



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Física

Caracterización de Nanopartículas de *Upconversion*

Tesis de Licenciatura en Ciencias Físicas

Tomás Di Napoli

Dirección: Hernán Grecco

Diciembre 2024

TEMA: Caracterización de nanopartículas de *upconversion*

ALUMNO: Tomás Di Napoli

LU: 551/18

LUGAR DE TRABAJO: Laboratorio de Electrónica Cuántica, Departamento de Física, Instituto de Física de Buenos Aires, CONICET/UBA.

DIRECCIÓN: Hernán Grecco (IFIBA-UBA/CONICET)

FECHA DE INICIACIÓN: Agosto 2023

FECHA DE FINALIZACIÓN: Diciembre 2024

FECHA DE EXAMEN: 27/12/2024

INFORME APROBADO POR:

Autor/a Tomás Di Napoli	Jurado Dr. Christian T. Schmiegelow
Director/a Dr. Hernán Grecco	Jurado Dra. María Gabriela Capeluto
Profesor/a de la Tesis de Licenciatura Dra. Silvina Ponce Dawson	Jurado

Agradecimientos

Resumen

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Luminiscencia	2
1.1.1. Espectroscopía estática	2
1.1.2. Espectroscopía dinámica	4
1.2. Instrumentación para espectrometría de fluorescencia	5
1.2.1. El espectrofluorímetro	5
1.2.2. Epectrofluorímetros en argentina y obsolescencia	6
1.2.3. Medición de tiempos de vida: <i>Time-Correlated Single Photon Counting</i>	7
1.3. Nanopartículas de <i>upconversion</i>	8
1.3.1. Luminiscencia de las UCNP	8
1.3.2. Mecanismos y dinámica de las UCNP	10
1.3.3. Requisitos para la caracterización óptica de las UCNP	11
2. Espectrofluorímetro para la caracterización de UCNPs	13
2.1. Renovación y ampliación del fluorímetro Horiba PTI Quanta Master 400	13
2.1.1. Componentes originales	13
2.1.2. Hardware para la renovación del QM 400	15
2.1.3. Hardware ampliación	16
2.2. Sistema de detección de fotones	17
2.2.1. Caracterización del PMT con la Red Pitaya	18
2.2.2. Conteo de fotones	20
3. Software y protocolos de medición	24
3.1. Software	24
3.2. Protocolo de medición estática	25
3.3. Protocolo de medición dinámica	27
4. Caracterización de UCNPs	29
4.1. Espectros estacionarios de la rodamina B	29
4.2. Caracterización óptica de UCNPs	30
5. Conclusiones	34

Appendices	40
A. instrucciones de armado	41
A.1. Renovación del Horiba PTI Quanta Master 400	41
A.2. Ampliación para mediciones dinámicas	42
A.3. Instalación y configuración del software	43
B. Instrucciones de uso	44
B.1. Modo de operación GUI	44

Capítulo 1

Introducción

En 1565, el médico y botanista Nicolás Monardes reportó el peculiar color azul que tomaba una infusión de madera mexicana usada para tratar enfermedades de riñón y urinarias. Este efecto ya era conocido por los Aztecas, que lo utilizaban para asegurarse que la valiosa madera no fuera falsificada. Monardes escribe en su libro¹

Asegúrate de que la madera torne el agua azulada, de lo contrario, es una falsificación. De hecho, ahora traen otro tipo de madera que torna el agua amarilla, pero no sirve; solo el tipo que torna el agua azulada es genuina.

Años más tarde, en 1845, el matemático Sir John Herschel describió el efecto similar que producía una solución transparente de quinina, una sustancia presente en el agua tónica, que reflejaba «un color azul celestial hermoso y extremadamente vívido». Herschel usó un prisma para comprobar que la dispersión causada por la quinina sólo se observaba al iluminar la solución con la parte azul del espectro. El mismo análisis para la luz emitida reveló luz azul, verde, y una pequeña cantidad de amarillo. En esa misma época, el físico Sir George Gabriel Stokes publicó *On the Refrangibility of Light*, un trabajo explicando experimentos con múltiples sustancias que exhibían este tipo de comportamientos, entre ellas incluida la quinina. Uno de sus experimentos más importantes consistía en formar el espectro solar a partir de un prisma, para luego mover un tubo de ensayo con la solución de quinina a través de sus colores. La solución permanecía transparente al ser iluminada por la parte visible del espectro, pero al llegar a la zona ultravioleta (invisible al ojo humano), la muestra se iluminó con luz azul brillante. Además de concluir que la luz siempre se dispersaba con longitudes de onda mayores a las de incidencia, afirmación que luego se conocería como corrimiento de Stokes, llamó a este fenómeno *fluorescencia*¹.

En 1888, el físico Eilhardt Wiedmann introdujo el término luminiscencia para referirse a los fenómenos lumínicos que no están determinados por un aumento en la temperatura de los materiales. Entre ellos están la fosforescencia y la fluorescencia. Actualmente ambos tienen aplicaciones en múltiples áreas distintas del conocimiento y la tecnología. Es particularmente destacable su éxito como herramienta para estudiar la estructura y dinámica de la materia viva, gracias la sensibilidad al micro-entorno de las moléculas fluorescentes, lo que resulta en una alta resolución espacial y temporal. Por ejemplo, la microscopía de fluorescencia consiste en iluminar la

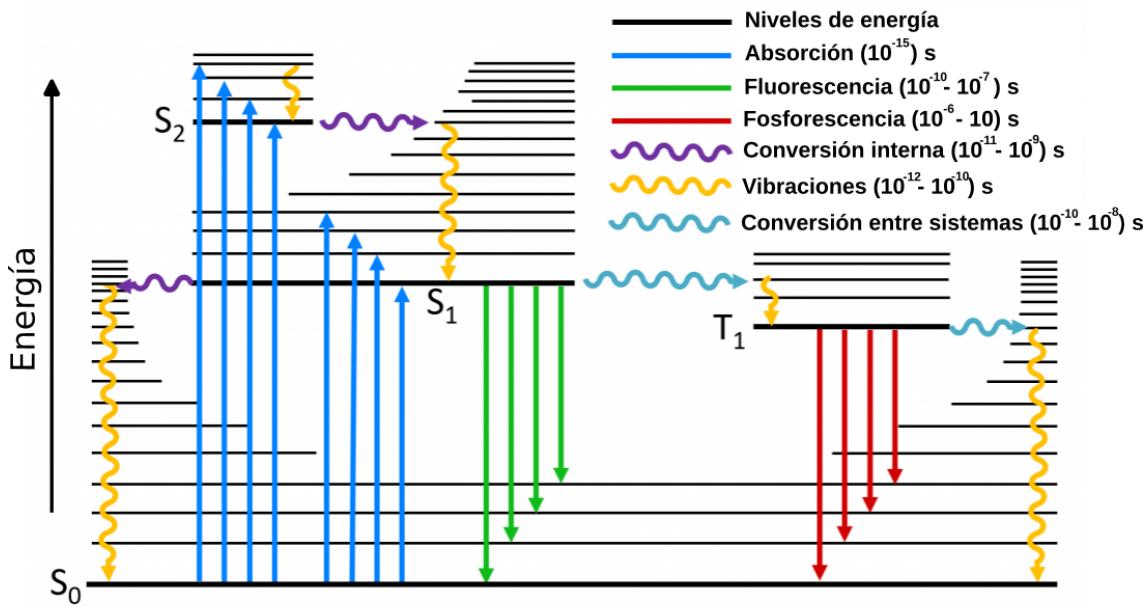


Figura 1.1: Diagrama de Jablonski.

muestra con una longitud de onda y detectar su fluorescencia en otra, permitiendo filtrar el fondo de la imagen¹. Técnicas dinámicas como la microscopía de imágenes de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM) o fosforescencia (PLIM) dan lugar a conocer el entorno químico en el que se encuentran distintas proteínas, como su PH, viscosidad, temperatura, entre otras cantidades²³. Si bien en el siglo 19 ya se sabía que los mecanismos de emisión de luz de estos fenómenos no estaban vinculados al aumento de temperatura de los materiales, no fue hasta el desarrollo de la mecánica cuántica a principios del 20 que se entendió su causa: la luminiscencia está dada por la transición entre distintos estados de energía de los electrones.

