detectores: un APD (Perkin Elmer) y un espectrómetro (300 líneas/nm, resolución: $2,3 \pm 0,2$ nm, Acton Research Corporation SpectraPro 275) acoplado a un arreglo CCD unidimensional (Princeton instruments, ST-121). Con el APD se sigue la intensidad de emisión en función del tiempo. De esta forma es

posible detectar la ubicación de moléculas en la muestra. Mediante el espectrografo se colectan los espectros de emisión en dichas ubicaciones. Debido a que el volumen observado es muy pequeño y a que la sonda se encuentra relativamente fija en la matriz, la muestra se barre colocando un espejo móvil (Newport) en la excitación que permite el recorrido del laser para estudiar distintas zonas. Así se recorre la muestra por líneas obteniéndose un mapa de la posición de las moléculas. Luego se selecciona una de las moléculas, a la cual se toma el espectro de emisión de fluorescencia, posicionando el haz con el espejo. Para el control de la temperatura se acopla al sistema un criostato para microscopio (Janis ST500-H). Para minimizar el fotoblanqueo de la sonda las medidas se realizan a una presión de 10^{-5} mbar. El objetivo utilizado tiene un comando que corrige aberraciones ópticas debidas al espesor de la ventana del criostato.



Esquema 2.3: Esquema del microscopio confocal para detección de espectros de moléculas únicas.

Los espectros adquiridos se corrigieron por la sensibilidad del espectrógrafo a las distintas longitudes de onda con el factor de corrección de la *Figura 2.5*.

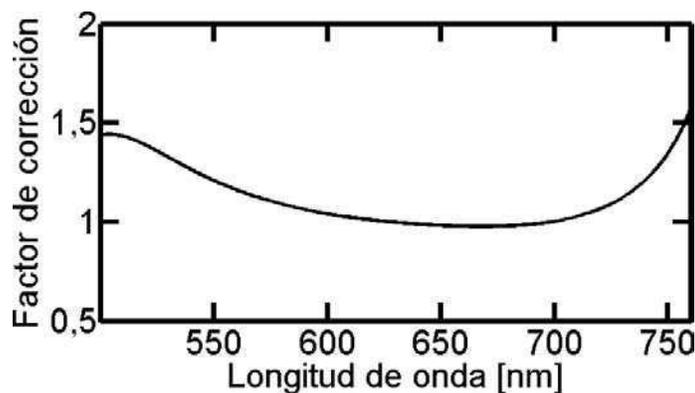


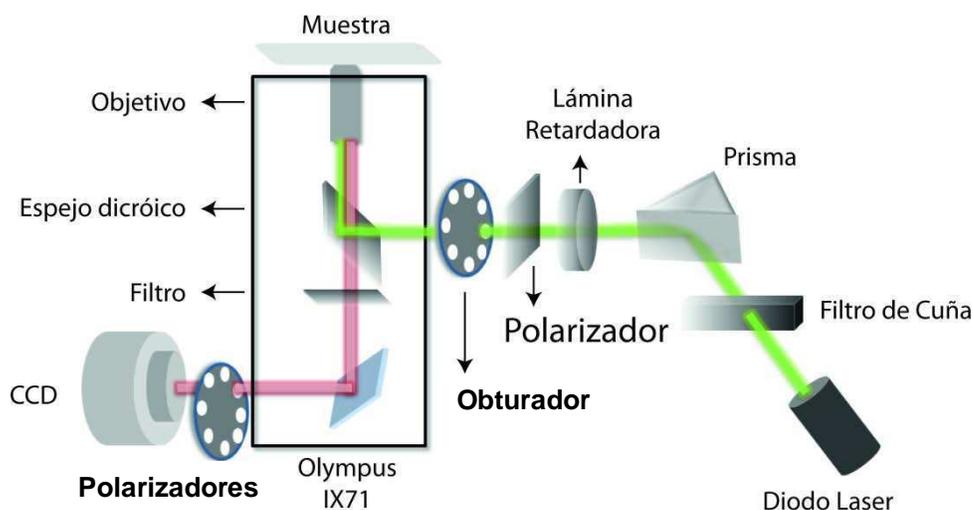
Figura 2.5: Factor de corrección debido a la diferencia de sensibilidad del espectrógrafo a las distintas longitudes de onda.

2.5.2 Microscopía de campo amplio

El equipo utilizado para esta técnica consta de un microscopio de epi-fluorescencia invertido. En este arreglo se ilumina un área de varios micrones en ambas direcciones con un laser colimado. El haz de excitación llega a la muestra luego de ser reflejado por un espejo dicroico. La fluorescencia emitida es enfocada sobre una cámara CCD. Esta técnica ha sido exitosamente aplicada para determinar difusión rotacional, mostrando diferentes regímenes de relajación del polímero así como cambios rápidos en los entornos [34].

Esta técnica se utilizó en el *Capítulo 4* para dos tipos de experimentos dependientes de la concentración de colorante. Uno a nivel

de moléculas únicas y el otro a nivel de ensamble. Las características específicas de cada experimento se detallan en la sección experimental del capítulo.



Esquema 2.4: Microscopio de campo amplio.

El equipo está compuesto por un microscopio Olympus IX71 (Esquema 2.4). Se utiliza un objetivo de inmersión en aceite Olympus PLAN APO N 60x, $NA=1,42$. El haz de excitación proveniente de un diodo Láser (SDL-532-200T, Shanghai Dream Lasers Technology Co., Beam Mode: TEM_{00}) de 532 nm, es atenuado por un filtro neutro de cuña y redireccionado con un prisma hacia la entrada del microscopio. En este camino óptico se controla la polarización del haz con un polarizador y una lamina retardadora de cuarto de onda. Es necesario incluir la lámina retardadora ya que el espejo dicróico dentro del cuerpo del microscopio cambia la fase del haz de excitación cuando este es reflejado y redireccionado hacia la muestra. Este efecto en la transmisión se corrige

cuando se aplica la corrección por el factor G en la determinación de la anisotropía de fluorescencia. El sistema de filtros y espejo dicróico se monta en un cubo comercial.

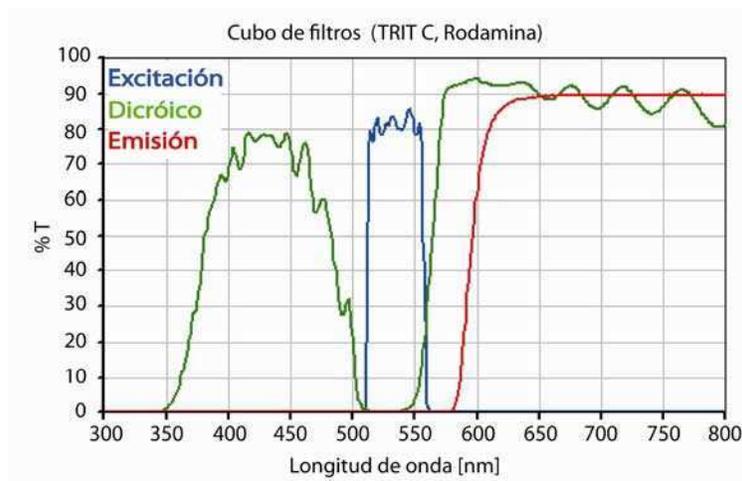


Figura 2.6: Espectros de transmisión del sistema de filtros y espejo dicróico utilizado en el microscopio de campo amplio para la detección de moléculas únicas y de ensamble de RN embebido en películas delgadas de PAMA de 25 y 200 nm de espesor. Línea verde: Espejo dicróico, línea azul: filtro de excitación y línea roja: filtro de emisión.

Los espectros de transmisión de estos elementos ópticos se muestran en la *Figura 2.6*. A la salida del microscopio se coloca una rueda de filtros con dos polarizadores de lámina en posiciones contiguas y orientados perpendicular y paralelo al haz de excitación. Con estos se determinan las componentes de la emisión paralela y perpendicular al haz de excitación. La rueda demora 150 ms para desplazarse entre posiciones contiguas y es este el factor limitante en el tiempo de adquisición de imágenes sucesivas. Finalmente la emisión se detecta con una cámara EM-CCD Andor iXon-885 con 1004×1002 pixels activos de $8 \times 8 \mu\text{m}$ de tamaño. En las condiciones experimentales descritas el tamaño de píxel corresponde a un tamaño de muestra sobre la platina de $0,13 \mu\text{m}$.

2.6 REFERENCIAS

- [1] K. Norrman, A. Ghanbari-Siahkali y N. B. Larsen, "Studies of spin-coated polymer films," *Annual Reports Section "C" (Physical Chemistry)*, vol. 101, p. 174, 2005.
- [2] G. Reiter, "Dewetting of thin polymer films," *Physical Review Letters*, vol. 68, no. 1, pp. 75–78, 1992.
- [3] N. P. G. Roeges, *A guide to the complete interpretation of infrared spectra of organic structures*. New York: Wiley, 1994, p. 340.
- [4] R. Zondervan, F. Kulzer, S. B. Orlinskii y M. Orrit, "Photoblinking of Rhodamine 6G in Poly (vinyl alcohol): Radical Dark State Formed through the Triplet," *Journal of Physical Chemistry A*, vol. 107, pp. 6770–6776, 2003.
- [5] R. Zondervan, F. Kulzer, M. A. Kol y M. Orrit, "Photobleaching of Rhodamine 6G in Poly (vinyl alcohol) at the Ensemble and Single-Molecule Levels," *Journal of Physical Chemistry A*, vol. 108, pp. 1657–1665, 2004.
- [6] W. E. Moerner y D. P. Fromm, "Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy," *Review of Scientific Instruments*, vol. 74, no. 8, pp. 3597–3619, 2003.
- [7] M. Kumbhakar, S. Nath, T. Mukherjee, J. P. Mittal y H. Pal, "Single-molecule detection in exploring nanoenvironments: an overview," *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, vol. 5, no. 2, pp. 113–137, 2004.
- [8] R. Reisfeld, R. Zusman, Y. Cohen y M. Eyal, "The spectroscopic behaviour of rhodamine 6G in polar and non-polar solvents and in thin glass and PMMA films," *Chemical Physics Letters*, vol. 147, no. 2–3, pp. 142–147, 1988.
- [9] G. S. S. Saini, S. Kaur, S. K. Tripathi, C. G. Mahajan, H. H. Thanga y A. L. Verma, "Spectroscopic studies of rhodamine 6G dispersed in polymethylcyanoacrylate," *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 61, no. 4, pp. 653–658, 2005.
- [10] F. Lopezarbeloa, V. Martinez, T. Arbeloa y I. Lopezarbeloa, "Photoresponse and anisotropy of rhodamine dye intercalated in ordered clay layered films," *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, vol. 8, no. 2, pp. 85–108, 2007.
- [11] G. Porter, P. J. Sadkowski y C. J. Tredwell, "Picosecond rotational diffusion in kinetic and steady state fluorescence spectroscopy," *Chemical Physics Letters*, vol. 49, no. 3, pp. 416–420, 1977.

- [12] S. Uppili, K. J. Thomas, E. M. Crompton y V. Ramamurthy, "Probing Zeolites with Organic Molecules: Supercages of X and Y Zeolites Are Superpolar," *Langmuir*, vol. 16, pp. 265–274, 2000.
- [13] N. C. Maiti, M. M. G. Krishna, P. J. Britto y N. Periasamy, "Fluorescence Dynamics of Dye Probes in Micelles," *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 101, no. 51, pp. 11051–11060, 1997.
- [14] Y. Hou, A. M. Bardo, C. Martinez y D. a. Higgins, "Characterization of Molecular Scale Environments in Polymer Films by Single Molecule Spectroscopy," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 104, no. 2, pp. 212–219, 2000.
- [15] H. Kim, N. Song, T. Park y M. Yoon, "Laser scanning confocal microscope (LSCM)-fluorescence spectral properties of Nile Red embedded in polystyrene film of different thickness," *Chemical Physics Letters*, vol. 432, no. 1–3, pp. 200–204, 2006.
- [16] A.-Y. Jee, S. Park, H. Kwon y M. Lee, "Excited state dynamics of Nile Red in polymers," *Chemical Physics Letters*, vol. 477, no. 1–3, pp. 112–115, 2009.
- [17] J. Kido, M. Kimura y K. Nagai, "Multilayer white light-emitting organic electroluminescent device.," *Science*, vol. 267, no. 5202, pp. 1332–1334, 1995.
- [18] A. Kawski, P. Bojarski y B. Kukliński, "Estimation of ground- and excited-state dipole moments of Nile Red dye from solvatochromic effect on absorption and fluorescence spectra," *Chemical Physics Letters*, vol. 463, no. 4–6, pp. 410–412, 2008.
- [19] G. B. Dutt, S. Doraiswamy, N. Periasamy y B. Venkataraman, "Rotational reorientation dynamics of polar dye molecular probes by picosecond laser spectroscopic technique," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 93, no. 12, p. 8498, 1990.
- [20] C. A. Guido, B. Mennucci, D. Jacquemin y C. Adamo, "Planar vs. twisted intramolecular charge transfer mechanism in Nile Red: new hints from theory.," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 12, no. 28, pp. 8016–8023, 2010.
- [21] N. Ghoneim, "Photophysics of Nile red in solution: steady state spectroscopy.," *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 56, no. 5, pp. 1003–1010, 2000.
- [22] A. P. Demchenko, Y. Mély, G. Duportail y A. S. Klymchenko, "Monitoring Biophysical Properties of Lipid Membranes by Environment-Sensitive Fluorescent Probes," *Biophysical Journal*, vol. 96, no. 9, pp. 3461–3470, 2009.
- [23] P. Owen Tuck, R. Christopher Mawhinney y M. Rappon, "An ab initio and TD-DFT study of solvent effect contributions to the electronic spectrum of Nile Red," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 11, no. 22, pp. 4471–4480, 2009.

- [24] A. Cser, K. Nagy y L. Biczók, "Fluorescence lifetime of Nile Red as a probe for the hydrogen bonding strength with its microenvironment," *Chemical Physics Letters*, vol. 360, no. 5–6, pp. 473–478, 2002.
- [25] A. K. Dutta, K. Kamada y K. Ohta, "Spectroscopic studies of Nile Red in organic solvents and polymers," *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 93, no. 1, pp. 57–64, 1996.
- [26] M. M. y H. B. H. Davis, "Titrimetric and equilibrium studies using indicators related to Nile Blue A," *Analytical Chemistry*, vol. 38, pp. 451–461, 1966.
- [27] R. P. Haugland, "Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals," *Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA*, vol. 6th ed., 1996.
- [28] G. Saroja y A. Samanta, "Photophysical studies on a fluorescence probe labelled fatty acid: chain folding in a micellar environment," *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, vol. 92, no. 15, pp. 2697–2701, 1996.
- [29] B. C. Barja, C. Chesta, T. D. Z. Atvars y P. F. Aramendia, "Relaxations in Poly (vinyl alcohol) and in Poly (vinyl acetate) Detected by Fluorescence Emission of 4-Aminophthalimide and Prodan," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 109, no. 33, pp. 16180–16187, 2005.
- [30] A. Mills, "Controlling the sensitivity of optical oxygen sensors," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 51, no. 1–3, pp. 60–68, 1998.
- [31] K. Mongey, J. G. Vos, B. D. Macraith y C. M. McDonagh, "b," *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, vol. 8, pp. 979–983, 1997.
- [32] A. M. Morin, W. Xu, J. N. Demas y B. A. DeGraff, "Oxygen Sensors Based on a Quenching of Tris-(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)ruthenium(II) in Fluorinated Polymers," *Journal of Fluorescence*, vol. 10, no. 1, pp. 7–12, 2000.
- [33] M. L. Bossi, M. E. Daraio y P. F. Aramendía, "Luminescence quenching of Ru(II) complexes in polydimethylsiloxane sensors for oxygen," *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 120, no. 1, pp. 15–21, 1999.
- [34] H. Uji-i, S. M. Melnikov, A. Deres, G. Bergamini, F. De Schryver, A. Herrmann, K. Müllen, J. Enderlein y J. Hofkens, "Visualizing spatial and temporal heterogeneity of single molecule rotational diffusion in a glassy polymer by defocused wide-field imaging," *Polymer*, vol. 47, no. 7, pp. 2511–2518, 2006.

CAPÍTULO 3

DINÁMICA ESPECTRAL DE ENSAMBLE Y MOLÉCULAS ÚNICAS

3.1 INTRODUCCIÓN

En este capítulo se describen los estudios espectroscópicos del comportamiento con la temperatura de las películas poliméricas delgadas de diferente espesor a escala nanométrica. Para esto, se abordó el problema desde dos puntos de vista diferentes y complementarios. Por medio de la adquisición del espectro de fluorescencia del conjunto de moléculas de colorante (*ensamble*), es posible obtener una idea general del comportamiento del polímero en diferentes condiciones y analizar la dinámica y polaridad de los entornos. Por otro lado, cuando se estudian

sistemas a nivel de *moléculas únicas* se evidencian eventos que se encontraban ocultos en el promedio.

En particular, se analiza el comportamiento espectral de la sonda Rojo Nilo en matrices de PAMA a partir de medidas de: *ensamble* y de *moléculas únicas*:

- 1) Los espectros del *ensamble* de moléculas de colorante se adquirieron con un espectrofluorímetro, y a partir de estos se estudió el solvatocromismo y el efecto de excitación en el flanco rojo del espectro de excitación (REE), y la dependencia de ambos fenómenos con la temperatura. Se estudiaron películas de PMMA, PEMA, PPMA y PBMA, de 25 nm a 350 μm de espesor.
- 2) Los espectros de *moléculas únicas* se midieron por la técnica de microscopía confocal modificada para la detección de espectros de emisión [1], [2]. Debido a que las moléculas de colorante están relativamente fijas en la matriz polimérica los cambios en el espectro y en la intensidad de fluorescencia están relacionados con procesos de parpadeo (*blinking*), rotación molecular y cambio en las interacciones molécula-entorno [3]. Estos cambios son importantes para entender la dinámica de cadenas poliméricas. PBMA y PPMA se estudiaron por debajo y por encima de T_g . El comportamiento dinámico de los espectros se estudió por medio de la función de distribución acumulada complementaria (FDAC) de las diferencias de energía entre espectros sucesivos y el tiempo de residencia. Los experimentos fueron realizados durante dos estadías de 2 meses cada una, en el laboratorio del Prof. Dr.

Christian von Borczyskowski, junto con la Dra. Daniela Täuber y la colaboración del Dipl.-Phys. Stefan Krause, Grupo de Espectroscopía Óptica y Física Molecular del Instituto de Física de la Universidad Técnica de Chemnitz, Alemania (OSMP, TŪChemnitz).

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Espectros de ensamble

3.2.1.1 Preparación de muestras

Se obtuvieron películas de espesor nanométrico (25–200 nm) y micrométrico (350 μm) a partir de soluciones de polímero en tolueno (Aldrich, grado espectroscópico) con RN en concentración 10^{-5} – 10^{-3} mol de RN/kg de polímero sobre cubreobjetos de vidrio limpios según las condiciones de preparación explicadas en el *Capítulo 2*, en las *secciones 2.2.2-3 y 2.3.1* y el *Apéndice 1.A.1.1*.

3.2.1.2 Adquisición de espectros

Los espectros de emisión y excitación del fluoróforo embebido en la matriz polimérica se adquirieron con un espectrofluorímetro PTI–Quantamaster. Antes de cada medición la muestra se mantuvo a la temperatura de trabajo por 20 min. Debido a las limitaciones en la

concentración máxima de colorante que puede utilizarse, se colocaron en el porta-cubeta dos muestras iguales, con la superficie del cubreobjetos en contacto entre sí, para incrementar la señal. De esta forma se aumenta al doble la intensidad colectada. Para evitar la condensación de agua sobre las muestras se adquirieron los espectros en atmósfera de N₂ seco. REE se determinó excitando las muestras en el flanco rojo del espectro de excitación como se detalló en la *sección 2.4.1* y *sección 1.2.3.3*. Para RN, λ_{exc} se varió entre 490 nm y 540 nm, en intervalos de 10 nm.

3.2.1.3 Corrección y ajuste de espectros

Los espectros obtenidos con intensidad de fluorescencia menor a 1×10^5 cuentas/s son apreciablemente afectados por la dispersión de la luz de excitación. La dispersión Rayleigh (dispersión elástica) genera un ensanchamiento aparente del espectro de emisión y un desplazamiento del máximo hacia mayores energías. Este efecto puede ser minimizado restando al espectro de emisión, el espectro correspondiente a la dispersión generada por una muestra sin colorante adquirido en las mismas condiciones. La curva de dispersión obtenida en función de la λ_{em} se ajusta operativamente con una exponencial decreciente. Este procedimiento se aplica también a los espectros de las medidas de anisotropía que se describirán en el *Capítulo 4*.

En la *Figura 3.1* se muestra el espectro de emisión de RN junto con el espectro corregido por la dispersión y la curva de dispersión ajustada para PEMA de 350 μm de espesor.

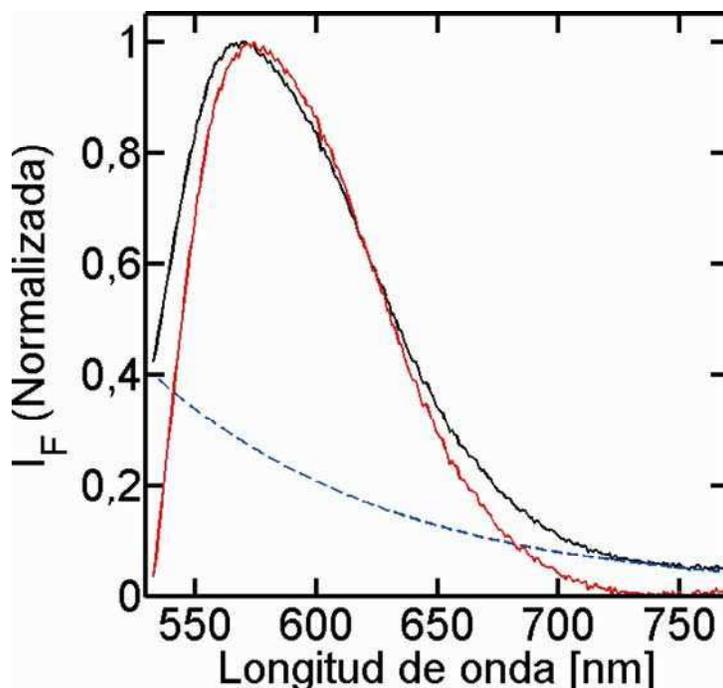


Figura 3.1: Corrección del espectro de fluorescencia de RN en PEMA de 350 μm de espesor a partir de una muestra de igual espesor sin colorante. Línea gruesa negra: espectro sin corregir, línea gris: espectro corregido y línea cortada: espectro de dispersión. λ_{exc} :490 nm.

Para graficar el espectro de emisión en número de onda, $\tilde{\nu}$, o energías es importante tener en cuenta que a pesar de que de la λ se puede convertir en $\tilde{\nu}$ según $\tilde{\nu} = 1/\lambda$, el ancho de banda en una escala de longitud de onda $\Delta\lambda$ no es simplemente la inversa del ancho de banda del número de onda $\Delta\tilde{\nu}$. Para los espectros adquiridos con un ancho de banda fijo en nm, se debe corregir la emisión para obtenerla en cm^{-1} según $I(\tilde{\nu}) = \lambda^2 I(\lambda)$. Esta ecuación da la distribución espectral correcta para la conversión del espectro de emisión adquirido en intervalos fijos en nm, a intervalos fijos en cm^{-1} .

Luego de corregir los espectros por la función de respuesta del equipo, por la dispersión y de expresarlos en escala de energía, se ajustaron los mismos con una suma de dos funciones Gaussianas. En la *Figura 3.2* se muestra, en el cuadro de la izquierda, un ejemplo de ajuste de espectro de fluorescencia para RN embebido en PEMA de 350 μm de espesor, y en el de la derecha, el ajuste de la emisión para la sonda en PEMA de 50 nm de espesor.

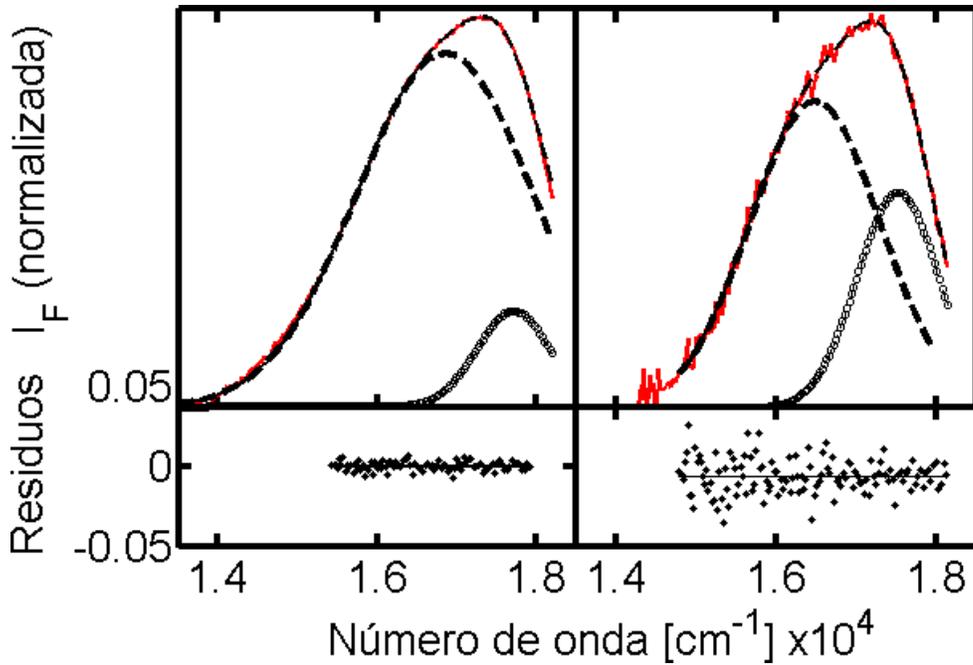


Figura 3.2: Cuadros superiores: Espectro de fluorescencia en escala de energía, de RN en PEMA de 350 μm (izquierda) y de 50 nm de espesor (derecha). El espectro se corrigió por dispersión y se ajustó con la suma de dos funciones gaussianas (líneas punteada y círculos: gaussianas, línea gris: datos experimentales y línea negra discontinua: resultados ajustados). Cuadro inferior: distribución de residuos. $\lambda_{\text{exc}}=490$ nm.

3.2.1.4 Medidas preliminares

3.2.1.4.1 Concentración de la sonda

La posición espectral del máximo de emisión se desplaza hacia mayores longitudes de onda con el incremento de la concentración de la sonda más allá de 10^{-4} M. A concentraciones mayores, la amplitud de REE disminuye hasta desaparecer. Estos efectos se explican por la transferencia de energía electrónica; ya que cuando se incrementa la concentración de sitios de menor energía de excitación, estos actúan como trampas de energía electrónica. Este efecto se evita manteniendo la concentración de colorante menor a 5×10^{-5} mol de RN/kg de polímero. A esta concentración no es posible obtener el espectro de absorción de las películas delgadas en un espectrofotómetro Shimadzu UV-3101 ($\text{abs} \ll 0,001$), por lo que el intervalo de λ_{exc} de REE se determinó por el flanco rojo del espectro de excitación.

En las películas de 25 nm a estas concentraciones de colorante, las correcciones no son suficientemente buenas y por lo tanto no se analizaron los espectros de emisión en estas condiciones.

3.2.1.4.2 Polaridad del sustrato

Como se explicó en el *Capítulo 1*, la polaridad del sustrato influye en la dinámica de las cadenas de polímero en películas de espesor nanométrico. Para analizar la influencia del sustrato en la posición espectral y en REE se prepararon películas de PEMA de 100 nm sobre cubreobjetos de vidrio

común y silanizado (Figura 3.3). El primero presenta densidad de carga negativa debido a la presencia de grupos silanol, el segundo esta cubierto por una capa de tetrametilsilano que le confiere un carácter no polar (ver Apéndice 1.A.3).

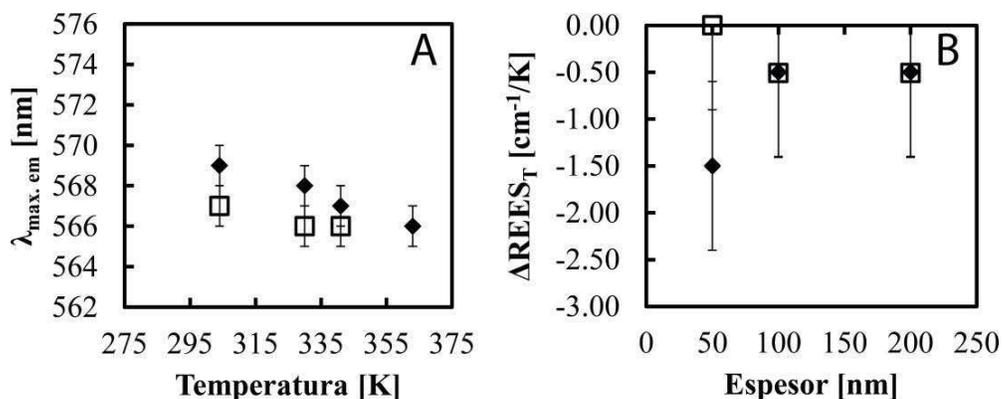


Figura 3.3: Influencia del sustrato en la posición del máximo de emisión en función de la temperatura (cuadro A) ($\lambda_{\text{exc}}=480$ nm) y en el efecto de REE en función del espesor (cuadro B) para RN en PEMA de 100 nm de espesor. Los rombos corresponden a cubreobjetos de vidrio, y los cuadrados, a cubreobjetos silanizados.

La polaridad del sustrato influye levemente en la posición del máximo de emisión y en la variación de la amplitud del efecto REE con la temperatura (calculado según la Ec. 1.7, Capítulo 1).

3.2.1.4.3 Otras sondas

Se probaron otras sondas como 4-AP y $\text{Ru}(\text{bpp})_3^{2+}$. La primera es altamente sensible a la polaridad del medio y tiene un gran corrimiento de

Stokes, pero la intensidad de emisión es baja en las películas delgadas, y al incrementar la concentración se forman otras especies emisoras que dificultan el análisis espectral, por lo que se descartó este fluoróforo.

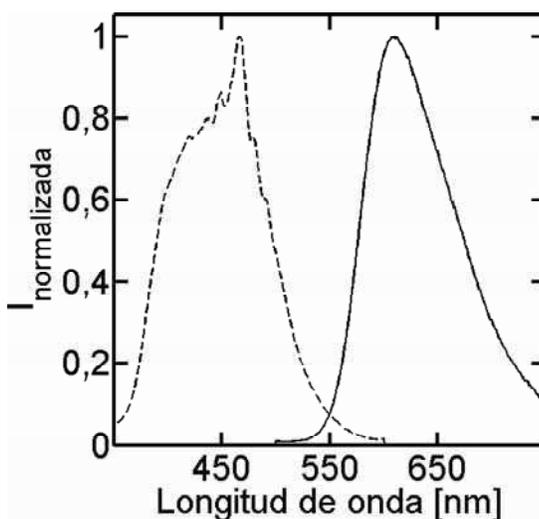


Figura 3.4: Espectros de fosforescencia de excitación (línea punteada, λ_{em} :620 nm, sin corregir) y emisión (línea sólida, λ_{exc} :480 nm) de $Ru(bpp)_3^{2+}$ embebida en películas de PMMA de espesor micrométrico.

En la *Figura 3.4* se muestra el espectro de excitación y emisión de fosforescencia de $Ru(bpp)_3^{2+}$ en PMMA de 100 nm de espesor a temperatura ambiente. Esta sonda presenta la ventaja de tener una gran diferencia entre la longitud de onda de excitación y la de emisión (~ 150 nm). Esto minimiza la probabilidad de transferencia de energía y el efecto de la dispersión cuando se excita la emisión en el flanco rojo del espectro de excitación. En estas condiciones es posible incrementar la concentración de la sonda en la matriz polimérica.

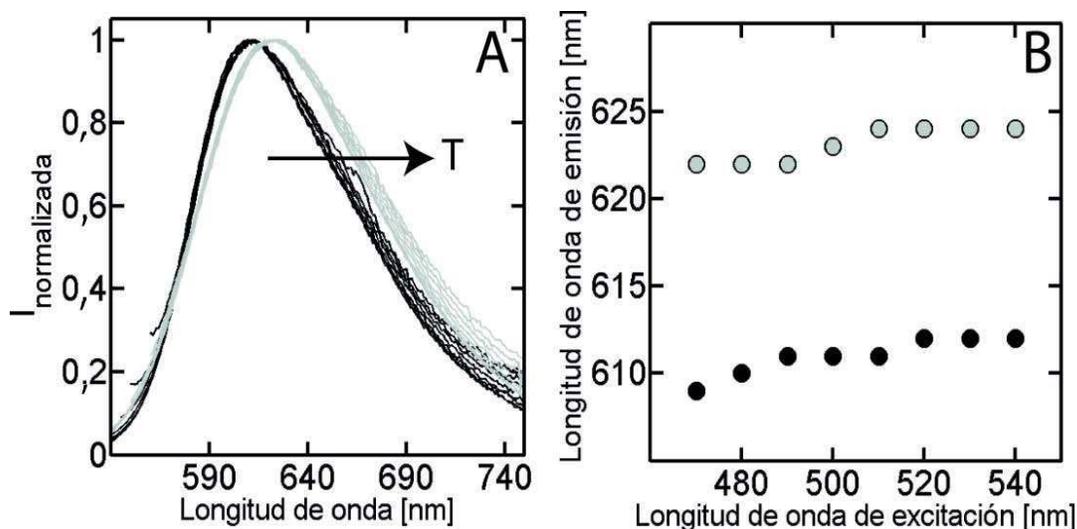


Figura 3.5: A) Espectros de emisión y B) Efecto de la temperatura sobre el REE de $\text{Ru}(\text{bpp})_3^{2+}$ embebida en películas de PMMA de espesor micrométrico. Líneas y círculos grises: 363 K, líneas y puntos negros: 298 K. λ_{exc} : 470 nm–540 nm.

En la *Figura 3.5* se presentan los espectros de emisión y REE a 298 K y 363 K para $\text{Ru}(\text{bpp})_3^{2+}$ en PMMA de 100 nm de espesor. El espectro de emisión se desplaza hacia menores energías con el incremento de la temperatura y se observa REE con una amplitud, en módulo, muy pequeña: 3 nm al rojo cuando se varía λ_{exc} entre 470 y 540 nm. En PBMA de 25 nm de espesor se observó el mismo comportamiento. Esta sonda debería tener un gran cambio de polaridad, dado que el estado fundamental es casi octaédrico y el excitado es TCML, con la carga localizada en uno de los ligandos (se vuelve asimétrica y polar). La baja sensibilidad de la sonda a la polaridad del entorno puede deberse a que el electrón en el estado excitado sobre el sistema π de la fenantrolina se encuentre ubicado en el centro de los dos grupos fenilo, aislándolo del entorno [4].

3.2.2 Espectros de moléculas únicas

3.2.2.1 Preparación de muestras

Se obtuvieron películas de 25 nm y 200 nm de espesor por spin-coating de soluciones de polímero en tolueno (Aldrich, grado espectroscópico) con RN en concentración de 10^{-10} mol de RN/kg de polímero, sobre substratos de silicio limpios, con una capa de SiO_x para evitar la desactivación de la fluorescencia de moléculas cercanas a la superficie (ver protocolo de limpieza en el *Apéndice 1.A.2.1*). En este caso, no existe formación de agregados por la baja concentración de colorante.

3.2.2.2 Microscopio confocal

El espectro de *moléculas únicas* de RN, embebidas en la matriz polimérica se registró con un microscopio confocal de barrido, provisto de dos detectores: un fotodiodo de avalancha (APD) y un espectrógrafo enfriado, con sensibilidad de *moléculas únicas* (ver *Capítulo 2, sección 2.5.1.1*). El tiempo de adquisición se fijó en 1 s, como compromiso considerando la relación entre el tiempo promedio experimental que tarda la sonda en sufrir el fotoblanqueo, la relación señal/ruido del espectro adquirido y la posibilidad de obtener la máxima información temporal. Con este tiempo de adquisición, se colectaron trazas temporales de espectros en cada punto identificado en la imagen de barrido confocal, hasta el blanqueo de la emisión (20 s sin reemitir).

3.2.2.3 Análisis de datos

Se usaron solo aquellas trazas espectrales en las cuales se observó desaparición total de la intensidad de emisión en un solo paso. Con este tipo de consideración se evita la posibilidad de tener dos moléculas o más en el volumen de observación.

Los espectros de *moléculas únicas* se ajustaron en escala de energías con la suma de cuatro funciones Gaussianas, por medio de una rutina escrita en MATLAB[®] desarrollada en el Grupo OSMP por el Dr. Danny Kowerko. Una vez determinada la posición espectral del máximo principal de emisión se construyeron trazas de su evolución temporal, las que se analizaron por la FDAC y el tiempo de residencia.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Espectros de emisión de ensamble de moléculas

En la *Figura 3.6* se muestra el espectro de emisión de fluorescencia de RN en una serie de polialquilmecrilatos.

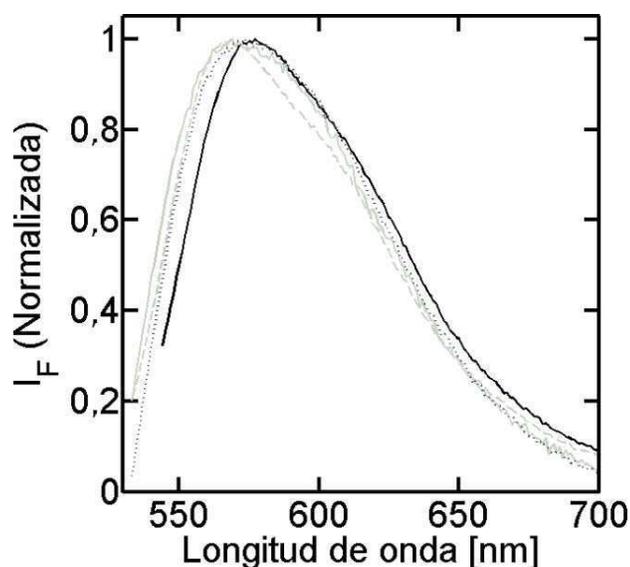


Figura 3.6: Espectro de emisión de Rojo Nilo en PMMA (línea negra sólida), PEMA (línea negra punteada), PPMA (línea gris punteada) y PBMA (línea gris sólida). Condiciones: $[RN]=6 \times 10^{-6}$ mol de RN/kg de polímero, $\lambda_{exc} = 510$ nm, $T = 298$ K, espesor de la película: $350 \mu\text{m}$.

