

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

TESIS DOCTORAL

**Dinámica del estado excitado y estructura
de agregados ADN-Ag_n: estudio
teórico-experimental**

Autor:

**Lic. Martín Ignacio
TACCONE**

Director:

Dr. Gustavo PINO

Co-director:

Dr. Cristián SÁNCHEZ

Instituto de Investigaciones en Físicoquímica de Córdoba

Departamento de Físicoquímica

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba

Dinámica del estado excitado y estructura de agregados ADN- Ag_n : estudio teórico-experimental

Martín Ignacio Taccone

Director: Dr. Gustavo Pino

Co-director: Dr. Cristián Sánchez

Comisión evaluadora de tesis:

Dr. Andrés H. Thomas

Dr. Maximiliano Burgos Paci

Dr. Martín Patrito

Dra. Liliana B. Jimenez

Universidad Nacional de Córdoba

Departamento de Físicoquímica

Facultad de Ciencias Químicas



El presente trabajo de tesis doctoral fue realizado en el Departamento de Físicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba; Instituto de Investigaciones en Físicoquímica de Córdoba (INFIQC-CONICET), bajo la dirección del Dr. Gustavo Pino y codirección del Dr. Cristián Sánchez y se presenta a consideración de dicha Facultad para optar por el título de Doctor en Ciencias Químicas.

Director:

Dr. Gustavo Pino

Co-director:

Dr. Cristián Sánchez

Comisión evaluadora:

Dr. Andrés H. Thomas

Dr. Martín Patrino

Dra. Liliana Jimenez

Dr. Maximiliano Burgos Paci

Resumen

El estudio de los procesos que ocurren luego de la absorción de luz en sistemas de interés biológico es de suma importancia a la hora de generar nuevos materiales biocompatibles para su potencial uso en medicina y nanotecnología. El objetivo principal de esta tesis doctoral fue estudiar los mecanismos involucrados en la absorción y emisión de luz de pequeños clústeres de Ag híbridos en cadenas cortas de ADN, mediante una aproximación *bottom-up*.

La primera parte analiza la interacción específica de la base del ADN citosina con la Ag y los procesos que ocurren luego de la absorción de luz ultravioleta, en comparación a otros metales como Na y K, mediante la técnica de fotofragmentación UV en fase gaseosa y cálculos teóricos *ab initio* de estado excitado.

En una segunda parte, en dirección hacia una mejor representación del sistema de estudio, se analizaron las propiedades ópticas y dinámica electrónica de modelos de clústeres de Ag híbridos en cadenas de ADN de distinta complejidad mediante dinámica molecular clásica y dinámica electrónica.

Por último se muestran los resultados obtenidos sobre los mecanismos involucrados en la absorción y emisión de luz en pequeños clústeres de Ag, sintetizados mediante técnicas electroquímicas, libre de ligandos y en agua ultrapura, como potenciales precursores para la generación de materiales híbridos biocompatibles.

Agradecimientos

El trabajo presentado en esta tesis doctoral fue posible gracias al aporte de SECYT-UNC, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y especialmente al CONICET quien financió mi beca interna doctoral.

Agradecer en segundo lugar a mis directores Dr. Gustavo Pino y Dr. Cristián Sánchez por el apoyo, la paciencia y la excelente disposición en todo momento.

También agradecer a todas aquellas personas con las cuales realizamos colaboraciones científicas: Christophe Jouvét (Universidad de Aix-Marseille, Marsella, Francia) y Gilles Gregoire (Universidad de Paris-Sud, Orsay, Francia) y sus equipos de trabajo, Sergio Dassie y Ariel Fernandez (FCQ-UNC) por las innumerables horas de discusión de resultados.

Un agradecimiento muy especial a los miembros del grupo, actuales y pasados, por las anécdotas, risas y discusiones: Fede, Mati, Juan Pablo, Rafael, Gene, Cruz, Agus, María, Maxi, Walter, Lucinda, Franco, Cande y Charly.

A mi familia, en especial a mi viejo Raúl que fue siempre un modelo a seguir, Nora, Andrés, Marcos y Nona por el apoyo incondicional. A Aru, por todo el camino recorrido.

Por último a mis amigos de toda la vida, por los momentos vividos, y a lo mejor que me dejó esta facultad: Nico, Franco, Pancho, Tincho, Nahuél y Ángel.

A todos los que alguna vez se cruzaron en este hermoso camino, gracias.

Índice general

1. Introducción y Antecedentes	1
1.1. Estructura y Conformación de los Ácidos Nucleicos	2
1.1.1. Apareamiento y Plegamiento No Canónico	7
1.2. Interacción del ADN con Metales	9
1.2.1. Nanoclústeres Metálicos	10
1.2.2. Propiedades Ópticas de Agregados ADN-Ag _n	12
1.3. Objetivos	17
1.4. Organización de la Tesis	18
2. Fundamentos y Metodologías	21
2.1. Introducción	22
2.2. Espectroscopía en Fase Gaseosa	22
2.2.1. Espectrometría de Masas	22
2.2.1.1. Vaporización e Ionización por Electrospray	24
2.2.1.2. Analizador por Tiempo de Vuelo	25
2.2.1.3. Multipolo Lineal	26
2.2.1.4. Trampa Iónica Cuadrupolar Tridimensional	29
2.2.2. Espectroscopía de Fotofragmentación UV	32
2.2.2.1. Fundamentos	32
2.2.2.2. Sistema experimental	37
2.3. Fundamentos y Metodologías Teóricas	40
2.3.1. Métodos <i>ab initio</i>	41

2.3.1.1.	Método <i>Coupled-Cluster</i>	44
2.3.1.2.	Teoría del Funcional de la Densidad	45
2.3.2.	Dinámica Cuántica - KRONOS	48
2.3.3.	Dinámica Clásica	53
2.3.3.1.	Campos de Fuerza	54
2.3.3.2.	Integración de las Ecuaciones de Movimiento	55
2.3.3.3.	Condiciones Periódicas de Contorno	56
3.	Espectroscopía de Complejos CytM⁺	57
3.1.	Introducción	58
3.2.	Sistema Experimental	60
3.3.	Resultados	62
3.3.1.	Espectroscopía del Complejo CytAg ⁺	62
3.3.2.	Espectroscopía de los Complejos CytNa ⁺ y CytK ⁺	69
3.4.	Conclusiones Parciales	78
4.	Dinámica Cuántica en Complejos ADN-Ag_n	81
4.1.	Introducción	82
4.2.	Sistema Teórico	84
4.2.1.	Elección de los sistemas modelos	84
4.2.2.	Metodología	86
4.3.	Resultados	88
4.3.1.	Modelo PolyC-Ag ⁰	88
4.3.2.	Influencia de la Carga	101
4.3.3.	Modelo <i>Zig-zag</i> PolyC-Ag _n ^{0/+}	108
4.3.4.	Conclusiones Parciales	120
5.	Nanoclústeres de Ag en Solución Acuosa	123
5.1.	Introducción	124
5.2.	Sistema Experimental	126

5.3. Resultados	129
5.3.1. Caracterización Experimental	129
5.3.2. Caracterización Teórica	138
5.4. Conclusiones Parciales	149
6. Conclusiones y Perspectivas	151
6.1. Conclusiones Finales	152
6.2. Perspectivas	156
Bibliografía	159

Capítulo 1

Introducción y Antecedentes

1.1. Estructura y Conformación de los Ácidos Nucleicos

Los primeros estudios sobre el ácido desoxirribonucleico, comúnmente llamado ADN, fueron realizados por Avery, MacLeod y McCarty en 1944, quienes descubrieron que éste era el agente responsable de la herencia genética[1]. Años más tarde, estudios de difracción de rayos X realizados por Watson, Crick y Franklin mostraron que esta molécula poseía una estructura en forma de doble hélice[2, 3]. Este descubrimiento fue la base para la entonces novedosa biología molecular, desde donde fue posible entender mecanismos de replicación, transcripción y transporte en términos moleculares. En los años siguientes, los estudios estructurales de los ácidos nucleicos mediante el uso de métodos como difracción de rayos X, resonancia magnética nuclear (RMN) y microscopía electrónica, han provisto de importante información en relación a su conformación y función celular. Para mayor información, el lector interesado puede recurrir a la siguiente bibliografía [4-7].

Los ácidos nucleicos son biopolímeros *construidos* a partir de unidades monoméricas denominadas nucleótidos. La estructura primaria está definida como la secuencia de monómeros que la constituye. Estos monómeros se componen de tres unidades químicas distintivas: una base, un azúcar y un grupo fosfato.

Las bases son anillos aromáticos con nitrógenos heterocíclicos, derivados de la purina y de la pirimidina, provistos de grupos funcionales que puede actuar como donores o aceptores en enlaces puente hidrógeno. El análisis químico del material genético celular muestra la existencia de 4 nucleótidos en el ADN, los cuales se diferencian según la base nitrogenada que contienen. Dos de ellas, Adenina (A) y Guanina (G) contienen anillos

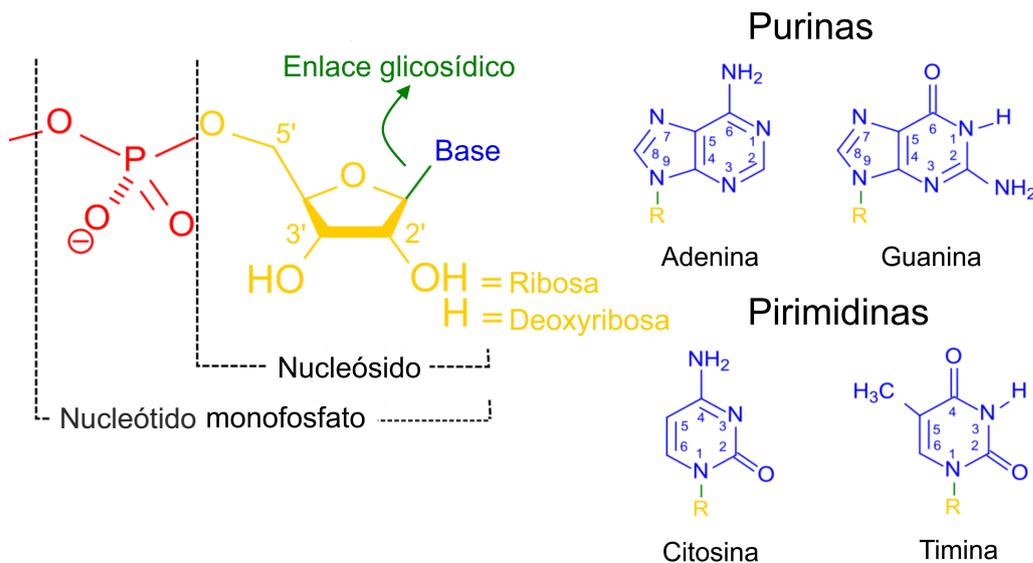


FIGURA 1.1: Esquema representativo de la estructura de un nucleótido. En azul se muestran las bases del ADN, en amarillo el grupo azúcar y en rojo el grupo fosfato.

púricos (purinas), mientras que las dos restantes, Citosina (C) y Timina (T) contienen anillos pirimidínicos. Éstas se unen mediante un enlace glicosídico C–N a una pentosa cíclica, siendo en el ADN la β -D-desoxiribosa, formando los denominados *nucleósidos*. Éstos a su vez están unidos entre sí a través de grupos fosfato, enlazados por el carbono 3' de un nucleósido y el carbono 5' del otro. La Figura 1.1 muestra un esquema de la estructura y la partes constituyentes de un ácido nucleico.

La unión entre los distintos nucleótidos a través de los grupos fosfato determinan la estructura primaria de la molécula ADN. A modo ilustrativo, la Figura 1.2 muestra una porción de una simple hebra de ADN compuesta por cuatro nucleótidos, de secuencia 5'-ATGC-3'.

Los nucleótidos son moléculas estructuralmente complejas cuando se considera su conformación tridimensional. En particular, el azúcar puede adoptar distintas conformaciones que modifican la estructura secundaria y terciaria de la molécula de ADN. En la Figura 1.3a se muestran dos de los confórmeros biológicamente más relevantes que puede adoptar el azúcar. Cuando ésta pasa de una conformación C3'-endo a C2'-endo, el enlace

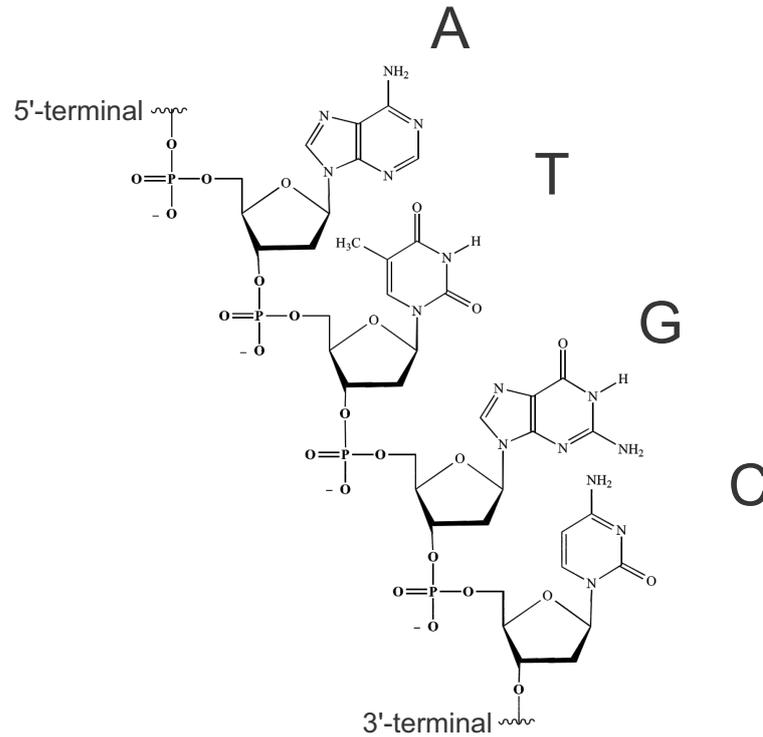


FIGURA 1.2: Estructura bidimensional de una simple hebra de ADN de secuencia 5'-ATGC-3'.

fosfatídico en C3' cambia de posición ecuatorial a posición axial, lo cual modifica el *esqueleto* de la molécula de ADN. Otra variación conformacional relevante es la rotación de la base respecto al enlace glicosídico, como se muestra en la Figura 1.3b. Cuando la rotación de dicho enlace genera que la base se encuentre *apartada* de la azúcar, se habla de una conformación *anti*, mientras que, si la rotación del enlace *aproxima* a la base hacia el azúcar, la conformación se denomina *syn*.

La estructura secundaria en el ADN está determinada por el apareamiento entre nucleótidos de dos hebras de ADN distintas. Éste ocurre mediante enlaces puente hidrógeno entre los nitrógenos y oxígenos de las bases nitrogenadas. Estos grupos funcionales, además, están relacionados con el reconocimiento a nivel molecular que ocurre en la replicación, transcripción y traducción de la información genética. En su forma canónica, las bases nitrogenadas adquieren tautomería ceto (K) y/o amino

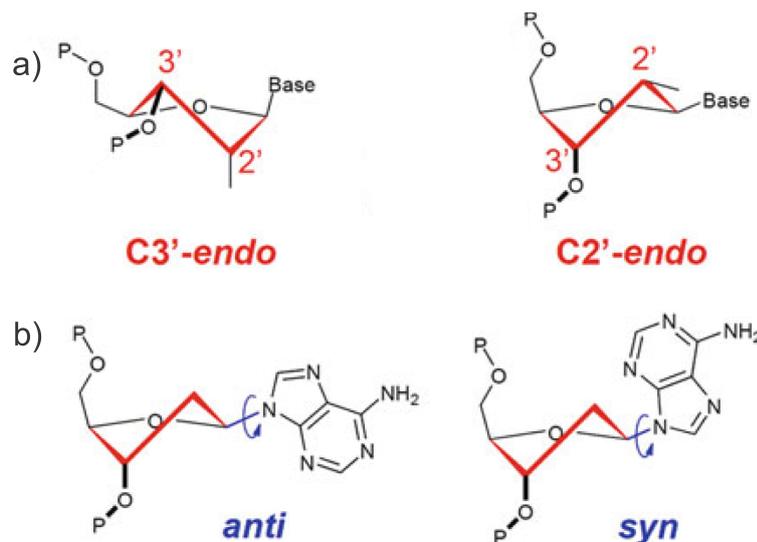


FIGURA 1.3: Estructuras conformacionales relevantes de los nucleótidos. a) Conformeros rotacionales relevantes del azúcar. b) Rotación *syn* y *anti* del enlace glicosídico. La imagen fue extraída de Ref[8].

(A). La forma de interacción entre bases más conocida es la propuesta por Watson, Crick y Franklin[3], denominada apareamiento de Watson-Crick (WC) o canónico, en la cual el reconocimiento se genera por medio de puentes hidrógeno que forman bases con tautomería K y A. La Figura 1.4 muestra el apareamiento del tipo WC entre los pares de base A(amino)-T(ceto) y G(ceto)-C(amino). Se puede observar que en el par AT la interacción se da por la formación de dos puentes hidrógeno, mientras que en el par GC la interacción ocurre a través de tres puentes hidrógeno. A su vez, el grupo resto (-R) representa la posición del enlace glicosídico, el cual

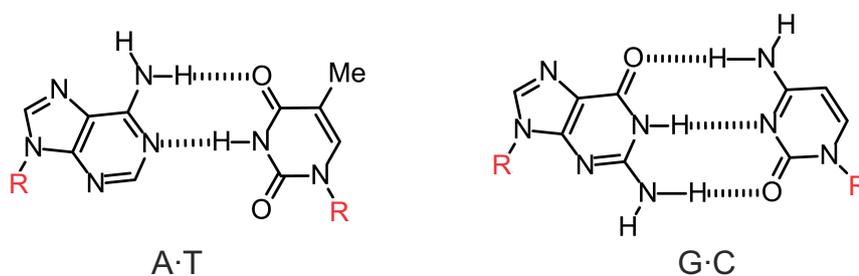


FIGURA 1.4: Apareamiento canónico del tipo WC de los pares de base A·T y G·C. En las estructuras además se destaca en rojo la posición del enlace glicosídico.

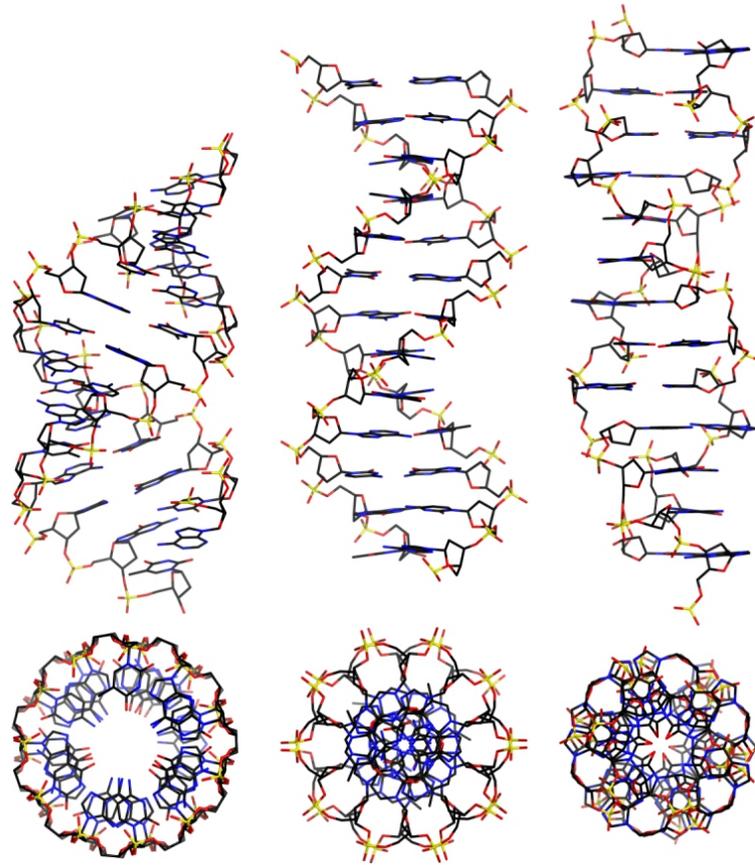


FIGURA 1.5: Estructuras de ADN tipo A, B y Z con vista lateral y superior, donde se aprecian las diferencias estructurales entre cada una de ellas.

en los pares WC se encuentra en forma paralela (*cisoid*). Este reconocimiento entre pares de bases se conoce como apareamiento *canónico*, y en conjunto con la secuencia de nucleótidos por uniones fosfato, da lugar a la formación de la doble hélice de ADN[9]. Sin embargo, la existencia de otros tautómeros puede generar apareamientos *no canónicos* en donde la interacción puente hidrógeno no es la propuesta por WC. Años más tarde del descubrimiento de Watson, Crick y Franklin[3], Lödwin propuso que un nuevo arreglo de los protones involucrados en la interacción puente hidrógeno entre las bases podría conducir a la generación de tautómeros no canónicos y generar a un error en el código genético si estos apareamientos no son corregidos antes de la replicación del ADN[10].

El plegamiento tridimensional que adopta la molécula define la

estructura terciaria del ADN. Dicho plegamiento está condicionado por la interacción entre pares de bases y la conformación de los nucleótidos constituyentes, y posee fines biológicos muy diversos. Las estructuras terciarias más comunes encontradas en la naturaleza son aquellas derivadas de la doble hélice originalmente descrita por WC, denominadas como A, B y Z, que se diferencian principalmente según las conformaciones que adoptan el azúcar y la base. La Figura 1.5 muestra estructuras de ADN tipo A, B y Z con vista lateral y superior, donde se pueden observar claras diferencias estructurales.

1.1.1. Apareamiento y Plegamiento No Canónico

Los apareamientos no canónicos entre pares de bases pueden formarse por diversas causas, como ser, la presencia de bases con tautomerismos diferentes a los canónicos[10], la interacción con ligandos o cationes presentes en el medio[11, 12] o por la inserción específica de bases exógenas al ADN[13].

La idea de modificar las interacciones entre las bases con el fin de generar nuevos apareamientos no canónicos es de gran interés desde hace varios años, debido principalmente a las potenciales aplicaciones en las ciencias biológicas y ciencia de materiales que surgen de manipular la estructura del ADN[14-17]. Este concepto se basa en la modificación de la interacción canónica en el apareamiento WC por nuevas interacciones no convencionales que conduzcan a otras formas de apareamiento entre bases. Con esto, se busca que la nueva molécula adopte nuevas funciones biológicas a las que tendría en un apareamiento canónico, o bien sea de potencial aplicación en otros campos relevantes.

Además de las estructuras convencionales de doble hélice también se han encontrados otras estructuras que involucran plegamientos terciarios,

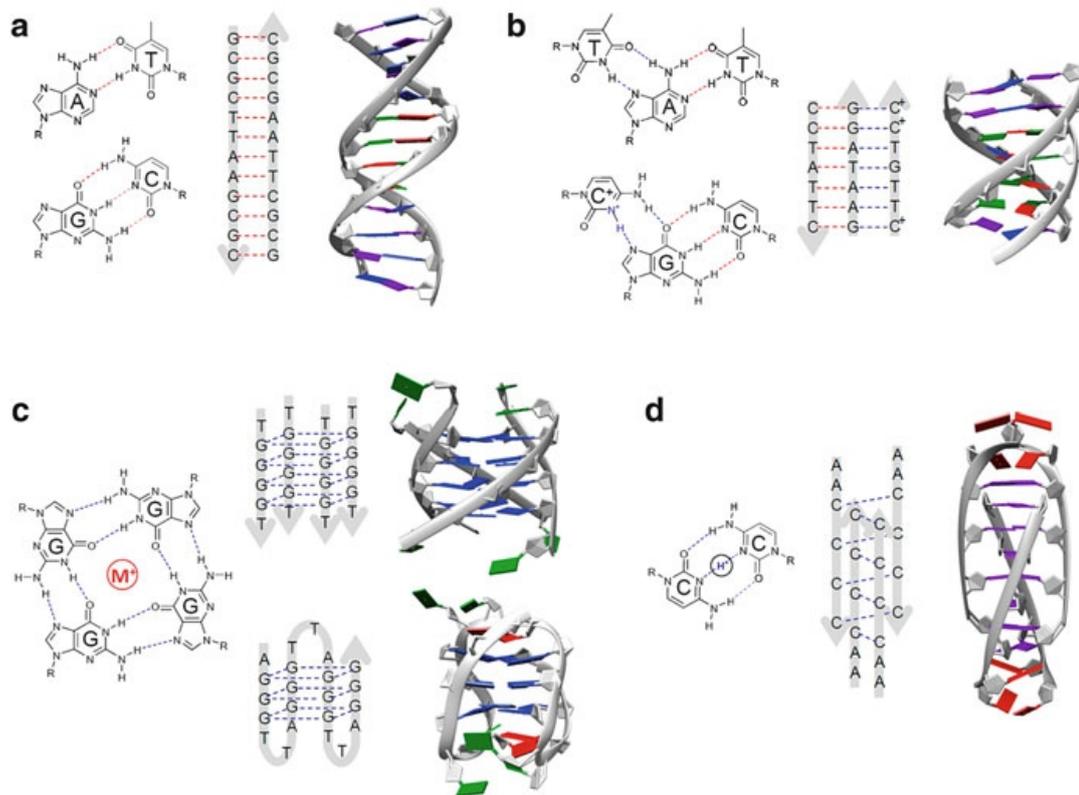


FIGURA 1.6: Plegamiento no canónico en moléculas de ADN. (a) Doble hélice de ADN tipo B con apareamiento tipo WC. (b) *Triplex* de ADN en donde dos hebras se unen por apareamiento WC con una tercera hebra mediante apareamiento no canónico. (c) *G-cuádruplex* de ADN formado por la interacción de cuatro G. (d) Estructura *i-motif* formado por la interacción de cuatro hebras.

con apareamientos no canónicos[8]. Su estudio es de gran interés científico ya que estructuras se han relacionado con distintos tipos de enfermedades o procesos biológicos de gran relevancia[18-21]. La Figura 1.6 muestra algunos de los distintos plegamientos canónicos y no canónicos que puede adoptar la molécula de ADN. Por ejemplo, en secciones del material genético con abundancia de G, o en presencia de alta concentración de Na⁺ o K⁺, se han encontrado estructuras con un plegamiento no canónico conocido como *G-cuádruplex* (Figura 1.6c), el cual se genera a partir de la interacción por puentes hidrógenos entre cuatro G provenientes de una, dos o cuatro hebras de ADN[22]. Otro plegamiento no canónico ocurre cuando tres hebras de ADN forma una triple hélice. Esta estructura se denomina

triplex (Figura 1.6b) de ADN y se forma por la interacción de dos hebras formando una doble hélice de tipo B, con una tercera hebra unida mediante interacciones no canónicas.

Por último, un plegamiento no canónico que puede adoptar el ADN es el denominado *i-motif* (Figura 1.6d), que al igual que el *G-cuadruplex* es una estructura tetramérica que se puede formar entre una, dos o cuatro hebras de ADN. La formación de esta estructura está favorecida en condiciones de pH ligeramente ácidas y en particular en presencia de regiones con abundante C[21]. Este plegamiento es de gran importancia ya que se conoce que está relacionado con el desarrollo de enfermedades de retardo mental, como el *cromosoma X frágil*[20].

En los últimos años, el estudio y modificación de la estructura secundaria y terciaria del ADN mediante la manipulación de las interacciones entre bases ha ganado popularidad en el área científica debido a su vinculación a funciones biológicas y su potencial aplicación en áreas de la nanotecnología[8]. En particular, el estudio de la interacción del ADN con metales ha cobrado gran importancia debido a la posibilidad de ampliar el código genético y/o generar apareamientos y plegamientos no canónicos en la molécula de ADN.

1.2. Interacción del ADN con Metales

En la actualidad, el enfoque de esta estrategia está dirigido a introducir nuevas nucleobases artificiales y/o diferentes iones metálicos al ADN con el fin de desarrollar aplicaciones para estos nuevos ácidos nucleicos modificados. Estas aplicaciones incluyen, por ejemplo, la mejora en la capacidad de transferencia de carga de las cadenas de ADN, la generación de nanoclústeres metálicos en matrices de ADN, el desarrollo de sensores de iones metálicos o nucleobases específicas, entre muchas otras[13, 23-25]. La

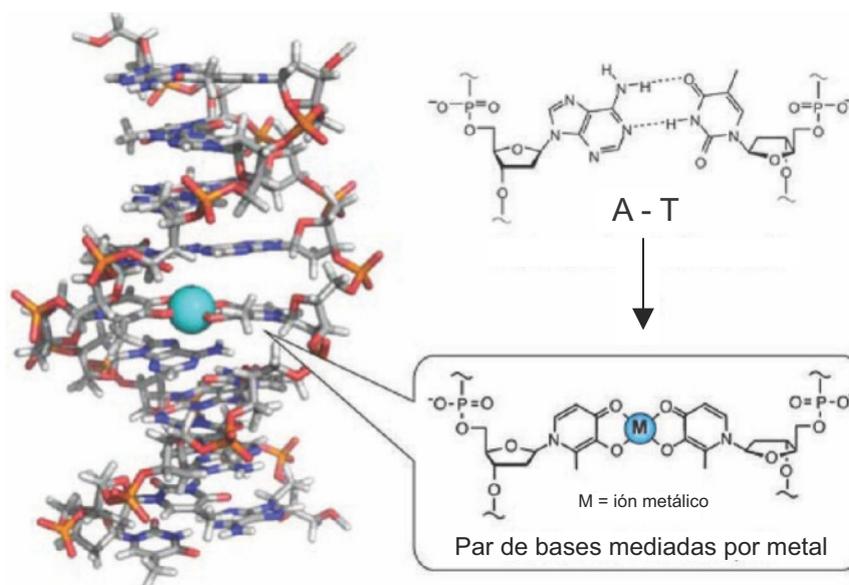


FIGURA 1.7: Esquema representando el reemplazo del par de bases AT con apareamiento WC en una doble hebra de ADN por nucleobases artificiales con la posibilidad de quelar a un ión metálico M.

Figura 1.7 muestra un esquema del reemplazo del par de bases AT con apareamiento WC por nucleobases artificiales con la posibilidad de quelar a un ión metálico. En particular, la generación de nanoclústeres metálicos en matrices de ADN es de especial interés en esta tesis doctoral.

1.2.1. Nanoclústeres Metálicos

El interés por pequeños agregados (o clústeres) metálicos de pocos átomos ha crecido en los últimos años por constituir el nexo entre las propiedades fotofísicas de átomos aislados y nanopartículas (NPs)[26]. Para sistemas masivos (o *bulk*) y en particular, partículas por encima de $\approx 1 \mu\text{m}$ de tamaño, las respuestas fisicoquímicas pueden ser principalmente analizadas en término macroscópicos. En el régimen nanoscópico, para NPs metálicas de $\approx 10 \text{ nm}$, los átomos superficiales toman gran relevancia ya que representan el $\approx 30\%$ del número total de átomos en la partícula[27], por lo que sus propiedades superficiales se vuelven importantes. Este régimen se caracteriza por la desviación de las propiedades del sistema *bulk*

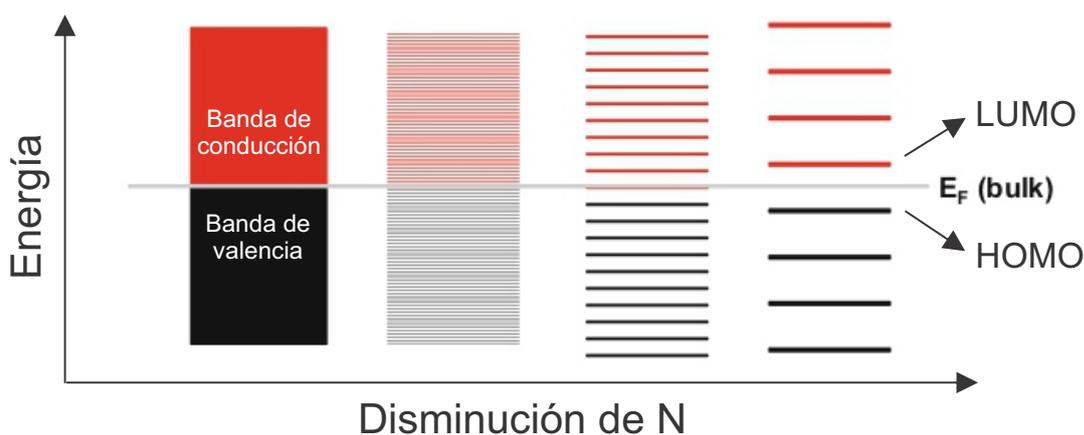


FIGURA 1.8: Confinamiento en un sistema metálico en donde la disminución del tamaño (número de átomos N) lleva a la discretización de los niveles de energía desde un material *bulk* hasta un clúster, resultando en la aparición del *gap* HOMO-LUMO.

(punto de fusión, propiedades ópticas, potenciales de ionización, etc) y la aparición de nuevas propiedades, como por ejemplo las oscilaciones colectivas de los electrones de conducción (*plasmones superficiales*), la magnetización por efecto túnel, etc[27]. Por debajo de este tamaño, a escalas subnanométricas ($<1-2$ nm), el confinamiento de los electrones (*confinamiento cuántico*) lleva a la aparición de nuevas propiedades ópticas y químicas en el material[28, 29]. Cuando las dimensiones de las partículas son semejantes a la longitud de onda de Fermi del sistema (*nanoclústeres* (NCs) o *clústeres atómicos*), siendo en el caso de la Ag de ≈ 1 nm, el continuo de energía se rompe en niveles de energía discretos y se hace visible la aparición de un *gap* de energía entre los estados correspondientes a los orbitales HOMO-LUMO. Bajo estas condiciones, las propiedades fisicoquímicas del sistema se vuelven críticamente dependientes del número preciso de átomos y son más semejantes a las propiedades de una molécula, que a la del sistema metálico *bulk*[26, 30-32]. La Figura 1.8 muestra un esquema de la densidad de estados (DOS) de un sistema metálico a medida que se reduce el número de átomos (N).

Estos grandes *gap* de energía, similares a los encontrados en puntos

cuánticos semiconductores, le confieren al sistema gran estabilidad termodinámica y altos rendimiento cuántico de fluorescencia, incluso en ausencia de ligandos protectores[33, 34]. Sin embargo, sus propiedades ópticas son altamente sensibles al ambiente químico, tamaño del clúster, carga total, etc[28].

La síntesis química de NCs asistida por una matriz orgánica ha sido una de las estrategias más utilizada en este campo para la generación de estos sistemas, debido a que el confinamiento espacial generado por la matriz permite la obtención de NCs metálicos con gran control en su tamaño[35].

En este sentido, la interacción específica de bases del ADN, naturales o artificiales, con algunos cationes metálicos hacen de la molécula de ADN una matriz ideal para la generación de nanoclústeres metálicos con potencial aplicación como biosensores[36], dispositivos LEDs de bajo consumo[37], marcadores biológicos[38, 39], entre otros.

1.2.2. Propiedades Ópticas de Agregados ADN- Ag_n

Varios años atrás, Dickson y colaboradores lograron sintetizar pequeños NCs de Ag (de ahora en más $AgNCs$) encapsulados en distintas matrices orgánicas, como dendrímeros[40], péptidos[41] y cadenas cortas de ADN (entre 10-50 bases)[42], con altos rendimientos cuánticos de fluorescencia. La síntesis de estos $AgNCs$ consta del agregado de una sal de Ag (generalmente $AgNO_3$) a una solución de la matriz soporte a utilizar, con posterior agregado de cantidades necesarias de un reductor fuerte (generalmente $NaBH_4$). La utilización de ADN como matriz para la síntesis de $AgNCs$ (ADN- Ag_n) ha sido de particular interés debido a la fuerte dependencia de las respuesta óptica del sistema con la secuencia de bases que constituyen las cadenas utilizadas. Se conoce, por ejemplo, que dominios con abundancia de C y/o G favorecen la formación de agregados

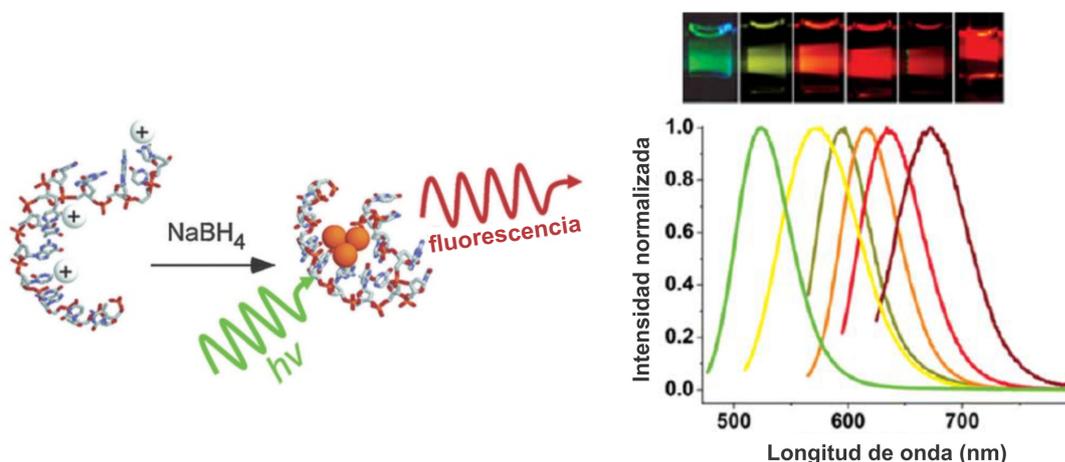


FIGURA 1.9: (a) Esquema reducido de la síntesis de agregados AgNCs generados en matrices de ADN (ADN-Ag_n). (b) Respuesta de emisión normalizada de distintos clústeres ADN-Ag_n. De izquierda a derecha, las longitudes de onda del máximo de emisión y las secuencias de bases de las matrices de ADN utilizadas fueron: 523 nm (C₂₀), 562 nm (AATTC₁₂), 590 nm (CGAAC₁₂), 615 nm (CGCGC₁₂), 635 nm (ATATC₈) y 670 nm (GGGGC₈). La imagen en la parte superior muestra los colores correspondientes a la emisión de los distintos clústeres ADN-Ag_n cuando son excitados a longitudes de onda cercanas al máximo de absorción. Figura adaptada de la Ref[49].

ADN-Ag_n fluorescentes, debido principalmente a la fuerte interacción de la Ag con estas nucleobases[43]. Esto permite sintonizar el espectro de absorción/emisión de los AgNCs desde el infrarrojo cercano hasta el UV, lo cual constituye una propiedad muy importante en dirección a su aplicación en nanociencia[44-48]. Por esto, el entendimiento de los mecanismos que determinan las propiedades fotofísicas de estos sistemas es necesario para la síntesis racional de AgNCs con posibles aplicaciones en nanociencia.

A modo de ejemplo, la Figura 1.9, extraída de la Ref[49], muestra la respuesta de emisión normalizada de clústeres ADN-Ag_n sintetizados en matrices de ADN con diferentes secuencias de bases. En esta figura se puede observar la dependencia de la respuesta óptica con la secuencia de bases como consecuencia de la interacción específica ADN-AgNCs.

Muchos interrogantes surgen respecto a la estructura y propiedades fotofísicas que exhiben estos sistemas, como por ejemplo: ¿cómo es la disposición del clúster metálico Ag_n dentro del agregado?, ¿qué partes de la

matriz de ADN interaccionan con el clúster metálico?, ¿aquellas partes que no interaccionan tienen influencia en la fotofísica del sistema?, ¿cuál es el estado de carga del clúster metálico?, ¿por qué algunos clústeres son fluorescentes y otros no?, entre otras tantas. En este sentido, en los últimos años, Gwinn y colaboradores han hecho importantes aportes con el fin de relacionar la fotofísica de los clústeres ADN- Ag_n con su estructura y estequiometría, a partir de distintas técnicas tanto experimentales como computacionales[45, 47, 50-53].

Uno de los primeros aspectos que requiere atención es el hecho de que los clústeres ADN- Ag_n presentan una banda de absorción común en la región UV del espectro (260–270 nm), correspondiente a la excitación de las bases del ADN[47], y una banda sintonizable en la región visible, la cual puede ser debida a la excitación del clúster metálico Ag_n . La sintonización de esta banda podría estar gobernada por el largo del cluster metálico, la secuencia de bases de la cadena de ADN y/o la carga del clúster metálico y su estructura[50, 54, 55]. Por otro lado, en aquellos clústeres ADN- Ag_n fluorescentes, la excitación de la banda ubicada en la región UV y la banda en la región visible generan la misma respuesta de fluorescencia. El origen de este comportamiento podría estar relacionado con un proceso de transferencia de carga desde la base del ADN hacia el clúster metálico, cuando la excitación ocurre a la longitud de onda de la banda en la región UV.

La Figura 1.10, adaptada de la Ref[45], muestra los espectros de excitación de distintos clústeres ADN- Ag_n con diferente secuencia de bases, normalizado con la intensidad de la banda UV. Se puede observar que la banda en la región UV, correspondiente a la excitación del ADN, no experimenta corrimiento, mientras que la banda en el visible se sintoniza en función a las diferentes secuencias de bases utilizadas. Los números que se encuentran por encima de cada banda en la región del visible indican la

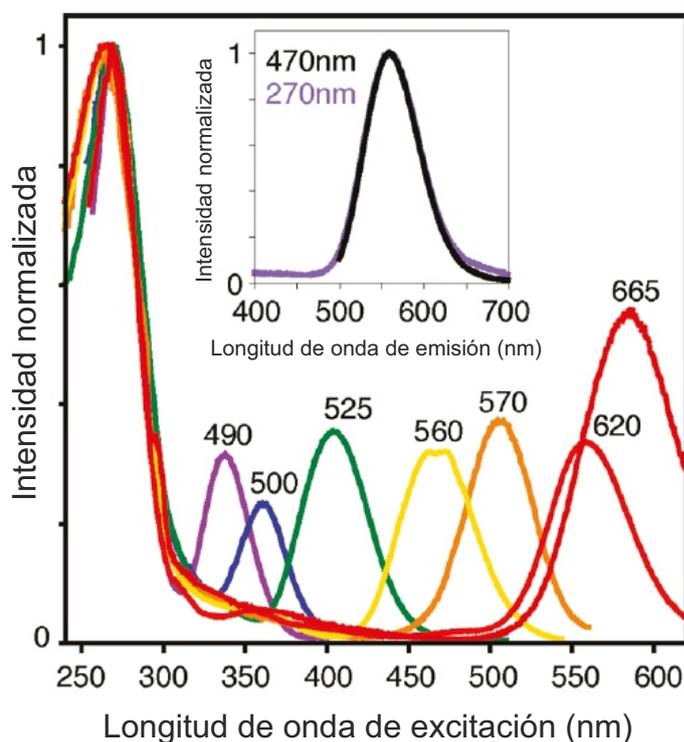


FIGURA 1.10: Espectros de excitación de distintos clústeres ADN- Ag_n con diferente secuencia de bases, normalizado con la intensidad de la banda UV. Los números encima de cada banda en la región del visible indica la longitud de onda de emisión de ese clúster. El recuadro muestra los espectros de emisión del clúster en amarillo ($\lambda_{emisión} = 560$ nm), excitando a la banda en el UV (270 nm) y a la banda en el visible (470 nm). Figura adaptada de la Ref[47].

longitud de onda de emisión de cada clúster en particular. El recuadro de la Figura muestra los espectros de emisión del clúster en color amarillo ($\lambda_{emisión} = 560$ nm), excitando a la banda en el UV (270 nm) y a la banda en el visible (470 nm), y se puede observar que ambas respuestas de emisión coinciden.

Por otro lado, Gwinn y colaboradores[45] lograron aislar y analizar estadísticamente una gran cantidad de clústeres ADN- Ag_n , generados a partir de secuencias de 10 bases de ADN, elegidas aleatoriamente, por medio de experimentos de cromatografía líquida de alta performance (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (ESI-MS). Los resultados muestran que una característica necesaria para que el clúster ADN- Ag_n fluoreszca es que el clúster metálico Ag_n se encuentre parcialmente oxidado.

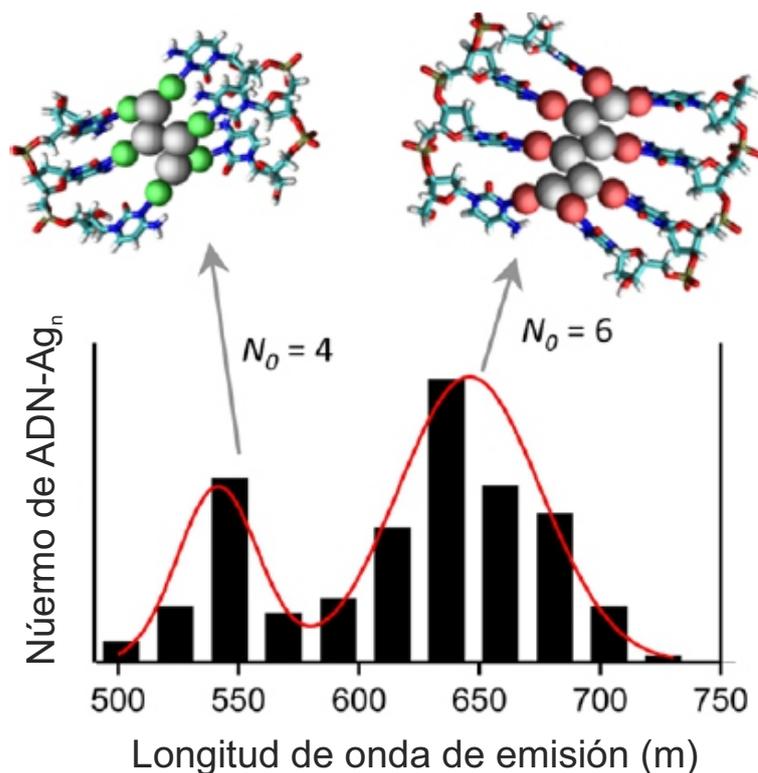


FIGURA 1.11: Distribución estadística de las longitudes de onda de emisión de distintos clústeres ADN-Ag_n analizados por Gwinn y colaboradores mostrando *colores mágicos* a ≈ 550 nm y ≈ 650 nm, correspondientes a los *números mágicos* de 4 y 6 átomos de Ag neutra (N_0) en el clúster metálico. Las estructuras en la parte superior fueron extraídas de simulaciones de dinámica molecular realizadas por los autores sobre las estructuras consideradas. La figura es adaptada de la Ref[45].

Si bien es claro que en este esquema existiría una distribución de carga en el clúster metálico, por simpleza se considera que coexisten Ag⁰ y Ag⁺ dentro del clúster. Sobre esta aproximación se profundizará en el Capítulo 4. Los resultados también indican que la relación Ag⁰/Ag⁺ dentro del clúster no es aleatoria, sino que sigue ciertos *números mágicos* de átomos de Ag neutra, sin importar el número de cationes Ag⁺ presentes. Estos *números mágicos* también están relacionados con *colores mágicos* de emisión[45]. Con el fin de explicar estos resultados, los autores proponen un modelo estructural para estos clústeres, basándose en el análisis de los patrones isotópicos de las señales obtenidas en los espectros de masas, la relación Ag⁰/Ag⁺ en el clúster ADN-Ag_n, y otras técnicas experimentales y cálculos teóricos. Este

modelo se basa en la idea de que un nanocable compuesto de átomos de Ag neutros se extiende longitudinalmente en forma de *zig-zag*, con cationes Ag^+ actuando como puentes de enlace entre el clúster de Ag neutro y las bases de la cadena de ADN[50, 52], como se muestra en la parte superior de la Figura 1.11 (Figura adaptada de la [45]). La Figura 1.11 también muestra la distribución estadística de la longitud de onda de emisión de los clústeres ADN- Ag_n analizados por Gwinn y colaboradores[45], mostrando *colores mágicos*, correspondientes a los *números mágicos* de 4 y 6 átomos de Ag neutra en el clúster metálico.

Si bien se han realizado grandes avances hacia el entendimiento de la fotofísica de estos sistemas, el tamaño y complejidad de los mismos dificulta su análisis mediante cálculos precisos *ab initio* o espectroscopía de alta resolución UV/IR. Por este motivo, la estructura fina y su relación con las propiedades ópticas son todavía desconocidas.

1.3. Objetivos

Teniendo en cuenta los antecedentes planteados en la sección anterior, el objetivo general de esta tesis doctoral es alcanzar una comprensión fisicoquímica de los factores y mecanismos que controlan y definen la absorción de luz y respuesta de fluorescencia de pequeños AgNCs en matrices de ADN. Con este fin se plantean los siguientes objetivos específicos:

- I) Determinar el origen del mecanismo de transferencia de energía desde la base nitrogenada al cluster metálico de Ag_n , cuando la absorción ocurre en la región UV del espectro, a partir del estudio espectroscópico en fase gaseosa de agregados pequeños entre Ag y Citosina, de los cuales se puede obtener información detallada de la estructura y dinámica de los procesos involucrados.

- II) Estudiar mediante cálculos computacionales la influencia de la estructura del clúster metálico sobre su fluorescencia en sistemas de tamaños intermedios que involucran cadenas cortas de oligonucleótidos, en busca de un acercamiento hacia los sistemas reales.
- III) Evaluar la dependencia del espectro de absorción de los clústeres con la relación Q/NAg (Q : carga total – NAg : Ag total en estado neutro y catiónico) en sistemas del mismo tipo que los planteados en el objetivo II.
- IV) Sintetizar y caracterizar la fotofísica de pequeños nanoclústeres de Ag fluorescentes, libres de matrices y en solución acuosa, como precursores estables hacia una síntesis racional de nanoclústeres en matrices orgánicas.