1.1. Luminiscencia

1.1.1. Espectroscopía estática

La luminiscencia es la emisión de fotones mediante la transición de un electrón en un estado excitado con energía E_e a otro con energía $E_k < E_e$. Este proceso suele ilustrarse a través de un diagrama de Jablonski (Fig. 1.1)¹. En un diagrama de Jablonski se muestran los niveles de energía electrónicos del material luminiscente junto con las posibles transiciones entre ellos. En el diagrama se ven los estados singlete S_0 , S_1 y S_2 , y el estado triplete T_1 . Todo proceso luminiscente comienza con la absorción de un fotón, lo que lleva al electrón a un estado más energético. Estas absorciones ocurren en un lapso de 10^{-15} s, un tiempo suficientemente corto como para que los desplazamientos de los núcleos del sistema sean despreciables⁴. La diferencia de energía entre estos estados es típicamente del orden de los eV. A

¹Tomado de <https://edinst.com/wp-content/uploads/2019/02/JablonskiDiagramFull-1024x604.png>

su vez, un electrón en un dado estado electrónico puede estar en distintos estados vibracionales, aunque estos estados están separados por energías del orden de las décimas de eV. Las transiciones entre estados vibracionales también son posibles y ocurren en un lapso de 10^{-12} a 10^{-10} segundos.

La sucesión de este tipo de transiciones da lugar a la fluorescencia: un electrón absorbe un fotón altamente energético, excitándolo a un estado electrónico de mayor energía con vibraciones. Rápidamente sus oscilaciones se relajan, dejándolo en un estado electrónico excitado, pero con baja energía vibracional. Por último, el electrón vuelve a su estado fundamental re-emitiendo un fotón, pero esta vez de menor energía que el que había absorbido. La fluorescencia tiene tiempos típicos de 10^{-10} a 10^{-7} segundos. El método más usual para caracterizar un material fluorescente, o luminiscente en general, es a través de su espectro de emisión y de absorción. Alternativamente, uno puede medir el espectro de excitación, que está fuertemente relacionado con el de absorción. El proceso para medir cada uno es:

- **Emisión:** consiste en medir la intensidad de luz emitida por la muestra en un rango amplio de longitudes de onda $\Delta\lambda_{em}$, al ser excitada por una longitud de onda fija λ_{ex} .
- **Absorción:** requiere medir la intensidad de luz que absorbe la muestra. Esto generalmente se logra excitando una solución de la sustancia en un rango de longitudes de onda y midiendo la cantidad de luz transmitida en cada caso.
- **Excitación:** para obtener este espectro se debe medir la intensidad de luz emitida por la muestra una dada longitud de onda λ_{em} , y barrer la excitación en un rango $\Delta\lambda_{ex}$.

La figura (1.2) muestra el espectro de absorción y de emisión de la fluoresceina, una tinta orgánica utilizada en distintas técnicas de diagnóstico médico^{5,6}. Los espectros dejan en evidencia la fluorescencia de la molécula: absorbe fotones de 457 y 486 nm, es decir 2,71 eV y 2,55 eV respectivamente, y emite con mayor intensidad en 523 nm, equivalente a 2,37 eV. Previsiblemente, la diferencia de energía es de $\sim 0,2$ eV, en el rango de energías vibracionales.

Otro tipo de mecanismos presentes en los materiales luminiscentes son la conversión interna y la conversión entre sistemas. Ambos consisten en transiciones entre estados electrónicos excitados, el primero es entre estados de la misma multiplicidad, en general singlete-singlete, y el segundo se da entre estados singlete-triplete⁸. La conversión entre sistemas, que ocurre en el orden de 10^{-10} a 10^{-9} segundos, es la responsable de la fosforescencia. La fosforescencia es la transición de un electrón en un estado excitado triplete a un estado singlete de menor energía. A diferencia de las transiciones fluorescentes, las transiciones triplete-singlete están prohibidas por las reglas de selección de la mecánica cuántica⁹. Por este motivo, los tiempos característicos de la fosforescencia son mucho mayores, del orden de 10^{-6} hasta 10 segundos. Además de los espectros de absorción, emisión y excitación, los tiempos de estas transiciones son de gran relevancia para caracterizar a los materiales luminiscentes.

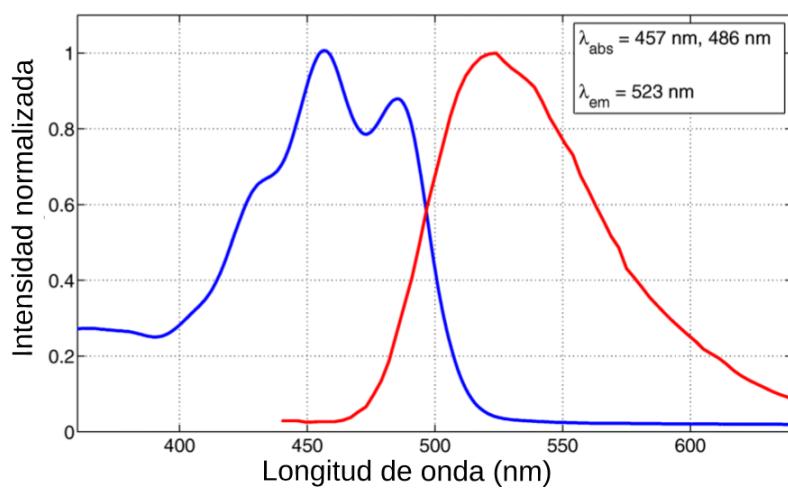


Figura 1.2: Espectro de la Fluoresceina diluida en etanol, tanto de absorción (azul) como de emisión (rojo). El cuadro muestra los picos de absorción en $\lambda_{abs} = 457 \text{ nm}$ y 486 nm , y de emisión en $\lambda_{em} = 523 \text{ nm}$. Tomada y adaptada de⁷.

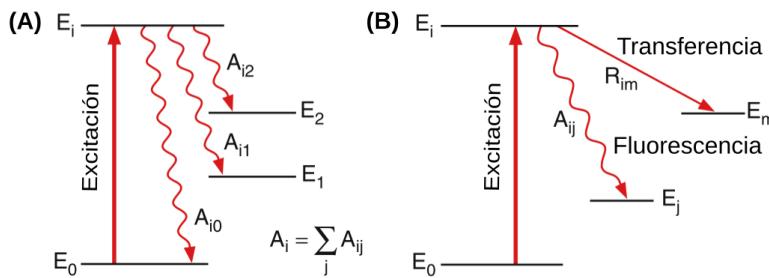


Figura 1.3: Diagrama de Jablonski con transiciones que contribuyen al tiempo de vida.(A) Sólo transiciones de fluorescencia. (B) Transiciones de fluorescencia y choques. Tomado y adaptado de⁹.

1.1.2. Espectroscopía dinámica

Se le llama tiempo de vida medio al tiempo promedio que el electrón pasa en un estado excitado de energía. La caracterización del tiempo de vida medio no solo brinda información del elemento luminiscente, sino también de su entorno. Es necesario hablar de tiempos medios porque las transiciones son un fenómeno fundamentalmente cuántico, y por lo tanto un proceso aleatorio. Además, la mayoría de mediciones de luminiscencia se hacen con una muestra que presenta grandes cantidades de los elementos ópticamente activos, por lo que también hay un efecto aleatorio propio de esa estadística.