Con el incremento del largo de la cadena alquílica lateral, el máximo de emisión se desplaza hacia menores longitudes de onda. Esto se debe a que la densidad de grupos carbonilo disminuye con el aumento del largo de cadena lateral, resultando una menor polaridad de los entornos (solvatocromismo). Teniendo en cuenta que RN tiene un estado excitado más polar que el fundamental, entornos más polares estabilizan en mayor medida el estado excitado, disminuyendo la energía de la emisión de fluorescencia. Como se muestra en la *Figura 3.7*, la posición espectral del máximo de emisión depende de la composición química del polímero siendo prácticamente independiente del espesor de la película entre 50 nm y $350 \mu\text{m}$.

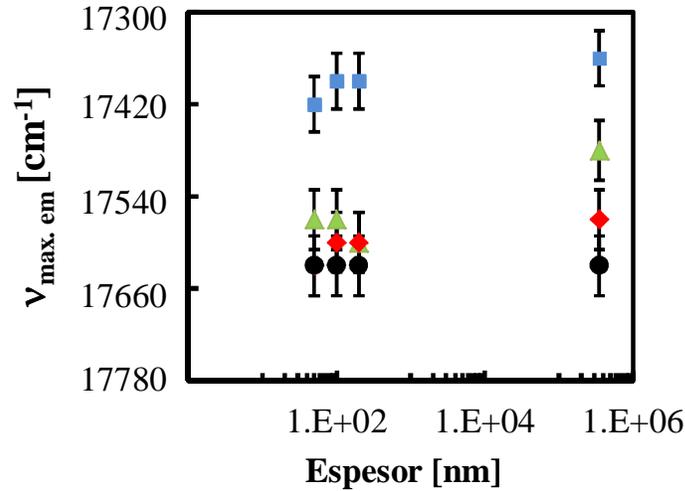


Figura 3.7: Solvatocromismo de RN en películas poliméricas de espesor entre 50 nm y 350 μm , donde PMMA (298 K): cuadrados, PEMA (304 K): triángulos, PPMA (290 K): rombos y PBMA (281 K): círculos. ($\lambda_{\text{exc}}=490$ nm).

En cada uno de los polímeros este efecto se consideró a una temperatura (T_{min}) por debajo de $T_{\text{g}}^{\text{bulk}}$. T_{min} en PBMA es 281 K, en PPMA, 290 K; en PEMA, 304 K y en PMMA, 298 K. En estas condiciones, la relajación del polímero se minimiza para todos los PAMA. La diferencia entre $\nu_{\text{max}}^{\text{PMMA}}$ y $\nu_{\text{max}}^{\text{PBMA}}$ es de $200 \pm 30 \text{ cm}^{-1}$ y permanece constante para todos los espesores de película estudiados. Debido a que el solvatocromismo depende fundamentalmente de la densidad de grupos éster en la caja de polímero, que estabilizan el estado excitado de la sonda, la emisión de RN se encuentra a energías menores en PMMA que en el resto de los polímeros estudiados.

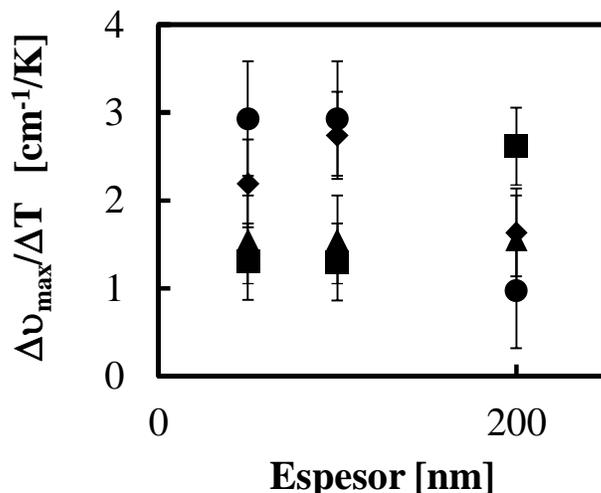


Figura 3.8: Variación de la posición del máximo de emisión de RN (cm^{-1}) con la temperatura en función del espesor de la película polimérica. $\Delta T = T_{\max} - T_{\min}$ para cada polímero se calcula entre la mayor (T_{\max}) y menor (T_{\min}) temperatura a la que se expuso la muestra: PBMA: $T_{\min}=281$ K y $T_{\max}=313$ K; PEMA: $T_{\min}=304$ K, $T_{\max}=363$ K; PPMA: $T_{\min}=290$ K y $T_{\max}=347$ K; PMMA: $T_{\min}=298$ K y $T_{\max}=363$ K. PMMA: cuadrados, PEMA: triángulos, PPMA: rombos y PBMA: círculos. ($\lambda_{\text{exc}}=490$ nm).

El efecto de la temperatura sobre la posición del máximo de emisión (termocromismo) para distintos espesores de película se muestra en la Figura 3.8. Para RN, se observa un desplazamiento espectral hacia mayores energías con el aumento de la temperatura. Este efecto se cuantifica calculando el cociente entre: la diferencia de las posiciones del máximo de emisión (cm^{-1}) a la mayor (T_{\max}) y menor (T_{\min}) temperatura de trabajo, y la diferencia de estas temperaturas ($\Delta T = T_{\max} - T_{\min}$). La magnitud de esta variación es siempre positiva y pequeña (del orden de $1 \text{ cm}^{-1}/\text{K}$) y no hay una tendencia uniforme ni con el espesor de la película ni con el tipo de polímero.

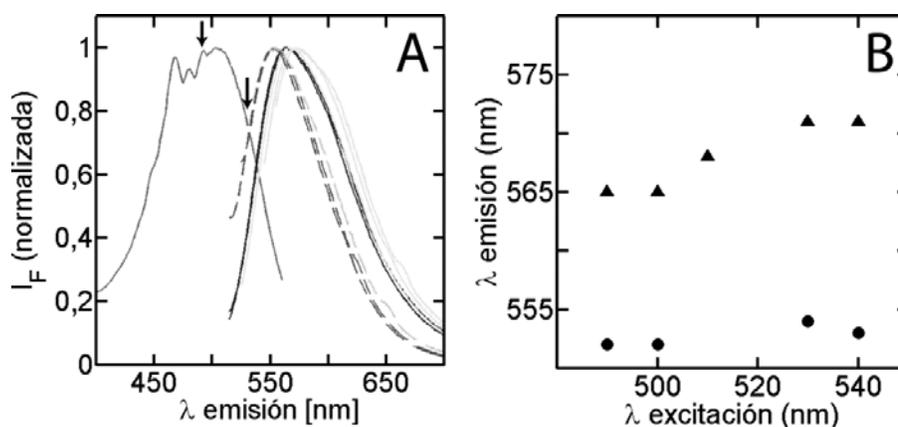


Figura 3.9: A) Espectros de excitación y emisión de RN embebido en una película de PBMA de espesor 350 μm . Las flechas indican las longitudes de onda de excitación (490 nm y 540 nm). Para $T=285$ K: Líneas continuas: $\lambda_{exc}=490$ y 500 nm, líneas grises continuas: $\lambda_{exc}=530$ y 540 nm. Para $T=333$ K: Línea negra cortada: $\lambda_{exc}=490$ y 510 nm, línea gris cortada: $\lambda_{exc}=540$ nm. B) Efecto de la temperatura en la variación del máximo de emisión por excitación en el flanco rojo del espectro de excitación, $T=285$ K (triángulos) y $T=333$ K (círculos).

El efecto de excitación en el flanco rojo del espectro de excitación se estudió en función de la temperatura, a fin de obtener información cualitativa sobre la relajación de los polímeros confinados a la escala de los nanómetros. En la *Figura 3.9.A* se observa el efecto del desplazamiento del espectro de emisión de RN en PBMA de 350 μm de espesor, al excitar a λ_{exc} entre 490 nm y 540 nm, además del efecto de la temperatura en el REE medido a 285 K y 333 K.

En el cuadro B, a $T=285$ K, λ_{em} depende de λ_{exc} y la amplitud, en módulo, de REE es de $210 \pm 50 \text{ cm}^{-1}$ en el intervalo de longitudes de onda medido (490 a 540 nm). Con el incremento de la temperatura por encima de T_g del polímero, $T=333$ K, λ_{em} se vuelve independiente de λ_{exc} y la amplitud de REE prácticamente desaparece ($30 \pm 50 \text{ cm}^{-1}$). Por debajo de T_g la

dinámica de los entornos es lenta y no llegan a igualarse. Por encima, la dinámica aumenta y se observa un comportamiento promedio en la polaridad de los entornos, por lo cual la amplitud de REE disminuye. Sin embargo, en PPMA, PEMA y PMMA se observó REE por encima de T_g por lo que en principio podría pensarse que no todos los entornos llegan a igualarse.

En la *Figura 3.9* se ve que REE esta superpuesto al termocromismo y que en el resultado neto este último predomina, ya que la emisión se corre al azul al incrementar la temperatura.

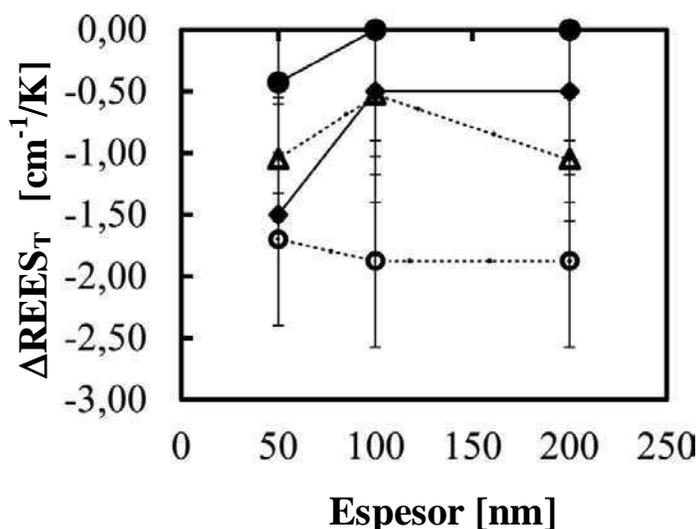


Figura 3.10: Variación de REE con la temperatura para RN en películas de PAMA de 50 nm a 200 nm de espesor. Círculo lleno: PMMA, rombo lleno: PEMA, ambos con líneas continuas. Triángulo sin relleno: PPMA, círculo sin relleno: PBMA, ambos con líneas punteadas. PBMA: $T_{\min}=281$ K y $T_{\max}=313$ K; PEMA: $T_{\min}=304$ K, $T_{\max}=363$ K; PPMA: $T_{\min}=290$ K y $T_{\max}=347$ K; PBMA: $T_{\min}=298$ K y $T_{\max}=363$ K. (a 100 nm de espesor, la magnitud del efecto en PEMA y PPMA coincide)

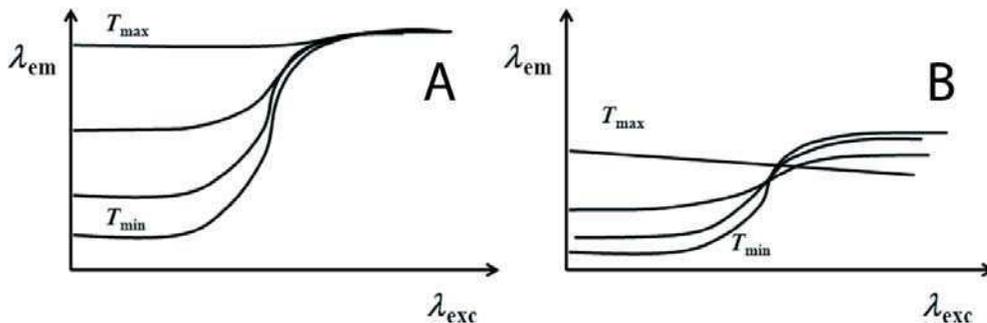
En la *Figura 3.10* se representa el cambio de la magnitud de REE con la temperatura, ΔREE_T , obtenido a partir de la *Ec. 1.7, Capítulo 1*, para RN en películas de 50 nm a 200 nm de espesor. Los valores se calcularon entre

la menor (T_{\min}) y mayor (T_{\max}) temperatura de trabajo, ver leyenda en la figura.

PBMA presenta la mayor variación de la amplitud de REE con la temperatura, mientras que en PMMA la variación es casi nula. En ningún caso REE desaparece completamente al aumentar la temperatura, indicando que persisten las diferencias de polaridad entre entornos. Esto es diferente a lo observado para la película gruesa (*Figura 3.9*). Dentro del error de las determinaciones, la amplitud de REE es independiente de la temperatura y del espesor de la película nanométrica. La tendencia general del modulo de la magnitud de REE es la esperada: disminuye al aumentar la temperatura.

3.3.1.1 Discusión

En la *Figura 3.8* se observó que al aumentar la temperatura el espectro se desplaza hacia mayores energías. Esto se puede explicar por una disminución de la polaridad de los entornos con la temperatura [5].



Esquema 3.1: A) Desplazamiento espectral en función de la longitud de onda de excitación a distintas temperaturas, donde $T_{\min} \ll T_g$ y $T_{\max} \gg T_g$. B) Efecto termocrómico en REE.

El estado excitado es menos estabilizado debido a que la reorientación de los grupos del entrono es más rápida y al azar que a bajas temperaturas.

REE se manifiesta como un desplazamiento espectral hacia menores energías debido a la lenta relajación del polímero que genera heterogeneidad en las interacciones sonda-caja de polímero (*Esquema 3.1.A*). Este efecto se observa cuando el sistema es rígido a una temperatura (T_{\min}), ya que si se aumenta T suficientemente ($T_{\max} \gg T_g$) el sistema llega a un estado fluido y REE desaparece debido a la rápida reorientación del solvente, produciéndose la emisión desde un mismo estado estabilizado. En esta situación, ΔREE_T es negativo y alcanza su valor absoluto máximo. Dependiendo de la rigidez del sistema en el intervalo de T estudiado ($T < T_g$), puede no haber diferencias en ΔREE_T . Para valores de T intermedios, la relajación es incompleta y el valor de ΔREE_T es intermedio.

Al aumentar la temperatura los dos efectos descriptos ocurren a la vez y se contraponen (*Esquema 3.1.B*): el desorden creciente del entorno tiende a desplazar el espectro al azul y la relajación lleva a un desplazamiento al rojo. Como la amplitud de REE no es muy grande puede considerarse que predomina el efecto termocrómico, que resulta en un pequeño desplazamiento del espectro hacia menores energías al incrementar T a la λ_{exc} . Por ejemplo, en la *Figura 3.9* se ve que REE (*Ec. 1.6, Capítulo 1*) tiende al valor predicho casi nulo a 333 K, en concordancia con $T > T_g$ y relajación completa. Pero en el resto de las muestras, el efecto de la temperatura sobre la posición espectral predomina y ν_{em} se desplaza hacia mayores energías, modificando los resultados esperados en experimentos de REE.

3.3.2 Espectros de emisión de moléculas únicas

En la *Figura 3.11* se muestra la posición de *moléculas únicas* localizadas por su fluorescencia como puntos brillantes. La imagen corresponde a un área de $4 \times 4 \mu\text{m}$ en la muestra. (Pot: $4 \mu\text{W}$)

Los espectros obtenidos presentan distinta intensidad, estructura y posición del máximo de emisión de más alta energía. En la *Figura 3.12* se muestra el histograma de frecuencias del máximo de emisión para todos los espectros registrados de todas las moléculas detectadas en cada polímero en películas de 200 y 25 nm de espesor medidas a 278 K, 296 K y 323 K.

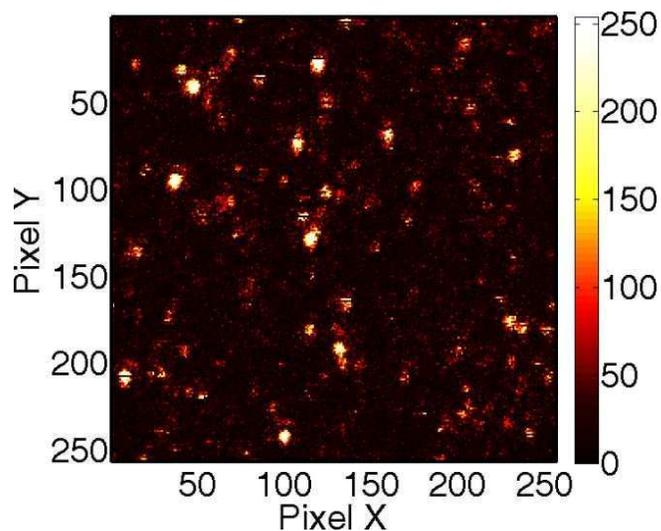


Figura 3.11: Mapa de la posición de las moléculas fluorescentes en PMMA de 200 nm de espesor adquirido a 296 K. La intensidad de emisión se representa en la barra de color de la derecha y representa las cuentas por píxel en 100 ms.

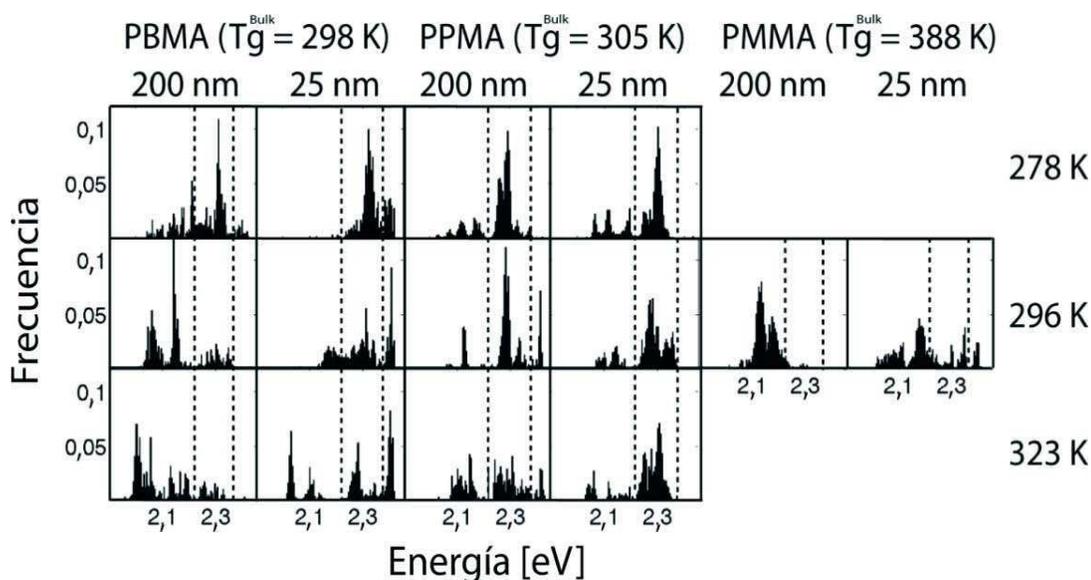


Figura 3.12: Histograma de energía del máximo de emisión de la banda de mayor energía en la traza temporal de RN en películas de PBMA, PPMA y PMMA de 25 nm y 200 nm de espesor a 278 K, 296 K y 323 K según se detalla en la figura. Las frecuencias están normalizadas por el número de moléculas medidas en cada muestra. Las líneas punteadas marcan los límites energéticos estipulados para las configuraciones Tipo A, B y C (ver texto). Se estudiaron más de 100 moléculas por histograma.

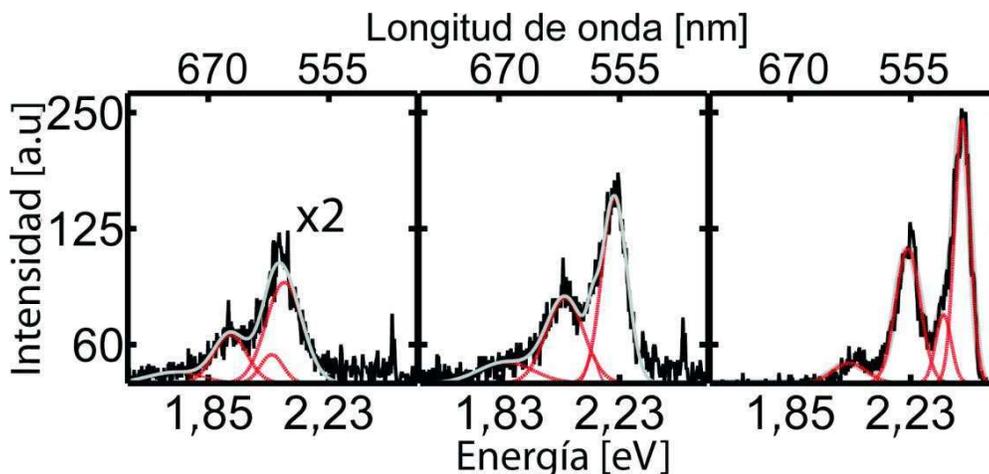


Figura 3.13: Ejemplos de tres tipos de espectros de moléculas únicas de RN registrados en una película de PBMA de 200 nm de espesor a 296 K, tiempo de adquisición: 1 s. Estos ejemplos son representativos del comportamiento espectral de RN en todas las muestras medidas. La línea negra corresponde al espectro medido, la línea gris muestra la suma de 4 curvas gaussianas (líneas gris oscuro) empleadas para el ajuste.

En todos los polímeros se detectaron tres tipos característicos de espectros de emisión y que son similares a los informados en la literatura por Yoon *et al.* y Higgins *et al.* en PMMA y PS [6], [7]. En la *Figura 3.13* se muestran ejemplos característicos obtenidos en PBMA de 200 nm de espesor a 296 K. Debido a que el espectro de emisión de RN es altamente sensible a la polaridad del entorno, las diferentes interacciones sonda-caja se observan como distintas posiciones del máximo de emisión de fluorescencia.

Los espectros de emisión de fluorescencia se clasificaron en tres tipos en función a la posición del máximo principal de emisión (*Figuras 3.12* y *3.13*). Los espectros Tipo A corresponden a aquellos en los que el máximo de emisión se encuentra a $E_{\text{max}} > 2,37$ eV, los de Tipo B, a aquellos en los que $2,22 \text{ eV} < E_{\text{max}} \leq 2,37$ eV y los Tipo C, a $E_{\text{max}} \leq 2,22$ eV. La intensidad del espectro está asociada a la rigidez y a la polaridad del entorno. Cuanto mayor es la rigidez del entorno menor es la probabilidad de que la población de moléculas en el estado S_1 decaiga por vías diferentes de la de fluorescencia. Estos hechos están en línea con lo observado en solventes: cuanto menor es la polaridad del solvente, mayor es el rendimiento cuántico de fluorescencia de RN [8] y mayor es la energía del máximo de emisión.

La energía espectral del máximo de emisión puede ser comparada con el máximo de emisión de RN en distintos solventes para estimar la fuerza de las interacciones entre la sonda y la caja de polímero, a través de la escala empírica de polaridad $E_T(30)$. A partir de datos de literatura se construyó la *Figura 3.14*, los valores utilizados y las referencias respectivas se presentan en la *Tabla 2.A.1* del *Apéndice 2.A*.

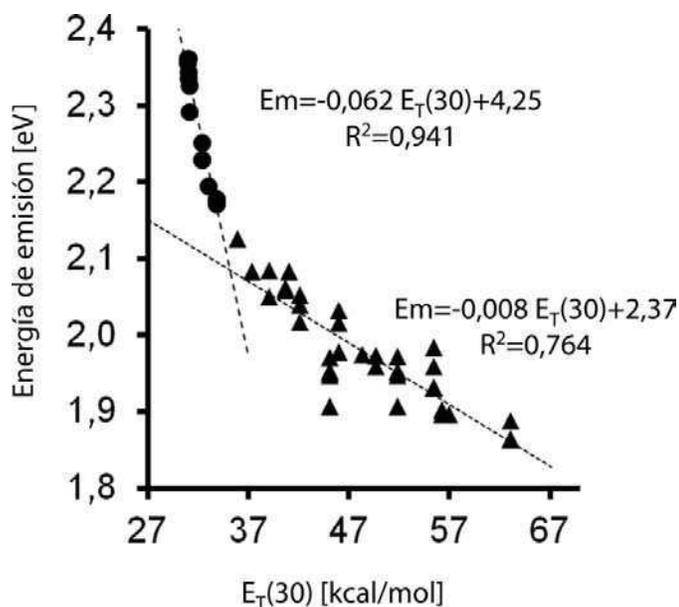
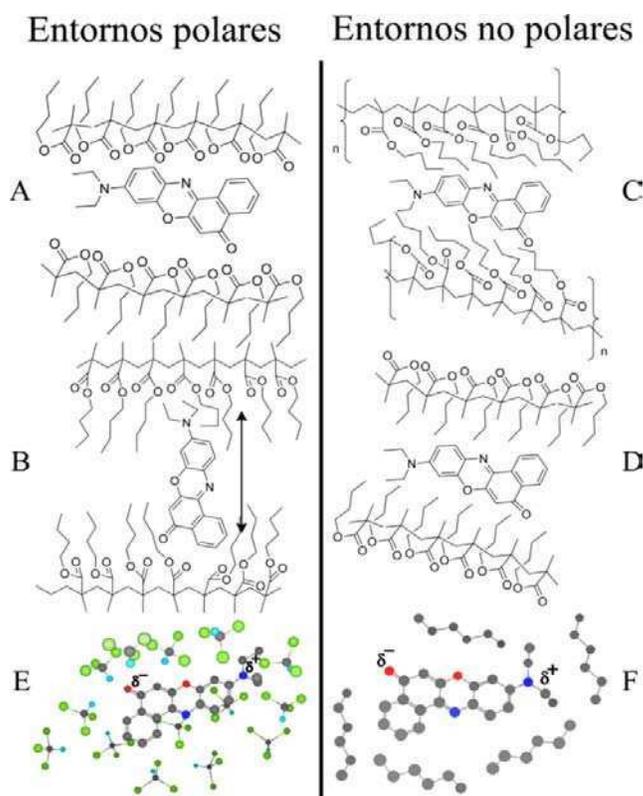


Figura 3.14: Correlación entre el máximo de emisión de RN en distintos solventes y la escala de polaridad empírica $E_T(30)$. Las líneas punteadas corresponden a ajustes lineales para: solventes con $E_T(30) < 36$ (círculos) y solventes con $E_T(30) > 36$ (triángulos).

Considerando sólo la energía del máximo de emisión, los espectros clasificados como Tipo A corresponden a RN en entornos similares a n-hexano, donde $E_{\max}^{\text{n-hexano}} = 2,36$ eV (Tabla 2.A.1, Apéndice 2.A). Los de Tipo B están comprendidos entre entornos de tipo CCl_4 y n-hexano ($E_{\max}^{\text{CCl}_4} = 2,23\text{--}2,25$ eV) y los de Tipo C, ubicados en cajas donde las interacciones son similares a las presentes entre CCl_4 y acetonitrilo (AcN), $E_{\max}^{\text{AcN}} = 1,98\text{--}2,03$ eV. En el Esquema 3.1 se presenta una posible conformación para la caja de polímero, la ubicación de RN y su análogo en solventes líquidos no polares y medianamente polares: n-hexano y clorometano, respectivamente.



Esquema 3.2: Representación esquemática de ambientes polares y no polares para RN en PBMA (A-D). Comparación con entornos líquidos representativos para espectros Tipo A (no polares en n-hexano, F) y espectros tipo B-C (polares en clorometano, E).

En entornos polares los grupos éster del polímero se orientan hacia el interior de la caja (*Esquema 3.2.A*). En otra conformación posible, la sonda puede intercalarse entre las cadenas alquílicas laterales orientando sus grupos polares dietilamino y carbonilo en dirección perpendicular a la cadena principal del polímero, interactuando con los grupos éster del polímero (Cuadro B). En entornos no polares la caja puede estar formada por cadenas alquílicas del polímero que rodean a la sonda apartándola de los grupos éster, Cuadros C y D. A partir de estos esquemas es posible interpretar cambios de polaridad del entorno debido a reordenamientos de la caja de polímero.

3.3.2.1 Comportamiento de ensamble vs. comportamiento acumulado

Para analizar si el conjunto de moléculas seleccionado es representativo del comportamiento general, se comparó el espectro de *ensamble*, adquirido en un fluorímetro en una muestra concentrada, con el espectro acumulado obtenido como la suma de todos los espectros individuales para cada muestra. En el caso particular de RN embebido en PMMA de 200 nm de espesor el espectro *ensamble* medido en el fluorímetro a 296 K, $\lambda_{exc} = 490$ nm y a una concentración de colorante de 2×10^{-5} mol de RN/kg polímero; coincide con el espectro acumulado construido en las mismas condiciones experimentales que el espectro *ensamble*, pero a una concentración menor (Figura 3.15.A).

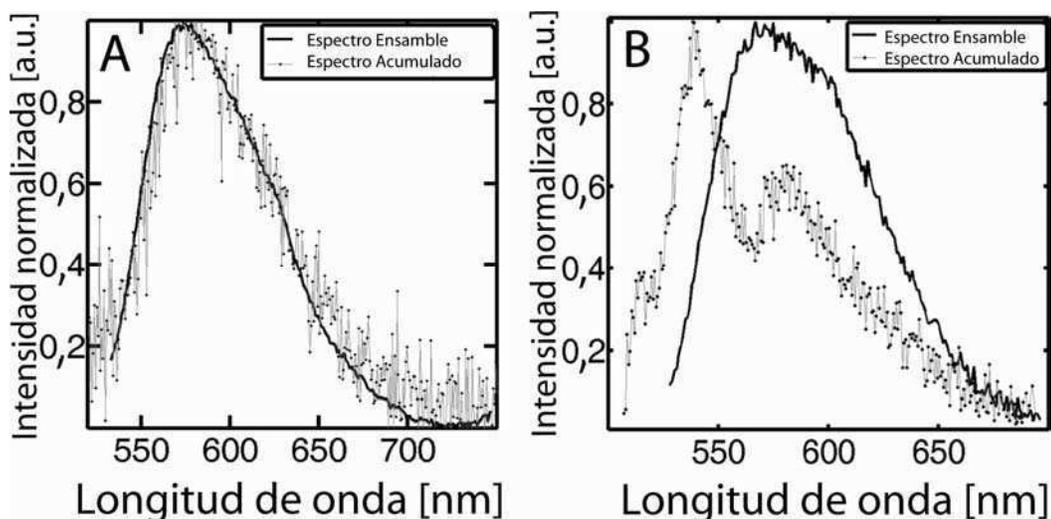


Figura 3.15: Espectros acumulado de todas las moléculas únicas medidas en una muestra (puntos) y el correspondiente espectro de *ensamble* medido en un fluorímetro (línea gruesa) para RN en A) PMMA, 200 nm, 296 K, y B) PBMA de 25 nm de espesor, 323 K. Los espectros se midieron en las mismas condiciones de λ_{exc} , espesor y temperatura pero diferente concentración. $[RN] (ensamble) = 2 \times 10^{-5}$ mol de RN/kg de polímero y $[RN] (acumulado) = 1 \times 10^{-12}$ mol de RN/kg de polímero.

Este hecho demuestra que el conjunto de espectros de *moléculas únicas* es representativo del comportamiento del *ensamble* en esta muestra. Por otro lado, se puede concluir que los Tipos de espectro observados son los que contribuyen principalmente al espectro *ensamble*, y son representativos de los tres entornos en los que la sonda se puede ubicar en los polímeros estudiados.

En el resto de los sistemas, el espectro acumulado difiere del espectro *ensamble* en la presencia de un máximo hacia mayores energías, *Figura 3.15.B*. Este es un efecto común en medidas de *moléculas únicas*, donde la estadística se ve afectada en el proceso de selección y adquisición de espectros. Las moléculas de RN con espectros de emisión Tipo A, son aquellas con el máximo de emisión desplazado hacia mayores energías, son además más brillantes, estructuradas y estables bajo irradiación continua, comparadas con las moléculas con espectros Tipo B y C. Como se explicó recién, los espectros Tipo A tienden a ser seleccionados con mayor facilidad. Debido a esto los espectros de cada tipo no necesariamente reflejan la fracción de entornos de Tipo A, B y C en la muestra. Por esta razón no se realizó un análisis de la distribución de espectros en función de la energía de emisión.

3.3.3 Comportamiento espectral temporal de RN en matrices poliméricas de PAMA

En la *Figura 3.16* se muestran dos ejemplos de traza temporal del máximo principal de emisión de moléculas de RN en PBMA de 25 nm de espesor a 323 K y los correspondientes espectros.

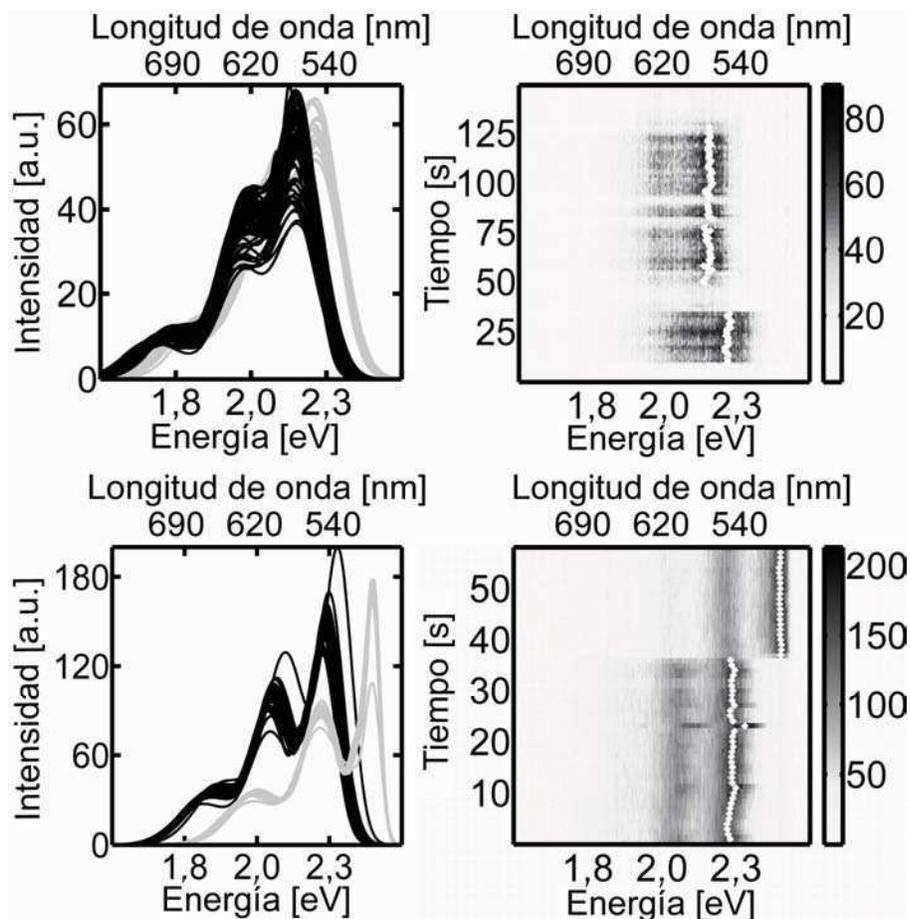


Figura 3.16: Ejemplos de trazas temporales de moléculas únicas de RN en PBMA de 25 nm de espesor, obtenidos a 323 K (tiempo de adquisición: 1 s). En las figuras de la derecha se observa la evolución temporal de los máximos de los espectros ajustados. La barra lateral en escala de grises muestra la intensidad relativa de los espectros y los círculos blancos representan el máximo principal del espectro ajustado en función del tiempo. Se distinguen fluctuaciones pequeñas alrededor del valor medio de energía de emisión. En la izquierda, en color gris, se muestran los espectros de mayor energía y en negro, los de menor energía.

Estas trazas temporales muestran que existen fluctuaciones pequeñas alrededor de la posición del máximo principal de emisión y que en algunos casos se producen cambios en la energía de emisión de gran amplitud, llamados saltos espectrales, en los que el espectro cambia entre Tipos A, B o

C. Estos saltos se deben a reordenamientos de la caja que conducen a un cambio grande en las interacciones sonda-polímero, mientras que las fluctuaciones pequeñas obedecen a pequeños cambios conformacionales, como por ejemplo el movimiento del grupo dietilamino de RN o a reordenamientos de la caja poco significativos en relación a cambios en la interacción sonda-polímero.

En el panel inferior derecho de la *Figura 3.16* se observa que el valor de E_{\max} fluctúa alrededor de 2,26 eV con una desviación estándar de 0,008 eV. A los 40 s, la posición espectral cambia a 2,39 eV y fluctúa menos, con una desviación estándar de 0,003 eV. Este evento corresponde a un ejemplo de salto espectral de Tipo B a Tipo A donde el entorno alrededor de esta molécula de RN se torna menos polar.

En el panel superior de la *Figura 3.16* se muestra otro ejemplo donde el comportamiento espectral de la molécula pasa de Tipo B a Tipo C, con un cambio de entorno a uno con características más polares. Además se observa parpadeo de la emisión por un período de 15 s y otros dos de 5 s. En entornos con interacciones de Tipo B y C se observa una mayor frecuencia de parpadeo de la sonda, con respecto a la emisión de Tipo A. Esto ya fue observado en trazas temporales de moléculas individuales [9–11].