1.4. Organización de la Tesis

La parte introductoria de esta tesis doctoral se compone del presente Capítulo y el Capítulo 2. Este último describe brevemente los fundamentos y metodologías utilizadas para desarrollar los objetivos planteados y se divide en una sección experimental y otra sección teórica. Primero el lector se encontrará con los fundamentos generales de la espectrometría de masas y espectroscopía UV de iones fríos en fase gaseosa, junto con el equipamiento utilizado en esta tesis doctoral. Luego se exponen las metodologías teóricas utilizadas para el entendimiento y caracterización de los sistemas estudiados.

En el Capítulo 3 se presentan los resultados obtenidos del estudio en fase gaseosa de la espectroscopía y dinámica de pequeños complejos $Cyt-M^+$ con M : Ag, Na y K, mediante la técnica de fotofragmentación UV y cálculos *ab*

initio de estado excitado. Estos sistemas se estudiaron para ganar información detallada respecto a la influencia de la identidad del catión metálico en la transferencia de energía desde la base del ADN al metal.

El Capítulo 4 comprende el estudio computacional de la fotofísica de sistemas modelos ADN-Ag_n a partir de cálculos de dinámica clásica y cuántica. Primero, se estudia un modelo simplificado con el fin de reproducir las propiedades ópticas de estos clústeres observadas experimentalmente, y analizar su dependencia con el estado de carga del clúster metálico. Luego, en dirección hacia una mejor representación del sistema, se analizó un modelo similar al modelo *zig-zag* propuesto por Gwinn y colaboradores[45]. Los resultados teóricos del Capítulo 4 están en acuerdo con los resultados experimentales en bibliografía y los obtenidos para complejos Citosina–M⁺ en el Capítulo 3, y además agregan información relevante respecto a la fotofísica de los clústeres ADN-Ag_n.

El Capítulo 5 expone los resultados sobre la síntesis electroquímica de nanoclústeres de Ag fluorescentes, en solución acuosa y libre de ligandos protectores, propuesta por López-Quintela y colaboradores[34]. Su caracterización espectroscópica comprende técnicas experimentales como espectrometría de masas, espectroscopía UV-Vis y fluorescencia resuelta en el tiempo, como también el apoyo de cálculos de estructura electrónica a nivel DFT y TD-DFT.

Por último, el Capítulo 6 resume las conclusiones importantes obtenidas en esta tesis doctoral y analiza las posibles perspectivas en este campo.

Para comodidad del lector, la versión digital de este documento en formato *pdf* cuenta con hipervínculos para facilitar la navegación. A modo de ejemplo, se puede acceder rápidamente a la Figura 3.2, a la Sección 4.3.3, a la ecuación 5.1 o a la referencia [47] haciendo clic sobre el número correspondiente. Los títulos en el índice general también son hipervínculos a los capítulos y secciones correspondientes.

Capítulo 2

Fundamentos y Metodologías

2.1. Introducción

En este capítulo se repasan las técnicas y metodologías experimentales y teóricas empleadas para caracterizar los sistemas estudiados en esta tesis doctoral.

Primero se detallan los fundamentos básicos sobre la espectroscopía de fotofragmentación UV, en fase gaseosa, utilizada para caracterizar la fotodinámica de los complejos CytM^+ , con $M : \text{Na}, \text{K}, \text{Ag}$. Luego se repasan brevemente los métodos computacionales utilizados a lo largo de esta tesis doctoral para caracterizar y correlacionar los sistemas estudiados con los datos experimentales.

2.2. Espectroscopía en Fase Gaseosa

La espectroscopía de moléculas frías aisladas en fase gaseosa permite una mejor y más profunda comprensión de la estructura y los mecanismos fotofísicos responsables de las propiedades ópticas de estos sistemas. Avances importantes a lo largo de los años han permitido abarcar sistemas cada vez más grandes y complejos[56, 57]. A continuación se detallan las metodologías utilizadas en la fotofragmentación UV de complejos del tipo CytM^+ , con $M : \text{Ag}, \text{Na}$ y K , aislados en fase gaseosa.

2.2.1. Espectrometría de Masas

La espectrometría de masas es una técnica analítica fundamental, ampliamente utilizada para la identificación y caracterización desde sistemas pequeños hasta sistemas de gran tamaño como proteínas o péptidos[58].

Esta técnica se basa en la generación de un paquete de iones en alto vacío a partir de una muestra problema, su separación espacial en función de su

relación masa/carga (m/z) y su posterior detección, cualitativa o cuantitativa[59]. Las técnicas utilizadas para generar los iones y su introducción al espectrómetro dependen fuertemente del sistema de estudio. Las técnicas de desorción láser asistida por matriz (MALDI, por su acrónimo en inglés) o ionización por electrospray (ESI, por su acrónimo en inglés) son quizás las más utilizadas en la espectroscopía debido a su versatilidad para transferir analitos a la fase gaseosa como especies cargadas. El desarrollo de esta técnica le valió el Premio Nobel de Química a John Bennett Fenn en el año 2002[60]. Una vez generados los iones, su separación se puede lograr mediante diferentes técnicas. Si bien una de las más utilizadas es la separación por tiempo de vuelo (TOF, por su acrónimo en inglés), debido a su gran versatilidad y facilidad de uso, existen otros analizadores que basan su funcionamiento en la aplicación de campos eléctricos de radio frecuencia. Los multipolos lineales, las trampas iónicas lineales (LIT) y las trampas iónicas cuadrupolares tridimensionales (3D-QIT) son algunas técnicas de las que se hablará más adelante. Si bien la elección de la técnica adecuada también dependerá del sistema de estudio, es habitual utilizar una combinación de analizadores acoplados para mejorar la separación y detección de los iones. Por último, el detector utilizado por excelencia en la espectrometría de masas es el detector de placa microcanal (MCP).

En esta tesis doctoral, para la ionización e introducción de los iones a la cámara se utilizó siempre una fuente ESI. En cuanto a su separación, se utilizaron combinación de analizadores TOF, multipolos lineales y trampas iónica cuadrupolares. La detección de los iones se realizó mediante un detector MCP.

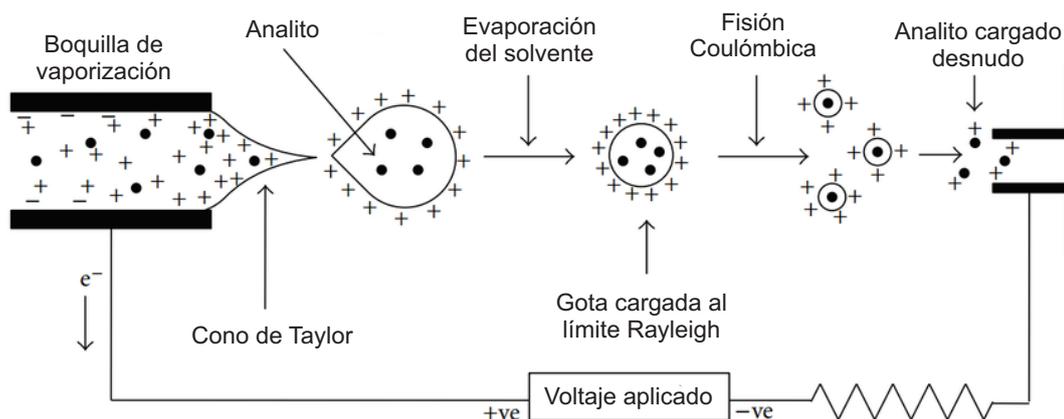


FIGURA 2.1: Esquema del proceso de vaporización e ionización en una fuente ESI.

2.2.1.1. Vaporización e Ionización por Electrospray

La técnica de electrospray (ESI, por su acrónimo en inglés) es una técnica de vaporización e ionización suave, ampliamente utilizada en la espectrometría de masa y espectroscopía en fase gaseosa[61]. Su éxito se debe principalmente a la capacidad de transferir a la fase gaseosa e ionizar desde pequeños compuestos inorgánicos hasta complejos o biomoléculas poco volátiles y de gran tamaño[62]. A diferencia de otras técnicas, la ESI puede generar iones con múltiples cargas lo cual permite ampliar el rango de masas detectable, llegando así a especies de entre kDa y MDa[63]. Un esquema del proceso, en modo de ionización positivo, se muestra en la Figura 2.1 y se detalla brevemente a continuación

Una solución conteniendo el analito de interés se introduce al sistema mediante un capilar a un flujo constante. A partir de la aplicación de un campo eléctrico fuerte, los iones generados son atraídos hacia un contraelectrodo ubicado en la punta del capilar. Al atravesar esta punta, la cual posee la forma de un cono de Taylor[64], se generan gotas cargadas positivamente en forma de spray. Conforme el solvente en la gota se evapora, la carga superficial aumenta hasta alcanzar un límite, dado por el tamaño de la gota y su tensión superficial, denominado *límite de*

Rayleigh[65]. Por encima de este límite la fuerza repulsiva generada por las cargas superficiales supera la tensión superficial y se produce una *explosión de Coulomb* en donde la gota se divide en gotas de menor tamaño para disminuir la carga superficial. Este proceso continúa hasta la completa evaporación del solvente, obteniendo finalmente el análito cargado.

2.2.1.2. Analizador por Tiempo de Vuelo

El primer espectrómetro TOF fue diseñado por W. E. Stephens en 1946[66] y luego mejorado por Wiley y McLaren en 1955[67]. La Figura 2.2 muestra el principio básico de funcionamiento de un espectrómetro de masa TOF de Wiley-McLaren. Éste mide el tiempo que le toma a los iones de diferentes relación m/z moverse desde la región donde fueron generados hasta el detector, a través de una zona de vuelo libre de campos eléctricos. La región donde los iones son generados (o introducidos) se denomina *zona de extracción* y está situada entre dos placas paralelas (P_1 y P_2 en Figura 2.2), a una distancia d_1 entre sí, y con voltajes V_1 y V_2 , respectivamente. Idealmente, estos iones son generados en un espacio infinitesimal, por lo que la diferencia de potencial ΔV_{1-2} entre las placas, generalmente de unos kV, expulsaría a los iones de masa m y carga $z = Ze$ (con Z entero) hacia el detector con una energía cinética:

$$Ec = \frac{1}{2}mv^2 = z\Delta V_{1-2} \quad (2.1)$$

En la práctica los iones no son generados en un punto infinitesimal sino que están concentrados en un volumen finito. Si se considera a iones con la misma relación m/z , aquellos generados más cerca de P_1 serán acelerados por más tiempo que los generados más cerca de P_2 , lo cual produce un ensanchamiento en la señal correspondiente a cada m/z y con esto una disminución en la resolución del equipo.

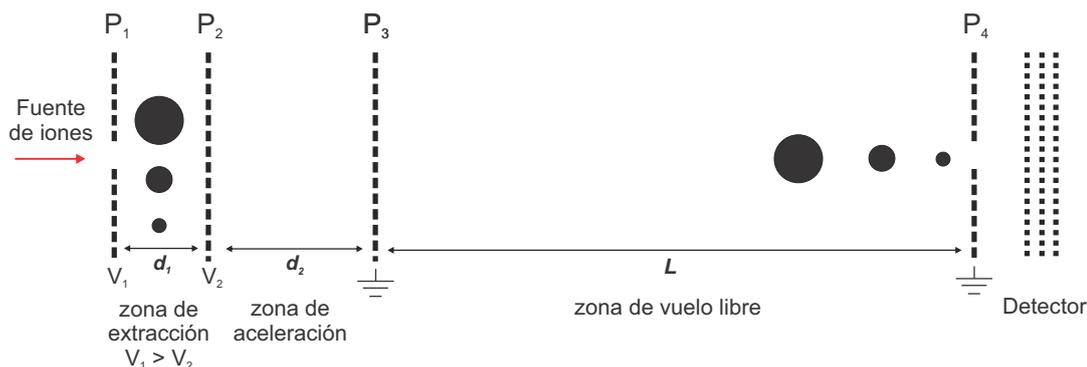


FIGURA 2.2: Esquema de un analizador por tiempo de vuelo (TOF).

En este sentido, Wiley y McLaren propusieron una mejora al sistema introduciendo la *zona de aceleración* entre las placas P₂ y P₃, con voltajes V₂ y 0 (conexión a tierra), respectivamente. En esta zona los iones son constantemente acelerados por la diferencia de potencial ΔV_{2-3} . Ajustando las condiciones de voltajes (V₁ y V₂) y distancias entre placas (d₁ y d₂) se puede lograr una configuración en la cual los iones con la misma relación m/z lleguen al detector a un tiempo casi independiente de la posición a la cual fueron extraídos.

Una vez atravesada la *zona de aceleración*, los iones recorren una zona de vuelo libre de campos eléctricos y magnéticos (*zona de vuelo libre*). El tiempo que los iones tardan en recorrer la zona de vuelo está definido por la distancia a recorrer (L) y la velocidad adquirida en la zona de extracción (v), según:

$$t_{\text{vuelo}} = \frac{L}{v} = \frac{L}{\sqrt{2e\Delta V_{1-2}}} \sqrt{\frac{m}{Z}} \quad (2.2)$$

En la práctica, la relación m/z es utilizada para la calibración de las condiciones con iones de masa y carga conocidos.

2.2.1.3. Multipolo Lineal

Los iones introducidos a la cámara pueden ser almacenados y analizados en dispositivos mediante la aplicación de campos de radiofrecuencias (RF).

Si bien el fundamento detallado de cómo operan estos instrumentos escapa al objetivo de esta tesis doctoral, se dará una breve explicación de su funcionamiento. Los multipolos lineales constan de pares de cilindros (electrodos) extendidos en la dirección de movimiento del haz de iones (eje z en este caso) en un arreglo simétrico en el plano $x - y$. La Figura 2.3 muestra un esquema de un cuadrupolo (cuatro electrodos) lineal. A cada par de electrodos enfrentados se le aplica un campo eléctrico $\Phi(t)$ compuesto de componentes de fase continua (DC, de ahora en más U_{DC}) y fase alterna de RF (AC, de ahora en más V_{RF}), de frecuencia ω , según:

$$\Phi(t) = \pm(U_{DC} - V_{RF} \cos(\omega t)) \quad (2.3)$$

donde $t =$ tiempo.

Esto crea un potencial 2D, dentro de la región rodeada por los electrodos en el plano $x - y$, donde la dependencia espacial puede ser expandida como la suma de los multipolos, según:

$$\Phi(x, y) = \sum_{N=0}^{\infty} A_N \phi_N(x, y) \quad (2.4)$$

donde A_N corresponde a la amplitud del multipolo $\phi_N(x, y)$

En el caso de un cuadrupolo lineal, el potencial en 2D generado posee 3 términos. Un término constante $\phi_0(x, y) = 1$, uno lineal $\phi_1(x, y)$ que corresponde al potencial generado por dos planos con cargas opuestas, y uno cuadrático $\phi_2(x, y)$ que corresponde al potencial generado por el cuadrupolo y es igual a $\frac{x^2 - y^2}{r_0^2}$, donde r_0 es la distancia del cilindro al eje central z .

En este esquema, el ión de carga z que ingresa a la zona rodeada por los electrodos del multipolo experimenta una fuerza $\vec{F} = -z\vec{\nabla}\phi_N(x, y, z, t)$. Debido a que la componente de RF del potencial aplicado varía en el tiempo,

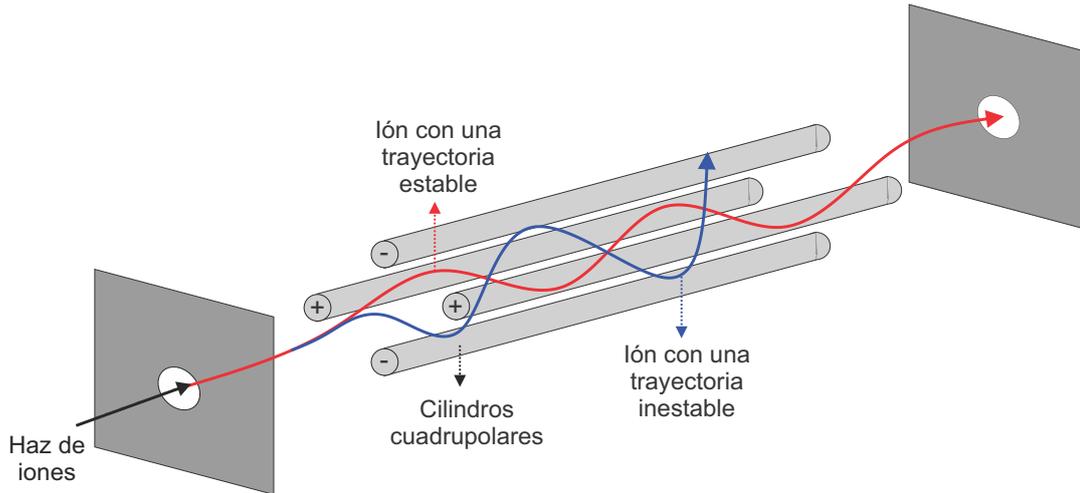


FIGURA 2.3: Esquema de un analizador cuadrupolar donde iones con trayectoria estable (rojo) llegan al detector e iones de trayectoria inestables (azul) no lo hacen.

también lo hace la atracción o repulsión de los iones a los cilindros dentro del cuadrupolo, generando así un movimiento oscilatorio del ión en el plano $x - y$. En este sentido, es posible que un ión introducido al multipolo atraviese la región comprendida por los electros sin colisionar con ninguno de ellos. Las ecuaciones de movimiento para un ión de masa m y carga z que se introduce en el cuadrupolo se pueden entonces escribir como:

$$-A_2 \frac{\delta \phi_2}{\delta x} = \frac{-2x}{r_0^2} (U_{DC} - V_{RF} \cos(\omega t))$$

y

$$-A_2 \frac{\delta \phi_2}{\delta y} = \frac{+2y}{r_0^2} (U_{DC} - V_{RF} \cos(\omega t)) \quad (2.5)$$

Estas ecuaciones se las puede reescribir como ecuaciones diferenciales de la forma:

$$\frac{\delta^2 x}{\delta \xi^2} + (a_x - 2q_x \cos(2\xi))x = 0$$

y

$$\frac{\delta^2 y}{\delta \xi^2} + (a_x - 2q_y \cos(2\xi))y = 0 \quad (2.6)$$

donde $a_x = -a_y = \frac{8ZeU_{DC}}{mw^2r_0^2}$; $q_x = -q_y = \frac{4ZeV_{RF}}{mw^2r_0^2}$; $\xi = \frac{wt}{2}$

Los movimientos en x e y están desacoplados y cada ecuación de movimiento tiene la forma matemática de una ecuación de Mathieu[68]. En un gráfico del parámetro a (relacionado con el campo DC) en función al parámetro q (relacionado con el campo AC), las ecuaciones de Mathieu tienen soluciones *estables* para todos los valores de a y q dentro de una región en el plano $a - q$ definida como el *diagrama de estabilidad*.

Los iones introducidos de esta manera oscilarán dentro una distancia radial $2r_0$ en la región delimitada por los electrodos siempre y cuando los voltajes aplicados a los electrodos sean tal que los parámetros a y q estén dentro del diagrama de estabilidad. En particular, debido a que los parámetros a y q dependen de la relación m/z del ión en movimiento (Ecuación 2.6), iones con distinta relación m/z tendrán entonces distintas trayectorias dentro del multipolo. Barriando los potenciales aplicados a los electrodos, siempre manteniendo U_{DC}/V_{RF} constante, permite generar trayectorias estables para iones con cierta relación m/z , pero trayectorias inestables para otros. La Figura 2.3 muestra dos iones de m/z diferentes que se introducen al cuadrupolo, uno con una trayectoria estable que atraviesa el multipolo y llega el detector, y otro con una trayectoria inestable que colisiona con los electrodos y no llega al detector.

Es importante destacar que si bien son necesarias otras aproximaciones cuando se trabaja con hexapolos u octapolos, los fundamentos básicos son los mismos. A medida que la cantidad de electrodos es mayor, el diagrama de estabilidad dentro de la región del multipolo se hace más pequeño, pudiendo separar mejor iones con relación m/z cercanas.

2.2.1.4. Trampa Iónica Cuadrupolar Tridimensional

Una trampa iónica cuadrupolar tridimensional (3D-QIT) se compone de dos electrodos hiperbólicos denominados *end-caps* y un electrodo en forma

de anillo, como se muestra en la Figura 2.4a. Al aplicar un potencial eléctrico compuesto de componentes de campo DC y AC, de igual forma que en un cuadrupolo lineal (Ecuación 2.4), el campo aplicado puede ser expresado en función del conjunto de coordenadas r y z como:

$$\Phi(r, z) = \frac{U_{DC} + V_{RF} \cos(\omega t)}{r_0^2 + z_0^2} (r^2 - 2z^2 + 2z_0^2) \quad (2.7)$$

El campo eléctrico aplicado varía linealmente en función a r y z , ejerciendo sobre los iones una fuerza hacia el centro de la trampa. Como en el caso de los multipolos lineales las ecuaciones de movimiento pueden ser expresadas como ecuaciones de Mathieu[68], según:

$$\frac{\delta^2 u}{\delta \xi^2} + (a_u - 2q_u \cos(2\xi))u = 0 \quad (2.8)$$

donde $u = r$ ó z ; $a_z = -2a_r = \frac{16ZeU_{DC}}{m\omega^2(r_0^2 + 2z_0^2)}$; $q_z = -2q_r = \frac{8ZeV_{RF}}{m\omega^2(r_0^2 + 2z_0^2)}$; $\xi = \frac{\omega t}{2}$

De la misma forma que en los multipolos lineales, las soluciones de las Ecuaciones 2.8 son estables si los valores de (a_r, q_r) o (a_z, q_z) se encuentran dentro del *diagrama de estabilidad* correspondiente.

El movimiento del ión dentro de la trampa posee dos componentes, un *micro* movimiento debido al campo RF aplicado, de frecuencia ω , y otro *macro* movimiento, debido al campo DC, de frecuencias menores Ω . A valores pequeños de amplitud del campo RF, el *micro* movimiento se vuelve despreciable, y hace que el *macro* movimiento a lo largo de las coordenadas r y z sean simples oscilaciones armónicas. En estas condiciones los iones describen *trayectorias de Lissajous* debido a la combinación de oscilaciones axiales a lo largo de la coordenada z , con frecuencia Ω_z , y una oscilación radial a lo largo de la coordenada r , con frecuencia ω_r . La Figura 2.4b muestra la simulación de la trayectoria de un ión, al integrar las ecuaciones de movimiento, bajo la influencia de un campo QIT.

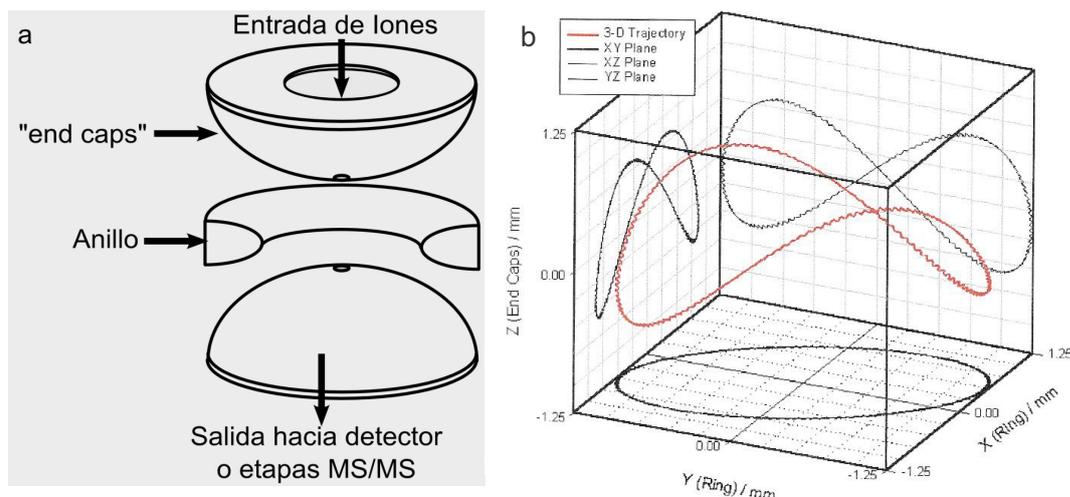


FIGURA 2.4: (a) Esquema de una trampa iónica cuadrupolar tridimensional (3D-QIT). (b) Simulación de la trayectoria estable de un ión ($m/z = 500$) atrapado dentro del 3D-QIT, con proyección del movimiento en los planos $x - y$, $x - z$ e $y - z$. El *macro* movimiento, formando trayectorias de Lissjaous, y el *micro* movimiento, con oscilaciones de alta frecuencia, son claramente distinguibles en la simulación. Ambas imágenes fueron extraídas de la Ref. [69].

Una vez almacenados los iones en la QIT, ésta se puede usar tanto como analizador de masas, como también para almacenamiento de iones. Este último caso es de especial interés para fines espectroscópicos, como se discutirá más adelante.

Si bien el procedimiento para separar los iones según su m/z es similar al de los multipolos, el funcionamiento del instrumento permite varias formas de acción. La primera se basa en almacenar iones de una dada m/z , variando las condiciones experimentales (U_{DC} , V_{RF} , w y Ω), para luego eyectarlos de la cámara mediante la aplicación de un campo pulsado en uno de los *end-caps*. Este método es poco utilizado debido a que el espectro de masas se obtiene realizando el procedimiento para cada m/z . Segundo, el paquete de iones completo puede ser almacenado en la QIT, para luego, con el campo de los *end-caps* apagado, barrer el potencial RF y eyectar los iones secuencialmente, según su relación m/z . Por último, similar al anterior, los iones se almacenan primero en la trampa para luego barrer el potencial RF. Debido a que los

movimientos axial (a lo largo del eje z , con frecuencia Ω_z) y ecuatoriales (a lo largo de la coordenada r , con frecuencia w_r) puede considerarse mutuamente independientes, la excitación resonante del movimiento axial producto del campo RF aplicado genera la eyección secuencial de los iones, según su m/z .

Por otro lado, el QIT se puede utilizar como trampa de iones, acumulando un ión con determinada m/z o un paquete de iones de distinta m/z por hasta un período de algunos segundos, dependiendo de las condiciones experimentales, con posterior extracción hacia el detector o hacia un analizador de masas acoplado. En la práctica, estas celdas generalmente están acopladas a un criostato para termalizar el sistema. Previo a la entrada de los iones, la QIT criostatizada a bajas temperaturas se llena con un pulso de gas buffer (He), que se enfría mediante colisiones con las paredes de la celda. Cuando los iones ingresan a la QIT, durante los primeros ms, colisionan con el gas buffer frío hasta su completa termalización. Luego del enfriamiento, los iones dentro de la QIT interaccionan con un láser de longitud de onda sintonizable.

2.2.2. Espectroscopía de Fotofragmentación UV

En esta tesis doctoral, los complejos en fase gaseosa fueron estudiados mediante espectroscopía de fotofragmentación UV de iones fríos. Esta técnica, en conjunto con la espectrometría de masas, proporciona una metodología muy poderosa para el entendimiento de los mecanismos fotofísicos que tienen lugar en los sistemas de estudio. A continuación se detallan brevemente los fundamentos de esta técnica.

2.2.2.1. Fundamentos

La espectroscopía de fotofragmentación UV es una técnica espectroscópica de *acción*, en el sentido de que la absorción de la radiación

incidente se detecta indirectamente, a través de algún evento desencadenado por ésta. En este caso, el evento que da indicio de absorción es la fragmentación de la especie estudiada y posterior detección de los fragmentos. La absorción de luz en una especie ocurre siempre y cuando la energía del fotón con la que se irradia sea resonante con una transición vibrónica a un estado electrónico excitado, y que además sea permitido por reglas de selección.

A su vez, la intensidad de las transiciones vibrónicas está principalmente determinada por el principio de Franck-Condon, que relaciona la probabilidad de que ocurra una transición ($P_{i \rightarrow f}$) con el solapamiento entre las funciones de onda de los estados inicial ($\psi_{inicial}$) y final (ψ_{final}), según:

$$P_{i \rightarrow f} = |\langle \psi_{final}^* | \hat{\mu} | \psi_{inicial} \rangle|^2 \quad (2.9)$$

siendo $\hat{\mu}$ el operador momento dipolar de transición.

Este principio se basa en la aproximación de Born-Oppenheimer, la cual sostiene que el movimiento electrónico en una molécula ocurre mucho más rápido que el movimiento nuclear. Esto permite la separación de la función de onda total en funciones de onda electrónica (ψ_{el}) y nuclear (ψ_{nuc}). Debido a que el operador momento dipolar de transición sólo depende de la componente electrónica (q), la componente nuclear puede ser separada de la integral del momento de transición de la forma:

$$\begin{aligned} \langle \psi_{total,f}^* | \hat{\mu} | \psi_{total,i} \rangle &= \langle \psi_{nuc,f}^* | \langle \psi_{el,f}^* | \mu | \psi_{el,i} \rangle | \psi_{nuc,i} \rangle \\ &= \underbrace{\langle \psi_{nuc,f}^* | \psi_{nuc,i} \rangle}_{\text{solapamiento nuclear}} \langle \psi_{el,f}^* | \mu | \psi_{el,i} \rangle \end{aligned} \quad (2.10)$$

siendo el solapamiento nuclear $\langle \psi_{nuc,f}^* | \psi_{nuc,i} \rangle$ el comúnmente llamado *factor de Franck-Condon* de la transición.

De la Ecuación 2.10 se puede observar que si el factor de Franck-Condon

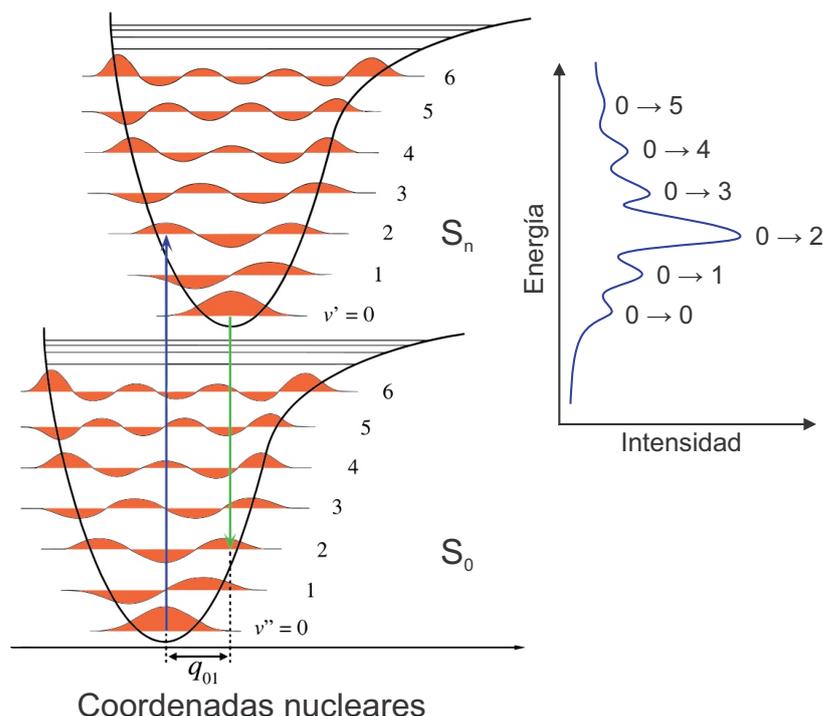


FIGURA 2.5: Esquema de la excitación vertical desde un estado S_0 a un estado excitado S_n para una molécula diatómica, con una diferencia en las coordenadas nucleares de mínima energía entre el estado fundamental (S_0) y el estado excitado (S_n) de q_{01} . La línea vertical azul marca la transición vibrónica al estado S_n con el mayor factor de Franck-Condon. Un esquema del espectro vibrónico se muestra a la derecha, en donde la transición $0 \rightarrow 2$ resulta en la transición de mayor intensidad.

para la transición entre los estados involucrados es cero, la intensidad de la transición vibrónica también lo es, independientemente de la magnitud de la componente electrónica.

No hay que perder de vista que debido a la aproximación de Born-Oppenheimer, las transiciones vibrónicas son verticales respecto a las coordenadas nucleares del estado inicial. En este sentido, en caso de que la geometría molecular de mínima energía del estado alcanzado ópticamente sea *similar* a la geometría de mínima energía del estado inicial, se espera que la transición $0 \rightarrow 0$, es decir desde el estado vibracional ν_0 del estado inicial al estado vibracional ν'_0 del estado final, sea la de mayor intensidad, debido al gran solapamiento de las funciones de onda vibracionales. En cambio, si la geometría de mínima energía del estado final difiere a la del estado inicial,

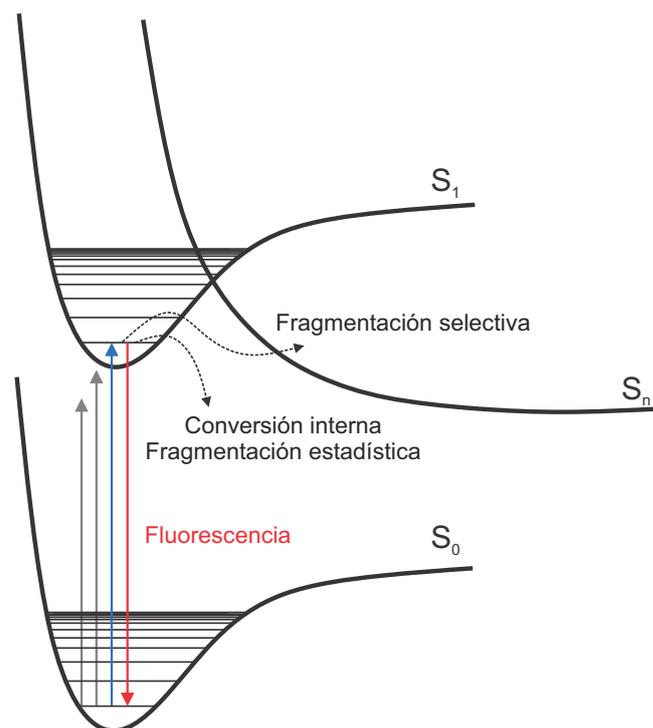


FIGURA 2.6: Esquema del proceso de fotofragmentación por absorción de luz UV. La excitación ocurre cuando la energía de irradiación es resonante con una transición a un estado vibracional del estado excitado (flecha azul). Luego, procesos radiativos, como la fluorescencia, y/o no radiativos, con posterior fragmentación selectiva o estadística, pueden ocurrir.

la transición 0_0^0 no será la de mayor intensidad.

La Figura 2.5 muestra un esquema en el cual la excitación ocurre desde el estado S_0 al estado excitado S_n para una molécula diatómica. En particular, la distancia interatómica de mínima energía del estado S_n se encuentra desplazada con respecto a aquella en el estado S_0 , por lo que la transición vibrónica con el mayor factor de Franck-Condon no es la transición $\nu_0 \rightarrow \nu'_0$.

Una vez alcanzado ópticamente el estado excitado, la energía absorbida se puede disipar por mecanismos radiativos o no radiativos. La Figura 2.6 muestra un esquema del proceso de excitación UV y los eventos que se pueden desencadenar posteriormente. La especie excitada puede decaer al estado fundamental (S_0) mediante la emisión de un fotón (fluorescencia) o por conversión interna (CI), desde el estado alcanzado ópticamente, o de algún otro estado electrónico excitado. En el primer caso, puede ocurrir o no

la fragmentación de la molécula, dependiendo de la energía del fotón emitido, y por tanto, el exceso de energía remanente. En el segundo caso, toda la energía absorbida en la excitación queda como energía en exceso en el estado S_0 , y por ende se redistribuye rápidamente en los modos vibracionales de la molécula. Esta redistribución de la energía en los modos vibracionales genera una fragmentación *estadística* de la molécula, entre todos los canales de disociación en el estado fundamental. Por otro lado, la disociación también puede ocurrir en el estado excitado, ya sea por alcanzar la energía límite de disociación en el estado excitado o por alcanzar por CI un estado de carácter disociativo (S_n en la Figura 2.5). Este último proceso da lugar a una fragmentación *selectiva* en donde los fragmentos observados dependerán fuertemente de la naturaleza de los estados excitados involucrados.

Debido a que la fragmentación ocurre de manera diferente si se da en el estado fundamental o en el estado excitado, en base a los fragmentos obtenidos se puede inferir el origen del proceso. En particular, si la fragmentación ocurre estadísticamente, por decaimiento al estado fundamental, los fragmentos observados son comparables con los obtenidos por disociación inducida por colisión (CID, por su acrónimo en inglés) o disociación por absorción multifotónica infrarroja (IRMPD, por su acrónimo en inglés). En cambio, si la disociación ocurre en el estado excitado los fragmentos observados pueden ser diferentes a los obtenidos por CID o IRMPD.

Como se comentó anteriormente, una longitud de onda de excitación resonante con una transición vibrónica llevará a la especie a un estado electrónico excitado, desencadenando posteriormente un proceso de disociación. El espectro de excitación se obtiene determinando a cada

longitud de onda la eficiencia de fragmentación ($Y(h\nu)$), calculada como:

$$Y^i(h\nu) = \frac{I_{frag}^i}{I_{padre} + \sum_{i=1}^n I_{frag}^i} \quad (2.11)$$

con I_{frag}^i la intensidad del fragmento i , I_{padre} la intensidad del ión padre y $\sum_{i=1}^n I_{frag}^i$ la sumatoria de las intensidades de todos los fragmentos observados. En la práctica, esta eficiencia de fragmentación es también corregida por la potencia del láser a cada longitud de onda.

Por otro lado, en condiciones de ensanchamiento natural (homogéneo), el ancho de la transición vibrónica está determinado por los ensanchamientos por tiempo de vida del estado excitado (LBT, por su acrónimo en inglés) y por el ensanchamiento rotacional (RB, por su acrónimo en inglés) a la temperatura del sistema. Haciendo uso del principio de incertidumbre de Heisenberg, se obtiene que:

$$\begin{aligned} FWHM(cm^{-1}) &> LBT + RB \\ FWHM(cm^{-1}) &> \frac{1}{2\pi c\tau} + RB \end{aligned} \quad (2.12)$$

En donde $FWHM$ corresponde al ancho a media altura de la función Lorentziana utilizada para ajustar la transición, c la velocidad de la luz en el vacío y τ al tiempo de vida del estado vibrónico excitado.

2.2.2.2. Sistema experimental

Los experimentos de espectroscopía de fragmentación UV del complejo $CytAg^+$ fueron realizados en el laboratorio de *Física de las Interacciones Iónicas y Moleculares* (PIIM, por su acrónimo en francés) de la Universidad Aix-Marseille-CNRS, bajo la dirección del Dr. Christophe Jovet, mientras que los complejos $CytNa^+$ y $CytK^+$ fueron estudiados en el *Instituto de*

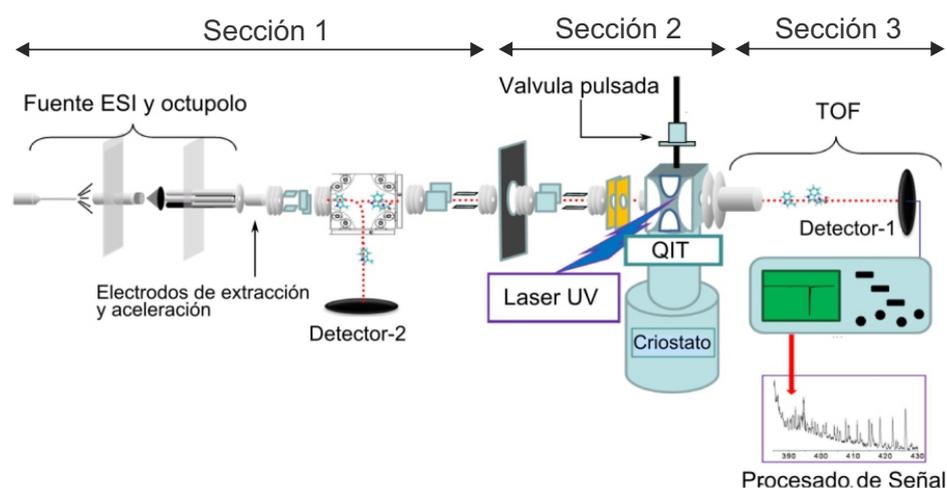
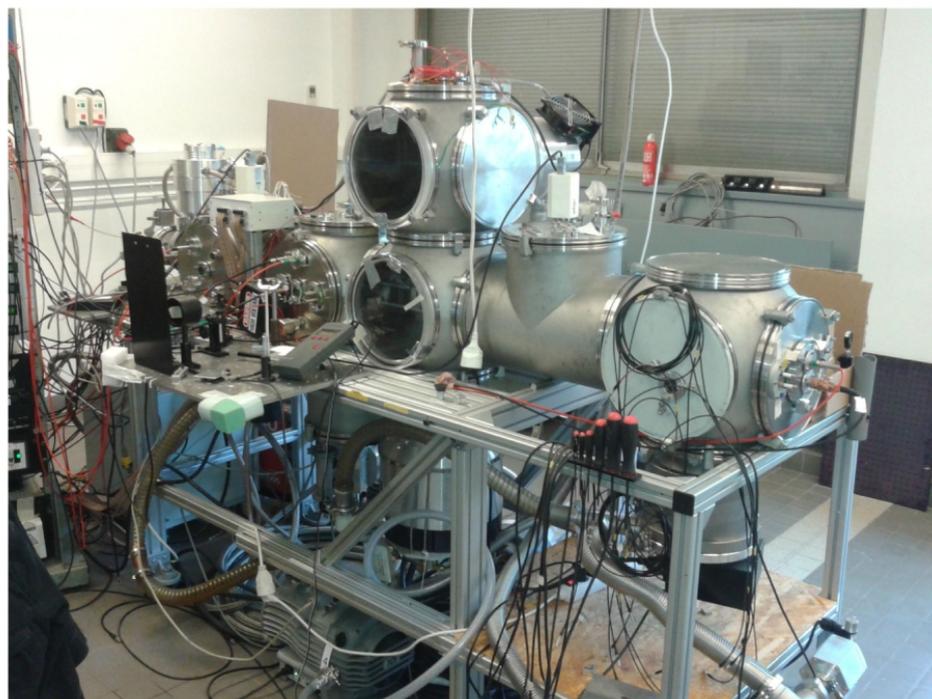


FIGURA 2.7: Fotografía del sistema experimental instalado en el PIIM (superior), y diagrama esquemático de las partes constituyentes y del funcionamiento del equipo (inferior).

Ciencias Moleculares de Orsay (ISMO-CNRS, por su acrónimo en francés) en la Universidad Paris-Sud, bajo la dirección del Dr. Gilles Grégoire.

Ambos laboratorios forman parte del Laboratorio Internacional asociado *Laboratorio de Estructura y Reactividad de Moléculas, Iones y Radicales en Fase Gaseosa* (LIA-LEMIR), co-financiado por CNRS-CONICET, cuyo director es el Dr. Gustavo Pino.

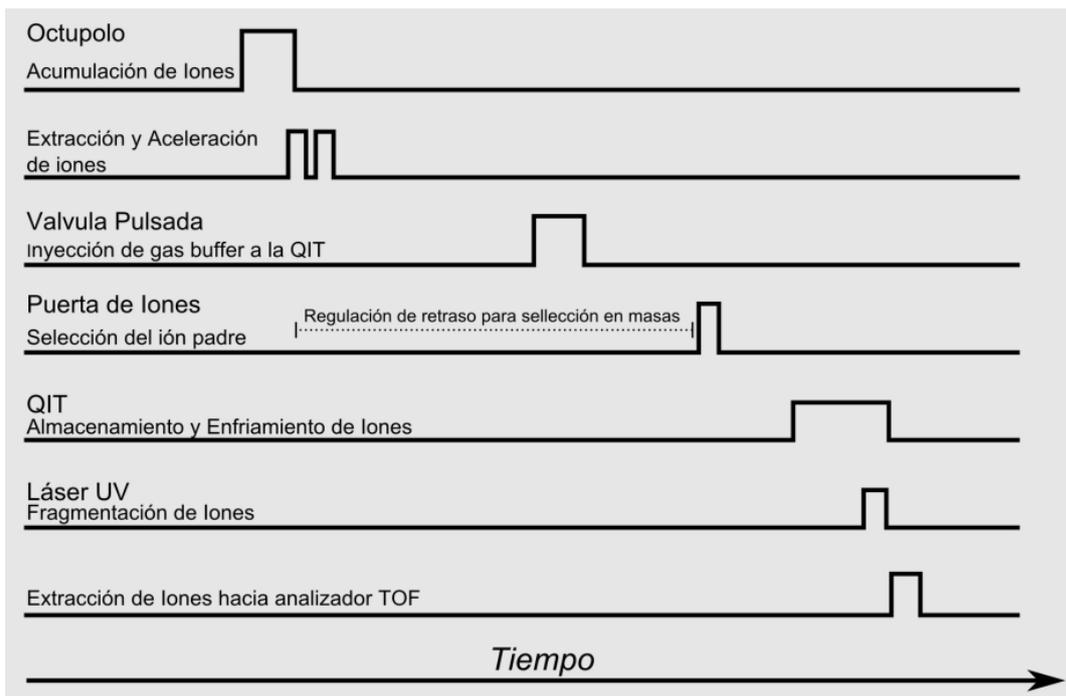


FIGURA 2.8: Esquema temporal de los eventos que tienen lugar en la obtención de un espectro de fotofragmentación UV.

De forma general, el equipo se divide en tres secciones características, las cuales se muestran en la Figura 2.7 junto a una fotografía del equipo utilizado. Debido a que el sistema opera de forma pulsada a 10 Hz, los distintos eventos que ocurren en el experimento deben ser sincronizados adecuadamente. Con esto se logra el solapamiento temporal y espacial de los iones atrapados en la QIT con el láser de fragmentación. Para facilitar la comprensión del lector sobre cómo opera el equipo, la Figura 2.8 muestra la secuencia temporal de los eventos que ocurren en un experimento característico.

La Sección 1 cuenta con una fuente ESI y una trampa octupolar. La fuente ESI, la cual opera a -3 kV, genera los agregados iónicos que luego son almacenados en un octupolo durante $\approx 90 \mu\text{s}$ a fin de aumentar la concentración de los mismos. Éste octupolo se encuentra dentro de una cámara de vacío, bombeada por un sistema de bomba turbomolecular, manteniendo la presión a $\approx 10^{-3}$ Torr. Luego de la acumulación, los iones

son extraídos de la trampa octupolar mediante la aplicación de un potencial en forma de pulso de -50 V y acelerados por un segundo potencial de 190 V. Esta secuencia de almacenamiento y extracción opera a 10 Hz y produce un paquete de iones con un ancho temporal de ≈ 500 ns. El paquete de iones es luego conducido mediante una serie de lentes electrostáticas, que corrigen su trayectoria, hasta la celda QIT (Sección 2). Previo a su entrada, se encuentra instalada una puerta de iones, que mediante el encendido y apagado de un campo eléctrico permite sólo la entrada de los iones de relación m/z de interés. En esta Sección, un sistema de vacío genera una caída de la presión de hasta $\approx 10^{-7}$ Torr.

El enfriamiento de los iones en la celda QIT se produce mediante un criostato (Coolpak Oerlikon). El gas buffer (He) es inyectado a la QIT por medio de una válvula pulsada (General Valve) 1 ms antes del ingreso de los iones, con el fin de garantizar la termalización del gas. Una vez ingresados, los iones son mantenidos dentro de la QIT por algunos ms para alcanzar un completo enfriamiento por colisiones con el gas buffer. Este proceso termaliza los iones a temperaturas cercanas a 20 K.

Una vez finalizado el período de enfriamiento, los iones son alcanzados por la radiación de un láser UV sintonizable, y los fragmentos generados de esta manera son extraídos hacia un analizador TOF de 1,5 m de largo y detectados mediante un MCP (Sección 3).

2.3. Fundamentos y Metodologías Teóricas

El modelado de la mecánica cuántica incluye métodos elaborados que permiten realizar cálculos de geometría y energía de sistemas muy complejos. También puede proveer espectros electrónicos y vibracionales, energías de ionización, afinidades electrónicas y protónicas, momentos dipolares, entre muchas otras, sin *conocimiento* previo del sistema (métodos

ab initio). Por otro lado, en la mecánica clásica, en la descripción del sistema se ignora la existencia de los electrones, los cuales son responsables de los enlaces químicos entre los átomos constituyentes. En este sentido la molécula es considerada como un sistema mecánico mantenido por fuerzas internas, descritas por potenciales denominados *campos de fuerza*. Su bajo costo computacional permite simular sistemas de gran tamaño y tiempos de dinámica prolongados, haciendo visible procesos de escala temporal larga.

En esta sección se describen brevemente las metodologías teóricas utilizadas y sus fundamentos.

2.3.1. Métodos *ab initio*

Un sistema molecular se puede pensar como un ensamble de N núcleos cargados positivamente descritos por un conjunto de coordenadas \mathbf{R} y n electrones cargados negativamente, descritos por un conjunto de coordenadas \mathbf{r} , en donde las interacciones entre las cargas, tanto repulsivas como atractivas, surgen de efectos cuánticos. La forma de predecir las propiedades intrínsecas de este ensamble es mediante su descripción a partir de la función de onda total del sistema $\Psi_{tot}(\mathbf{r}, \mathbf{R})$ y la resolución de la ecuación de Schrödinger $H\Psi_{tot}(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = E_{tot}\Psi_{tot}(\mathbf{r}, \mathbf{R})$. En general, esta ecuación no puede ser resuelta exactamente por lo que se utilizan distintos paquetes de mecánica cuántica para obtener buenas aproximaciones.