Si se tienen N_i átomos en un estado excitado con energía E_i y se asume que la probabilidad de transición a un estado de menor energía E_j es constante en el tiempo se obtiene que

$$\frac{dN_i}{dt} = A_{ij} N_i \implies N_i(t) = N_i(0)e^{A_i t}, \quad (1.1)$$

donde A_{ij} es una constante llamada coeficiente de Einstein, y $A_i = \sum_j A_{ij}$ tiene en cuenta la probabilidad del electrón decaiga a cualquier estado con $E_j < E_i$ (ver Fig. 1.3A)⁹. Como sabemos que un electrón emite un fotón al desexcitarse, la ecuación (1.1) nos dice que al dejar de iluminar una muestra esperamos que se emitan fotones

exponencialmente distribuidos en el tiempo. Es decir que si tenemos un detector de fotones, medimos con precisión el tiempo en el que dejamos de iluminar, y hacemos un histograma de los tiempos en los que detectamos un fotón, las alturas de sus barras deberían seguir una exponencial. Además sabemos que la relación entre el tiempo de vida y el parámetro de la exponencial es $\tau_i = 1/A_i$, por lo que es posible ajustar una exponencial a la altura de las barras para medirlo. Exactamente eso es lo que se hace en *Time-Correlated Single Photon Counting* (TCSPC, ver sección 1.2.3), una de las técnicas más comunes para medir tiempos de vida.

La ecuación (1.1) sólo tiene en cuenta las transiciones fluorescentes del átomo, pero como explicamos en la sección anterior, éstas no son las únicas. Además, generalmente los átomos están en entornos que inducen transiciones no radiativas, como transferencia de energía a otros átomos, o colisiones con átomos vecinos (**Fig. 1.3B**). Suponiendo que se induce una nueva probabilidad de desexcitación no radiativa R_i por transferencia de energía, y siguiendo la lógica anterior, la tasa de cambio de cantidad de átomos N_i en el estado i es

$$\frac{dN_i}{dt} = (A_{ij} + R_i)N_i \implies N_i(t) = N_i(0)e^{(A_i+R_i)t}, \quad (1.2)$$

y por lo tanto su tiempo de vida efectivo $\tau_{eff} = 1/(A_i + R_i)$. La implicancia de este fenómeno es muy fuerte: es posible obtener información del entorno microscópico de un material luminiscente al medir su tiempo de vida¹⁰.

Para poder aprovechar estas propiedades de los materiales luminiscentes es necesario poder medir precisamente tanto sus espectros estacionarios como los dinámicos. En la próxima sección comentamos brevemente cuáles son los instrumentos y técnicas que se implementan más comúnmente para hacer este tipo de mediciones.

1.2. Instrumentación para espectrometría de fluorescencia

1.2.1. El espectrofluorímetro

Para caracterizar la respuesta óptica de una sustancia, generalmente se desea registrar tanto el espectro de excitación como el de emisión. El instrumento científico por excelencia para realizar estas mediciones es el espectrofluorímetro. Fundamentalmente, este instrumento permite realizar mediciones de la intensidad de luz que emite una muestra, haciendo escaneos en longitud de onda de emisión y excitación. Adicionalmente, algunos pueden realizar mediciones de tiempo de vida resueltas, escaneos sincrónicos con alguna señal y mediciones de anisotropía en la polarización de materiales luminiscentes. Estas capacidades son fundamentales para investigaciones en diversas disciplinas científicas, incluyendo química, bioquímica, farmacología, ciencias ambientales, ciencia de materiales y biomedicina. El objetivo principal de un espectrofluorímetro es obtener los espectros de emisión y de excitación de una muestra. Para lograr este objetivo, el instrumento debe ser capaz de iluminar la muestra con múltiples longitudes de onda diferentes y registrar su respuesta a cada una de ellas.

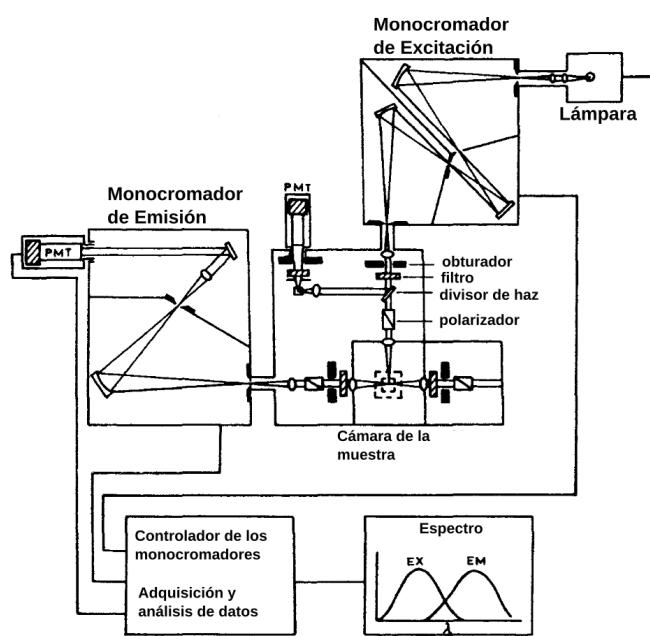


Figura 1.4: Diagrama de un espectrofluorímetro genérico. La luz traza un camino que comienza en la lámpara (zona superior derecha) y termina en el PMT de detección (centro-izquierda). Después de salir de la lámpara, la luz es filtrada por un monocromador y luego enfocada sobre la muestra. La luz reemitida pasa por otro monocromador y termina en el PMT. La señal se lee con un sistema de control que la digitaliza y para luego ser procesada por una PC que construye los espectros. Figura tomada y adaptada de⁴.

La Figura 2.1 muestra un diagrama esquemático de un espectrofluorímetro genérico. Este instrumento incluye todos los componentes fundamentales para cumplir su función. Utiliza una lámpara de espectro amplio que funciona como fuente de luz de alta intensidad para un rango extenso de longitudes de onda. Posteriormente la luz es filtrada por un monocromador de excitación que permite seleccionar la longitud de onda con la que se desea iluminar a la muestra. La luz de excitación seleccionada se enfoca sobre la muestra colocada en la cámara principal, cuya luminiscencia, generalmente con una longitud de onda mayor que la luz de excitación, es filtrada por el monocromador de emisión. Los monocromadores suelen estar motorizados, lo que permite que el escaneo sea automático. La luz restante llega a un detector, usualmente un tubo fotomultiplicador (PMT), un detector muy sensible que convierte fotones en corriente eléctrica. El espectrofluorímetro emplea diversas técnicas para reducir la luz parásita (longitudes de onda diferentes a la deseada), como el diseño en ángulo de 90° entre los brazos de excitación y emisión, y un compartimento hermético pintado de negro no reflectante. La señal del PMT es procesada electrónicamente, digitalizada y analizada en una computadora. Este sistema también controla los monocromadores y la adquisición de datos, además de permitir al usuario ajustar parámetros y facilitar la visualización y análisis. A menudo, se incorporan componentes adicionales en el camino óptico, como obturadores, polarizadores, divisores de haz y otros elementos ópticos, para estudiar diferentes propiedades de la muestra.

El mío es el más común, pero no es el único que existe

1.2.2. Epectrofluorímetros en argentina y obsolescencia

Actualmente, el Departamento de Física de la FCEyN-UBA no cuenta con espectrofluorímetros para la caracterización de espectros de excitación y emisión. Para realizar este tipo de mediciones, la facultad dispone del laboratorio de fotoquímica

del Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE), que cuenta con tres espectrofluorímetros con distintas características, pero que tienen algo en común: ningún equipo tiene menos de 20 años, el más antigüo llegando a los 40 años de uso. La disparidad en la antigüedad y funcionalidad de los instrumentos es un fenómeno común en laboratorios de investigación en países como Argentina, donde la inversión en ciencia es escasa o poco regular en el tiempo¹¹. Ante esta realidad, los institutos suelen priorizar la adquisición de equipos con nuevas capacidades, en lugar de renovar instrumentos existentes por versiones más modernas. Esto es posible gracias a la precisión y robustez de las partes mecánicas de los instrumentos, pero la obsolescencia de los equipos antiguos plantea problemas a largo plazo, especialmente cuando sus plataformas de control quedan desactualizadas. Con el tiempo, se vuelve complicado operar estos instrumentos, ya que los mecanismos de extracción de datos, como los disquetes, dejan de estar disponibles en el mercado. Aún más crítico es que el funcionamiento del equipo depende de la computadora de control, la cual utiliza placas y puertos que ya no se fabrican ni se consiguen en el mercado actual. El problema de la obsolescencia en instrumentos científicos afecta desproporcionadamente a instituciones con bajo presupuesto, ampliando la brecha de acceso a instrumentos de investigación avanzados.