3.3.4 Análisis de la distribución de diferencias de energías de emisión.

Las trazas temporales en general, no contienen la suficiente cantidad de datos para ser analizadas por medio de la función de correlación temporal. Por esto se decidió analizar la distribución de energías de emisión por medio

de la *función de distribución acumulada complementaria* (FDAC) de las diferencias de energías [12]. Esta función da la probabilidad de que la variable aleatoria X sea mayor que un valor en particular, x .

El estudio de las fluctuaciones espectrales de las trazas temporales se llevó a cabo calculando las diferencias de energía entre el máximo de emisión de espectros sucesivos (ΔE). Como ya se mencionó (*Figura 3.16*), se observaron fluctuaciones de energía alrededor de un valor medio y, eventualmente, fluctuaciones de energía grandes (saltos). Se calculó el logaritmo de la FDAC del cuadrado de la diferencia de energía entre máximos de emisión de espectros sucesivos ($\log\Phi_c(\Delta E^2)$). Se representa así la probabilidad de observar un cambio espectral con una energía superior a un dado valor en módulo. Este análisis permite la estimación de la probabilidad y amplitud de cambios espectrales, pero no distingue el sentido de los cambios ni la información sobre su velocidad.

$$\log\Phi_c(\Delta E^2) = \log\left(1 - \int_0^{\Delta E^2} f(\Delta E^2) \cdot d(\Delta E^2)\right) \quad \text{Ec. 3.1}$$

Las moléculas con comportamiento Tipo A mostraron fluctuaciones de baja amplitud y bajo número de saltos. Estas moléculas se encuentran en entornos más estables y menos polares que las moléculas con comportamiento Tipo B y C. Estas últimas, que son menos estables, muestran fotoblanqueo y parpadeo más frecuente y espectros de menor intensidad que las Tipo A. Esta observación está en concordancia con el hecho de que el rendimiento cuántico de fluorescencia, Φ_F , de RN se ve incrementado en medios no polares comparado con medios polares: en CCl_4

$\Phi_F = 0,65$; en cloroformo, 0,33; en acetona, 0,32; en acetonitrilo, 0,29 y en metanol, 0,08 [8], [13].

En general los saltos más frecuentes se dan entre espectros Tipo B y C, más que entre A con B y C. Como las fluctuaciones son más frecuentes entre sitios Tipo B y C se decidió combinar ambos y separarlos de los Tipo A. Como criterio se asignó a una molécula emisiva un comportamiento espectral Tipo A, B o C, si el máximo principal del primer espectro de la serie temporal se encuentra en el intervalo de energía característico de cada Tipo de espectro.

3.3.5 Simulaciones de un sistema de dos niveles de energía

Para explicar los cambios espectrales observados, se realizaron simulaciones de la evolución temporal de la posición espectral del máximo principal de emisión de una molécula que puede fluctuar entre dos niveles de energía, E_1 y E_2 . Estas simulaciones permiten entender la FDAC en relación con las fluctuaciones espectrales.

En la *Figura 3.17* se muestran simulaciones de la evolución temporal del máximo de emisión para un sistema de dos niveles de energía con fluctuaciones al azar alrededor del valor medio de cada estado y con una baja probabilidad de intercambio entre niveles. Según el sistema representado por:



donde k_{12} es la constante de velocidad de salto de energía en la dirección $E_1 \xrightarrow{k_{12}} E_2$, y k_{21} , la constante de velocidad de salto en la dirección $E_2 \xrightarrow{k_{21}} E_1$.

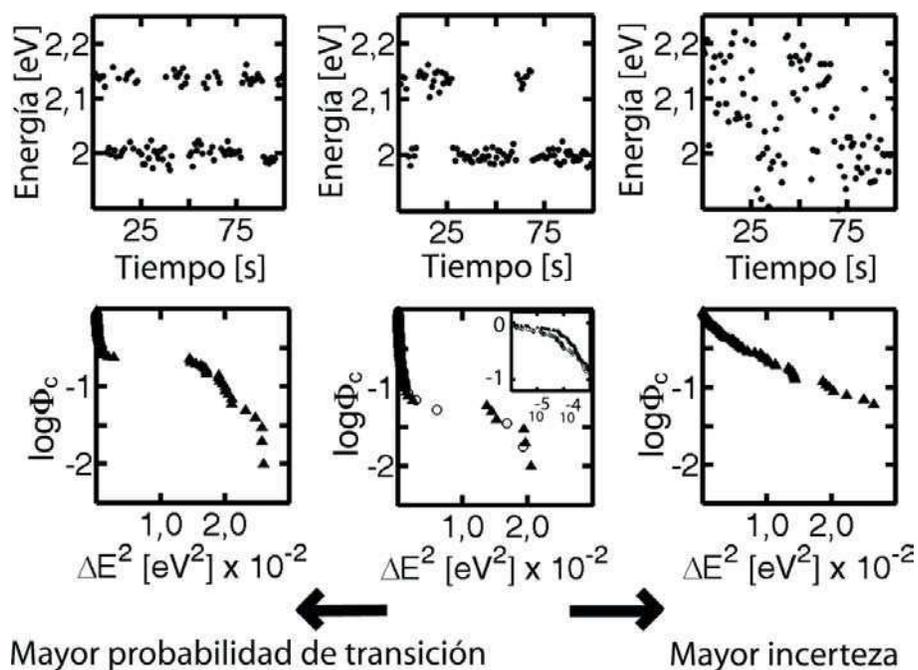


Figura 3.17: Simulación de un sistema de dos niveles de energía, E_1 y E_2 intercambiables con constantes k_{12} y k_{21} . Traza temporal (cuadros superiores) y el logaritmo de la función de distribución acumulada complementaria de los saltos de energía al cuadrado, $\log\Phi_c(\Delta E^2)$ (cuadros inferiores). En la figura del centro: simulación con $k_{12} = k_{21} = 0,05 \text{ s}^{-1}$, fluctuación en $\delta E_1 = \delta E_2 = 0,012 \text{ eV}$, $\Delta E_1 = E_1 - E_2 = 0,14 \text{ eV}$ (triángulos negros del panel inferior). Los círculos blancos corresponden a datos experimentales para una molécula de RN en PBMA 200 nm a 278 K. El cuadro interno superior muestra una ampliación del 90% de los eventos. Paneles de la izquierda y derecha, respectivamente: incremento en la constante de transición $k_{12} = k_{21} = 0,3 \text{ s}^{-1}$, e incremento en la amplitud de la incerteza, donde $\delta E_1 = \delta E_2 = 0,050 \text{ eV}$. Todos los demás parámetros de la simulación permanecen igual a los del panel central.

La escala temporal de las fluctuaciones se fijó en un intervalo de tiempo arbitrario, que se tomó como 1 s para compararlo con los resultados experimentales. Los valores de energía en el ejemplo de la *Figura 3.17* se fijaron arbitrariamente, siendo $E_1 = 2,00$ eV y $E_2 = 2,14$ eV. Se asignó $\delta E_1 = \delta E_2 = 0,012$ eV para las fluctuaciones al azar alrededor del valor de los niveles de energía. Con estos parámetros se generaron secuencias aleatorias dinámicas. A partir de estas secuencias se calculó la diferencia de energía al cuadrado entre espectros sucesivos, $\Delta E^2 = (E_{t+1} - E_t)^2$.

En los paneles superiores de la figura se muestra la traza temporal del sistema simulado y en los paneles inferiores, la función $\Phi_c(\Delta E^2)$ correspondiente en escala logarítmica.

En el panel central inferior, se presenta también la comparación, en círculos blancos, con los valores experimentales del $\log \Phi_c(\Delta E^2)$ de una molécula de RN en PBMA de 200 nm de espesor a 278 K. Los triángulos negros corresponden a la simulación que mejor describe el comportamiento experimental, según los parámetros señalados anteriormente. Se ve que el modelo de intercambio entre dos niveles describe adecuadamente lo observado. En los paneles laterales se muestra la influencia en $\log \Phi_c(\Delta E^2)$ del incremento en la constante de velocidad de salto (izquierda, $k_{12} = k_{21} = 0,3$ s⁻¹) y el incremento en la fluctuación aleatoria alrededor del valor de energía de cada nivel (derecha, $\delta E_1 = \delta E_2 = 0,050$ eV).

La forma de $\log \Phi_c(\Delta E^2)$ está relacionada con el comportamiento espectral temporal de las moléculas según los siguientes puntos principales:

- 1) La pendiente inicial de $\log \Phi_c(\Delta E^2)$ (a bajos valores de ΔE^2) está relacionada con las fluctuaciones pequeñas alrededor del valor medio

de energía de cada nivel.

- 2) Cuando el número total de saltos espectrales en ambos sentidos (N_i) se normaliza por el número total de observaciones, se obtiene una probabilidad que determina el valor de $\log \Phi_c(\Delta E^2)$ en que se establece el *plateau* de la función. N_i es igual a la frecuencia total de saltos multiplicada por el tiempo total de observación. Si se considera la fracción de tiempo que permanece la molécula en E_2 :

$$\Gamma_{12} = \frac{k_{12}}{k_{12} + k_{21}} \quad \text{Ec. 3.2}$$

y en E_1 según:

$$\Gamma_{21} = \frac{k_{21}}{k_{12} + k_{21}} \quad \text{Ec. 3.3}$$

Entonces, la frecuencia de saltos hacia abajo, f_{21} ; y hacia arriba, f_{12} , quedan expresadas de la siguiente manera:

$$f_{21} = k_{21} \cdot \Gamma_{12} \quad \text{Ec. 3.4}$$

$$f_{12} = k_{12} \cdot \Gamma_{21} \quad \text{Ec. 3.5}$$

N_t se calcula, en función de las frecuencias, según:

$$N_t = (f_{21} + f_{12}) \cdot \tau_{\text{obs}} = \frac{2k_{12} \cdot k_{21}}{k_{12} + k_{21}} \tau_{\text{obs}} \quad \text{Ec. 3.6}$$

donde τ_{obs} es el tiempo total de observación.

- 3) En los casos en los que se observa un *plateau* nítido, el valor de $\Delta E^2 = (E_2 - E_1)^2$ corresponde al valor para el cual $\log \Phi_c(\Delta E^2)$ decrece 0,3 unidades desde el valor del *plateau*.

3.3.6 Análisis de la FDAC para moléculas con comportamiento espectral Tipo A y Tipo B-C

En la sección anterior se vio que la simulación del sistema con dos niveles de energía intercambiables permite describir el comportamiento de la dinámica espectral de una molécula y obtener la información relevante a partir de la FDAC. Ahora, es interesante estudiar el comportamiento conjunto de todas las moléculas clasificadas como Tipo A o Tipo B-C para un mismo polímero, a un dado espesor y temperatura.

En la *Figura 3.18* se muestra la función de distribución acumulada complementaria de un conjunto de *moléculas únicas* de RN que presentan espectros Tipo A en PBMA de 25 nm de espesor y a 323 K. Este comportamiento es representativo del observado en el resto de las muestras.

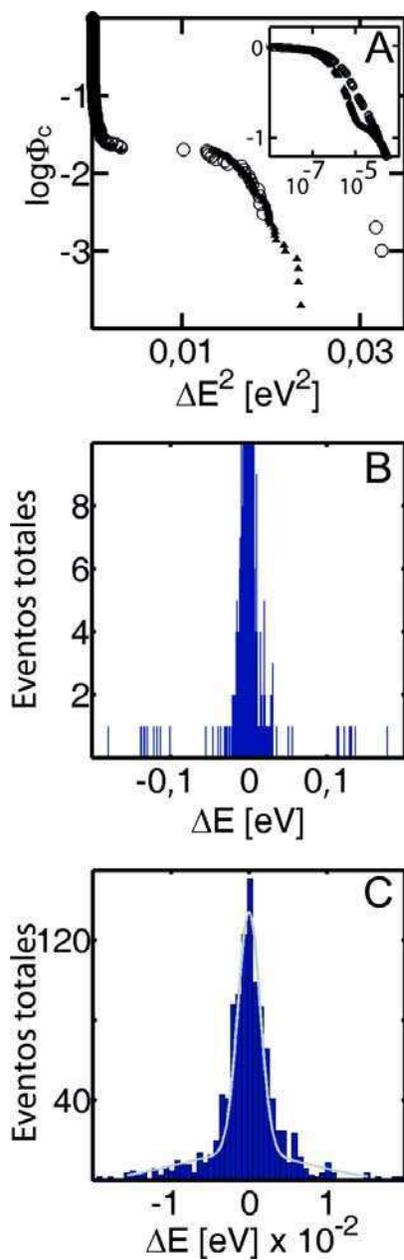


Figura 3.18: A) $\log \Phi_c(\Delta E^2)$ vs. ΔE^2 para moléculas de RN con comportamiento espectral Tipo A en PBMA de 25 nm de espesor a 323 K. Los círculos blancos corresponden a los datos experimentales y los triángulos negros a la mejor simulación ($\Delta E = 0,13$ eV y $k_{12} = k_{21} = 0,003$ s⁻¹ y dos fuentes de fluctuaciones: $\delta \Delta E_2 \sim 0,012$ eV y $\delta \Delta E_1 \sim 0,001$ eV) El recuadro interno muestra un detalle en escala doble logarítmica para el intervalo de datos de ΔE^2 de baja amplitud. B) Histograma de ΔE . C) Expansión en el eje de ΔE de los datos de B) y ajuste con dos funciones gaussianas de la parte central de B) (ver texto).

En el cuadro A, $\log \Phi_c(\Delta E^2)$ muestra que el 95 % de los casos presenta fluctuaciones menores a 0,03 eV ($1 \times 10^{-3} \text{ eV}^2$), que existe un salto con amplitud de $\sim 0,12 \text{ eV}$ ($0,014 \text{ eV}^2$) y con probabilidad de 0,02 ($1 \times 10^{-1,7}$); esto indica que solo existe un 2 % de saltos de $\Delta E = 0,12 \text{ eV}$ entre los 2200 espectros obtenidos en estas condiciones para este conjunto de moléculas.

El cuadro B muestra el histograma de frecuencias de ΔE . En él se ve claramente que la mayoría de los eventos están distribuidos en forma simétrica alrededor de cero y que también existen dos poblaciones con menor frecuencia que se encuentran equi-especiadas alrededor del cero a aproximadamente $\pm 0,12 \text{ eV}$ y que corresponden a los saltos de energía. La distribución de fluctuaciones de baja amplitud puede ser ajustada por la suma de dos distribuciones gaussianas, cuadro C. La distribución total de ΔE tiene tres componentes principales, la primera, relacionada con fluctuaciones al azar alrededor del valor medio y de muy baja amplitud, que representa a la mayoría de las fluctuaciones espectrales. La segunda, relacionada con fluctuaciones de mayor amplitud también alrededor del valor medio. Y una tercera, que tiene en cuenta los saltos de gran amplitud entre dos niveles energéticos distintos.

Por lo tanto, para simular la FDAC para los valores del cuadro A es necesario agregar una fuente de fluctuaciones alrededor del valor de energía de cada nivel y de muy baja amplitud ($\delta \Delta E_1 \sim 0,001 \text{ eV}$) y otra, de mayor amplitud ($\delta \Delta E_2 \sim 0,012 \text{ eV}$), también alrededor de los mismos valores de energía. El valor del salto simulado es $\Delta E = 0,13 \text{ eV}$ y $k_{12} = k_{21} = 0,003 \text{ s}^{-1}$. El ajuste de las distribuciones alrededor del valor cero, se hace a partir del detalle de la distribución del cuadro C y de los valores

$(94 \pm 4) \exp\left[-\left(\frac{\Delta E^2}{(2 \times (1,9 \pm 0,2) 10^{-3} \text{ eV})^2}\right)\right] + (12 \pm 3) \exp\left[-\left(\frac{\Delta E^2}{(2 \times (8,2 \pm 0,9) 10^{-3} \text{ eV})^2}\right)\right]$. Esta distribución se muestra en la *Figura 3.18.C*.

La primera componente puede ser asociada a fluctuaciones térmicas y error del ajuste. La segunda componente puede relacionarse con pequeños cambios conformacionales que se promedian a cero en la ventana temporal de observación y que pueden tener asociados distintos valores en diferentes ubicaciones de la sonda, aun perteneciendo al mismo tipo de comportamiento espectral. Este efecto ha sido informado anteriormente [14], [15] y está relacionado con la heterogeneidad espacial. La tercera componente involucra cambios conformacionales en las interacciones sonda-polímero, que cambian la posición del espectro en aproximadamente 0,1 eV.

En la *Figura 3.19* se muestra la FDAC para todas las moléculas con comportamiento espectral Tipo B-C en PBMA, PPMA y PMMA de 25 y 200 nm de espesor, medidas a 278 K, 296 K y 323 K. Las curvas del $\log \Phi_c(\Delta E^2)$ presentan una pendiente inicial alta (en módulo) y luego un gradual decrecimiento del módulo de la pendiente, sin un *plateau* nítido. Esto puede ser el resultado de la heterogeneidad de interacciones sonda-entorno evidenciadas como variabilidad de la amplitud de fluctuaciones y de saltos espectrales de las *moléculas únicas*. Este efecto de la heterogeneidad espacial hace perder la nitidez del *plateau*, observado cuando se analiza la trayectoria de una sola molécula.

En todos los casos el 90 % de los datos presenta fluctuaciones del máximo de emisión menores a 0,03 eV ($1 \times 10^{-3} \text{ eV}^2$). Las fluctuaciones de gran amplitud son más frecuentes en las películas de 200 nm que en las de 25 nm para PBMA, PPMA y PMMA.

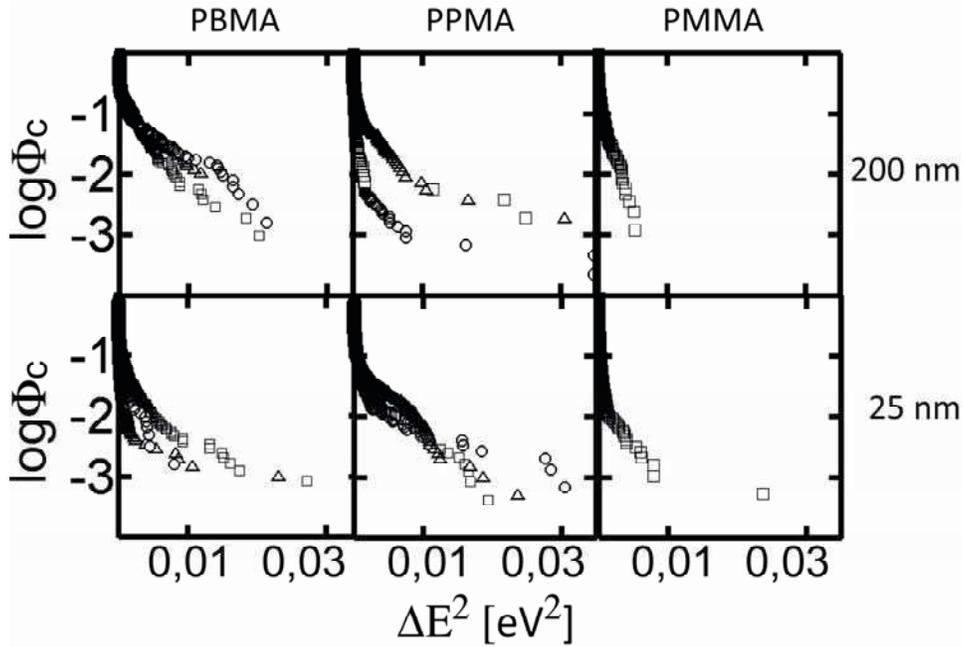


Figura 3.19: $\log\Phi_c(\Delta E^2)$ en función de la ΔE^2 para fluctuaciones espectrales de entornos Tipo B-C de RN en PBMA, PPMA y PMMA (izquierda, centro y derecha, respectivamente) de 200 nm y 25 nm de espesor (superior e inferior). El tipo de marcador responde a la temperatura: 278 K, círculos; 296 K, cuadrados y 323 K, triángulos.

En el *Capítulo 1* se explicó que en varios trabajos se ha observado que T_g de películas poliméricas delgadas se ve influenciada por el espesor. Sin embargo, en base a los resultados presentados no es posible obtener una correlación entre la frecuencia y amplitud de los saltos espectrales con T_g . Este hecho indica que los eventos registrados no están asociados a la temperatura de transición vítrea de los polímeros estudiados.

En PPMA T_g disminuye 18 K en películas de 25 nm de espesor respecto de las películas de más de 200 nm (T_g es 290 K y 308 K, respectivamente). En PMMA T_g aumenta levemente en 7 K cuando se disminuye el espesor entre esos valores (T_g de 388 K para 200 nm y 395 K

para 25 nm) [16]. Con respecto a PBMA no se ha encontrado información en la literatura en relación a T_g de películas delgadas por lo que se toma el valor de ensamble, 298 K, como referencia. Los movimientos colectivos parecen no tener influencia en los cambios espectrales. Esto puede explicarse si las fluctuaciones espectrales son determinadas por cambios conformacionales restringidos a zonas críticas de la sonda o de la caja de polímero. Por ejemplo, la aproximación del grupo éster del polímero y del grupo carbonilo o dietilamino de la sonda, sin un reordenamiento mayor de la caja y con leves fluctuaciones de la ubicación de la sonda dentro de la misma.

En la *Figura 3.20* se muestra $\log \Phi_c(\Delta E^2)$ en función de ΔE^2 para el comportamiento espectral de entornos Tipo A de RN en PBMA y PPMA. Los espectros Tipo A fluctúan menos que los tipo B-C en iguales condiciones. Solo RN en PBMA de 25 nm a 323 K presenta fluctuaciones de mayor amplitud. Debido a la baja probabilidad de los eventos, estos no contribuyen significativamente a las grandes variaciones de energía responsables del *plateau* de las distribuciones mostradas en la *Figura 3.19*.

El análisis anterior muestra que hay cambios espectrales más significativos entre ubicaciones diferentes de la sonda en un dado polímero, que entre polímeros diferentes. Este resultado refuerza la conclusión de que las fluctuaciones espectrales no están relacionadas con T_g , pero sí con cambios de interacciones de tipo van der Waals o dipolares entre las paredes de la caja y la sonda, como por ejemplo las favorecidas por la relajación del grupo alquilo y éster que comienzan a rotar a muy baja temperatura [17], [18].

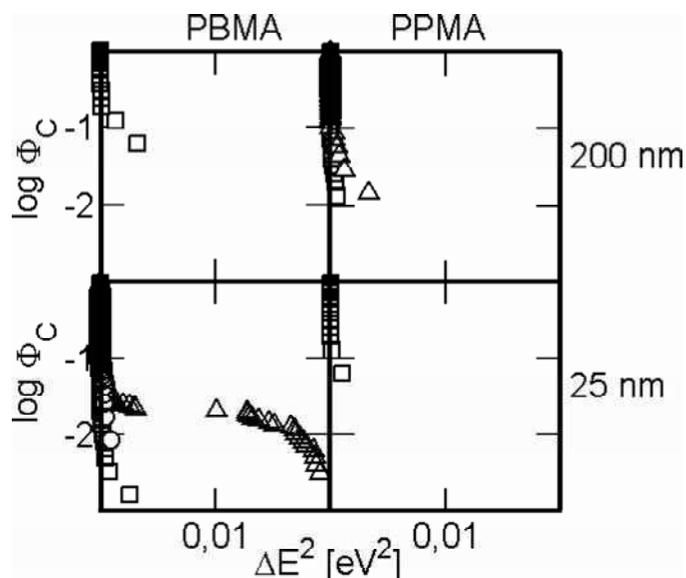


Figura 3.20: $\log \Phi_c(\Delta E^2)$ en función de la ΔE^2 para fluctuaciones de espectros en entornos Tipo A de RN en PBMA (izquierda) y PPMA (derecha) de 200 nm (superior) y 25 nm (inferior). El tipo de marcador responde a la temperatura: 278 K, círculos; 296 K, cuadrados y 323 K, triángulos.

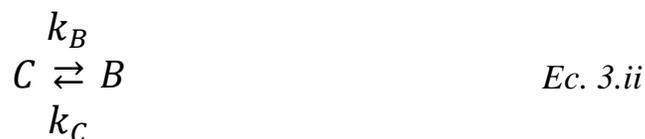
La amplitud de los saltos espectrales es, en todos los casos, de 0,11 eV a 0,15 eV. Este hecho fortalece la hipótesis de un mismo proceso común para todos los polímeros estudiados. En este trabajo se propone el movimiento de las cadenas laterales del polímero y en especial del grupo éster, que se encuentra en todos los PAMA, y su aproximación relativa a los grupos carbonilo y dietilamino de RN, como responsable de los cambios en las interacciones sonda-caja. Una conclusión similar también fue hallada por Weiss *et al.* en la interacción de PAMA con la sonda Pireno [19].

3.3.7 Análisis de tiempos de residencia

Según la hipótesis ergódica, resulta equivalente estudiar un sólo

sistema a lo largo del tiempo, que hacer medidas sobre repeticiones idénticas del sistema a un mismo tiempo. Por lo tanto es posible remplazar el promedio temporal de un microsistema por el promedio sobre las réplicas. Analizando la traza temporal de la emisión de moléculas independientes, se puede obtener información cinética y de equilibrio del conjunto. A lo largo de una trayectoria temporal el sistema puede variar entre distintas configuraciones. A una temperatura suficientemente baja el sistema fluctúa entre mínimos locales con energía de activación baja entre distintas posiciones. Cada tanto, el sistema logra cruzar una energía de activación mucho mayor y alcanzar otra conformación estable.

Esta descripción es aplicable al sistema presentado en la *Ec. 3.i* donde ahora, los dos niveles de energía E_1 y E_2 están representados por los estados C y B según:



El tiempo medio de residencia en cada estado se define por las *Ec. 3.7* y *3.8*, de manera que la fracción de tiempo que el sistema permanece en el estado C y en el B es, respectivamente:

$$\tau_{\text{res, B}} = f_B \tau_{\text{obs}} \quad \text{Ec. 3.7}$$

$$\tau_{\text{res, C}} = f_C \tau_{\text{obs}} \quad \text{Ec. 3.8}$$

Para este caso, se define una constante de equilibrio, K_{eq} , entre conformaciones diferentes de la sonda-caja de polímero, que son responsables de los distintos tipos de emisión espectral:

$$K_{eq} = \frac{\tau_{res} B}{\tau_{res} C} = \frac{N_B}{N_C} \quad Ec. 3.9$$

El tiempo de residencia es considerado igual al tiempo total durante el cual las moléculas emiten desde los estados Tipo B o Tipo C. N_B y N_C es el número de espectros (observables) con valores tipo B y C. Al considerar el tiempo y no la intensidad de emisión es posible independizarse del brillo de las moléculas en cada estado. Para esto, se yuxtaponen todas las trazas temporales de las moléculas estudiadas en una misma muestra, correspondientes al Tipo B-C, sin incluir los estados de parpadeo y fotoblanqueo. Se arma así un vector temporal artificial, para cada polímero, espesor y temperatura, que se supone es ergódico. En este punto se supone que la probabilidad de parpadeo y la duración de estos períodos oscuros es igual en las dos conformaciones de la caja de polímero.

El mismo procedimiento se usa para el conjunto de las *moléculas únicas* con espectros Tipo A. Al usar estas trazas temporales artificiales se puede reemplazar el tiempo medio de residencia en cada conformación por el número total de espectros de cada tipo en la traza temporal artificial (ver *Tabla 3.1*). Luego, se elige un valor de energía umbral que discrimina el estado del sistema y permite definir el tiempo de residencia en cada estado. De esta forma se calcula la fracción de tiempo que permanece el sistema en

cada estado. Esto es válido por que todos los espectros se obtuvieron con igual lapso de exposición. En la *Figura 3.21* se presentan los resultados para el conjunto de espectros Tipo B-C en PBMA de 25 nm de espesor a 323 K.

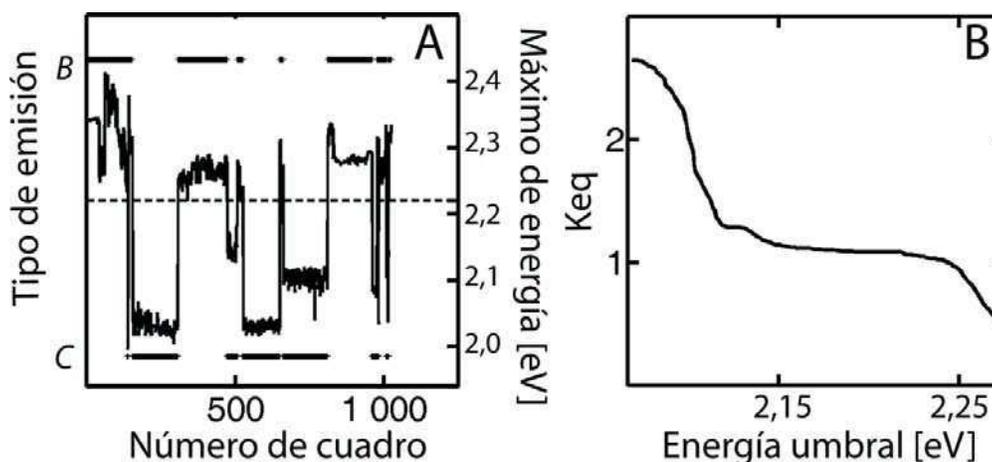


Figura 3.21: A) Vector temporal artificial de la posición del máximo de emisión de RN en PBMA 25 nm a 323 K para moléculas con comportamiento espectral Tipo B-C (marcados en el eje izquierdo). Los puntos negros representan el tiempo que permanece la molécula única en estado emisor Tipo B o C en base al valor umbral de 2,22 eV, línea punteada. B) valor calculado de K_{eq} en función del umbral de energía seleccionado.

El valor umbral se seleccionó a partir de graficar K_{eq} vs. energía umbral (E_{umbral} , eV), *Figura 3.21.B*. Se utiliza el valor medio de la energía para el que K_{eq} no cambia en un intervalo de al menos 0,05 eV. En este caso el valor de energía umbral es de 2,22 eV, en coincidencia con el valor de energía límite para la clasificación entre espectros Tipo B y Tipo C. En general el valor de energía umbral coincidió con el umbral seleccionado para la clasificación de espectros en Tipo A, B y C. Los resultados para todas las

muestras se presentan en la *Tabla 3.1*.

Tabla 3.1: Número total de espectros en cada estado (N_B y N_C), K_{eq} para el conjunto B+C en las muestras poliméricas estudiadas. En todos los casos $E_{umbral} = 2,22$ eV.

PBMA	25 nm			200 nm		
	278 K	296 K	323 K	278 K	296 K	323 K
N_B	521	1617	1068	401	259	95
N_C	5	711	983	229	756	477
K_{eq}	10²	2,3	1,1	1,7	0,3	0,2

PPMA	25 nm			200 nm		
	278 K	296 K	323 K	278 K	296 K	323 K
N_B	997	1855	1553	1489	405	235
N_C	458	484	454	446	121	230
K_{eq}	2,2	3,8	3,4	3,3	3,3	1,0

PMMA	25 nm	200 nm
	296 K	296 K
N_B	539	49
N_C	1309	795
K_{eq}	0,44	0,06

En esta se observa que el comportamiento de K_{eq} de PBMA con la temperatura es diferente del de PPMA. En PBMA los valores de K_{eq} disminuyen con el aumento de la temperatura. En PPMA esta tendencia es mucho menor, mostrando valores casi constantes. En PMMA se realizaron medidas sólo a 296 K porque el valor de T_g es muy superior a los valores de temperatura estudiados y no se esperaban ver cambios.

A partir de los datos en PBMA y PPMA es posible estimar el valor de ΔG° del sistema según

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq} = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ \quad \text{Ec. 3.10}$$

donde R es la constante de los gases, T la temperatura absoluta, ΔH° la entalpía y ΔS° la entropía estándares del proceso.

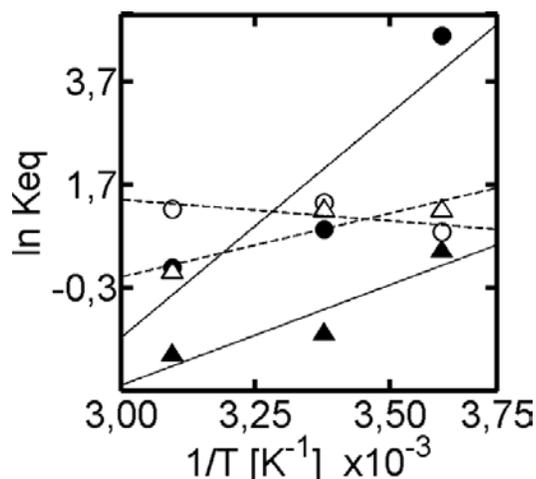


Figura 3.22: $\ln K_{eq}$ en función de T^{-1} , para los cambios espectrales entre configuraciones $C \rightarrow B$. Los puntos sin relleno corresponden a PPMA y los negros, a PBMA. Círculos: películas de 25 nm de espesor, triángulos: películas de 200 nm de espesor.

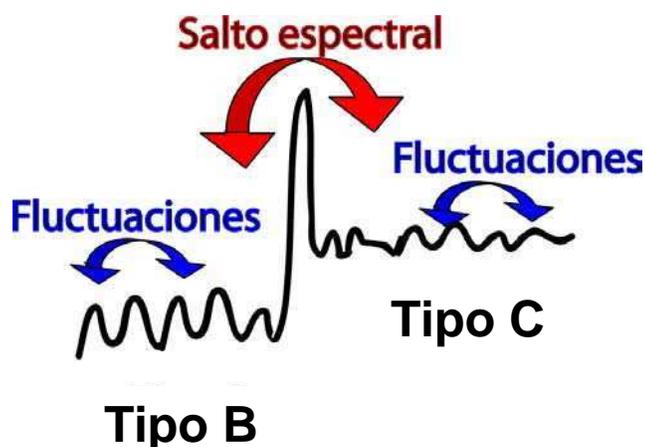
Por estimación lineal de los datos de la *Figura 3.22* se obtuvieron los parámetros termodinámicos que se resumen en la *Tabla 3.2*.

Tabla 3.2: ΔH° , ΔS° y ΔG° de transición calculados a partir de regresión lineal de los datos de la *Figura 3.22*.

Polímero	Espesor [nm]	ΔH° [kJ/mol]	ΔS° [J/Kmol]	ΔG° [kJ/mol] 296 K
PBMA	25	-72 ± 35	-230 ± 110	-5 ± 2
	200	-32 ± 15	-120 ± 60	2 ± 1
PPMA	25	7 ± 4	30 ± 15	16 ± 4
	200	-20 ± 10	-60 ± 25	38 ± 8

Los valores de parámetros termodinámicos de equilibrio en PPMA son bajos y poco dependientes del espesor de la película, mientras que para PBMA las diferencias son significativas con el espesor. En PBMA la transición $C \rightarrow B$ es exotérmica y en PPMA es prácticamente termoneutra. El valor de K_{eq} en PBMA de 25 nm a 278 K es muy alto (*Tabla 3.1*), probablemente debido a la muy baja frecuencia de observación de espectros Tipo C (baja extensión temporal de la traza o muestra pequeña). Esto puede verse también en la *Figura 3.12*, donde la frecuencia de espectros Tipo C es baja a 278 K y aumenta con la temperatura. Este aumento es mucho mayor en PBMA que en PPMA. Los valores de ΔS° son negativos sugiriendo algún tipo de ordenamiento molecular por el cambio de las interacciones sonda-

caja durante el proceso. La transición $C \rightarrow B$ tiene parámetros ΔH° y ΔS° con el mismo signo, del estilo de una transición de fase: exotérmico para dar un estado más ordenado. Los procesos de estabilización por solvatación también tienen estas características. La temperatura de equilibrio (T_{eq}) a la que este cambio puede tener $\Delta G^\circ = 0$ es 318 K para PBMA de 25 nm y 283 K para PBMA de 200 nm de espesor.



Esquema 3.3: representación de la superficie de energía potencial para la transición $B \leftrightarrow C$ y fluctuaciones de menor energía en cada nivel.

En el *Esquema 3.3* se muestra una posible representación del comportamiento de RN en los polímeros mediante la superficie de energía potencial para la transición de Tipo C a Tipo B (saltos) y para las fluctuaciones alrededor del valor medio de energía de cada nivel.

Los saltos espectrales que se establecen entre conformaciones Tipo A y otro Tipo no fueron analizados desde un enfoque termodinámico. En las trazas temporales artificiales armadas para el conjunto Tipo A-B no parece alcanzarse un estado de equilibrio entre conformaciones, dado que los

intercambios son muy poco frecuentes.

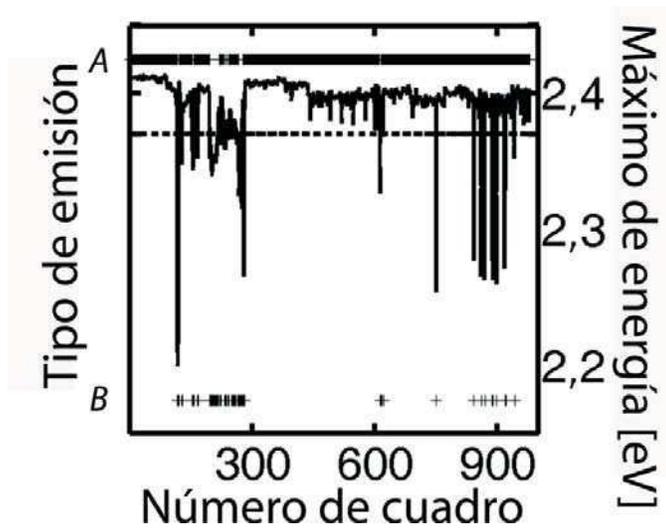


Figura 3.23: A: Vector temporal artificial de la posición del máximo de emisión de RN en PBMA 25 nm a 323 K para moléculas con comportamiento espectral Tipo A. Los puntos negros representan el tiempo que permanece la molécula en el estado emisor Tipo A o B en base al valor umbral de 2,37 eV, línea punteada.

En la *Figura 3.23* se muestra la traza temporal para el conjunto de espectros Tipo A de RN en PBMA de 25 nm de espesor a 323 K. Puede verse que las moléculas permanecen más del 99 % del tiempo en el estado Tipo A y rara vez cambian a otro Tipo de estado emisor.