Como se comentó previamente, la aproximación de Born-Oppenheimer permite separar la función de onda del sistema como un simple producto entre la función de onda electrónica (Ψ_{el}) y nuclear (χ_N), de la forma:

$$\Psi_{tot}(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = \Psi_{el}(\mathbf{r}, \mathbf{R})\chi_N(\mathbf{R}) \quad (2.13)$$

A partir de esto, el Hamiltoniano H (operador energía) se escribe como:

$$H = T_N + T_e + V_{Ne} + V_{NN} + V_{ee} \quad (2.14)$$

donde los dos primeros términos corresponden a la energía cinética de los núcleos y electrones, mientras que los otros tres términos corresponden a interacciones de Coulomb atractivas entre núcleos y electrones, y repulsivas entre núcleos y electrones consigo mismos. El Hamiltoniano total también puede ser separado en Hamiltoniano nuclear H_N y electrónico H_{el} , en donde

$$H_{el} = T_e + V_{Ne} + V_{ee} = T_e - \sum_{A=1}^N \sum_{i=1}^n \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^n \sum_{j>i}^n \frac{1}{r_{ij}} \quad (2.15)$$

Entonces, la función de onda electrónica $\Psi_{el}(\mathbf{r}, \mathbf{R})$ satisface la ecuación:

$$H_{el}\Psi_{el}(\mathbf{r}, \mathbf{R}) = E_{el}(\mathbf{R})\Psi_{el}(\mathbf{r}, \mathbf{R}) \quad (2.16)$$

La energía electrónica $E_{el}(\mathbf{R})$ equivale entonces:

$$E_{el}(\mathbf{R}) = \frac{\int \Psi_{el}^*(\mathbf{r}, \mathbf{R}) H_{el} \Psi_{el}(\mathbf{r}, \mathbf{R})}{\int \Psi_{el}^*(\mathbf{r}, \mathbf{R}) \Psi_{el}(\mathbf{r}, \mathbf{R}) \delta\tau} \quad (2.17)$$

Por esto, la energía electrónica total del sistema se escribe como

$$E_{el}^{tot}(\mathbf{R}) = E_{el}(\mathbf{R}) + \sum_{A=1}^N \sum_{B>A}^N \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (2.18)$$

en donde el último término corresponde a la interacción entre los núcleos y es constante cuando la posición de los núcleos es fija. Una vez conocida la función de onda electrónica $\Psi_{el}(\mathbf{r}, \mathbf{R})$, la ecuación de Schrödinger nuclear que satisface la función de onda nuclear $\chi_N(\mathbf{R})$ puede ser resuelta.

En particular, los cálculos de química cuántica proveen la representación de $E_{el}^{tot}(\mathbf{R})$ en función a las coordenadas nucleares (\mathbf{R}) , también llamada

superficie de energía potencial (SEP). Para esto, la Ecuación 2.15 puede ser reescrita como:

$$H_{el} = \sum_{i=1}^n (T_{ei} + V_{Ni}) + \sum_{i=1}^n \sum_{j>i}^n \frac{1}{r_{ij}} \quad (2.19)$$

donde el primer término corresponde a la sumatoria de los n Hamiltonianos (h_i^c) para cada electrón i moviéndose en el campo generado por los núcleos, y el segundo término corresponde a la repulsión entre electrones. La función de onda electrónica $\Psi_{el}(\mathbf{r}, \mathbf{R})$ que los describe puede ser expresada como un determinante de Slater $|\phi_1(1)\phi_2(2)\dots\phi_n(n)|$ generado a partir de orbitales $\phi_i(x_i)$, en donde cada orbital describe a un electrón del sistema molecular. Estos orbitales, denominados orbitales moleculares, son generalmente construidos a partir de una combinación lineal de orbitales atómicos (OAs) χ_v . Luego, cuando la energía electrónica es calculada en la base de OAs se obtiene un conjunto de ecuaciones, llamadas ecuaciones de *Hartree-Fock* (HF). La resolución de estas ecuaciones se realiza mediante un procedimiento variacional iterativo llamado campo autoconsistente (SCF, de su acrónimo en inglés), y el resultado es un conjunto de M orbitales moleculares de un electrón.

La idea esencial del método de orbitales moleculares o HF consiste en asignar a cada OM, en un sistema de capa cerrada, dos electrones con espines α y β , respectivamente. En este esquema, la correlación electrónica debido al movimiento de electrones vecinos es ignorada. La diferencia entre la energía exacta (E_{exacta}) y la energía de HF (E_{HF}) calculada de esta manera es la energía de correlación electrónica ϵ_c .

En este sentido, el cálculo de ϵ_c y la elección de los OAs para la descripción de los OMs, son dos aspectos importantes a tener en cuenta si se quieren mejorar los resultados obtenidos por métodos *ab initio*.

Una forma de mejorar la función de onda HF consiste en describir al sistema mediante el agregado de determinantes de Slater obtenidos a partir

del remplazo de orbitales ocupados por orbitales virtuales ϕ_V . Por ejemplo, el reemplazo de dos orbitales ocupados por dos orbitales virtuales genera una nueva función de onda que es una combinación lineal de los determinantes construidos, de la forma $\Psi = |\phi_1\phi_2\phi_{Vi}\phi_{Vi+1}\dots\phi_n|$. El uso del conjunto completo de configuraciones posibles corresponde a la configuración de interacciones completa (FCI, por su acrónimo en inglés). Debido a que el número de posibles configuraciones escala muy rápidamente con el número de electrones considerados, este método se vuelve computacionalmente muy costoso. Sin embargo, la inclusión de la correlación electrónica en la descripción del sistema es de suma importancia para un cálculo de gran precisión.

2.3.1.1. Método *Coupled-Cluster*

El método de clúster acoplado o *Coupled-Cluster* (CC, de su acrónimo en inglés) es uno de los métodos más precisos y confiables de entre la técnicas de química cuántica, debido a la inclusión del efecto de correlación electrónica. En este método, en vez de correlacionar el movimiento de un par específico de electrones, como ocurre por ejemplo en la teoría de perturbación de muchos cuerpos (MBPT, por su acrónimo en inglés)[70], CC correlaciona el movimiento de cualquier par de electrones con un par de orbitales ocupados i y j seleccionados, introduciendo una función de dos partículas:

$$f_{ij}(x_m, x_n) = \sum t_{ij}^{ab} \phi_{Va}(x_m)\phi_{Vb}(x_n) \quad (2.20)$$

en donde ϕ_{Va} y ϕ_{Vb} corresponden a orbitales virtuales y t_{ij}^{ab} es denominado coeficiente del clúster. Al intercambiar cada producto de funciones de onda de partículas independientes por 2.20 se obtienen mejoras al determinante de Slater. A partir de este método, es posible generar todos los determinantes de Slater conteniendo uno (S), dos (D), etc orbitales

excitados[71]. El método CCSD(T), en donde el tercer orbital excitado es tratado perturbativamente, es uno de los métodos de mayor precisión[72] pero tiene un costo computacional muy elevado, por lo que generalmente todavía se utiliza sólo para moléculas pequeñas[73-75].

En particular, a partir de la teoría de respuesta de CC se pueden derivar métodos de correlación de segundo orden para el cálculo de energías de excitación. La idea atrás de la teoría de respuesta es el estudio del sistema ante la exposición a campos externos dependientes del tiempo. De la respuesta de la función de onda o la densidad al campo aplicado se pueden obtener propiedades del sistema dependientes de la frecuencia. En este marco, CC2[76] es el modelo CC iterativo computacionalmente más simple para obtener energías de excitación corregidas por segundo orden. Si bien no mejora la descripción de las propiedades del estado fundamental en comparación a otros métodos como la teoría de perturbación de segundo orden (MP2), la ventaja radica en que, en combinación con la teoría de respuesta de CC, puede ser aplicado al cálculo de estados excitados[77-79].

2.3.1.2. Teoría del Funcional de la Densidad

Una de las metodologías más utilizadas en los cálculos *ab initio* es la teoría del funcional de la densidad (DFT, por su acrónimo en inglés). En esta, la energía electrónica E_{el} del estado fundamental del sistema esta completamente determinada mediante el conocimiento de la densidad electrónica $n(\mathbf{r})$ del sistema[80]. La principal ventaja de esta metodología es el bajo costo computacional, ya que reduce el sistema de n variables, con n la cantidad de electrones, a uno de 3 variables correspondientes a los ejes cartesianos.

En este esquema, la energía total del sistema es funcional de la densidad electrónica, y dado un potencial externo $v(r)$ generado por los núcleos, ésta

se puede escribir como:

$$E[n(\mathbf{r})] = \int n(\mathbf{r})v(\mathbf{r})d\mathbf{r} + F[n(\mathbf{r})] \quad (2.21)$$

en donde $F[n(\mathbf{r})]$ es un funcional universal de la densidad electrónica *a priori* desconocido, mientras que el término $\int n(\mathbf{r})v(\mathbf{r})\delta\mathbf{r}$ es dependiente del sistema. La densidad electrónica $n(\mathbf{r})$ se puede calcular fácilmente como la sumatoria del cuadrado del módulo de un conjunto de orbitales de un electrón.

Kohn y Sham propusieron en 1965 un funcional universal[81] que contenía contribuciones individuales de la energía cinética ($T[n(\mathbf{r})]$), interacción de Coulomb clásica ($E_H[n(\mathbf{r})]$) y una corrección de interacción electrónica no clásica, conocida como la energía de correlación e intercambio (E_{xc}^{exacto}), de la forma:

$$F[n(\mathbf{r})] = T[n(\mathbf{r})] + E_H[n(\mathbf{r})] + E_{xc}^{exacto} \quad (2.22)$$

Introduciendo 2.22 en 2.21 se obtiene la expresión para el cálculo de la energía total del sistema como:

$$E[n(\mathbf{r})] = \underbrace{T[n(\mathbf{r})]}_{E \text{ cinética}} + \underbrace{\int n(\mathbf{r})v(\mathbf{r})d\mathbf{r}}_{P \text{ externo}} + \underbrace{\frac{1}{2} \int \frac{n(\mathbf{r})n(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d(\mathbf{r})d(\mathbf{r}')}_{E \text{ Coulomb}} + \underbrace{E_{xc}^{exacto}(\mathbf{r})}_{E \text{ int}} \quad (2.23)$$

Si bien en general la energía de correlación e intercambio (E_{xc}) tiene una contribución pequeña a la energía total, es muy importante encontrar el funcional adecuado para el estudio de cada sistema en particular.

Muchos años después, en 1993, Axel Becke propuso el uso de funcionales *híbridos*[82] para mejorar el cálculo de la energía de correlación e intercambio. Éstos incorporan parcialmente el intercambio exacto procedente de un cálculo de Hartree-Fock con el resto de la energía de

correlación e intercambio proveniente de otra fuente (empírica o *ab initio*). Su uso ha ganado gran popularidad en los últimos años debido a que describen mejor los sistemas moleculares en relación a los funcionales puros. Uno de los más utilizados es el famoso funcional B3LYP, desarrollado en conjunto por Becke, Lee, Yang y Parr[83-85]. Sin embargo, la parte no Coulómbica de estos funcionales generalmente decae muy rápido y se vuelven imprecisos para representar interacciones electrónicas de largo alcance, haciendo su uso inadecuado para modelar procesos de excitación electrónica a orbitales de alta energía. Los funcionales híbridos con correcciones de largo alcance (LC), como CAM-B3LYP[86], utilizan el método de atenuación Coulómbica para corregir este problema, por lo que son ideales para describir procesos de transferencia de carga[87].

Al igual que para el método de CC, en DFT, a partir de la resolución de la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo se pueden obtener propiedades del sistema que dependen de la frecuencia. Esta extensión se denomina *DFT dependiente del tiempo*[88] (TD-DFT, por su acrónimo en inglés). La teoría de respuesta lineal es utilizada para estudiar la respuesta de la densidad electrónica luego de una perturbación al sistema. Esta perturbación consiste en la aplicación de un campo eléctrico externo de la forma $V(t) = E \cos(\omega t)$, del cual se obtiene una función de onda como funcional de la densidad electrónica, según:

$$\Psi(r, t) = \Psi[n(t)](t)e^{-\omega t} \quad (2.24)$$

En este esquema el sistema se asume inicialmente en el estado fundamental antes de la aplicación del campo eléctrico, y que la densidad electrónica varía sólo lentamente en el tiempo (aproximación de la densidad local adiabática, ALDA). A partir de la solución dependiente del tiempo de la Ecuación 2.24 se pueden obtener las energías de excitación y fuerzas del

oscilador de las transiciones.

Si bien el método TD-DFT es uno de los más utilizados para el estudio de excitados electrónicos excitados, hay que tener en cuenta que posee todas las aproximaciones que hace DFT. Por esto, para una mayor precisión en el estudio del estado excitado del sistema, generalmente se realiza una primera aproximación explorativa con TD-DFT y luego una refinación del cálculo con CC2.

2.3.2. Dinámica Cuántica - KRONOS

La dinámica electrónica luego de la absorción de luz es una pieza clave para entender el comportamiento electrónico de un sistema particular. Diferentes metodologías computacionales se han desarrollado para este fin, aunque generalmente suponen costos de cálculo muy elevados.

En esta tesis doctoral se utilizó el programa de dinámica cuántica KRONOS, desarrollado en el grupo de trabajo, para obtener la descripción a nivel atomístico del comportamiento electrónico del sistema en función del tiempo, luego de aplicada una perturbación. Este programa se ha empleado satisfactoriamente para la descripción electrónica de sistemas muy variados[89-95] y provee una herramienta de gran utilidad para la dilucidación de mecanismos fotodinámicos.

La estructura electrónica del estado fundamental se obtiene utilizando el modelo de enlaces fuertes derivado de la teoría del funcional de la densidad, con corrección de cargas autoconsistentes (SCC-DFTB, de su acrónimo en inglés)[96], a través del código DFTB+[97]. Este método es una extensión de DFT a partir de la teoría de enlaces fuertes (TB). TB se basa principalmente en el empleo de una base mínima de orbitales atómicos localizados y el reemplazo del Hamiltoniano del sistema por una matriz Hamiltoniano parametrizada, en donde los elementos dependen sólo de las

coordenadas nucleares y la simetría de los orbitales. Este Hamiltoniano se expresa en términos de un conjunto de bases de orbitales atómicos $\phi_\nu(\mathbf{r} - \mathbf{R}_\alpha)$ donde \mathbf{R}_α es la posición del átomo α , ν es el índice que indica el momento angular y el spin del orbital atómico. La ecuación de Schrödinger en este esquema se escribe como:

$$\sum_\nu^N c_{\nu i} (H_{\mu\nu} - \epsilon_i S_{\mu\nu}) = 0 \quad (2.25)$$

donde $H_{\mu\nu} = \langle \phi_\mu | \hat{H} | \phi_\nu \rangle$ y $S_{\mu\nu} = \langle \phi_\mu | \phi_\nu \rangle \forall \mu \in \alpha \wedge \nu \in \beta$.

El método de combinación DFTB[98] se basa en la expansión de segundo orden de la energía total de Kohn-Sham, con respecto a las fluctuaciones de la densidad electrónica, según:

$$n(\mathbf{r}) = n^0(\mathbf{r}) + \delta n(\mathbf{r}) \quad (2.26)$$

donde $n^0(\mathbf{r})$ es una densidad de referencia y $\delta n(\mathbf{r})$ es la fluctuación de la densidad. En este esquema, la energía del sistema de N electrones y M núcleos ubicados en \mathbf{R} se expresan como un funcional de la densidad de carga de la forma:

$$E[n(\mathbf{r})] = T[n(\mathbf{r})] + E_H[n^0(\mathbf{r}) + \delta n(\mathbf{r})] + E_{xc}[n^0(\mathbf{r}) + \delta n(\mathbf{r})] + \int d\mathbf{r} n v(\mathbf{r}) + E_{ZZ} \quad (2.27)$$

donde E_{ZZ} corresponde a la energía de repulsión por interacción de a pares.

En este formalismo, las funciones ϕ_ν son funciones de onda pseudoatómicas construidas como combinación lineal de los orbitales de Slater. Considerando sólo interacciones de a pares, los elementos de las matrices Hamiltoniano (H^0) y de solapamiento (S), ambas necesarias para la

evolución temporal de la dinámica, quedan expresadas como:

$$H_{\mu\nu}^0 = \begin{cases} \epsilon_{\mu}^{\text{átomo libre}}, & \text{si } \mu = \nu \\ \langle \phi_{\mu}^{\alpha} | \hat{T} + v_{eff}^{\alpha}[n^0] + v_{eff}^{\beta}[n^0] | \phi_{\mu}^{\beta} \rangle & \text{si } \alpha \neq \beta \end{cases}$$

$$S_{\mu\nu} = \begin{cases} 1, & \text{si } \mu = \nu \\ \langle \phi_{\mu}^{\alpha} | \phi_{\mu}^{\beta} \rangle & \text{si } \alpha \neq \beta \end{cases} \quad (2.28)$$

donde v_{eff}^{α} corresponde al potencial efectivo centrado en \mathbf{R}_{α} .

La energía total del sistema en el esquema DFTB es:

$$E_{DFTB} = \sum_i^{occ} \langle \Psi_i | \hat{H}^0 | \Psi_i \rangle + \frac{1}{2} \sum_{\alpha\beta}^M \gamma_{\alpha\beta} \Delta q_{\alpha} \Delta q_{\beta} + E_{rep} \quad (2.29)$$

donde Δq_{α} es la diferencia entre la población atómica de Mulliken q_{α} y el número de electrones de valencia del átomo libre neutro q_{α}^0 , $\gamma_{\alpha\beta}$ la integral función de la distancia que describe la interacción electrónica entre los átomos α y β y E_{rep} una energía repulsiva de corto alcance. En el caso en que $\alpha = \beta$, $\gamma_{\alpha\alpha}$ describe la interacción electrónica dentro del átomo α y puede aproximarse como la diferencia entre la energía de ionización y la afinidad electrónica, es decir, con su dureza química[99].

Las fluctuaciones de la carga se obtienen a partir del análisis poblacional de Mulliken como:

$$q_{\alpha} = \sum_{\mu \in \alpha} (\rho S)_{\mu\mu} \quad (2.30)$$

donde $\rho_{\mu\nu}$ es el elemento $\mu\nu$ de la matriz densidad reducida.

Finalmente, aplicando el método variacional a la Ecuación 2.29, el Hamiltoniano modificado queda de la forma:

$$H_{\mu\nu} = \langle \phi_{\mu} | \hat{H}^0 | \phi_{\nu} \rangle + \frac{1}{2} S_{\mu\nu} \sum_{\xi}^M (\gamma_{\alpha\xi} + \gamma_{\beta\xi}) \Delta q_{\xi} \quad (2.31)$$

Debido a la dependencia del Hamiltoniano con la carga, es necesario aplicar el procedimiento de autoconsistencia en cada paso para resolver 2.31.

Al igual que en el formalismo TD-DFT, a partir de la resolución de la ecuación de Schrödinger dependiente del tiempo se pueden obtener propiedades que dependan de la frecuencia. En este caso, el formalismo se denomina DFTB dependiente del tiempo (TD-DFTB, de su acrónimo en inglés).

Siendo el operador de la matriz densidad reducida (MDR):

$$\hat{\rho}(t) = \sum_i |\psi_i(t)\rangle f(\epsilon_i) \langle \psi_i(t)| \quad (2.32)$$

derivando en función del tiempo se puede obtener la ecuación de movimiento para el operador de la MDR, conocida como la ecuación de Liouville-von Neumann:

$$\frac{\delta}{\delta t} \hat{\rho}(t) = -\frac{i}{\hbar} [\hat{H}[\rho], \hat{\rho}(t)] \quad (2.33)$$

A partir de expresar la matriz densidad reducida (MDR) monoeléctronica en la base de orbitales atómicos no ortogonales de la forma

$$\hat{\rho}(t) = \sum_{\mu\nu} |\psi_\mu\rangle \rho_{\mu\nu}(t) \langle \psi_\nu| \quad (2.34)$$

se puede derivar 2.33 como

$$\frac{\delta}{\delta t} \hat{\rho} = -\frac{i}{\hbar} (S^{-1} \hat{H}[\hat{\rho}, t] \hat{\rho} - \hat{\rho} \hat{H}[\hat{\rho}, t] S^{-1}) \quad (2.35)$$

Si se expande el funcional de la energía dependiente del tiempo alrededor de una densidad de referencia n^0 , donde las fluctuaciones de la densidad electrónica ahora dependen del tiempo, se obtiene la expresión

para el Hamiltoniano DFTB dependiente del tiempo

$$H_{\mu\nu}[\rho, t] = \langle \phi_\mu | \hat{H}^0 \phi_\nu \rangle + \frac{1}{2} S_{\mu\nu} \sum_{\xi}^M (\gamma_{\alpha\xi} + \gamma_{\beta\xi}) \Delta q_\xi(t) \quad (2.36)$$

donde las cargas de Mulliken ahora adquieren una dependencia temporal

$$q_\alpha = \sum_{\mu \in \alpha} (\rho(t) S)_{\mu\mu} \quad (2.37)$$

En particular, para que la MDR evolucione según 2.35 es necesario que el sistema no se encuentre en un autoestado del Hamiltoniano. Para esto, si el sistema se encuentra inicialmente en el estado fundamental es necesario aplicarle una perturbación que lo desplace de ese estado. El Hamiltoniano que describe la influencia de un potencial externo dependiente del tiempo se puede expresar como:

$$\hat{H}(t) = \hat{H}_0 + \hat{V}(t) \quad (2.38)$$

donde \hat{H}_0 es el Hamiltoniano que describe al sistema en el estado fundamental y $\hat{V}(t)$ es la perturbación externa que depende del tiempo. Bajo ciertas aproximaciones, el término perturbativo del campo electromagnético utilizado para perturbar el sistema se puede escribir como:

$$\hat{V}(t) = -\mathbf{E}(t) \hat{\mu} \quad (2.39)$$

donde $\mathbf{E}(t)$ es el campo eléctrico dependiente del tiempo y $\hat{\mu}$ es el operador momento dipolar del sistema.

Si la perturbación que se utiliza es del tipo *pulso*, es decir que su forma funcional corresponde a una delta (δ) de Dirac, se puede obtener información relevante sobre las excitaciones electrónicas del sistema. Este tipo de perturbación excita conjuntamente todas las frecuencias del sistema

y se expresa como:

$$\mathbf{E}(t) = E_0 \delta(t) \mathbf{u} \quad (2.40)$$

donde E_0 es la intensidad del campo y $\mathbf{u} = \hat{i}, \hat{j}, \hat{k}$ es la dirección de polarización del campo.

Siendo ésta una perturbación instantánea a los electrones del sistema en $t > 0$ (debido a que el campo eléctrico es infinito en $t = 0$) la excitación coherente hace que las cargas del sistema evolucionen con el tiempo según 2.3.2. Cuando la intensidad del pulso es pequeña, la respuesta electrónica se encuentra dentro del régimen de respuesta lineal, y el momento dipolar responde a:

$$\mu(t) = \int \alpha(t - \tau) E(\tau) \delta\tau \quad (2.41)$$

donde $\alpha(t - \tau)$ es la polarizabilidad temporal a lo largo del eje sobre el cual se aplica el campo externo $E(\tau)$. Realizando una transformada de Fourier al momento dipolar se obtiene la susceptibilidad eléctrica:

$$\alpha(\omega) = \frac{\mu(\omega)}{E_0} \quad (2.42)$$

donde la parte imaginaria es proporcional al espectro de absorción del sistema.

Por otro lado, una perturbación tipo *láser* se puede aproximar como un campo eléctrico monocromático que oscila en el tiempo de la forma:

$$\mathbf{E}(t) = E_0 \sin(\omega t) \mathbf{u} \quad (2.43)$$

donde E_0 es la intensidad del campo, ω la frecuencia con la que oscila y \mathbf{u} la dirección de polarización.

Este tipo de perturbación permite estudiar la naturaleza de las excitaciones de una manera profunda cuando se analiza la evolución temporal de las poblaciones o la variación de la densidad de carga en el tiempo.

2.3.3. Dinámica Clásica

Las simulaciones de dinámica molecular proveen información atómica sobre las posiciones y velocidades a un nivel microscópico. A un determinado tiempo, el sistema estudiado puede adoptar distintas conformaciones, de las cuales pueden ser extraídas propiedades macroscópicas, promediando sobre todo el ensamble de valores de propiedades microscópicas. Por ejemplo, el espectro de una molécula en solución es obtenido a partir del promedio sobre todas las posibles conformaciones pobladas a la temperatura considerada. Bajo la hipótesis de la ergodicidad, a períodos suficientemente largos el valor medio de una propiedad es igual al valor medio observado. Esto permite el reemplazo del promedio de un ensamble por el promedio en el tiempo, ya que si el sistema evoluciona, dado un tiempo suficiente, se espera que pase por todos los estados posibles.

2.3.3.1. Campos de Fuerza

Debido a que el papel de los electrones en este esquema es ignorado, la energía potencial de una molécula en su estado basal, puede considerarse como una función de las coordenadas nucleares, denominada *Campo de Fuerza* (FF, de su acrónimo en inglés). Estos FF se componen de términos enlazantes y no enlazantes, de la forma:

$$E_{pot} = \underbrace{E_{enlace} + E_{ángulo} + E_{torsional}}_{\text{Enlazantes}} + \underbrace{E_{vdw} + E_{elec}}_{\text{No enlazantes}} \quad (2.44)$$

Los términos enlazantes incluyen contribuciones debidas a enlaces covalentes (E_{enlace}), ángulos ($E_{ángulo}$) y diedros ($E_{torsional}$). Los términos no enlazantes se definen por un término correspondiente a interacciones de

Van der Waals (E_{vdw}) y otro término Coulómbico para interacciones electrostáticas (E_{elec})

Debido a la naturaleza clásica de esta metodología, los FF contienen parámetros que definen las interacciones de a pares de cada átomo del sistema en particular. Esta *parametrización* de las interacciones se realiza mediante cálculos *ab initio* y teniendo en cuenta resultados experimentales. Por esto, los FF son diseñados para el estudio de sistema específicos. Entre los FF más utilizados para la simulación de sistemas biológicos se destacan AMBER[100] y CHARMM[101]. En esta tesis doctoral se utilizó en todos los casos el potencial CHARMM27, especialmente desarrollado para la simulación de ácidos nucleicos y lípidos[101].

2.3.3.2. Integración de las Ecuaciones de Movimiento

La dinámica del sistema es estudiada a partir de la resolución de la ecuación de movimiento de Newton para una partícula i :

$$F_i = ma_i = m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = - \frac{dV(r_i)}{dr_i} \quad (2.45)$$

en donde m la masa de la partícula i , a es su aceleración, r sus coordenadas y $V(r_i)$ es la energía potencial que actúa sobre ella. La posición $r_i(t + \delta t)$ que tendrá la partícula i al tiempo $t + \delta t$ puede ser obtenida a partir de su posición, velocidad y aceleración a tiempo t mediante una expansión de Taylor de la forma:

$$r_i(t + \delta t) = r_i(t) + v_i(t)\delta t + \frac{1}{2}a_i(t)\delta t^2 + \dots \quad (2.46)$$

De forma similar, a un tiempo $t - \delta t$ uno obtiene:

$$r_i(t - \delta t) = r_i(t) - v_i(t)\delta t + \frac{1}{2}a_i(t)\delta t^2 + \dots \quad (2.47)$$

La suma de las Ecuaciones 2.46 y 2.47 lleva al algoritmo de *velocity Verlet*[102]

$$r_i(t + \delta t) = 2r_i(t) - r_i(t - \delta t) + a_i(t)\delta t^2 + \dots \quad (2.48)$$

en donde las nuevas coordenadas de la partícula i a tiempo $t + \delta t$ son derivadas a partir de la posición y aceleración a tiempo t , sin tener en cuenta la velocidad explícitamente.

2.3.3.3. Condiciones Periódicas de Contorno

Para muchos sistemas, las interacciones de la molécula de estudio con el solvente son fundamentales para el entendimiento de los mecanismos involucrados. En una simulación de dinámica molecular con solvente explícito, moléculas de solvente se localizarán sobre el borde del área de simulación. Para simular las interacciones de esta moléculas de manera adecuada se emplean las *condiciones de contorno periódicas*, en donde la caja de simulación está rodeada virtualmente por réplicas iguales en todas las direcciones, haciendo que el cálculo de la simulación se desarrolle como si el sistema fuera infinito en el espacio.

Debido a que el costo computacional de computar interacciones de a pares en un espacio infinito es ciertamente infinito, los programas utilizan parámetros de *corte* que hacen referencia a la distancia hasta la cual se computan las interacciones.

Capítulo 3

Fotofragmentación UV de

Complejos Citosina- M^+ (M : Ag,

Na, K) en Fase Gaseosa

3.1. Introducción

La interacción de bases del ADN con cationes (H^+ o cationes metálicos M^+) ha sido de gran interés a lo largo de los años debido a la capacidad de inducir la formación de estructuras o plegamientos no canónicos en el ADN[103-106], y su potencial aplicación en nanociencia y nanomedicina[13]. Además, se sabe que algunas de estas estructuras no canónicas se relacionan con distintos tipos de enfermedades o procesos biológicos de gran relevancia[18-21].

En particular, se conoce que el catión Ag^+ interacciona exclusivamente con las bases del ADN, particularmente la Cyt, y no con el resto azúcar-fosfato[12, 107, 108], como sí lo hacen otros metales como Na y K, por atracción electrostática[109]. Los primeros reportes en bibliografía mostraron que el catión Ag^+ estabiliza fuertemente el *mismatch* Cyt-Cyt en el ADN[12, 110]. Berdakin *et al.* demostraron mediante espectroscopía IRMPD y cálculos teóricos que la estructura más estable del dímero Cyt_2Ag^+ en el estado fundamental imita la estructura *i-motif* del dímero C_2H^+ en los plegamientos no canónicos del ADN/ARN. Esta gran afinidad ha sido utilizada en los últimos años para la generación de clústeres híbridos ADN- Ag_n , altamente fluorescentes y sintonizables, debido a su potencial uso en medicina[111, 112], biología[38], nanotecnología[36, 37], entre otros. Aunque la generación de clústeres ADN- Ag_n fluorescentes se ve favorecida por la presencia de regiones con Cyt en la secuencia utilizada, las propiedades ópticas de estos sistemas son también dependientes de otros factores como la secuencia de bases de la matriz, el tamaño del clúster metálico, el pH, la temperatura, etc[43].

Si bien hay reportes en bibliografía sobre la interacción de la Ag con las bases del ADN[53, 113, 114], poco se conoce sobre el efecto que tiene la radiación UV en estos sistemas. Gwinn y colaboradores han demostrado

que en los clústeres ADN- Ag_n fluorescentes la excitación a la banda UV, atribuida a las bases del ADN, genera la misma respuesta de fluorescencia que si se excitara a la banda visible, atribuida al clúster metálico Ag_n . Esto sugiere la presencia de un estado de transferencia de carga desde la base al metal, luego de la excitación UV, en donde la identidad del metal podría ser fundamental para entender sus propiedades ópticas.

Una estrategia útil para dilucidar estos mecanismos es el estudio de la fotodinámica en el estado excitado de los pequeños bloques que constituyen el ADN, como una aproximación del tipo *bottom-up*. Si bien en este esquema las propiedades no son directamente escalables a sistemas de mayor complejidad, aporta información detallada de los procesos involucrados en los bloques constituyentes. La espectroscopía de iones fríos en fase gaseosa no sólo aporta información detallada sobre la estructura de los complejos, sino que también da indicios sobre los procesos desencadenados luego de la absorción de luz. Particularmente, la espectroscopía de fotofragmentación UV, en conjunto con cálculos *ab initio* de estado excitado, han demostrado ser una herramienta de gran utilidad hacia este objetivo[106, 115-119].

En relación a los anteriormente comentado, en este capítulo se exponen los resultados sobre el estudio de la interacción de complejos de Cyt con cationes metálicos (Ag^+ , Na^+ y K^+), aislados en fase gaseosa y su interacción con la radiación UV, con el fin de aportar información detallada sobre la dinámica involucrada luego de la absorción de luz, y la influencia de la identidad del metal en la misma. Esto se realizó mediante la espectroscopía de fotofragmentación UV de los complejos en fase gaseosa, y cálculos *ab initio* del estado excitado.

3.2. Sistema Experimental

El esquema experimental ya fue descrito en la Sección 2. Brevemente, los iones son producidos en una fuente ESI a partir de una solución de Cyt (500 μM) y la sal correspondiente (AgNO_3 (250 μM), NaCl o KI (100 μM)) en MeOH (50 %)/ H_2O (50 %) en volúmen, como solvente, y luego acumulados en una trampa iónica octupolar. Una vez allí, los iones son extraídos atravesando un selector de masas, el cual sólo permite el paso de los iones de interés a la celda QIT, para ser atrapados y termalizados por colisiones con el gas buffer (He), el cual se encuentra a una temperatura de 10 K, e irradiados por un láser sintonizable pulsado.

Debido a que la generación del complejo Cyt_2Ag^+ en fase gaseosa está favorecida termodinámicamente por encima de la formación del complejo CytAg^+ , la generación de este último se llevó a cabo a través de la fotodisociación del complejo Cyt_2Ag^+ por radiación UV de 273,4 nm, longitud de onda a la cual la eficiencia de fragmentación es máxima[106]. El complejo CytAg^+ obtenido fue luego re-aislado por remoción de Cyt_2Ag^+ remanente (y otros productos de fragmentación) de la celda QIT, mediante la excitación resonante del movimiento axial con la ayuda de un generador de Radio Frecuencia (RF) dipolar auxiliar. El segundo láser fue disparado \approx 60 ms después del *láser 1* para permitir el completo enfriamiento del ión CytAg^+ por colisiones con el gas buffer. Por su parte, los complejos CytNa^+ y CytK^+ fueron generados directamente en la fuente ESI y aislados, como se detalló previamente, para su estudio.

Una vez producida la fotofragmentación de los iones, los fragmentos y el ión padre remanente son extraídos hacia un espectrómetro de masas por TOF y detectados por un MCP (Z-Gap, Jordan TOF, Inc.). La eficiencia de fotofragmentación de cada fragmento detectado es normalizada por la señal del ión padre y la potencia del láser, y luego graficada en función a la energía

del fotón.

Para la generación y estudio espectroscópico del complejo CytAg^+ se utilizaron dos láseres OPO (EKSPLA) operando a 10 Hz, ambos bombeados por láseres pulsados de Nd:YAG, con anchos de pulso de 10 ns y resolución espectral de 10 cm^{-1} . En el caso de los complejos CytNa^+ y CytK^+ , se utilizó un láser OPO de picosegundos (EKSPLA PG 411) con una resolución de 8 cm^{-1} , bombeado por un láser de Nd:YAG (EKSPLA) con 16 ps de ancho de pulso, o la salida de un láser de colorante doblado en frecuencia (Quantel TDL 90) con resolución espectral de $0,2 \text{ cm}^{-1}$ y bombeado por un láser pulsado de Nd:YAG (EKSPLA) de 10 ns de ancho de pulso. En todos los casos los láseres de fragmentación fueron operados a 10 Hz, y disparados al menos 40 ms luego de la entrada de los iones a la celda QIT a fin de asegurar el enfriamiento completo de los iones y el bombeo del gas buffer.

Las geometrías de equilibrio y las frecuencias vibracionales de los complejos en los estados fundamental y excitado fueron calculadas con el paquete TURBOMOLE (v6.6)[120], al nivel de teoría *coupled-cluster* utilizando la aproximación *Split-Component Scaling* (SCS-CC2)[121] y haciendo uso de la resolución de la identidad[122] para la evaluación de las integrales electrón-repulsión. Se utilizó el conjunto de bases de Karlsruhe Def2-SVPD[123] en todos los casos. En particular, la aproximación del SCS fue aplicada debido a que mejora la exactitud de los cálculos por CC2 que involucren estados de transferencia de carga[124].

Los espectros electrónicos con resolución vibracional fueron simulados con el paquete PGOPHER[125] haciendo uso de las frecuencias calculadas para los estados fundamental y excitado. Éstos cálculos se realizaron considerando una temperatura vibracional y rotacional de 0 K y utilizando una convolución de funciones gaussianas con ancho a media altura (FWHM, del acrónimo en inglés) de 8 cm^{-1} .

Para la estimación de los tiempos de vida de los estados excitados, las

transiciones vibrónicas en los espectros de fotofragmentación de los complejos CytNa^+ y CytK^+ fueron ajustados a funciones lorentzianas utilizando el programa de análisis OriginLab[126].

3.3. Resultados

3.3.1. Espectroscopía del Complejo CytAg^+

Como se detalló previamente, el complejo CytAg^+ fue obtenido por fotofragmentación del complejo Cyt_2Ag^+ en la trampa iónica QIT, con el láser de disociación (*láser 1*, de ahora en más) sintonizado a 273,4 nm (4,54 eV), donde se encuentra el máximo de la banda de absorción de este complejo[106].

La Figura 3.1a muestra el espectro de masas luego del re-aislamiento del complejo CytAg^+ , con el *láser 1* (273,4 nm) encendido, donde se pueden observar cantidades remanentes de Ag^+ , como consecuencia de la disociación de Cyt_2Ag^+ . El láser de fragmentación (*láser 2*, de ahora en más) es disparado 60 ms más tarde que el *láser 1* para permitir el enfriamiento del complejo CytAg^+ por colisiones con el gas buffer, y producir la fotofragmentación del complejo CytAg^+ (Figura 3.1b). La sustracción del espectro de masas con ambos *láser 1* y *láser 2* encendidos (Figura 3.1b) menos el espectro de masas con sólo *láser 1* encendido (Figura 3.1a) se muestra en la (Figura 3.1c). Aquí se observa la aparición de una señal a $m/z = 111$, correspondiente al fragmento Cyt^+ , y la correspondiente disminución de la señal del ión padre CytAg^+ .

El *láser 2* fue continuamente sintonizado en el intervalo 31500 - 35300 cm^{-1} (3,90 - 4,38 eV), con el objetivo de obtener el espectro de fotofragmentación del complejo CytAg^+ . La Figura 3.2 muestra el espectro, normalizado por la intensidad del ión padre y la potencia del láser. La primera banda de absorción observada comienza a $\approx 31700 \text{ cm}^{-1}$ (3,93 eV).

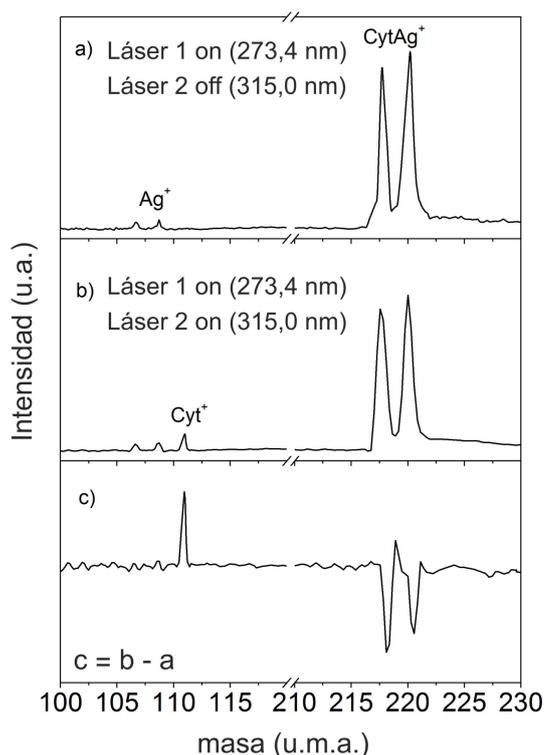


FIGURA 3.1: Espectros de masas obtenidos bajo distintas condiciones. (a) Luego de la fotólisis del complejo Cyt_2Ag^+ con el *láser 1* sintonizado a 273,4 nm (4,54 eV) y re-aislamiento del complejo CytAg^+ . (b) Luego de la fotofragmentación del complejo CytAg^+ con el *láser 2* sintonizado a 315,0 nm (3,94 eV). (c) Resultado de la sustracción de (b) menos (a), donde se observa la disminución de la señal del ión padre CytAg^+ y el aumento de la señal del fotoproducto Cyt^+ . Las señales observadas a $m/z = 107$ y 109 en (a) y (b) corresponden a la distribución isotópica de iones Ag^+ remanentes, debido a que su intensidad no es afectada por el proceso de fotofragmentación del *láser 2*. Los picos observados a $m/z = 218$ y 220 corresponden a la distribución isotópica de CytAg^+ .

El recuadro de la Figura 3.2 muestra esta banda registrada con mayor resolución. Se puede notar una estructura vibracional compleja, con progresiones de $\approx 50 \text{ cm}^{-1}$, aunque su estructura dificulta la determinación precisa de la transición 0_0^0 . También se observa una segunda banda de absorción que comienza a $\approx 34850 \text{ cm}^{-1}$ (4,32 eV) de mayor intensidad que la primera banda.

Lo más inesperado de este resultado es que la fotofragmentación del complejo CytAg^+ lleva a la generación de Cyt^+ y Ag como productos, a diferencia de lo que ocurre cuando la fragmentación del complejo ocurre en

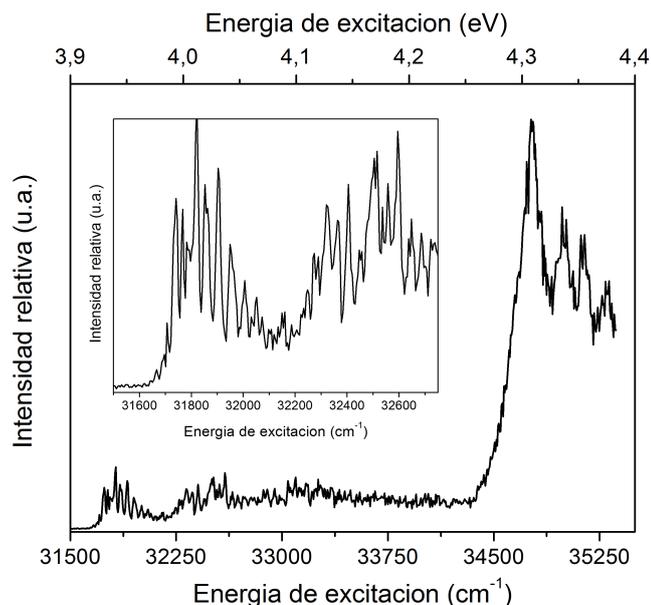


FIGURA 3.2: Espectro de fotofragmentación del complejo CytAg^+ en la región espectral $31500 - 35000 \text{ cm}^{-1}$ ($3,90 - 4,34 \text{ eV}$), obtenido siguiendo la señal de masa del fragmento Cyt^+ . El recuadro interior muestra la banda de absorción de más baja energía, en la región $31500 - 32750 \text{ cm}^{-1}$, obtenida con mayor resolución.

el estado fundamental, por medio de Disociación Multifotónica IR (IRMPD, del acrónimo en inglés), la cual conduce a la pérdida del fragmento neutro HNCO como principal canal de fragmentación[114]. Este resultado sugiere que el estado excitado alcanzado corresponde a un estado de transferencia de carga (TC) que involucra la promoción de un electrón de la Cyt a la Ag^+ con la subsiguiente fragmentación.

Para obtener más información acerca de la estructura y dinámica del estado excitado en este sistema, se optimizaron las geometrías del estado fundamental y excitado. La estructura del estado fundamental del complejo fue previamente determinada por Pino y colaboradores[114], combinando experimentos de espectroscopía IRMPD junto con cálculos a nivel de teoría DFT/B3LYP. En concordancia con estos resultados, se encontró que la estructura más estable es una estructura plana (simetría C_s) con la molécula de Cyt en su forma tautomérica ceto-amino, en la cual el catión Ag^+ interacciona simultáneamente con N_3 y O_7 (Figura 3.3). Esta estructura

también fue observada en complejos CytM^+ , con $M : \text{Li, Na, K, Cs y Rb}$, por Rodgers y colaboradores[127, 128]. De acuerdo a lo informado previamente, la población de otros tautómeros de más alta energía fue considerada despreciable[114, 127, 128].

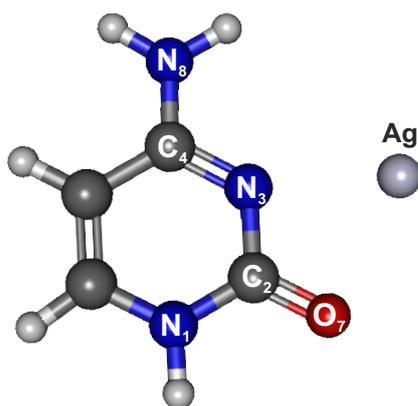


FIGURA 3.3: Estructura más estable del complejo CytAg^+ con numeración de átomos pesados

Se encontró que la estructura en el estado excitado de este complejo también es plana con simetría C_s como se muestra en la parte superior de la Figura 3.4. En la Tabla 3.2 se muestran las energías de transición verticales (E_v) y adiabáticas (E_{ad}) calculadas para este complejo, en comparación con la transición experimental 0_0^0 , junto con la fuerza del oscilador para cada transición. En relación a lo observado experimentalmente, los primeros dos estados excitados en este

complejo corresponden a estados TC en los cuales un electrón de un orbital n_{N3} o n_{O7} localizado en la molécula de Cyt es transferido a un orbital tipo σ^* localizado en la Ag. La Figura 3.4 muestra los orbitales moleculares involucrados en la transición $n_O - \sigma^*$ al primer estado excitado. El tercer estado excitado S_3 , corresponde a una transición $\pi - \pi^*$ localizada sobre la molécula de Cyt, como se observa en la Figura 3.4. El siguiente estado de TC encontrado en el complejo corresponde a una transición $\pi - \sigma^*$ a 5,56 eV. Sin embargo, la baja fuerza del oscilador (OS, por su acrónimo en inglés) para esta transición ($3,7 \times 10^{-5}$) sugiere que no es posible alcanzarlo ópticamente.

Las E_{ad} calculadas para los estados excitados S_1 y S_3 son 3,98 eV y 4,39 eV, respectivamente, en buena concordancia con las energías de las bandas de absorción observadas experimentalmente a 3,93 eV y 4,32 eV, sugiriendo que estos son los estados electrónicos excitados ópticamente. En todos los casos las E_{ad} fueron corregidas por la diferencia entre la energía del punto

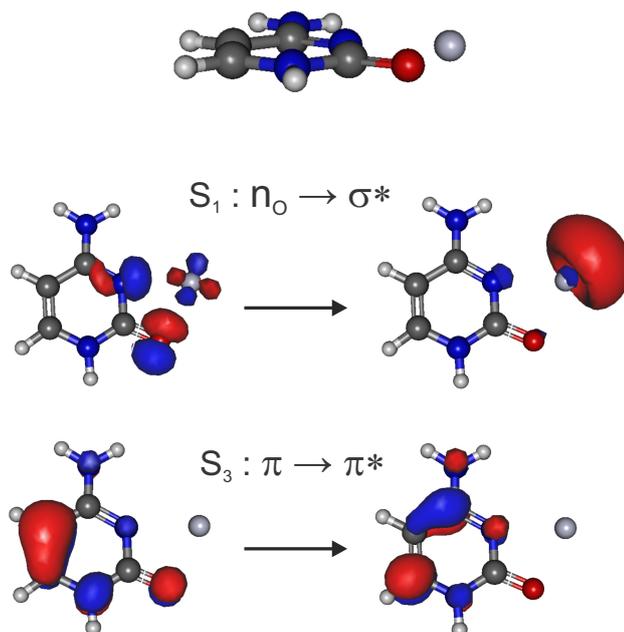


FIGURA 3.4: Estructuras optimizadas de los estados excitados S_1 y S_3 y los OMs involucrados en los estados excitados de interés del complejo CytAg^+ .

TABLA 3.1: Energías de transición verticales (E_v) y adiabáticas (E_{ad}) para los estados más relevantes, y sus respectivas fuerzas del oscilador (OS) para el complejo CytAg^+ calculados al nivel de teoría SCS-CC2/Def2-SVPD. Los valores de las transiciones experimentales se muestran en paréntesis y negrita a modo de comparación.

Complejo	Estado	E_v	E_{ad}	OS
CytAg^+	S_1 ($n_O\sigma^*$)	4,15	3,98 (3,93)	0,0077
	S_2 ($n_N\sigma^*$)	4,84	-	0,0079
	S_3 ($\pi\pi^*$)	4,89	4,39 (4,32)	0,0909
	S_7 ($\pi\sigma^*$)	5,56	-	$3,7 \times 10^{-5}$

Las E_{ad} fueron corregidas por la diferencia de energía de punto cero (ΔZPE) entre los estados involucrados. Todas las energía se informan en eV.

cerro del estado fundamental y del estado excitado (ΔZPE). El fragmento observado luego de la excitación UV, en todo el intervalo de trabajo, fue Cyt^+ , incluso por encima de 4,30 eV correspondiente a la excitación del estado $\pi\pi^*$, en el cual se esperaría que el fragmento sea Ag^+ . Esto sugiere que la conversión interna desde el estado $\pi\pi^*$ al estado TC S_1 , es ultrarrápida, llevando finalmente a la disociación del complejo en este estado y generando Cyt^+ y Ag como productos.

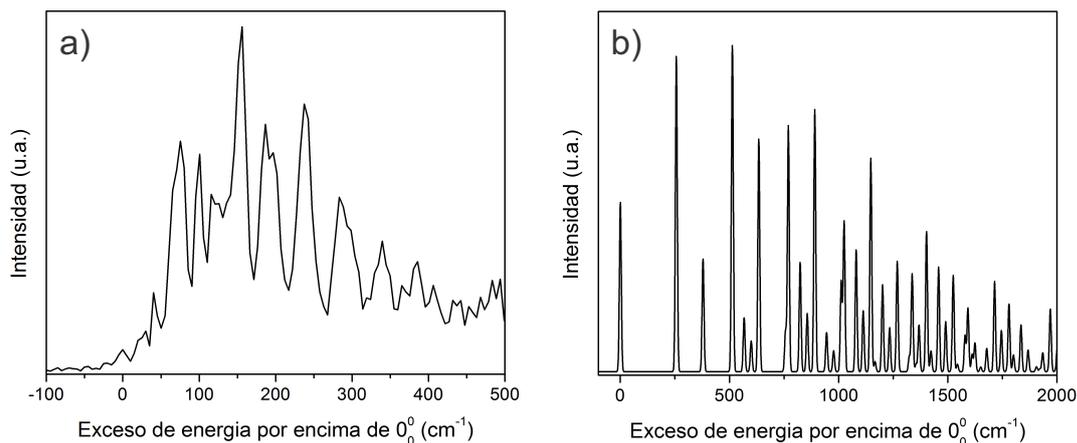


FIGURA 3.5: (a) Espectro de fotofragmentación experimental en la región de la primera banda de transferencia de carga y (b) la simulación de Franck-Condon del espectro vibrónico del complejo CytAg^+ . La energía se expresa como exceso de energía por sobre la transición 0_0^0 .