Esto ha llevado a un auge en el desarrollo de instrumentos científicos accesibles y de bajo costo^{12,13}, particularmente en áreas como instrumentación, microscopía, espectroscopía y adquisición de datos^{14–16}. Las iniciativas de hardware abierto hacen que los diseños y la documentación estén disponibles de forma gratuita para que cualquier persona pueda usarlos, construirlos y modificarlos^{17,18}. Por ejemplo, la plataforma Arduino ha proporcionado una plataforma de desarrollo de electrónica económica y fácil de usar basada en un microcontrolador (<https://www.arduino.cc/>). El OpenFlexure Microscope es un microscopio de código abierto que cuesta menos de 100 USD construir¹⁹. Asimismo, recientemente se desarrolló un espectrómetro basado en Raspberry Pi que cuesta menos de 400 EUR²⁰. El software y los lenguajes de código abierto, como Python (<http://www.python.org>), que cuentan con bibliotecas numéricas y de instrumentación como NumPy²¹ y PyVISA²², han desempeñado un papel clave al reducir las barreras de entrada y facilitar la creación rápida de prototipos. Cabe destacar que han surgido empresas enfocadas en hardware parcialmente o completamente abierto. Por ejemplo, OpenBCI (<https://openbci.com/>), que ofrece sistemas EEG de bajo costo para interfaces cerebro-computadora, y Opentrons (<https://opentrons.com/>), que proporciona soluciones de manejo de líquidos para la automatización de laboratorios.

1.2.3. Medición de tiempos de vida: *Time-Correlated Single Photon Counting*

Muchos espectrofluorímetros comerciales tienen la capacidad de medir tiempos de vida del orden de los nanosegundos. Sin embargo, existen materiales luminescentes, como los fosforescentes, presentan tiempos de vida del orden de los cientos de microsegundos en adelante. Aunque esto alivia la necesidad de una electrónica rápida y costosa,矛盾地 hace que no se pueda medir su tiempo de vida en instrumentos comerciales, ya que los valores típicos están muy alejados del rango

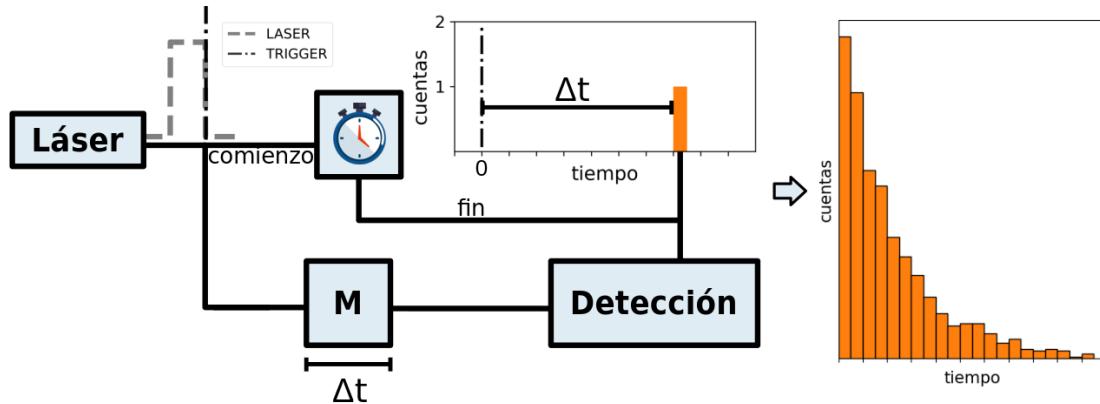


Figura 1.5: Diagrama de TCSPC. Adaptada de²³.

en el que operan²³.

Existen distintas técnicas para medir el tiempo de vida²⁴, pero la más implementada es *Time-Correlated Single Photon Counting* (TCSPC). TCSPC es una técnica digital que cuenta fotones correlacionados temporalmente con respecto a un pulso de excitación. Un diagrama de esta técnica de medición se puede ver en la figura (1.5). El experimento comienza con un pulso de excitación, que tiene dos tareas: (i) excitar a la muestra y (ii) iniciar algún tipo de cronómetro. La muestra se excita repetidamente utilizando una fuente de luz pulsada, comúnmente un láser. Cada pulso es monitoreado, produciendo una señal de inicio que activa el contador del cronómetro. Usualmente, para esta tarea se usa un conversor de tiempo a amplitud (TAC). La luz re-emitida por la muestra llega al sistema de detección, que además de detectar el pulso es el responsable de detener el cronómetro. Al final de esta medición se obtiene el tiempo que tardó el fotón en llegar al detector. Al repetir este experimento múltiples veces, se construye un histograma de cuentas de fotones en función del tiempo. De acuerdo a lo explicado en la sección 1.1.2, para el caso en que sólo hay transiciones de fluorescencia, las alturas de las barras de este histograma deberían seguir una distribución exponencial con tiempo característico τ , el tiempo de vida.

Además de los sistemas fluorescentes y fosforescentes existen otros sistemas en los que distintos centros ópticamente activos interactúan entre sí de forma no lineal, resultando en que la solución a la ecuación equivalente a 1.2 no sea una exponencial decreciente. En la próxima sección introduciremos a las nanopartículas de *upconversion*, un sistema con estas propiedades.

1.3. Nanopartículas de *upconversion*

1.3.1. Luminiscencia de las UCNPs

Las nanopartículas de *upconversion* (UCNP) consisten en una matriz cristalina con dimensiones nanométricas dopada con iones lantánidos trivalentes. El término *upconversion*, que traducido literalmente del inglés sería conversión ascendente, surge la capacidad de las UCNPs de absorber fotones de baja energía, generalmente en el infrarrojo cercano (NIR) y re-emitirlos en el espectro visible y ultravioleta (UV-VIS).

Esta propiedad es útil en múltiples áreas distintas. Por ejemplo, se pueden utilizar como trazadores ópticos en microscopía para etiquetar células, manipular drogas a nivel microscópico y en teranósticos, una técnica de diagnóstico usada comúnmente en tratamientos de medicina nuclear^{25–27}. Al absorber en el infrarrojo presentan una ventaja ante otros fluoróforos, ya que en este rango de longitudes de onda la luz es menos dispersada por los tejidos, además de causar menos daño biológico. Esta capacidad de convertir luz en el NIR al UV-VIS también se puede aprovechar para mejorar la eficiencia de celdas solares, que no son capaces de convertir fotones en el NIR a energía eléctrica²⁸. Otras potenciales aplicaciones de las nanopartículas incluyen su uso para el diseño de pantallas transparentes, termómetros nanométricos y detectores de moléculas fluorescentes en agua^{29–31}.

El motivo de la conversión ascendente de las nanopartículas está dado por la interacción entre los iones lantánidos con las que son dopadas. Los lantánidos son los elementos del sexto período de la tabla periódica, y se caracterizan por ser los elementos que completan los niveles electrónicos $4f$, comenzando con el lantano y finalizando con el lutecio. Aunque esos son sus niveles más energéticos sin completar, los niveles $5s^25p^6$ corresponden a funciones de onda más externas que las $4f$, generando una especie de capa protectora para los electrones de valencia³². La consecuencia de esto son bandas muy angostas en sus espectros de emisión, ya que sus propiedades se ven poco afectadas por los factores externos. Por este motivo, los niveles de energía de los iones lantánidos dentro de la matriz cristalina son similares a sus niveles cuando están libres³³. La luminiscencia de estos iones se da por las transiciones entre los niveles $f - f$ con la misma paridad. Si bien las reglas de selección de la mecánica cuántica establecen que estas transiciones están prohibidas por dipolo eléctrico, para los lantánidos que se encuentran en las UCNPs estas condiciones se ven relajadas por la asimetría de la red cristalina y la interacción entre ellos³⁴. Estas transiciones semi-prohibidas de los lantánidos se ven reflejadas en los largos tiempos de vida de sus estados excitados, que suelen ser del orden de los cientos de microsegundos hasta los milisegundos.