3.3.8 Enfoque según procesos de coalescencia

Al obtener $\Phi_c(\Delta E^2)$ se pierde la información temporal del sistema. Sin embargo las experiencias sugieren la existencia de fluctuaciones en distintas escalas temporales. Un análisis como un fenómeno de coalescencia permite

interpretar la forma de las distribuciones de energía comparando la ventana de observación con el tiempo característico de las transiciones.

Los procesos dinámicos afectan la distribución de energía media observada en un intervalo en un sistema que puede intercambiarse entre dos estados. La forma de la distribución depende de la relación entre el tiempo de residencia en cada estado y la frecuencia de muestreo (o tiempo de exposición). La *Figura 3.18* puede interpretarse también en estos términos. En la *Figura 3.18.B* se observaron tres fenómenos separados por la amplitud de la fluctuación y por la frecuencia temporal. Cuando el tiempo de observación es corto con respecto al tiempo de residencia en cada estado, se observa que la molécula puede emitir desde dos estados de energía bien definidos. Este tipo de comportamiento genera una distribución de diferencia de energías de espectros sucesivos que presenta dos máximos bien definidos y simétricamente distribuidos alrededor del cero, por ejemplo, como se ven en la *Figura 3.18.B* a $\pm 0,13$ eV. Estas corresponden a los saltos de energía y son debidas a grandes cambios en las interacciones sonda-polímero como resultado de reacomodamientos importantes de la sonda y de la caja de polímero.

En la *Figura 3.24* se muestra la distribución de energías, E (cuadro B); y de las diferencias de energía, ΔE (cuadro C), de una simulación de un sistema de dos niveles de energía intercambiables (cuadro A) similar a las realizadas en la *Figura 3.18.A*, con un valor de ΔE de 0,13 eV.

En esta figura se ilustra el efecto de la ventana temporal de muestreo en la distribución de E y ΔE para el caso de una simulación con $k_{12} = k_{21} = 0,3 \text{ s}^{-1}$. La forma de las distribuciones se ve afectada por el tiempo de observación que está asociado al tiempo de adquisición en un

experimento real. Al variar la ventana temporal de observación es posible obtener la forma de la distribución de E y ΔE para la misma traza temporal.

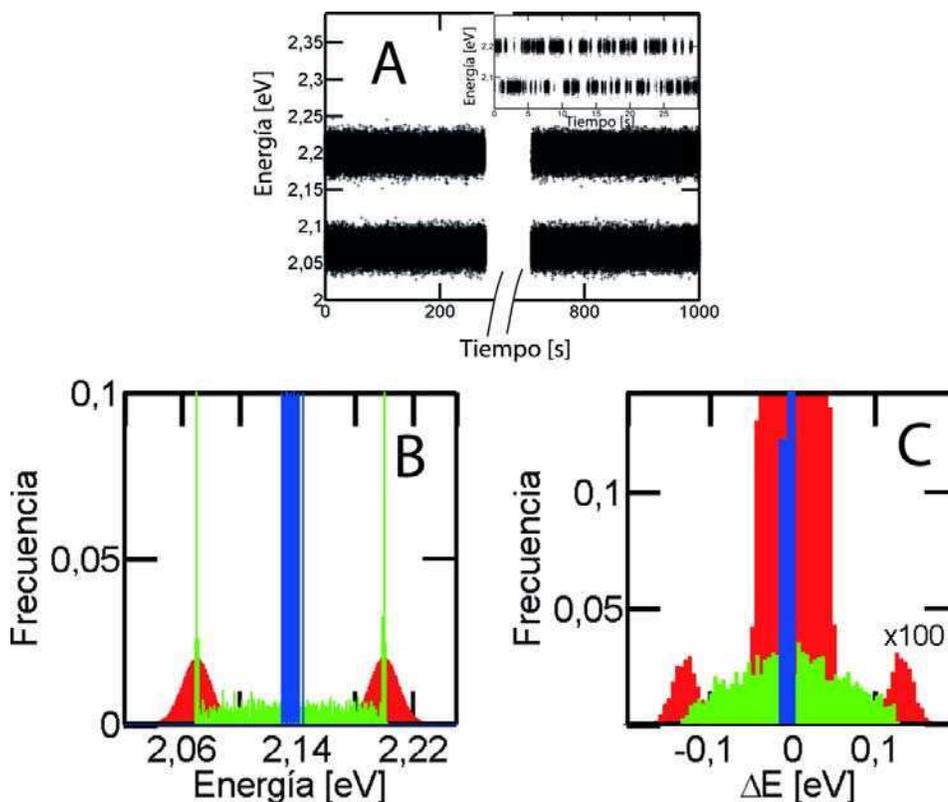


Figura 3.24: A) simulación de una traza temporal de 10^6 puntos, tomando cada punto arbitrariamente como de 1 s de duración, donde $k_{12} = k_{21} = 0,3 \text{ s}^{-1}$, $\Delta E = 0,13 \text{ eV}$ y $\delta E = 0,01 \text{ eV}$. En el cuadro interno del gráfico de la traza temporal (A) se muestra una ampliación de los primeros 30 s de simulación. Influencia de la ventana temporal de muestreo: en B) los histogramas de la posición del máximo principal de emisión y en C) los histogramas de las diferencias de energía, ΔE . En los histogramas, la ventana temporal de observación se distingue por la escala de colores de la representación. Donde rojo=1 s, verde=500 s y azul=10000 s.

Para este fin, la traza temporal simulada de la posición de los máximos de emisión se segmenta en intervalos sucesivos iguales al ancho de la

ventana temporal elegido para la observación. Dentro de estos segmentos se promedian los valores de energía y se genera una nueva traza temporal. Este procedimiento se repite para distintos lapsos de observación. Las distribuciones calculadas a partir de estas trazas temporales para E y ΔE entre espectros sucesivos se muestran en la *Figura 3.24 B y C*.

Cuando la ventana temporal es igual a 1 s, se observa una distribución de E con 2 picos, debidos a la ocurrencia de los niveles de energía E_1 y E_2 . En ΔE la distribución tiene 3 picos, dos de muy baja frecuencia, equiespaciados y que corresponden a la diferencia de energía entre niveles (*salto*); un pico centrado en cero, con mayor frecuencia y que está asociado a la diferencia entre observaciones consecutivas donde el sistema permanece en el mismo nivel de energía, E_1 o E_2 . Al incrementar el tamaño de la ventana temporal (ventana temporal = 5×10^2 s), se observa una distribución de energías, centrada alrededor del promedio de las energías de los niveles E_1 y E_2 . (E_{prom}) típica de la coalescencia de la señal. ΔE tiene una distribución ancha, con un solo pico, centrada alrededor de cero. Al incrementar aun más la ventana temporal (ventana temporal = 1×10^4 s) se observa una distribución angosta centrada alrededor de E_{prom} en el caso del cuadro B, y centrada en cero, en el caso del cuadro C. Al promediar mayor número de eventos como consecuencia de incrementar el tamaño de la ventana temporal, el ancho de la distribución se hace cada vez menor.

En la *Figura 3.18.B* hay tres fenómenos, separados por la amplitud de la fluctuación y por su frecuencia temporal. En función de lo analizado en la *Figura 3.24* el fenómeno es del estilo de la coalescencia: la detección de dos señales cuando el tiempo de observación es corto con respecto al tiempo de residencia, cuadro C (distribución roja); una señal ancha y distribuida alrededor de cero cuando los dos tiempos son comparables y que representa

las fluctuaciones de energía intermedia, cuadro C (distribución verde); y una señal angosta y situada en el centro, cuando el tiempo de observación es mayor al de las fluctuaciones. En este caso, pueden ocurrir varios procesos que se promedian dando una señal angosta en $\Delta E \sim 0$. Así se presentan las tres escalas temporales características del sistema y a las que obedece la distribución observada para los datos experimentales en la *Figura 3.18*.

El análisis por la FDAC de los saltos de energía no tiene información temporal. Para agregarla se hace necesario observar al sistema en varias escalas temporales. En las condiciones actuales, sin embargo, tal análisis no es posible porque una disminución del tiempo de adquisición de espectros resultaría en un gran incremento del ruido y el tiempo total de observación esta limitado por la fotoestabilidad de la sonda.

3.4 CONCLUSIONES

Debido a su diferencia de polaridad entre el estado excitado y el fundamental, solubilidad en el solvente de trabajo, estabilidad térmica y fotoquímica, RN fue probada para sensar cambios en las interacciones: sonda-caja de polímero de distintos PAMA causada por la temperatura y el espesor de la película polimérica.

Por medio de medidas de *ensamble* de moléculas de colorante, en un espectrofluorímetro convencional, se pudo obtener el espectro de emisión de fluorescencia de RN en matrices poliméricas de hasta 50 nm de espesor con una baja influencia de la dispersión de la luz y de la transferencia de energía electrónica entre estados excitados moléculas en estado fundamental. En

estas condiciones se estudió cualitativamente la dependencia del espectro de emisión con respecto a cuatro factores: la estructura química del polímero (longitud de cadena lateral), la longitud de onda de excitación, la temperatura y el espesor de la película. Los tres primeros afectan la emisión de la sonda de forma significativa y están relacionados con cambios en las interacciones sonda-polímero. El espesor de la película en la escala de los nanómetros no afecta significativamente las propiedades de emisión de la sonda.

Por medio de la espectroscopía de *moléculas únicas* se ha podido detectar el espectro de moléculas de RN en las distintas matrices poliméricas de distinto espesor y a las distintas temperaturas de trabajo. Los espectros adquiridos presentan diferente posición del máximo principal de emisión, intensidad, fotoestabilidad y estructura. Estas diferencias se atribuyeron a la alta sensibilidad de RN para sensor entornos con polaridades diferentes, que se originan en las posibles configuraciones sonda-caja de polímero que estabilizan el estado excitado de RN.

Los espectros de *moléculas únicas* presentaron cambios no solo debido a la localización de la sonda en la matriz sino también en la evolución temporal para una dada localización, observándose fluctuaciones espectrales de baja y alta amplitud (saltos). Las fluctuaciones muestran tres componentes diferentes en la evolución temporal de la energía de emisión, que pueden ser entendidas en términos de la teoría de coalescencia: dos distribuciones con valor medio cero, con desviación estándar diferentes, asociados a procesos que ocurren con tiempos característicos comparables y menores al tiempo de observación (1 s en nuestro caso); y una tercera componente con menor frecuencia y amplitud igual al valor de los saltos de energía (0,13-0,15 eV) que ocurre con tiempo característico mayor al tiempo de observación.

Del análisis de la FDAC se pudo concluir que la frecuencia de los saltos resultó independiente del espesor, longitud de cadena lateral del polímero y temperatura de trabajo. Esto sugiere que los movimientos colectivos parecen no tener influencia en los cambios espectrales de RN y que el origen de los saltos se puede atribuir a características químicas que tienen en común los tres polímeros estudiados. En este sentido se propone que los reajustes en las interacciones sonda-caja de polímero que involucran el carbonilo del polímero sean los responsables de los saltos espectrales y que estos involucran pequeños reajustes en el entorno de la sonda.

3.5 REFERENCIAS

- [1] W. P. Ambrose, P. M. Goodwin, J. C. Martin y R. A. Keller, "Single molecule detection and photochemistry on a surface using near-field optical excitation," *Physical Review Letters*, vol. 72, no. 1, pp. 160–163, 1994.
- [2] W. E. Moerner y L. Kador, "Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid," *Physical Review Letters*, vol. 62, no. 21, pp. 2535–2538, 1989.
- [3] C. Blum, F. Stracke, S. Becker, K. Müllen y A. J. Meixner, "Discrimination and Interpretation of Spectral Phenomena by Room-Temperature Single-Molecule Spectroscopy," *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 105, no. 29, pp. 6983–6990, 2001.
- [4] K. Mongey, J. G. Vos, B. D. Macraith y C. M. McDonagh, "b," *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, vol. 8, pp. 979–983, 1997.
- [5] T. Hagan, D. Pilloud y P. Suppan, "Thermochromic shifts of some molecular and exciplex fluorescence spectra," *Chemical Physics Letters*, vol. 139, no. 6, pp. 499–502, 1987.
- [6] H. Kim, N. Song, T. Park y M. Yoon, "Laser scanning confocal microscope (LSCM)-fluorescence spectral properties of Nile Red embedded in polystyrene film of different thickness," *Chemical Physics Letters*, vol. 432, no. 1–3, pp. 200–204, 2006.
- [7] Y. Hou, A. M. Bardo, C. Martinez y D. a. Higgins, "Characterization of Molecular Scale Environments in Polymer Films by Single Molecule Spectroscopy," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 104, no. 2, pp. 212–219, 2000.
- [8] N. Ghoneim, "Photophysics of Nile red in solution: steady state spectroscopy.," *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, vol. 56, no. 5, pp. 1003–10, 2000.
- [9] T. Gensch, M. Böhmer y P. F. Aramendía, "Single molecule blinking and photobleaching separated by wide-field fluorescence microscopy.," *The Journal of Physical Chemistry: A*, vol. 109, no. 30, pp. 6652–8, 2005.
- [10] R. Zondervan, F. Kulzer, S. B. Orlinskii y M. Orrit, "Photoblinking of Rhodamine 6G in Poly (vinyl alcohol): Radical Dark State Formed through the Triplet," *Journal of Physical Chemistry A*, vol. 107, pp. 6770–6776, 2003.
- [11] R. Zondervan, F. Kulzer, M. A. Kol y M. Orrit, "Photobleaching of Rhodamine 6G in Poly (vinyl alcohol) at the Ensemble and Single-Molecule Levels," *Journal of Physical Chemistry A*, vol. 108, pp. 1657–1665, 2004.

- [12] C. Hellriegel, J. Kirstein, C. Bräuchle, V. Latour, T. Pigot, R. Olivier, S. Lacombe, R. Brown, V. Guieu, C. Payrastra, A. Izquierdo y P. Mocho, "Diffusion of Single Streptocyanine Molecules in the Nanoporous Network of Sol-Gel Glasses†," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 108, no. 38, pp. 14699–14709, 2004.
- [13] A.-Y. Jee, S. Park, H. Kwon y M. Lee, "Excited state dynamics of Nile Red in polymers," *Chemical Physics Letters*, vol. 477, no. 1–3, pp. 112–115, 2009.
- [14] S. Krause, P. F. Aramendia, D. Täuber y C. von Borczyskowski, "Freezing single molecule dynamics on interfaces and in polymers.," *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP*, vol. 13, no. 5, pp. 1754–61, 2011.
- [15] C. Hellriegel, J. Kirstein, C. Bräuchle, V. Latour, T. Pigot, R. Olivier, S. Lacombe, R. Brown, V. Guieu, C. Payrastra, A. Izquierdo y P. Mocho, "Diffusion of Single Streptocyanine Molecules in the Nanoporous Network of Sol-Gel Glasses," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 108, no. 38, pp. 14699–14709, 2004.
- [16] R. D. Priestley, M. K. Mundra, N. J. Barnett, L. J. Broadbelt y J. M. Torkelson, "Effects of Nanoscale Confinement and Interfaces on the Glass Transition Temperatures of a Series of Poly(n-methacrylate) Films," *Australian Journal of Chemistry*, vol. 60, no. 10, pp. 765–771, 2007.
- [17] K. L. Wustholz, D. R. B. Sluss, B. Kahr y P. J. Reid, "Applications of single-molecule microscopy to problems in dyed composite materials," *International Reviews in Physical Chemistry*, vol. 27, no. 2, pp. 167–200, 2008.
- [18] K. Yoshii, S. Machida y K. Horie, "Local free volume and structural relaxation studied with photoisomerization of azobenzene and persistent spectral hole burning in poly(alkyl methacrylate)s at low temperatures," *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, vol. 38, no. 23, pp. 3098–3105, 2000.
- [19] S. Abraham, T. D. Z. Atvars y R. G. Weiss, "Effects of temperature and alkyl groups of poly(alkyl methacrylate)s on inter- and intramolecular interactions of excited singlet states of pyrenyl guest molecules.," *The Journal of Physical Chemistry. B*, vol. 114, no. 38, pp. 12221–33, 2010.

CAPÍTULO 4

DINÁMICA ROTACIONAL DE ENSAMBLE Y MOLÉCULAS ÚNICAS

4.1 INTRODUCCIÓN

Los cambios en las interacciones sonda-polímero se deben a diferentes conformaciones de la caja de polímero y son responsables de las fluctuaciones espectrales en la fluorescencia de Rojo Nilo (energía del máximo de emisión y cambios de intensidad), como se presentó en el capítulo anterior. En este capítulo se estudia otra causa que afecta la emisión de la sonda: *los movimientos rotacionales*, los cuales también contribuyen a fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia.

Mediante el análisis de la fluorescencia polarizada es posible conocer las características de la difusión rotacional de moléculas individuales [1–5]. En la configuración más simple, se analizan las componentes paralela y perpendicular a la dirección de polarización de la irradiación y se obtiene la proyección del momento dipolar de la emisión en un plano, expresando su orientación parcial con el ángulo azimutal. Debido a la geometría del sistema de medición, al utilizar un microscopio como el descrito en la *sección 2.5.2, Capítulo 2* (epi-iluminación), se pierde información de una de las componentes de la emisión. La componente de la polarización paralela a la dirección de propagación de la luz (z) puede determinarse por otras técnicas como imágenes desenfocadas [6] y TIRF [7]. En esta última, la onda evanescente es generada al excitar la muestra con luz por reflexión total interna. Hofkens *et al.* publicaron estudios de orientación de *moléculas únicas* con imágenes desenfocadas que brindan información completa sobre la dinámica y la orientación en 3 dimensiones de cada molécula. En este trabajo los autores estudiaron la orientación de *moléculas únicas* en función de la temperatura alrededor de T_g de PBMA (298 K) de 300 nm. Observaron ocasionalmente saltos de orientación, los cuales se hacen más frecuentes a 315 K [8]. Los resultados obtenidos concuerdan con medidas de *ensamble* de moléculas de colorante.

En este capítulo se presentan los resultados de la dinámica rotacional de sondas fluorescentes en **estado excitado** y en **estado fundamental**. La dinámica se estudió por medio de la anisotropía de fluorescencia de *moléculas únicas* y de *ensamble*, con la sonda embebida en películas de espesor controlado de distintos PAMA. Las rotaciones de sondas fluorescentes que tienen lugar en el **estado excitado** se estudiaron por medidas de espectros de emisión polarizados, en un espectrofluorímetro convencional, y las que tienen lugar en el **estado fundamental**, por

imágenes de emisión polarizada, adquiridas con un microscopio de campo amplio. En muchos casos, el análisis de los datos de microscopía de fluorescencia de medidas de *ensamble* se ve afectado por el fotoblanqueo de la sonda. Por ejemplo, en el análisis de correlación de fluorescencia el fotoblanqueo modifica la intensidad total, generando resultados ficticios [9]. Por este motivo, es importante encontrar una ecuación que conduzca a la resolución del problema de difusión rotacional contemplando el fotoblanqueo en condiciones de irradiación continua linealmente polarizada. En este capítulo se propone un método de resolución del problema y su aplicación a la dinámica de RN en PAMA.¹

4.2 DINÁMICA DE ROTACIÓN EN EL ESTADO EXCITADO

En la *sección 1.2.3.4, Capítulo 1*, se introdujo la anisotropía de fluorescencia como parámetro para describir las interacciones sonda-caja de polímero.

Se adquirieron los espectros de emisión polarizados según se describe en la *sección 2.4.2, Capítulo 2*, y la anisotropía de fluorescencia de estado estacionario se calcula a partir de la *Ec. 1.9*.

¹ Parte de los métodos de análisis de datos usados en este capítulo, se desarrollaron en conjunto con el Lic. Aquiles Carattino, como parte de su trabajo de tesis de licenciatura presentado en el Departamento de Física, UBA.

4.3 DINÁMICA DE ROTACIÓN EN EL ESTADO FUNDAMENTAL

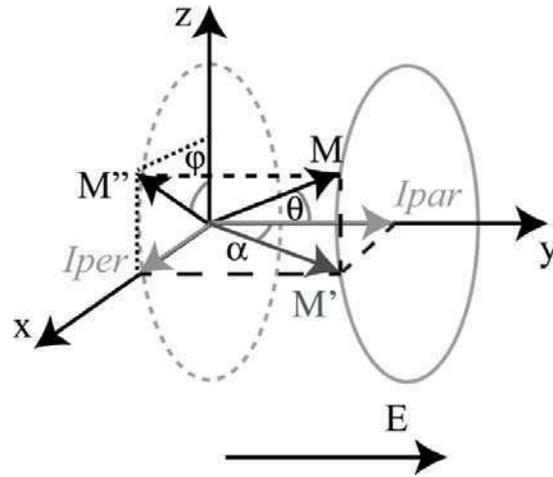
4.3.1 Ensamble de moléculas

Cuando se irradia una muestra con luz linealmente polarizada, E , se produce una fotoselección de las moléculas excitadas debido a que los momentos de transición de excitación, M_A y de emisión, M_E , del fluoróforo están polarizados. A partir de las medidas de anisotropía sólo puede determinarse el ángulo θ entre E y M (se supone, sin pérdida de generalidad como se discute más adelante que, $\beta=0$, siendo β el ángulo entre M_A y M_E). Para caracterizar la orientación de las moléculas del sistema se usa frecuentemente el parámetro de orden, S . En una distribución uniaxial, S se define como el promedio estadístico del polinomio de Legendre de grado 2, $S = \langle P_2(\cos\theta) \rangle = \frac{3}{2}\langle \cos^2\theta \rangle - \frac{1}{2}$. Cuando el sistema tiene una dirección privilegiada existe un orden perfecto y $S=1$, cuando no hay orden $\langle \cos^2\theta \rangle = \frac{1}{3}$ y $S=0$.

Como la irradiación es linealmente polarizada, si ocurre fotoblanqueo (degradación fotoquímica) este también tiene preferencia con la orientación. Por lo tanto, dependiendo del tiempo de rotación y la probabilidad de degradación fotoquímica de la sonda, el fotoblanqueo puede afectar el análisis de la difusión rotacional. A continuación se analizan los posibles casos de dinámica rotacional con y sin efecto del fotoblanqueo.

4.3.1.1 Caso estático sin fotoblanqueo

La orientación espacial de M puede ser descripta por el *Esquema 4.1*.



Esquema 4.1: Sistema de coordenadas que describe la orientación del momento dipolar de transición, \mathbf{M} de la sonda, con excitación linealmente polarizada, \mathbf{E} en la dirección de \hat{y} , con propagación en \hat{z} . Este esquema representa el sistema de coordenadas para microscopía de campo amplio con excitación linealmente polarizada y detección polarizada paralela y perpendicular a la excitación. \mathbf{M}'' es la proyección de \mathbf{M} en el plano xz , y \mathbf{M}' es la proyección de \mathbf{M} en el plano de la platina del microscopio, xy .

Sobre un *ensamble* de moléculas la relación entre la anisotropía de fluorescencia, $r(t)$, y la distribución angular de \mathbf{M} viene dada por:

$$r(t) = \frac{3 \overline{\cos^2 \theta(t)} - 1}{2} \quad \text{Ec. 4.1}$$

donde para el caso de \mathbf{M}_E paralelo a \mathbf{M}_A y excitación linealmente polarizada de una orientación aleatoria de moléculas en el espacio, sin posibilidad de rotar, $\overline{\cos^2 \theta} = \frac{3}{5}$ y $\langle r(t) \rangle = 0,4$ [10]. Éste valor de $\langle r(t) \rangle$ es el valor máximo de anisotropía de *ensamble* que se puede medir en una muestra sin orientación preferencial.

RN puede ser modelada como un elipsoide prolado con el momento de la transición en la dirección del eje largo de la molécula (transición tipo $\pi-\pi^*$) [11]. El *Esquema 4.1* es aplicable a la sonda RN en una matriz de polímero, ya que la orientación de la molécula prácticamente no se modifica entre el proceso de excitación y el de emisión, además, \mathbf{M}_E es prácticamente paralelo a \mathbf{M}_A en este caso. En efecto, $\langle r(t) \rangle$ para RN es cercano a 0,4 en los polímeros estudiados [12].

Una molécula orientada según el *Esquema 4.1* contribuye a las intensidades paralela (I_{par}) y perpendicular (I_{per}) al haz de excitación linealmente polarizado en la dirección y, según las ecuaciones:

$$I_{\text{par}}(\theta, \varphi) \propto \cos^2 \theta \quad \text{Ec. 4.2}$$

$$I_{\text{per}}(\theta, \varphi) \propto \sin^2 \theta \sin^2 \varphi \quad \text{Ec. 4.3}$$

Para un *ensamble* de fluoróforos orientados con función de distribución $f(\theta)$, con simetría cilíndrica respecto del eje y, el número de moléculas orientadas entre θ y $\theta+d\theta$ es proporcional a $f(\theta)d\theta = \sin\theta d\theta$. Entonces la distribución de fluoróforos excitados con luz linealmente polarizada esta dada por:

$$f(\theta)d\theta = \cos^2 \theta \sin\theta d\theta \quad \text{Ec. 4.4}$$

A partir de estas ecuaciones es posible obtener las intensidades totales paralelas y perpendiculares a la excitación, I_{par} e I_{per} respectivamente, en función de la intensidad incidente, para una muestra ubicada sobre la platina de un microscopio con epi-iluminación (simetría uniaxial), con fluoróforos orientados al azar, donde el polímero delgado está ubicado en el plano xy , y se excita la muestra con luz linealmente polarizada en la dirección y , con un haz de luz propagándose en la dirección z y se mide la emisión polarizada en las direcciones x e y . Se tiene para la muestra estática:

$$I_{\text{par}} = I_0 \int_0^{2\pi} d\varphi \int_0^{\pi} \cos^4 \theta \text{sen}\theta d\theta = \frac{4\pi}{5} I_0 \quad \text{Ec. 4.5}$$

$$I_{\text{per}} = I_0 \int_0^{2\pi} \cos^2 \varphi d\varphi \int_0^{\pi} \cos^2 \theta \text{sen}^3 \theta d\theta = \frac{4\pi}{15} I_0 \quad \text{Ec. 4.6}$$

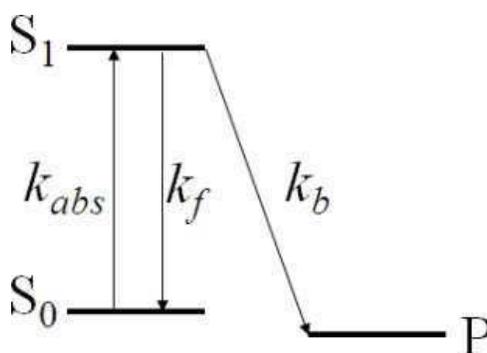
Esta relación indica que experimentos con excitación linealmente polarizada aumentan el contraste entre I_{par} e I_{per} .

$$\frac{I_{\text{par}}}{I_{\text{per}}} = 3 \quad \text{Ec. 4.7}$$

4.3.1.2 Caso estático con fotoblanqueo

El fotoblanqueo es una transición irreversible del fluoróforo a un estado no fluorescente. En este proceso la sonda sufre una transformación química a un producto con una baja probabilidad de absorción o un bajo

rendimiento cuántico de fluorescencia [11] [12], que resulta en una ausencia de emisión. Las causas del fotoblanqueo son múltiples y muy difíciles de caracterizar. En trabajos anteriores se han propuesto sistemas de 5 o 6 niveles electrónicos que incluyen estados oscuros y tripletes para describir, en forma aproximada, las curvas de decaimiento de la intensidad de fluorescencia bajo irradiación continua [15]. Para el análisis de la cinética de fotoblanqueo, en esta tesis se consideró un sistema simplificado con 3 niveles electrónicos, el cual se muestra en el *Esquema 4.2*, donde S_0 corresponde al estado fundamental, S_1 , el estado excitado y P , un estado oscuro:



Esquema 4.2: Sistema de tres niveles considerado para el modelo de fotoblanqueo propuesto. S_0 representa el estado fundamental, S_1 el estado excitado, P el estado fotoblanqueado. Donde k_{abs} , k_f y k_b son las constantes de velocidad (en s^{-1}) de los procesos de absorción, fluorescencia y fotoblanqueo, respectivamente.

Bajo condiciones de excitación linealmente polarizada, la intensidad absorbida, I_a se escribe como $I_a = I_0 \sigma N(\theta, t) \cos^2 \theta$, donde σ es la sección eficaz de absorción molecular, I_0 es el número de fotones incidentes por unidad de área y tiempo, $N(\theta, t)$ es la distribución angular de moléculas en el

estado fundamental (número de moléculas y su orientación) y θ es el ángulo entre la dirección de polarización y \mathbf{M} . Usando la aproximación de estado estacionario para S_I

$$\frac{\partial N(\theta, t)}{\partial t} = -\Phi_b I_0 \sigma \cos^2 \theta N(\theta, t) \quad \text{Ec. 4.8}$$

donde Φ_b es el rendimiento cuántico de fotoblanqueo. La solución para esta ecuación es de la forma [15]:

$$N(\theta, t) = N_0 e^{-(\Phi_b I_0 \sigma \cos^2 \theta) t} \quad \text{Ec. 4.9}$$

En las condiciones de irradiación descritas para el microscopio y para una muestra estática, las intensidades de emisión polarizadas dependen del fotoblanqueo según:

$$I_{\text{par}}(t) = \int_0^{2\pi} N_0 \cos^4 \theta e^{-(\Phi_b I_0 \sigma \cos^2 \theta) t} \sin \theta d\theta \quad \text{Ec. 4.10}$$

$$I_{\text{per}}(t) = \int_0^{2\pi} N_0 \cos^2 \theta \sin^2 \theta e^{-(\Phi_b I_0 \sigma \cos^2 \theta) t} \sin \theta d\theta \quad \text{Ec. 4.11}$$

4.3.1.3 Caso difusional con fotoblanqueo

El blanqueo selectivo de la emisión de sondas que están orientadas en la dirección del vector de campo electromagnético de la luz incidente es responsable, por una vía adicional, del decaimiento de la anisotropía. En el caso que se analiza ahora, se tiene en cuenta el cambio de la orientación por la difusión rotacional de la sonda. Dado que el fotoblanqueo se encuentra siempre presente en experimentos de fluorescencia, la idea principal de este análisis es poder interpretar medidas de conjunto de moléculas que tengan en cuenta la rotación difusional y el fotoblanqueo en condiciones de irradiación polarizada. Más aún, puede considerarse el fotoblanqueo como una fotoselección que hace evidente la difusión rotacional. Combinando las Ec. 4.8 y la ecuación de difusión rotacional [14] se obtiene:

$$\frac{\partial N(\theta, t)}{\partial t} = D \left[\frac{1}{\sin\theta} \cdot \frac{\partial}{\partial \theta} \left(\sin\theta \frac{\partial N(\theta, t)}{\partial \theta} \right) \right] - [\Phi_b I_0 \sigma \cos^2 \theta] N(\theta, t) \quad \text{Ec. 4.12}$$

donde D es el coeficiente de difusión rotacional, suponiendo que la rotación es isotrópica. Cabe recordar que $N(\theta, t)$ corresponde a la distribución en el estado fundamental. Para resolver estas ecuaciones no pueden considerarse soluciones sólo en término de los armónicos esféricos, se deben buscar soluciones que tengan en cuenta la evolución temporal [17] y para la cual se propone en este trabajo

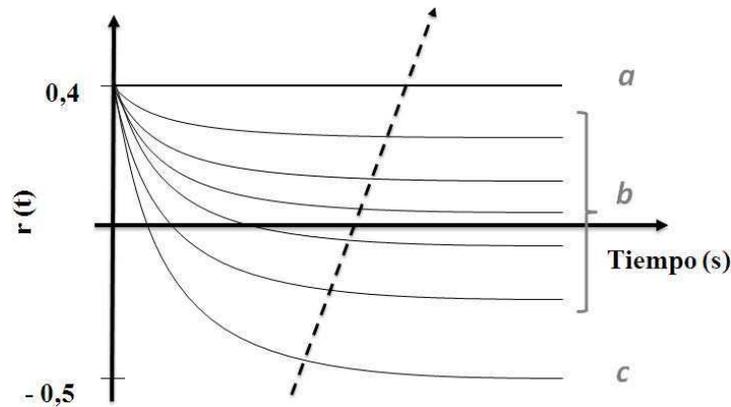
$$N(\theta, t) = \sum_{l=0}^{\infty} C_l(t) \cdot P_l(\cos\theta) \quad \text{Ec. 4.13}$$

donde P_l son los polinomios de Legendre de l -orden y C_l son los coeficientes

dependientes del tiempo. La solución propuesta en la *Ec. 4.13* aplicada a la *Ec. 4.12* lleva a un sistema de ecuaciones diferenciales para los coeficientes:

$$\frac{dC_l}{dt} = -[Dl(l+1) + \phi T_l]C_l - S_{l-2}\phi T_{l-2} - Q_{l+2}\phi C_{l+2} \quad \text{Ec. 4.14}$$

donde $\phi = I_0\sigma\Phi_b$ es una pseudoconstante de primer orden para la velocidad de fotoblanqueo. El desarrollo de las ecuaciones y las expresiones para los coeficientes T, S y Q, que dependen solo de l , se encuentran explicados en el *Apéndice 3.A*.



Esquema 4.3: Dependencia temporal de la anisotropía con la velocidad de reorientación y de fotoblanqueo de la sonda. La flecha indica el incremento en $\frac{D}{\phi}$.

Los distintos casos dinámicos se representan en el *Esquema 4.3*. En éste se muestra la anisotropía esperada teniendo en cuenta que la solución estacionaria depende del compromiso entre la rotación y el fotoblanqueo, D

y ϕ . En el *caso 1*, moléculas sin posibilidad de rotar y en ausencia de fotoblanqueo, $r(t)$ tiene evidentemente un valor constante de 0,4, curva *a*. Si la sonda sufre fotoblanqueo, pero no gira apreciablemente durante el tiempo de observación, $r(t)$ decae hasta un valor mínimo de $-0,5$, con una velocidad de cambio que depende de la potencia de la fuente de excitación (*caso 2*), curva *c*. Este ejemplo no es accesible experimentalmente ya que para alcanzar el valor de $r(t) = -0,5$ todas las moléculas fluorescentes que quedan en el sistema deben estar orientadas en una dirección aproximadamente perpendicular a la luz de excitación, por lo que la probabilidad de excitarlas es casi nula y no se detectan fotones. Si se agrega la rotación con una velocidad apreciable se genera una familia de curvas dependientes de la velocidad de reorientación ($1/6D$) y de fotoblanqueo ($\phi = I_0\sigma\Phi_b$), curvas *b*. Es de notar, que el valor constante de 0,4 para $r(t)$ se obtiene también si la molécula rota muy rápidamente con respecto a la velocidad de fotoblanqueo. En este caso, se mantiene la orientación al azar durante todo el decaimiento, lo que explica el valor de 0,4 (sin rotación en el estado excitado).

Si bien las ecuaciones se resolvieron considerando que $\beta = 0$ y $r_0 = 0,4$, no se pierde generalidad en el análisis, como se explica en la *sección 4.4.2.2*.

4.3.2 Moléculas únicas

La anisotropía de fluorescencia de *moléculas únicas* es una medida estándar de su dinámica rotacional y de la interacción con el entorno. Para determinar la orientación tridimensional de una *molécula única* es necesario conocer los ángulos θ y ϕ . A partir de las medidas de intensidad polarizadas,

I_{per} e I_{par} , solo se puede calcular el ángulo α formado por la proyección de \mathbf{M} en el plano de la muestra, vector \mathbf{M}' en el *Esquema 4.1*, y la dirección de polarización de la luz.

$$\tan^2 \alpha = \frac{1 - r}{1 + 2r} = \frac{I_{\text{per}}}{I_{\text{par}}} \quad \text{Ec. 4.15}$$

$$\alpha = \arctan\left(\sqrt{\frac{I_{\text{per}}}{I_{\text{par}}}}\right) \quad \text{Ec. 4.16}$$

En el caso de moléculas individuales, la anisotropía carece del significado estadístico que posee en un conjunto grande de moléculas y en este caso debe ser analizado como una medida de la relación de intensidades. La ventaja de usar el parámetro r , sobre la relación de intensidades, es que el primero está acotado entre 1 y $-0,5$, mientras que $\tan^2 \alpha$ va de cero a infinito.

En los sistemas estudiados el tiempo de vida del estado excitado del fluoróforo es mucho menor que el tiempo característico de las rotaciones. De esta forma la emisión ocurre en la misma orientación molecular en la que tuvo lugar la absorción de luz. Debido a esto, los resultados mostrados en la *sección 4.4.2* corresponden a movimientos de la sonda en su estado fundamental, entre excitaciones sucesivas de la misma molécula y no son aquellos causantes de la despolarización en el estado excitado [18].

4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.1 Condiciones experimentales: dinámica de rotación en el estado excitado

4.4.1.1 Adquisición de espectros y ajuste

Las muestras se preparan según se indican en el *Capítulo 2, sección 2.2.2*. Al igual que en el estudio de REE, las muestras se midieron en atmósfera de N_2 y se estabilizaron a la temperatura de trabajo durante 20 min, previo al inicio de las mediciones. Se prepararon películas de PBMA, PiBMA, PEMA y PMMA de 50 nm, 100 nm y 200 nm de espesor. Las sondas estudiadas fueron R6G, RN, 4-AP y $Ru(bpp)_3^{+2}$.

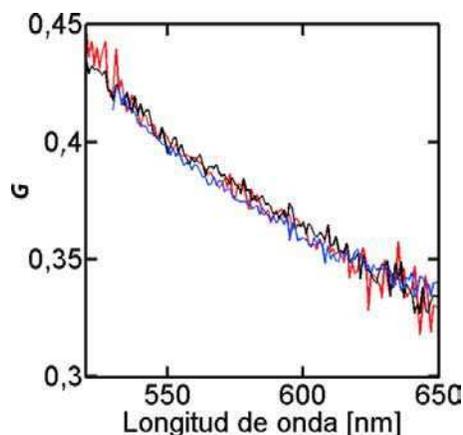


Figura 4.1 Espectro del factor de corrección de la anisotropía, G vs. λ_{em} del monocromador de emisión, obtenido con una muestra de R6G en PEMA de 350 μm de espesor (línea gris claro), con una solución de Rosa de Bengala en tolueno (línea negra) y con una solución de RN en tolueno (línea gris).