TABLA 3.2: Energías de transición verticales (E_v) y adiabáticas (E_{ad}) para los estados más relevantes, y sus respectivas fuerzas del oscilador (OS) para el complejo CytAg^+ calculados al nivel de teoría SCS-CC2/Def2-SVPD. Los valores de las transiciones experimentales se muestran en paréntesis y negrita a modo de comparación.

Complejo	Estado	E_v	E_{ad}	OS
CytAg^+	S_1 ($n_O\sigma^*$)	4,15	3,98 (3,93)	0,0077
	S_2 ($n_N\sigma^*$)	4,84	-	0,0079
	S_3 ($\pi\pi^*$)	4,89	4,39 (4,32)	0,0909
	S_7 ($\pi\sigma^*$)	5,56	-	$3,7 \times 10^{-5}$
CytNa^+	S_1 ($\pi\pi^*$)	4,95	4,31 (4,34)	0,0940
	S_4 ($\pi\sigma^*$)	6,45	-	0,0025
	S_{11} ($n_O\sigma^*$)	7,36	-	0,0529
	S_{12} ($n_N\sigma^*$)	7,81	-	0,1296
CytK^+	S_1 ($\pi\pi^*$)	4,93	4,25 (4,30)	0,0859
	S_4 ($\pi\sigma^*$)	6,46	-	0,0019
	S_{11} ($n_N\sigma^*$)	7,28	-	0,0578
	S_{12} ($n_O\sigma^*$)	7,70	-	0,0784

Las E_{ad} fueron corregidas por la diferencia de energía de punto cero (ΔZPE) entre los estados involucrados. Todas las energía se informan en eV.

Se calcularon las frecuencias del estado fundamental y primer estado excitado con el objetivo de obtener más información sobre la primera banda de transferencia de carga. La Figura 3.5 muestra en (b) el espectro vibrónico obtenido a partir de la simulación de Franck-Condon en comparación con

(a) el espectro de fotofragmentación experimental. Las energías se expresan como exceso respecto a la transición 0_0^0 . Como se mencionó previamente, la estructura vibracional de la primera banda de transferencia de carga dificulta la determinación de la transición 0_0^0 . Se puede observar que la simulación del espectro vibrónico no reproduce el espectro experimental. Debido a que el primer estado excitado $n_O\sigma^*$ mantiene la simetría plana Cs del estado fundamental, por reglas de selección sólo están permitidas transiciones vibrónicas de modos *en-el-plano* en combinación con transiciones vibrónicas de modos de torsión *fuera-del-plano* con número par de cuantos de energía vibracional. Esta restricción de simetría conduce a la simulación de un espectro vibrónico *simple* hasta $\approx 1000 \text{ cm}^{-1}$ por encima de la transición 0_0^0 , en desacuerdo con lo encontrado experimentalmente, donde se observa un espectro complejo con progresiones de $\approx 50 \text{ cm}^{-1}$. En el espectro simulado se observa un conjunto denso de transiciones, similar al mostrado en el espectro experimental, a energía superiores a 1000 cm^{-1} por encima de la transición 0_0^0 . Esto sugiere que la transición 0_0^0 del estado TC S_1 ($n_O\sigma^*$) podría encontrarse $\approx 1000 \text{ cm}^{-1}$ por debajo de la primera transición observada en el espectro experimental y que esta última corresponde al umbral de fragmentación del complejo en el estado excitado. Por tanto, al excitar al complejo con energía menor al límite de disociación, si bien se alcanza ópticamente el estado S_1 , no se generan los fragmentos Cyt⁺ y Ag, y por consiguiente no se observa la transición.

Esta energía umbral para la disociación del complejo en Cyt⁺ y Ag (E_u) se puede aproximar conociendo la energía de enlace del complejo CytAg⁺ en el estado fundamental ($E_b(S_0)$), y los potenciales de ionización de la Cyt (PI_{Cyt}) y de la Ag (PI_{Ag}), de la forma:

$$E_u \geq E_b(S_0) + PI_{Cyt} - PI_{Ag} \quad (3.1)$$

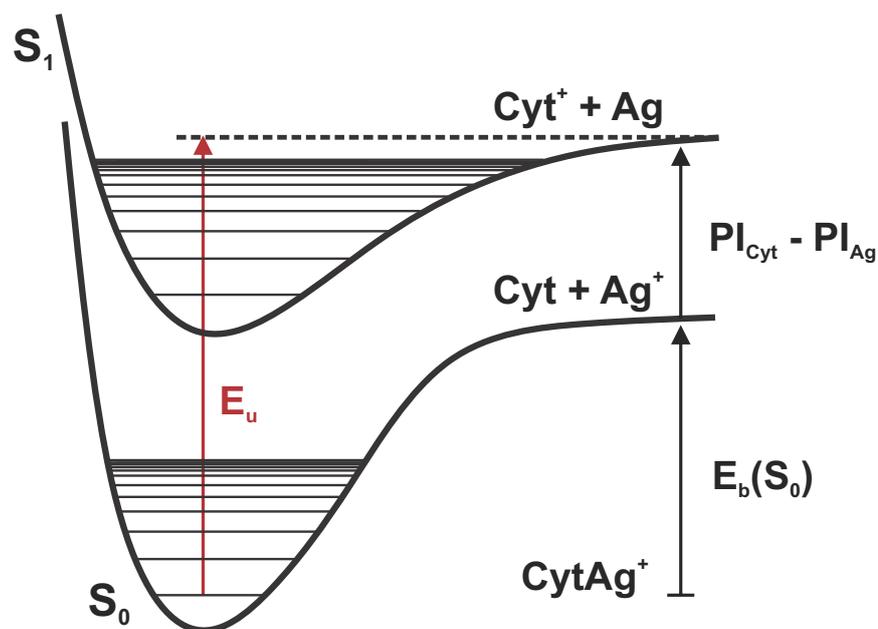


FIGURA 3.6: Esquema representativo de la energía umbral (E_u) para el proceso de disociación del complejo CytAg^+ en Cyt^+ y Ag , según la ecuación 3.1.

A partir los valores de $E_b(S_0) = 2,86 \text{ eV}$ [114], $PI_{\text{Cyt}} = 8,73 \text{ eV}$ [129] y $PI_{\text{Ag}} = 7,58 \text{ eV}$ [130] se obtiene un valor de $E_u = 4,01 \text{ eV}$ estimado a partir de la ecuación 3.1, en buen acuerdo con la energía de la primera transición observada experimentalmente (3,93 eV).

3.3.2. Espectroscopía de los Complejos CytNa^+ y CytK^+

A diferencia de lo discutido en la sección anterior, la fotoexcitación UV de los complejos CytNa^+ y CytK^+ resulta en la generación de Cyt neutra (la cual no es detectable por esta metodología experimental) y el correspondiente ión metálico Na^+ y K^+ con $m/z = 23$ y 39 , respectivamente. Es necesario notar que Na^+ y K^+ fueron los únicos fragmentos observados luego de la irradiación láser y no se encontraron indicios de la presencia de fragmentos iónicos de Cyt bajo las condiciones experimentales de trabajo. Este resultado se contrapone a lo encontrado para el complejo CytAg^+ , en el cual el primer estado excitado es un estado de TC, cuya excitación conduce a la formación del fragmento Cyt^+ [131]. Sin embargo, los resultados

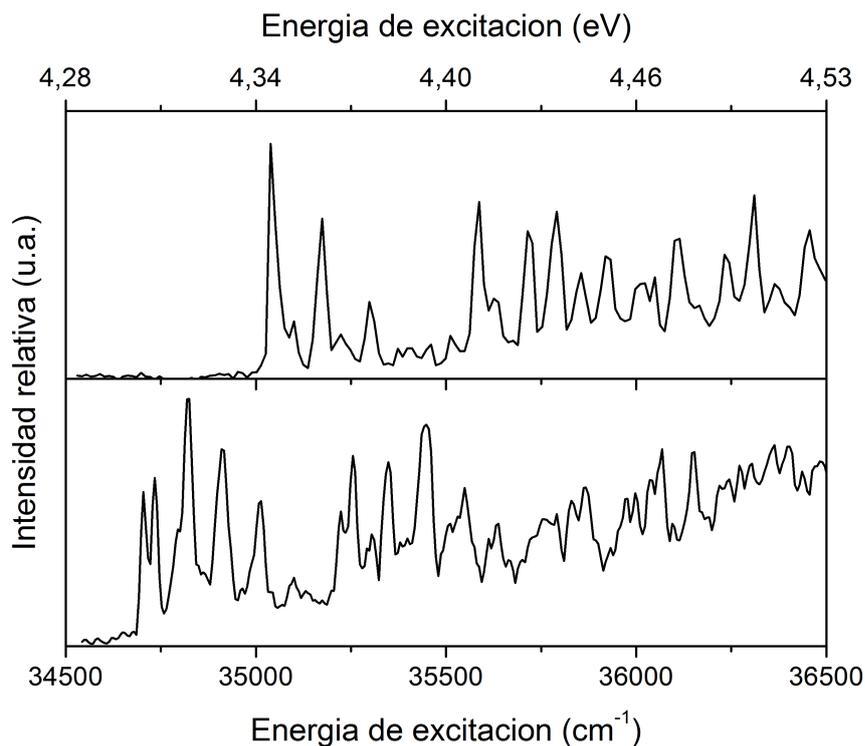


FIGURA 3.7: Espectros de fotofragmentación UV de los complejos CytNa⁺ (a) y CytK⁺ (b), obtenidos siguiendo la intensidad del canal de fragmentación M⁺, normalizado por la potencia del láser y la señal del ión padre, en función de la energía del láser.

obtenidos para los complejos CytNa⁺ y CytK⁺ son consistentes con lo encontrado por Rodgers y colaboradores sobre su fragmentación en el estado fundamental mediante experimentos de IRMPD[128].

La Figura 3.7 muestra los espectros de fotofragmentación UV con resolución vibracional, en un intervalo espectral de 34500 - 36500 cm⁻¹ (4,28 - 4,53 eV). En ambos casos los espectros fueron obtenidos siguiendo el canal de fragmentación M⁺, con M : Na y K. A energías de excitación por encima de 36500 cm⁻¹ los espectros son poco resueltos y exhiben una banda de absorción ancha que decae en intensidad hasta ≈ 40000 cm⁻¹ (≈ 5 eV).

La transición 0_0^0 del complejo CytNa⁺ se observa a 35028 cm⁻¹ (4,34 eV), la cual es además la transición de mayor intensidad. Esto sugiere un buen solapamiento entre las funciones de onda de los estados fundamental y excitado, y por tanto, gran similitud entre las estructuras de equilibrio de los

estados involucrados. Para el complejo CytK^+ , la transición 0_0^0 se observa a 34707 cm^{-1} (4,30 eV), y a diferencia del complejo CytNa^+ , esta transición no es la transición vibrónica de mayor intensidad, sugiriendo una mayor diferencia entre las geometrías de equilibrios de los estados fundamental y excitado, que en el caso del complejo CytNa^+

A partir de cálculos teóricos se encontró que la estructura más estable en el estado fundamental para ambos complejos es plana con simetría C_s , conteniendo el tautómero ceto-amino de Cyt en el cual el metal interactúa simultáneamente con el oxígeno carbonílico O_7 y el nitrógeno N_3 (análogo a la estructura del complejo CytAg^+ , Fig. 3.3), en concordancia con lo reportado por Rodgers y colaboradores en trabajos previos[127, 128]. La optimización de la geometría del primer estado excitado, de carácter $\pi\pi^*$, también llevó a una estructura plana en los dos complejos. Sin embargo, ambos exhibieron dos frecuencias imaginarias indicando que esas estructuras no corresponden a un mínimo real en la superficie de energía potencial (SEP) del estado excitado. Los modos vibracionales asociados a estas frecuencias imaginarias corresponden a torsiones del grupo NH_2 y movimiento fuera del plano del catión metálico junto al anillo pirimidínico. La re-optimización de las estructuras comenzando desde una geometría ligeramente distorsionada a lo largo del movimiento fuera del plano del anillo pirimidínico finalmente condujo, en ambos casos, a un mínimo en la SEP del estado excitado. Las estructuras finales no poseen frecuencias imaginarias y exhiben al catión metálico ligeramente fuera del plano y una pequeña distorsión del grupo NH_2 (Figura 3.8).

Los parámetros estructurales más relevantes (distancias interatómicas y ángulos diedros) son reportados en la Tabla 3.3. Como se esperaba, en función a los espectros de fotofragmentación de ambos complejos (Fig. 3.7), se encontró una mayor distorsión geométrica entre el estado fundamental y el primer estado excitado para el complejo CytK^+ que para el complejo

TABLA 3.3: Distancias interatómicas (Å) y ángulos diedros (grados) relevantes de las estructuras optimizadas para los complejos CytM⁺ (M : Na, K) en el estado fundamental y primer estado excitado.

Parámetro	CytNa ⁺		CytK ⁺	
	S ₀ (Cs)	$\pi\pi^*$	S ₀ (Cs)	$\pi\pi^*$
N ₃ -M	2,47	2,35	2,87	2,74
O ₇ -M	2,23	2,37	2,56	2,74
O ₇ C ₂ N ₃ -M	0	-4	0	-7
H ₁ N ₈ C ₄ N ₃	0	36	0	41
H ₂ N ₈ C ₄ N ₃	0	15	0	15

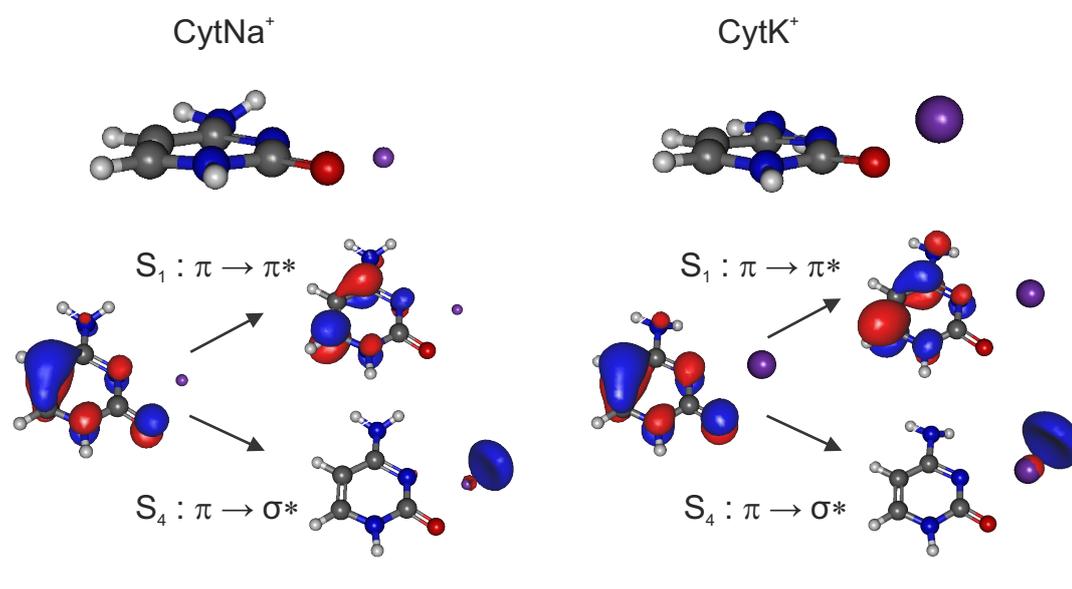


FIGURA 3.8: Estructuras optimizadas del primer estado excitado S₁ y los OMs involucrados en los estados excitados de interés de los complejos CytNa⁺ y CytK⁺.

CytNa⁺.

En la Tabla 3.4 se muestran las E_v y E_{ad} calculadas para los estados excitados más relevantes de ambos complejos y sus respectivas OS, en conjunto con la energía experimental de la transición 0_0^0 . En todos los casos las E_{ad} fueron corregidas por la diferencia entre la energía del punto cero del estado fundamental y del estado excitado (ΔZPE), permitiendo una comparación directa con las transiciones 0_0^0 experimentales. Como se puede observar, las energías adiabáticas calculadas para el primer estado excitado están en buena concordancia con el valor experimental de la transición 0_0^0

TABLA 3.4: Energías de transición verticales (E_v) y adiabáticas (E_{ad}) de los estados más relevantes, y sus respectivas fuerzas del oscilador (OS) para los complejos CytNa⁺ y CytK⁺ calculados al nivel de teoría SCS-CC2/Def2-SVPD. Los valores de las transiciones experimentales (**negrita**) se muestran en paréntesis a modo de comparación.

Complejo	Estado	E_v	E_{ad}	OS
CytNa ⁺	S ₁ ($\pi\pi^*$)	4,95	4,31 (4,34)	0,0940
	S ₄ ($\pi\sigma^*$)	6,45	-	0,0025
	S ₁₁ ($n_O\sigma^*$)	7,36	-	0,0529
	S ₁₂ ($n_N\sigma^*$)	7,81	-	0,1296
CytK ⁺	S ₁ ($\pi\sigma^*$)	4,93	4,25 (4,30)	0,0859
	S ₄ ($\pi\sigma^*$)	6,46	-	0,0019
	S ₁₁ ($n_N\sigma^*$)	7,28	-	0,0578
	S ₁₂ ($n_O\sigma^*$)	7,70	-	0,0784

Las E_{ad} fueron corregidas por la diferencia de energía de punto cero (ΔZPE) entre los estados involucrados. Todas las energía se reportan en eV.

para los dos complejos.

Se realizaron cálculos de frecuencias del estado fundamental y primer estado excitado de las geometrías de equilibrio para los complejos, a fin de simular los espectros vibrónicos. La Figura 3.9 muestra el espectro vibrónico obtenido de la simulación de Franck-Condon (rojo) en comparación con el espectro de fotofragmentación experimental (negro) para (a) CytNa⁺ y (b) CytK⁺. En los espectros simulados se muestra una asignación tentativa de las transiciones vibrónicas en cada complejo.

A su vez, los modos vibracionales involucrados en estas transiciones se muestran en la Figura 3.10.

En el caso del complejo CytNa⁺, una progresión *simple* se puede observar hasta $\approx 500 \text{ cm}^{-1}$ por encima de la transición 0_0^0 , en donde las transiciones de mayor intensidad corresponden a la excitación del modo ν_2 , el cual corresponde a distorsiones *fuera-del-plano*, con uno y dos cuantos de energía vibracional. Luego, una segunda progresión es observada a partir de la excitación del modo ν_{12} a 532 cm^{-1} , correspondiente a torsiones *en-el-plano*, por encima de la transición 0_0^0 , con una gran presencia de transiciones

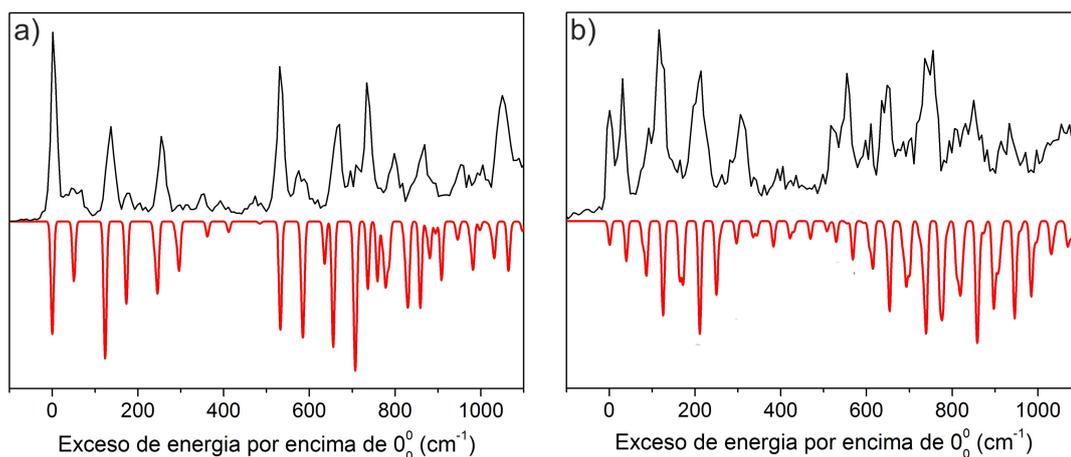


FIGURA 3.9: Comparación entre los espectros de fotofragmentación UV obtenidos experimentalmente (negro) y los espectros vibrónicos simulados (rojo) al nivel de teoría SCS-CC2/Def2-SVPD para los complejos (a) CytNa⁺ y (b) CytK⁺.

correspondiente a modos de combinación entre ν_{12} , ν_1 y ν_2 .

Para el complejo CytK⁺ el análisis es similar. Hasta $\approx 500 \text{ cm}^{-1}$ por encima de la transición 0_0^0 , las transiciones de mayor intensidad corresponden a la excitación de los modos ν_1 y ν_2 y una segunda progresión es observada a partir de la excitación del modo ν_{12} a 529 cm^{-1} , con transiciones correspondientes a modos de combinación con ν_1 y ν_2 .

En general, el espectro vibrónico simulado a este nivel de teoría reproduce satisfactoriamente el espectro experimental para ambos complejos, confirmando que el estado excitado localmente, de carácter $\pi\pi^*$, corresponde a la estructura ligeramente distorsionada fuera del plano, encontrada teóricamente.

Por otro lado, al hacer una mejor inspección a los espectros experimentales se observa que las transiciones son ligeramente más anchas que el ancho de banda del láser de picosegundos utilizado ($\text{FWHM} = 8 \text{ cm}^{-1}$), lo cual podría estar relacionado a la resolución espectral del sistema, o a un ensanchamiento homogéneo asociado a tiempos de vida cortos del estado excitado. Para obtener más información acerca del origen del ensanchamiento de las bandas observadas, se obtuvieron los primeros 650

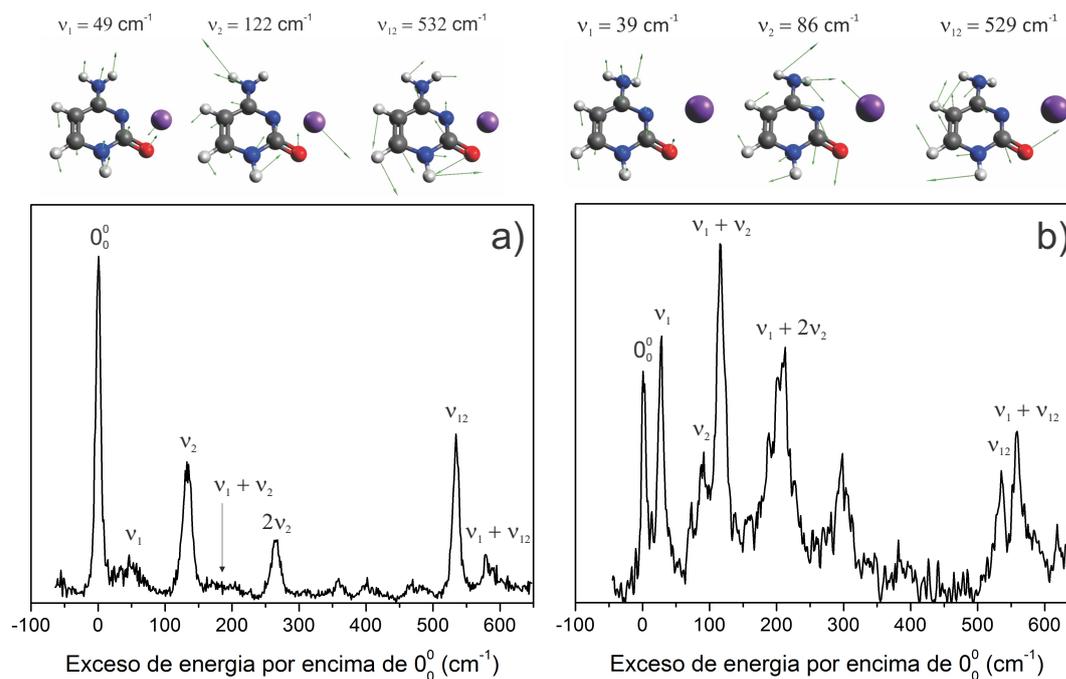


FIGURA 3.10: Asignación tentativa de modos vibracionales para las primeras transiciones vibrónicas activas hasta 650 cm^{-1} por encima de la energía de transición 0_0^0 para los complejos CytNa^+ (a) y CytK^+ (b), respectivamente.

cm^{-1} del espectro, por encima de la transición 0_0^0 , para CytNa^+ y CytK^+ , con un láser de colorantes de pulsos de 8 ns de duración y una resolución espectral de $0,2 \text{ cm}^{-1}$. La comparación entre los espectros obtenidos, para ambos complejos, con ambos láseres se muestra en la Figura 3.11.

Los espectros obtenidos para ambos complejos con el láser de alta resolución ($0,2 \text{ cm}^{-1}$, ns) exhiben anchos de banda similares a los obtenidos con el láser de resolución media ($8,0 \text{ cm}^{-1}$). Por otro lado, el ancho de banda para ambas transiciones 0_0^0 es mayor que el ensanchamiento debido al contorno rotacional a 20 K ($\text{RB} = 4 \text{ cm}^{-1}$, de su acrónimo en inglés) como es observado en sistemas con constantes rotacionales similares[132]. Esto indica que en ambos casos ocurre un ensanchamiento homogéneo debido al tiempo de vida del estado excitado de ambos complejos. Además, como se observa en la Figura 3.10 las transiciones vibrónicas se hacen más anchas cuando se excitan los modos vibracionales ν_1 y ν_2 , asociados a distorsiones *fuera-del-plano*. Como se comentó en la Sección 2, en condiciones de

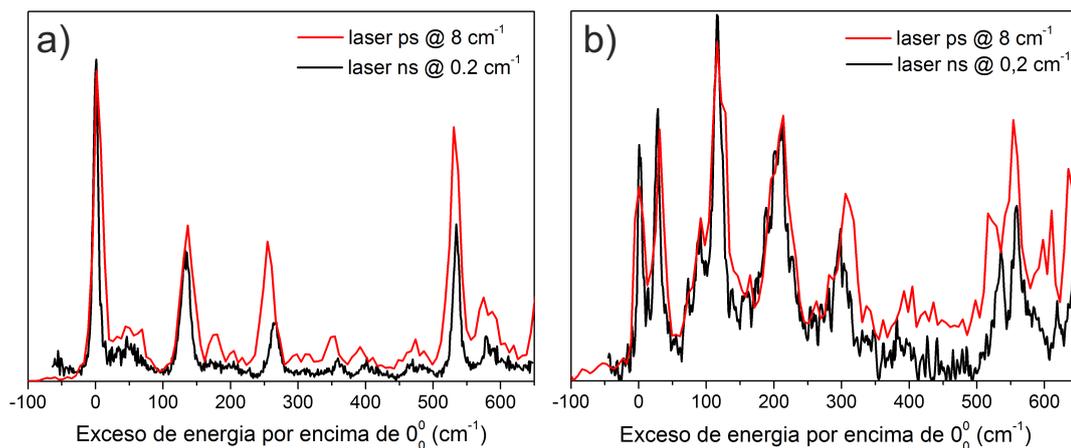


FIGURA 3.11: Comparación entre los espectros de fotofragmentación obtenidos con láseres UV de resolución media (8 cm^{-1} , ps) y resolución alta (0.2 cm^{-1} , ns), enfatizando el ensanchamiento homogéneo de las transiciones vibrónicas.

ensanchamiento natural (homogéneo), el ancho de la transición vibrónica está determinado por el tiempo de vida del estado excitado (LTB, por su acrónimo en inglés) y por el contorno rotacional (RB, por su acrónimo en inglés) a la temperatura de trabajo. Haciendo uso del principio de incertidumbre de Heisenberg, se obtiene que

$$\begin{aligned}
 FWHM &\geq LBT + RB \\
 FWHM &\geq \frac{1}{2\pi c\tau} + RB \\
 \tau &\geq \frac{1}{2\pi c(FWHM - RB)} \quad (3.2)
 \end{aligned}$$

En donde $FWHM$ corresponde al ancho a media altura (en cm^{-1}) de la función Lorentziana utilizada para ajustar la transición, c la velocidad de la luz en el vacío y τ al tiempo de vida del estado excitado.

La Tabla 3.5 muestra que τ en la transición 0_0^0 es $1,2 \pm 0,2$ ps y $1,3 \pm 0,2$ ps, para CytNa⁺ y CytK⁺, respectivamente, el cual se ve significativamente reducido luego de la excitación de los modos vibracionales ν_1 y ν_2 , correspondientes a distorsiones *fuera-del-plano*. Es importante notar que en ambos complejos CytNa⁺ y CytK⁺ no se observa ensanchamiento, en

comparación a la transición 0_0^0 , cuando se excita el modo vibracional ν_{12} , que corresponde a distorsiones *en-el-plano*, a 532 cm^{-1} y 529 cm^{-1} , respectivamente. Los tiempos de vida cortos del estado excitado, estimados para estos complejos, en conjunto con la especificidad de los modos correspondientes a distorsiones *fuera-del-plano* sugieren fuertemente que el principal mecanismo de desactivación del estado excitado ocurre por conversión interna al estado fundamental, puesto que los movimientos *fuera-del-plano* acoplan ambos estados electrónicos, como fue previamente observado en sistemas similares[116, 133-137]. Por lo tanto, el estado fundamental es poblado eficientemente en unos pocos ps y seguido por la rápida disociación a Cyt y M^+ como productos.

TABLA 3.5: Ensanchamiento por tiempo de vida (LBT en cm^{-1} de diferentes transiciones relevantes en los complejos CytNa^+ y CytK^+ y el tiempo de vida del estado excitado (τ) para cada transición calculado a partir de la ecuación 3.2.

CytNa^+			CytK^+		
Modo	LBT(cm^{-1})	$\tau(\text{ps})$	Modo	LBT(cm^{-1})	$\tau(\text{ps})$
0_0^0	$4,5 \pm 0,2$	1,2	0_0^0	$4,0 \pm 0,2$	1,3
$\nu_1(49 \text{ cm}^{-1})$	12 ± 1	0,4	$\nu_1(39 \text{ cm}^{-1})$	$6,1 \pm 0,2$	0,8
$\nu_2(122 \text{ cm}^{-1})$	$6,8 \pm 0,2$	0,8	$\nu_2(85 \text{ cm}^{-1})$	$5,7 \pm 0,2$	0,8
$2\nu_2$	$6,7 \pm 0,2$	0,8	$\nu_1 + 2\nu_2$	$9,0 \pm 0,5$	0,6
$\nu_{12}(532 \text{ cm}^{-1})$	$4,9 \pm 0,2$	1,1	$\nu_{12}(529 \text{ cm}^{-1})$	$4,1 \pm 0,2$	1,3
$\nu_1 + \nu_{12}$	$6,5 \pm 0,2$	0,8	$\nu_1 + \nu_{12}$	$6,5 \pm 0,2$	0,8

Como se discutió en la sección anterior, el primer estado excitado para el complejo CytAg^+ es un estado TC ($n_O\sigma^*$) en el cual un electrón en un orbital n_O del O_3 de la Cyt es promovido a un orbital σ^* localizado en la región del catión Ag^+ (Tabla 3.2). En cambio, para los complejos CytNa^+ y CytK^+ , el primer estado excitado corresponde a una transición $\pi - \pi^*$, y en consecuencia, el electrón permanece sobre la molécula de Cyt. Para estos dos complejos, el primer estado TC que involucra la transferencia de un electrón desde la Cyt a Na^+/K^+ es el estado excitado S_4 ($\pi\sigma^*$) localizado $\approx 1.5 \text{ eV}$ por encima del estado $\pi\pi^*$. Los otros dos estados TC con configuraciones

TABLA 3.6: Energías umbral para el canal de fotofragmentación del estado de TC (E_u) para los complejos CytM^+ (M : Na y K), calculados según la Ecuación 3.1, potenciales de ionización de los átomos metálicos (PI_M) y energía de enlace de los complejos en el estado fundamental ($E_b(S_0)$).

Complejo	PI_M	$E_b(S_0)$	E_u
CytNa^+	5,14 ^a	2,23 ^b	5,82
CytK^+	4,34 ^a	1,67 ^b	6,07
CytAg^+	7,58 ^a	2,86 ^c	4,01

Todos los valores son informados en eV. ^aRef. [130], ^bRef. [128], ^cRef. [114]

electrónicas $n_O\sigma^*$ y $n_N\sigma^*$ se encuentran incluso a mayores energías (Tabla 3.4).

De la misma forma que para el complejo CytAg^+ , la energía para alcanzar el umbral (E_u) de disociación en el estado de transferencia de carga se puede aproximar conociendo $E_b(S_0)$, PI_M y PI_{Cyt} según la Ecuación 3.1. La Tabla 3.5 muestra las E_u estimadas para los complejos CytNa^+ y CytK^+ , junto con lo obtenido para CytAg^+ , a modo de comparación. Se puede observar que las E_u estimadas son ≈ 2 eV mayores que el correspondiente valor para el complejo CytAg^+ como consecuencia, principalmente, de un menor potencial de ionización para Na y K en comparación a Ag. Por este motivo, en los complejos CytNa^+ y CytK^+ el estado TC es *movido* por encima del estado $\pi\pi^*$, a energías mayores que el intervalo de energías de excitación exploradas en este trabajo.

3.4. Conclusiones Parciales

En esta sección se mostraron los resultados sobre la espectroscopía de complejos CytM^+ , con M : Na, K y Ag, mediante experimentos de fotofragmentación UV en fase gaseosa y cálculos teóricos del estado excitado. Se encontraron diferencias remarcables en relación a la naturaleza

de los estados excitados del complejo CytAg^+ en comparación a los complejos con metales alcalinos CytNa^+ y CytK^+ .

La principal diferencia observada entre los complejos es el patrón de fragmentación en todo el intervalo de energías utilizadas en este trabajo (4,3 - 5,8 eV). Luego de la excitación, los complejos CytNa^+ y CytK^+ se disocian a Cyt neutra y Na^+ y K^+ , respectivamente, mientras que el complejo CytAg^+ se fragmenta siguiendo el canal de disociación por TC a Cyt^+ y Ag neutra, incluso a bajas energías de excitación ($\approx 3,9$ eV). Esto se debe a que el primer estado excitado S_1 en el complejo CytAg^+ corresponde a un estado de transferencia de carga en el cual un electrón ubicado en la región de la Cyt se promueve a Ag^+ . En cambio, en los complejos CytNa^+ y CytK^+ el primer estado excitado S_1 corresponde a una transición $\pi - \pi^*$. El estado TC que podría llevar a la generación de Cyt^+ y Na o K como productos, se encuentra ≈ 2 eV por encima de la máxima energía de excitación utilizada en este trabajo. Esto sugiere que en los complejos CytNa^+ y CytK^+ , se excita ópticamente el estado S_1 ($\pi\pi^*$), que luego por conversión interna al estado fundamental se fragmentan en Cyt y Na^+ o K^+ .

La importancia de estos resultados radica en la influencia de la identidad del metal en la estructura electrónica de los complejos. La alta afinidad entre Ag y Cyt, como también la alta energía de ionización del metal, en comparación a Na o K hacen que el estado de transferencia de carga se encuentre a energías relativamente bajas. Estos resultados pueden ser el fundamento de la respuesta de emisión común en los sistemas híbridos ADN- Ag_n y puede tener su base en el estado de transferencia de carga observado para el complejo CytAg^+ . Si bien los sistemas estudiados en esta sección corresponden a la mínima *porción* de estudio de estos sistemas, los resultados podrían ser la base para entender la fotofísica que gobierna a estos complejos.

Además, la influencia de la identidad del metal en la estructura

electrónica podría ser clave en la síntesis racional de nanoclústeres metálicos hibridados con cadenas ADN para su posible aplicación en nanociencia.

Capítulo 4

Dinámica Cuántica en Complejos

ADN- A_{g_n}

4.1. Introducción

Como se discutió previamente, la incorporación de pares de bases mediadas por metales ha probado ser una herramienta poderosa para el potencial desarrollo de dispositivos artificiales basados en ADN[23, 138, 139]. En este sentido, la generación de clústeres híbridos ADN- Ag_n fluorescentes y sintonizables en un amplio rango espectral son de principal interés en este campo. Las propiedades ópticas de estos sistemas híbridos, las cuales son fuertemente dependientes de factores como la secuencia de bases[140-142], tamaño del clúster[45] pH,[108], temperatura[143], etc, han llevado a la creación de una nueva generación de fluoróforos pequeños y biocompatibles como marcadores biológicos que exceden a los comúnmente utilizados *quantum dots* semiconductores o colorantes orgánicos[140, 144].

Como se comentó en la Introducción de esta tesis doctoral, recientemente Gwinn y colaboradores han aportado una importante contribución hacia el entendimiento de cómo la interacción metal-ADN determina la estructura del clúster y su respuesta espectroscópica mediante la purificación y caracterización de clústeres híbridos ADN- Ag_n seleccionados a partir de HPLC acoplado a ESI-MS[52]. Los autores aportan evidencia experimental y teórica que apunta a una estructura de clústeres ADN- Ag_n en donde un clúster metálico de Ag_n en forma de nanocable se produce entre hebras de ADN, con cationes Ag^+ actuando como *puentes de enlace* entre la base y el cable metálico. Además, el número de átomos de Ag que forman el nanocable metálico está directamente relacionado con el *color* del clúster, es decir, su longitud de onda de emisión[52]. La idea basada en clústeres ADN- Ag_n con estructura en forma de nanocable fue empleada con éxito para explicar los resultados experimentales relacionando, a partir de distintas técnicas espectroscópicas y espectrometría de masas, el número de átomos de Ag en el clúster neutro del cable metálico y sus propiedades

ópticas [45, 50, 52].

En particular, estos clústeres híbridos ADN- Ag_n poseen dos bandas de absorción características. Una de ellas, en el rango visible, es sintonizable con la secuencia de bases de ADN y/o el número de átomos de Ag del cable metálico. La otra banda de absorción, en la región UV, es común a todos los clústeres ADN- Ag_n , independientemente de la posición de la banda en el visible y la secuencia de bases utilizada, y corresponde a la excitación de las bases del ADN[47, 107, 108, 140].

En relación a esto, Gwinn y colaboradores demostraron que la excitación de la banda UV común en estos sistemas lleva a la misma respuesta de fluorescencia que si se excita la banda sintonizable en el visible[47], sugiriendo un fuerte acoplamiento electrónico entre los estados excitados del ADN y el clúster metálico de Ag. Esta propiedad sería de gran utilidad a la hora de desarrollar nanodispositivos, ya que permitiría el uso de una sola fuente de excitación UV para todos los sistemas, obteniendo un espectro de emisión sintonizable. Como se detalló en el capítulo anterior, se observó un proceso de transferencia de carga (TC) desde la Citosina (Cyt) hacia el catión Ag^+ para el complejo más simple $CytAg^+$ en fase gaseosa, luego de la excitación UV, pudiendo ser esta la base del acoplamiento electrónico entre las dos regiones.

El diseño racional de clústeres híbridos ADN- Ag_n para las aplicaciones mencionadas requiere entonces un completo entendimiento de cómo la interacción metal-ADN determina las propiedades ópticas del sistema. Con este fin, esta sección pretende dar una imagen dinámica de los procesos de excitación en clústeres ADN- Ag_n mediante simulaciones de dinámica molecular (DM) y dinámica electrónica, utilizando los códigos DFBT+ y KRONOS. Esta metodología fue utilizada exitosamente por el grupo de trabajo para el entendimiento de la dinámica electrónica en sistemas complejos, a través del cálculo de propiedades relevantes dependientes del

tiempo, como son la población de orbitales moleculares o cargas atómicas[89-91, 93-95].

4.2. Sistema Teórico

La elección de un sistema representativo de la estructura *real* de los complejos ADN-Ag_n es de suma importancia a la hora de contrastar con resultados experimentales. Sin embargo, un estudio mediante una estrategia del tipo *bottom-up*, en donde la complejidad del sistema aumenta en dirección hacia la simulación del sistema *real*, permite un mejor entendimiento de los mecanismos involucrados. A partir de esto, dos modelos con distinto grado de complejidad fueron estudiados mediante esta metodología. Las bases para la elección de estos modelos se detalla a continuación.

4.2.1. Elección de los sistemas modelos

Primero, en la búsqueda de una representación *reduccionista* del sistema *real* se generó una estructura en donde el par de bases mediado por metal Cyt-Ag-Cyt, con orientación cisoid/transoid, se replica siguiendo las características estructurales de la doble hélice del ADN (distancia base-base en el plano longitudinal y rotación de los pares de bases en el plano transversal). Esta elección se basa en estudios previos reportados en bibliografía sobre la interacción Cyt-Ag en fase condensada[12, 145-147], y por espectrometría de masas acoplada a espectroscopía infrarroja en fase gaseosa[105]. Todos estos reportes están en concordancia con el hecho de que el catión Ag⁺ interacciona de manera simultánea con dos moléculas de Cyt, resultando en una estructura Cyt-Ag⁺-Cyt en donde el catión se encuentra entre los N₃ de cada base. En este contexto, el par de base cisoid/transoid *motif* mediada por Ag es una estructura modelo plausible

en base a estos resultados. En cuanto al número de moléculas de Cyt a emplear, Gwinn y colaboradores estudiaron recientemente la interacción específica de cationes Ag^+ con hebras de Ade, Cyt, Gua y Tym con diferente número de bases[145]. Los autores encontraron que las hebras de Cyt_6 formaban complejos de simple hebra, con tres cationes Ag^+ a partir de la generación de un *loop* en un extremo, como también de doble hebra, con seis iones Ag^+ . De esta forma, la elección de dos simples hebras de seis Cyt, unidas por seis cationes Ag^+ para el modelo reduccionista, es una suposición razonable para estudiar las propiedades de este sistema. También fueron evaluadas la influencia del *backbone* del ADN y el ruido térmico en las propiedades fotofísicas de los sistemas.

El segundo modelo utilizado, de mayor complejidad, se basa en estudios realizados recientemente por Gwinn y colaboradores[45]. Los autores afirman que los clústeres híbridos ADN- Ag_n fluorescentes presentan *números mágicos* de átomos neutros de Ag en el cable metálico, los cuales están relacionados con *colores mágicos* en la emisión fluorescente de estos compuestos. Los *números mágicos* de átomos neutros de Ag reportados para clústeres ADN- Ag_n que emiten por debajo de 800 nm son 4 y 6, con emisiones a ≈ 540 nm y ≈ 630 nm, respectivamente. Además, estas estructuras son acompañadas de *números no mágicos* de cationes Ag^+ , es decir que el número de Ag^+ no tendría influencia sobre la fotofísica del sistema. A partir de esto, la elección los modelos utilizados, en donde un nanocable de 4 (*green*) y 6 (*red*) átomos de Ag en forma de zig-zag se *enlaza* mediante cationes Ag^+ a dobles hebras de 3 y 4 Cyt, respectivamente, hace referencia a la mínima estructura posible conteniendo *números mágicos* de átomos de Ag neutros, con la estructura *zig-zag* propuesta por los autores.

Vale aclarar que a pesar de toda la información teórica y experimental reportada en bibliografía todavía no existe una caracterización estructural fidedigna de estos clústeres híbridos ADN- Ag_n . A partir de esto no es posible

descartar la existencia de estructuras con distinto número de coordinación, conformación o estado de carga, que puedan influenciar en las propiedades fotofísicas de estos sistemas.

4.2.2. Metodología

Las estructuras analizadas en esta sección fueron generadas utilizando el paquete *Nucleic Acid Builder* (NAB)[148] en conjunto con el programa de visualización *Visual Molecular Dynamics* (VMD)[149]. En los casos en donde se requirieron simulaciones de dinámica molecular (modelos dpC₁₂Ag₆, *green* y *red*), éstas se realizaron con el programa *Large-Scale Atomic-Molecular Massively Parallel Simulator* (LAMMPS)[150, 151] en una caja cúbica de 60 Å de lado conteniendo agua explícita como solvente, y contraiones para neutralizar la carga del sistema. Para describir las interacciones del ADN, el potencial clásico *Charmm27*[152, 153] fue utilizado en todos los casos, mientras que las interacciones Ag-Ag y Ag-ADN fueron aproximadas usando parámetros reportados para Ag_n-piridina y sistemas conteniendo Zn[154, 155]. En este punto es necesario aclarar que si bien estos parámetros no describen de manera correcta la interacción Ag-Ag y Ag-ADN, las simulaciones de DM no buscan un fin predictivo en el sistema, sino generar estructuras con distintas conformaciones para tener en cuenta el *backbone* del ADN y ruido térmico en los cálculos de dinámica electrónica. Por este motivo ninguna conclusión es extraída de los resultados obtenidos de las simulaciones de DM. Los parámetros de *no-enlace* Ag-Ag y Ag-ADN fueron extraídos del trabajo de Vercauteren y colaboradores[156]. Este conjunto de parámetros ya fue utilizado previamente por Gwinn y colaboradores para simular de manera aproximada la estructura de pocos átomos de Ag embebidos en cadenas cortas de ADN[45].

En cuanto a la simulación, en todos los casos primero se realizó una

minimización de la energía del sistema completo, seguida de una corrida de 10 ns de duración a una temperatura de 300 K y volumen constante. Una vez estabilizadas las propiedades termodinámicas se extrajo posteriormente un ensamble de estructuras, equiespaciadas en el tiempo de simulación, y los resultados reportados como un promedio de dicho ensamble. Además de incluir el efecto del ruido térmico en el ADN y el cable metálico, esta estrategia permite tener en cuenta fluctuaciones en los parámetros estructurales (por ejemplo, distancias de enlace Ag-Ag y Ag-N₃ como ángulo y diedros entre el cable metálico y el ADN) en las propiedades fotofísicas estudiadas.

Los fundamentos básicos sobre la metodología empleada para estudiar las propiedades ópticas de estos sistemas ya fueron descritos en la sección 2. Brevemente, en una primera etapa la estructura electrónica en el estado fundamental se obtiene a partir del Hamiltoniano DFTB del sistema, utilizando el código de DFTB+, a partir del conjunto de parámetros DFTB *mio* 1.1[97]. Este conjunto de parámetros estándar *mio* fue extendido mediante cálculos a nivel DFT para incluir la interacción de la Ag con el resto de átomos que componen el conjunto.

Los espectros de absorción se obtuvieron aplicando al sistema una perturbación inicial de pulso, en forma de delta de Dirac, a la matriz densidad del estado fundamental. Luego, la evolución de la matriz densidad en el tiempo se calcula por integración de su ecuación de movimiento. En el régimen de respuesta lineal, el espectro de absorción se obtiene a partir de la deconvolución de la señal de momento dipolar de la excitación, luego de una transformada de Fourier.

Por último, con el fin de ganar información sobre la naturaleza de las transiciones electrónicas observadas en el espectro, se sintonizó una perturbación, consistente en un campo eléctrico sinusoidal dependiente del tiempo, con el máximo de absorción de la banda de interés, de forma que la

dirección de polarización del campo aplicado coincida con el vector dirección del momento dipolar de la transición. En estas condiciones de irradiación, a partir de la evolución de la matriz densidad, se pueden obtener la población de cada estado poblado y despoblado, producto de la irradiación, como también la carga de cada átomo del sistema, en función del tiempo.

4.3. Resultados

Los resultados de este Capítulo se dividen en dos secciones. Primero se analizan los resultados para el modelo reduccionista, en ausencia ($C_{12}Ag_6$) y presencia de *backbone* ($dpC_{12}Ag_6$), y variando la carga total del sistema ($C_{12}Ag_6 - [C_{12}Ag_6]^{6+}$). Luego los modelos *zig-zag* propuestos por Gwinn y colaboradores (*green* y *red*) son analizados en función de la carga total del sistema.

4.3.1. Sistema Modelo PolyC–Ag⁰: Una Primera Aproximación

Como se comentó previamente, en primer lugar una representación *reduccionista* del sistema *real* se generó replicando seis unidades del par de bases mediado por metal una Cyt-Ag-Cyt, con orientación cisoid, siguiendo la características estructurales de la doble hélice del ADN. La Figura 4.1a muestra la estructura ($C_{12}Ag_6$) obtenida luego de este procedimiento. La segunda estructura utilizada ($dpC_{12}Ag_6$) busca dar cuenta del efecto del *backbone* y el desorden estructural en la fotofísica del sistema. Con este objetivo, la estructura con el *backbone* fue explorada mediante una simulación de dinámica molecular *NVT*, de 10 ns de duración, del sistema embebido en H₂O como solvente y Na⁺ como contraiones, a una

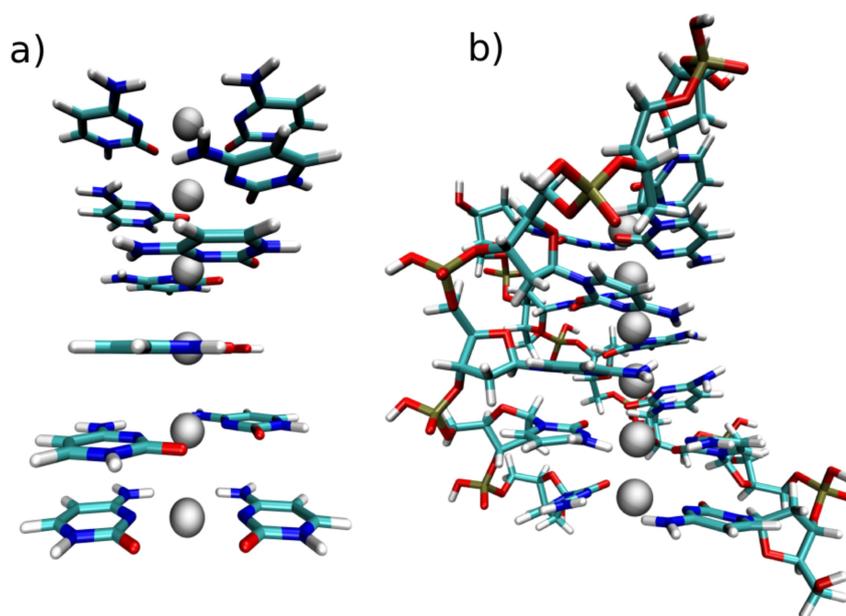


FIGURA 4.1: (a) Estructura modelo $C_{12}Ag_6$, obtenida por replicación de seis unidades de Cyt-Ag-Cyt con orientación cisoid, manteniendo los parámetros estructurales de la doble hélice de ADN tipo B. (b) Estructura representativa de $dpC_{12}Ag_6$ obtenida a los 5 ns de la simulación de dinámica molecular, considerando el *backbone* completo del ADN.

temperatura de 300 K. Luego, se seleccionó un ensamble de 20 estructuras, equiespaciadas en el tiempo de la simulación, para el posterior análisis. Los espectros de absorción y cargas en función del tiempo analizados para $dpC_{12}Ag_6$ se reportan como un promedio del ensamble de estructuras obtenidas. En el caso de la estructura electrónica y los orbitales moleculares, si bien todas las estructuras fueron analizadas, los resultados mostrados corresponden a una estructura representativa del conjunto. La Figura 4.1b muestra una estructura del sistema $dpC_{12}Ag_6$ extraída de la simulación de dinámica molecular.