En el desarrollo de esta tesis utilizamos UCNPs formadas por una matriz cristalina de fluoruro de ítrio NaYF_4 dopadas con iones lantánidos de erbio Er^{3+} e iterbio Yb^{3+} (**Fig. 1.6B**). Las nanopartículas cuentan con una capa externa de matriz sin dopaje que aumenta fuertemente su eficiencia (ver **Fig. 1.6A**)^{35,36}. La figura **(1.6C)** muestra el diagrama de niveles del Yb y el Er, y la **(1.6D)** los mecanismos más comunes de interacción entre ellos.

El sistema Yb-Er forma un sistema sensibilizador-activador, donde el sensibilizador, en este caso el iterbio, tiene una gran sección eficaz por lo que tiene una alta probabilidad de absorber fotones. El Yb en particular tiene su pico de absorción en ~ 980 nm, lo que excita a su electrón de valencia al nivel ${}^2\text{F}_{5/2}$. Por otro lado el Er, el activador del sistema, también tiene una banda de absorción centrada en 980 nm que excita la transición ${}^4\text{I}_{15/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{11/2}$. A su vez, presenta sucesivos niveles de energía mayores al ${}^4\text{I}_{11/2}$ equiespaciados con una energía de 980 nm. La combinación entre este esquema de niveles tipo escalera y los largos tiempos de vida de los lantánidos dan el origen a la conversión ascendente: los electrones del Er logran excitarse múltiples veces antes de decaer a su estado fundamental. Esto hace que la transición final sea de mayor energía que los fotones con los que se iluminó a la

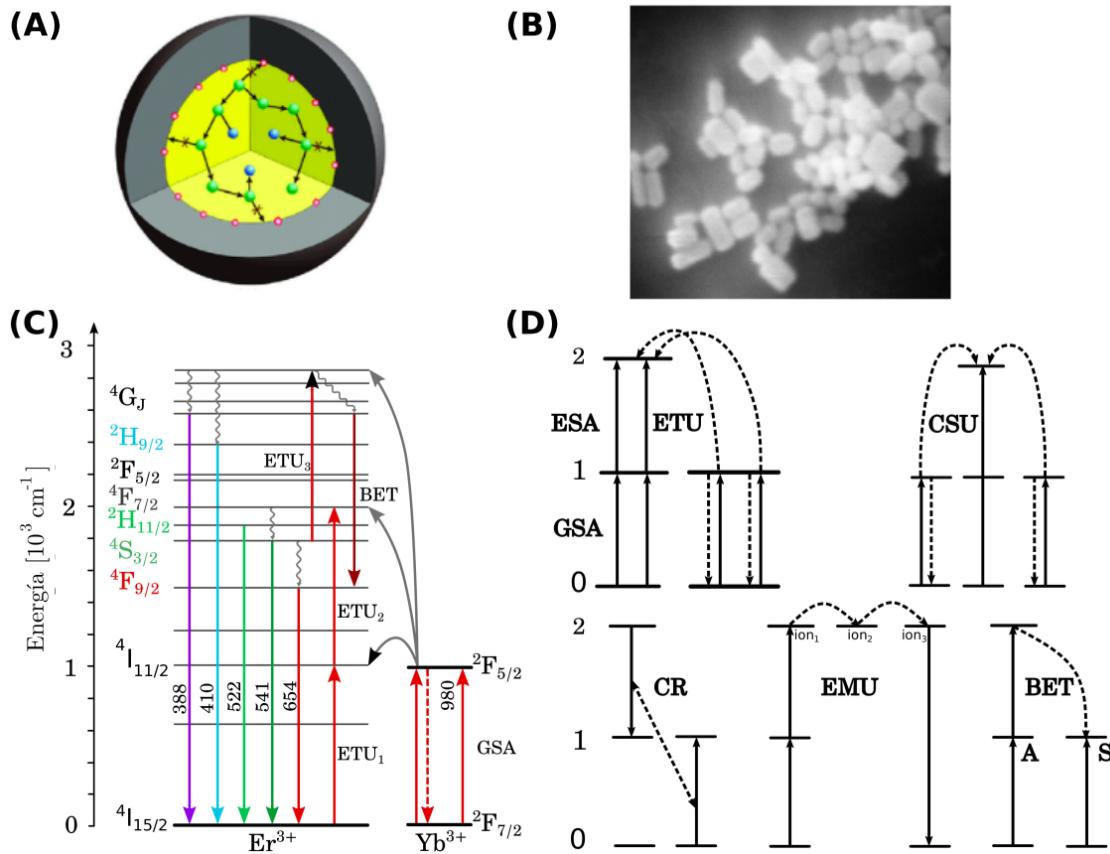


Figura 1.6: Diagrama de nanopartículas de *upconversion*. (A) Diagrama de una UCNP. Consiste en una matriz cristalina dopada con lantánidos en el interior (amarillo), y una capa externa (negro) sin dopaje. (B) Imagen SEM de las nanopartículas utilizadas durante esta tesis. (C) Diagrama de niveles de una UCNP dopada con iones de erbio Er³⁺ e iterbio Yb³⁺. (D) Mecanismos principales de interacción entre los dopantes. Tomada de²³.

muestra, re-emitiendo en el espectro UV-VIS.

1.3.2. Mecanismos y dinámica de las UCNP

Para que la excitación sucesiva de los iones de erbio sea posible, distintos mecanismos de transferencia de energía se dan con el iterbio. Un diagrama de cada uno de ellos se puede ver en la figura (1.6D). Todas las excitaciones comienzan por una excitación del nivel fundamental (*Ground State Absorption*, GSA) al primero excitado en la escalera de niveles con energía de 980 nm. Esto puede pasar tanto para el erbio como para el iterbio, pero como comentamos en la sección anterior, el iterbio tiene una sección eficaz mucho mayor, y por lo tanto es más probable que absorba un ion. Una vez en el estado excitado, gracias a sus largos tiempos de vida, el Er tiene una probabilidad apreciable de volver a absorber otro fotón (*Excited State Absorption*, ESA), excitándolo al nivel $^4F_{7/2}$ con energía equivalente a $\sim 490\text{nm}$. Con menor probabilidad, la situación se podría volver a repetir. Otra alternativa es que un ion

excitado de Yb transfiera su energía de forma no radiativa a través de interacciones dipolo-dipolo a un ion de Er (*Energy Transfer Upconversion*, ETU)³⁷. En este caso, el Yb vuelve a su estado fundamental sin emitir un fotón, y el Er excita su electrón de valencia a un nivel más alto. Tanto ETU como ESA son los mecanismos más probables que causan la luminiscencia de las UCNP³⁸. *Cooperative Sensitization Upconversion* (CSU) y *Energy Migration Upconversion* (EMU) son mecanismos que requieren la interacción de tres iones, en los que los estados excitados se transfieren de unos a otros. Algunos de los mecanismos, como la relajación cruzada (*Cross Relaxation*, CR), no benefician la luminiscencia, sinó que la perjudican. CR consiste en la interacción de dos electrones excitados en la que ambos quedan en un estado intermedio no radiativo. *Back Energy Transfer* (BET) es otro de este tipo, consiste en la relajación de un ion activador en un estado excitado a un sensibilizador²³.