En el cálculo de la anisotropía es necesario obtener el factor G del equipo en función de la longitud de onda. Este debe ser calculado en base a espectros que sean libres de luz espuria. G depende solo del sistema de detección y es independiente de la muestra, por esto, para asegurar un buen valor de G , se lo obtuvo a partir de los espectros polarizados, I_{HH} e I_{HV} (ver *Capítulo 2, Ec. 2.2*), para una solución del colorante en tolueno y para colorantes en películas gruesas, *Figura 4.1*.

Para la determinación de la anisotropía estacionaria, $r(\lambda)$, se adquieren cuatro espectros, $I_{VV}(\lambda)$, $I_{VH}(\lambda)$, $I_{HH}(\lambda)$ y $I_{HV}(\lambda)$, según se detalló en el *Capítulo 2, sección 2.4.2*. Los espectros de RN se adquirieron a $\lambda_{exc} = 500$ nm y para disminuir la luz espuria proveniente de la excitación se utilizó un filtro Schott OG515 en la detección. Para R6G las condiciones fueron: $\lambda_{exc} = 490$ nm y un filtro GG495 en la detección. La apertura de rendijas de excitación y emisión correspondió a un ancho de banda de 6 nm y 8 nm, respectivamente, y el tiempo de integración se fijó en 2 s/nm. Los valores de $r(\lambda)$ obtenidos en función de λ_{em} se promediaron entre $\lambda_{max}+5$ nm y $\lambda_{max}+20$ nm. En este intervalo, la señal es suficientemente alta, está menos afectada por la dispersión y se observa que $r(\lambda)$ permanece prácticamente constante.

La componente dispersiva presente en los espectros de emisión polarizada, se minimizó usando como referencia la dispersión de una película sin colorante, adquirida en las mismas condiciones que la muestra.

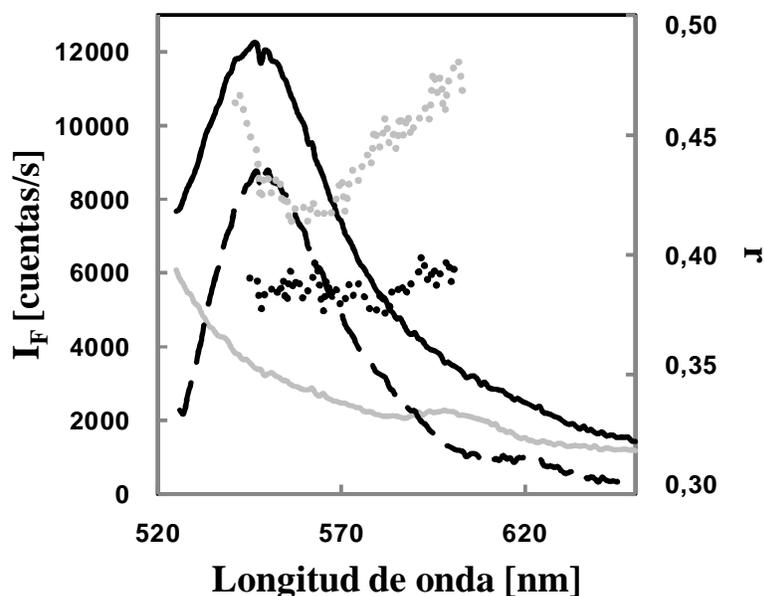


Figura 4.2: Eje de la izquierda: Intensidad de fluorescencia polarizada, I_{VV} (línea continua), dispersión del blanco de polímero sin colorante (línea gris), intensidad corregida por dispersión (línea cortada) para R6G en PEMA de 50 nm de espesor excitando a 500 nm. Eje de la derecha: Anisotropía calculada a partir de datos crudos (puntos grises) y corregidos (puntos negros). $r=0,43$ (std=0,02) y $r=0,38$ (std=0,01), respectivamente; calculado entre 555 y 575 nm.

En la Figura 4.2 se muestra el espectro de la luz dispersada (línea gris continua, polarizado) obtenido con una muestra sin colorante; el espectro de I_{VV} de R6G en PEMA de 200 nm de espesor sin corregir (línea negra continua) y corregido por la dispersión (línea negra cortada). El valor medio de $r(\lambda)$ sin corregir por dispersión y usando G obtenido en iguales condiciones (puntos grises) es de 0,43 (std=0,02), luego de corregir y usando G libre de dispersión (Figura 4.1), $r = 0,38$ (std=0,01), puntos negros.

4.4.1.2 Medidas preliminares

Se probaron sondas con tiempos de vida de estado excitado mayor que RN y R6G: tal son los casos de 4-AP y $\text{Ru}(\text{bpp})_3^{2+}$. Al permanecer más tiempo en el estado excitado tienen una ventana temporal mayor que permite sensar eventos que generen cambios en anisotropía menos frecuentes. Además tienen un gran corrimiento de Stokes, lo cual disminuye el efecto de la dispersión en los espectros de emisión. 4-AP tiene un tiempo de vida del estado excitado en matrices poliméricas de PAMA de ~ 18 ns [19] y $\text{Ru}(\text{bpp})_3^{2+}$ de ~ 5 μs [20].

En el caso de 4-AP, como se mencionó en el *Capítulo 3*, no es adecuada ya que a las concentraciones necesarias se forman especies adicionales al monómero.

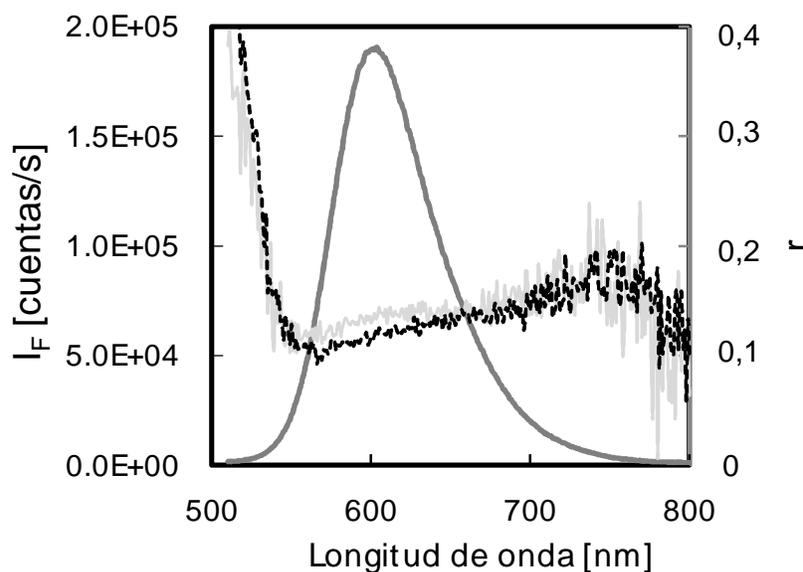


Figura 4.3: Espectro de emisión (I_{VV}) de $\text{Ru}(\text{bpp})_3^{2+}$ ($\lambda_{\text{exc}} = 480$ nm) embebida en PMMA de espesor micrométrico. Anisotropía de emisión a 298 K (línea gris) y 363 K (línea negra).

La anisotropía de emisión de $\text{Ru}(\text{bpp})_3^{2+}$ se siguió en función de la temperatura en una película de PMMA de espesor micrométrico, *Figura 4.3*. La sonda posee una anisotropía máxima cercana a 0,1 y esto hace que sea una sonda poco adecuada para estudios de anisotropía de emisión en polímeros. El bajo valor de $r(\lambda)$ puede deberse a que la transición electrónica tiene lugar entre estados doblemente degenerados por la alta simetría de la sonda o a que el ángulo entre los momentos de absorción y de emisión es grande debido a que están involucrados diferentes estados electrónicos.

Por las razones expuestas, se descartó el uso de estas sondas.

4.4.2 Condiciones experimentales: dinámica de rotación en el estado fundamental

4.4.2.1 Preparación de muestras

Se utilizó PMMA, PEMA, PBMA y RN. Las películas de PAMA de 25 nm y 200 nm se prepararon por la metodología especificada en *Capítulo 2* sobre cubreobjetos de vidrio. Las mediciones se llevaron a cabo de dos formas diferentes: *moléculas únicas* y *ensamble*. En ambos casos se usó irradiación linealmente polarizada. En las medidas de *ensamble*, la concentración de colorante fue de 10^{-7} mol RN/kg de polímero. Para moléculas individuales la concentración fue de 10^{-12} mol RN/kg de polímero con irradiación estroboscópica.

4.4.2.2 Instrumentación

Las mediciones de ensamble y de moléculas individuales fueron realizadas con el mismo equipo. A un microscopio Olympus IX-71 invertido, con un sistema de filtros adecuados para la excitación y colección de la emisión de RN, se le agregó un polarizador y una lámina retardadora de cuarto de onda en la excitación para lograr luz linealmente polarizada (relación de ejes para luz elíptica: 1/200). Ver *Capítulo 2, Esquema 2.4*.

En esta configuración, el movimiento de la rueda de filtros es el limitante en la velocidad de adquisición de imágenes, siendo de aproximadamente 150 ms por desplazamiento. Debido a que los cambios en la orientación informados en la literatura ocurren en escalas temporales del orden de las decenas de segundos, la limitación en el tiempo de adquisición no afecta las medidas de dinámica rotacional [21]. Se tuvo en cuenta la diferencia de sensibilidad del sistema de detección a las distintas polarizaciones de la luz, factor G . Para determinarlo se midió la anisotropía de muestras de concentración alta en un espectrofluorímetro obteniéndose $\langle r(t) \rangle \sim 0,4$. Con este valor se calculó el factor G del microscopio, a partir del registro de I_{par} e I_{per} con esta misma muestra en el microscopio. La anisotropía se calculó usando las imágenes sucesivas paralelas y perpendiculares a la dirección de excitación. Para corregir $r(t)$ por el ruido de fondo (B) se utilizó la *Ec. 4.17*,

$$r(t) = \frac{I_{par} - B - G(I_{per} - B)}{I_{par} - B + 2G(I_{per} - B)} \quad \text{Ec. 4.17}$$

El valor de B se obtuvo de diferente forma en las medidas de *moléculas únicas* y en las de *ensamble* según se explica en las secciones siguientes.

La teoría descrita en las secciones anteriores supone que E es una onda plana, al igual que la emisión. Sin embargo, como la luz es enfocada sobre la muestra por una lente, puede ocurrir que la polarización medida disminuya respecto de la real. Esto es debido a que cada componente de la emisión en la dirección los ejes del sistema de coordenadas, tiene contribuciones de las otras componentes que dependen de la AN y afectan la anisotropía de una manera compleja [22–26]. En este trabajo no se ha tenido en cuenta la influencia de la AN del objetivo en la intensidad polarizada detectada ya que se priorizó la capacidad de los objetivos con alta AN de coleccionar mayor cantidad de fotones para mejorar la relación señal/ruido. $AN > 1$ pueden introducir contribuciones de la componente z de la intensidad en la componente x - y .

4.4.2.3 Adquisición de imágenes de moléculas únicas

Un problema común en la espectroscopía de moléculas únicas es el fotoblanqueo de la sonda cuando es necesario seguir trayectorias temporales largas. Incluso la sonda más estable no puede perdurar durante periodos largos bajo la irradiación continua de un experimento típico de *moléculas únicas*. Para esto se resolvió interrumpir la excitación y así disminuir la importancia del fotoblanqueo. Se irradió durante 1,1 s seguidos de oscuridad por 10,0 s, permitiendo seguir moléculas hasta 1,5 horas sincronizando la adquisición con la excitación. La potencia de irradiación fue de 0,60 mW

medida sobre un portaobjeto a la salida del objetivo con un medidor de potencia (FieldMaster-Coherent) y un fotodiodo como sensor (LM 2-vis, Coherent). Durante el tiempo de irradiación se adquieren secuencias de imágenes, donde los cuadros impares corresponden a la intensidad de fluorescencia paralela a la dirección del campo eléctrico del haz de excitación, I_{par} ; y los pares a la intensidad perpendicular, I_{per} .

En la *Ec. 4.17*, B se determinó con la función *gaussf* de la librería *DipImage* de Matlab. Debido a que la excitación no es homogénea en toda el área iluminada, es necesario considerar un valor de B gaussiano en las dos dimensiones espaciales, para evitar subestimar o sobreestimar el ruido.

4.4.2.4 Adquisición de imágenes de ensamble

La adquisición se llevó a cabo de forma similar a la utilizada en el sistema para medidas de *moléculas únicas*. Se excitó de manera continua adquiriéndose imágenes consecutivas de I_{par} e I_{per} . El tiempo de exposición y la ganancia se variaron según la concentración de RN para ajustar la intensidad máxima dentro del intervalo lineal de la CCD. La potencia de la luz incidente sobre la muestra se varió entre 0,04 y 0,80 mW. Las medidas se repitieron en al menos tres zonas distintas de cada polímero y los resultados obtenidos fueron reproducibles.

En el análisis de anisotropía, B se consideró como un valor constante adquirido en una muestra sin colorante (*Ec. 4.17*).

4.4.2.5 Análisis de resultados

El procesamiento de imágenes se llevó a cabo con rutinas escritas en Matlab. En el análisis de *moléculas únicas*, se identifican los puntos brillantes en las imágenes fijando un valor umbral de intensidad. Si el entorno inmediato de este punto tiene por lo menos 4 píxeles adyacentes con intensidad por encima del umbral, se lo considera como la emisión de una molécula. Con estos datos se genera una “máscara” con la posición de los centros del conjunto de píxeles brillantes y se aplica a toda la secuencia temporal. En algunos casos hay moléculas que no se encuentran en un estado emisoro al principio de la medición, entonces, es necesario repetir la generación de la máscara en alguna imagen intermedia de la secuencia, sin considerar las posiciones ya identificadas en la primera máscara.

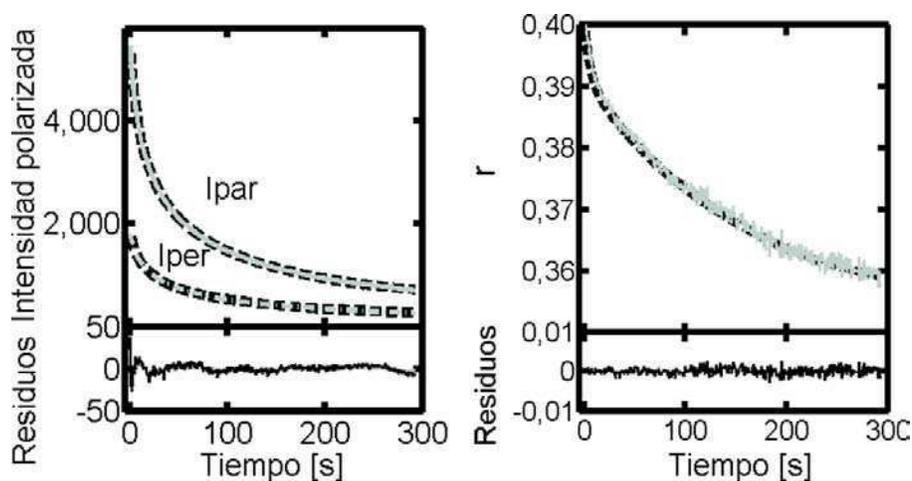


Figura 4.4: A) Cuadro superior: Decaimiento temporal de la intensidad de emisión paralela y perpendicular de RN en PMMA 200 nm (línea gris) y ajuste multi-exponencial (línea punteada). Cuadro inferior: residuos. B) Cuadro superior: Evolución temporal de la anisotropía y ajuste. Línea continua gris: datos experimentales. Línea punteada negra: ajuste. Factor $G = 0,450$, $B = 400$ cuentas. Cuadro inferior: residuos.

En las medidas de *ensamble*, para descartar efectos en el valor de $r(t)$ debido al corrimiento temporal en la adquisición de I_{par} e I_{per} , se ajustaron operativamente las curvas de decaimiento de estas intensidades con sumas de exponenciales y se calculó $r(t)$ a partir de los valores ajustados a un mismo tiempo, *Figura 4.4*.

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Dinámica de rotación en el estado excitado

En la *Figura 4.5.A* se muestra el cambio relativo de la anisotropía de emisión con la temperatura para RN embebido en una película de PBMA de 50 nm, 100 nm y 200 nm de espesor. Este comportamiento es similar al encontrado cuando se utiliza R6G como sonda, *Figura 4.5.B*.

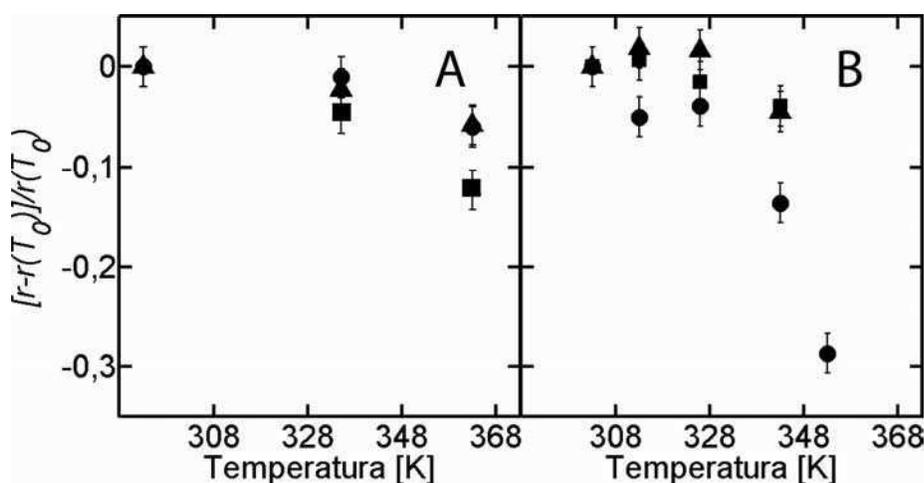


Figura 4.5: A) Cambio relativo de la anisotropía en función de la temperatura, respecto del valor a $T_0 = 293$ K para RN y B) R6G en PBMA. Espesor de películas: 50 nm (triángulos), 100 nm (círculos) y 200 nm (cuadrados).

No se observa una dependencia con el espesor de la película y el cambio en la anisotropía ocurre para ambas sondas a $T \sim 327$ K, aproximadamente 30 K por encima de T_g del polímero.

Este mismo experimento se llevó a cabo en matrices poliméricas de 100 nm de espesor de PBMA, PiBMA y PEMA, *Figura 4.6*. La intensidad de la señal de fluorescencia adquirida en PBMA es menor que en PiBMA y PEMA a medida que se incrementa la temperatura del sistema, esto se debe a que moléculas en entornos menos restrictivos presentan mayor movilidad y degradación fotoquímica [27–29]. El cambio en la dinámica de RN en las matrices estudiadas se registra aproximadamente a 30 K por encima de la respectiva T_g en cada polímero: 327 K en PBMA ($T_g = 298$ K), 348 K para PiBMA ($T_g = 334$ K) y no se observa cambio en PEMA hasta 365 K ($T_g = 334$ K).

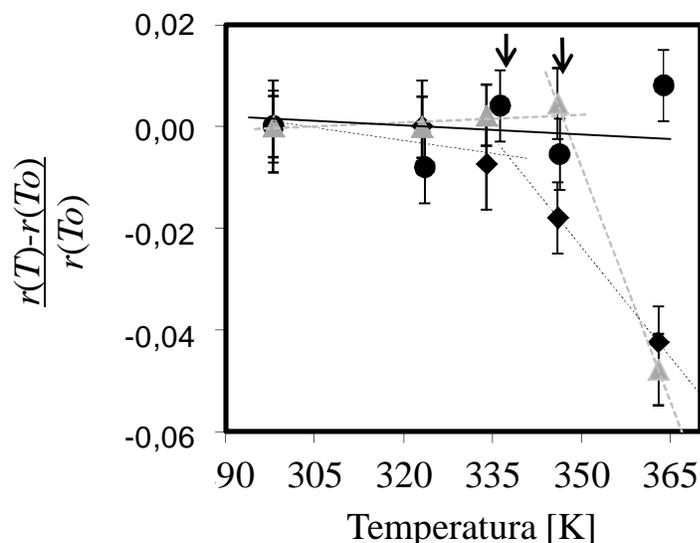


Figura 4.6: Variación de la anisotropía en función de la temperatura para RN en PBMA (rombos), PiBMA (triángulos) y PEMA (círculos) de 100 nm de espesor. Los ajustes lineales se representan con una línea continua para PEMA, línea punteada gris para PiBMA, y línea punteada negra para PBMA. Las flechas indican la intersección de las rectas para PBMA y PiBMA.

4.5.2 Dinámica de rotación en el estado fundamental

4.5.2.1 Fluctuaciones de la orientación de moléculas individuales

4.5.2.1.1 Análisis de trazas temporales de intensidad polarizada y anisotropía de moléculas únicas

La Figura 4.7 muestra una imagen de la intensidad de fluorescencia de RN en PMMA de 200 nm de espesor. Debido a la baja concentración de colorante y la alta sensibilidad de la CCD es posible distinguir la emisión de moléculas individuales como puntos brillantes dentro del área iluminada.

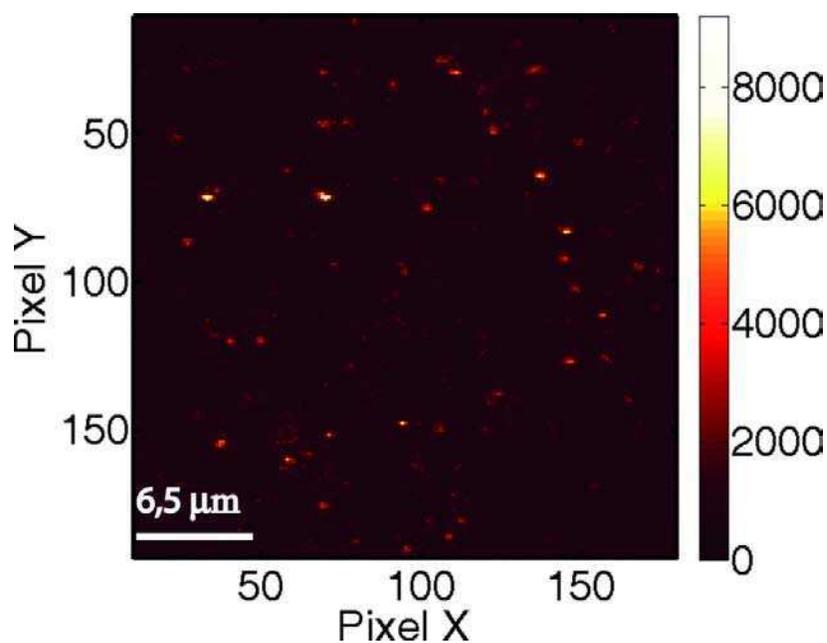
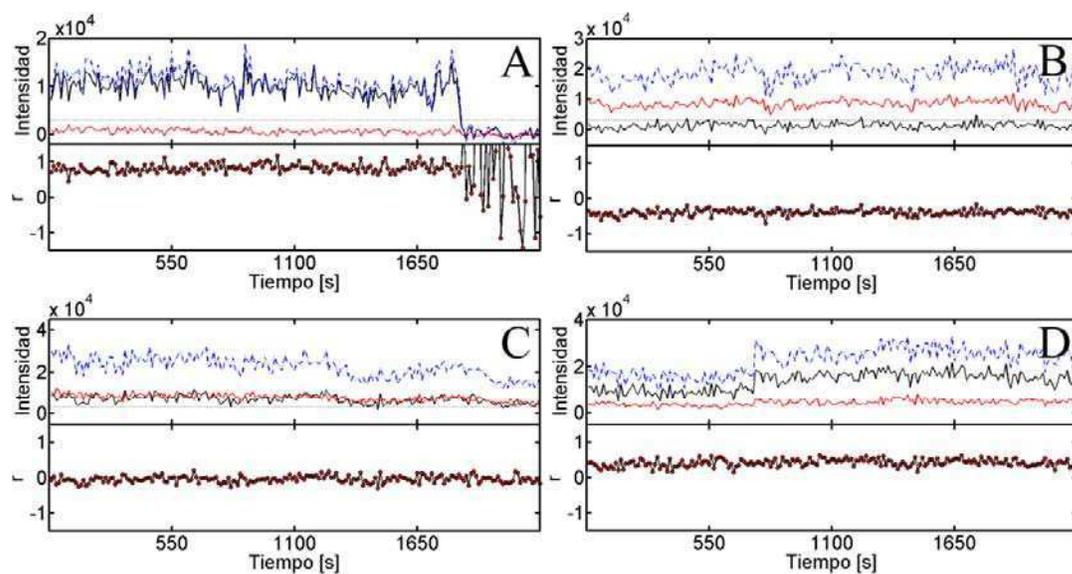


Figura 4.7: Imagen de emisión de fluorescencia paralela a la dirección de polarización de excitación de moléculas únicas de RN en una película de PMMA de 200 nm de espesor, $\lambda_{exc}=532$ nm, tiempo de exposición=100 ms.

PMMA



PBMA

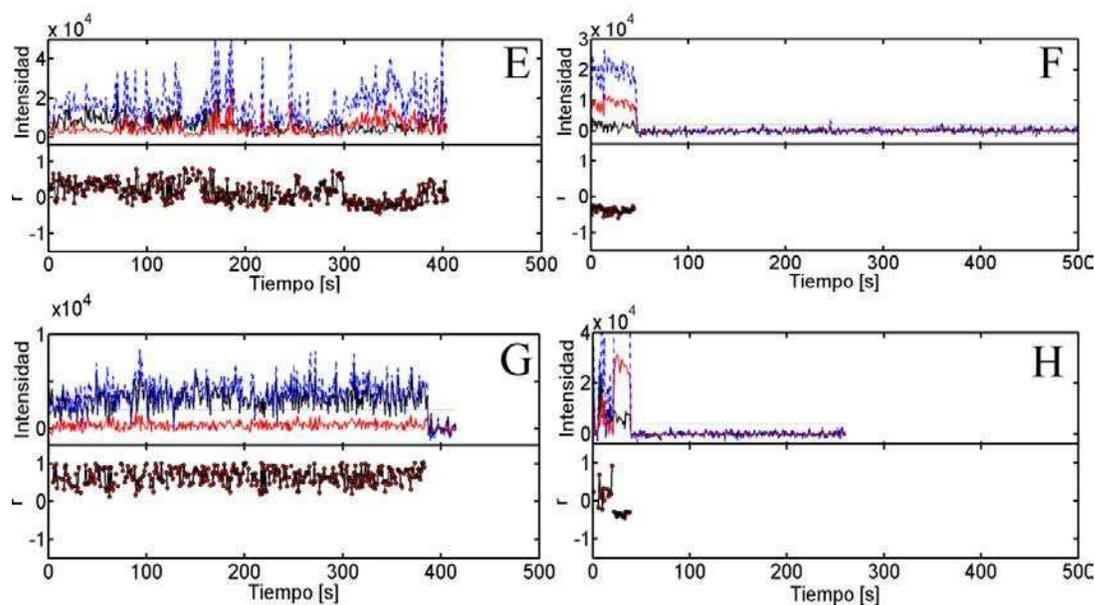


Figura 4.8: Ejemplos del comportamiento temporal de la anisotropía de moléculas únicas de RN en PMMA de 200 nm de espesor (Cuadros A–D) y de PBMA de 200 nm de espesor (Cuadros E–H) a 296 K bajo excitación linealmente polarizada. Para cada molécula única: Gráfico superior: variación temporal de la I_{tot} (línea gris punteada), I_{par} (línea negra) e I_{perG} (línea gris continua, $G=0,45$). Gráfico Inferior: traza temporal de la anisotropía.

Para minimizar efectos de ruido se fijó un valor umbral de intensidad (3000 cuentas/cuadro, $\sim 3,5$ veces el ruido de fondo en la intensidad total) a partir del cual se considera que la molécula está emitiendo. Es importante notar que al incluir esta restricción adicional no se estudian todas las posiciones posibles en la semiesfera de orientaciones.

En las *Figura 4.8* se presentan secuencias temporales de la intensidad paralela, I_{par} , perpendicular, I_{per} , total, I_{tot} (gráfico superior) y de la anisotropía, $r(t)$ (gráfico inferior) de *moléculas únicas* de RN embebidas en películas de PMMA (Cuadros A–D) de 200 nm de espesor a 296 K y de PBMA de 200 nm de espesor a 296 K (Cuadros E–H). Según la *Ec. 4.17* la anisotropía para una *molécula única* puede abarcar valores entre 1,0 ($I_{\text{per}}=0$) y $-0,5$ ($I_{\text{par}}=0$). Se observa que las fluctuaciones temporales de la anisotropía de RN en PMMA son pequeñas y el valor de $\langle r(t) \rangle$ es prácticamente constante. En las *Figuras 4.8.A* y *4.8.B* la anisotropía de una *molécula única* alcanza los valores extremos. En la *Figura 4.8.A*, a tiempo ~ 1800 s la molécula es fotoblanqueada e I_{par} e I_{per} son nulas, como consecuencia a partir de los 1800 s la anisotropía presenta fluctuaciones ficticias que no son tenidas en cuenta para el análisis.

En la *Figura 4.8.C* $\langle r(t) \rangle \sim 0$, este valor de anisotropía puede deberse a entornos que presentan una movilidad alta y en promedio $\langle r(t) \rangle \sim 0$ o al caso en que I_{par} e I_{per} son iguales y con baja movilidad. En este ejemplo, se optó por la interpretación de orientación fija, $I_{\text{par}} \sim I_{\text{per}} G$, porque las fluctuaciones tienen una desviación estándar similar a la de los ejemplos anteriores.

En la *Figura 4.8.D* $\langle r(t) \rangle$ permanece constante con un valor medio de 0,41 y una desviación estándar de 0,10. Aproximadamente a los 700 s se observa un salto de intensidad que no modifica $\langle r(t) \rangle$ esto puede deberse a

una reorientación de \mathbf{M} fuera del plano de la muestra. No se debe a un cambio en la intensidad del laser de excitación ya que no se registra en otras moléculas observadas al mismo tiempo. Sin embargo por lo estudiado en el *Capítulo 3*, el aumento de intensidad también puede deberse a un cambio de polaridad del entorno. En entornos no polares RN aumenta el rendimiento cuántico de fluorescencia, por lo tanto, la intensidad de emisión [30]. Las fluctuaciones espectrales y de orientación pueden o no estar correlacionadas [31].

En la *Figura 4.8.E-H*, se muestra el comportamiento dinámico rotacional de *moléculas únicas* de RN en PBMA de 200 nm de espesor. En este polímero, $\langle r(t) \rangle$ muestra fluctuaciones de la orientación mayores a las mostradas en PMMA de igual espesor. Además, estas fluctuaciones se producen alrededor de valores medios diferentes. Por ejemplo, en el cuadro E, hasta aproximadamente 300 s, $r(t)$ muestra fluctuaciones grandes de la orientación, luego, $r(t)$ disminuye de forma abrupta y la proyección de \mathbf{M} en el plano xy oscila entre posiciones cercanas. En el cuadro F, se muestra una *molécula única* que emite durante 50 s con amplitud de fluctuaciones similar a la de RN en PMMA. En el cuadro H, otra molécula emite durante 50 s antes del fotoblanqueo. Durante el tiempo de emisión sufre un cambio abrupto en la dinámica.

En la *Figura 4.9* se presenta la evolución temporal de las intensidades, anisotropía y del ángulo α para una *molécula única* de RN en PMMA de 200 nm de espesor. Se observa un cambio en el valor de anisotropía de 0,21 ($std = 0,04$) a 0,83 ($std = 0,06$).

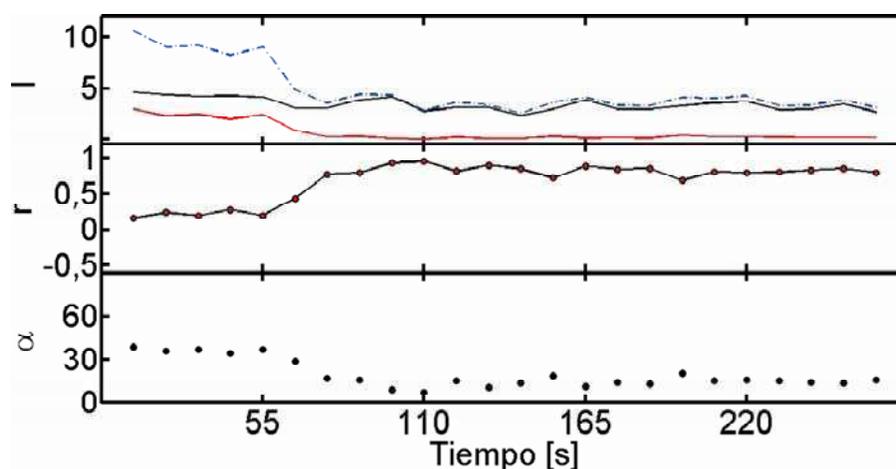


Figura 4.9: Superior: variación temporal de la I_{tot} (línea gris punteada), I_{par} (línea negra) e $I_{\text{per}}G$ (línea gris continua, $G=0,45$) para una molécula única de RN en película de PMMA de 200 nm de espesor a 296 K bajo excitación linealmente polarizada a 532 nm. Central: traza temporal de la anisotropía. Inferior: evolución temporal del ángulo α .

En general las fluctuaciones de orientación de RN en PMMA son de baja amplitud, demostrando entornos rígidos. El comportamiento de la sonda en PBMA es diferente. Se encuentran frecuentemente entornos con dinámica diferentes. Incluso es posible que la dinámica de un entorno cambie en el tiempo de observación. En la *Figura 4.10* una *molécula única* de RN embebida en PBMA de 25 nm de espesor muestra un cambio en la dinámica rotacional. Al inicio de la medición la molécula se encuentra en un estado *oscuro*, a los 1600 s pasa al estado *emisor* con $\langle r(t) \rangle = -0,01$ ($std = 0,19$). A los 1900 s disminuye su movilidad con cambio en la anisotropía a $\langle r(t) \rangle = 0,07$ ($std = 0,09$). Este ejemplo es similar al mostrado en la *Figura 4.8.E y H* para PBMA de 200 nm de espesor.

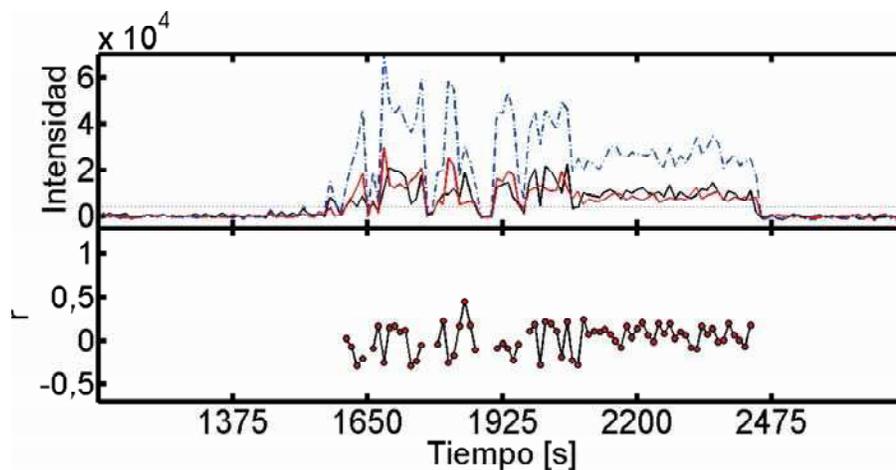


Figura 4.10: Superior: variación temporal de la I_{tot} (línea gris punteada), I_{par} (línea negra) e I_{perG} (línea gris continua) para una molécula única de RN en PBMA de 25 nm de espesor a 296 K bajo excitación linealmente polarizada a 532 nm. Inferior: traza temporal de la anisotropía.

El coeficiente de difusión rotacional depende de la frecuencia de las fluctuaciones y de la amplitud de las mismas. Amplitudes grandes con frecuencias bajas pueden conducir a un mismo valor de D que amplitudes pequeñas con frecuencias altas. En la *Figura 4.11* se muestran dos trazas temporales de RN en PBMA de 200 nm de espesor, que son representativas de los casos observados. Se presentan dos entornos, uno con rigidez alta, B (triángulos), $std = 0,09$, y otro con movilidad alta, A (círculos), $std = 0,33$ que experimentan reordenamientos con frecuencias muy diferentes. La *molécula única A* presenta $\Delta r_{\text{max}}=1,07$ entre puntos sucesivos, mientras que la *B* tiene $\Delta r_{\text{max}}=0,07$.

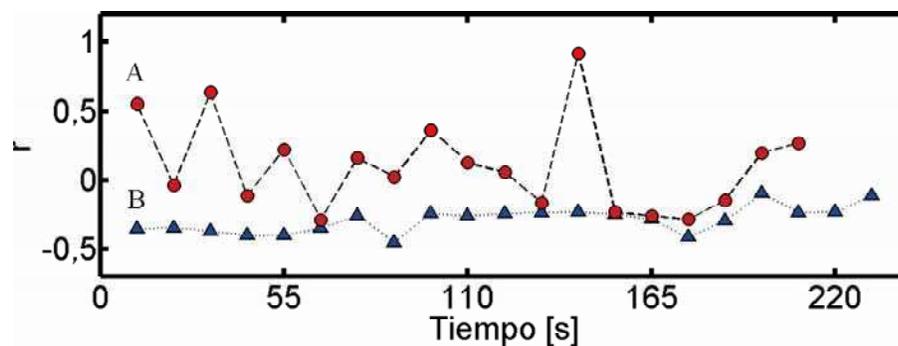


Figura 4.11: Anisotropía de emisión de dos moléculas de RN en PBMA de 200 nm de espesor a 296 K. La molécula A (círculos) tiene una dinámica mayor que la molécula B (triángulos).