Primero, la estructura electrónica de los complejos $C_{12}Ag_6$ y $dpC_{12}Ag_6$ se analizó mediante el cálculo de la densidad de estados (DOS) del sistema, las cuales se muestran en la Figura 4.2a y 4.2b, respectivamente. En todos los casos la energía de los estados fue referenciada en función a la energía de Fermi del sistema. En negro se muestra la DOS del sistema completo, y

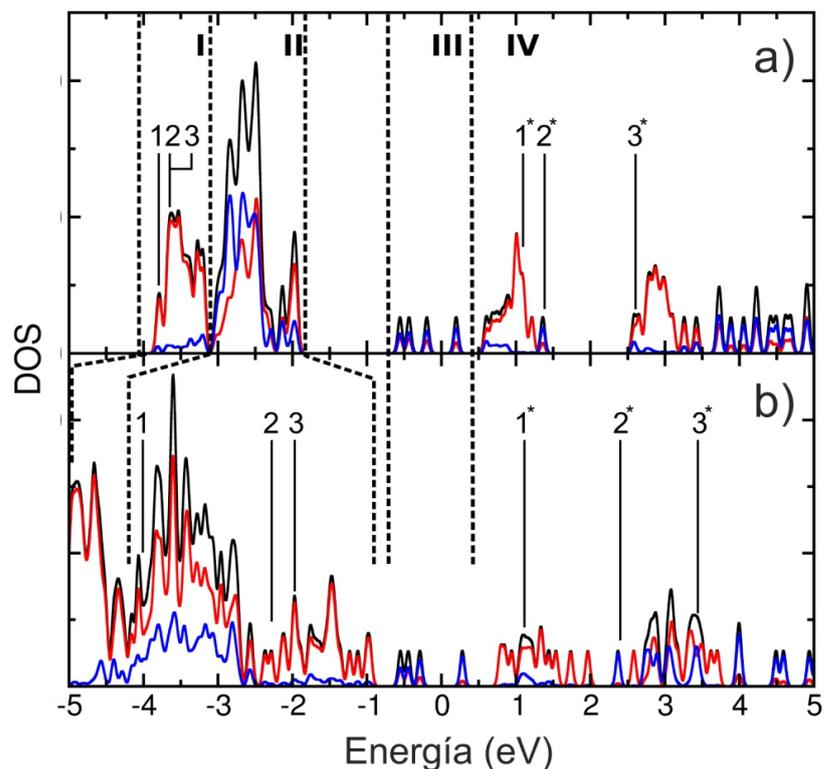


FIGURA 4.2: Estructura electrónica de $C_{12}Ag_6$ (a) y $dpC_{12}Ag_6$ (b), representada según su densidad de estados (DOS). Las líneas negra, roja y azul representan la DOS total del sistema y la DOS proyectada (PDOS) en las regiones de ADN y Ag, respectivamente.

en rojo y azul la DOS proyectada (PDOS) sobre las regiones de ADN y Ag, respectivamente.

A partir de la estructura electrónica del modelo $C_{12}Ag_6$ se pueden establecer cuatro zonas características distinguibles. Estas zonas se señalan en la Figura 4.2a con números romanos y se separan por líneas punteadas verticales. La primera zona (I) consiste en un conjunto de estados generados mayormente por estados con gran contribución del ADN y una contribución casi despreciable de la Ag. En cambio, la segunda zona (II) consiste en un amplio conjunto de estados donde ocurre una mezcla significativa entre estados del ADN y la Ag. La tercera zona (III) yace cerca de la energía de Fermi del sistema y consiste en una serie de cuatro grupos de estados angostos, tres de los cuales caen ligeramente por debajo de la

energía de Fermi, mientras que el cuarto cae por encima de ésta. Una característica importante a destacar es que los estados de esta zona, los cuales incluyen los orbitales HOMO y LUMO del sistema, se encuentran bien separados en energía del resto del conjunto de estados. Por último, en la cuarta zona (IV) se puede observar un conjunto grande de estados con alternancia en la contribución de ADN y Ag.

El mismo análisis se realizó para el sistema modelo $dpC_{12}Ag_6$ (Figura 4.2b) y revela que ni la presencia del *backbone*, ni el desorden estructural modifican significativamente las propiedades de las cuatro zonas distinguidas en el modelo $C_{12}Ag_6$. En particular, el grupo de estados cercanos a la energía de Fermi se mantiene prácticamente sin modificaciones. La mayor diferencia se observa en la zona II donde los estados, tanto del ADN como de la Ag, se expanden sobre un rango mayor de energía, pero las descripciones generales de las cuatro zonas se mantienen.

Con el fin de estudiar la fotofísica de estos sistemas, se calcularon los espectros de absorción de las estructuras consideradas siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 2. Los paneles a y b de la Figura 4.3 muestran en negro los espectros de absorción obtenidos para $C_{12}Ag_6$ y $dpC_{12}Ag_6$, respectivamente, y en rojo los correspondientes espectros de absorción de la región de ADN aislado para cada estructura. De aquí en adelante por *región* de ADN se entiende a cualquier átomo que no sea Ag, y *región* de Ag a todos los átomos de Ag del clúster metálico. Vale recordar que el espectro de absorción para el modelo $dpC_{12}Ag_6$ mostrado en la Figura 4.3b corresponde al espectro de absorción promedio obtenido a partir del ensamble de estructuras extraídas de la dinámica molecular.

Varios puntos importantes de la Figura 4.3 son importantes de destacar. Primero, los espectros calculados para las regiones de ADN, con y sin la presencia del *backbone*, presentan una intensa banda de absorción a ≈ 5 eV y

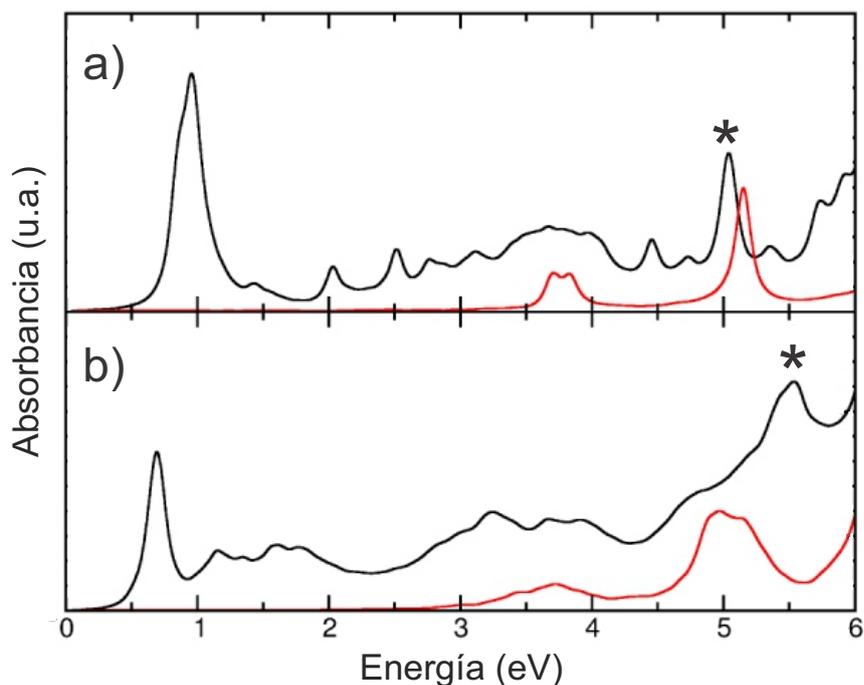


FIGURA 4.3: En línea negra se muestran los espectros de absorción calculados para $C_{12}Ag_6$ (a) y $dpC_{12}Ag_6$ (b), este último como promedio de espectros de absorción del ensamble de estructuras extraídas de la dinámica molecular. En línea roja, los espectros de absorción de la región de ADN aislado de cada estructura. Las energía de excitación empleadas para perturbar el sistema se marcan con un asterisco en cada caso.

otra de menor intensidad a ≈ 3.5 eV. Esto se encuentra en concordancia con resultados experimentales y teóricos que muestran que el espectro de absorción del ADN presenta una banda intensa alrededor de 4.5 - 5.0 eV, atribuida a la transición $\pi\pi^*$ de las bases[47], y una segunda banda de baja intensidad alrededor de 3.5 - 4.0 eV, la cual usualmente no se observa experimentalmente[157, 158]. Además, estudios en bibliografía sobre los clústeres ADN- Ag_n muestran que, luego de la síntesis química, la energía de la banda de absorción en la región UV no experimenta grandes corrimientos, mientras que aparecen nuevas bandas en la región visible del espectro[47, 50, 52]. Como se observa en la Figura 4.3a y b, los resultados obtenidos a partir de las simulaciones están en concordancia con las observaciones experimentales, dado que la banda de absorción UV sufre sólo un pequeño corrimiento cuando la estructura completa (y no sólo la

región del ADN) es considerada para ambos clústeres $C_{12}Ag_6$ y $dpC_{12}Ag_6$. Por otro lado, en las Figuras 4.3a y 4.3b se observa que tanto para $C_{12}Ag_6$ como para $dpC_{12}Ag_6$ aparece una banda de absorción intensa, a bajas energías (≈ 1 eV), observada previamente en estudios experimentales[52] y asignada tentativamente a la excitación longitudinal del nanocable metálico Ag_n . Además, la energía de esta banda está en concordancia con las predicciones de TD-DFT para la excitación del plasmón longitudinal en nanocables desnudos de Ag[54, 159, 160].

Para obtener más información acerca de la naturaleza de la banda de absorción UV y los orbitales moleculares involucrados en la excitación, se sintonizó un campo eléctrico sinusoidal dependiente del tiempo con el máximo de absorción de la banda en la región UV de cada espectro, para ambos clústeres $C_{12}Ag_6$ y $dpC_{12}Ag_6$. Como se comentó previamente, la dirección de polarización del campo fue elegida de tal forma que coincidiera con la dirección de momento dipolar de la transición, a la energía de la banda, para cada estructura[92]. En el caso de $C_{12}Ag_6$, la energía de excitación fue sintonizada a 5.04 eV, señalada con un asterísco en la Figura 4.3a, mientras que para $dpC_{12}Ag_6$, la energía de excitación se sintonizó al máximo de la banda de absorción UV para cada una de las estructuras del ensamble. En la Figura 4.3b se marca también con un asterísco, esquemáticamente, la posición del máximo de la banda de absorción para el promedio del ensamble.

El análisis de la población de los orbitales moleculares en función del tiempo permite determinar qué orbitales moleculares están involucrados en la excitación óptica. La Figura 4.4 muestra los orbitales poblados (N^*) y des poblados (N) más relevantes durante el proceso de irradiación para ambos modelos $C_{12}Ag_6$ y $dpC_{12}Ag_6$. La posición en energía de estos orbitales, en relación a la energía de Fermi del sistema, se marca en la estructura electrónica (DOS) de cada modelo con la misma representación

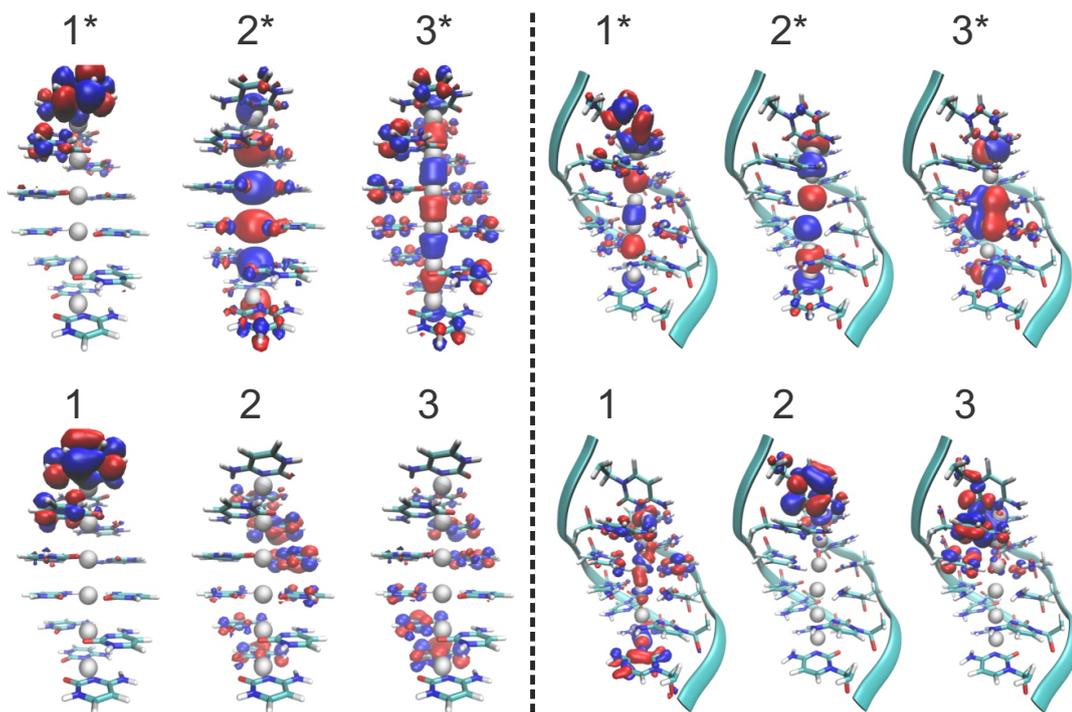


FIGURA 4.4: Orbitales moleculares poblados (N^*) y des poblados (N) durante el proceso de irradiación para los modelos $C_{12}Ag_6$ (izquierda) y $dpC_{12}Ag_6$ (derecha), respectivamente, a las energías de excitación marcadas en la Figura 4.3.

(Figura 4.2).

Se puede observar que para el modelo $C_{12}Ag_6$ los orbitales moleculares des poblados (1, 2 y 3) corresponden a orbitales π de las bases del ADN, sin contribución de orbitales de la Ag. En concordancia, la Figura 4.2 muestra que estos estados forman parte de la zona I, por lo que tienen una contribución despreciable de estados provenientes de la Ag. En cuanto a los estados poblados, el estado 1^* corresponde a un estado π localizado principalmente en el ADN, el cual es encontrado en la zona IV de la Figura 4.2a, también con contribución despreciable de estados de la Ag. Si bien este resultado puede llevar a la interpretación de que la transición UV en estos sistemas corresponde a una excitación $\pi\pi^*$ pura de las bases del ADN, se puede observar que los orbitales poblados 2^* y 3^* corresponden a estados deslocalizados con una significativa contribución de la Ag. Esto también es corroborado en la Figura 4.2a, donde se observa que estos orbitales tienen

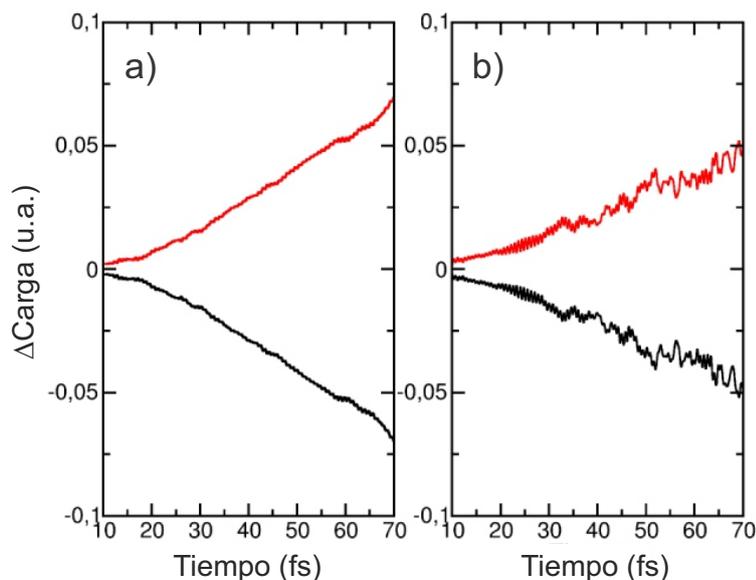


FIGURA 4.5: Diferencia de cargas atómica de Mulliken dependientes del tiempo con respecto al estado fundamental (ΔCarga). Los paneles a y b muestran los resultados obtenidos para C_{12}Ag_6 y $\text{dpC}_{12}\text{Ag}_6$, respectivamente. Los (ΔCarga) de las regiones del ADN y la Ag se muestran en rojo y negro, respectivamente.

una gran contribución de estados provenientes de la Ag.

Con el fin de explorar la dinámica de carga durante el proceso de irradiación, se calculó la diferencia de cargas atómicas de Mulliken con respecto a las cargas del estado fundamental (ΔCarga), en función del tiempo, para las regiones del ADN y la Ag. La Figura 4.5a muestra en rojo y negro la ΔCarga obtenida para ADN y Ag del modelo C_{12}Ag_6 , respectivamente.

Se puede observar una transferencia de carga neta desde la región de ADN hacia la región de la Ag cuando se excita la banda en el UV, a pesar del hecho de que este proceso no corresponde a la excitación de un estado de transferencia de carga, como se analizó a partir de los orbitales moleculares involucrados. Este resultado indica que los mecanismos fotofísicos inducidos luego de la excitación UV en el modelo C_{12}Ag_6 involucran un proceso de transferencia de carga *lento* desde el ADN hacia la Ag. El término *lento* se toma aquí en comparación a lo que sería una excitación vertical

hacia un estado electrónico excitado; el proceso de transferencia de carga observado es de hecho ultrarrápido y ocurre como consecuencia de la evolución temporal del paquete de onda excitado.

Las conclusiones generales obtenidas para el sistema C₁₂Ag₆ permanecen esencialmente inalteradas cuando se considera la estructura con el *backbone* (dpC₁₂Ag₆). Como se puede observar en la Figura 4.4 y 4.2b, todos los orbitales despoblados durante el proceso de irradiación presentan un cierto grado de mezcla entre los estados del ADN y la Ag. El orbital 1 presenta una deslocalización en los átomos de Ag, mientras que los orbitales 2 y 3 corresponden a orbitales π de la base de ADN, con una pequeña y localizada contribución de orbitales d de la Ag. En cuanto a los orbitales poblados, el orbital 1* presenta un carácter π predominante con una buena contribución de estados deslocalizados de la Ag, mientras que los orbitales 2* y 3* poseen una predominante contribución de estados deslocalizados de la Ag con muy poca contribución de estados del ADN.

La dinámica de carga durante el proceso de irradiación para dpC₁₂Ag₆ (Figura 4.5b) también muestra un proceso de transferencia de carga *lento* desde el ADN hacia la Ag luego de la irradiación UV, sugiriendo que ni la presencia del *backbone* ni el desorden estructural evitan que ocurra este proceso.

Debido a que la banda de absorción UV en el modelo dpC₁₂Ag₆ es particularmente ancha, se analizó la dependencia del proceso de transferencia de carga en función de la energía de irradiación para una estructura del ensamble. Las energías utilizadas se marcan en el espectro de absorción de la Figura 4.6 (panel izquierdo) con asteriscos. En el panel derecho se puede observar que en todos los casos se reproduce el comportamiento de las cargas en función del tiempo, indicando que este proceso es robusto en cuanto a la energía utilizada y está presente en *toda* la banda de absorción UV.

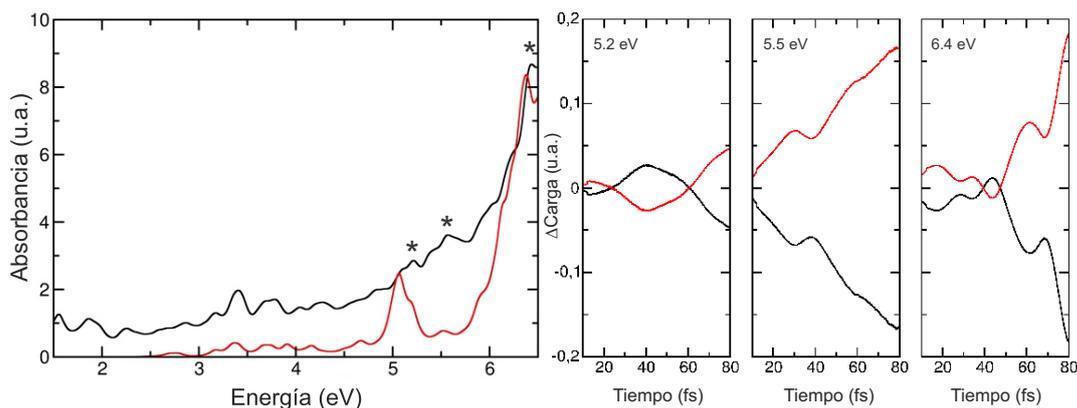


FIGURA 4.6: (Izquierda) Espectros de absorción del sistema completo (negro) y la región de ADN (rojo) de una estructura obtenida a partir de la dinámica molecular para el modelo $dpC_{12}Ag_6$. (Derecha) Diferencia de carga (Δ Carga) con respecto al estado fundamental luego de irradiación de luz para las regiones de Ag (negro) y ADN (rojo), a varias energías de excitación para la estructura seleccionada. Las energías de irradiación se indican con asteriscos en el espectro de absorción, y en la parte superior izquierda en cada panel.

Los resultados presentados hasta aquí muestran que la excitación de la banda UV en los modelos analizados genera una promoción de electrones desde estados pertenecientes a la zona I (Figura 4.2), mayormente orbitales π de la base del ADN, hacia estados de la zona IV, con contribución de orbitales de la Ag. Teniendo en cuenta que la banda visible de los complejos ADN- Ag_n que se observa experimentalmente ha sido atribuida a la excitación longitudinal del cable metálico[52], el proceso de transferencia de carga reportado aquí puede ser fundamental para el entendimiento de la fluorescencia común observada experimentalmente cuando se excitan tanto la banda en el UV como la banda en el visible. Como muestra la Figura 4.2a y 4.2b, los orbitales poblados luego de la irradiación presentan una gran deslocalización en la dirección longitudinal del nanocable metálico y tienen gran parecido a los orbitales involucrados en la transición longitudinal HOMO - LUMO de nanocables de Ag aislados, reportados previamente[160].

Para confirmar esta hipótesis, la energía de excitación se sintonizó con la banda de absorción más intensa en el visible (≈ 1 eV) para cada estructura.

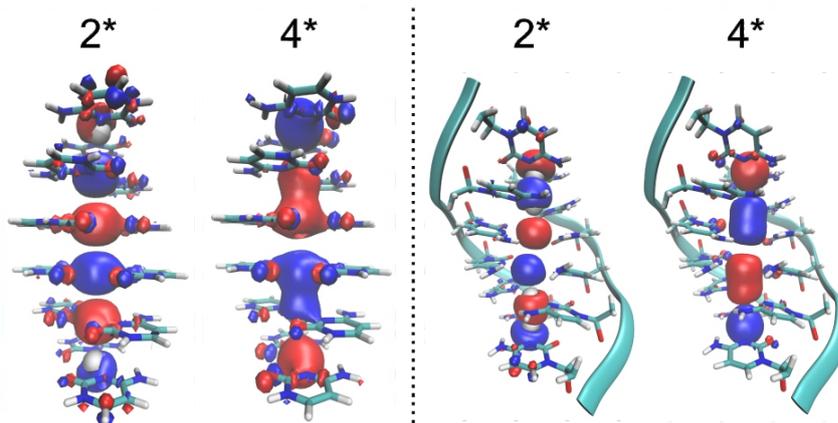


FIGURA 4.7: Orbitales moleculares poblados luego de irradiar la banda más intensa de baja energía (≈ 1 eV) para $C_{12}Ag_6$ (a) y $dpC_{12}Ag_6$ (b).

El análisis de población de orbitales moleculares muestra que los orbitales poblados más relevantes luego de la irradiación corresponden al orbital 2^* , identificado como uno de los *receptores* de la excitación electrónica al irradiar la banda de absorción UV, y el orbital 4^* , que es de hecho el orbital LUMO del nanocable de Ag aislado (Figura 4.7).

A partir de estos resultados se propone que el proceso de transferencia de carga observado provee un posible camino mecánico que explica la relación entre las dos bandas características en estos sistemas. Si bien no es posible obtener información acerca de los procesos de fluorescencia a partir de la metodología utilizada, los electrones promovidos a orbitales en la región IV, con gran contribución de la Ag, deben encontrar un mecanismo de relajación hacia el conjunto de orbitales ocupados de menor energía. Este mecanismo puede darse a través de la emisión de fonones, por conexión directa con los estados de menor energía, es decir, vía intersecciones cónicas, o por fluorescencia. En este sentido, la presencia de estados virtualmente aislados de la Ag en la región III, separados en energía y electrónicamente desacoplados del grupo I, desde donde los electrones son promovidos, y del grupo IV, hasta donde son promovidos, genera una especie de *gap* similar a los encontrados en los *quantum dots* semiconductores. Estos estados pueden

ser importantes para entender la causa de la fluorescencia en estos sistemas. Además provee un indicio de por qué se obtienen clústeres fluorescentes cuando se utiliza Ag como metal mediador de las bases, y no con otro metal.

Es importante resaltar algunas notas finales acerca de la robustez de los resultados obtenidos con respecto a parámetros estructurales. Las propiedades fotofísicas observadas para los modelos $C_{12}Ag_6$ y $dpC_{12}Ag_6$ son cualitativamente similares debido a que el origen del proceso de transferencia de carga se basa en el escenario electrónico analizado mediante la DOS. La similitud entre las estructuras electrónicas de los modelos (Figura 4.2a y 4.2b) da indicio de que el factor determinante en la conformación de la estructura electrónica de estos sistemas es la interacción entre los estados de la Ag y los estados provenientes de las bases del ADN, sin importar la presencia de estados del *backbone* ni el desorden estructural. Es importante volver a destacar que el propósito de la comparación entre los modelos $C_{12}Ag_6$ y $dpC_{12}Ag_6$ no busca obtener información estructural sino sólo analizar la influencia del desorden y el ruido térmico sobre las propiedades fotofísicas y el proceso de transferencia de carga.

Como se mencionó previamente, la elección de los modelos considerados se basó en la información experimental disponible sobre la interacción *motif* Cyt-Ag[12, 146, 147]. Sin embargo, trabajos recientes sugieren que en este tipo de sistemas el par de bases de ADN no conserva la orientación paralela tradicional sino que interactúa con una estructura *motif* paralela, posibilitando una interacción transoid en el par C_2Ag [105, 145, 161, 162], el cual se encontraría estabilizado por la formación de puentes hidrógenos.

Por esto motivo, también se evaluó el efecto de la isomerización cisoid/transoid del enlace glicosídico en las propiedades fotofísicas. Para esto, se utilizó el modelo estructural sin el *backbone* de ADN generando una doble hebra con estructuras transoid Cyt-Ag-Cyt de manera similar a la estructura cisoid ya descrita. Los resultados obtenidos se muestran en la

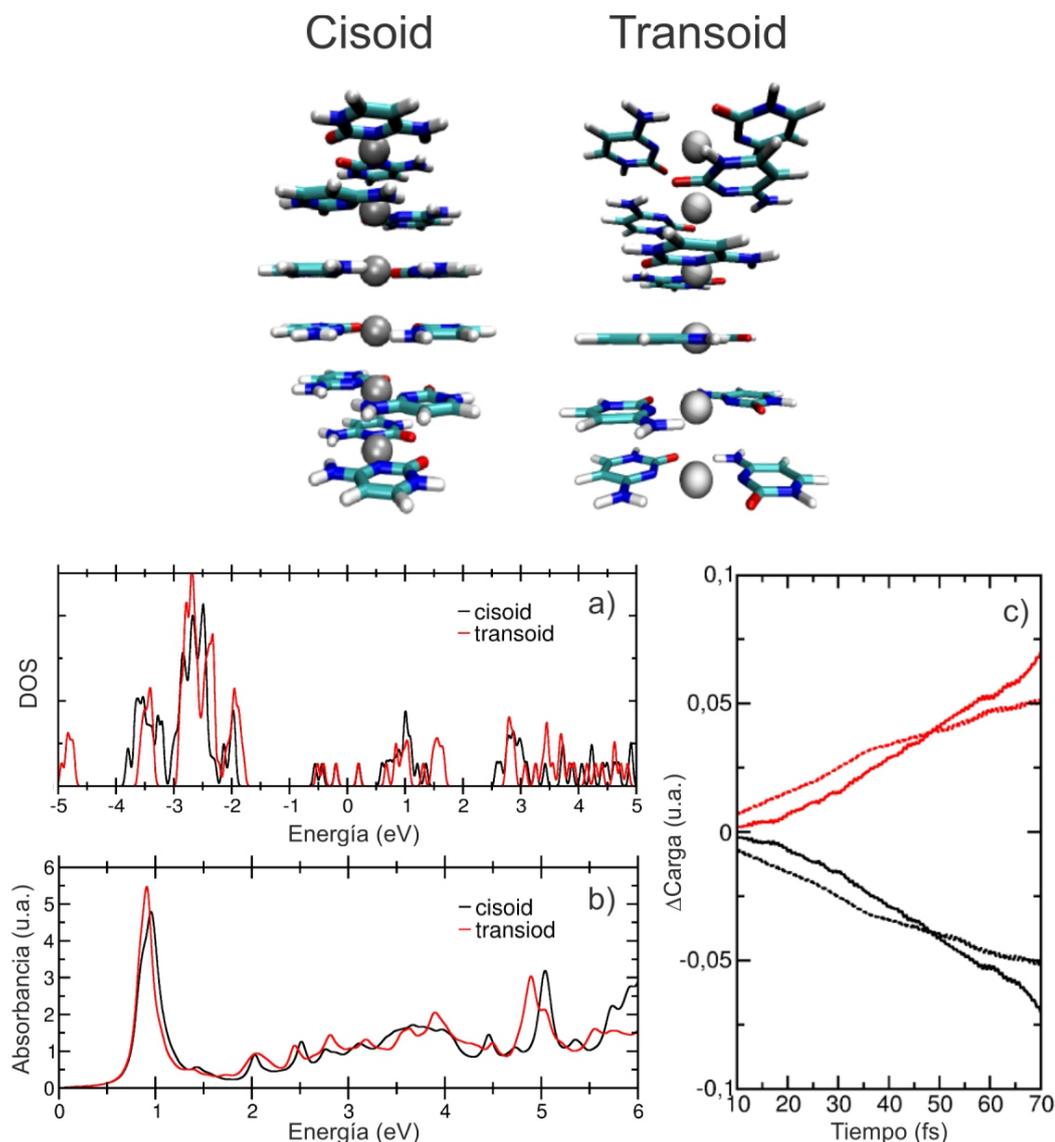


FIGURA 4.8: (a) Representación de estructuras, (b) DOS, (c) espectros de absorción y (d) proceso de transferencia de carga para las estructuras cisoid/transoid. En (d), en rojo y negro los Δ Carga para las regiones de ADN y Ag, respectivamente. La línea continua representa la estructura cisoid, mientras que la punteada la estructura transoid.

Figura 4.8 en comparación a los resultados ya presentados del isómero cisoid. Como se puede observar, ni la estructura electrónica del sistema, ni los espectros de absorción o los procesos de transferencia de carga son cualitativamente alterados por la isomería cisoid/transoid.

4.3.2. Modelos $C_{12}Ag_6$ y $[C_{12}Ag_6]^{6+}$: Influencia de la Carga

En la sección anterior se utilizaron los modelos $C_{12}Ag_6$ y $dpC_{12}Ag_6$, para describir las propiedades ópticas de estos sistemas. La fotodinámica luego de la irradiación de luz mostró un proceso de transferencia de carga desde el ADN hacia el nanocable metálico, el cual podría ser la base para entender el mecanismo de fluorescencia común en estos sistemas cuando se excita tanto la banda en el UV como la banda en el visible. Sin embargo, la influencia de la carga total del sistema, y sobretodo, por qué los sistemas totalmente cargados no fluorescen, es algo todavía sin entender. Teniendo en cuenta que en la sección anterior se concluyó que ni el *backbone* ni el desorden estructural influyen significativamente en las propiedades ópticas de los sistemas, el modelo $C_{12}Ag_6$ se utilizó para investigar la influencia de la carga total en las propiedades ópticas de los complejos ADN- Ag_n .

La estructura electrónica y el espectro de absorción fueron calculados para el modelo $C_{12}Ag_6$ variando la carga total del sistema de 0 a 6+. Es importante notar que la carga 6+ en este sistema (de ahora en más $[C_{12}Ag_6]^{6+}$) hace referencia a un complejo *totalmente* cargado, en relación a la cantidad de átomos de Ag en la estructura. Las DOS y PDOS sobre las regiones de ADN y Ag para los sistemas $C_{12}Ag_6$ y $[C_{12}Ag_6]^{6+}$ se muestran en la Figura 4.9a y 4.9b, respectivamente, marcando en línea punteada las cuatro zona características mencionadas anteriormente. A primera vista se observa un cambio significativo en la estructura electrónica cuando el sistema alcanza carga 6+. Este cambio se puede desglosar en tres aspectos importantes. Primero, se observa un nuevo conjunto de estados para el complejo iónico $[C_{12}Ag_6]^{6+}$ cerca de la energía de Fermi, causado por la proximidad de estados ocupados del ADN y estados desocupados de la Ag. Segundo, la contribución de los estados desocupados del ADN aparece ≈ 2 eV más alto en energía para el complejo iónico que para el neutro. Por

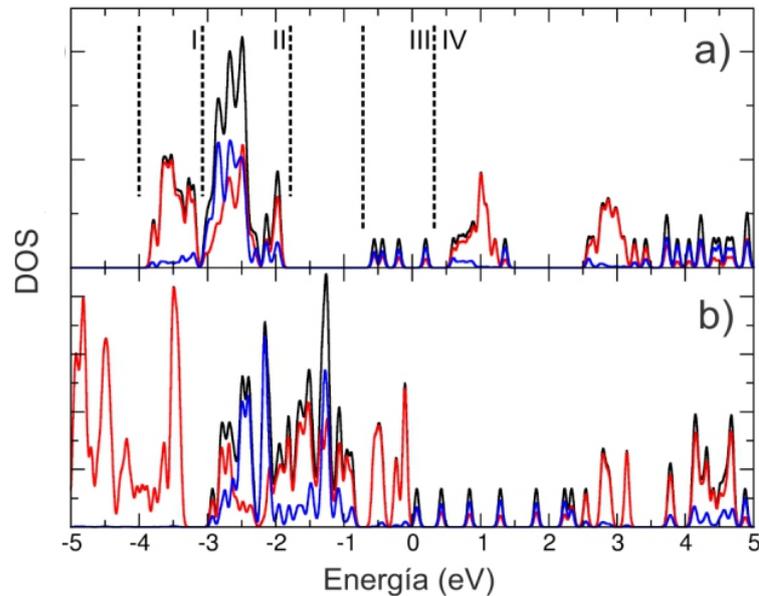


FIGURA 4.9: DOS total (negro) y PDOS sobre las regiones de ADN y Ag (rojo y azul, respectivamente) para $C_{12}Ag_6$ (a) y $[C_{12}Ag_6]^{6+}$ (b).

último, la superposición de estados del ADN y estados d de la Ag, ubicada en la zona II del complejo neutro $C_{12}Ag_6$ disminuye considerablemente en $[C_{12}Ag_6]^{6+}$ y se expande sobre un rango de energías mayores, quedando solo una zona fuerte de superposición a ≈ -1.3 eV por debajo de la energía de Fermi. Estas diferencias en la estructura electrónica entre $C_{12}Ag_6$ y $[C_{12}Ag_6]^{6+}$ son la manifestación de un cambio en la naturaleza de las interacciones entre el ADN y la Ag.

Como muestra la Figura 4.10, el espectro de absorción calculado para el modelo $[C_{12}Ag_6]^{6+}$ también muestra una gran diferencia en comparación a $C_{12}Ag_6$. Como fue descrito en la sección anterior, el espectro de absorción de $C_{12}Ag_6$ (Figura 4.10a) presenta una correlación razonable con lo esperable para estos sistemas, según reportes experimentales y teóricos[43, 52, 107, 140]. Sin embargo, en el sistema totalmente cargado se observa una abrupta disminución de la intensidad de la banda en la región visible correspondiente a la excitación longitudinal del cable metálico. Esto podría estar directamente relacionado con el cambio en la naturaleza del enlace

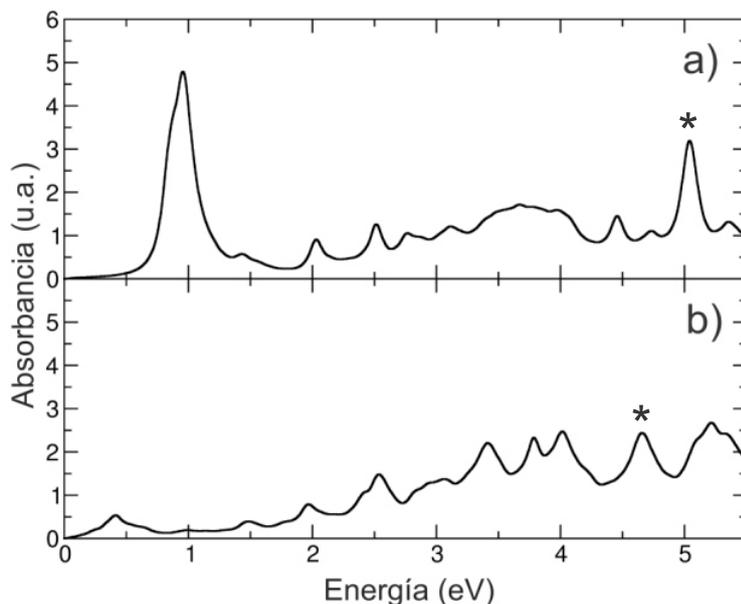


FIGURA 4.10: Espectros de absorción calculado para los modelos $C_{12}Ag_6$ (a) y $[C_{12}Ag_6]^{6+}$ (b).

ADN-Ag al pasar de un sistema neutro a un sistema totalmente cargado.

Para obtener más información acerca de este cambio en la interacción entre la Ag y el ADN, se calculó la diferencia de densidad de carga entre el complejo neutro y cargado, la cual se muestra en la Figura 4.11. Se puede observar que al *cargar* el sistema, la densidad de carga positiva se deslocaliza principalmente a lo largo del cable de Ag, con una gran acumulación en los extremos, como se puede esperar de consideraciones puramente electrostáticas en cables metálicos. En este sentido, la carga del cable podría causar una polarización de las moléculas de Cyt con una compensación de carga negativa localizada principalmente en el N_3 de la base, involucrado en la interacción con la Ag. Esta diferencia de densidad de carga revela un fuerte cambio en la naturaleza de la interacción Cyt-Ag pasando de un *carácter covalente* en $C_{12}Ag_6$ a un *carácter iónico* en $[C_{12}Ag_6]^{6+}$, y puede ser la base para explicar los cambios observados en la estructura electrónica de ambos modelos.

La población de orbitales moleculares más relevantes en función del

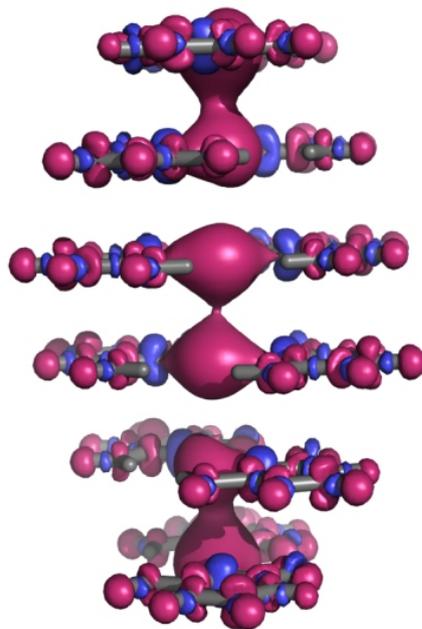


FIGURA 4.11: Diferencia de densidad de carga total entre $C_{12}Ag_6$ y $[C_{12}Ag_6]^{6+}$. La acumulación y depleción de carga se representan con lóbulos azul y violeta, respectivamente

tiempo luego de la irradiación a la banda UV se siguió para ambos modelos $C_{12}Ag_6$ y $[C_{12}Ag_6]^{6+}$ según la metodología descrita anteriormente. Las energías de excitación utilizadas se marcan con un asterisco en los espectros de absorción de cada modelo en la Figura 4.10a y 4.10b. Para proveer una mejor representación de los resultados la Figura 4.12 muestra la evolución de la población de orbitales moleculares en relación a la población del estado fundamental, en función del tiempo y la energía de cada eigen-estado, en una representación en dos dimensiones. En esta representación (de ahora en más llamada *DynPop*) el mapa de colores representa el cambio (aumento o disminución) de la población de cada estado en función del tiempo (ρ_{ii}), en comparación con la población sin perturbar del estado fundamental.

Para el clúster neutro $C_{12}Ag_6$ la *DynPop* obtenida irradiando a 5,1 eV (Figura 4.12a) confirma una de las conclusiones centrales discutidas en la sección anterior con respecto a la relación entre la estructura electrónica y

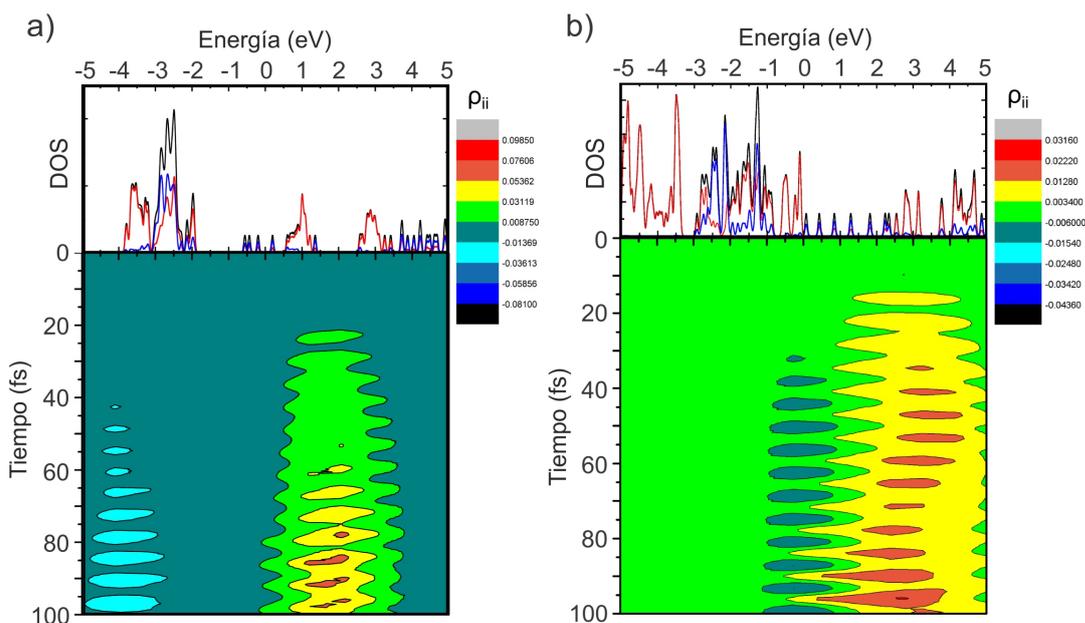


FIGURA 4.12: Evolución de la población de orbitales moleculares durante la irradiación de luz a 5,1 eV para $C_{12}Ag_6$ (a) y 4,6 eV para $[C_{12}Ag_6]^{6+}$ (b), respectivamente (*DynPop*). El mapa de colores representa el cambio (aumento o disminución) de la población de cada estado en función del tiempo, comparada con la población sin perturbar del estado fundamental. Para un mejor entendimiento el *DynPop* es graficado en conjunto con la DOS.

las propiedades fotofísicas del sistema. Como se puede observar, los estados des poblados corresponden a estados de la zona I (Figura 4.9a) con una buena contribución de los estados del ADN, mientras que los orbitales poblados a partir de la irradiación se encuentran en la zona IV (Figura 4.9a). En cambio, los estados *espectadores* de la Ag en la zona III (Figura 4.9a) están claramente separados en energía y electrónicamente desacoplados del grupo I, desde donde los electrones son promovidos, y grupo IV, hacia donde los electrones son promovidos. Estos estados entonces podrían generar un *gap* similar al observado en *quantum dots* semiconductores, y como se había mencionado anteriormente, podría ser la clave para entender el proceso de fluorescencia en estos sistemas.

A diferencia del clúster neutro, la *DynPop* obtenida para el sistema iónico $[C_{12}Ag_6]^{6+}$ cuando el sistema es irradiado a 4,6 eV (Figura 4.12b) muestra que, al comienzo de la simulación, los estados poblados caen $\approx 3,5$ eV por

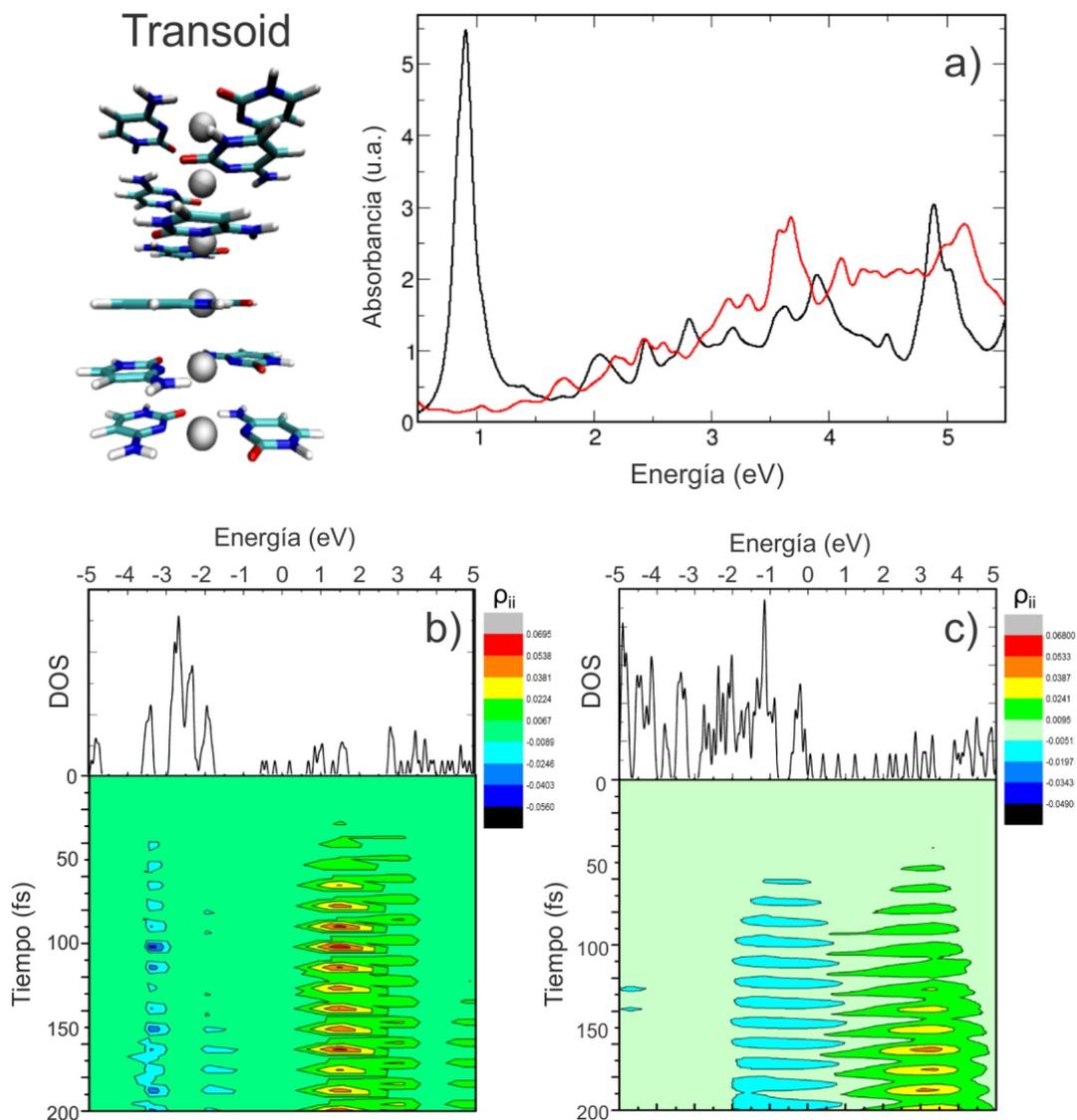


FIGURA 4.13: Estructura C₁₂Ag₆ con orientación transoid. (a) Espectros de absorción para los clústeres C₁₂Ag₆ y [C₁₂Ag₆]⁶⁺ y (b) y (c) población dinámica de los orbitales en función del tiempo irradiando a 4,9 eV para C₁₂Ag₆ y 5,1 eV para [C₁₂Ag₆]⁶⁺, respectivamente.

encima de la energía de Fermi, pero la evolución del paquete de onda finalmente lleva a la población de los estados de baja energía de la Ag. Luego de unas pocas decenas de femtosegundos los orbitales poblados y des poblados se expanden sobre un amplio rango de energía y caen por encima y debajo la energía de Fermi, sin ningún *gap* entre los estados que permita el desacople electrónico.