Cada uno de estos mecanismos hace una contribución a la dinámica de la transición de estados de las UCNP. A diferencia de los sistemas fluorescentes más simples como los discutidos en la sección 1.1.2, las ecuaciones dinámicas de las nanopartículas de *upconversion* resultan en sistemas de ecuaciones más complejos. Para empezar, hay una ecuación para cada nivel de energía excitado. Además, cada mecanismo de transferencia agrega términos cruzados en las ecuaciones, y al depender de la presencia de fotones en más de un nivel, suelen ser términos no lineales. Cada uno de esos términos también está acompañado por un coeficiente desconocido que describe el tiempo característico del mecanismo. El resultado es un sistema de doce ecuaciones diferenciales ordinarias no lineales, con decenas de parámetros desconocidos³⁹. Los términos no lineales de las ecuaciones dinámicas se asocian con la absorción secuencial de n fotones que tiene que ocurrir para que las UCNP emitan luz. Esto tiene una consecuencia directa en las observaciones de los experimentos: la luminiscencia depende de la densidad de potencia de excitación como una ley de potencias³⁸. Cada mecanismo sigue una ley de potencias con distinto exponente, pero tienen en común que están relacionadas con el número de fotones presente en el proceso.

1.3.3. Requisitos para la caracterización óptica de las UCNP

Las UCNP son un sistema luminiscente que convierte fotones de 980 nm en el NIR al espectro visible a través de múltiples interacciones entre los iones lantánidos que las componen. Esta interacción se modela a través de un sistema de doce ecuaciones diferenciales no lineales con decenas de parámetros desconocidos. La no linealidad del sistema implica que tanto los espectros como los tiempos de vida dependen de la densidad de potencia de excitación de forma no trivial. Una caracterización óptica ideal de las nanopartículas requeriría ajustar los parámetros de este sistema, aunque esto resulta imposible a fines prácticos por el tamaño del espacio de parámetros y los largos tiempos de adquisición de cada experimento, especialmente a bajas potencias de excitación.

Un instrumento apropiado para caracterizar ópticamente las UCNP debería ser capaz de:

1. Medir espectros estacionarios al excitar una muestra de forma continua.
2. Medir tiempos de vida para los distintos picos de emisión de las partículas.

3. Variar la potencia de excitación.

Idealmente, el instrumento debería ser capaz de realizar mediciones de forma automática para paliar con los largos tiempos que requieren los experimentos. En esta tesis tomamos un espectrofluorímetro antiguo Horiba PTI Quanta Master 400, lo renovamos y ampliamos sus capacidades para que cumpla con estos requisitos. Luego, utilizamos el espectrofluorímetro renovado para caracterizar un lote de nanopartículas de *upconversion* de $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$.

En el capítulo 2 describimos con detalle el *hardware* del instrumento original, explicamos qué partes conservamos y cómo reemplazamos las partes que descartamos. Posteriormente hacemos una caracterización del sistema de detección de fotones, tanto de la respuesta del *hardware* como la detección de picos a través del *software*. En el capítulo 3 explicamos cuál es la estructura del *software* que controla el instrumento, así como los protocolos que implementa para realizar una medición estática y una dinámica. Por último, en la primera sección del capítulo 4 utilizamos el instrumento modificado para medir el espectro estático de excitación y emisión de una muestra patrón y lo comparamos con la misma medición hecha con el instrumento original. En la segunda sección hacemos una caracterización óptica completa de un lote de las UCNPs, midiendo sus espectros estáticos en función de la potencia, así como sus tiempos de vida para los picos de mayor emisión.

Capítulo 2

Espectrofluorímetro para la caracterización de UCNPs

En este capítulo de la tesis se describe detalladamente la plataforma de fuente abierta que desarrollamos para renovar la electrónica y el *software* de control del espectrofluorímetro Horiba PTI Quanta Master (QM 400), uno de los espectrofluorímetros antiguos del laboratorio de fotoquímica del INQUIMAE. Además de su renovación, ampliamos sus capacidades para medir tiempos de vida del orden de los microsegundos, que junto con el agregado de un láser pulsado externo de 980 nm nos permitió conseguir la plataforma ideal para la caracterización óptica de UCNPs tanto estática como dinámica.

2.1. Renovación y ampliación del fluorímetro Horiba PTI Quanta Master 400

2.1.1. Componentes originales

La serie Horiba PTI QM incluye espectrofluorímetros modulares para investigación científica y sistemas optimizados para mediciones de fotoluminiscencia. Estos espectrofluorímetros se encuentran frecuentemente en los laboratorios de Argentina, por ejemplo, sabemos que hay tres equipos de esta serie en el laboratorio de fotoquímica del INQUIMAE (QM400, QM-4 y RatioMaster), dos en el Centro de Investigaciones en Bionanociencias (CIBION) y uno en el Centro Atómico Constituyentes de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CAC-CNEA), y probablemente haya más similares en otras instituciones. Al ser modelos antiguos y descontinuados se pueden encontrar en el mercado por precios que rondan los \$5000 USD, un costo relativamente bajo para un espectrofluorímetro científico. Los bajos costos se dan por su antigüedad y fin de soporte por parte de la empresa, lo que obliga a los usuarios a resolver ellos mismos los problemas que haya con los equipos. Por ejemplo, en CIBION, uno de los dos modelos que tienen no está funcionando porque hay problemas con la inicialización de los controladores en la PC. En este trabajo, reacondicionamos específicamente un espectrofluorímetro QM 400 de más de 30 años de antigüedad, (diagrama en la Fig. 2.1A y fotografía en la Fig. 2.2A), pero

dada la similaridad entre los distintos modelos de esta serie, la renovación se pueden aplicar a cualquiera de ellos con leves modificaciones.

El QM 400 está equipado con una lámpara de xenón de 75 W como fuente de luz, la cual proporciona un amplio espectro de longitudes de onda (desde el infrarrojo cercano, alrededor de 1000 nm, hasta el ultravioleta, alrededor de 300 nm). Los monocromadores de excitación y emisión contienen redes de difracción rotadas por motores paso a paso de 200 pasos por revolución, con especificaciones de 7 V y 0.7 A por bobina (M1 y M2), lo que permite una resolución en la selección de longitudes de onda de 0.5 nm. Ambos incluyen un fin de carrera electromecánico para verificar si se ha alcanzado la longitud de onda máxima. Los motores paso a paso, junto con sus fines de carrera respectivos, están conectados a un módulo controlador de motores (MDM) mediante conectores propietarios no documentados. Los fotones son detectados por un tubo fotomultiplicador (PMT, modelo PTI 810), cuya caracterización se detalla en la sección 2.2.1. Éste está conectado al MDM a través de un cable BNC y polarizado con 1000 V desde una fuente de alimentación externa proporcionada también por el MDM. Esto genera pulsos negativos de alrededor de 170 ns con una terminación de 50 Ohm y un voltaje de -3.5 V (**Fig. 2.1D**). Finalmente, el MDM está conectado mediante un cable plano a una tarjeta de interfaz ISA en una PC con sistema operativo Windows 95 y el programa FelixGX, un *software* propietario de adquisición y control instalado por Horiba (**Fig. 2.1B**). FelixGX permite medir espectros de emisión y excitación (**Fig. 2.1E**), además de brindar herramientas de análisis rápido de los datos y controlar diferentes periféricos.

La antigüedad de la PC y electrónica de control hace que el proceso de adquisición de datos sea tedioso, y más aún para la caracterización de UCNPs. Para hacer una medición el usuario debe colocar la muestra en la cámara y luego configurar en FelixGX un barrido de la longitud de onda de excitación o emisión. En el caso de medir *upconversion* se debe agregar un láser controlado externamente por una fuente de corriente (**Fig. 2.1A**) en la que se debe configurar por separado los parámetros de excitación, como la potencia. Una plataforma de caracterización óptica completa de UCNPs debería ser capaz de medir espectros de emisión y tiempos de vida (del orden de los microsegundos) excitando a 980 nm con distintas densidades de potencia. Además, como las mediciones de espectro y tiempo de vida son de larga duración (en especial a bajas potencias), resulta ideal que la plataforma permita configurar múltiples mediciones sucesivas sin la necesidad de una configuración manual por el usuario. Durante su tesis de doctorado, Juan Bujamer agregó la capacidad de medir tiempos de vida típicos de *upconversion* al QM 400²³. Para lograrlo utilizó en conjunto el control de los monocromadores que brinda FelixGX, una CPU y FPGA Red Pitaya y una fuente de diodo láser externa. El excelente trabajo de Juan durante sentó las bases para que en este trabajo podamos hacer una renovación total del QM 400, utilizando como única plataforma de control a la Red Pitaya e independizandonos de la PC de control original. En las siguientes secciones, explicaremos los cambios de *hardware* y *software* que realizamos en el espectrofluorímetro para que sea una plataforma ideal para medir *upconversion*.