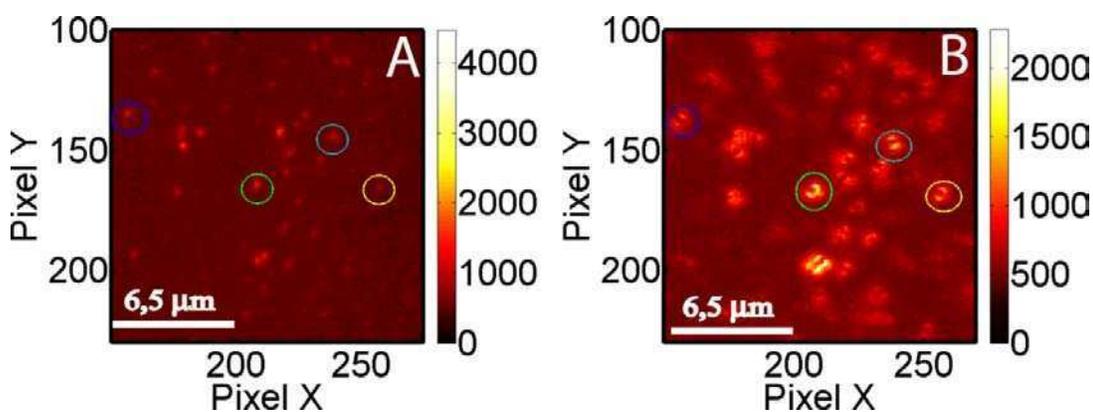


Figura 4.12: Efecto del desenfoque en la imagen de fluorescencia del dipolo de la transición para RN en PMMA de 200 nm de espesor, adquiridas con excitación circularmente polarizada, tiempo de exposición: 100 ms. A: imagen sin desenfocar. B: imagen desenfocada de la misma región de la muestra. Los círculos de colores resaltan moléculas con orientación angular diferente.

En los resultados presentados se puede observar que existen comportamientos dinámicos distintos entre moléculas en una misma muestra. Por medio de α se puede conocer la orientación de la proyección en el plano x - y de \mathbf{M} . Por otro lado, a través del estudio de imágenes

desenfocadas es posible obtener información de la orientación total de \mathbf{M} [6], [32]. Excitando con luz circularmente polarizada y con un ligero desenfoque de la imagen (0,5 a 1 μm) se puede obtener información de la orientación de una *molécula única* en las tres dimensiones. Las imágenes desenfocadas muestran la distribución espacial angular de la radiación del dipolo de emisión (*Figura 4.12*).

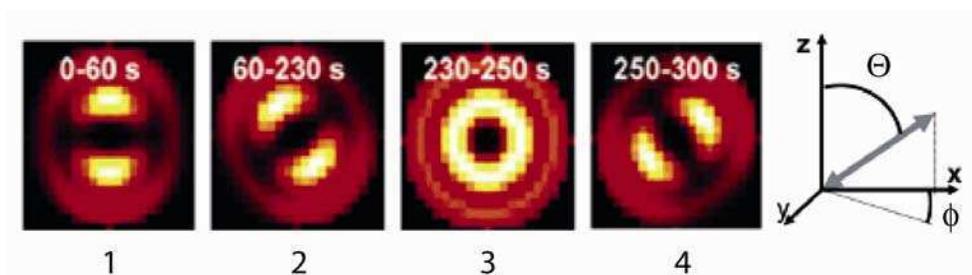


Figura 4.13: Series de patrones de emisión simulados para imágenes desenfocadas (1 μm de desenfoque). Los ángulos son para el primer patrón: $\Theta = 90^\circ$ y $\phi = 0^\circ$, para el 2do: $\Theta = 90^\circ$ y $\phi = 45^\circ$, 3ro: $\Theta = 0^\circ$ y $\phi = 0^\circ$ y para el 4to: $\Theta = 90^\circ$ y $\phi = 135^\circ$. Imagen tomada de la referencia [33]. El programa en Matlab para realizar las simulaciones se encuentra disponible en la página web del grupo del Dr. Jörg Enderlein: <http://www.joerg-enderlein.de/research/current-projects/imaging-of-single-molecules.html>.

En la *Figura 4.12* dos imágenes de la misma zona de irradiación muestran el cambio en el patrón de emisión que se obtiene al desenfocar el haz de excitación sobre la muestra. Con círculos de distinto color se marcan *moléculas únicas* con diferentes orientaciones de \mathbf{M} . En la figura se muestra una imagen sin desenfocar, A, y la misma imagen desenfocada, B, adquirida 4 s después.

Contando con simulaciones del patrón de emisión del dipolo de una

molécula única con distintas orientaciones, como los mostrados en la *Figura 4.13*, es evidente que las orientaciones de \mathbf{M} entre las moléculas en la *Figura 4.12* son diferentes, mostrando una alta heterogeneidad espacial, sin una orientación preferencial. Si bien existen programas accesibles para obtener la orientación a partir de este tipo de imágenes, el proceso es bastante demandante y se eligió usar luz linealmente polarizada, que aumenta el contraste, y analizar las trazas temporales de $r(t)$ como se describe a continuación.

Existen trabajos en la literatura, computacionales [34–36] y experimentales [37–41] donde se informa que el comportamiento dinámico de las interfaces aire/polímero y polímero/sustrato es muy diferente entre sí. En experimentos de *moléculas únicas* por microscopía confocal y de campo amplio la distancia que se excita en la dirección transversal al sustrato es mayor al espesor de las películas poliméricas estudiadas (25 nm–200 nm). Por esto no ha sido posible atribuir las diferencias en la dinámica de *moléculas únicas* a una posición específica en la dirección z de la matriz.

4.5.2.1.2 Análisis por la función de distribución acumulada de las fluctuaciones de orientación

Los resultados de anisotropía de *moléculas únicas* se analizaron en forma análoga a los resultados de fluctuaciones espectrales del *Capítulo 3*. Para ello, primero se calcularon las diferencias de anisotropía de imágenes sucesivas en las trazas temporales de cada una de las moléculas. Luego se computó la función de distribución acumulada complementaria del cuadrado de las diferencias de anisotropía, $\Phi_c(\Delta r^2)$, según la *Ec. 4.18*,

$$\Phi_c(\Delta r^2) = 1 - \int_0^{\Delta r^2} f(\Delta r^2) d\Delta r^2 \quad \text{Ec. 4.18}$$

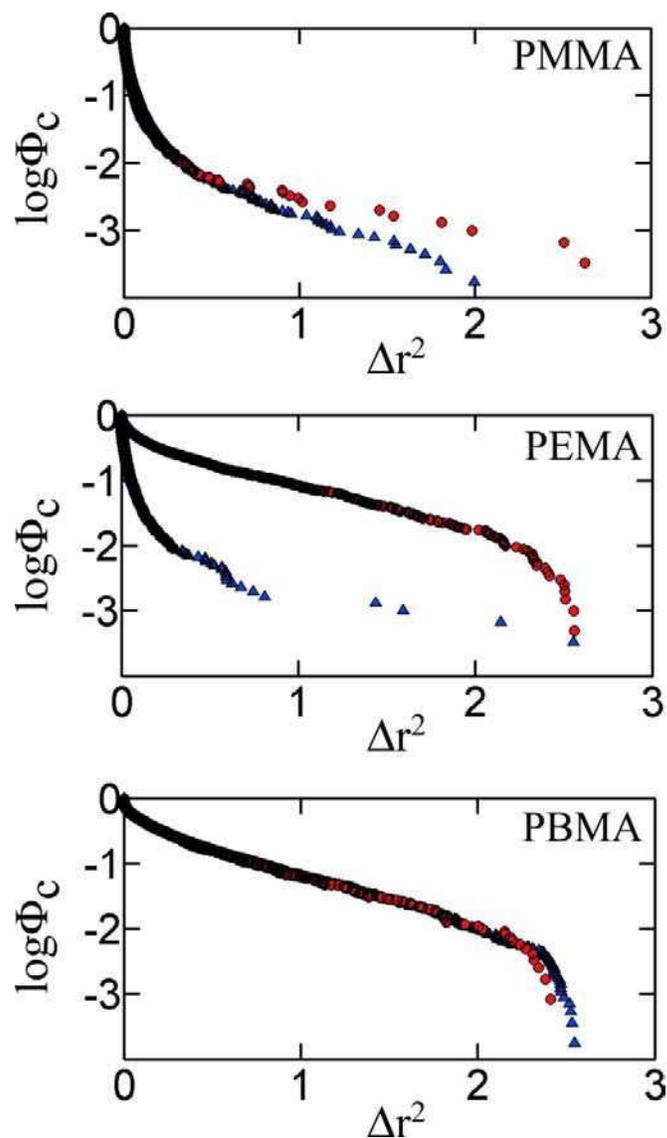


Figura 4.14: Logaritmo de la función de distribución acumulada complementaria de los saltos de anisotropía para RN en PMMA, PEMA y PBMA, de 200 nm (triángulos) y 25 nm (círculos) de espesor a 296 K.

La *Figura 4.14* muestra los resultados obtenidos para RN en PMMA, PEMA y PBMA de 200 y 25 nm de espesor a 296 K.

En PMMA, la distribución de las fluctuaciones de orientación para las películas de 200 nm y para las de 25 nm son muy similares. Sólo hay una pequeña diferencia en el 1 % de las fluctuaciones de mayor amplitud que se observa con probabilidad creciente en las películas de 25 nm. El 90 % de los saltos ocurre con $|\Delta r| < 0,20$. Así, los ejemplos mostrados en la *Figura 4.8* son representativos del comportamiento general de las moléculas en PMMA, con fluctuaciones principalmente de baja amplitud.

En PBMA la distribución de saltos de anisotropía también es independiente del espesor de la película polimérica entre 25 y 200 nm de espesor. Para este caso, solo el 30 % de los saltos tiene $|\Delta r| < 0,20$.

En PEMA las fluctuaciones de mayor amplitud son más frecuentes en películas delgadas y hay una gran diferencia en la movilidad en los dos espesores analizados.

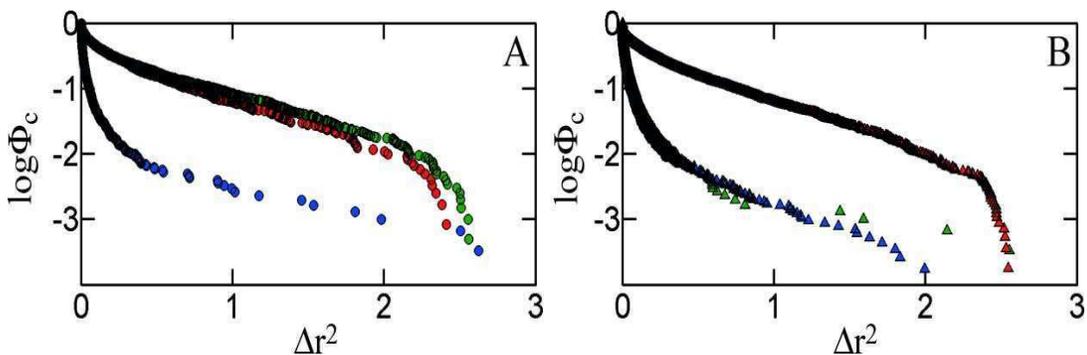


Figura 4.15: Comparación entre $\log \Phi_c(\Delta r^2)$ para RN en películas de A) 25 nm y B) 200 nm, de espesor a 296 K en PBMA (rojo), PEMA (verde) y PMMA (azul).

En la *Figura 4.15* se compara el efecto del espesor de la película según el polímero en la $\Phi_c(\Delta r^2)$ a 296 K, los gráficos son los mismos que los de la *Figura 4.14*. En películas de 25 nm los cambios de orientación de RN en la matriz son iguales en PBMA y PEMA y los movimientos de gran amplitud son más frecuentes que en PMMA. En las películas de 200 nm las fluctuaciones en PEMA y PMMA son de igual probabilidad y las de gran amplitud son menos frecuentes que en PBMA.

Tabla 4.1: Valores de referencia de desviación de T_g de películas de espesor nanométrico con respecto al valor de espesor micrométrico [37].

Polímero	$T_g^{\text{película}} - T_g^{\text{bulk}}$	$T_g^{\text{película}} - T_g^{\text{bulk}}$
	(200 nm)	(25 nm)
PEMA ($T_g = 334$ K)	~ 0 K	-14 K
PMMA ($T_g = 388$ K)	~ 0 K	8 K
PBMA ($T_g = 298$ K)	Sin datos	Sin datos

En literatura se informan los valores de T_g aproximados para 200 nm y 25 nm para PEMA y PMMA, *Tabla 4.1* [37]. Si T_g de una película delgada es menor a T_g de una película gruesa esto causa que los entornos sean más flexibles a una temperatura menor en la película delgada. Según los datos de PEMA de la *Tabla 4.1* a 296 K el sistema de 25 nm de espesor se encuentra 24 K por debajo de T_g y sin embargo se puede detectar diferencias en la movilidad de los entornos respecto de la película de 200 nm, que se midió

38 K por debajo de T_g . En el caso de PMMA tanto para 25 nm como para 200 nm la temperatura medida está al menos 80 K por debajo de T_g , y no se observan diferencias en el comportamiento de ambos, que responden al patrón de entorno rígido. En PBMA, la película de 200 nm de espesor se encuentra a $T \sim T_g$ y $\log \Phi_c(\Delta r^2)$ presenta el mismo comportamiento que las películas de 25 nm. Este hecho sugiere que con las medidas de anisotropía de *moléculas únicas* se sensan movimientos locales previos a los movimientos cooperativos que dan origen a la transición vítrea o que T_g de las películas de PBMA es inferior a 296 K. Este tipo de comportamiento se ha informado también en la literatura en PS [42] y en polimetacrilato (PMA) [43], donde observan un cambio en la orientación de moléculas únicas por imágenes desenfocadas entre 20–30 K por debajo de T_g en películas delgadas.

Los movimientos permiten reorientaciones de una sonda como RN ($V=285 \text{ \AA}^3$, $L=10 \text{ \AA}$, [11]) de gran amplitud en el intervalo de 0,1–1 s. Aún en estas condiciones hay anisotropía de emisión de fluorescencia $\langle r(t) \rangle = 0,4$ porque una reducción de este valor requiere movimientos en el intervalo de nanosegundos, que se alcanza a $T > T_g$. De hecho estos resultados están de acuerdo con lo observado en las medidas de emisión estacionaria para emisión de fluorescencia, donde $\langle r(\lambda) \rangle$ baja de 0,4 a $T - T_g > 30 \text{ K}$.

Si bien $\langle r(t) \rangle = 0,4$, aún por debajo de T_g se ven movimientos locales dependientes de la diferencia $T - T_g$, que son de gran amplitud. Para el caso de PEMA estos movimientos ocurren al menos 24 K por debajo de T_g . En la *Figura 4.15* puede verse que las curvas para PBMA de 200 y 25 nm se superponen con las de PEMA 25 nm, y que, a su vez, las de PEMA 200 nm se superponen con las de PMMA 200 y 25 nm, sugiriendo un comportamiento único en los sistemas estudiados.

Este estudio de la función de distribución acumulada revela que moléculas de RN en la matriz polimérica tienen cambios de anisotropía mayores en películas delgadas, hecho que es compatible con ambientes menos rígidos por disminución de T_g .

4.5.2.2 Medidas de Ensamble de Moléculas

4.5.2.2.1 Resolución de la ecuación diferencial para el problema difusional con fotoblanqueo

Se resolvió la *Ec. 4.12* numéricamente por una rutina escrita en Matlab, obteniéndose valores de anisotropía desde 0,4 a $-0,5$. Para hacer el programa eficiente se consideró una tolerancia en las integrales con las que se calcula I_{par} e I_{per} , que se adapta al valor de la intensidad total. Básicamente el programa controla mientras va calculando los parámetros, el valor de la intensidad total. Si este valor es bajo, disminuye la tolerancia. De esta forma se evita cometer errores grandes en el cálculo de la anisotropía, reajustando la tolerancia automáticamente en cada caso. El algoritmo para obtener la solución general se probó en los casos límites de difusión rotacional en ausencia de fotoblanqueo y de fotoblanqueo en ausencia de difusión rotacional. En el primer caso se obtuvieron las curvas de decaimiento de $r(t)$ con parámetros $\phi = 0$ y D entre 0,01 y 0,50. Las curvas se ajustaron con una exponencial decreciente y se comprobó que la relación entre el valor de constante de decaimiento ajustada y el valor de D fijado para la integración es 6, que está de acuerdo con la ecuación de decaimiento de la anisotropía para un rotor isotrópico, *Capítulo 1, Ec. 1.11*. En el caso que existe fotoblanqueo sin reorientación, el cálculo de la distribución de orientación de

moléculas coincide con el decaimiento expresado por la Ec. 4.9 [44].

Para optimizar el ajuste de las curvas experimentales con las soluciones de la Ec. 4.12, se analizó la relación entre las curvas observándose (Figura 4.16):

1. $r(t)$ decae hasta un valor, r_∞ , donde ambos procesos, fotoblanqueo selectivo y reorientación, se equilibran.
2. Las familias de curvas con igual relación de $\frac{D}{\phi}$ convergen a un mismo valor de r_∞ . En la Figura 4.16, para $\frac{D}{\phi} = 2,0$, $r_\infty = 0,38$ para $\frac{D}{\phi} = 1,0$, $r_\infty = 0,36$ y para $\frac{D}{\phi} = 0,5$ se obtiene $r_\infty = 0,35$. Cuanto menor es $\frac{D}{\phi}$, menor es el valor de r_∞ .

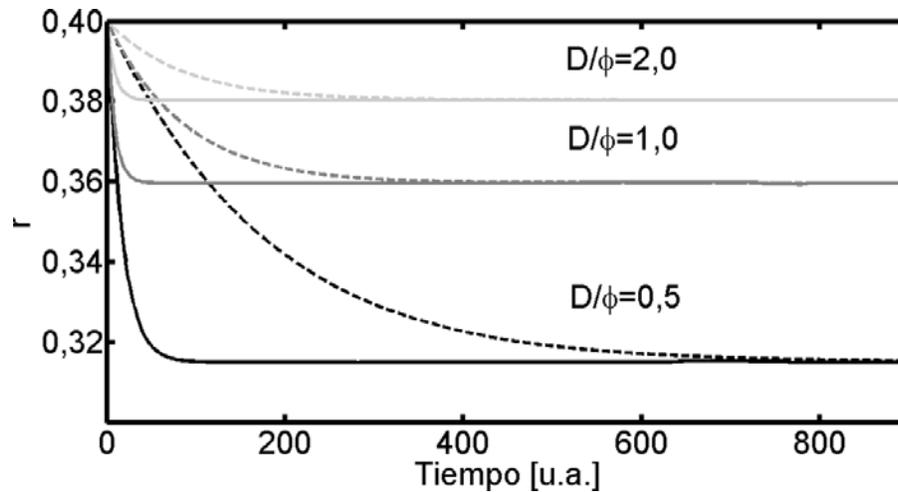


Figura 4.16: Curvas de anisotropía en función del tiempo calculadas a partir de la integración numérica de la Ec. 4.12 para diferentes valores de $\frac{D}{\phi}$. Para $\frac{D}{\phi}=2,0$: $D=0,02$ y $\phi=0,01$, para $\frac{D}{\phi}=1,0$, $D=0,02$ y $\phi=0,02$ y para $\frac{D}{\phi}=0,5$, $D=0,01$ y $\phi=0,02$, líneas continuas. Las líneas punteadas corresponden a un factor 0,10 en los valores de D y ϕ , manteniendo la relación constante.

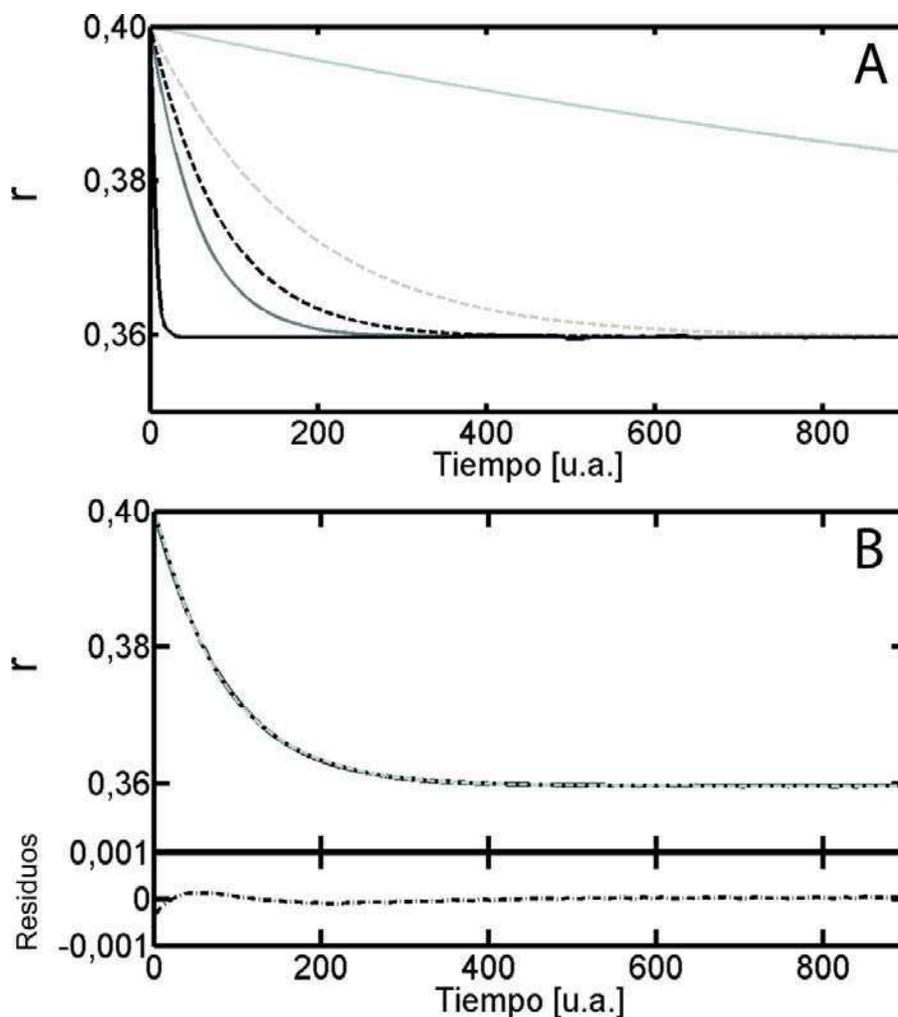


Figura 4.17: A) Evolución temporal de $r(t)$, obtenida por integración numérica de la Ec. 4.12, para una familia de curvas donde la relación $\frac{D}{\phi}=1$ con valores individuales entre 0,0001 (línea continua gris) y 0,03 (línea continua negra). B) Simulación de datos según la para valores de $D=0,002$ y $\phi=0,002$ y ajuste según la Ec. 4.19 con parámetros: $r_{\infty}=0,36$ ($\pm 0,005\%$) y $\tau_{op}=84,1$ u.a. ($\pm 15\%$); para los cuales se obtiene, a partir de las Ec. 4.20 y Ec. 4.21, $D=0,002$ u.a. ($\pm 15\%$), $\phi=0,002$ u.a. ($\pm 15\%$), y $\tau_{tot}=75$ u.a. ($\pm 15\%$), como se explica más adelante.

- Si la relación $\frac{D}{\phi}$ es constante, cuanto menor es el valor de estos parámetros más lentamente se alcanza el valor de r_{∞} y por lo tanto

cambia la escala temporal de los eventos. Esto se detalla mejor en la *Figura 4.17*.

Las curvas de la *Figura 4.16* se ajustaron con la ecuación

$$r(t) = \Delta r e^{-t/\tau_{op}} + r_{\infty} \quad \text{Ec. 4.19}$$

donde $r_{\infty} = r_0 - \Delta r$ y τ_{op} es el tiempo de decaimiento, relacionado con D y ϕ .

En la *Figura 4.17.B* se muestra una curva simulada y la calidad del ajuste según la *Ec. 4.19*, cuyos parámetros se especifican en el pie de la figura.

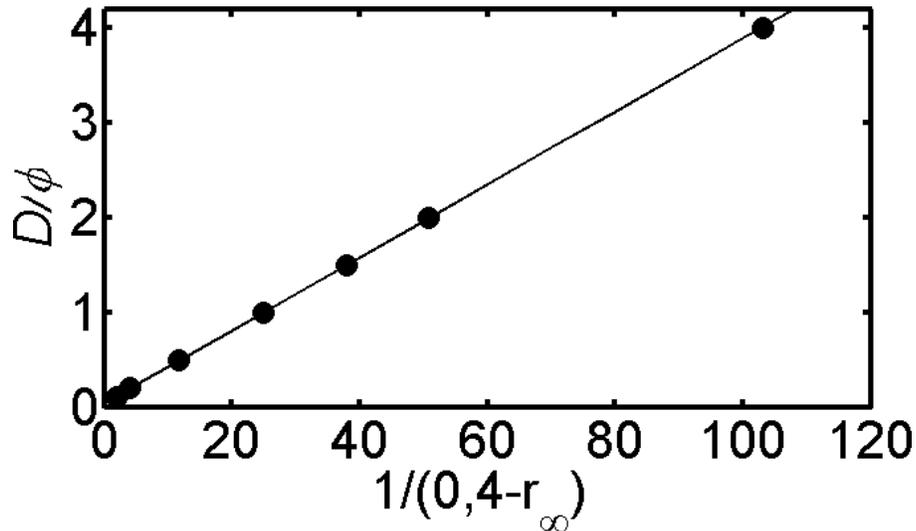


Figura 4.18: Relación entre $\frac{D}{\phi}$ y r_{∞} , obtenidos a partir de la integración numérica de la *Ec. 4.12* y del ajuste de la *Ec. 4.19* (puntos negros). Línea: ajuste según la *Ec. 4.20*.

Con los valores de los parámetros de ajuste de la ecuación operativa, *Ec. 4.19*: r_∞ y τ_{op} (siempre $r_0 = 0,4$) y los valores de D y ϕ que se usaron para simular los datos, se obtienen los gráficos de correlación entre $\frac{D}{\phi}$ y r_∞ y entre D y $1/\tau_{op}$; *Figuras 4.18 y 4.19*, respectivamente.

$$\frac{D}{\phi} = \frac{(0,038 \pm 0,001)}{0,4 - r_\infty} + (0,040 \pm 0,001) \quad \text{Ec. 4.20}$$

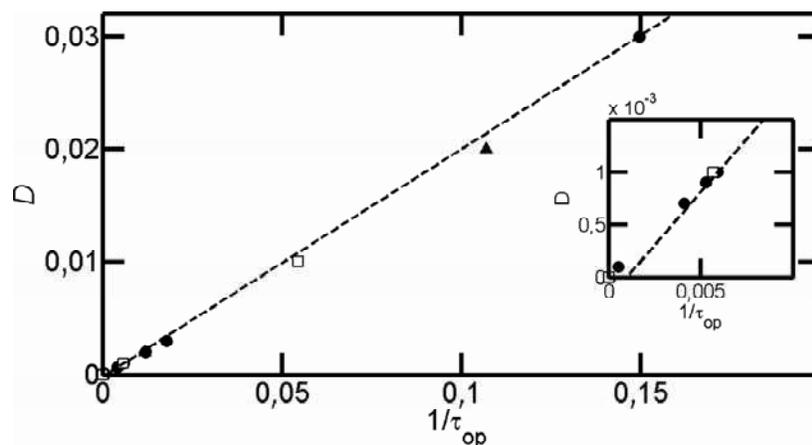


Figura 4.19: Relación entre la inversa del tiempo de decaimiento operativo de la anisotropía, $\frac{1}{\tau_{op}}$, (*Ec. 4.19*) y el coeficiente de difusión rotacional, D , obtenidos para familias de curvas con relación $\frac{D}{\phi}$ fija. Círculos: $\frac{D}{\phi}=1,0$, triángulos: $\frac{D}{\phi}=2,0$, cuadrados: $\frac{D}{\phi}=0,5$. La línea punteada representa la regresión lineal que mejor ajusta los datos, *Ec. 4.21*.

A partir de este ajuste es posible obtener la relación entre la velocidad de rotación de las moléculas y la velocidad de fotoblanqueo conociendo el valor de r_∞ . El valor de τ_{op} , también obtenido del ajuste con la *Ec. 4.19*, se

relaciona con el valor de D respectivo. Así se construye la *Figura 4.19*, la cual puede ser ajustada por una regresión lineal según la *Ec. 4.21*,

$$D = (0,20 \pm 0,04) \frac{1}{\tau_{op}} - (2 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-4}) s^{-1} \quad \text{Ec. 4.21}$$

Esta ecuación es válida en el intervalo de r_∞ entre 0,31 y 0,38, que es el intervalo experimental. Esta figura demuestra que el valor de $1/\tau_{op}$ solo depende de D y es independiente de ϕ .

En resumen, los datos experimentales de los gráficos como los de las *Figuras 4.16 y 4.17*, se ajustan empíricamente según la *Ec 4.19* y se obtienen r_∞ y τ_{op} . Estos se relacionan con los valores de D y ϕ usando las relaciones de las *Ec. 4.20-4.21*.

4.5.2.2.2 Momentos de transición de absorción y emisión no paralelos

Hasta aquí se han desarrollado las ecuaciones teniendo en cuenta que los momentos de transición de absorción y emisión son paralelos. Sin embargo, en algunos fluoróforos, esta condición no se cumple y pueden existir diferencias en la orientación entre \mathbf{M}_A y \mathbf{M}_E . Esta diferencia está cuantificada por el ángulo β entre ambos momentos. En el caso de una distribución de fluoróforos en la cual $\beta = 0$, la anisotropía fundamental, r_0 , alcanza el valor máximo de 0,4 en una muestra isotrópica. De existir cambios en la dirección entre \mathbf{M}_A y \mathbf{M}_E por factores como: reacomodamientos nucleares entre el estado fundamental y el excitado,

vibraciones del solvente, conversión entre estados electrónicos antes de emitir, $r_0 < 0,4$. En estos casos r_0 se calcula a partir de la ecuación:

$$r_0 = 0,4 \left(\frac{3}{2} \cos^2 \beta - \frac{1}{2} \right) \quad \text{Ec. 4.22}$$

Si hay absorción o emisión desde estados electrónicos doblemente degenerados, $r_0 < 0,4$. En este caso no se puede usar la Ec. 4.22 porque no hay una dirección definida de uno de los momentos.

Debido a que los cálculos de la sección 4.5.2.2.1 fueron realizados teniendo en cuenta que $\beta = 0$, en el caso de haber despolarización del estado excitado, los valores calculados se corrigen en un factor $r_0/0,4$ y las conclusiones no se ven afectadas. En general las sondas usadas para anisotropía de fluorescencia tienen valores de r_0 entre 0,4 y 0,37.

4.5.2.2.3 Resultados de ensamble en películas de PAMA de distinto espesor

En la *Figura 4.20* se muestra la imagen del primer cuadro de la secuencia de imágenes polarizadas de la fluorescencia de RN en PMMA de 200 nm de espesor. En la figura se observa que la intensidad es mayor en el centro y decrece radialmente, como es de esperar para excitación con un haz gaussiano (Láser con modo 00). Para determinar el área de análisis, se seleccionó un punto central (x,y) de la zona de mayor intensidad de la figura y se graficaron los perfiles de intensidad en dos direcciones perpendiculares, *Figura 4.21*. La superficie definida por las zonas donde la $I \geq 0,9.I_{\max}$ se usó como área de análisis.

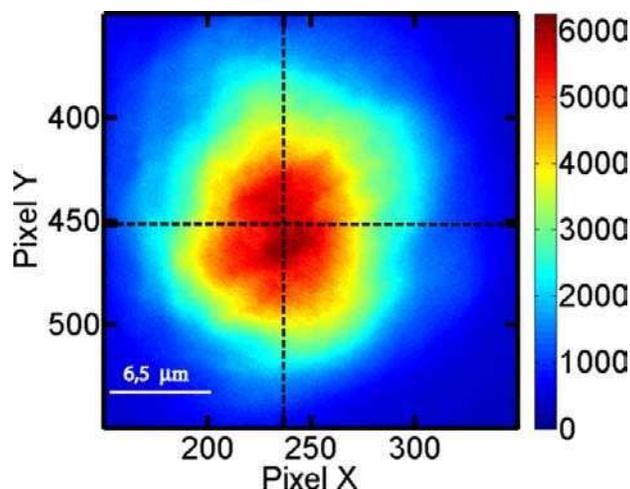


Figura 4.20: Mapa de intensidad de fluorescencia del primer cuadro (I_{par}) de una muestra con $[\text{RN}] = 10^{-7}$ mol RN/kg polímero en PMMA de 200 nm de espesor a 296 K, $\lambda_{\text{exc}} = 532$ nm, cuya área iluminada corresponde a $676 \mu\text{m}^2$ (Tamaño de pixel= $0,13 \mu\text{m}$). Las líneas perpendiculares fueron trazadas a $x = 237$ e $y = 452$, y sus correspondientes perfiles de intensidad se muestran en la Figura 4.21.

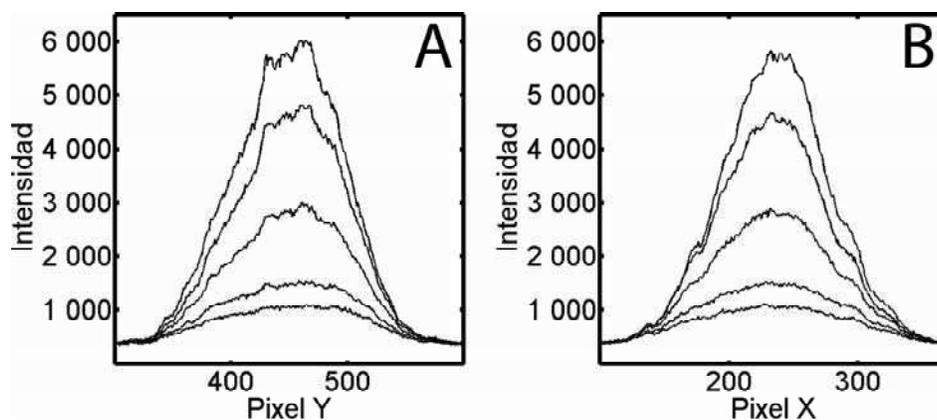


Figura 4.21: Perfil de intensidad de fluorescencia para la línea de píxeles A) $x = 237$ y B) $y = 452$ para $t = 0$ s, 5 s, 50 s, 250 s, 500 s (de mayor a menor intensidad respectivamente). Tiempo de exposición: 100 ms.

A partir del procesamiento de estas imágenes se obtuvo la evolución temporal de la I_{par} e I_{per} , y se calculó la I_{tot} y $r(t)$.

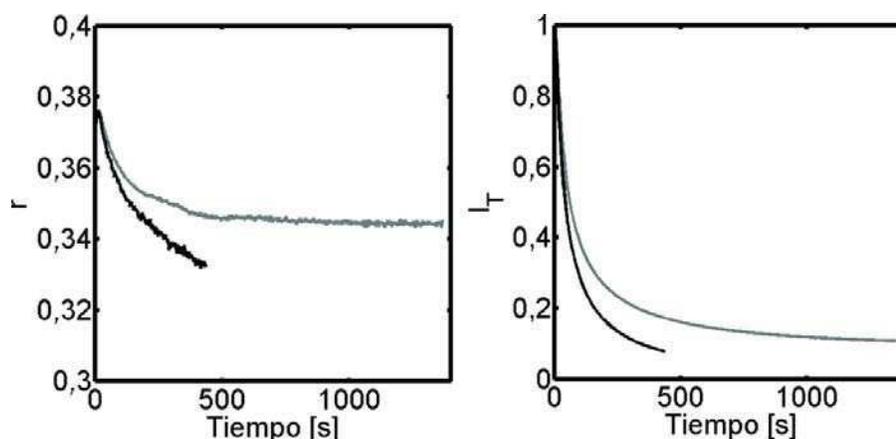


Figura 4.22: Influencia de la potencia del láser de excitación ($\lambda_{\text{exc}}=532$ nm) en la evolución temporal de la intensidad total de fluorescencia y en la anisotropía para una muestra de RN embebido en una película de PMMA de 200 nm de espesor. Línea gris: 0,64 mW, línea negra: 0,85 mW. Tiempo de exposición: 100 ms.

En PMMA se realizaron medidas variando la potencia del láser, *Figura 4.22*. Como es de esperar, al incrementar la potencia, aumenta la velocidad de fotoblanqueo. El decaimiento de la anisotropía en el tiempo llega hasta el valor constante (r_{∞}) cuando la potencia es de 0,64 mW. Para una potencia de 0,85 mW, se interrumpió la irradiación cuando se llegó a un valor bajo de intensidad total, sin que se hubiera alcanzado el valor de r_{∞} (ver *Figura 4.22*). Esto no es conveniente para obtener buenos ajustes. Para obtener resultados confiables es necesario asegurar que el sistema llegue a un valor de r_{∞} constante. Para ello se debe manejar la potencia del láser como un parámetro experimental decisivo en las medidas.

En la *Figura 4.23* se muestra la evolución temporal de la anisotropía para RN en las películas de PEMA de 25 nm, 100 nm y 200 nm y de PMMA y PBMA de 25 nm y 200 nm de espesor. Para todas las muestras $r(t)$ decae hasta un valor aproximadamente constante que se considera como r_{∞} .