La comparación entre las *DynPop* de C₁₂Ag₆ y [C₁₂Ag₆]⁶⁺ permite

observar que la modificación de la estructura electrónica al pasar de carga 0 a 6+, siendo ésta principalmente la aparición del conjunto de estados cerca de la energía de Fermi en la zona III (Figura 4.9b), modifica sustancialmente la evolución del paquete de onda en el tiempo. El fuerte acoplamiento entre estados poblados y des poblados en $[C_{12}Ag_6]^{6+}$ podría deberse al *carácter iónico* de la interacción ADN-Ag y ser la clave para entender el mecanismo que causa el *quenching* en los sistemas ADN-Ag_n completamente iónicos y que evita su fluorescencia.

De la misma forma que en la sección anterior, el mismo análisis presentado se realizó para el modelo $C_{12}Ag_6$ y $[C_{12}Ag_6]^{6+}$ con orientación transoid. La Figura 4.13 muestra que las propiedades ópticas descritas hasta aquí también se preservan cualitativamente más allá de la isomería cisoid/transoid.

4.3.3. Modelo Zig-zag PolyC–Ag_n^{0/+}: Un Avance Hacia el Sistema Real

En la sección anterior se analizaron las propiedades fotofísicas y la influencia de la carga total del sistema en un sistema modelo ADN-Ag_n reduccionista. Con el objetivo de tender hacia una mejor representación de estos sistemas, en esta sección se analizan dos modelos basados en las estructuras propuestas por Gwinn y colaboradores[45]. Evidencia experimental sostiene que los sistemas híbridos ADN-Ag_n se componen de simples o dobles hebras de oligonucleótidos que actúan como soporte de un cable neutro de átomos de Ag, en forma de zigzag. Entre el cable neutro y las bases del ADN, cationes Ag⁺ hacen de *puentes de enlace*[43, 50, 52]. Los modelos analizados en esta sección constan de una doble hebra de 3 y 4 pares de Cyt, con 4 y 6 átomos neutros de Ag en el nanocable metálico, unidos por cationes Ag⁺. Estas estructuras son llamadas de ahora en más *green* y *red*, respectivamente, en referencia a los *colores mágicos* de emisión de estos clústeres [45]. Una representación de las estructuras, extraída de la simulación de dinámica molecular, se muestra en la Figura 4.14. El *backbone* de ADN se muestra en forma de *cartoon* para facilitar la visualización.

La elección de los sistemas modelos surge del hecho de que 4 y 6 son los *números mágicos* de Ag neutra del nanocable metálico para clústeres híbridos fluorescentes, encontrados por Gwinn y colaboradores[45, 52], con emisiones a ≈ 540 nm (verde) y ≈ 630 nm (rojo), respectivamente. Además, la estequiometría Ag⁰/Ag⁺ de 4/6 y 6/8 utilizada para los clústeres *green* y *red* respectivamente, ya ha sido observada experimentalmente para clústeres ADN-Ag_n híbridos ricos en citosina[45]. Si bien estas estructuras fueron estudiadas a partir de DM por Gwinn y colaboradores[45] la naturaleza aproximada de los parámetros Ag-Ag y ADN-Ag utilizados impide obtener conclusiones acerca de la influencia de la estructura en las

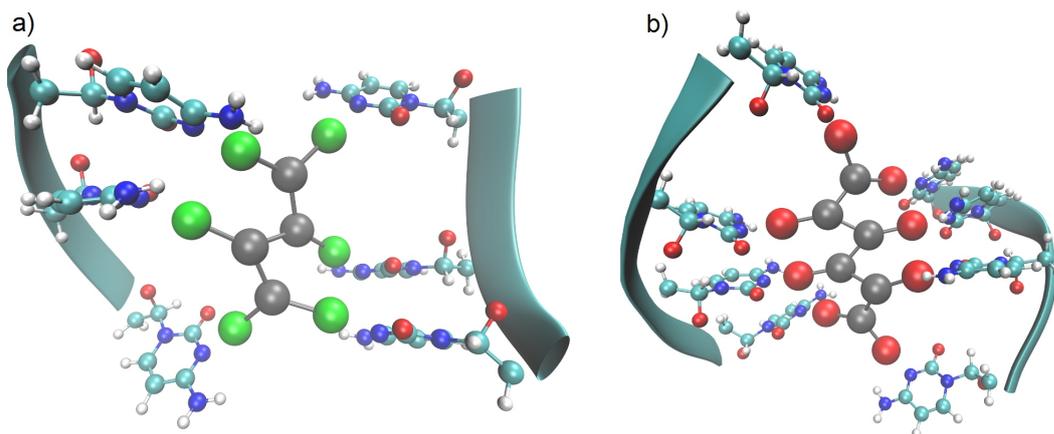


FIGURA 4.14: Estructuras *green* (a) y *red* (b) extraída luego de 5 ns de simulación de dinámica molecular. Los átomos en verde y rojo representan los cationes Ag^+ en cada estructura, mientras que el cable neutro de Ag se muestra en gris. El *backbone* de ADN se muestra en forma de *cartoon* para facilitar la visualización.

propiedades ópticas.

En una primera etapa, a fin de asegurar una distribución estadística de configuraciones que representen toda la simulación de dinámica molecular, y tener en cuenta el desorden estructural del sistema, cada estructura *green* y *red* fue explorada mediante una simulación NVT de 10 ns de duración, embebida en H_2O como solvente explícito y contraiones para neutralización de la carga. Como se hizo con el modelo $\text{dpC}_{12}\text{Ag}_6$, luego de la estabilización de las propiedades termodinámicas, un ensamble de 10 estructuras equiespaciadas en el tiempo fueron extraídas para realizar los análisis. Las propiedades ópticas de los clústeres se estudiaron en estado *neutro* y *cargado* (6+ y 8+ para *green* y *red*, respectivamente) a fin de evaluar su dependencia con la carga total del sistema. En este caso, las cargas 6+ y 8+ en los modelos *cargados* hacen referencia a la cantidad de cationes Ag^+ que actúan de puente de enlace entre el cable metálico y las bases del ADN. Por último, los resultados finales son reportados como un promedio del ensamble de estructuras obtenidas.

En base a suposiciones electrostáticas, como ocurre para $[\text{C}_{12}\text{Ag}_6]^{6+}$, se puede esperar que en un sistema metálico en forma de nanocable la carga

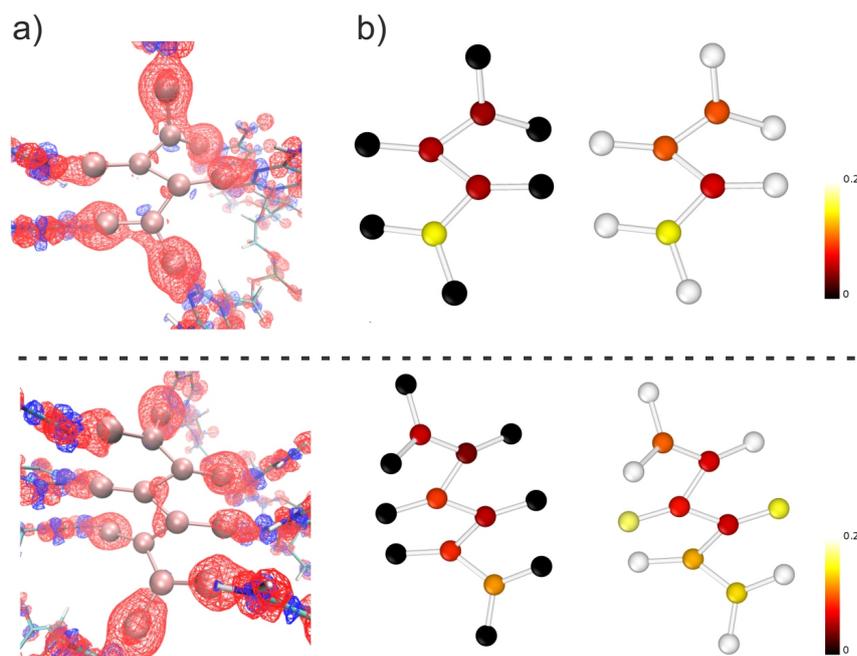


FIGURA 4.15: (a) Diferencia de densidad de carga entre el sistema cargado y neutro para *green* (arriba) y *red* (abajo). Las grillas rojas y azules corresponden a diferencia de densidad de carga positiva y negativa, respectivamente. Un isovalor de $\pm 0,0025$ de la función de onda fue utilizado en todos los casos. (b) Cargas atómicas de Mulliken del cable metálico de los sistemas neutros (izquierda) y cargados (derecha) de *green* (arriba) y *red* (abajo). El ADN no es mostrado en la figura para una mejor visualización. La escala de colores en (b) representa la carga atómica de Mulliken de cada átomo. Las estructuras utilizadas para ambos sistemas se corresponden con las estructuras de la Figura 4.14, extraídas de la dinámica molecular.

tienda a ir hacia los extremos para minimizar la repulsión electrónica. En el caso de las estructuras analizadas se espera que la carga también vaya hacia los átomos de Ag laterales del clúster metálico, donde está unida la Cyt (de ahora en más Ag_n laterales) debido a que la longitud y el ancho del clúster metálico son comparables. Sin embargo, la fuerte interacción entre la Cyt y Ag^+ [12, 105] podría generar una localización de carga que favorezca la distribución de carga propuesta por Gwinn y colaboradores para estos sistemas[45].

Para corroborar esta hipótesis se analizó la distribución de carga para ambos clústeres *green* y *red* en estado neutro y cargado para las estructuras extraídas de la dinámica molecular. La Figura 4.15a muestra la diferencia de

densidad de carga entre el clúster cargado y neutro para una estructura del ensamble de los clústeres *green* (arriba) y *red* (abajo), respectivamente. En ambos clústeres se puede observar una acumulación de densidad de carga positiva sobre las Ag_n laterales, mientras que para los átomos del nanocable metálico, es decir, aquellos que no están unidos al ADN (de ahora en más Ag_n centrales) prácticamente no se observa modificación. Esto sugiere que el cambio del estado de carga de *neutro* a *cargado* afecta principalmente las Ag_n laterales, sin alterar las Ag_n centrales. Lo mismo se puede observar cuando se analiza la distribución de carga atómica de Mulliken en ambos clústeres *green* y *red* neutros y cargados, mostrado en la Figura 4.15b. El color de cada átomo de Ag representa el valor de la carga atómica de Mulliken. Nuevamente, tanto para *green* como para *red*, cuando el sistema se encuentra *cargado*, la carga atómica positiva tiende a acumularse en las Ag_n laterales, mientras que la carga atómica de las Ag_n centrales permanece prácticamente inalterada y cercana a cero.

Para asegurarse de que este comportamiento es independiente del desorden estructural e intrínseco del modelo en consideración, se comparó el promedio de las cargas atómicas de las Ag_n laterales y centrales para los clústeres *green* y *red*, cargados y neutros, del todo el ensamble completo de estructuras extraídas de la dinámica molecular. En la Figura 4.16, cada par de círculos rojo y negro se corresponde con el promedio de carga atómica de las Ag_n laterales y centrales, respectivamente, para cada una de las diez estructuras del ensamble. A su vez, en cada gráfica el panel de la izquierda muestra los resultados para los clústeres neutros, mientras que el panel de la derecha muestra los resultados para los clústeres cargados. Una vez más, para el conjunto completo de estructuras analizadas, en ambos *green* y *red* el *cargado* del sistema afecta principalmente a las Ag_n laterales, mientras que la carga de las Ag_n centrales permanece prácticamente inalterada. Estos resultados están en acuerdo con la distribución de carga planteada por

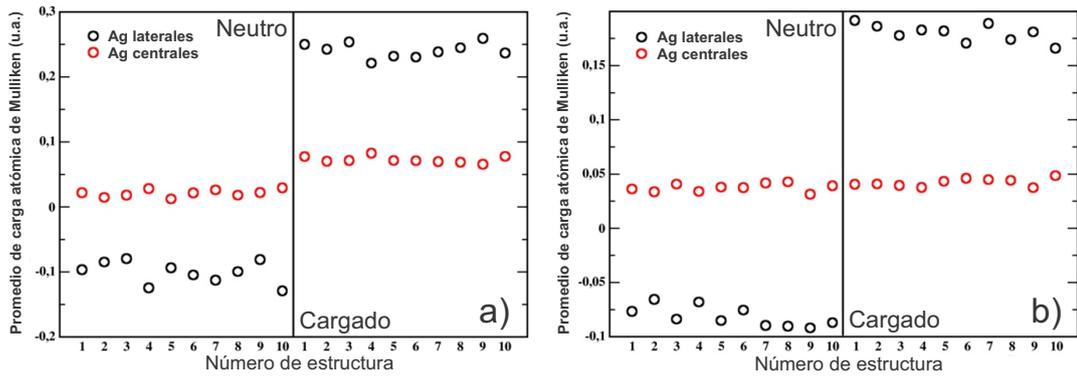


FIGURA 4.16: Cada par de círculos negro y rojo representa la carga atómica promedio para Ag_n laterales (negro) y centrales (rojo) sobre el ensamble de estructuras para *green* (a) y *red* (b). En cada gráfica el panel izquierdo corresponde al sistema neutro mientras que el panel derecho al sistema cargado.

Gwinn y colaboradores para este tipo de sistemas[45].

Se calcularon los espectros de absorción para el ensamble completo de estructuras *green* y *red* neutro y cargado, y el espectro promedio se muestra en la Figuras 4.17a y 4.17b para *green* y *red*, respectivamente. En ambos modelos tanto en estado neutro como cargado, se observa una banda en la región UV a $\approx 4,9$ eV correspondiente a la excitación de las bases del ADN, como fue reportado previamente para estos sistemas[47, 163, 164], y observado en los otros modelos ADN- Ag_n analizados en este Capítulo.

Otra banda ancha se puede observar a $\approx 1,7$ eV que podría corresponder a la excitación longitudinal del clúster metálico, como fue también observado en otros trabajos[45, 50, 52, 165, 166]. Esta hipótesis está en concordancia con la distribución de carga propuesta, ya que las características de esta banda de absorción permanecen prácticamente inalteradas cuando el sistema es *cargado*, debido a que la densidad de carga positiva se acumularía sobre la Ag_n laterales. También se observa un pequeño corrimiento hacia mayores longitudes de onda cuando se aumenta el largo del cable de Ag_n centrales, como observó experimentalmente Gwinn y colaboradores en estos sistemas[45], o también en cables neutros de Ag[160, 165]. Sin embargo, se puede notar la aparición de múltiples picos

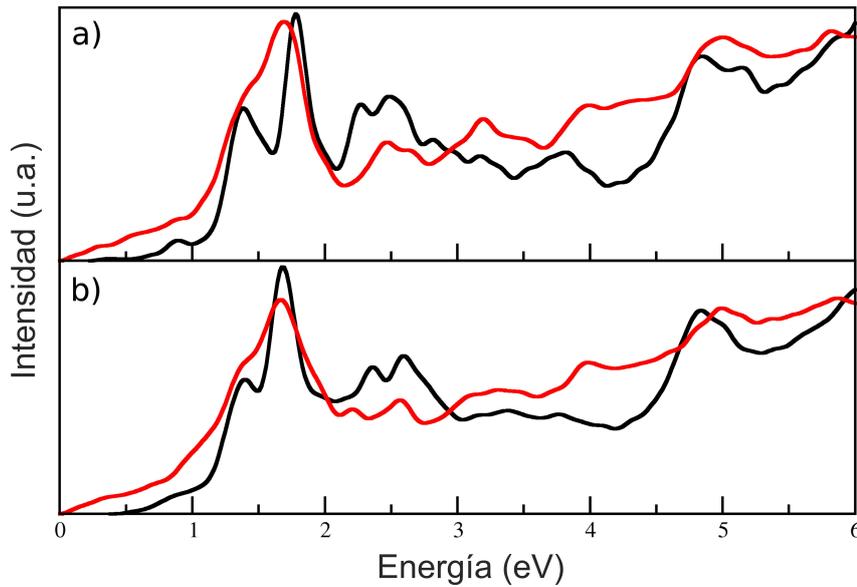


FIGURA 4.17: Espectros de absorción promedio para *green* (a) y *red* (b), para los sistemas neutros (negro) y cargados (rojo).

parcialmente resueltos para esta banda, tanto para los sistemas cargados como los neutros. Debido a que las propiedades ópticas de estos sistemas son sensibles a la estructura del clúster y las coordenadas internas[45, 50, 54], la presencia de estos picos, que no se observan experimentalmente, se puede deber al limitado número de estructuras consideradas para el ensamble, y con ésto, al cálculo del espectro promedio.

Por último, en los clústeres neutros, una tercera banda aparece a $\approx 2,5$ eV que disminuye en intensidad cuando el sistema es *cargado*. Si bien esta banda no se ha reportado experimentalmente para este tipo de sistemas, estudios teóricos de cables de Ag_n neutros muestran que ocurre una excitación transversal del tipo plasmón a energías mayores que la excitación longitudinal y que experimenta un pequeño corrimiento hacia menores longitudes de onda cuando el largo del cable metálico aumenta[165, 166]. Para obtener más información sobre la naturaleza de esta banda se siguió la población de orbitales en el tiempo, para los clústeres neutros, luego de la irradiación de esta banda, a 2,59 eV y 2,54 eV para *green* y *red* respectivamente. Las Figuras 4.18a y 4.18b muestran que en ambos clústeres

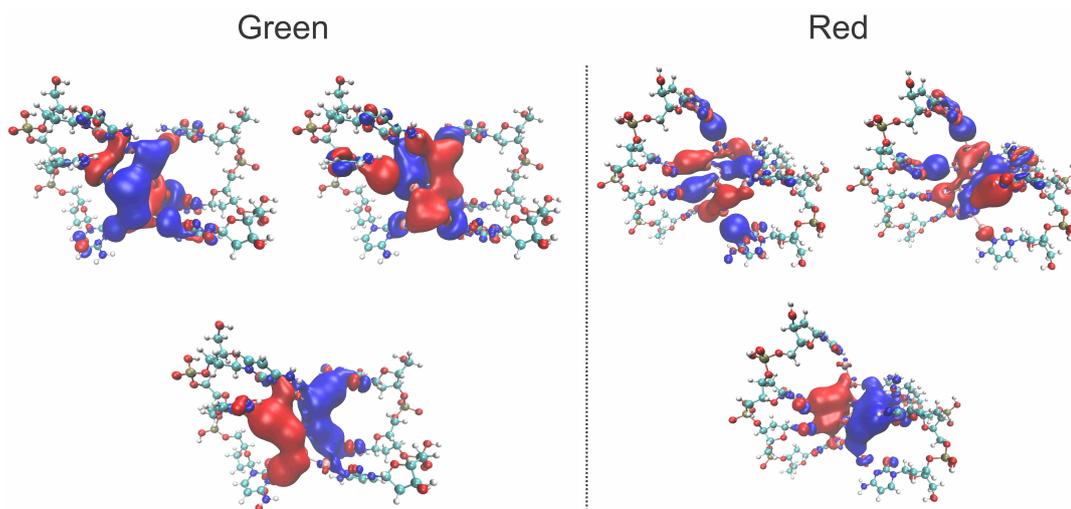


FIGURA 4.18: Orbitales moleculares poblados (superior) y des poblados (inferior) involucrados en la excitación del plasmón transversal del clúster metálico a 2.59 eV para *green* y 2.54 eV para *red*.

los orbitales moleculares más importantes que se despueblan (inferior) y pueblan (superior) luego de la excitación corresponden a excitaciones transversales dentro del clúster metálico, sin contribución del ADN. En este sentido, la disminución de la intensidad de esta banda cuando se *carga* el sistema, junto con el hecho de que la banda en la zona del visible permanece prácticamente inalterada, están en concordancia con la distribución de carga propuesta por Gwinn y colaboradores[45]. Al *cargar* el sistema, densidad de carga positiva se acumula principalmente en las Ag_n laterales, y en consecuencia la excitación transversal del clúster metálico se ve afectada, observándose una fuerte disminución en la intensidad de la banda correspondiente.

Se obtuvieron resultados similares para los sistemas modelos $C_{12}Ag_6$ y $[C_{12}Ag_6]^{6+}$ en donde la banda correspondiente a la excitación longitudinal del clúster metálico, en la zona del visible, se desvanecía cuando la carga total del sistema alcanzaba el mismo valor que la cantidad de átomos de Ag. Estos sugiere que la banda observada a $\approx 2,5$ eV para los clústeres neutros *green* y *red* podría corresponder a una excitación transversal dentro del

clúster metálico, y el hecho de que no se observe experimentalmente soporta la distribución de carga propuesta por Gwinn y colaboradores para este tipo de sistemas[52].

También se observan otras pequeñas bandas a mayores energías que la banda de excitación transversal del clúster metálico, que pueden deberse a sobreestimaciones de las transiciones de electrones d de la Ag. Este tipo de transiciones también se observaron previamente en estudios teóricos de cables metálicos de Ag_n [54, 55, 165, 166].

En este punto es necesario destacar que si bien los espectros calculados no reproducen perfectamente los espectros experimentales, las características ópticas de este tipo de sistemas, llámese la banda de excitación longitudinal del clúster metálico en el visible y la de excitación de las bases del ADN en el UV, como también las propiedades fotofísicas intrínsecas, también son observadas.

Como se discutió previamente, existe la hipótesis de que la emisión en los clústeres ADN- Ag_n , luego de excitación UV, ocurre mediante un proceso de transferencia de carga (TC) desde el ADN hacia el clúster metálico, donde estaría localizado el centro emisor. En relación a esto, se observó un estado de TC en el complejo $CytAg^+$ en fase gaseosa, y un proceso de transferencia de carga en los modelos $C_{12}Ag_6$ y $dpC_{12}Ag_6$. Sin embargo, la hipótesis no es fácilmente extrapolable para los modelos *green* y *red*, ya que tanto la complejidad del sistema, como la distribución de carga podrían dificultar que ocurra este proceso. Por este motivo, las propiedades fotodinámicas de los modelos *green* y *red* cargados fueron estudiadas mediante el seguimiento de las cargas atómicas de Mulliken en función del tiempo.

La dinámica de la carga durante la irradiación de luz se obtuvo a partir de la diferencia de carga atómica de Mulliken en función del tiempo, con respecto a la carga del estado fundamental (Δ Carga) para las regiones de

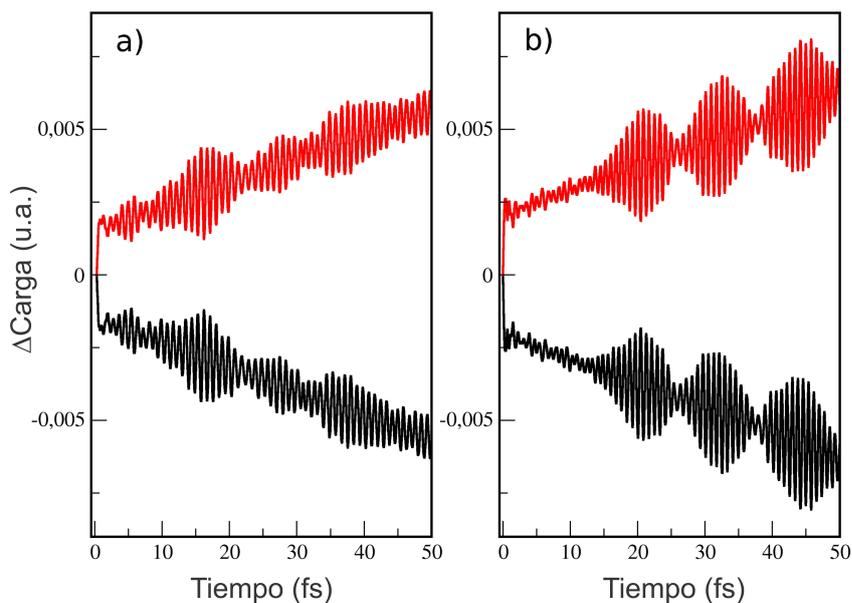


FIGURA 4.19: Promedio de la diferencia de cargas atómicas de Mulliken con respecto a la carga del estado fundamental (Δ Carga) para *green* (a) y *red* (b). Los Δ Carga de las regiones de ADN y Ag se muestran con líneas rojas y negras, respectivamente.

ADN y Ag. Se irradió la banda de absorción UV de cada estructura del ensamble, para ambos clústeres cargados *green* y *red*, y se calculó la Δ Carga como el promedio de los resultados. Las Figuras 4.19a y 4.19b muestran que al igual que en los sistemas modelos $C_{12}Ag_6$ y $dpC_{12}Ag_6$, luego de la irradiación de luz UV, una carga negativa neta es transferida desde la región del ADN hacia la Ag para ambos clústeres *green* y *red*.

Sin embargo, en ambos casos, dos procesos pueden distinguirse claramente. El primero corresponde a un proceso ultrarrápido de *separación* de carga que ocurre dentro de los primeros femtosegundos de dinámica. El segundo, en cambio, corresponde a un proceso de transferencia de carga *lento* desde la región de ADN hacia la Ag, que se mantiene hasta el final de la dinámica, similar a los observados en los otros modelos analizados. Vale aclarar nuevamente que este último es de hecho ultrarrápido debido a que ocurre en la escala temporal de los fs y es consecuencia de la evolución temporal del paquete de onda excitado.

Para entender más sobre los procesos observados, se analizó la evolución

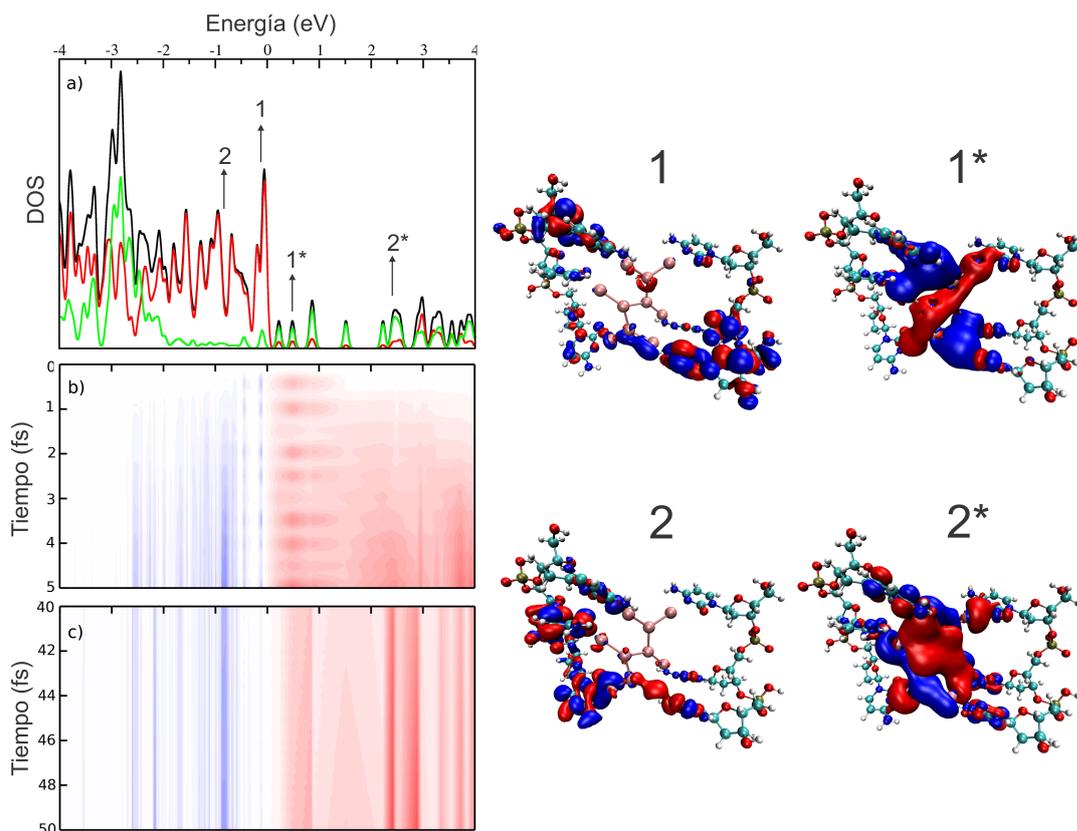


FIGURA 4.20: Evolución de la población de orbitales moleculares del clúster *green* cargado, durante la irradiación de luz a la banda UV, en función del tiempo y la energía de cada eigen-estado (*DynPop*). (a) DOS total (negro) y proyectada sobre las regiones de ADN (rojo) y Ag (verde). (b) *DynPop* obtenida a tiempos cortos entre 0 y 5 fs y (c) tiempos largos entre 40 y 50 fs. El mapa de colores representa el incremento (rojo) o disminución (azul) de la población de cada estado en función del tiempo, comparado con la población del estado fundamental sin perturbar. Los orbitales despopulados (N) y poblados (N*) más importantes, a tiempo cortos (N=1) y largos (N=2) durante la irradiación, se muestran en el panel derecho.

de la población de orbitales moleculares en función del tiempo (*DynPop*), para ambos clústeres *green* y *red* cargados. En este sentido, los orbitales moleculares involucrados a tiempos cortos de dinámica darán información sobre las transferencia de carga ultrarrápida, mientras que aquellos a tiempos largos darán información sobre el proceso de transferencia de carga *lento*. Los resultados obtenidos para *green* son mostrados en la Figura 4.20 junto con la DOS y PDOS del sistema. Lo primero que se puede destacar de este análisis es que la población de orbitales difiere a tiempos cortos y largos. En el primer proceso, a tiempos cortos (Figura 4.20b), la *DynPop*

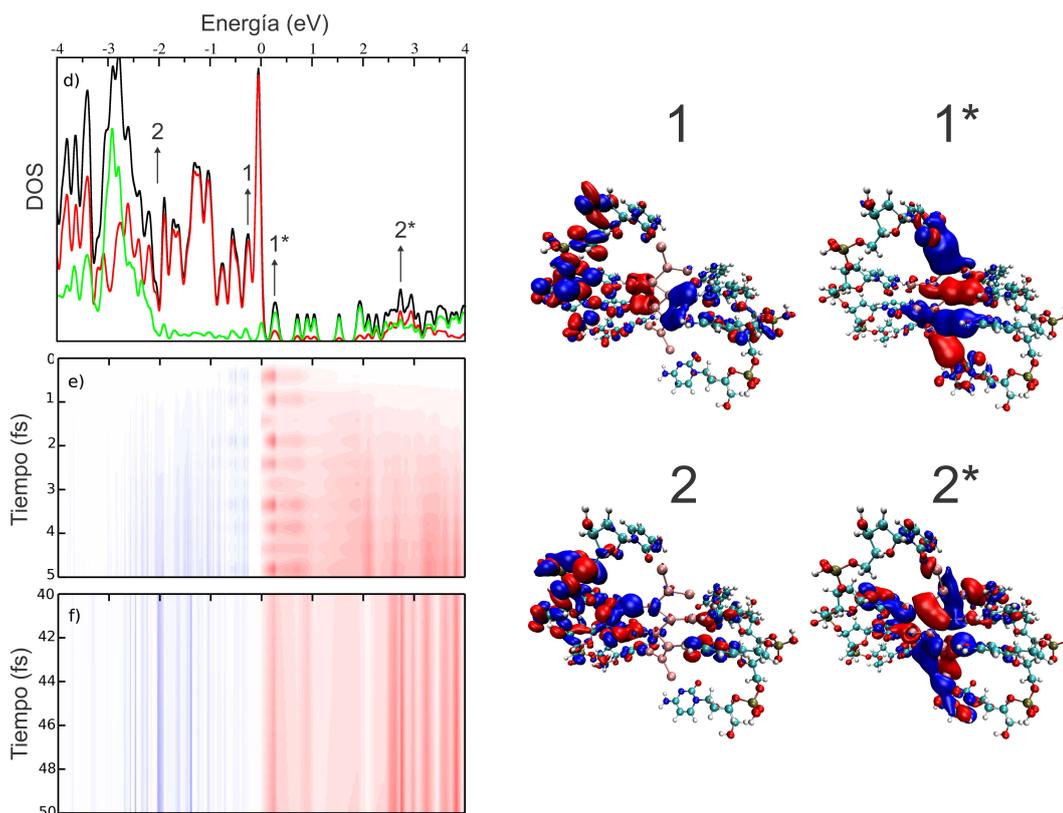


FIGURA 4.21: Evolución de la población de orbitales moleculares del clúster *red* cargado, durante la irradiación de luz a la banda UV, en función del tiempo y la energía de cada eigen-estado (*DynPop*). (a) DOS total (negro) y proyectada sobre las regiones de ADN (rojo) y Ag (verde). (b) *DynPop* obtenida a tiempos cortos entre 0 y 5 fs y (c) tiempos largos entre 40 y 50 fs. El mapa de colores representa el incremento (rojo) o disminución (azul) de la población de cada estado en función del tiempo, comparado con la población del estado fundamental sin perturbar correspondiente. Los orbitales despopulados (N) y poblados (N*) más importantes, a tiempo cortos (N=1) y largos (N=2) durante la irradiación, se muestran en el panel derecho.

muestra que los estados involucrados en la transferencia de carga están muy cercanos a la energía de Fermi. Los orbitales despopulados (1) y poblados (1*) más importantes involucrados en este proceso se marcan en la DOS y se muestran en el panel derecho. Se puede observar que el orbital despopulado 1 tiene mayoritaria contribución de la región de ADN con muy poca contribución de la Ag. En cambio, el orbital poblado 1* tiene gran contribución de la Ag y poca contribución del ADN. Dada la velocidad de este proceso, y la naturaleza de los orbitales involucrados, es posible que corresponda a la excitación de un estado de transferencia de carga en donde

el sistema es excitado desde un estado del ADN a un estado de la Ag, similar a lo observado para el complejo CytAg^+ en fase gaseosa.

A tiempos largos (Figura 4.20c), en cambio, los orbitales involucrados se encuentran alejados de la energía de Fermi del sistema. Los orbitales desocupado (2) y ocupado (2^*) más importantes involucrados en este proceso se marcan en la DOS y se muestran en el panel derecho. En este caso, a diferencia de lo que ocurre a tiempos cortos, el orbital ocupado en el proceso (2^*) tiene apreciable contribución tanto de la Ag como del ADN. Este proceso de transferencia de carga es similar al observado para los otros modelos analizados, y se puede entender como una excitación desde un estado del ADN a un estado mixto donde hay contribución de ambas regiones. Por esto, la transferencia de carga ocurre como evolución del paquete de onda en el tiempo, en una escala temporal *lenta*.

El mismo análisis se puede realizar para el clúster *red*, mostrado en la Figura 4.21. Si bien los orbitales involucrados muestran una diferencia menos clara que para el clúster *green*, los procesos fotofísicos que ocurren luego de la excitación UV son similares.

Por último, es importante notar que la estructura electrónica obtenida para los clústeres *green* y *red* es levemente diferente a los modelos anteriormente analizados, probablemente como consecuencia de la complejidad del modelo. Sin embargo, el *gap* de energía, aunque pequeño, es también observado en estos casos. Además, en todo el tiempo de dinámica, no se observó mezcla entre estados por encima y debajo de la energía de Fermi como fue observado para el modelo totalmente iónico $[\text{C}_{12}\text{Ag}_6]^{6+}$.

4.3.4. Conclusiones Parciales

En esta sección se estudió la espectroscopía y propiedades fotofísicas de modelos ADN-Ag_n de distinta complejidad a partir de dinámica molecular y DFTB dependiente del tiempo. Primero, un modelo reduccionista del sistema *real* mostró rasgos característicos de estos sistemas en los espectros de absorción calculados, como ser la banda en la región UV, correspondiente a la excitación de las bases del ADN, y la banda sintonizable en el visible, correspondiente a la excitación longitudinal del cable metálico. Un proceso de transferencia de carga también se observó, desde la base del ADN hacia el cable metálico, en concordancia con lo obtenido para el complejo más simple CytAg⁺ en fase gaseosa. También, un análisis de las propiedades ópticas de este modelo en donde el clúster metálico Ag_n se encuentra *cargado*, mostró un fuerte acoplamiento entre estados que se encuentran por debajo y encima de la energía de Fermi, lo cual podría tener relación con el hecho de que los clústeres ADN-Ag_n totalmente iónicos no fluorescen.

Por otro lado, al estudiar sistemas modelos más complejos, propuestos por Gwinn y colaboradores, en donde cationes Ag⁺ hacen de *punte de enlace* entre un cable metálico de Ag neutro y las bases del ADN, se observaron también las propiedades ópticas características de estos sistemas. La comparación entre los complejos neutros y cargados mostró un buen acuerdo con la distribución de carga propuesta por Gwinn y colaboradores. Además se observaron dos procesos de transferencia de carga, desde el ADN hacia el metal, para los clústeres cargados. Uno *ultrarrápido* que podría corresponder a la excitación de un estado de transferencia de carga, como fue observado para el complejo CytAg⁺ en fase gaseosa, y otro de naturaleza *lenta* similar a los observados en los otros modelos analizados.

Por último, es importante notar que en ningún modelo estudiado la presencia del *backbone* o el ruido térmico en el sistema afectaron la fotofísica en

estos complejos.

Los resultados aquí mostrados son un avance importante hacia tanto la dilucidación estructural de los complejos ADN-Ag_n como al entendimiento de los procesos que gobiernan la fotofísica luego de la absorción de luz.

Capítulo 5

Nanoclústeres de Ag en Solución

Acuosa

5.1. Introducción

Con el avance de la nanotecnología en los últimos años, los nanoclústeres (NCs) metálicos han sido un importante objeto de estudio debido a sus potenciales aplicaciones en este campo[36-39, 111, 112]. Es sabido que cuando el tamaño del sistema metálico se reduce lo suficiente aparecen efectos de confinamiento cuántico en el material, haciendo surgir nuevas propiedades ópticas y químicas[29]. El principal efecto del confinamiento cuántico en este tipo de sistemas es la aparición de un *gap* de energía HOMO-LUMO debido a la discretización de los niveles de energía del NCs, teniendo así un comportamiento del tipo *molecular*[167, 168]. El *gap* de energía generado a partir de esta discretización es el principal responsable de los altos rendimientos cuánticos de fluorescencia y estabilidad termodinámica, el cual además es sensible al ambiente químico, tamaño del clúster, carga total, etc[29].

Los primeros desarrollos en este campo fueron realizados por Knight et al. en 1984[169]. Él observó, en espectros de masa de clústeres de Na, la presencia de señales intensas correspondientes a clústeres Na_n con números específicos de átomos, denominados luego como *números mágicos*, los cuales están directamente relacionados con la estructura electrónica del sistema. A partir de estos resultados Eckardt y Knight propusieron un modelo físico, denominado *modelo de Jellium*, para explicar la estructura electrónica de capas en NCs libres de ligandos[170]. Este modelo aproximado, considera a los electrones del NCs como un gas libre inmerso en un potencial de simetría esférica, generado por los núcleos *iónicos*. Si bien el acuerdo con los resultados experimentales es aceptable, la validez del modelo se hace cuestionable cuando $N \leq 20$, debido principalmente a la pérdida del carácter esférico del NCs. Bajo ciertas aproximaciones, las cuales no serán discutidas en la presente sección, este modelo permite relacionar la energía

del *gap* HOMO-LUMO con la cantidad de átomos en el NCs. Este modelo toma gran relevancia en relación a la síntesis racional de nanomateriales y su aplicación en nanociencia, debido a que permitiría un mayor control sobre el número de átomos del clúster metálico. Sin embargo, es importante no perder de vista su carácter aproximado.

A lo largo de los años se han desarrollado variadas técnicas experimentales para la síntesis de estos nanomateriales, entre ellas la reducción química[171], la síntesis electroquímica[33], la fotoreducción[172], etc. Para alcanzar un mayor control sobre sus propiedades ópticas es de suma importancia la utilización de matrices orgánicas que actúen como soporte de los NCs. Si bien las cadenas de ADN son unas de las matrices más utilizadas para este fin[43, 47, 108, 173], también es común el uso de matrices poliméricas[174, 175], o incluso de proteínas[176]. Vale aclarar que si bien la matriz le confiere al sistema estabilidad contra los procesos de coalescencia, como también características ópticas particulares, dificulta la obtención de información sobre las propiedades ópticas intrínsecas de los NCs metálicos desnudos.

En este sentido, muy recientemente, López-Quintela y colaboradores desarrollaron una prometedora técnica de síntesis electroquímica, del tipo *bottom-up*, para la generación de AgNCs tan pequeños como dos y tres átomos de Ag. Esta síntesis se realiza en agua ultrapura y permite la obtención de AgNCs fluorescentes, termodinámicamente muy estables y libres de ligandos protectores[34]. Bajo ciertas aproximaciones, cuya discusión se omite en esta tesis doctoral, utilizando el modelo esférico de Jellium[170] para clústeres metálicos, y en combinación con HRMS, los autores asignan las propiedades ópticas de la solución conteniendo AgNCs a los clústeres Ag₂ y Ag₃[34].

Los autores también estudiaron la interacción de estos AgNCs con ADN mediante varias técnicas experimentales y reportan que el clúster Ag₃

interactúa selectivamente con el ADN, pero no lo hace el clúster Ag_2 [34]. También analizaron su actividad anticancerígena en tumores pulmonares en ratones, observando que la co-administración de cisplatino con el clúster Ag_3 potencia fuertemente la eficiencia anticancerígena mediante la reducción del tamaño del tumor, debido a las propiedades de intercalación del Ag_3 en ADN[111].

Más allá de la amplia aplicabilidad y los resultados prometedores sobre la interacción de estos NCs con el ADN, un entendimiento detallado sobre sus propiedades fotofísicas es todavía necesario. En este aspecto, una caracterización óptica y estructural es indispensable para la síntesis racional de nanomateriales conteniendo AgNCs.

En este capítulo se exponen los resultados obtenidos sobre la síntesis electroquímica de pequeños AgNCs fluorescentes, en agua, libre de ligandos protectores y su caracterización espectroscópica, como un aporte más al entendimiento de la fotofísica en este tipo de sistemas.

5.2. Sistema Experimental

La síntesis electroquímica de los AgNCs fue llevada a cabo de acuerdo al procedimiento reportado por López-Quintela y colaboradores[34]. Brevemente, éste sistema consta de una celda electroquímica de vidrio compuesta por dos electrodos (Ag como electrodo de trabajo y Pt como electrodo de referencia) con forma de placa, de $2,0 \text{ cm}^2$ de área superficial y separados por $1,0 \text{ cm}$ de distancia. La Figura 5.1 muestra un esquema del sistema experimental utilizado. Previo al experimento, el electrodo de Ag fue pulido con Al_2O_3 (Buehler) de $0,05 \mu\text{m}$ de tamaño de partícula, seguido de un electropulido por 600 segundos a 2 V , mientras que el electrodo de Pt fue flameado con H_2 durante 5 s. Luego ambos electrodos fueron lavados exhaustivamente con agua ultrapura (Mili-Q, Millipore, de $18 \text{ M}\Omega$ de

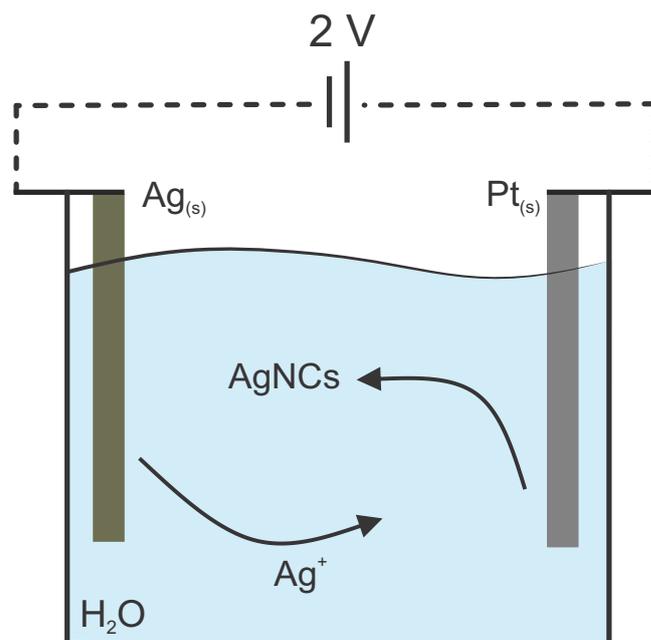


FIGURA 5.1: Esquema de la celda electroquímica utilizada para la generación de AgNCs en agua.

resistividad). La síntesis fue realizada aplicando un escalón de potencial de 2 V por 600 s en agua ultrapura, previamente desoxigenada con N_2 y a temperatura ambiente. El procedimiento electroquímico fue llevado a cabo en un potenciostato Autolab PGSTAT100 usando el programa NOVA 1.10. Luego de la síntesis, se agregó Na_2S (JT Baker) 1 M a la solución a fin de precipitar los cationes Ag^+ remanentes en la muestra. En algunos experimentos se agregó KCl (Sigma-Aldrich) 1 M, en lugar de Na_2S , para explorar los efectos de la identidad del anión en las propiedades ópticas de los AgNCs. Finalmente, la solución fue filtrada a través de una membrana de PTFE (Nalgene) con poros de $0.2 \mu m$ de tamaño y almacenada en oscuridad.

Una vez generados los AgNCs y luego de su purificación, se adquirieron los espectros de absorción UV-Vis y de fluorescencia de la solución. Los espectros de absorción UV-Vis se obtuvieron con un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700 PharmaSpec, en una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico, con agua ultrapura (Mili-Q) como blanco de referencia, en el

intervalo de 200-800 nm. Para una mayor claridad, los espectros de absorción se muestran en el intervalo 200-400 nm, debido a que la muestra no absorbe por encima de 400 nm. Los espectros de fluorescencia (emisión y excitación) se obtuvieron en un espectrofotómetro Quanta Master QM2 de Photon Technology International, equipado con un detector Hamamatsu R928 PMT por contador de fotones, en una celda de fluorescencia de 1 cm de paso óptico, con agua ultrapura (Mili-Q) como referencia. En particular, las matrices de excitación-emisión (EEM) se construyeron a partir de los espectros de emisión y excitación determinados a intervalos de 10 nm en la longitud de onda de excitación y emisión, respectivamente.

Los experimentos de espectroscopía de emisión resuelta en el tiempo (TRES, por sus siglas en inglés) fueron llevados a cabo en un fluorímetro Horiba Delta-Flex, excitando la muestra a 267 nm con un láser de diodo cuyo pulso tiene una duración de ≈ 70 ps. Se utilizó una solución de colágeno como dispersante para obtener la respuesta temporal del instrumento a la longitud de onda de excitación del láser. Las curvas de decaimiento temporal de fluorescencia se midieron en el intervalo de longitudes de onda de emisión 280-500 nm, a intervalos de 10 nm cada una. Posteriormente, los resultados fueron analizados con el *software* DAS-6.

Para conocer la identidad y estado de carga de los AgNCs las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas de alta resolución (HRMS) Brunker Daltonics MicroTOF QII operado en modo de ionización positivo, por inyección directa a la cámara mediante una fuente ESI. Todos los espectros fueron obtenidos en el intervalo m/z 100-1000. En todos los casos se utilizó formiato de sodio $[\text{Na}(\text{HCOONa})]^+$ como calibrante interno. Debido a la concentración de AgNCs en la muestra las señales de las especies conteniendo AgNCs son poco intensas, para facilitar la visualización, sólo se muestran las regiones donde se observan estas especies y no el espectro completo.

La caracterización teórica de los AgNCs sintetizados se realizó empleando el paquete de cálculo Gaussian 09[177]. En todos los casos las geometrías en el estado fundamental y excitado de los AgNCs, junto con sus energías, fueron calculadas al nivel de teoría DFT/CAM-B3LYP y TD-DFT/CAM-B3LYP, utilizando el pseudopotencial de Stuttgart/Dresden (SDD)[178] para representar los átomos de Ag. En todos los casos se utilizó el modelo del continuo polarizable (PCM)[179] para tener en cuenta los efectos del solvente en las propiedades calculadas. Los espectros de excitación se obtuvieron realizando un cálculo de energía al estado excitado de interés a la geometría de equilibrio del estado fundamental, para cada AgNCs.

Por último, se utilizó un algoritmo del tipo SIMPLEX para ajustar una combinación lineal de los espectros de excitación calculados para cada AgNCs al espectro de excitación de fluorescencia total obtenido experimentalmente.

5.3. Resultados

5.3.1. Caracterización Experimental

Los espectros de absorción UV-vis y emisión de fluorescencia de los AgNC sintetizados exhiben características ópticas similares a las reportadas previamente por López-Quintela y colaboradores[34, 111]. En el espectro de absorción, se pueden observar dos bandas centradas a 220 nm y 290 nm (Figura 5.2a), mientras que el espectro de emisión con excitación a $\lambda = 230$ nm exhibe tres bandas distinguibles a 300 nm, 350 nm y 410 nm (Figura 5.2b).