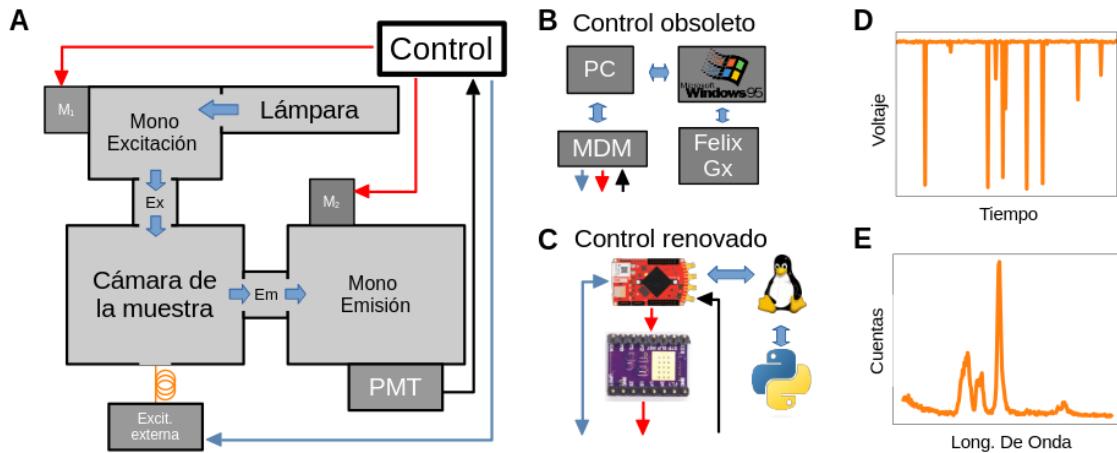


Figura 2.1: Representación esquemática del espectrofluorímetro (A) Diagrama del hardware del Horiba PTI QM 400. Las flechas rojas representan los conectores de motores y fines de carrera, las negras corresponden a BNC, las azules a USB y las naranjas representan fibra óptica. La trayectoria de la luz dentro del espectrómetro está indicada con flechas azules gruesas. (B) y (C) Representación del módulo de control instrumental antiguo y nuevo, respectivamente. (D) Representación de la señal cruda medida por el detector PMT. (E) Espectro de la muestra construido a partir del conteo de picos en las señales crudas medidas para cada longitud de onda.

2.1.2. Hardware para la renovación del QM 400

pequeño parrafo de las partes en la que constó la cosa esta

Luego de hacer una inspección de todas las partes, decidimos conservar los componentes ópticos, la motorización, el PMT, la fuente de alta tensión y el chasis, ya que son robustos y funcionales. En contraste, la electrónica de control y detección resultó ser voluminosa, de código cerrado y obsoleta, por lo que optamos por reemplazarla con alternativas modernas: una CPU con FPGA integrada Red Pitaya (RP) STEM LAB 125-14. La RP cuenta con cuatro entradas y salidas analógicas que emiten y procesan señales en las radiofrecuencias, y un conjunto de pines digitales que permiten controlar circuitos integrados fácilmente. Esta placa junto con dos circuitos integrados DRV8825 que simplifican el control de los motores por paso cumplen la tarea de controlar a los monocromadores. Este cambio en la electrónica de control nos permitió reemplazar el voluminoso módulo MDM ($\sim 10 \text{ cm} \times 30 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$) por dos controladores DRV8825 soldados a una placa PCB mucho más pequeña ($10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$) (Fig. 2.4). Para facilitar la conexión de los componentes del espectrofluorímetro a la RP también agregamos a la placa un puerto IDC que permite conectar los pines digitales, y conectores a los motores a través de fichas adaptadas a medida. El PMT se conecta a través de un cable BNC-SMA a uno de los canales analógicos de radiofrecuencias de la RP, luego son digitalizados por su conversor analógico digital (ADC) (Fig. 2.1D) y luego contados por software (Fig. 2.1E). Todas las conexiones se ven detalladas en la figura (2.3). El ADC de 14 bits de la RP se configura con una frecuencia de muestreo de 31.25 MHz de forma tal de satisfacer el criterio de Nyquist (ver sección 2.2.1). RP tiene una inter-

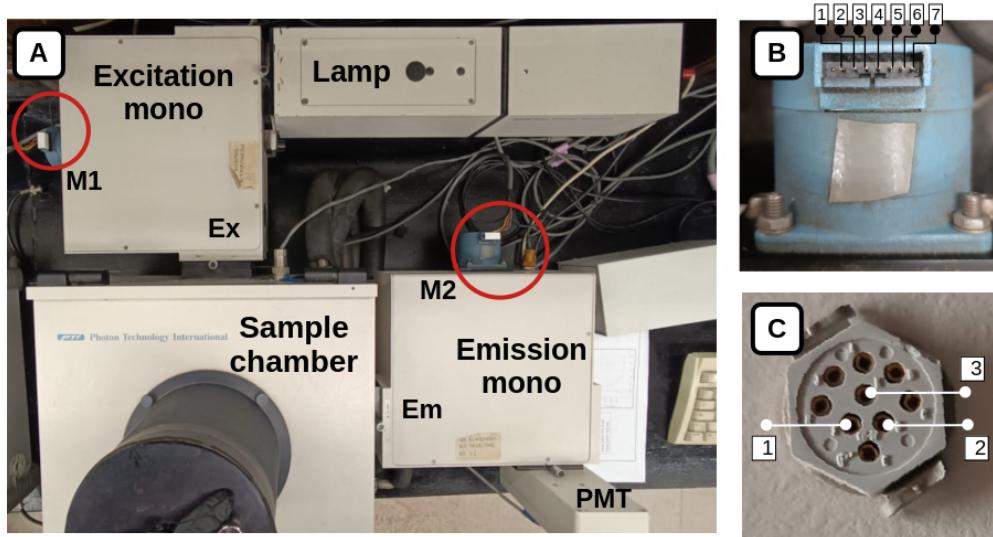


Figura 2.2: Foto del Horiba PTI Quanta Master 400. (A) Imagen del espectrómetro completo. En rojo se señalan los motores de los monocromadores y los fines de carrera. (B) Diagrama de pines de los motores paso a paso. Los únicos pines utilizados en la versión renovada son 1 y 7, y 3 y 5, que corresponden a cada bobina del motor respectivamente. (C) Diagrama de pines de los fines de carrera.

faz de programación de aplicaciones que permite configurar dos métodos distintos para comenzar una adquisición de datos. Una opción es llamar a una función que comienza la adquisición de inmediato. Alternativamente, se puede configurar una de las entradas analógicas o digitales como *trigger* para comenzar una medición. Nosotros usamos el primer método para medir espectros estáticos y el otro para medir tiempos de vida. Asimismo, la RP tiene dos mecanismos distintos para escribir los datos en la memoria al hacer una adquisición: un método por defecto de escritura a un espacio de memoria de 2^{14} enteros de 16 bits, y un método de adquisición de memoria profunda (DMA) que permite guardar hasta 2 MB⁴⁰. Con esta capacidad para almacenar datos, a 31.25 MHz la ventana temporal de pulsos más grande que se puede obtener es de ~ 0.5 ms y ~ 8 ms respectivamente. Aunque resulta beneficioso el método DMA y se podría implementar en esta renovación, nosotros utilizamos el método por defecto por la simplicidad que significó durante el desarrollo. Para contrarrestar la corta duración de la ventana de adquisición, el software de control que desarrollamos permite agregar una demora para obtener ventanas de medición más grandes (ver sección 3.3). El apéndice A explica detalladamente cómo reproducir las conexiones.