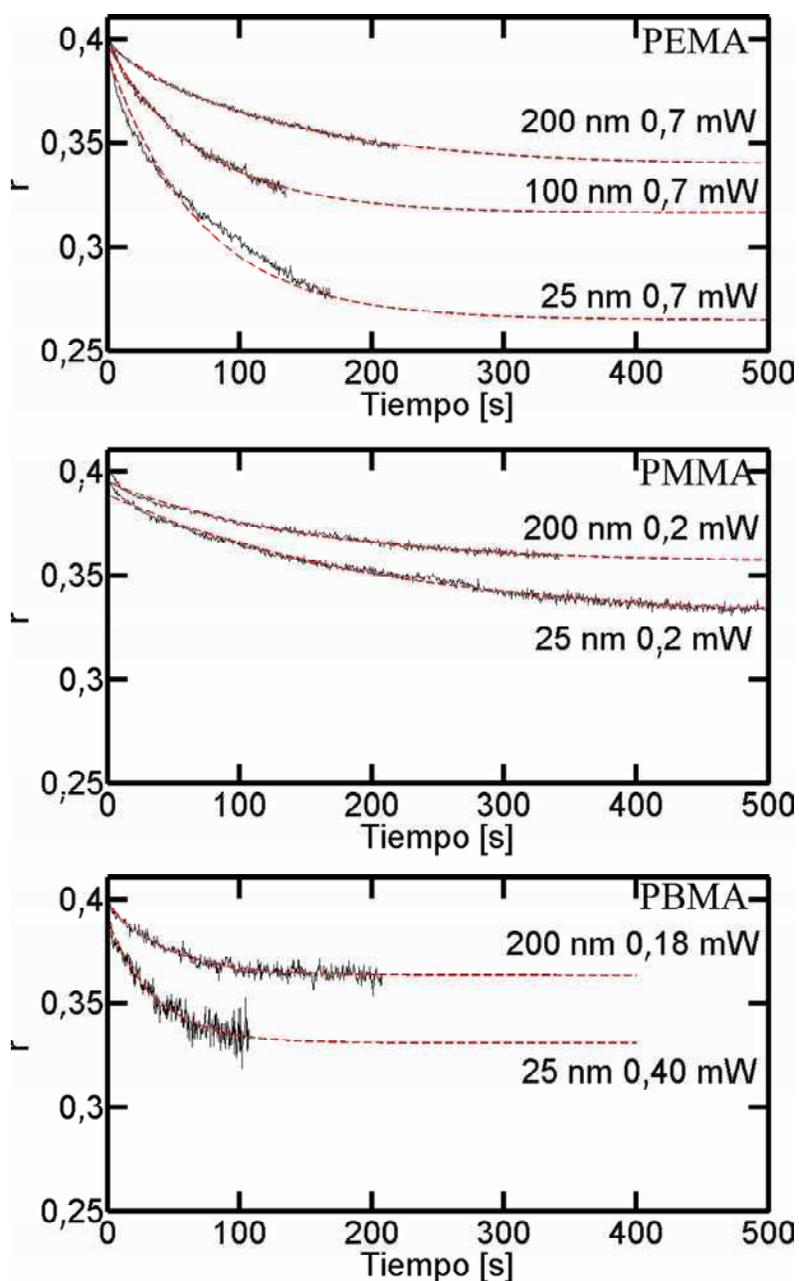


Figura 4.23: Decaimiento de la anisotropía de RN en películas de A) PEMA de 200 nm, 100 nm y 25 nm de espesor. B) PMMA de 200 nm y 25 nm de espesor y C) PBMA de 200 nm y 25 nm de espesor. Todas las medidas se adquirieron a 296 K. Las líneas continuas representan los datos experimentales y las líneas punteadas, el ajuste operativo con la Ec. 4.19.

También se muestra los ajustes operativos según la *Ec. 4.19*, que describen muy bien la evolución temporal de $r(t)$. Al excitar las muestras con la misma potencia (potencia incidente=0,7 mW para PEMA y 0,2 mW para PMMA) cuanto mayor es el espesor de la película, mayor es el valor de r_∞ que alcanza RN en la matriz polimérica. Se observa que el modelo de blanqueo selectivo por un solo fotón y giro isotrópico describe bien los decaimientos de $r(t)$.

Tabla 4.2: Parámetros obtenidos de D y ϕ para RN en PEMA, PMMA y PBMA de distinto espesor a 296 K. Donde $\tau_r = \frac{1}{6D}$, $\Phi_b = \frac{\phi}{I_0\sigma}$, $\sigma_{RN}=1,4 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$ y I_0 entre $2 \times 10^{20} - 8 \times 10^{20} \text{ fotones.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para las potencias utilizadas. Área de análisis: $60 \mu\text{m}^2$.

Polímero	Espesor [nm]	τ_{op} [s]	r_∞	$\frac{D}{\phi}$	$D \cdot 10^{-3}$ [s ⁻¹]	$\phi \cdot 10^{-3}$ [s ⁻¹]	τ_r [s]	Φ_b 10 ⁻⁸
		$\pm 15\%$	$\pm 0,005$	$\pm 0,05$	$\pm 20\%$	$\pm 20\%$	$\pm 20\%$	$\pm 20\%$
PEMA	200	124	0,340	0,67	1,4	2,1	116	2
	100	70	0,321	0,49	2,7	5,4	63	5
	25	69	0,260	0,31	2,2	7,3	75	6
PMMA	200	144	0,360	0,92	1,2	1,3	138	1
	25	202	0,332	0,58	0,8	1,4	208	1
PBMA	200	44	0,361	1,09	4,3	4,0	38	13
	25	36	0,330	0,59	5,4	9,1	29	13

A partir de los resultados de τ_{op} y r_{∞} , se completó la *Tabla 4.2* con los valores de $\frac{D}{\phi}$, ϕ y D , y los valores calculados de τ_r y Φ_b para RN en PEMA, PBMA y PMMA. El cálculo de la intensidad de excitación a partir de la potencia medida se detalla en el *Apéndice 3.A.2*.

El máximo valor de rendimiento cuántico de fotoblanqueo se obtuvo para PBMA y el mínimo, para PMMA; independientemente del espesor de la película. Este resultado puede explicarse considerando al O_2 disuelto en la matriz como el principal causante de la reacción de fotoblanqueo. La permeabilidad del gas se calcula como el producto de la difusión de O_2 por su solubilidad en la matriz y es afectada por la flexibilidad y polaridad del material [45]. Así, la permeabilidad del O_2 se ve favorecida en PBMA ya que es menos polar que PMMA y a temperatura ambiente presenta la mayor flexibilidad de entornos.

Las cajas de polímero con paredes flexibles facilitan el encuentro entre el O_2 y la sonda y, consecuentemente, el fotoblanqueo. Este hecho es coincidente con los resultados obtenidos en el *Capítulo 3* de espectroscopía de *moléculas únicas*. Donde las moléculas en entornos Tipo B–C (más flexibles) mostraron una mayor probabilidad de fotoblanqueo que las ubicadas en entornos Tipo A (más rígidos). Sin embargo, los entornos Tipo A se asociaron a cajas menos polares, poniendo de manifiesto que la flexibilidad influye más que la polaridad en la permeabilidad local del O_2 .

En PEMA los valores de Φ_b son bajos y dependientes del espesor de la película, siendo mayor para la película de 25 nm. Este resultado está de acuerdo con la mayor flexibilidad de entornos obtenidos a partir de $\Phi_c(\Delta r^2)$ en PEMA de 25 nm de espesor.

El Φ_b se ha informado en distintas matrices poliméricas entre 10^{-4} y 10^{-9} [46]. Los valores en este trabajo están entre 10^{-7} y 10^{-8} .

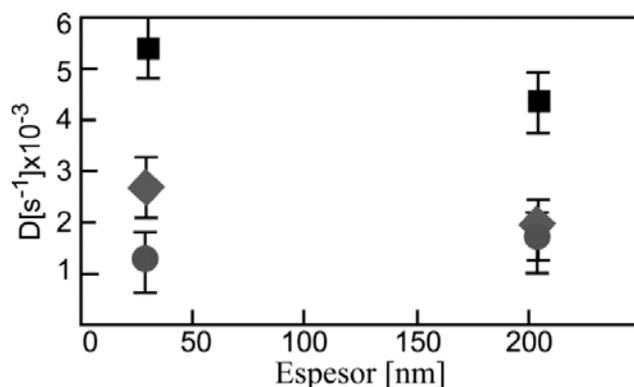


Figura 4.24: Relación entre D y el espesor de la película polimérica para PEMA (rombos), PMMA (círculos) y PBMA (cuadrados).

En la Figura 4.24 se muestra la dependencia de D con el espesor de la película polimérica a 296 K. Se observa que los valores de D calculados por éste método no presentan diferencias significativas, dentro del error experimental, para distintos espesores de película. Sin embargo, existe una clara diferencia entre el comportamiento dinámico de RN en PBMA respecto del resto de los polímeros. Esta diferencia se observa también en las funciones de distribución acumulada para las fluctuaciones de la anisotropía de moléculas únicas. En bibliografía se ha informado la magnitud de D para la sonda 4-(dimetilamino)-4'-nitro-estilbeno (DANS) en PMMA de espesor micrométrico, siendo $10^{-4} s^{-1}$ a 10 K por debajo de T_g y $10^{-2} s^{-1}$ a 10 K por encima de T_g , determinados por generación de segundo armónico (SHG) [47]. Los valores de este trabajo están en torno a 1×10^{-4} y $5 \times 10^{-3} s^{-1}$, para una sonda de similar tamaño y forma.

A partir de los valores de la *Tabla 4.2* y la *Figura 4.24* se ve que PBMA tiene los valores de D más altos, como era de esperar y de acuerdo con el comportamiento de $\log\Phi_c(\Delta r^2)$ de las medidas de *moléculas únicas*. Por otra parte, PMMA da los valores más bajos, también de acuerdo con $\log\Phi_c(\Delta r^2)$. Las películas de PEMA de 200 nm tienen un valor muy similar a PMMA del mismo espesor, pero el valor de D en PEMA de 25 nm es poco menos de la mitad del de PBMA de 25 nm, mientras que el comportamiento de *moléculas únicas* es muy parecido. En general, la tendencia observada en el análisis por $\log\Phi_c(\Delta r^2)$ en *moléculas únicas* es compatible con los resultados obtenidos en el *ensamble* por el método de fotoblanqueo. Las curvas de la *Figura 4.23* no muestran tan evidentemente las diferencias como la función de distribución acumulada complementaria de los saltos de anisotropía de *moléculas únicas*, donde por el tipo de representación, las fluctuaciones de baja probabilidad se ponen más en evidencia.

En los ajustes del decaimiento de la anisotropía de la *Figura 4.23* se utilizó la traza temporal completa. En la *Figura 4.25* se presentan ajustes del decaimiento de $r(t)$ de RN en PBMA de 200 nm cuando se consideran diferentes proporciones de moléculas fotoblanqueadas para un mismo decaimiento. Al ajustar este decaimiento hasta fotoblanquear más del 90 % de las moléculas, se obtiene un valor de $r_\infty = 0,36$, mientras que considerando una proporción de fotoblanqueo de la intensidad total de emisión menor, se obtiene un r_∞ mayor. Esto lleva a valores del ajuste que se presentan en la *Tabla 4.3*. En los cuadros inferiores de la *Figura 4.25* puede observarse que todos los ajustes son de calidad similar.

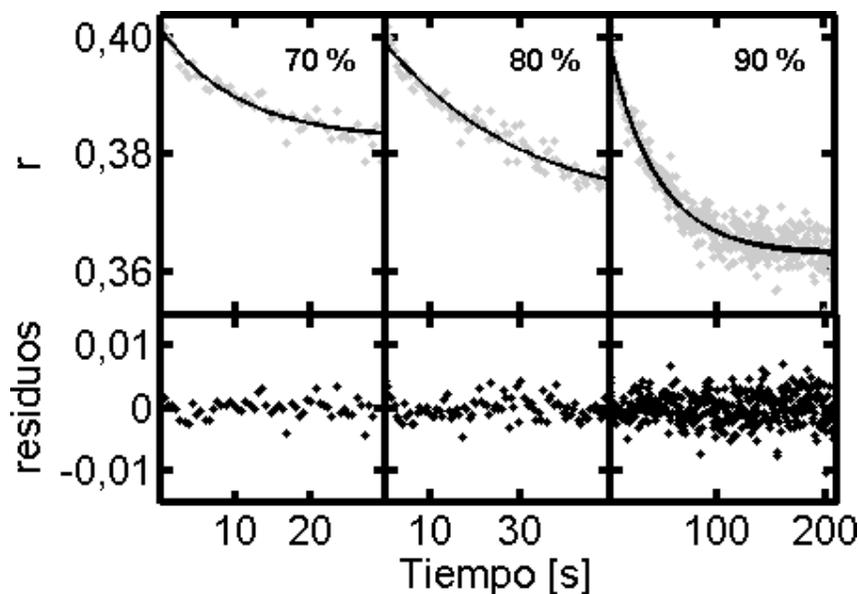


Figura 4.25: Cuadros superiores: Decaimiento de la anisotropía de RN en PBMA de 200 nm de espesor luego de fotoblanquear cierto porcentaje de la intensidad total indicado en cada cuadro. Cuadros inferiores: Residuos. Las líneas continuas representan el ajuste del decaimiento de la anisotropía con la Ec. 4.19. Condiciones experimentales: Potencia: 0,18 mW (532 nm), tiempo de exposición: 100 ms.

Tabla 4.3: Influencia de la proporción de población fotoblanqueada en los parámetros obtenidos de D y ϕ para RN en PBMA de 200 nm de espesor a 296 K. Donde $\tau_r = \frac{1}{6D}$, $\Phi_b = \frac{\phi}{I_0\sigma}$, $\sigma_{RN}=1,4\times 10^{-16} \text{ cm}^2$ y I_0 entre $2,2\times 10^{20} \text{ fotones.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Área de análisis: $60 \mu\text{m}^2$.

Porcentaje fotoblanqueado de la I_{tot}	τ_{op} [s]	r_{∞}	$D \cdot 10^{-3}$ [s ⁻¹]	$\phi \cdot 10^{-3}$ [s ⁻¹]	τ_r [s]	Φ_b 10 ⁻⁸
	$\pm 15\%$	$\pm 0,005$	$\pm 0,8$	$\pm 0,5$	$\pm 20\%$	$\pm 20\%$
70 %	10	0,380	20,6	8,9	8	30
80 %	30	0,370	6,5	4,9	25	16
>90 %	44	0,361	4,3	4,0	38	15

Como se presentó en el análisis por *moléculas únicas* hay moléculas que experimentan entornos más flexibles y otras que se encuentran confinadas en entornos más rígidos. Es la heterogeneidad dinámica la que explica los resultados en los experimentos de fotoblanqueo. Las cajas con paredes más flexibles permiten al O_2 permear dentro de la matriz con mayor facilidad. Por esto, dependiendo del porcentaje de la intensidad fotoblanqueada, los valores de D y Φ_b son indicativos de que se están observando poblaciones de entornos con rigidez diferentes.

Las diferencias observadas en la *Tabla 4.3* ponen de manifiesto que cuando la proporción de moléculas que emiten es alta, tanto D como Φ_b son altos. Cuando se fotoblanquean preferentemente las moléculas en entornos con dinámica rápida, tanto D como Φ_b son bajos, debido a la mayor influencia de las moléculas en entorno con dinámica lenta, y por lo tanto con menor rendimiento cuántico de fotoblanqueo.

Ediger *et al.* midieron el coeficiente de difusión rotacional por fotoblanqueo de un *ensamble* de moléculas de Rubreno en PS [48]. En estos experimentos observaron que el tiempo de correlación rotacional de la población de moléculas resultante luego del fotoblanqueo, τ_o , depende de la fracción de moléculas que es fotoblanqueada. Al aumentar la fracción de moléculas fotoblanqueadas, la distribución de τ_o se corre hacia tiempos más largos. Este hecho indica que las moléculas que están más orientadas con E y las que rotan más rápido son fotoblanqueadas preferentemente comparado con aquellas que rotan más lentamente o que se encuentran menos orientadas respecto al vector de excitación. Al fotoblanquear se seleccionan estas poblaciones con comportamiento marcadamente diferente. En un trabajo reciente, demostraron la existencia de dos poblaciones de sondas con dinámicas diferentes; una lenta, atribuida a moléculas de colorante situadas

en el seno del polímero, y otra rápida, debida a la dinámica de rotación de moléculas en una capa de polímero más “fluida” en la interfase aire/polímero [49].

4.5.2.2.4 Desplazamiento cuadrático medio angular aplicado al cálculo del coeficiente de difusión rotacional

El coeficiente de difusión rotacional del *ensamble* de moléculas únicas se puede calcular a partir del desplazamiento cuadrático medio angular de las variaciones de orientación a distintos tiempos. Este cálculo permite relacionar el D obtenido por anisotropía de *moléculas únicas* con el obtenido por medidas de fotoblanqueo del *ensamble*. Harms *et al.* han estudiado la dinámica de moléculas únicas de TMR en membranas fosfolípídicas por imágenes de fluorescencia polarizadas [50]. En este trabajo, calculan las trayectorias angulares de cada *molécula única* para obtener el desplazamiento angular cuadrático medio, $\langle \Delta\alpha^2 \rangle$. Observan una dependencia lineal de este parámetro con el tiempo que puede ser relacionado con el coeficiente de difusión rotacional según

$$\langle \Delta\alpha^2 \rangle = 2Dt \quad \text{Ec. 4.23}$$

considerando difusión rotacional en una dimensión. Donde α es el ángulo calculado según la *Ec. 4.16*.

La *Ec. 4.23* deriva de la ecuación de difusión de Einstein, que describe el transporte microscópico de materia y calor. En esta ecuación la

distribución de probabilidad condicional de que una partícula esté en la posición x a tiempo t luego de haber estado en la posición cero a tiempo cero es $P(x,t)$.

$$\frac{\partial P(x,t)}{\partial t} = D\nabla^2 P(x,t) \quad \text{Ec. 4.24}$$

Para relacionar el parámetro de transporte, D , con la dinámica microscópica es necesario utilizar la función de correlación

$$C(x,t) = \langle |x_1(t) - x_1(0)|^2 \rangle \quad \text{Ec. 4.25}$$

El desplazamiento cuadrático medio (MSD^2) se puede escribir en términos de la solución de la Ec. 4.24 según

$$MSD = \langle |x_1(t) - x_1(0)|^2 \rangle = \int dx (x(t) - x(0))^2 P(x,t) \quad \text{Ec. 4.26}$$

Para el caso de difusión en 3 dimensiones y considerando que $P(x,t)$ esta normalizada para todos los tiempos

$$MSD = 6Dt \quad \text{Ec. 4.27}$$

² Del inglés, mean square displacement (MSD)

donde el coeficiente 6 surge de $2.n$ donde n es la dimensión, en la Ec. 4.27 $n=3$ [51]. En el desarrollo presentado el cálculo del MSD está aplicado a la difusión traslacional y depende de una función de correlación. Esta ecuación puede aplicarse por analogía a la difusión rotacional [52]. Como las trazas temporales no son lo suficientemente largas no es posible realizar este desarrollo para obtener un valor de D promedio a partir del análisis de reorientaciones de *moléculas únicas* y compararlo con el obtenido por resolución de la ecuación difusional en presencia de fotoblanqueo.

4.6 CONCLUSIONES

Los movimientos de las cadenas poliméricas en películas delgadas se estudiaron siguiendo la dinámica rotacional de sondas fluorescentes en el **estado fundamental** y en el **excitado**.

Al seguir la dinámica rotacional de RN y R6G en el **estado excitado** en películas de PMMA, PEMA y PBMA, se observó una caída de la anisotropía de emisión de la sonda en películas de 100 nm de espesor, muy por encima de T_g de películas gruesas. De acuerdo con esto, PEMA no muestra cambios en $r(\lambda)$ con la temperatura en el intervalo estudiado. Los resultados pueden explicarse en base a la alta frecuencia (\sim GHz) en la que se observa la relajación [53] con medidas de fluorescencia. No se observa una dependencia en particular en el comportamiento de $\langle r(\lambda) \rangle$ con T para los diferentes espesores de la película polimérica.

Para estudiar la dinámica rotacional en el **estado fundamental** se realizaron medidas de fluorescencia de *moléculas únicas* y de *ensamble* por

medio de la técnica de microscopía de campo amplio con detección polarizada. A nivel de *moléculas únicas* se optimizaron los programas para la detección y análisis de las imágenes adquiridas. Mediante la adquisición de la intensidad de emisión paralela y perpendicular a la polarización de excitación, se estudio la anisotropía de las *moléculas únicas*. Se mostraron claramente los cambios en el comportamiento rotacional de la sonda en la matriz evidenciando la heterogeneidad dinámica temporal y espacial presente en los polímeros en estado vítreo. Por medio de la función de distribución acumulada complementaria se evaluaron los cambios de anisotropía, observando una dependencia en la frecuencia de saltos de gran amplitud con el largo de cadena lateral del polímero y con el espesor, los que pueden asociarse a cambios en T_g del polímero en la película. Estos cambios ocurren entre 20 K y 30 K por debajo de T_g informada para los mismos polímeros a igual espesor.

Por fluorescencia polarizada de *moléculas únicas* se detecta la activación temprana de movimientos de las cadenas de polímero por debajo de la temperatura a la cual se observa un cambio abrupto en la dinámica del polímero. En los experimentos de *moléculas únicas* las trazas temporales no tienen la cantidad de puntos suficientemente para obtener un tiempo de difusión rotacional por análisis de la función de correlación rotacional temporal.

En el método desarrollado para medidas de ensamble se aprovecha el fotoblanqueo, presente en toda medida de fluorescencia, para crear un gradiente de orientaciones y medir diferentes rotaciones. Los datos macro y microscópicos coinciden. En el análisis de *moléculas únicas* por la función de distribución acumulada complementaria se obtiene información sobre el número total y la amplitud de las fluctuaciones, mientras que en el análisis

de *ensamble* por fotoblanqueo selectivo a la polarización, se obtiene información temporal como D y τ_r . A partir de este análisis es posible obtener coeficientes de difusión rotacional de sondas proladas en ausencia de difusión traslacional. Sólo es necesario encontrar la condición de potencia radiante de excitación óptima. Este método provee de una alternativa para sistemas donde no se pueden realizar medidas en un espectrofluorímetro convencional debido a baja señal detectable e imposibilidad de incrementar tamaño de la muestra o la concentración de la sonda.

4.7 REFERENCIAS

- [1] T. Ha, J. Glass, T. Enderle, D. S. Chemla y S. Weiss, “Hindered Rotational Diffusion and Rotational Jumps of Single Molecules,” *Physical Review Letters*, vol. 80, no. 10, pp. 2093–2096, 1998.
- [2] D. Wöll, E. Braeken, A. Deres, F. C. De Schryver, H. Uji-i y J. Hofkens, “Polymers and single molecule fluorescence spectroscopy, what can we learn?,” *Chemical Society Reviews*, vol. 38, no. 2, pp. 313–28, 2009.
- [3] G. DeMaggio, W. Frieze, D. Gidley, M. Zhu, H. Hristov y A. Yee, “Interface and Surface Effects on the Glass Transition in Thin Polystyrene Films,” *Physical Review Letters*, vol. 78, no. 8, pp. 1524–1527, 1997.
- [4] G. J. Schuitz, H. Schindler y T. Schmidt, “Single-Molecule Microscopy on Model Membranes Reveals Anomalous Diffusion,” *Biophysical Journal*, vol. 73, pp. 1073–1080, 1997.
- [5] D. M. Warshaw, E. Hayes, D. Gaffney, A.-M. Lauzon, J. Wu, G. Kennedy, K. Trybus, S. Lowey y C. Berger, “Myosin conformational states determined by single fluorophore polarization,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 14, pp. 8034–8039, 1998.
- [6] M. Böhmer y J. Enderlein, “Orientation imaging of single molecules by wide-field epifluorescence microscopy,” *Journal of the Optical Society of America B*, vol. 20, no. 3, pp. 554–559, 2003.
- [7] E. J. Ambrose, “A Surface Contact Microscope for the study of Cell Movements,” *Nature*, vol. 178, no. 4543, pp. 1192–1194, 1956.
- [8] A. Deres, G. A. Floudas, M. Klaus, M. Van Der Auweraer y F. De Schryver, “The Origin of Heterogeneity of Polymer Dynamics near the Glass Temperature As Probed by Defocused Imaging,” *Macromolecules*, pp. 9703–9709, 2011.
- [9] C.-Y. Lu y D. A. Vanden Bout, “Effect of finite trajectory length on the correlation function analysis of single molecule data,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 125, no. 12, pp. 124701(1–9), 2006.
- [10] B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH, 2001.
- [11] G. B. Dutt, S. Doraiswamy y N. Periasamy, “Molecular reorientation dynamics of polar dye probes in tertiary-butyl alcohol–water mixtures,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 94, no. 8, pp. 5360–5369, 1991.

- [12] H. Tajalli, A. Ghanadzadeh Gilani, M. S. Zakerhamidi y P. Tajalli, "The photophysical properties of Nile red and Nile blue in ordered anisotropic media," *Dyes and Pigments*, vol. 78, no. 1, pp. 15–24, 2008.
- [13] T. Gensch, M. Böhmer y P. F. Aramendía, "Single molecule blinking and photobleaching separated by wide-field fluorescence microscopy.," *The Journal of Physical Chemistry: A*, vol. 109, no. 30, pp. 6652–8, 2005.
- [14] R. Zondervan, F. Kulzer, S. B. Orlinskii y M. Orrit, "Photoblinking of Rhodamine 6G in Poly (vinyl alcohol): Radical Dark State Formed through the Triplet," *Journal of Physical Chemistry A*, vol. 107, pp. 6770–6776, 2003.
- [15] R. Zondervan, F. Kulzer, M. A. Kol y M. Orrit, "Photobleaching of Rhodamine 6G in Poly (vinyl alcohol) at the Ensemble and Single-Molecule Levels," *Journal of Physical Chemistry A*, vol. 108, pp. 1657–1665, 2004.
- [16] A. Kowski, "Fluorescence Anisotropy: Theory and Applications of Rotational Depolarization," *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 23, no. 6, pp. 459–529, 1993.
- [17] J. W. Wu, "Birefringent and electro-optic effects in poled polymer films: steady-state and transient properties," *Journal of the Optical Society of America B*, vol. 8, no. 1, pp. 142–152, 1991.
- [18] A.-Y. Jee, S. Park, H. Kwon y M. Lee, "Excited state dynamics of Nile Red in polymers," *Chemical Physics Letters*, vol. 477, no. 1–3, pp. 112–115, 2009.
- [19] B. C. Barja, C. Chesta, T. D. Z. Atvars y P. F. Aramendía, "Relaxations in Poly (vinyl alcohol) and in Poly (vinyl acetate) Detected by Fluorescence Emission of 4-Aminophthalimide and Prodan," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 109, no. 33, pp. 16180–16187, 2005.
- [20] M. L. Bossi, M. E. Daraio y P. F. Aramendía, "Luminescence quenching of Ru(II) complexes in polydimethylsiloxane sensors for oxygen," *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 120, no. 1, pp. 15–21, 1999.
- [21] R. Zondervan, F. Kulzer, G. C. G. Berkhout y M. Orrit, "Local viscosity of supercooled glycerol near T_g probed by rotational diffusion of ensembles and single dye molecules.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 31, pp. 12628–33, 2007.
- [22] B. Richards y E. Wolf, "Electromagnetic Diffraction in Optical Systems. II. Structure of the Image Field in an Aplanatic System," *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, vol. 253, no. 1274, pp. 358–379, 1959.
- [23] J. Enderlein, I. Gregor, D. Patra y J. Fitter, "Art and artefacts of fluorescence correlation spectroscopy.," *Current Pharmaceutical Biotechnology*, vol. 5, no. 2, pp. 155–161, 2004.

- [24] S. A. Mackowiak, T. K. Herman y L. J. Kaufman, "Spatial and temporal heterogeneity in supercooled glycerol: evidence from wide field single molecule imaging.," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 131, no. 24, p. 244513 (1–14), 2009.
- [25] D. Axelrod, "Fluorescence microscopy of living cells in culture. Part B," in *Fluorescence polarization microscopy*, vol. 30, Taylor and Wang, Eds. Academic Press, 1989, pp. 333–352.
- [26] K. Bahlmann y S. Hell, "Electric field depolarization in high aperture focusing with emphasis on annular apertures," *Journal of microscopy*, vol. 200, no. 1, pp. 59–67, 2000.
- [27] M. D. Ediger, "Spatially heterogenous dynamics in supercooled liquids," *Annual Review of Physical Chemistry*, vol. 51, pp. 99–128, 2000.
- [28] M. T. Cicerone, F. R. Blackburn y M. D. Ediger, "Anomalous Diffusion of Probe Molecules in Polystyrene: Evidence for Spatially Heterogeneous Segmental Dynamics," *Macromolecules*, vol. 28, no. 24, pp. 8224–8232, 1995.
- [29] C.-Y. Wang y M. D. Ediger, "How Long Do Regions of Different Dynamics Persist in Supercooled o-Terphenyl?," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 103, no. 20, pp. 4177–4184, 1999.
- [30] N. Ghoneim, "Photophysics of Nile red in solution: steady state spectroscopy.," *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 56, no. 5, pp. 1003–1010, 2000.
- [31] C. Jung, C. Hellriegel, B. Platschek, D. Wöhrle, T. Bein, J. Michaelis y C. Bräuchle, "Simultaneous measurement of orientational and spectral dynamics of single molecules in nanostructured host-guest materials," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 129, no. 17, pp. 5570–5579, 2007.
- [32] P. Dedecker, B. Muls, A. Deres, H. Uji-i, J. Hotta, M. Sliwa, J.-P. Soumillion, K. Müllen, J. Enderlein y J. Hofkens, "Defocused Wide-field Imaging Unravels Structural and Temporal Heterogeneity in Complex Systems," *Advanced Materials*, vol. 21, no. 10–11, pp. 1079–1090, 2009.
- [33] W. Schroevers, R. Vallée, D. Patra, J. Hofkens, S. Habuchi, T. Vosch, M. Cotlet, K. Müllen, J. Enderlein y F. C. De Schryver, "Fluorescence lifetimes and emission patterns probe the 3D orientation of the emitting chromophore in a multichromophoric system.," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 126, no. 44, pp. 14310–1, 2004.
- [34] K. Binder, A. Milchev y J. Baschnagel, "Simulation studies on the dynamics of polymers at interfaces," *Annual Review of Materials Research*, vol. 26, pp. 107–134, 1996.

- [35] C. Mischler, J. Baschnagel y K. Binder, "Polymer Films in the Normal-Liquid and Supercooled State: A Review of Recent Monte Carlo Simulation Results," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 94, no. 1–3, pp. 197–227, 2001.
- [36] C. Mischler, J. Baschnagel, S. Dasgupta y K. Binder, "Structure and dynamics of thin polymer films: a case study with the bond-fluctuation model," *Polymer*, vol. 43, no. 2, pp. 467–476, 2002.
- [37] R. D. Priestley, M. K. Mundra, N. J. Barnett, L. J. Broadbelt y J. M. Torkelson, "Effects of Nanoscale Confinement and Interfaces on the Glass Transition Temperatures of a Series of Poly(n-methacrylate) Films," *Australian Journal of Chemistry*, vol. 60, no. 10, pp. 765–771, 2007.
- [38] S. Kim, M. K. Mundra, C. B. Roth y J. M. Torkelson, "Suppression of the T_g - Nanoconfinement Effect in Thin Poly(vinyl acetate) Films by Sorbed Water," *Macromolecules*, vol. 43, no. 11, pp. 5158–5161, 2010.
- [39] R. D. Priestley, C. J. Ellison, L. J. Broadbelt y J. M. Torkelson, "Structural relaxation of polymer glasses at surfaces, interfaces, and in between.," *Science*, vol. 309, no. 5733, pp. 456–9, 2005.
- [40] S. Kim, C. B. Roth y J. M. Torkelson, "Effect of Nanoscale Confinement on the Glass Transition Temperature of Free-Standing Polymer Films: Novel , Self-Referencing Fluorescence Method," *Polymer*, vol. 46, no. 24, pp. 2754–2764, 2008.
- [41] M. Alcoutlabi y G. B. McKenna, "Effects of confinement on material behaviour at the nanometre size scale," *Journal of Physics: Condensed Matter*, vol. 17, no. 15, pp. R461–R524, 2005.
- [42] Z. Zheng, F. Kuang y J. Zhao, "Direct Observation of Rotational Motion of Fluorophores Chemically Attached to Polystyrene in Its Thin Films," *Macromolecules*, vol. 43, pp. 3165–3168, 2010.
- [43] H. Uji-i, S. M. Melnikov, A. Deres, G. Bergamini, F. De Schryver, A. Herrmann, K. Müllen, J. Enderlein y J. Hofkens, "Visualizing spatial and temporal heterogeneity of single molecule rotational diffusion in a glassy polymer by defocused wide-field imaging," *Polymer*, vol. 47, no. 7, pp. 2511–2518, 2006.
- [44] A. J. Carattino, "Evolución temporal de la anisotropía en películas delgadas de polímero," Tesis de Licenciatura. Departamento de Física. UBA-FCEN, 2010.
- [45] H. Kaczmarek, A. Kaminska y A. Herk, "Photooxidative degradation of poly (alkyl methacrylate)s," *European Polymer Journal*, vol. 36, pp. 767–777, 2000.
- [46] C. Eggeling, J. Widengren, R. Rigler y C. A. M. Seidel, "Photobleaching of Fluorescent Dyes under Conditions Used for Single-Molecule Detection: Evidence of Two-Step Photolysis," *Analytical Chemistry*, vol. 70, no. 13, pp. 2651–2659, 1998.

- [47] L.-Y. Liu, D. Ramkrishna y H. S. Lackritz, “Rotational Brownian Motion of Chromophores and Electric Field Effects in Polymer Films for Second-Order Nonlinear Optics,” *Macromolecules*, vol. 27, no. 21, pp. 5987–5999, 1994.
- [48] C.-Y. Wang y M. D. Ediger, “Lifetime of spatially heterogeneous dynamic domains in polystyrene melts,” *The Journal of Chemical Physics*, vol. 112, no. 15, pp. 6933–6937, 2000.
- [49] K. Paeng, S. F. Swallen y M. D. Ediger, “Direct Measurement of Molecular Motion in Freestanding Polystyrene Thin Films,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 133, pp. 8444–8447, 2011.
- [50] G. S. Harms, M. Sonnleitner, G. J. Schütz, H. J. Gruber y T. Schmidt, “Single-molecule anisotropy imaging,” *Biophysical Journal*, vol. 77, no. 5, pp. 2864–2870, 1999.
- [51] R. Newburgh, J. Peidle y W. Rueckner, “Einstein, Perrin y the reality of atoms: 1905 revisited,” *American Journal of Physics*, vol. 74, no. 6, pp. 478–481, 2006.
- [52] Z. Cheng y T. Mason, “Rotational Diffusion Microrheology,” *Physical Review Letters*, vol. 90, no. 1, pp. 018304–1/4, 2003.
- [53] N. G. McCrum, B. E. Read y G. Williams, *Anelastic and Dielectric Effects in Polymeric Solids*. Dover Publications, 1967.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES GENERALES

5.1 CONCLUSIONES

1. La aplicación en conjunto de técnicas de espectroscopía de fluorescencia convencionales (espectrofluorímetro) y técnicas avanzadas de microscopía de fluorescencia (confocal y campo amplio) ha permitido revelar, a lo largo de la presente tesis, aspectos de la dinámica espectral y rotacional de la sonda, Rojo Nilo, en una serie de polialquilmecrilatos. Estos estudios proporcionaron información acerca de la heterogeneidad espacial y temporal de la caja de polímero donde se ubica la sonda y sobre la

sensibilidad de los cambios espectrales y de orientación a las interacciones sonda-polímero y a las dinámica de las cadenas principales del polímero en relación a la temperatura y el confinamiento de la película de polímero.

2. Uno de los grandes logros de este trabajo fue la adquisición de imágenes polarizadas de moléculas únicas con una excelente relación señal/ruido por medio de un microscopio de campo amplio y detección por CCD.

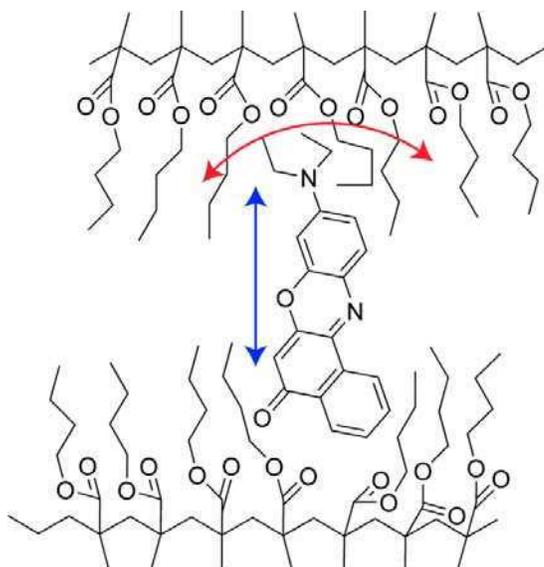
3. Se obtuvieron y caracterizaron películas de espesor controlado y reproducible en la escala nanométrica con una excelente calidad óptica por la técnica de spin-coating.

4. A partir de las medidas de excitación en el flanco rojo del espectro de excitación y de anisotropía de emisión, presentadas en los *Capítulo 3 y 4*, se adquirieron conocimientos preliminares del sistema sonda-polímero, como la selección de la sonda adecuada y sus características espectroscópicas en las matrices poliméricas. A partir de los experimentos de REE se obtuvo información cualitativa sobre la rigidez y polaridad de los entornos. La presencia de este efecto en las matrices indica que existe una distribución de energías de interacción sonda-caja de polímero. Se observó heterogeneidad en la polaridad de los polímeros, sin una dependencia con el espesor. Los valores de anisotropía de emisión estacionaria, en los que la sonda sensa la dinámica desde el estado excitado, mostraron valores de $\langle r \rangle \sim 0,4$ y constantes hasta 30 K por encima de T_g , cuando comienzan a descender.