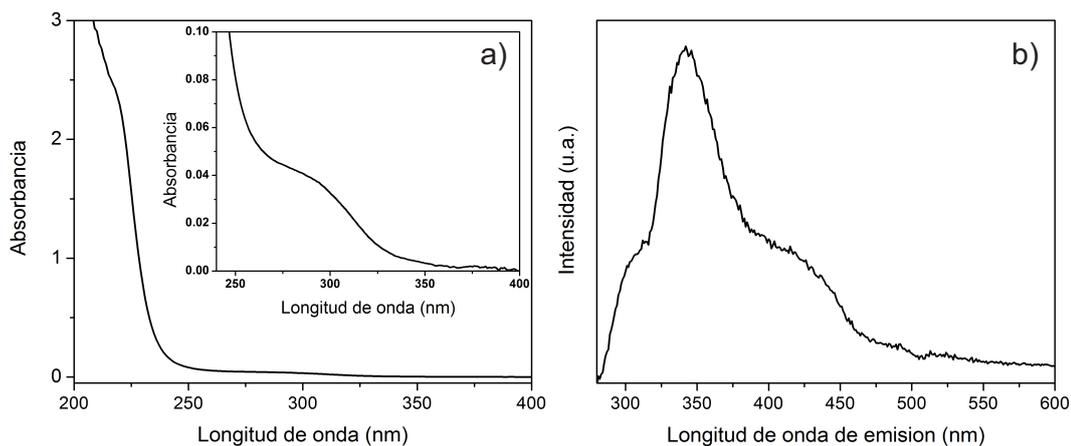


FIGURA 5.2: Espectros de absorción (a) y emisión (b) con excitación a $\lambda = 230$ nm, para los AgNCs sintetizados en este trabajo. El recuadro en (a) muestra con mejor resolución el hombro entre 250 y 350 nm.

Estas bandas de emisión también fueron reportadas previamente por Cuerva et al.[180], pero con distintas intensidades relativas, con una posible asignación a los clústeres Ag_2 , Ag_3 y Ag_4 , respectivamente, suponiendo la aproximación del modelo esférico de Jellium[170].

A fin de determinar la atomicidad y estado de carga de los clústeres en la mezcla se obtuvo el espectro de masas de alta resolución (HRMS) de la solución. A partir de éste, se observaron señales correspondientes a especies conteniendo clústeres Ag_2 , Ag_3^+ y Ag_4^{2+} (Figura 5.3), las cuales fueron asignadas mediante la simulación del patrón isotópico de cada complejo. Es importante notar que los tres AgNCs observados (Ag_2 , Ag_3^+ y Ag_4^{2+}) son especies con configuración electrónica de capa cerrada. Es sabido que los clústeres atómicos metálicos con esta configuración electrónica son termodinámicamente más estables y su formación está favorecida por sobre aquellos con configuración electrónica de capa abierta[181].

Las especies conteniendo AgNCs observadas en los espectros de masas (Figura 5.3) son complejos que contienen también iones S_2^- . Estas especies puede estar presentes como complejos estables en la solución, o bien se pueden producir en la fuente de ESI durante la evaporación de solvente (ver

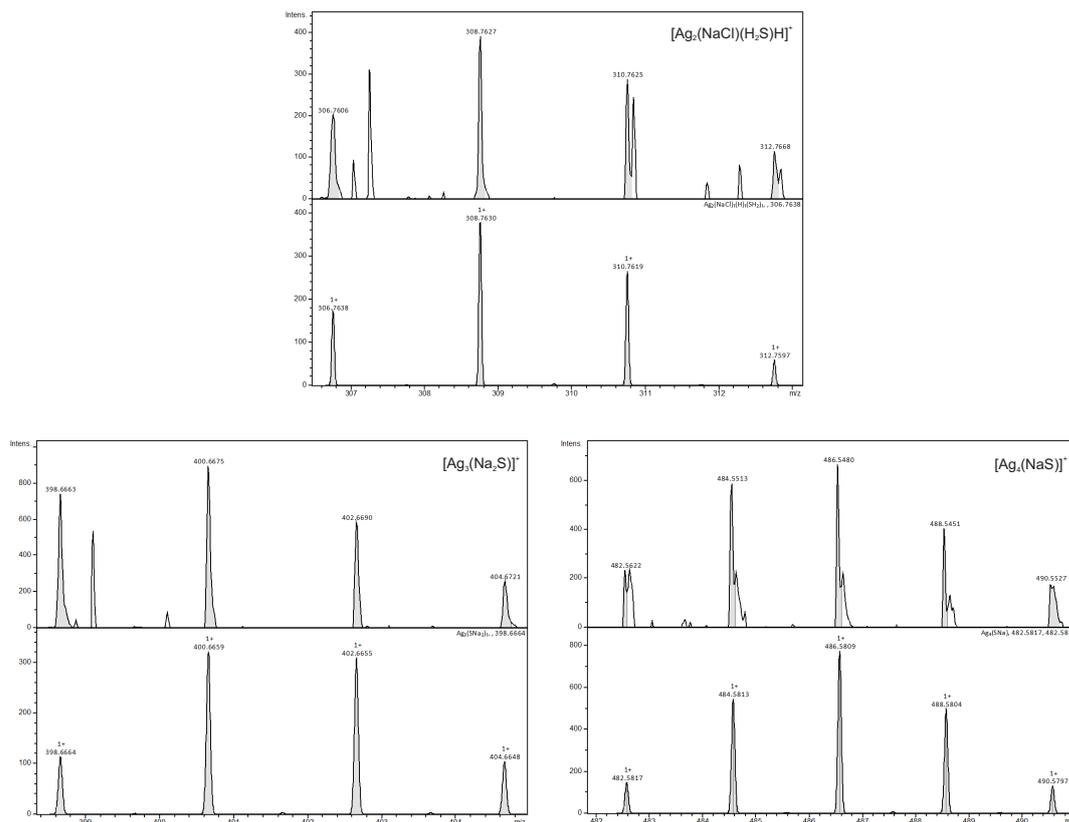


FIGURA 5.3: Espectros de masas de alta resolución, en modo de ión positivo, de las mezcla de AgNCs, mostrando complejos con Ag_2 (arriba), Ag_3^+ (abajo-izquierda) y Ag_4^{2+} (abajo-derecha). En cada panel, el espectro experimental (arriba) es comparado con el patrón isotópico simulado de cada complejo (abajo). Los complejos se muestran en la parte superior-derecha de cada gráfico.

sección 1). En este último caso, las características ópticas de la solución (espectros de emisión, excitación y absorción) deberían depender fuertemente del anión utilizado para la precipitación de la Ag^+ remanente de la síntesis. Para obtener información al respecto, se utilizaron soluciones de Na_2S 1M y KCl 1M como precipitantes en diferentes experimentos a fin de analizar las diferencias. La Figura 5.4 muestra los espectros de absorción y emisión con excitación a $\lambda_{ex} = 230$ nm de los clústeres sintetizados utilizando KCl 1M como precipitante. Como se puede notar, en comparación a la Figura 5.2, las características ópticas permanecen inalteradas, independientemente del anión utilizado. Esto sugiere que las especies responsables de las propiedades ópticas en la solución son los

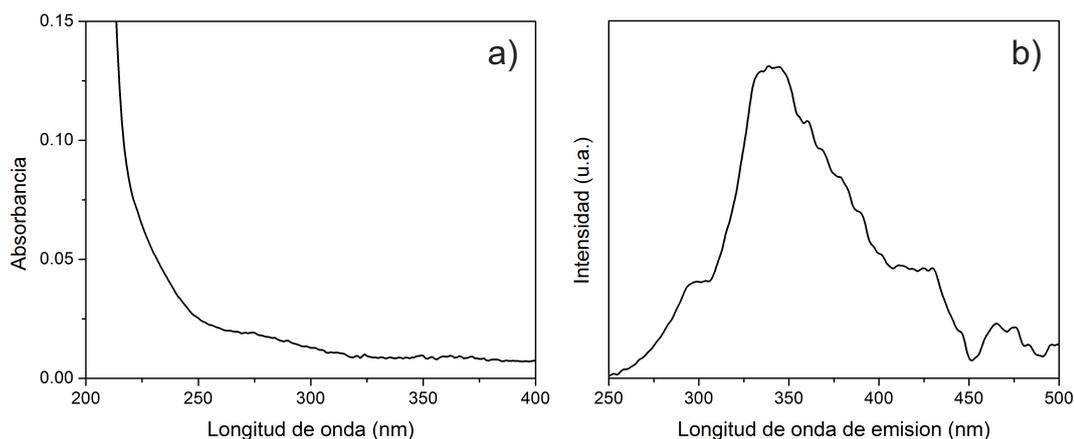


FIGURA 5.4: Espectros de absorbancia (a) y emisión (b) de la muestra de AgNCs sintetizada con KCl 1M como precipitante. En (b) la longitud de onda de excitación $\lambda_{\text{ex}} = 230$ nm.

AgNCs Ag_2 , Ag_3^+ y Ag_4^{2+} desnudos y que los complejos observados en los espectros de masas son producidos en la fuente ESI, luego de la evaporación del solvente.

Para conocer mejor la composición de la mezcla, se determinaron los espectros de excitación y emisión a diferentes longitudes de onda de emisión y excitación, respectivamente, con intervalos de 10 nm. La Figura 5.5a y 5.5b muestra los resultados de ambos experimentos. A primera vista se puede observar, tanto en el barrido de excitación como en el barrido emisión, la aparición y desaparición de bandas a medida que la longitud de onda de excitación o emisión varía. Una mejor representación del sistema se puede obtener a partir de una matriz de emisión/excitación (EEM, por sus siglas en inglés). Esta técnica demostró ser de gran utilidad a la hora de caracterizar la composición de AgNCs en muestras complejas[182]. La misma se obtuvo graficando cada espectro de emisión en función de la longitud de onda de excitación, y viceversa. Las Figuras 5.5c y 5.5d muestran dichas matrices, en las cuales la escala de colores indica la intensidad relativa en cada punto. Las EEM exhiben cuatro islas distintivas, marcadas como A, B, C y D en la Figura 5.5c, con grandes corrimientos

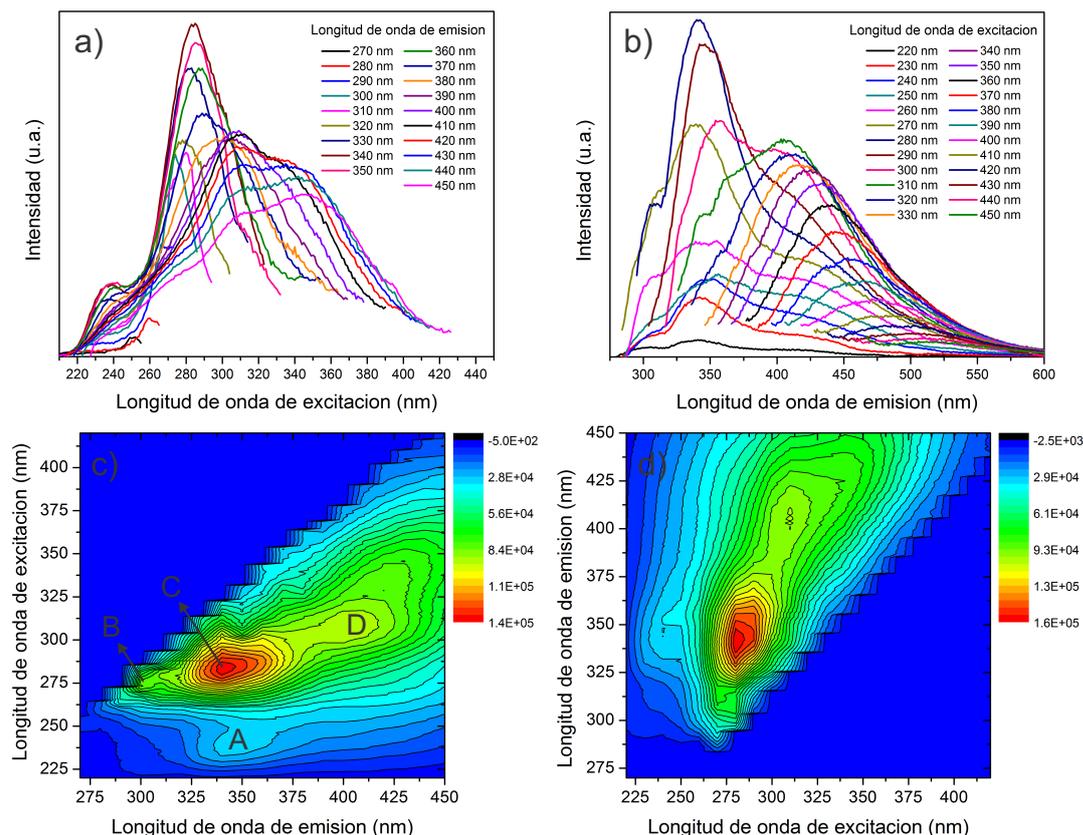


FIGURA 5.5: Barrido de espectros de excitación (a) y emisión (b) de la mezcla de AgNCs tomados a diferentes longitudes de onda de excitación y emisión. (c) y (d) muestran las matrices de emisión/excitación (EEM) obtenidas a partir de (a) y (b), respectivamente. Las flechas en (c) indican la posición de las cuatro islas analizadas en este trabajo.

TABLA 5.1: Máximos de excitación y emisión para las islas observadas en las EEM para la mezcla de AgNCs, corrimientos espectrales (ΔE_{ex-em}) y asignación de los tiempos de vida

Isla	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	ΔE_{ex-em} (cm^{-1})	Tiempo de vida (ns)
A	240	350	13095	$17,1 \pm 0,5$
B	275	305	3576	$4,50 \pm 0,09$
C	280	340	6303	$1,10 \pm 0,03$
D	310	410	7868	$4,50 \pm 0,09$

espectrales, los cuales se reportan en la Tabla 5.1. Es importante notar que estas islas pueden corresponder tanto a transiciones electrónicas de AgNCs de diferentes naturaleza, como también a transiciones electrónicas dentro del mismo AgNC.

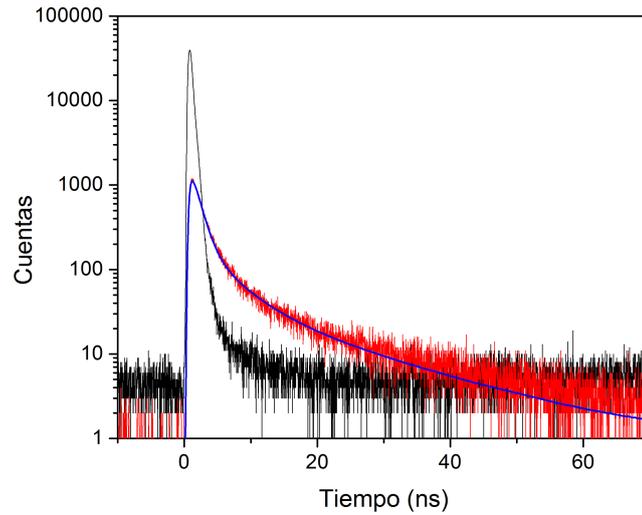


FIGURA 5.6: Curvas de decaimiento del *prompt* (negro), la solución de AgNCs (rojo) y el respectivo ajuste (azul) obtenidas midiendo la emisión a 350 nm.

Adicionalmente, se realizaron experimentos de espectroscopía de emisión resuelta en el tiempo (TRES, por sus siglas en inglés) a la mezcla de AgNCs, debido a su capacidad para deconvolucionar y caracterizar la emisión de mezclas complejas. El decaimiento de la emisión de fluorescencia, luego de excitación a $\lambda_{\text{ex}} = 267$ nm, fue obtenido entre 280 y 500 nm con intervalos de 10 nm en la longitud de onda de emisión. Todas las curvas de decaimiento fueron ajustadas en forma global a una función de decaimiento compuesta de 4 exponenciales, de la forma:

$$I(f) = B + A_1 e^{-(\tau_1/t)} + A_2 e^{-(\tau_2/t)} + A_3 e^{-(\tau_3/t)} + A_4 e^{-(\tau_4/t)} \quad (5.1)$$

donde B corresponde al ajuste temporal entre la respuesta del equipo (*prompt*) y la muestra, A_1 , A_2 , A_3 y A_4 a los factores pre-exponenciales de cada decaimiento exponencial y τ_1 , τ_2 , τ_3 y τ_4 a los tiempos de vida del estado excitado.

El ajuste global de todas las curvas de decaimiento a la ecuación 5.1 arrojó los siguientes tiempos de vida del estado excitado para todas las longitudes de onda exploradas: $\tau_1 = 1,10$ ns, $\tau_2 = 4,50$ ns, $\tau_3 = 17,1$ ns y $\tau_4 =$

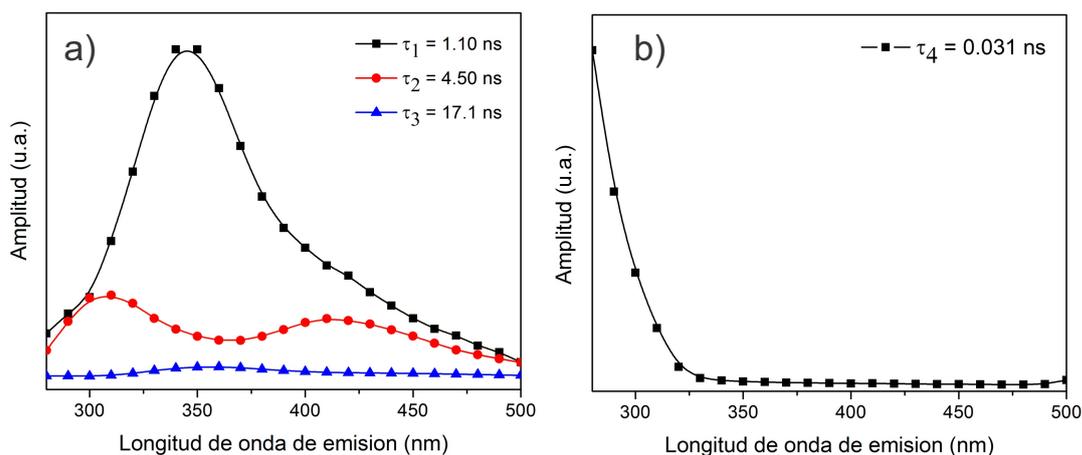


FIGURA 5.7: (a) Factores de amplitud A_1 , A_2 y A_3 de la función de decaimiento exponencial (asociada a tres tiempos de vida del estado excitado diferentes) en función de la longitud de onda de emisión, obtenidos a partir del ajuste global de la respuesta de decaimiento del TRES. (b) Factor de amplitud A_4 en función de la longitud de emisión para el tiempo de vida más corto (τ_4) obtenido del ajuste global del experimento TRES. La longitud de onda de excitación fue de 267 nm. Las curvas de decaimiento fueron tomadas con un intervalo de 10 nm en la longitud de onda de emisión.

0,031 ns. A modo de ejemplo, la curva obtenida midiendo la emisión de la mezcla de AgNCs a 350 nm y su respectivo ajuste obtenido por el equipo se muestra en la Figura 5.6, junto con la respuesta temporal del equipo obtenida a partir de la solución de dispersante (*prompt*). A su vez, el conjunto completo de parámetros obtenidos a partir del ajuste global, junto con la respectiva distribución de Pearson χ^2 para cada longitud de onda de emisión se muestran en la Tabla 5.2.

La Figura 5.7a muestra los factores de amplitud (A_1 , A_2 y A_3) obtenidos a partir del ajuste global, correspondiente a los decaimientos exponenciales asociados a τ_1 , τ_2 y τ_3 , respectivamente, en función de la longitud de onda de emisión. Las longitudes de onda en los máximos de A_1 , A_2 y A_3 en la Figura 5.7a se corresponden con los máximos de emisión de las cuatro islas encontradas en la EEM (Figuras 5.5c y 5.5d), sugiriendo que la deconvolución realizada de esta manera representa de manera correcta la respuesta de fluorescencia de la mezcla de AgNCs en el intervalo de trabajo.

Es necesario notar que el factor A_2 posee dos máximos de emisión, a 305 nm y 410 nm, lo cual puede estar debido a dos procesos de decaimiento con tiempos de vida similares. En acuerdo con lo observado en este trabajo, se han informado en bibliografía tiempos de vida de estados excitados de NCs de Ag y Au en la escala de los nanosegundos[46, 183]. El factor de amplitud A_4 asociado al tiempo de vida $\tau_4 = 0,031$ ns muestra un decrecimiento continuo de su intensidad desde 275 nm hasta 325 nm, como se observa en la Figura 5.7b. Por esto, el tiempo de vida τ_4 es asignado a la luz dispersa proveniente de la fuente de excitación láser, cuyo ancho temporal es $\approx 0,025$ ns. En acuerdo a esto, el tiempo de vida τ_4 fue especialmente requerido para el buen ajuste de los decaimientos a longitudes de onda de emisión cortas, donde mayor luz dispersa recibe el detector.

Con el fin de comprobar la buena calidad del ajuste se realizó una comparación entre la convolución del espectro de emisión, a partir de la contribución de cada componente de la mezcla a la respuesta de emisión, y el espectro de emisión obtenido con el fluorímetro comercial a la misma

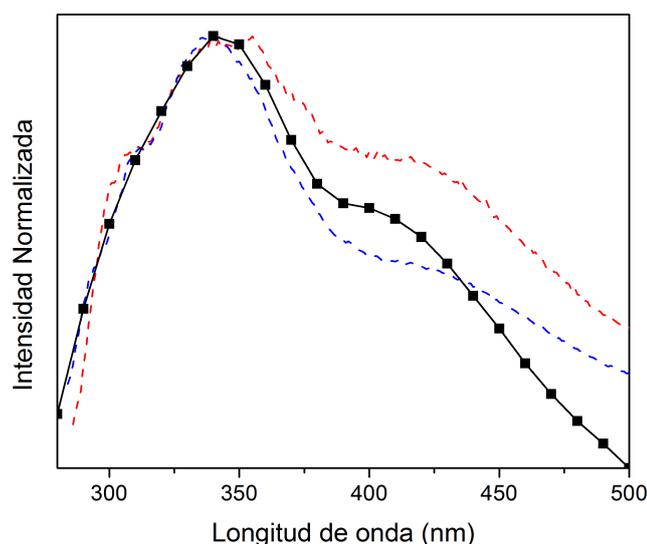


FIGURA 5.8: Convolución del espectro de emisión de la mezcla de AgNCs a partir de los factores A_1 , A_2 y A_3 obtenidos del ajuste global (negro) en comparación a los espectros de emisión de la muestra excitando a 260 nm (azul) y 270 nm (rojo).

longitud de onda de excitación. Esta convolución es igual a la sumatoria de las contribuciones individuales de cada componente de la mezcla a la respuesta de emisión de la forma $\sum A_i \tau_i$, siendo i cada componente. Debido a que los espectros de emisión de la Figura 5.5b se tomaron barriendo la longitud de onda de excitación con intervalos de 10 nm, el espectro convolucionado, obtenido excitando a 267 nm, se comparara con los espectros de emisión excitando a 260 nm y 270 nm (Figura 5.8). Se puede observar que el espectro convolucionado tiene una buena correlación con los espectros de emisión hasta ≈ 430 nm. Una inspección a la Tabla 5.2 de hecho muestra que los valores de χ^2 obtenidos para el ajuste por encima de 430 nm se encuentran por debajo de 0,8, indicando un ajuste relativamente malo. En general, un valor de χ^2 por debajo de 0,75 es indicativo de una cantidad insuficiente de datos para un ajuste significativo[184], aunque también podría deberse a que la banda de emisión observada a 410 nm posee un valor de τ ligeramente diferente a τ_2 , como se mencionó previamente.

A partir de lo analizado anteriormente, es posible asignar los valores de los tiempos de vida observados en el experimento TRES a cada isla reportada en la Tabla 5.1.

Los resultados presentados hasta aquí muestran que la solución de AgNCs contenía Ag_2 , Ag_3^+ y Ag_4^{2+} . Comparando los resultados de EEM y TRES, el espectro de emisión de la solución se deconvolucionó en tres espectros de emisión, cada uno asociado a un tiempo de vida del estado excitado diferente. De esta forma, los tres espectros de emisión y sus tiempos de vida del estado excitado asociados pueden ser asignados a cada uno de los AgNCs encontrados Ag_2 , Ag_3^+ y Ag_4^{2+} .

TABLA 5.2: Amplitud (A) de las curvas de decaimientos obtenidas a partir del ajuste TRES, junto con la distribución de Pearson del ajuste (χ^2) a cada longitud de onda de emisión.

Longitud de onda de emisión (nm)	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	χ^2
280	$(1,7\pm 0,1)\times 10^{-4}$	$(1,01\pm 0,02)\times 10^{-4}$	$(2,9\pm 0,3)\times 10^{-6}$	$(5,880\pm 0,009)\times 10^{-1}$	1,01
290	$(2,4\pm 0,1)\times 10^{-4}$	$(2,12\pm 0,02)\times 10^{-4}$	$(2,5\pm 0,3)\times 10^{-6}$	$(3,400\pm 0,007)\times 10^{-1}$	0,84
300	$(3,1\pm 0,1)\times 10^{-4}$	$(3,02\pm 0,02)\times 10^{-4}$	$(1,9\pm 0,3)\times 10^{-6}$	$(1,980\pm 0,006)\times 10^{-1}$	0,81
310	$(5,2\pm 0,1)\times 10^{-4}$	$(3,14\pm 0,02)\times 10^{-4}$	$(5,2\pm 0,3)\times 10^{-6}$	$(1,010\pm 0,005)\times 10^{-1}$	0,75
320	$(7,9\pm 0,1)\times 10^{-4}$	$(2,82\pm 0,02)\times 10^{-4}$	$(1,22\pm 0,03)\times 10^{-5}$	$(3,29\pm 0,03)\times 10^{-2}$	0,90
330	$(1,08\pm 0,01)\times 10^{-3}$	$(2,24\pm 0,02)\times 10^{-4}$	$(2,31\pm 0,04)\times 10^{-5}$	$(1,33\pm 0,03)\times 10^{-2}$	0,91
340	$(1,26\pm 0,01)\times 10^{-3}$	$(1,82\pm 0,02)\times 10^{-4}$	$(3,22\pm 0,04)\times 10^{-5}$	$(9,0\pm 0,2)\times 10^{-3}$	0,99
350	$(1,26\pm 0,01)\times 10^{-3}$	$(1,55\pm 0,02)\times 10^{-4}$	$(3,67\pm 0,04)\times 10^{-5}$	$(7,3\pm 0,2)\times 10^{-3}$	1,04
360	$(1,11\pm 0,01)\times 10^{-3}$	$(1,40\pm 0,02)\times 10^{-4}$	$(3,73\pm 0,04)\times 10^{-5}$	$(6,3\pm 0,2)\times 10^{-3}$	1,05
370	$(8,88\pm 0,08)\times 10^{-4}$	$(1,39\pm 0,02)\times 10^{-4}$	$(3,42\pm 0,04)\times 10^{-5}$	$(5,2\pm 0,2)\times 10^{-3}$	1,04
380	$(6,93\pm 0,08)\times 10^{-4}$	$(1,55\pm 0,02)\times 10^{-4}$	$(2,85\pm 0,04)\times 10^{-5}$	$(4,9\pm 0,2)\times 10^{-3}$	0,98
390	$(5,72\pm 0,08)\times 10^{-4}$	$(1,81\pm 0,02)\times 10^{-4}$	$(2,32\pm 0,04)\times 10^{-5}$	$(4,3\pm 0,2)\times 10^{-3}$	0,95
400	$(4,96\pm 0,08)\times 10^{-4}$	$(2,08\pm 0,02)\times 10^{-4}$	$(1,95\pm 0,04)\times 10^{-5}$	$(3,9\pm 0,2)\times 10^{-3}$	0,87
410	$(4,28\pm 0,07)\times 10^{-4}$	$(2,23\pm 0,02)\times 10^{-4}$	$(1,64\pm 0,03)\times 10^{-5}$	$(3,9\pm 0,2)\times 10^{-3}$	0,86
420	$(3,89\pm 0,07)\times 10^{-4}$	$(2,16\pm 0,02)\times 10^{-4}$	$(1,50\pm 0,03)\times 10^{-5}$	$(3,1\pm 0,2)\times 10^{-3}$	0,86
430	$(3,25\pm 0,07)\times 10^{-4}$	$(2,02\pm 0,02)\times 10^{-4}$	$(1,43\pm 0,03)\times 10^{-5}$	$(3,0\pm 0,1)\times 10^{-3}$	0,79
440	$(2,73\pm 0,06)\times 10^{-4}$	$(1,80\pm 0,02)\times 10^{-4}$	$(1,31\pm 0,03)\times 10^{-5}$	$(2,5\pm 0,1)\times 10^{-3}$	0,75
450	$(2,24\pm 0,06)\times 10^{-4}$	$(1,56\pm 0,02)\times 10^{-4}$	$(1,21\pm 0,03)\times 10^{-5}$	$(2,4\pm 0,1)\times 10^{-3}$	0,77
460	$(1,84\pm 0,05)\times 10^{-4}$	$(1,28\pm 0,02)\times 10^{-4}$	$(1,09\pm 0,03)\times 10^{-5}$	$(2,3\pm 0,1)\times 10^{-3}$	0,75
470	$(1,58\pm 0,05)\times 10^{-4}$	$(1,03\pm 0,01)\times 10^{-4}$	$(9,3\pm 0,3)\times 10^{-6}$	$(1,7\pm 0,1)\times 10^{-3}$	0,69
480	$(1,19\pm 0,05)\times 10^{-4}$	$(8,4\pm 0,2)\times 10^{-5}$	$(8,1\pm 0,3)\times 10^{-6}$	$(1,9\pm 0,1)\times 10^{-3}$	0,64
490	$(9,4\pm 0,4)\times 10^{-5}$	$(6,8\pm 0,1)\times 10^{-5}$	$(6,6\pm 0,2)\times 10^{-6}$	$(2,6\pm 0,1)\times 10^{-3}$	0,61
500	$(5,5\pm 0,4)\times 10^{-5}$	$(5,4\pm 0,1)\times 10^{-5}$	$(5,0\pm 0,2)\times 10^{-6}$	$(9,8\pm 0,1)\times 10^{-3}$	0,62

5.3.2. Caracterización Teórica

A fin de soportar la asignación realizada, se realizó una caracterización teórica de los AgNCs encontrados. Como se detalló en la sección Sistema Experimental en este capítulo se optimizaron las estructuras de los estados fundamental y excitado para los tres AgNCs encontrados (Ag₂, Ag₃⁺ y Ag₄²⁺) y se calcularon los espectros de absorción de las estructuras de menor energía para cada AgNC. Si bien los espectros calculados de esta manera corresponden a espectros de absorción, su comparación con el espectro de absorción experimental se vuelve imposible teniendo en cuenta la fuerte absorbancia de la muestra por debajo de 225 nm (Figura 5.2). Por esto, asumiendo que en estos sistemas la absorción de luz lleva a una respuesta de emisión de fluorescencia, la comparación de los espectros

calculados se realiza con el espectro de excitación de fluorescencia total, el cual es obtenido como la suma de los espectros de excitación experimentales tomados en todo el intervalo espectral de trabajo.

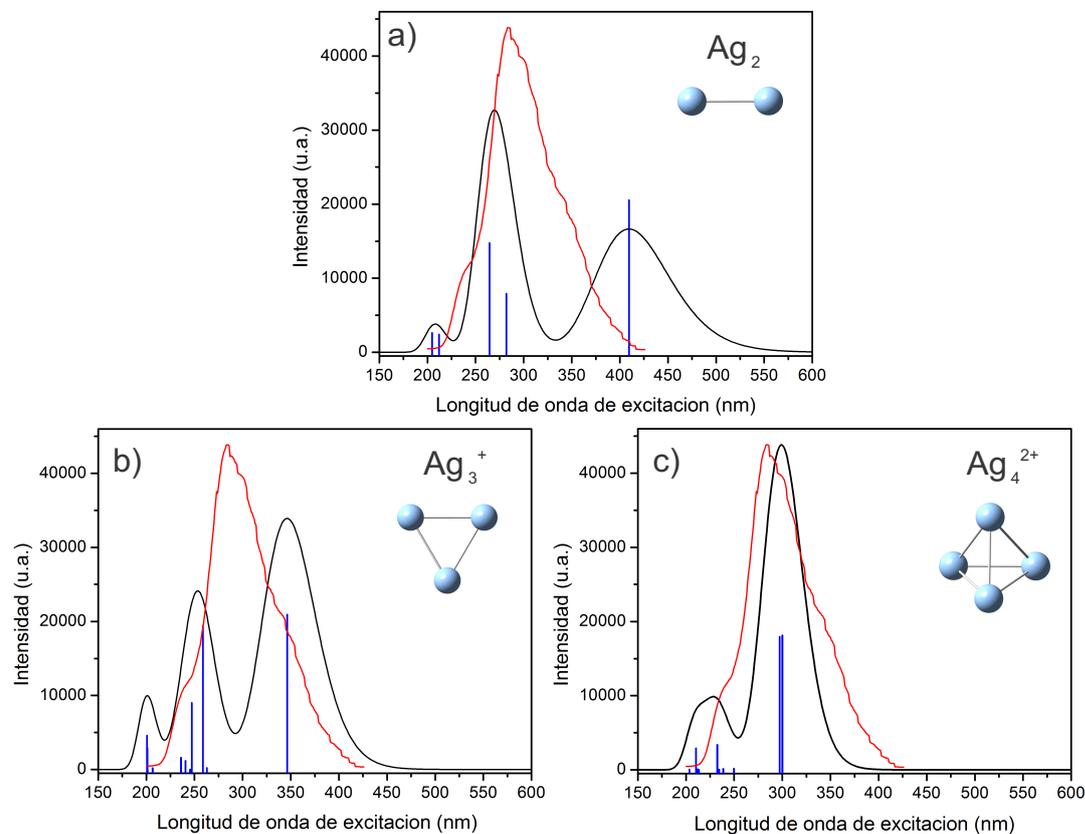


FIGURA 5.9: Comparación entre los espectros de absorción calculados de las estructuras más estables de Ag_2 , Ag_3^+ y Ag_4^{2+} (negro) y el espectro experimental de excitación de fluorescencia total (rojo). Las fuerzas del oscilador se grafica como líneas azules verticales.

Las estructuras de menor energía encontradas para los AgNCs Ag_2 , Ag_3^+ y Ag_4^{2+} son lineal ($D_{\infty h}$), trigonal (D_{3h}) y tetraédrica (T_d), respectivamente. Estas se muestran en la parte superior derecha de cada gráfico en la Figura 5.9, junto con el espectro de excitación calculado, en comparación con el espectro de excitación de fluorescencia total obtenido experimentalmente. Es importante notar que las dos bandas características observadas en el espectro de absorción experimental, a ≈ 290 nm y ≈ 220 nm, también son observadas en el espectro de excitación de fluorescencia total, validando así la aproximación comentada en el párrafo anterior. Las

fuerzas del oscilador para cada transición de los espectros de absorción calculados se muestran como líneas azules verticales.

Las principales transiciones electrónicas, junto con los correspondientes orbitales moleculares involucrados para los NCs Ag_2 , Ag_3^+ y Ag_4^{2+} se presentan en las Tablas 5.3, 5.4 y 5.5, respectivamente. Si bien se puede notar que el espectro calculado para Ag_4^{2+} es el que mejor ajusta al espectro experimental, los resultados de HRMS y TRES mostraron que la mezcla consta de varios tipos de AgNCs diferentes. Teniendo en cuenta esto, se puede observar que los tres espectros de los AgNCs estudiados presentan ciertas similitudes, siendo éstas una banda a ≈ 200 nm, otra banda a ≈ 300 nm y la banda de más baja energía ($\lambda > 300$ nm) correspondiente a la transición HOMO \rightarrow LUMO. Si bien es aceptado que mientras mayor es el tamaño del NCs, menor es la diferencia de energía HOMO - LUMO ($\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$)[185], esto es sólo cierto para NCs con el mismo estado de carga. En este caso particular, la energía de esta transición aumenta con el tamaño del AgNCs ($\text{Ag}_2 < \text{Ag}_3^+ < \text{Ag}_4^{2+}$), como puede observarse en las Tablas 5.3, 5.4 y 5.5, pero también lo hace su carga positiva, haciendo así incomparables las energías de transición HOMO \rightarrow LUMO.

Por otro lado, la *Energy Gap Law* (EGL, por sus siglas en inglés)[186] establece una correlación entre el tiempo de vida del estado excitado (incluyendo procesos radiativos y no radiativos) y el ΔE entre los estados involucrados en el proceso no radiativo. Esta ley es comúnmente usada para correlacionar tiempos de vida de estados excitados con $\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$. Esto es correcto si se comparan los tiempos de vida del primer estado excitado de diferentes especies/moléculas que involucran la transición HOMO \rightarrow LUMO. De otra manera, si los tiempos de vida del estado excitado corresponden a otros estados superiores, no es correcto correlacionarlos con el $\Delta E_{\text{HOMO-LUMO}}$, sino con el ΔE entre el estado excitado y el estado responsable de la desactivación no radiativa. En

TABLA 5.3: Orbitales moleculares (OMs), energías de transición y fuerzas del oscilador para los seis primeros estados electrónicos excitados de Ag_2 .

Estado excitado	Principales contribuciones de orbitales moleculares	Energía de transición eV / nm	Fuerza del oscilador ($S_0 \rightarrow S_n$)
1	19 \rightarrow 20 HOMO - LUMO	3,028 / 409,4	0,411
2	18 \rightarrow 20	4,300 / 288,4	0,000
3	52 % (19 \rightarrow 21) + 45 % (16 \rightarrow 20)	4,397 / 282,0	0,158
4	52 % (19 \rightarrow 22) + 45 % (17 \rightarrow 20)	4,397 / 282,0	0,158
5	52 % (16 \rightarrow 20) + 46 % (19 \rightarrow 21)	4,687 / 264,6	0,295
6	52 % (17 \rightarrow 20) + 46 % (19 \rightarrow 22)	4,687 / 264,6	0,295

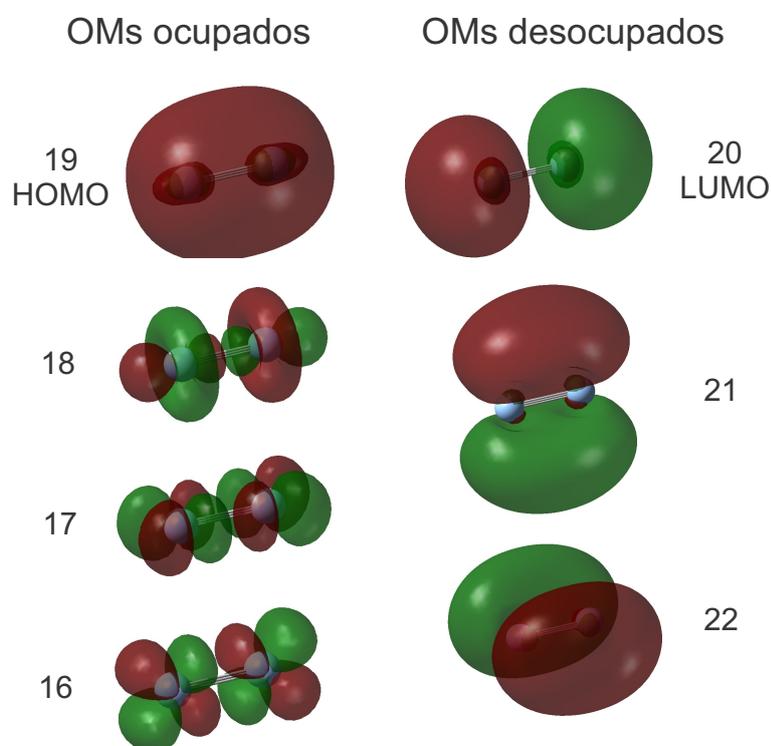
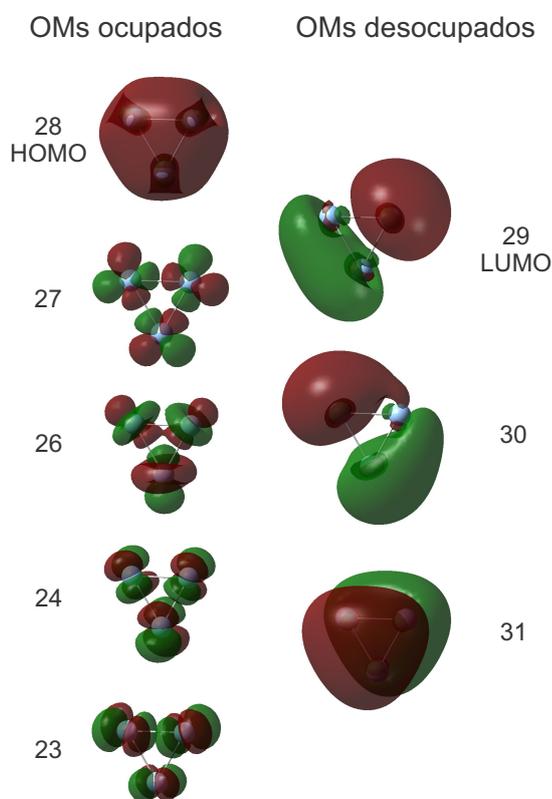


FIGURA 5.10: Orbitales moleculares (OMs) ocupados y desocupados involucrados en los seis primeros estados electrónicos excitados del NCs Ag_2 . En todos los casos se utilizó un isovalor de 0,02. Valores positivos y negativos de la función de onda se grafican en rojo y verde, respectivamente.

consecuencia, mientras más chico es el ΔE entre los dos estados involucrados en procesos de conversión interna o cruzamiento de estados, más corto es el tiempo de vida del estado excitado del estado emisor.

TABLA 5.4: Orbitales moleculares (OMs), energías de transición y fuerzas del oscilador para los seis primeros estados electrónicos excitados de Ag_3^+ .

Estado excitado	Principales contribuciones de orbitales moleculares	Energía de transición eV / nm	Fuerza del oscilador ($S_0 \rightarrow S_n$)
1	61 % (28 \rightarrow 29) + 32 % (28 \rightarrow 30) 28 HOMO - 29 LUMO	3,581 / 346,3	0,419
2	32 % (28 \rightarrow 29) + 61 % (28 \rightarrow 30)	3,582 / 346,2	0,419
3	41 % (27 \rightarrow 29) + 51 % (27 \rightarrow 30)	4,716 / 262,9	0,004
4	51 % (27 \rightarrow 29) + 51 % (29 \rightarrow 30)	4,716 / 262,9	0,004
5	28 \rightarrow 31	4,792 / 258,7	0,389

FIGURA 5.11: Orbitales moleculares (OMs) ocupados y desocupados involucrados en los seis primeros estados electrónicos excitados del NCs Ag_3^+ . En todos los casos se utilizó un isovalor de 0,02. Valores positivos y negativos de la función de onda se grafican en rojo y verde, respectivamente.

Por otro lado, la velocidad del proceso no radiativo puede depender fuertemente de la densidad de estados de los sistemas, favoreciendo el acoplamiento entre dos estados electrónicos con el aumento en la densidad de estados de la especie/molécula. La densidad de estados incrementa con

TABLA 5.5: Orbitales moleculares (OMs), energías de transición y fuerzas del oscilador para los cinco primeros estados electrónicos excitados de Ag_4^{2+} .

Estado excitado	Principales contribuciones de orbitales moleculares	Energía de transición eV / nm	Fuerza del oscilador ($S_0 \rightarrow S_n$)
1	37→38 HOMO - LUMO	4,131 / 300,1	0,363
2	37→39	4,133 / 300,0	0,362
3	37→40	4,170 / 297,3	0,359
4	47 % (34→38) + 46 % (35→39)	4,918 / 252,1	0,000
5	36→40	4,931 / 251,4	0,000

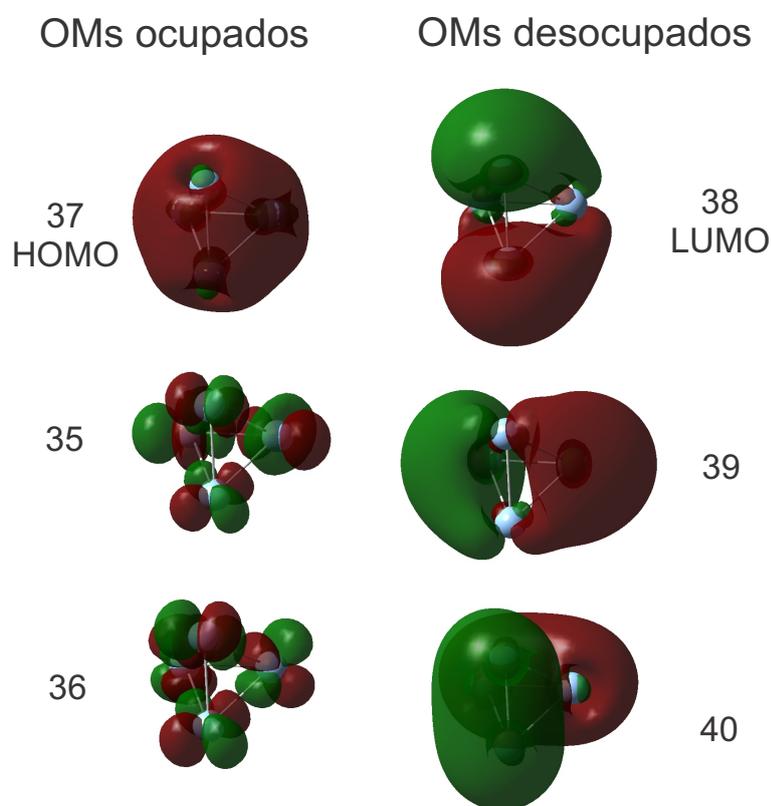


FIGURA 5.12: Orbitales moleculares (OMs) ocupados y desocupados involucrados en los cinco primeros estados electrónicos excitados del NCs Ag_4^{2+} . En todos los casos se utilizó un isovalor de 0,02. Valores positivos y negativos de la función de onda se grafican en rojo y verde, respectivamente.

el aumento del número de átomos del NCs, y en consecuencia, el tiempo de vida del estado excitado disminuye.

La asignación de todas las bandas observadas experimentalmente fue entonces realizada teniendo en cuenta la discusión del párrafo anterior y la

comparación con los espectros teóricos, considerando la energías de transición calculadas y sus correspondientes fuerzas del oscilador.

La banda a $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 280/340 nm (isla C, Figura 5.5c), asociada a $\tau_1 = 1,10$ ns fue asignada a Ag_4^{2+} . Así mismo, el espectro de excitación calculado para este clúster muestra una banda ubicada a 300 nm, correspondiente a la excitación de los estados excitados S_1 , S_2 y S_3 (Tabla 5.5). De todos los espectros calculados, esta banda es la banda más cercana al máximo del espectro experimental de excitación de fluorescencia total (280 nm). Una banda de absorción a ≈ 275 nm fue asignada anteriormente al clúster Ag_4^{2+} , en experimentos de radiólisis pulsada[187-191]. Además, esta banda es asociada al tiempo de vida del estado excitado más corto debido a la mayor densidad de estados de este clúster (Ag_4^{2+}) con respecto a los más pequeños (Ag_2 y Ag_3^+), permitiendo un proceso de conversión interna más rápido.

El tiempo de vida $\tau_2 = 4,50$ ns fue asignado al clúster Ag_3^+ . Las bandas asociadas a este tiempo de vida, ubicadas a $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 275/305 nm (isla B, Figura 5.5a) y 310/410 nm (isla D, Figura 5.5a), pueden ser asignadas a las bandas de excitación calculadas a 263 nm y 346 nm para el clúster Ag_3^+ , correspondiente a las transiciones desde estado fundamental a los estados excitados S_5 y S_1/S_2 , respectivamente, como se muestra en la Tabla 5.4.

Previamente, se asignó una banda de absorción transiente de tiempo de vida largo a ≈ 310 nm al clúster Ag_3^+ generado durante la formación de Ag coloidal, por experimentos de radiólisis pulsada[191].

La gran diferencia de energía (7686 cm^{-1}) entre la excitación y la emisión de esta banda ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 310/410 nm), en comparación a la correspondiente diferencia de energía (3576 cm^{-1}) de la banda a $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 275/305 nm sugiere un cambio mayor entre las geometrías de equilibrio del estado fundamental y el estado excitado S_1/S_2 que entre el estado fundamental y el estado excitado S_5 . En tal sentido, las geometrías de equilibrio calculadas para el estado fundamental y el estado excitado S_5 muestran una estructura

triangular (simetría D_{3h}), mientras que la geometría correspondiente al primer estado excitado es lineal (simetría $D_{\infty h}$), en acuerdo con la suposición planteada.

Para obtener más información acerca de los estados involucrados en la fotoexcitación de este clúster, se calculó la curva de energía potencial (PEC, por sus siglas en inglés) de los distintos estados electrónicos del clúster, a lo largo de la coordenada del ángulo $Ag-\widehat{Ag}-Ag$ manteniendo las distancias de enlace rígidas. En la Figura 5.13a se muestran las correspondientes PECs. Como se puede observar, el mínimo de energía en las PECs para el estado fundamental y el estado excitado S_5 , se encuentra a un ángulo $Ag-\widehat{Ag}-Ag$ de 60° como es esperado para una estructura triangular. En su lugar, el mínimo de energía de la PEC para el estado excitado S_1/S_2 está ubicado a 180° , correspondiente a una estructura lineal. Por esto, luego de la excitación al estado excitado S_5 (flecha violeta en Figura 5.13a) la emisión ocurre desde la misma región de la PEC llevando a un moderado corrimiento de Stokes, como es indicado por la flecha azul en la Figura 5.13a. Contrariamente, la excitación vertical al estado excitado S_1/S_2 (flecha verde en Figura 5.13a) tendrá lugar a una geometría similar a la del estado fundamental, la cual se encuentra por encima de la pequeña barrera de energía para la apertura del triángulo. Por consiguiente, ésta se relajará en la escala temporal de una vibración (algunos femtosegundos) a la estructura lineal, de mayor estabilidad. Luego de esto, la emisión ocurrirá verticalmente desde la estructura lineal en el estado excitado S_1 al estado fundamental, donde la PEC alcanza un máximo (flecha roja en Figura 5.13a), lo que en consecuencia genera el gran corrimiento de Stokes esperado para esta transición.