5. La espectroscopía de moléculas únicas expone la heterogeneidad temporal y espacial que caracteriza al *estado vítreo*. Cada molécula de RN presenta un comportamiento espectral y dinámico único. En esta tesis se propuso relacionar las fluctuaciones espectrales y las de orientación de *moléculas únicas* con cambios en la dinámica de las cadenas de polímero en función de la temperatura y del espesor de la película. Se observaron fluctuaciones espectrales de amplitud baja y alta. Estas fluctuaciones se deben a cambios en las interacciones sonda-caja. Las de baja amplitud están relacionadas con movimientos estructurales de la sonda y de la caja que llevan a pequeños cambios en las interacciones. Las de alta amplitud se asocian a los grandes reacomodamientos en las interacciones de tipo van der Waals que pueden darse entre los componentes de las paredes de la caja y la relajación del grupo éster y alquilo. La homogeneidad de comportamiento de las fluctuaciones espectrales observada en todos los casos, sugiere que las fluctuaciones espectrales no están relacionadas con los movimientos involucrados en la transición vítrea.

6. En el caso de las fluctuaciones de orientación del estado fundamental de la sonda, se observaron comportamientos dinámicos diferentes. El estudio sistemático de las fluctuaciones de la anisotropía se realizó por medio del análisis de la FDAC de las diferencias de anisotropía. Estas diferencias están relacionadas con T_g y con el aumento de la dinámica de las cadenas de polímero por efecto del nanoconfinamiento. Mientras que de los cambios espectrales no llegan a sentir los cambios involucrados en los movimientos colectivos de las cadenas de polímero. Los cambios de anisotropía, que implican movimientos de reorientación grandes de la sonda, sienten el aumento en la dinámica de las cadenas poliméricas, incluso antes de alcanzar el valor de T_g . Esto se debe a que los cambios de orientación

tienen un mayor requerimiento de volumen libre o de acomodamiento de la caja para tener lugar, como se ilustra en el *Esquema 5.1*.



Esquema 5.1: Representación esquemática de los movimientos de RN en PBMA y comparación entre movimientos de reacomodamiento de la caja de polímero. Los cambios de orientación implican movimientos grandes de la sonda que requieren reordenamientos grandes de la caja (curva roja). Los cambios espectrales se deben a pequeños movimientos que son iguales en todos los polímeros, por ejemplo el representado con la flecha azul.

7. El fotoblanqueo limita el tiempo que se puede observar la emisión de una misma molécula. Por esto no es posible realizar estudios de correlación temporal de las señales a fin de obtener el tiempo característico de las fluctuaciones. La aplicación del análisis por FDAC de las trazas de posición espectral o de anisotropía pierde la información temporal del sistema. En esta tesis se propuso una solución al estudio de la dinámica

rotacional de sondas fluorescentes en presencia de fotoblanqueo bajo excitación linealmente polarizada. Es precisamente el fotoblanqueo con luz polarizada el que realiza una fotoselección, creando un desequilibrio que permite observar la difusión rotacional. Al aplicar la técnica de fotoblanqueo se obtiene un valor de D que informa sobre la dinámica de relajación del polímero. En todos los sistemas estudiados este valor es $\sim 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

APÉNDICES

APÉNDICE 1.A

1.A.1 Protocolos de limpieza de sustratos y capilares de vidrio

Para las determinaciones de fluorescencia sobre sustrato de vidrio es necesario que estos se encuentren libres de impurezas que emitan o dispersen la luz al ser irradiados con el haz de excitación. El protocolo de limpieza debe ser riguroso en cuanto al control de posibles fuentes de contaminación. En las medidas de fluorescencia de *moléculas únicas* la presencia de impurezas fluorescentes puede conducir a resultados ficticios. Para evitar contaminaciones todo el material debe ser de vidrio, ya que el solvente es tolueno y puede extraer compuestos aromáticos del material plástico.

Frascos, cubreobjetos y micropipetas de vidrio se limpian según los protocolos descritos a continuación. Es posible almacenar en estufa de uso exclusivo para material de vidrio limpio, a 80 °C, el material limpio para su posterior uso.

Las películas poliméricas preparadas sobre sustratos de vidrio limpiados por los *Protocolos 1.A.1.1* y *1.A.1.2*, prácticamente no contienen puntos brillantes al ser observadas en las condiciones de adquisición de imágenes especificadas en el *Capítulo 4*. El *Protocolo 1.A.1.1* se aplicó para la preparación de muestras en la determinación de espectros de emisión adquiridos en un espectrofluorímetro, *Capítulos 3* y *4*.

1.A.1.1 Solución de piraña

1. Colocar las muestras en el soporte adecuado para que estén separadas entres sí.
2. Sonicar en acetona durante 10 min.
3. Sonicar en etanol durante 10 min.
4. Sonicar en agua destilada durante 10 min.
5. Sonicar en Piraña (mezcla de Agua oxigenada-Acido Sulfúrico, 1:1) durante 1 h a 60 °C.
6. Lavar con abundante agua milliQ.
7. Secar en estufa a 90 °C.

1.A.1.2 Ozonizador

1. Colocar las muestras en el soporte adecuado para que estén separadas entres sí.
2. Sonicar en acetona durante 10 min.

3. Sonicar en etanol durante 10 min.
4. Sonicar en agua milliQ durante 10 min.
5. Secar en estufa.
6. Tratar en Ozonizador durante 30 min capilares+frascos+cubreobjetos.

Ambos protocolos son igualmente eficientes, pero en el caso del uso de Ozonizador el tiempo de limpieza se reduce considerablemente.

1.A.2 Protocolos utilizados para la limpieza de sustratos de silicio

En las determinaciones de espectros de *moléculas únicas*, según las especificaciones instrumentales aplicadas al *Capítulo 3*, se prepararon las películas poliméricas sobre sustratos de **silicio cristalino** con una capa de óxido de silicio de 100 nm de espesor, crecida térmicamente (*Center for Microtechnologies, ZFM, TU Chemnitz*). Debido a esto, tanto los sustratos de silicio como los cubreobjetos de vidrio, son químicamente equivalentes. Los sustratos de silicio fueron sometidos al siguiente protocolo de limpieza:

1.A.2.1 Solución de piraña y calentamiento a la llama

1. Colocar sustratos de silicio en un vaso de precipitados de 20 mL.
2. Sonicar en acetona durante 10 min a 50 °C.
3. Sonicar en etanol durante 10 min a 50 °C.
4. Sonicar en agua milliQ durante 10 min a 50 °C.
5. Sonicar en Piraña (mezcla de Agua oxigenada–Ácido Sulfúrico, 1:1) durante 2 h a 70 °C.
6. Lavar con abundante agua milliQ.

7. Calentar sobre llama hasta color naranja-blanco durante 30 s.

1.A.3 Protocolo de silanización de sustratos:

Para estudiar la influencia de las interfaces sobre la dinámica de las cadenas de polímeros en los sistemas del *Capítulo 3* se silanizaron los sustratos de vidrio. Los grupos polares en los PAMA son atraídos por los grupos silanol y siloxano de la superficie del vidrio. Para modificar estas interacciones se le confiere a la superficie del sustrato carácter no polar tratándolas con clorotrimetilsilano según:

1. Limpiar los sustratos (con etanol y acetona).
2. Tratar con sulfonítrica (mezcla de ácido nítrico-sulfúrico 1:1) durante 1 h.
3. Enjuagar con abundante agua milliQ.
4. Secar en estufa.
5. Tratar con clorotrimetilsilano en atmosfera seca hasta evaporación total.
6. Secar en estufa.

APÉNDICE 2.A

Desde un punto de vista microscópico la polaridad de un solvente comprende todo tipo de interacciones soluto-solvente. Existen dos famosas escalas empíricas espectroscópicas que se destacan de las demás por la amplitud de su uso: π^* y $E_T(30)$ [1], [2]. Ambas se basan en interacciones solvente-soluto que resultan en un corrimiento del espectro de emisión o absorción y utilizan como sondas: 4-nitroanisol y N - (4' - hidroxy - 3',5' - difenil) - 2,4,6 - trifenil- piridinio - betaina (betaina-30) respectivamente. $E_T(30)$ fue determinado por Dimroth y Reichardt para una gran cantidad de solventes y se define como la energía de transición de dicha sonda medida en kcal/mol asociada a la banda de absorción solvatocrómica de mayor λ del colorante n° 30 en el trabajo original de los autores [3].

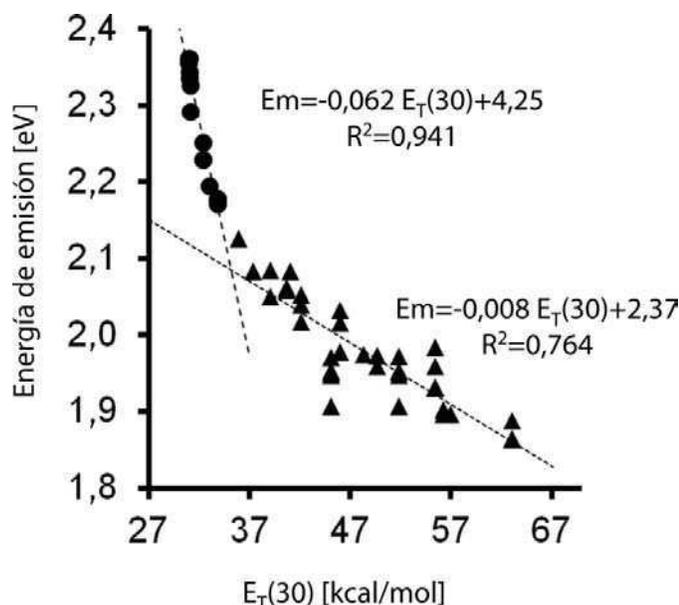


Figura 2.A.1: Correlación entre el máximo de emisión de RN en distintos solventes y la escala de polaridad empírica $E_T(30)$. Las líneas punteadas corresponden a ajustes lineales para: solventes con $E_T(30) < 36$ (círculos) y solventes con $E_T(30) > 36$ (triángulos).

Tabla 2.A.1: Datos de literatura del máximo de emisión de RN en distintos solventes (expresados en longitud de onda o número de onda) y el correspondiente valor de $E_T(30)$.

Solvente	Valor informado	Energía [eV]	$E_T(30)$	Ref.
n-hexano	19050 cm ⁻¹	2,36	31,0	A.6
n-hexano	19000 cm ⁻¹	2,36	31,0	A.8
n-dodecano	531 nm	2,33	31,1	A.1
n-heptano	529 nm	2,34	31,1	A.1
n-heptano	19047 cm ⁻¹	2,36	31,1	A.2
ciclohexano	18484 cm ⁻¹	2,29	31,2	A.2
ciclohexano	18750 cm ⁻¹	2,33	31,2	A.9
tetraclouro de carbono	17985 cm ⁻¹	2,23	32,5	A.2
tetraclouro de carbono	17985 cm ⁻¹	2,23	32,5	A.2
tetraclouro de carbono	18200 cm ⁻¹	2,25	32,5	A.6
xileno	565 nm	2,19	33,1	A.1
tolueno	17574 cm ⁻¹	2,18	33,9	A.2
tolueno	570 nm	2,18	33,9	A.4
tolueno	570 nm	2,17	33,9	A.5
1,4-dioxano	17152 cm ⁻¹	2,13	36,0	A.2
THF	16806 cm ⁻¹	2,08	37,4	A.2
cloroformo	595 nm	2,08	39,1	A.1
clorometano	16800 cm ⁻¹	2,05	39,1	A.6
diclorometano	16638 cm ⁻¹	2,06	40,7	A.2
diclorometano	16600 cm ⁻¹	2,06	40,7	A.6
acetato de etilo	16806 cm ⁻¹	2,08	41,1	A.2
acetona	608 nm	2,04	42,2	A.1
acetona	16556 cm ⁻¹	2,05	42,2	A.2
acetona	615 nm	2,02	42,2	A.3
DMSO	15898 cm ⁻¹	1,97	45,1	A.2
DMSO	637 nm	1,95	45,1	A.4
DMSO	650 nm	1,91	45,1	A.5
DMSO	15800 cm ⁻¹	1,95	45,1	A.6
acetonitrilo	16260 cm ⁻¹	2,01	46,0	A.2

acetonitrilo	627 nm	1,98	46,0	A.3
acetonitrilo	610 nm	2,03	46,0	A.9
2-propanol	628 nm	1,97	48,4	A.3
1-butanol	15923 cm ⁻¹	1,97	49,7	A.2
1-butanol	633 nm	1,96	49,7	A.3
etanol	650 nm	1,91	51,9	A.5
etanol	629 nm	1,97	51,9	A.1
etanol	15748 cm ⁻¹	1,95	51,9	A.2
etanol	635 nm	1,95	51,9	A.3
etanol	637 nm	1,95	51,9	A.4
metanol	15576 cm ⁻¹	1,93	55,5	A.2
metanol	642 nm	1,93	55,5	A.3
metanol	625 nm	1,98	55,5	A.7
metanol	15800 cm ⁻¹	1,96	55,5	A.8
etilenglicol	654 nm	1,90	56,3	A.4
etilenglicol	652 nm	1,90	56,3	A.3
glicerol	654 nm	1,90	57,0	A.4
agua	657 nm	1,89	63,1	A.1
agua	15037 cm ⁻¹	1,86	63,1	A.2
agua	665 nm	1,86	63,1	A.3

2.A REFERENCIAS

- [1] T. R. Kamlet JM, Abboud JLM, Abraham MH, “Linear solvation energy relationships. 23. A comprehensive collection of the solvatochromic parameters, π , α , and β , and some methods for simplifying the generalized solvatochromic equation,” *J Org Chem*, vol. 48, pp. 2877–2887, 1983.
- [2] Y. Marcus, “The properties of organic liquids that are relevant to their use as solvating solvents.,” *Chem Soc Rev*, vol. 22, no. 409, p. 416, 1993.
- [3] C. Reichardt, “ChemInform Abstract: Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators.,” *ChemInform*, vol. 26, no. 9, pp. no–no, 1995.

Referencias de la *Tabla 2.A.1*

- [A.1] P. Greenspan, E. P. Mayer y S. D. Fowler, "Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets" *The Journal of Cell Biology*, vol. 100, no. 3, pp. 965-73, 1985.
- [A.2] A. G. Gilani, M. Moghadam y M. S. Zakerhamidi, "Solvatochromism of Nile red in anisotropic media" *Dyes and Pigments*, vol. 92, no. 3, pp. 1052-1057, 2012.
- [A.3] D. L. Sackett y J. Wolff, "Nile red as a polarity-sensitive fluorescent probe of hydrophobic protein surfaces" *Analytical Biochemistry*, vol. 167, no. 2, pp. 228-234, 1987.
- [A.4] G. Hungerford y J. A. Ferreira, "The effect of the nature of retained solvent on the fluorescence of Nile Red incorporated in sol-gel-derived matrices" *Journal of Luminescence*, vol. 93, no. 2, pp. 155-165, 2001.
- [A.5] T. M. R. Viseu, G. Hungerford, A. F. Coelho y M. I. C. Ferreira, "Dye-Host Interactions for Local Effects Recognition in Homogeneous and Nanostructured Media" *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 107, no. 48, pp. 13300-13312, 2003.
- [A.6] B. Boldrini, E. Cavalli, A. Painelli y F. Terenziani, "Polar Dyes in Solution: A Joint Experimental and Theoretical Study of Absorption and Emission Band Shapes" *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 106, no. 26, pp. 6286-6294, 2002.
- [A.7] A. K. Dutta, K. Kamada y K. Ohta, "Spectroscopic studies of Nile red in organic solvents and polymers" *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 93, no. 1, pp. 57-64, 1996.
- [A.8] Y. Hou, A. M. Bardo, C. Martinez y D. A. Higgins, "Characterization of Molecular Scale Environments in Polymer Films by Single Molecule Spectroscopy" *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 104, pp. 212-219, 2000.
- [A.9] A. Kowski, P. Bojarski y B. Kuklinski, "Estimation of ground- and excited-state dipole moments of Nile Red dye from solvatochromic effect on absorption and fluorescence spectra" *Chemical Physics Letters*, vol. 463, no. 4-6, pp. 410-412, 2008.

APÉNDICE 3.A

3.A.1 Parámetros T, S y Q para la solución de la Ec. 4.12.

Los polinomios de Legendre son una familia de polinomios que esta definida por la ecuación

$$P_n(x) = \frac{1}{2^n n!} \frac{d^n}{dx^n} (x^2 - 1)^n, \quad (n = 0, 1, 2, 3, \dots) \quad \text{Ec. 3.A.1}$$

$$P_0(x) = 1; \quad P_1(x) = x; \quad P_2(x) = \frac{1}{2}(3x^2 - 1);$$

$$P_3(x) = \frac{1}{2}(5x^3 - 3x); \dots$$

Ec. 3.A.2

Si $P_n(x)$ es una familia de polinomios de grado n , todo polinomio de grado m puede escribirse de la forma:

$$P(x) = \sum_{n=0}^m c_n P_n(x) \quad \text{Ec. 3.A.3}$$

donde c_n son coeficientes numéricos que dependen de n y $P(x)$.

A partir de la Ec. 3.A.3 se propone la solución para Ec. 4.12 dada por

$$N(\theta, t) = \sum_{l=0}^{\infty} C_l(t) P_l(\cos\theta) \quad \text{Ec. 3.A.4}$$

donde $x = \cos\theta$ y $n=l$. Si se tiene en cuenta la relación de recurrencia para los polinomios de Legendre, $P_l(\cos\theta)$

$$\cos\theta P_l = [(l+1)/(2l+1)]P_{l+1} + \left[\frac{l}{2l+1}\right]P_{l-1} \quad \text{Ec. 3.A.5}$$

Se obtiene

$$\begin{aligned} \cos^2\theta P_l = & \left\{ \frac{l+1}{[(2l+1)(2l+3)]} \right\} [(l+2)P_{l+2} + (l+1)P_l] \\ & + \{l/[(2l+1)(2l-1)]\} [lP_l + (l-1)P_{l-2}] \end{aligned} \quad \text{Ec. 3.A.6}$$

Al reemplazar las ecuaciones 3.A.4 y 3.A.6 en la Ec. 4.12 se llega a la Ec. 4.14, que relaciona los coeficientes de 3.A.4. Reordenando los términos se llega a los coeficientes S, T y Q

$$T_1 = \frac{4l^3 + 6l^2 - 1}{8l^3 + 12l^2 - 2l - 3} \quad \text{Ec. 3.A.7}$$

$$S_1 = \frac{2l^3 + 5l^2 + l - 2}{8l^3 + 12l^2 - 2l - 3} \quad \text{Ec. 3.A.8}$$

$$Q_1 = \frac{2l^3 + l^2 - 3l}{8l^3 + 12l^2 - 2l - 3} \quad \text{Ec. 3.A.9}$$

Una vez que elegido el número de términos de la expansión 3.A.4, el

sistema de la *Ec. 4.14* puede resolverse usando el método de autovalores por resolución numérica. Se consideraron hasta los 16 primeros términos ya que por encima de este valor los resultados permanecen invariantes. Si la velocidad de fotoblanqueo es grande comparado con el coeficiente de difusión rotacional, la intensidad total decae muy rápidamente a valores cercanos a cero y comienzan a evidenciarse errores en el cálculo del decaimientos de $r(t)$. El cálculo de la *Ec. 4.12* requiere hasta 16 términos para que $r(t)$ converja a un valor constante, *Figura 3.A*. Cuanto mayor es la velocidad de fotoblanqueo respecto de la difusión rotacional mayor error se comete en el calculo del decaimiento de $r(t)$. El tratamiento de los resultados es similar al propuesto por Enderlein en [4].

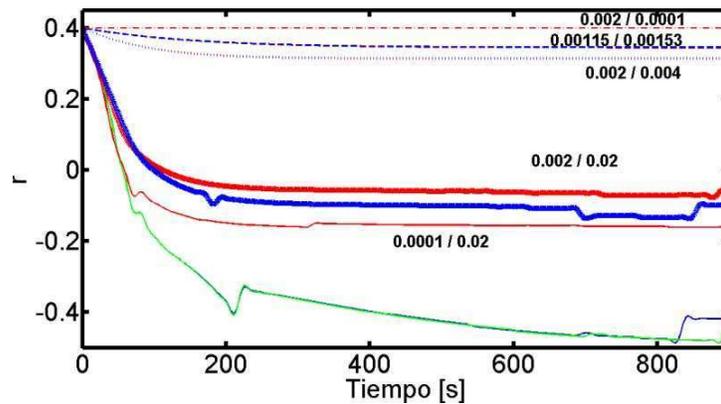


Figura 3.A.1: Influencia del número de términos en el decaimiento de anisotropía calculado. Los cocientes sobre cada curva son los valores de $\frac{D}{\phi}$ empleados en los cálculos. Curva roja: 4 términos, verde: 10 términos, azul: 16 términos.

Dentro del intervalo de anisotropías experimentales, los cálculos considerando 4 términos son prácticamente iguales a los de 16 términos.

3.A.2 Cálculo de la intensidad en el haz gaussiano

La potencia del haz de excitación está distribuida sobre la muestra con una función aproximadamente Gaussiana (*Figura 3.A.2*), debido al modo TEM₀₀ del laser utilizado. Así, al excitar una muestra de fluoróforos distribuidos homogéneamente se adquiere la imagen de emisión (mediante una CCD) la cual permite una descripción completa del haz de excitación en 2D.

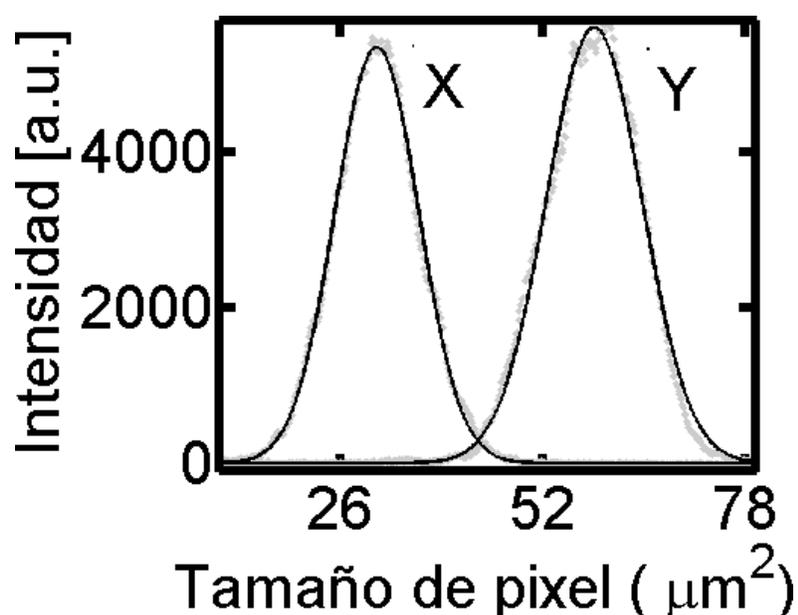


Figura 3.A.2: ajuste gaussiano para las líneas de píxel de la figura 4.20, según la ecuación $f(x) = a1 \cdot \exp(-((x-b1)/c1)^2)$, donde para X: $a1 = 5609 \pm 5$, $b1 = 450 \pm 2$ y $c1 = 66 \pm 1$; para Y: $a1 = 5355 \pm 5$, $b1 = 236 \pm 2$ y $c1 = 58.22 \pm 1$.

La distribución de la intensidad en un haz gaussiano esta dado por la ecuación:

$$I(a) = I_0 e^{-\frac{2a^2}{w^2}} \quad \text{Ec. 3.A.10}$$

donde I_0 : la intensidad máxima en el eje z ($a=0$), z : dirección de propagación; w : el radio del haz y a : la distancia radial desde el centro del haz ($a^2=x^2+y^2$). Esta descripción representa una función gaussiana centrada en $a=0$, con una distribución radial simétrica, *Figura 3.A.3*. Cuando $a=w$ la intensidad se reduce hasta $1/e^2$ de la I_0 .

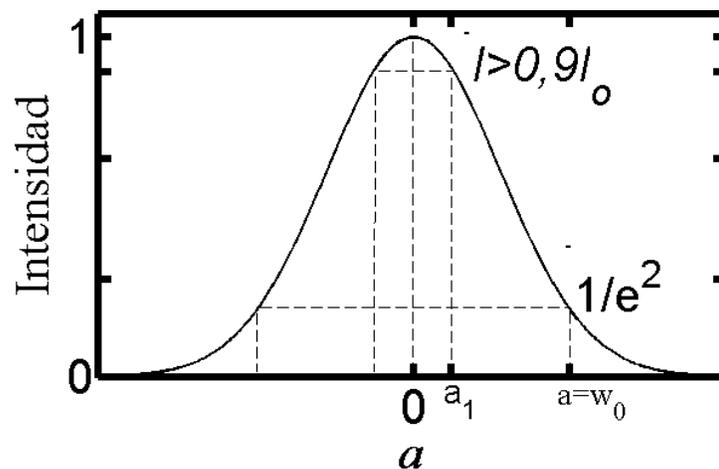


Figura 3.A.3: Distribución gaussiana de la intensidad en un laser con modo TEM_{00} .

La potencia es $P=I*A$, donde A : área, a partir de esta ecuación podemos obtener una expresión para la potencia en función de un a particular, $P(a)$, integrando la Ec. 3.A.10 desde $a=0$ hasta $a= a_1$:

$$P(a) = \int_0^{a_1} \int_0^{2\pi} I_0 e^{-\frac{2a^2}{w^2}} d\theta da \quad \text{Ec. 3.A.11}$$

donde $d\theta da = dA$, es un diferencial de área en coordenadas polares. Resolviendo la integral se obtiene:

$$P(a_1) = \frac{I_0 \pi w^2}{2} \left[1 - e^{-\frac{2a_1^2}{w^2}} \right] \quad \text{Ec. 3.A.13}$$

A partir de esta ecuación se calcula la intensidad máxima como $I_0 = 2P/\pi w^2$. Y reemplazando en la Ec. 3.A.10, se calcula la intensidad dentro del círculo a_1 para el cual la $I \geq 0,9 \times I_0$.

GLOSARIO DE TÉRMINOS Y SÍMBOLOS

T_g	Temperatura de transición vítrea	Capítulo 1
V_{esp}	Volumen específico	Capítulo 1
M_w	Masa molecular media en masa	Capítulo 1
M_n	Masa molecular media en número	Capítulo 1
I_{PD}	Índice de polidispersidad	Capítulo 1
PBMA	Polibutilmetacrilato	Capítulo 1
PEMA	Polietilmetacrilato	Capítulo 1
PiBMA	Poliisobutilmetacrilato	Capítulo 1
PMMA	Polimetilmetacrilato	Capítulo 1
PPMA	Polipropilmetacrilato	Capítulo 1
PAMA	Polialquilmetacrilato	Capítulo 1
λ_{em}	Longitud de onda de emisión.	Capítulo 1
ν_{em}	Posición espectral del máximo de emisión (cm^{-1})	Capítulo 1
ε	Coefficiente de absorción molar	Capítulo 1
k_r	Constante asociada a procesos radiativos	Capítulo 1
k_{nr}	Constante asociada a procesos no radiativos	Capítulo 1
Φ_F	Rendimiento cuántico de fluorescencia.	Capítulo 1
λ_{exc}	Longitud de onda de excitación	Capítulo 1
REE	Efecto de excitación en el flanco rojo del espectro	Capítulo 1
ΔREET	Influencia de la temperatura sobre REE	Capítulo 1
μ	Momento dipolar	Capítulo 1
E	Dirección del campo eléctrico de la luz de excitación linealmente polarizada	Capítulo 1
M_E	Momento de transición de emisión	Capítulo 1
M_A	Momento de transición de absorción	Capítulo 1
M	Momento de transición para M_A paralelo a M_E ($\beta=0$)	Capítulo 1

θ	Ángulo entre M y E	Capítulo 1
β	Ángulo entre el momento de transición de absorción M_A y de emisión, M_E	Capítulo 1
φ	Ángulo entre la proyección de M en el plano xy y el eje x .	Capítulo 1
$r(\lambda)$	Anisotropía de emisión de fluorescencia.	Capítulo 1
$r(t)$	Anisotropía de emisión de fluorescencia a tiempo t	Capítulo 1
D	Coefficiente de difusión rotacional	Capítulo 1
EMU	Espectroscopía de moléculas únicas	Capítulo 1
ECF	Espectroscopía de correlación de fluorescencia	Capítulo 1
AFM	Microscopía de fuerza atómica	Capítulo 2
SEM	Microscopía electrónica de barrido	Capítulo 2
$Ru(bpp)_3^{+2}$	Rutenio (II) tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)	Capítulo 2
4-AP	4-aminoftalimida	Capítulo 2
R6G	Rodamina 6 G	Capítulo 2
RN	Rojo Nilo	Capítulo 2
TE	Transferencia de energía no radiativa	Capítulo 2
Φ_{TE}	Eficiencia de transferencia de energía	Capítulo 2
R_0	Distancia crítica de transferencia entre donador y aceptor	Capítulo 2
$I_{VV}(\lambda)$	Intensidad adquirida con excitación vertical y emisión verticalmente polarizadas	Capítulo 2
$I_{VH}(\lambda)$	Intensidad adquirida con excitación vertical y emisión horizontalmente polarizadas	Capítulo 2
$I_{HV}(\lambda)$	Intensidad adquirida con excitación horizontal y emisión verticalmente polarizadas	Capítulo 2
$I_{VH}(\lambda)$	Intensidad adquirida con excitación horizontal y emisión horizontalmente polarizadas	Capítulo 2
$G(\lambda)$	Factor de corrección de la diferente sensibilidad del sistema de detección a la luz polarizada.	Capítulo 2
η	Índice de refracción	Capítulo 2

NA	Apertura numérica de un objetivo	Capítulo 2
$\Delta\nu^{\text{REE}}$	Medida del efecto REES entre 490 nm y 540 nm de longitud de onda de excitación	Capítulo 3
E_{max}	Posición espectral del primer máximo de emisión	Capítulo 3
$E_{\text{T}}(30)$	Escala de polaridad empírica	Capítulo 3
FDAC	Función de distribución acumulada complementaria	Capítulo 3
$\log\Phi_c(\Delta E^2)$	Logaritmo de la función de distribución acumulada complementaria de las diferencias de energía	Capítulo 3
k_{12}	Constante de velocidad del proceso de salto en la dirección 1→2	Capítulo 3
k_{21}	Constante de velocidad del proceso de salto en la produzca un salto en la dirección 2→1	Capítulo 3
f_{12}	Frecuencia de saltos en la dirección 1→2	Capítulo 3
f_{21}	Frecuencia de saltos en la dirección 2→1	Capítulo 3
Γ_{12}	Fracción de tiempo que el sistema permanece en E_2	Capítulo 3
Γ_{21}	Fracción de tiempo que el sistema permanece en E_1	Capítulo 3
N_t	Numero de total de saltos espectrales	Capítulo 3
K_{eq}	constante de equilibrio entre conformaciones diferentes de la sonda-caja de polímero	Capítulo 3
τ_{res}	Tiempo de residencia entre estados en estado (B o C)	Capítulo 3
$\log\Phi_c(\Delta r^2)$	Logaritmo de la función de distribución acumulada complementaria de las diferencias de anisotropía	Capítulo 4
k_{F}	Constante de velocidad de emisión de fluorescencia	Capítulo 4
σ	Sección eficaz de absorción de la molécula	Capítulo 4
I_a	Velocidad de absorción de luz	Capítulo 4
I_0	Velocidad de flujo fotónico incidente	Capítulo 4
ϕ	Constante de pseudo-primer orden de fotoblanqueo	Capítulo 4
Φ_b	Rendimiento cuántico de fotoblanqueo	Capítulo 4
MSD	Desplazamiento cuadrático medio angular	Capítulo 4

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas e instituciones que han hecho posible la elaboración de este trabajo de tesis, tanto en lo científico como en lo personal. Ha sido un camino difícil y largo, y al final de este viaje he llegado a la conclusión de que, además de haber aprendido y disfrutado de las discusiones científicas, me llevo en el corazón muchísima gente a la que quiero y respeto profundamente.

A mis padres: A él por mostrarme desde mis primeros pasos la belleza que nos rodea en la naturaleza, por enseñarme a trabajar y por inculcarme los valores que son pilares en mi vida. A ella, por hacer y dar todo siempre. Por los desayunos, las corridas, y por acompañarme paso a paso en mi educación. Doy gracias a Dios, todos los días, por estar con Uds.

A mi marido, Cris, porque sus brazos me contienen siempre y sus palabras son sanas y precisas. Por cuidarme el alma... Por comprender y acompañarme en el camino que elegí. Te prometo firmemente que tesis hay una sola!

A Pedro, porque bajo su dirección aprendí muchísimo, gracias a su paciencia y apoyo constante. Le agradezco especialmente el tiempo que dedicó a mi formación y a darme palabras de aliento en los momentos difíciles. Por las interesantes charlas y los tiempos de trabajo arduo, que en conjunto, siempre dieron excelentes resultados.

A Bety Barja y Julia Roberti, por las charlas, por amar la ciencia. Por ser un ejemplo constante de trabajo, esfuerzo y amor en la facultad, siempre tratando a todos con tanto respeto.

A Sabrina Simoncelli, por brillar siempre con su pasión por la ciencia y su compromiso con la formación de todos los estudiantes. Por estar siempre dispuesta a ayudar al prójimo desinteresadamente. Voy a extrañar mucho tenerte de compañera de trabajo, pero me reconforta saber que forjamos una amistad inquebrantable.

A Aquiles Carattino por ser un compañero dispuesto y generoso como pocos. Por las interesantes charlas que me han ayudado como disparadores de nuevas ideas.

A Pablo Hoijemberg, por ser un amigo increíble y por ocuparse de todos para que seamos mejores personas. En especial agradezco el acompañamiento y la gran ayuda en los últimos meses de escritura de la tesis, prueba de que la distancia desaparece cuando la amistad es fuerte.

A Gabriela Lagorio y Gabriela Cordón, por tener siempre una sonrisa y palabras dulces en los momentos difíciles, por su compromiso con el trabajo y sobre todo, con la familia.

A Andrea Montenegro y Martin, por su amistad, única, imprescindible. Por tener siempre palabras de apoyo. Gracias por acompañarme tanto!

A Martin Mirenda, agradezco el respeto que demuestra diariamente a la educación, la ciencia y las instituciones. Por su calidad científica y los buenos aportes que ha hecho en mi formación como estudiante y como científica. Cada uno de sus comentarios siempre me ayudó a pensar mejor. Estoy segura que su contribución a la sociedad va a ser muy significativa.

A Eugenia Tomasini, por su paciencia, acompañamiento y consejo durante los momentos críticos de la entrega de este trabajo de tesis. Por aguantar casi de manera estoica un espectro infinito de estados anímicos entre quejas, alegrías y esfuerzos. Por su compromiso activo y constante con la sociedad. Por hacer de nuestro lugar de trabajo un sitio más entretenido y distendido para discutir sobre ciencia, política y la vida. GRACIAS!!!

A todo el grupo de fotoquímica, gracias por compartir todos estos años juntos y generar un ambiente de trabajo hermoso. Las reuniones de grupo siempre fueron un lugar donde las discusiones científicas impulsaron el trabajo de todos. Enrique S., Lelia D., Analía I., Maira T., Noelia Z., Vir D. (gracias!!!), Alan S., Hernán R. y Sergio L.; de cada uno aprendí muchísimo y los guardo con un cariño muy especial en mi corazón.

Al grupo de la Dra. Teresa Atvars en UNICAMP-Brasil, Tatiana Duque-Martins, Raquel Domingues y Walmir. Con ellos compartí mi primera experiencia laboral en el exterior. Me recibieron y enseñaron todo con respeto y afecto. Al día de hoy tengo los mejores recuerdos de mi estadía en Campinas. Especialmente agradezco a la Dra. Atvars por las excelentes discusiones científicas, por la pasión y amor que transmite por la investigación.

Al grupo del Dr. Christian von Borczyskowski en TU-Chemnitz-Alemania, en especial a Daniela Taüber y Stefan Krause, con quienes trabajamos arduamente y me ayudaron a comprender sobre la dinámica espectral de moléculas únicas. A Thomas Baumgärtel y Danny Kowerko, por su calidez y disposición a enseñarme su ciudad con tanto cariño. Quisiera recalcar en especial las interesantes charlas con el Dr. von Borczyskowski, su amabilidad y disponibilidad durante mi estadía en Chemnitz. Por su colaboración en mi investigación, siempre con un excelente nivel científico, rigurosidad e imaginación.

Al grupo de la Dra. Bilmes, por su generosa disposición para el uso del spin-coater y el ozonizador.

A Silvia E. Braslavsky por sus buenos consejos y su compromiso con el desarrollo de la ciencia en el país y el mundo.

A la memoria de la Dra. Elizabeth Jares-Erijman, por habernos brindado su apoyo y disposición en esta tesis, y por su compromiso con la nanotecnología, biología y física del país. Y Eliseo, por las piezas indispensables...

A las chicas y chicos de la E16, porque sin su ayuda en el momento culmine de presentación de la tesis, este día no llegaba.

A mis compañeros de estudio, Lou F., Martin G., Diego P., Fernando M., Nico S., Javier S., Jose M., Martin A., Ingrid M., Sebastián T., Eugenio O., Romina V., Cori, por las infinitas horas de estudio y las acaloradas discusiones que nos llevaron a todos a entender, al menos algunos de los hermosos fenómenos de la naturaleza.

A mis compañeros de docencia en el CBC, de quienes siempre recibí palabras de apoyo y cariño.

A Alberto Viale, Eduardo Corton y Pablo Englebienne por acompañarme en mis primeros pasos en el mundo científico.

A Alejandra y Alberto, por su sonrisa, disposición constante, eficiencia y amor por su trabajo. Gracias por hacernos la vida más feliz y en muchos casos más simple!!!

A mis profesores, colegas, compañeros de oficina y amigos de la facultad, con los que he compartido día a día durante estos años. Y a toda la gente que de una u otra forma acompañaron mi trabajo y crecimiento.

A mi hermanita, por el amor infinito que nos une y por el apoyo en todos mis proyectos. A mis hermanos, por cuidarme siempre.

A las instituciones que han apoyado y financiado este trabajo de tesis:

- Agencia de Promoción Científica y Tecnológica,
- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)
- DQIAQF-FCEN-UBA
- Proyecto conjunto entre Alemania y Argentina: DAAD-MINCYT

A todos, muchas gracias.