Finalmente, la banda con $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ a 240/350 nm (isla A en Figura 5.5c) asociada a $\tau_3 = 17,1$ ns es asignada a la banda de excitación calculada a 265 nm del clúster Ag_2 , correspondiente a la excitación desde el estado fundamental al estado excitado S_5/S_6 (Tabla 5.3). Esta banda muestra un

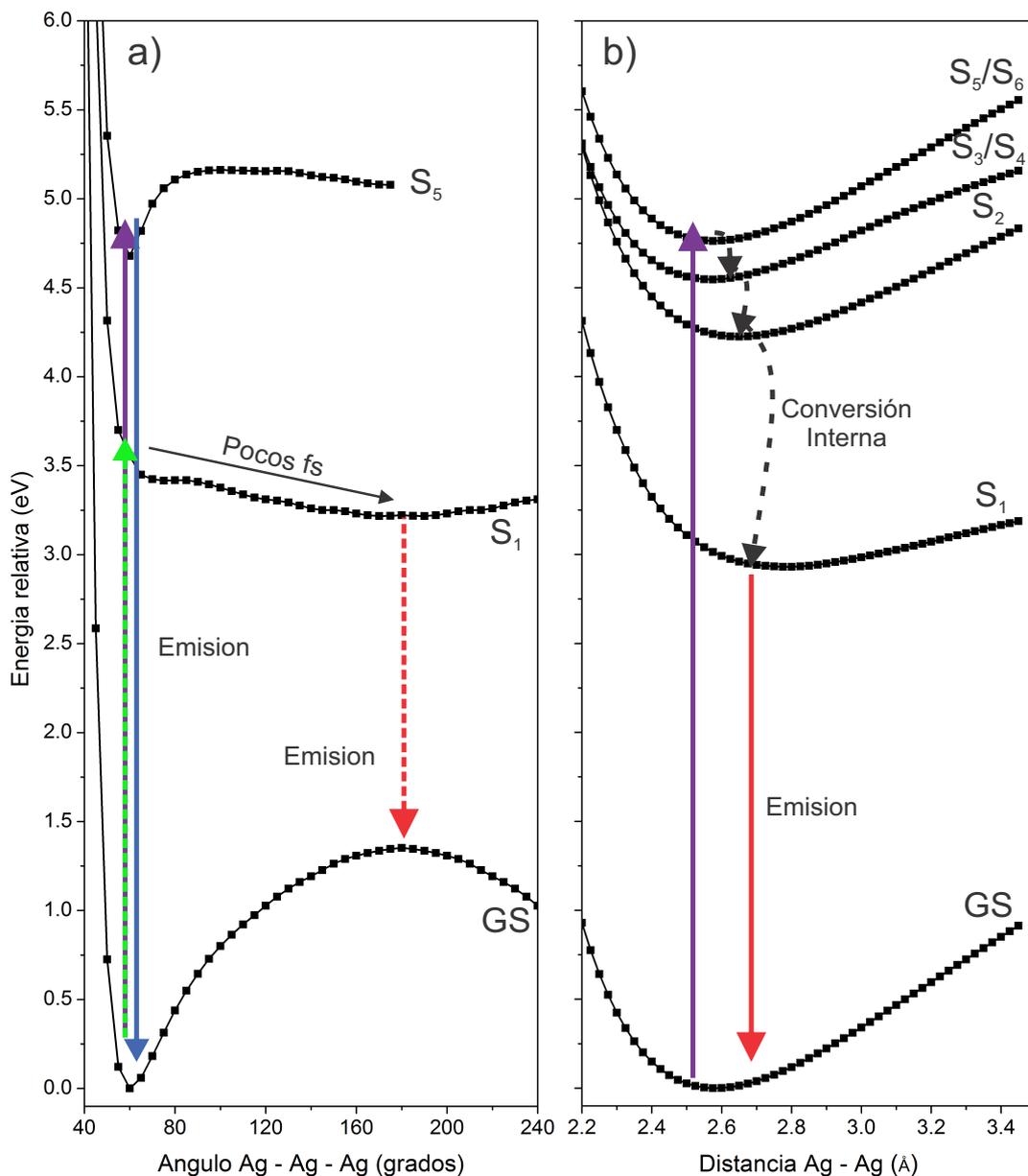


FIGURA 5.13: (a) Curvas de energía potencial a lo largo de la coordenada angular $\widehat{\text{Ag-Ag-Ag}}$ de los estados fundamental (S_0) y excitados S_1 y S_5 para el clúster Ag_3^+ , manteniendo las distancias de enlace rígidas. (b) Curvas de energía potencial a lo largo de la distancia de enlace Ag-Ag de los estados fundamental (S_0) y estados excitados S_1 , S_2 , S_3/S_4 y S_5/S_6 , para el clúster Ag_2 . El eje vertical indica la energía relativa al mínimo de la PEC del estado fundamental. Los procesos de excitación y emisión están representado por flechas de colores. La PEC del estado excitado S_5 en (a) se muestra hasta 180° debido a una fuerte mezcla de estado excitados, que no puede ser resuelta por la metodología computacional empleada.

gran ΔE (13095 cm^{-1}) entre los máximos de excitación y de emisión (Tabla 5.1). Este ΔE_{ex-em} se puede deber a una gran diferencia de geometría entre

los estados fundamental y ópticamente excitados S_5/S_6 como en el caso del clúster Ag_3^+ , o bien debido a la emisión desde un estado excitado de menor energía poblado por conversión interna desde el estado excitado poblado ópticamente.

Las PECs calculadas (Figura 5.13b) para los estados fundamental y excitado S_5/S_6 muestran que el mínimo se encuentra a la misma distancia Ag-Ag (2,57 Å), sugiriendo que es poco probable que el ΔE_{ex-em} observado se deba a cambios de geometría entre los estados involucrados. Por otro lado, analizando la Tabla 5.3, se puede observar que el ΔE entre el estado excitado ópticamente S_5 (4,69 eV) y el S_4/S_3 (4,4 eV) es muy pequeño ($\Delta E_{5-4/3} = 0,29$ eV), como también el $\Delta E_{4/3-2} = 0,10$ eV entre los estados excitados S_4/S_3 y S_2 (4,30 eV). Teniendo en cuenta la EGL[186], mientras más chico es el ΔE entre dos estados, más rápido es el proceso de conversión interna de uno a otro, haciendo del estado S_5/S_6 un estado prácticamente oscuro que experimenta una conversión interna muy rápida hacia los estados excitados S_4/S_5 . Luego, los estados S_4/S_3 se desactivan de la misma forma al estado excitado S_2 . Por último, el estado excitado S_2 no puede desactivarse radiativamente ya que la fuerza del oscilador para la transición al estado fundamental es cero (Tabla 5.3). Por este motivo, el estado excitado S_2 sólo puede desactivarse nuevamente por conversión interna al estado excitado S_1 . La desactivación no radiativa del estado excitado S_1 al estado fundamental es muy poco probable debido al gran diferencia de energía entre ambos estados ($\Delta E_{1-0} = 3,03$ eV) y la baja densidad de estados del clúster. Sin embargo, la fuerza del oscilador para la transición radiativa $S_1 \rightarrow S_0$ es considerablemente alta (0,411), y por este motivo el estado S_1 es el único estado emisor del clúster Ag_2 . De acuerdo al mecanismo planteado, el ΔE_{ex-em} calculado entre la excitación óptica a 264 nm (flecha violeta en Figura 5.13b) y la emisión a 409 nm (flecha roja en Figura 5.13b) es ≈ 13363 cm^{-1} , en acuerdo con el valor experimental de 13095 cm^{-1} (Tabla 5.1)

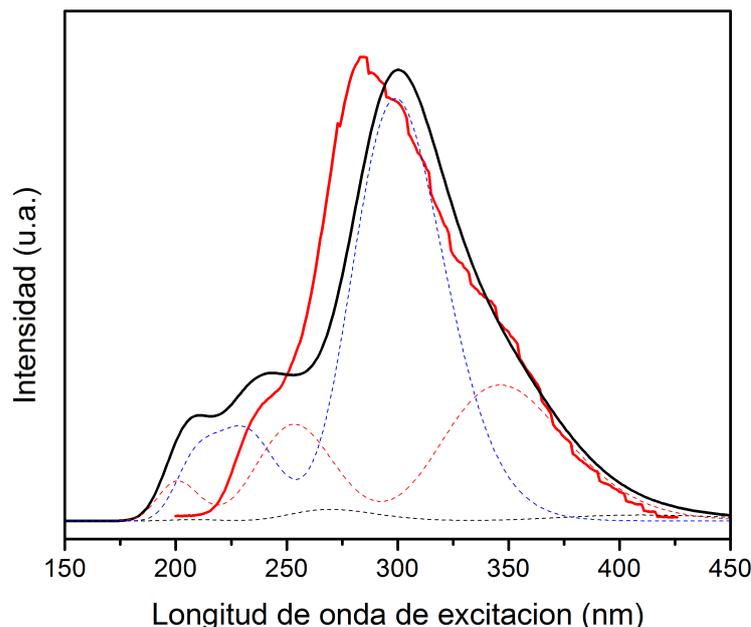


FIGURA 5.14: En línea sólida, la comparación entre el espectro teórico como combinación lineal de los espectros de excitación calculados para Ag_2 , Ag_3^+ y Ag_4^{2+} , obtenido con un ajuste SIMPLEX (negro) y el espectro experimental de excitación de fluorescencia total (rojo). En línea punteada negra, roja y azul los espectros de excitación calculados de para Ag_2 , Ag_3^+ y Ag_4^{2+} , respectivamente, pesados por el factor de ajuste SIMPLEX.

Considerando la asignación realizada más arriba, el espectro de excitación de fluorescencia total fue ajustado mediante un algoritmo SIMPLEX a una combinación lineal de los espectros de excitación calculados para los tres AgNCs (Ag_2 , Ag_3^+ y Ag_4^{2+}), pesados por un factor relacionado con la población relativa de cada uno. El resultado, mostrado en la Figura 5.14, muestra muy buena concordancia entre la sumatoria de los espectros calculados y el espectro experimental. Los pesos relativos obtenidos a partir del ajuste fueron 0,04 para Ag_2 , 0,28 para Ag_3^+ y 0,68 para Ag_4^{2+} . Aunque la estimación de la concentración relativa de cada AgNCs en la mezcla, a partir de los espectros de excitación, está modulada por su correspondiente rendimiento cuántico de fluorescencia, el cual es desconocido, se puede concluir que el AgNCs más abundante en la mezcla es Ag_4^{2+} , el cual de hecho se ha reportado como un AgNCs termodinámicamente muy estable[188-192].

En trabajos previos realizados por Buceta et al.[34] los autores reportaron que su solución estaba compuesta principalmente por Ag_2 y Ag_3 . Considerando el estado de carga y la composición química de los iones observados en los espectros de masas reportados por los autores, estos AgNCs corresponderían a Ag_2 y Ag_3^+ . En su trabajo, el máximo del espectro de emisión, luego de la excitación a 230 nm, está ubicado a 305 nm, con una pequeña banda a 425 nm. En este trabajo esas bandas se asignaron al clúster Ag_3^+ , en acuerdo con lo informado por estos autores[34].

Por consiguiente, las diferencias observadas en los espectros de emisión reportados por Buceta et al.[34] y los del presente trabajo son reconciliadas teniendo en cuenta la diferente concentración relativa de los AgNCs en la mezcla. La diferente composición puede deberse a diferencias en las condiciones experimentales de la síntesis de los AgNCs que hasta el momento no se han podido determinar.

5.4. Conclusiones Parciales

En esta sección se mostraron los resultados de la síntesis de pequeños AgNCs en solución acuosa, libre de estabilizantes, mediante la electrosíntesis descrita por López-Quintela y colaboradores[34]. Estudios de HRMS mostraron complejos conteniendo los clústeres AgNCs Ag_2 , Ag_3^+ y Ag_4^{2+} , con estructuras electrónicas de capa cerrada. Mediante el análisis de EEM, en combinación con TRES y cálculos teóricos a nivel DFT/TD-DFT se logró deconvolucionar los espectros de emisión y excitación y asignar las diferentes transiciones y tiempos de vida a los AgNCs Ag_2 , Ag_3^+ y Ag_4^{2+} .

Tanto la síntesis electroquímica de estos nanoclústeres, como la caracterización de sus propiedades ópticas tiene principal importancia a la hora de generar AgNCs híbridos fluorescentes con diferentes matrices poliméricas, principalmente oligonucleótidos de diferente largo y secuencia

de bases. Como bien se discutió en el Capítulo 4, si bien en AgNCs hibridizados con cadenas de ADN, la secuencia de bases como el largo de la cadena son características que pueden afectar las propiedades ópticas en estos sistemas, el principal protagonista en este esquema es el clúster metálico. En este sentido el estudio presentado en esta sección intenta dar luz hacia el entendimiento de las propiedades ópticas y dinámicas en estos sistemas, desde una enfoque *bottom-up*.

Capítulo 6

Conclusiones y Perspectivas

6.1. Conclusiones Finales

El objetivo central de esta tesis doctoral fue estudiar y entender los mecanismos que gobiernan la fotofísica de pequeños nanoclústeres de Ag, tanto aislados como en matrices de ADN. Este objetivo se abordó inicialmente mediante el estudio de pequeños complejos Citosina– M^+ , con $M : Ag, Na, K$, como una aproximación *bottom-up* para ganar información fundamental sobre la interacción ADN-metal. Luego, en dirección hacia una mejor representación del sistema, se estudiaron computacionalmente distintos modelos de tamaños intermedios, conteniendo Ag^0 y/o Ag^+ e hibridizados en cadenas cortas de ADN ricas en Citosina. Por último, con el objetivo de aportar más información sobre el comportamiento de estos sistemas, se estudio la espectroscopía de pequeños nanoclústeres fluorescentes sintetizados en solución acuosa y libre de ligandos protectores, como precursores estables para la síntesis racional de clústeres ADN- Ag_n con aplicaciones en nanociencia y nanomedicina.

Particularmente, la espectroscopía UV de complejos Citosina– M^+ , con $M : Ag, Na, K$, en fase gaseosa mostró una clara diferencia según la identidad del catión metálico utilizado. Luego de la excitación UV los patrones de fragmentación de los complejos $CytNa^+$ y $CytK^+$ mostraron disociación a Cyt neutra y Na^+ y K^+ como productos, respectivamente, mientras que el complejo $CytAg^+$ se fragmenta siguiendo un canal de disociación por transferencia de carga (TC) a Cyt^+ y Ag neutra. En este último, el primer estado excitado del complejo corresponde a un estado de TC en el cual un electrón ubicado en la región de la Cyt se promueve al catión Ag^+ . En cambio, para los complejos $CytNa^+$ y $CytK^+$, debido a los bajos potenciales de ionización de Na y K, el estado de TC que podría llevar a la fragmentación en Cyt^+ y M se encuentra muy alto en energía, ≈ 2 eV por encima de la máxima energía de excitación utilizada en los

experimentos. Estos resultados dan indicio de que la identidad del metal puede ser determinante en las propiedades fotofísicas de estos sistemas. También, el estado de TC en el complejo CytAg^+ podría sentar las bases para entender la fotofísica que gobierna la dinámica electrónica en estos complejos luego de la absorción de luz.

Los resultados sobre la espectroscopía y dinámica de agregados CytM^+ , con $M : \text{Ag}, \text{Na}, \text{K}$, en fase gaseosa, se condensan en las siguientes publicaciones en revistas internacionales:

- Taccone, M. I.; Féraud, G.; Berdakin, M.; Dedonder-Lardeux, C.; Jouvét, C. y Pino, G. A. Communication: UV Photoionization of Cytosine Catalyzed by Ag^+ *J. Chem. Phys.*, **2015**, *143*, 4, 041103. DOI:10.1063/1.4927469
- Taccone, M. I.; Cruz-Ortiz, A.; Dezalay, J.; Soorkia, S.; Broquier, M.; Gregoire, G.; Sánchez, C. y Pino, G. UV Photofragmentation of Cold Cytosine– M^+ Complexes ($\text{M}^+ : \text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Ag}^+$) *J. Phys. Chem. A* **2019**, *123*, 36, 7744-7750. DOI:10.1021/acs.jpca.9b06495

En base a estos resultados, y con el objetivo de alcanzar una mejor representación del sistema, se estudiaron computacionalmente distintos modelos de clústeres ADN- Ag_n a partir de dinámica molecular y dinámica cuántica. Primero se utilizó un modelo reduccionista compuesto de dos hebras de seis Cyt, unidas por un nanoalambre de Ag neutro, sin la presencia de los grupos azúcar y fosfato. Este modelo mostró características ópticas similares a las reportadas en bibliografía para los clústeres ADN- Ag_n , como ser la banda en la región UV, correspondiente a la excitación de las bases del ADN, y la banda sintonizable en el visible. También se observó un proceso de transferencia de carga desde la base al cable metálico, en concordancia con lo obtenido para el complejo más simple CytAg^+ en fase gaseosa. También, un análisis de las propiedades

ópticas en un modelo con el clúster metálico Ag_n totalmente iónico mostró que un fuerte acoplamiento entre estados por debajo y encima de la energía de Fermi podría ser el motivo por el cual los clústeres ADN- Ag_n totalmente iónicos no fluorescen.

Al estudiar un modelo similar al propuesto por Gwinn y colaboradores, en donde cationes Ag^+ hacen de puente de enlace entre un cable metálico de Ag neutra, en forma de *zig-zag*, y las bases del ADN, también se observaron rasgos ópticos característicos de estos sistemas. Esto indica que la estructura propuesta por Gwinn y colaboradores puede ser una estructura plausible para explicar las propiedades ópticas de los clústeres ADN- Ag_n . Por otro lado, se observaron dos procesos de TC diferentes, que podrían estar relacionados con lo observado para el complejo $CytAg^+$ en fase gaseosa.

Además, el mismo análisis teniendo en cuenta los grupos azúcar y fosfato en ningún modelo mostró modificaciones significativas en las características observadas, sugiriendo que las propiedades ópticas en estos complejos son debidas principalmente a la interacción entre las bases del ADN y el metal.

En particular, estos resultados son un paso importante hacia la dilucidación estructural y el entendimiento de los procesos fotofísicos en estos sistemas luego de la absorción de luz.

Estos resultados están condensados en las siguientes publicaciones en revistas internacionales:

- Berdakin, M.; Taccone, M. I.; Julian, K. J.; Pino, G. y Sánchez, C. G. Disentangling the Photophysics of DNA-Stabilized Silver Nanocluster Emitters. *J. Phys. Chem. C*, **2016**, *120*, 42, 24409–24416. DOI:10.1021/acs.jpcc.6b05363
- Berdakin, M.; Taccone, M. I.; Pino, G. y Sánchez, C. G. DNA-Protected Silver Emitters: Charge Dependent Switching of Fluorescence. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2017**, *19*, 8, 5721-5726. DOI:10.1039/C6CP08345E

- Taccone, M. I.; Berdakin, M.; Pino, G. y Sánchez, C. G. Optical Properties and Charge Distribution in Rod-Shape DNA-Silver Cluster Emitters. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2018**, *20*, 35, 22510-22516. DOI:10.1039/C8CP03895C

Por último, se lograron sintetizar exitosamente pequeños AgNCs fluorescentes en solución acuosa y libre de ligandos protectores, mediante la técnica electroquímica descrita por López-Quintela y colaboradores, en dirección a la síntesis dirigida de clústeres ADN-Ag_n. Los análisis por espectrometría de masas comprobaron la presencia de complejos conteniendo los clústeres Ag₂, Ag₃⁺ y Ag₄²⁺, con estructuras electrónicas de capa cerrada, a diferencia de lo propuesto por López-Quintela y colaboradores. Mediante el análisis de las matrices de excitación/emisión, en combinación con espectroscopía de fluorescencia resuelta en el tiempo y cálculos *ab initio* a nivel DFT/TD-DFT se logró deconvolucionar el espectro de emisión y excitación de la mezcla y asignar las diferentes transiciones y tiempos de vida a los AgNCs Ag₂, Ag₃⁺ y Ag₄²⁺.

Estos resultados están siendo redactados en la siguiente publicación:

- Taccone, M. I.; Fernandez, R. A.; Molina, F.; Gustín, I.; Sánchez, C. G.; Dassie, S. A. y Pino, G. A. Spectroscopic and Theoretical Characterization of Electrochemically Generated Silver Nanoclusters. *J. Phys. Chem. C*, (En redacción)

Como se discutió previamente, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral son un avance hacia la posibilidad de sintetizar clústeres ADN-Ag_n con un número preciso de átomos de Ag en el clúster metálico, y de esta forma lograr un mayor control sobre las características ópticas de estos complejos.

6.2. Perspectivas

Se logró dar respuesta a muchas de las hipótesis planteadas en la introducción de esta tesis doctoral respecto a las características de estos sistemas. Sin embargo, muchas otras aún quedan por analizar. En forma de opinión personal, a continuación se plantean algunas perspectivas interesantes en dirección a la aplicabilidad de estos sistemas en nanociencia.

En primer lugar, el estudio de la fotofísica de complejos entre bases del ADN, distintas de Cyt, y el catión Ag^+ podría arrojar mayor información a cómo influye el estado de TC en las propiedades ópticas de los clústeres ADN- Ag_n . En particular, por qué la abundancia de Cyt o Gua en la secuencia de bases utilizada favorece la formación de clústeres ADN- Ag_n fluorescentes.

Por otro lado, si bien es sabido que en los clústeres ADN- Ag_n el largo del cable metálico Ag_n neutro es el principal responsable de la sintonización de la banda de absorción en el visible, la secuencia de bases utilizada también modifica su posición en el espectro. Muy recientemente, Gwinn y colaboradores investigaron la influencia de la secuencia de bases en el *color* del clúster ADN- Ag_n mediante un análisis estadístico a través de *machine-learning*[51]. En relación a esto, una dilucidación fehaciente de la estructura de estos complejos, junto con un estudio computacional de cómo varía la dinámica electrónica en función de la secuencia de bases, son eslabones necesarios para la síntesis racional de estos sistemas.

Por último, como se mencionó antes, la síntesis electroquímica de AgNCs en solución y libres de ligandos protectores tiene principal importancia en la síntesis de clústeres ADN- Ag_n ya que permitiría un control preciso del número de átomos de Ag en el clúster metálico. Debido a la gran estabilidad de estos AgNCs y su condición libre de ligandos, son precursores ideales para la síntesis racional de estos sistemas. A partir de esto, evaluar la eficiencia de la síntesis de clústeres ADN- Ag_n mediante el

uso de AgNCs sintetizados electroquímicamente, en lugar de AgNO_3 y NaBH_4 como reductor es el primer paso hacia un mayor control sobre la composición y estado de carga del clúster metálico Ag_n .

Bibliografía

- [1] O. T. Avery, C. M. Macleod y M. McCarty, *The Journal of Experimental Medicine* **1944**, 79, 137-158.
- [2] R. E. Franklin y R. G. Gosling, *Nature* **1953**, 171, 740-741.
- [3] J. D. Watson y F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737-738.
- [4] W. Saenger, *Principles of nucleic acid structure*, Springer Advanced Texts in Chemistry (Cantor, C.R., Ed.), Springer-Verlag, **1984**.
- [5] S. Neidle, *Nucleic Acid Structure and Recognition*, Oxford University Press, **2002**.
- [6] C. R. Calladine, H. R. Drew, B. F. Luisi y A. A. Travers, *Understanding DNA*, Third Edition, Academic Press, **2004**.
- [7] S. Neidle, *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure*, Oxford University Press, **1999**.
- [8] V. Gabelica, *Nucleic Acids in the Gas Phase*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2014**.
- [9] A. Gelbin, B. Schneider, L. Clowney, S.-H. Hsieh, W. K. Olson y H. M. Berman, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, 118, 519-529.
- [10] P.-O. Löwdin, *Reviews of Modern Physics* **1963**, 35, 724-732.
- [11] S. Johannsen, N. Megger, D. Böhme, R. K. O. Sigel y J. Müller, *Nature Chemistry* **2010**, 2, 229.

- [12] A. Ono, S. Cao, H. Togashi, M. Tashiro, T. Fujimoto, T. Machinami, S. Oda, Y. Miyake, I. Okamoto e Y. Tanaka, *Chemical Communications* **2008**, 4825-4827.
- [13] Y. Takezawa y M. Shionoya, *Accounts of Chemical Research* **2012**, *45*, 2066-2076.
- [14] N. C. Seeman, *Nature* **2003**, *421*, 427-431.
- [15] X. Li y D. R. Liu, *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43*, 4848-4870.
- [16] Y. Lu y J. Liu, *Current Opinion in Biotechnology* **2006**, *17*, 580-588.
- [17] U. Feldkamp y C. M. Niemeyer, *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 1856-1876.
- [18] L. H. Hurley, *Nature Reviews Cancer* **2002**, *2*, 188-200.
- [19] M. Duca, P. Vekhoff, K. Oussedik, L. Halby y P. B. Arimondo, *Nucleic Acids Research* **2008**, *36*, 5123-5138.
- [20] P. Fojtík y M. Vorlícková, *Nucleic Acids Research* **2001**, *29*, 4684-4690.
- [21] K. Gehring, J.-L. Leroy y M. Guéron, *Nature* **1993**, *363*, 561-565.
- [22] S. Burge, G. N. Parkinson, P. Hazel, A. K. Todd y S. Neidle, *Nucleic Acids Research* **2006**, *34*, 5402-5415.
- [23] Y. Takezawa y M. Shionoya, *Accounts of Chemical Research* **2012**, *45*, 2066-2076.
- [24] B. Jash y J. Müller, *Chemistry – A European Journal* **2017**, *23*, 17166-17178.
- [25] S. Naskar, R. Guha y J. Müller, *Angewandte Chemie International Edition Accepted Author Manuscript* **2019**.
- [26] L. A. Peyser, A. E. Vinson, A. P. Bartko y R. M. Dickson, *Science* **2001**, *291*, 103-106.

- [27] L. F. Cótica, I. A. Santos, E. M. Giroto, E. V. Ferri y A. A. Coelho, *Journal of Applied Physics* **2010**, *108*, 064325.
- [28] Y. Piñeiro, D. Buceta, J. Rivas y M. Arturo López-Quintela en *Metal Nanoparticles and Clusters: Advances in Synthesis, Properties and Applications*, (ed.: F. L. Deepak), Springer International Publishing, Cham, **2018**, págs. 1-30.
- [29] Y. Piñeiro, J. Rivas y M. López-Quintela en *Colloidal Foundations of Nanoscience*, (eds.: D. Berti y G. Palazzo), Elsevier, Amsterdam, **2014**, págs. 81 -105.
- [30] P. Gruene, D. M. Rayner, B. Redlich, A. F. G. van der Meer, J. T. Lyon, G. Meijer y A. Fielicke, *Science* **2008**, *321*, 674-676.
- [31] J. Li, X. Li, H.-J. Zhai y L.-S. Wang, *Science* **2003**, *299*, 864-867.
- [32] C. T. Campbell, S. C. Parker y D. E. Starr, *Science* **2002**, *298*, 811-814.
- [33] N. Vilar-Vidal, M. C. Blanco, M. A. López-Quintela, J. Rivas y C. Serra, *The Journal of Physical Chemistry C* **2010**, *114*, 15924-15930.
- [34] D. Buceta, N. Busto, G. Barone, J. M. Leal, F. Domínguez, L. J. Giovanetti, F. G. Requejo, B. García y M. A. López-Quintela, *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54*, 7612-7616.
- [35] J. Li, J.-J. Zhu y K. Xu, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2014**, *58*, 90 -98.
- [36] M. Holzinger, A. Le Goff y S. Cosnier, *Frontiers in Chemistry* **2014**, *2*, 63.
- [37] X. Kang y M. Zhu, *Chemical Society Reviews* **2019**, *48*, 2422-2457.
- [38] O. S. Wolfbeis, *Chemical Society Reviews* **2015**, *44*, 4743-4768.
- [39] H.-H. Wang, C.-A. J. Lin, C.-H. Lee, Y.-C. Lin, Y.-M. Tseng, C.-L. Hsieh, C.-H. Chen, C.-H. Tsai, C.-T. Hsieh, J.-L. Shen, W.-H. Chan, W. H. Chang y H.-I. Yeh, *ACS Nano* **2011**, *5*, 4337-4344.

- [40] J. Zheng y R. M. Dickson, *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 13982-13983.
- [41] L. Peyser-Capadona, J. Zheng, J. I. González, T.-H. Lee, S. A. Patel y R. M. Dickson, *Physical Review Letters* **2005**, *94*, 058301.
- [42] C. M. Ritchie, K. R. Johnsen, J. R. Kiser, Y. Antoku, R. M. Dickson y J. T. Petty, *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111*, 175-181.
- [43] E. Gwinn, D. Schultz, S. M. Copp y S. Swasey, *Nanomaterials* **2015**, *5*, 180-207.
- [44] E. Gwinn, P. O'Neill, A. Guerrero, D. Bouwmeester y D. Fyngenson, *Advanced Materials* **2008**, *20*, 279-283.
- [45] S. M. Copp, D. Schultz, S. Swasey, J. Pavlovich, M. Debord, A. Chiu, K. Olsson y E. Gwinn, *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2014**, *5*, 959-963.
- [46] S. A. Bogh, M. R. Carro-Temboury, C. Cerretani, S. M. Swasey, S. M. Copp, E. G. Gwinn y T. Vosch, *Methods and Applications in Fluorescence* **2018**, *6*, 024004.
- [47] P. R. O'Neill, E. G. Gwinn y D. K. Fyngenson, *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115*, 24061-24066.
- [48] T. Vosch, Y. Antoku, J.-C. Hsiang, C. I. Richards, J. I. Gonzalez y R. M. Dickson, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*, 12616-12621.
- [49] S. Choi, J. Yu, S. A. Patel, Y.-L. Tzeng y R. M. Dickson, *Photochemical & Photobiological Sciences* **2011**, *10*, 109-115.
- [50] S. M. Copp, D. Schultz, S. M. Swasey, A. Faris y E. G. Gwinn, *Nano Letters* **2016**, *16*, 3594-3599.
- [51] S. M. Copp, A. Gorovits, S. M. Swasey, S. Gudibandi, P. Bogdanov y E. G. Gwinn, *ACS Nano* **2018**, *12*, 8240-8247.

- [52] D. Schultz, K. Gardner, S. S. R. Oemrawsingh, N. Markešević, K. Olsson, M. Debord, D. Bouwmeester y E. Gwinn, *Advanced Materials* **2013**, *25*, 2797-2803.
- [53] V. Soto-Verdugo, H. Metiu y E. Gwinn, *The Journal of Chemical Physics* **2010**, *132*, 195102.
- [54] N. V. Karimova y C. M. Aikens, *The Journal of Physical Chemistry A* **2015**, *119*, 8163-8173.
- [55] E. B. Guidez y C. M. Aikens, *Nanoscale* **2012**, *4*, 4190-4198.
- [56] A. R. Milosavljević, A. Giuliani, C. Nicolas, J.-F. Gil, J. Lemaire, M. Réfrégiers y L. Nahon, *Journal of Physics: Conference Series* **2010**, *257*, 012006.
- [57] M. S. de Vries y P. Hobza, *Annual Review of Physical Chemistry* **2007**, *58*, 585-612.
- [58] H. Awad, M. M. Khamis y A. El-Aneed, *Applied Spectroscopy Reviews* **2015**, *50*, 158-175.
- [59] J. H. Gross, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2011**, págs. 561-620.
- [60] M. A. Grayson, *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* **2011**, *22*, 1301-1308.
- [61] M. Wilm, *Molecular & Cellular Proteomics* **2011**, *10*.
- [62] J. Fenn, M. Mann, C. Meng, S. Wong y C. Whitehouse, *Science* **1989**, *246*, 64-71.
- [63] S. Banerjee y S. Mazumdar, *International Journal of Analytical Chemistry* **2012**, *2012*, 40.
- [64] G. I. Taylor, *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* **1964**, *280*, 383-397.

- [65] A. Gomez y K. Tang, *Physics of Fluids* **1994**, 6, 404-414.
- [66] W. E. Stephens, *Bulletin of the American Physical Society* **1946**, 21, 22.
- [67] W. C. Wiley e I. H. McLaren, *Review of Scientific Instruments* **1955**, 26, 1150-1157.
- [68] J. A. Richards en *Analysis of Periodically Time-Varying Systems*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **1983**, págs. 93-107.
- [69] M. W. Forbes, M. Sharifi, T. Croley, Z. Lausevic y R. E. March, *Journal of Mass Spectrometry* **1999**, 34, 1219-1239.
- [70] W. Tobocman, *Phys. Rev.* **1957**, 107, 203-208.
- [71] M. L. Abrams y C. D. Sherrill, *Chemical Physics Letters* **2005**, 412, 121-124.
- [72] P. Jurečka, J. Černý, P. Hobza y D. R. Salahub, *Journal of Computational Chemistry* **2007**, 28, 555-569.
- [73] M. Haranczyk y M. Gutowski, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 699-706.
- [74] J. Berdys-Kochańska, J. Kruszewski y P. Skurski, *The Journal of Physical Chemistry A* **2005**, 109, 11407-11412.
- [75] M. Piacenza y S. Grimme, *Journal of Computational Chemistry* **2004**, 25, 83-99.
- [76] O. Christiansen, H. Koch y P. Jørgensen, *Chemical Physics Letters* **1995**, 243, 409-418.
- [77] C. Hättig y F. Weigend, *The Journal of Chemical Physics* **2000**, 113, 5154-5161.
- [78] C. Hättig y A. Köhn, *The Journal of Chemical Physics* **2002**, 117, 6939-6951.

- [79] C. Hättig y K. Hald, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2002**, *4*, 2111-2118.
- [80] P. Geerlings, F. De Proft y W. Langenaeker, *Chemical Reviews* **2003**, *103*, 1793-1874.
- [81] W. Kohn y L. J. Sham, *Physical Review* **1965**, *140*, A1133-A1138.
- [82] A. D. Becke, *The Journal of Chemical Physics* **1993**, *98*, 1372-1377.
- [83] C. Lee, W. Yang y R. G. Parr, *Physical Review B* **1988**, *37*, 785-789.
- [84] P. J. Stephens, F. J. Devlin, C. F. Chabalowski y M. J. Frisch, *The Journal of Physical Chemistry* **1994**, *98*, 11623-11627.
- [85] A. D. Becke, *The Journal of Chemical Physics* **1993**, *98*, 5648-5652.
- [86] T. Yanai, D. P. Tew y N. C. Handy, *Chemical Physics Letters* **2004**, *393*, 51-57.
- [87] A. E. Raeber y B. M. Wong, *Journal of Chemical Theory and Computation* **2015**, *11*, 2199-2209.
- [88] E. Runge y E. K. U. Gross, *Phys. Rev. Lett.* **1984**, *52*, 997-1000.
- [89] C. F. A. Negre, V. C. Fuertes, M. B. Oviedo, F. Y. Oliva y C. G. Sánchez, *The Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116*, 14748-14753.
- [90] M. B. Oviedo, X. Zarate, C. F. A. Negre, E. Schott, R. Arratia-Pérez y C. G. Sánchez, *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2012**, *3*, 2548-2555.
- [91] C. F. A. Negre, K. J. Young, M. B. Oviedo, L. J. Allen, C. G. Sánchez, K. N. Jarzemska, J. B. Benedict, R. H. Crabtree, P. Coppens, G. W. Brudvig y V. S. Batista, *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 16420-16429.
- [92] M. B. Oviedo y C. G. Sánchez, *The Journal of Physical Chemistry A* **2011**, *115*, 12280-12285.

- [93] O. A. Douglas-Gallardo, M. Berdakin, T. Frauenheim y C. G. Sánchez, *Nanoscale* **2019**, *11*, 8604-8615.
- [94] C. Mansilla Wettstein y C. G. Sánchez, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2018**, *20*, 21910-21916.
- [95] C. R. Medrano y C. G. Sánchez, *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2018**, *9*, 3517-3524.
- [96] M. Elstner, D. Porezag, G. Jungnickel, J. Elsner, M. Haugk, T. Frauenheim, S. Suhai y G. Seifert, *Physical Review B* **1998**, *58*, 7260-7268.
- [97] B. Aradi, B. Hourahine y T. Frauenheim, *The Journal of Physical Chemistry A* **2007**, *111*, 5678-5684.
- [98] G. Seifert, *The Journal of Physical Chemistry A* **2007**, *111*, 5609-5613.
- [99] A. F. Oliveira, G. Seifert, T. Heine y H. A. Duarte, *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2009**, *20*, 1193 -1205.
- [100] I. Ivani, P. D. Dans, A. Noy, A. Pérez, I. Faustino, A. Hospital, J. Walther, P. Andrio, R. Goñi, A. Balaceanu, G. Portella, F. Battistini, J. L. Gelpí, C. González, M. Vendruscolo, C. A. Laughton, S. A. Harris, D. A. Case y M. Orozco, *Nature Methods* **2015**, *13*, 55.
- [101] A. D. MacKerell Jr. y N. K. Banavali, *Journal of Computational Chemistry* **2000**, *21*, 105-120.
- [102] L. Verlet, *Phys. Rev.* **1967**, *159*, 98-103.
- [103] B. Lippert y D. Gupta, *Dalton Transactions* **2009**, 4619-4634.
- [104] C. Cristofari, R. Rigo, M. L. Greco, M. Ghezzi y C. Sissi, *Scientific Reports* **2019**, *9*, 1210.
- [105] M. Berdakin, V. Steinmetz, P. Maitre y G. A. Pino, *The Journal of Physical Chemistry A* **2014**, *118*, 3804-3809.
- [106] M. Berdakin, G. Féraud, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvét y G. Pino, *Journal of Physical Chemistry Letters* **2014**, *5*, 2295-2301.

- [107] J. T. Petty, J. Zheng, N. V. Hud y R. M. Dickson, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 5207-5212.
- [108] C. M. Ritchie, K. R. Johnsen, J. R. Kiser, Y. Antoku, R. M. Dickson y J. T. Petty, *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111*, 175-181.
- [109] M. Egli, *Chemistry & Biology* **2002**, *9*, 277 -286.
- [110] H. Torigoe, I. Okamoto, T. Dairaku, Y. Tanaka, A. Ono y T. Kozasa, *Biochimie* **2012**, *94*, 2431 -2440.
- [111] V. Porto, E. Borrajo, D. Buceta, C. Carneiro, S. Huseyinova, B. Domínguez, K. J. E. Borgman, M. Lakadamyali, M. F. Garcia-Parajo, J. Neissa, T. García-Caballero, G. Barone, M. C. Blanco, N. Busto, B. García, J. M. Leal, J. Blanco, J. Rivas, M. A. López-Quintela y F. Domínguez, *Advanced Materials* **2018**, *30*, 1801317.
- [112] J. Neissa, C. Pérez-Arnaiz, V. Porto, N. Busto, E. Borrajo, J. M. Leal, M. A. López-Quintela, B. García y F. Dominguez, *Chemical Science* **2015**, *6*, 6717-6724.
- [113] E. L. L. Andres y L.-A. Olga, *Nanotechnology Reviews* **2015**, *4*, 173.
- [114] M. Berdakin, V. Steinmetz, P. Maitre y G. Pino, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2015**, *17*, 25915-25924.
- [115] M. Berdakin, G. Féraud, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvét y G. Pino, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2014**, *16*, 10643-10650.
- [116] M. Broquier, S. Soorkia, G. Pino, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvét y G. Grégoire, *The Journal of Physical Chemistry A* **2017**, *121*, 6429-6439.
- [117] S. Ullrich, T. Schultz, M. Z. Zgierski y A. Stolow, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2004**, *6*, 2796-2801.
- [118] L. Serrano-Andrés y M. Merchán, *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **2009**, *10*, 21 -32.

- [119] C. T. Middleton, K. de La Harpe, C. Su, Y. K. Law, C. E. Crespo-Hernández y B. Kohler, *Annual Review of Physical Chemistry* **2009**, *60*, 217-239.
- [120] a. D. o. U. o. K. GmbH y F. Karlsruhe, TURBOMOLE V6.6.
- [121] S. Grimme, *The Journal of Chemical Physics* **2003**, *118*, 9095-9102.
- [122] R. Ahlrichs, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2004**, *6*, 5119-5121.
- [123] F. Weigend, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2006**, *8*, 1057-1065.
- [124] A. Hellweg, S. A. Grün y C. Hättig, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2008**, *10*, 4119-4127.
- [125] C. M. Western, *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* **2017**, *186*, 221 -242.
- [126] Origin(Pro), Versión 8b **OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA.**
- [127] *Physical Chemistry Chemical Physics* **2012**, *14*, 4517-4526.
- [128] B. Yang, R. R. Wu, N. C. Polfer, G. Berden, J. Oomens y M. T. Rodgers, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2013**, *24*, 1523-1533.
- [129] S. Lobsiger y S. Leutwyler, *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2012**, *3*, 3576-3580.
- [130] D. Lide, *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 90th Edition*, Taylor & Francis, **2009**.
- [131] M. I. Taccone, G. Féraud, M. Berdakin, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouviet y G. A. Pino, *The Journal of Chemical Physics* **2015**, *143*, 041103.
- [132] N. Nieuwjaer, C. Desfrancois, F. Lecomte, B. Manil, S. Soorkia, M. Broquier y G. Grégoire, *The Journal of Physical Chemistry A* **2018**, *122*, 3798-3804.

- [133] L. Blancafort, B. Cohen, P. M. Hare, B. Kohler y M. A. Robb, *The Journal of Physical Chemistry A* **2005**, *109*, 4431-4436.
- [134] A. L. Sobolewski y W. Domcke, *The Journal of Physical Chemistry A* **1999**, *103*, 4494-4504.
- [135] A. L. Sobolewski y W. Domcke, *Chemical Physics Letters* **1999**, *300*, 533-539.
- [136] M. Z. Zgierski, S. Patchkovskii y E. C. Lim, *The Journal of Chemical Physics* **2005**, *123*, 081101.
- [137] M. Merchán y L. Serrano-Andrés, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 8108-8109.
- [138] S. Liu, G. H. Clever, Y. Takezawa, M. Kaneko, K. Tanaka, X. Guo y M. Shionoya, *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50*, 8886-8890.
- [139] K. S. Park, C. Jung y H. G. Park, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 9757-9760.
- [140] J. T. Petty, S. P. Story, J.-C. Hsiang y R. M. Dickson, *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2013**, *4*, 1148-1155.
- [141] C. I. Richards, S. Choi, J.-C. Hsiang, Y. Antoku, T. Vosch, A. Bongiorno, Y.-L. Tzeng y R. M. Dickson, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 5038-5039.
- [142] J. T. Petty, O. O. Sergev, D. A. Nicholson, P. M. Goodwin, B. Giri y D. R. McMullan, *Analytical Chemistry* **2013**, *85*, 9868-9876.
- [143] S. S. R. Oemrawsingh, N. Markešević, E. G. Gwinn, E. R. Eliel y D. Bouwmeester, *The Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116*, 25568-25575.
- [144] T. Vosch, Y. Antoku, J.-C. Hsiang, C. I. Richards, J. I. Gonzalez y R. M. Dickson, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104*, 12616-12621.

- [145] *Scientific Reports* **2015**, *5*, 1-9.
- [146] A. Ono, H. Torigoe, Y. Tanaka e I. Okamoto, *Chemical Society Reviews* **2011**, *40*, 5855-5866.
- [147] H. Urata, E. Yamaguchi, Y. Nakamura y S.-i. Wada, *Chemical Communications* **2011**, *47*, 941-943.
- [148] T. J. Macke y D. A. Case en *Molecular Modeling of Nucleic Acids*, cap. 24, págs. 379-393.
- [149] W. Humphrey, A. Dalke y K. Schulten, *Journal of Molecular Graphics* **1996**, *14*, 33-38.
- [150] S. Plimpton, *Journal of Computational Physics* **1995**, *117*, 1 -19.
- [151] W. M. Brown, P. Wang, S. J. Plimpton y A. N. Tharrington, *Computer Physics Communications* **2011**, *182*, 898 -911.
- [152] N. Foloppe y A. D. MacKerell, Jr., *Journal of Computational Chemistry* **2000**, *21*, 86-104.
- [153] A. D. MacKerell Jr. y N. K. Banavali, *Journal of Computational Chemistry* **2000**, *21*, 105-120.
- [154] D. Y. Wu, M. Hayashi, Y. J. Shiu, K. K. Liang, C. H. Chang, Y. L. Yeh y S. H. Lin, *The Journal of Physical Chemistry A* **2003**, *107*, 9658-9667.
- [155] F. Lin y R. Wang, *Journal of Chemical Theory and Computation* **2010**, *6*, 1852-1870.
- [156] N. Staelens, L. Leherte, B. Champagne y D. P. Vercauteren, *ChemPhys-Chem* **2015**, *16*, 360-369.
- [157] D. Varsano, R. Di Felice, M. A. L. Marques y A. Rubio, *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 7129-7138.
- [158] T. Fleig, S. Knecht y C. Hättig, *The Journal of Physical Chemistry A* **2007**, *111*, 5482-5491.

- [159] S. M. Swasey, N. Karimova, C. M. Aikens, D. E. Schultz, A. J. Simon y E. G. Gwinn, *ACS Nano* **2014**, *8*, 6883-6892.
- [160] H. E. Johnson y C. M. Aikens, *The Journal of Physical Chemistry A* **2009**, *113*, 4445-4450.
- [161] L. A. Espinosa Leal, A. Karpenko, S. Swasey, E. G. Gwinn, V. Rojas-Cervellera, C. Rovira y O. Lopez-Acevedo, *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2015**, *6*, 4061-4066.
- [162] H. A. Day, C. Huguin y Z. A. E. Waller, *Chemical Communications* **2013**, *49*, 7696-7698.
- [163] M. Berdakin, M. Taccone, K. J. Julian, G. Pino y C. G. Sánchez, *The Journal of Physical Chemistry C* **2016**, *120*, 24409-24416.
- [164] M. Berdakin, M. I. Taccone, G. A. Pino y C. G. Sánchez, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2017**, *19*, 5721-5726.
- [165] F. Ding, E. B. Guidez, C. M. Aikens y X. Li, *The Journal of Chemical Physics* **2014**, *140*, 244705.
- [166] J. Yan y S. Gao, *Phys. Rev. B* **2008**, *78*, 235413.
- [167] C. Vinod, G. Kulkarni y C. Rao, *Chemical Physics Letters* **1998**, *289*, 329-333.
- [168] K. Sattler en *Handbook of Thin Films*, (ed.: H. S. Nalwa), Academic Press, Burlington, **2002**, págs. 61 -97.
- [169] W. D. Knight, K. Clemenger, W. A. de Heer, W. A. Saunders, M. Y. Chou y M. L. Cohen, *Physical Review Letters* **1984**, *52*, 2141-2143.
- [170] M. Brack, *Review of Modern Physics* **1993**, *65*, 677-732.
- [171] W. Wei, Y. Lu, W. Chen y S. Chen, *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133*, 2060-2063.
- [172] P. Kunwar, J. Hassinen, G. Bautista, R. H. A. Ras y J. Toivonen, *Scientific Reports* **2016**, *6*, 23998.

- [173] R. R. Ramazanov, T. S. Sych, Z. V. Reveguk, D. A. Maksimov, A. A. Vdovichev y A. I. Kononov, *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2016**, *7*, 3560-3566.
- [174] I. Díez, R. H. A. Ras, M. I. Kanyuk y A. P. Demchenko, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, *15*, 979-985.
- [175] I. Díez, M. I. Kanyuk, A. P. Demchenko, A. Walther, H. Jiang, O. Ikkala y R. H. A. Ras, *Nanoscale* **2012**, *4*, 4434-4437.
- [176] J. Xie, Y. Zheng y J. Y. Ying, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 888-889.
- [177] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski y D. J. Fox, Gaussian 09 Revision E.01, Gaussian Inc. Wallingford CT 2009.
- [178] J. M. L. Martin y A. Sundermann, *The Journal of Chemical Physics* **2001**, *114*, 3408-3420.
- [179] J. Tomasi, B. Mennucci y R. Cammi, *Chemical Reviews* **2005**, *105*, 2999-3094.

- [180] M. Cuerva, R. García-Fandiño, C. Vázquez-Vázquez, M. A. López-Quintela, J. Montenegro y J. R. Granja, *ACS Nano* **2015**, *9*, 10834-10843.
- [181] H. Häkkinen, *Advances in Physics: X* **2016**, *1*, 467-491.
- [182] H. Ramsay, D. Simon, E. Steele, A. Hebert, R. D. Oleschuk y K. G. Stampelcoskie, *RSC Advances* **2018**, *8*, 42080-42086.
- [183] B. S. González, M. C. Blanco y M. A. López-Quintela, *Nanoscale* **2012**, *4*, 7632-7635.
- [184] En *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, (ed.: J. R. Lakowicz), Springer US, Boston, MA, **2006**, págs. 97-155.
- [185] K. Kwak, V. D. Thanthirige, K. Pyo, D. Lee y G. Ramakrishna, *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2017**, *8*, 4898-4905.
- [186] R. Englman y J. Jortner, *Molecular Physics* **1970**, *18*, 145-164.
- [187] A. Kulesza, R. Mitrić, V. Bonačić-Koutecký, B. Bellina, I. Compagnon, M. Broyer, R. Antoine y P. Dugourd, *Angewandte Chemie* **2011**, *123*, 908-911.
- [188] T. Linnert, P. Mulvaney, A. Henglein y H. Weller, *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112*, 4657-4664.
- [189] P. Mulvaney y A. Henglein, *The Journal of Physical Chemistry* **1990**, *94*, 4182-4188.
- [190] A. Henglein, T. Linnert y P. Mulvaney, *Berichte der Bunsengesellschaft für Physikalische Chemie* **1990**, *94*, 1449-1457.
- [191] N. M. Dimitrijevic, D. M. Bartels, C. D. Jonah, K. Takahashi y T. Rajh, *The Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105*, 954-959.
- [192] E. Janata, A. Henglein y B. G. Ershov, *The Journal of Physical Chemistry* **1994**, *98*, 10888-10890.