2.1.3. Hardware ampliación

El espectrofluorímetro original QM 400 disponible en el laboratorio no era adecuado para estudiar *upconversion*, ya que no contaba con una fuente de luz en el infrarrojo (IR). Tampoco era posible realizar mediciones de tiempos de vida de la luminiscencia debido a la falta de excitación pulsada y detección dependiente del tiempo. Luego de aplicar renovación mencionada anteriormente, incorporamos estas

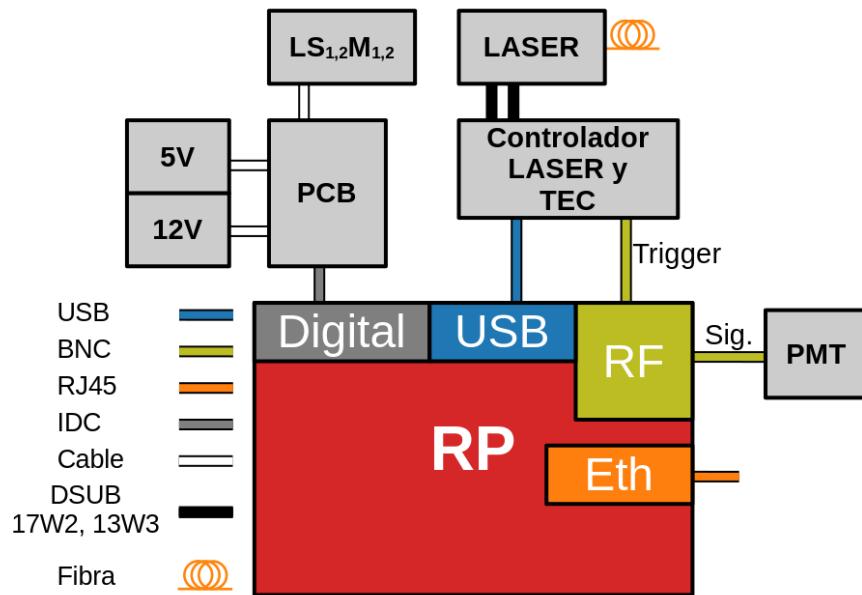


Figura 2.3: Conexiones necesarias para la renovación y ampliación del QM400.

funcionalidades al equipo y al *software* de forma independiente.

Para ello, añadimos una fuente de luz IR externa modulable al sistema. En nuestro caso, utilizamos un controlador de diodo láser y temperatura (TEC) de banco THORLABS ITC4020, controlado por la RP, para operar un diodo láser BL976-SAG300 de 976 nm y 300 mW. La salida del diodo láser se conecta mediante una fibra óptica a la entrada de fuente externa del QM 400 (**Fig. 2.1A**). El ITC4020 permite configurar la frecuencia de pulsado y el ciclo de trabajo, además de proporcionar una señal TTL que está en 5 V cuando el láser está prendido y 0 V cuando está apagado. Esta señal se conecta a otra de las entradas analógicas de la RP, que luego la utiliza como *trigger* para sincronizar la finalización de la excitación del láser, con la medición de los pulsos eléctricos de los fotones. Esta sincronización le permite al *software* realizar histogramas y así medir los tiempos de vida, proceso que se explica en detalle en la sección 3.3.

2.2. Sistema de detección de fotones

Los tubos fotomultiplicadores (PMTs) son detectores de fotones ampliamente utilizados en fluorómetros y cumplen un rol central en el funcionamiento del instrumento. Un PMT está compuesto por un photocátodo y una serie de díodos, que actúan como etapas de amplificación. Los fotones incidentes provocan la emisión de electrones desde el photocátodo, y estos son amplificados sucesivamente por los díodos. Al final del proceso, que tiene una duración típica de 40 a 50 nanosegundos, el pulso llega a un ánodo, desde donde se lee la señal. Este detector puede operar en dos modos: analógico o conteo de fotones. En el modo analógico, la corriente que fluye por el ánodo debe ser proporcional a la intensidad de luz que incide so-

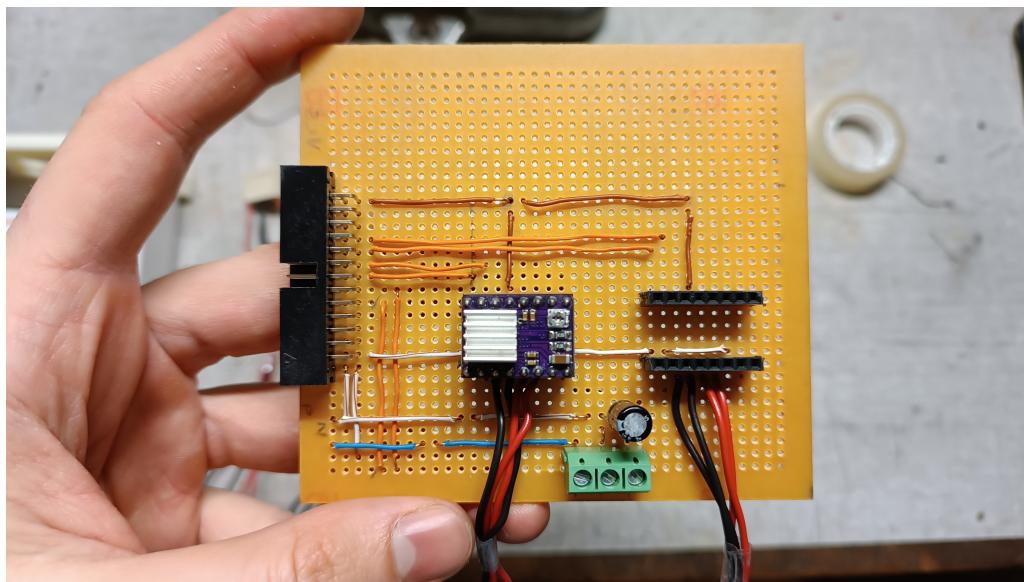


Figura 2.4: Placa PCB con la electrónica de control. La placa cuenta con un puerto IDC (izquierda) al que se conectan los pines digitales de la RP, que además provee la alimentación de 3.3 V a los circuitos integrados (centro). La placa incluye una bornera para proveer una referencia a tierra, una alimentación de 5 V y otra de 12 V.

bre el photocátodo. En el modo de conteo, el PMT registra pulsos eléctricos de corta duración cada vez que se detecta un fotón. Resulta crucial que el detector no se encuentre dañado, cosa que usualmente sucede por la exposición a luz muy intensa. Esto puede generar una corriente de oscuridad alta, pulsos espurios en la señal que sesgan el resultado de la medición⁴. En nuestro instrumento renovado, la señal del PMT se adquiere utilizando una Red Pitaya (RP). Este dispositivo permite una frecuencia máxima de adquisición de 125 MHz, aunque también es posible trabajar a frecuencias menores que sean divisiones por 2 de ese valor. Para realizar un conteo preciso de los fotones que inciden en el photocátodo, caracterizamos la señal del PMT del QM 400 utilizando la RP en las mismas condiciones operativas del fluorímetro modificado. Como resultado, medimos la corriente de oscuridad, determinamos el ancho medio de los pulsos y definimos el algoritmo de detección de pulsos más adecuado para optimizar el conteo. En las próximas secciones describimos en detalle esta caracterización.

2.2.1. Caracterización del PMT con la Red Pitaya

Una señal típica del PMT al ser iluminado de forma constante, medida con una ventana de la RP a 31.25 MHz, se puede ver en la figura (2.5A). La señal muestra un voltaje de base que ronda los 3.5 V, y múltiples picos negativos que representan la llegada de un fotón al photocátodo. Si bien la mayoría de pulsos suelen estar entre 1 y 0 V, hay otros que no llegan a saturar el detector y tienen menor altura. Los pulsos que saturan tienen un tiempo rápido de subida, de aproximadamente ~ 16 ns, luego son constantes y después bajan rápidamente. Se puede notar una ligera

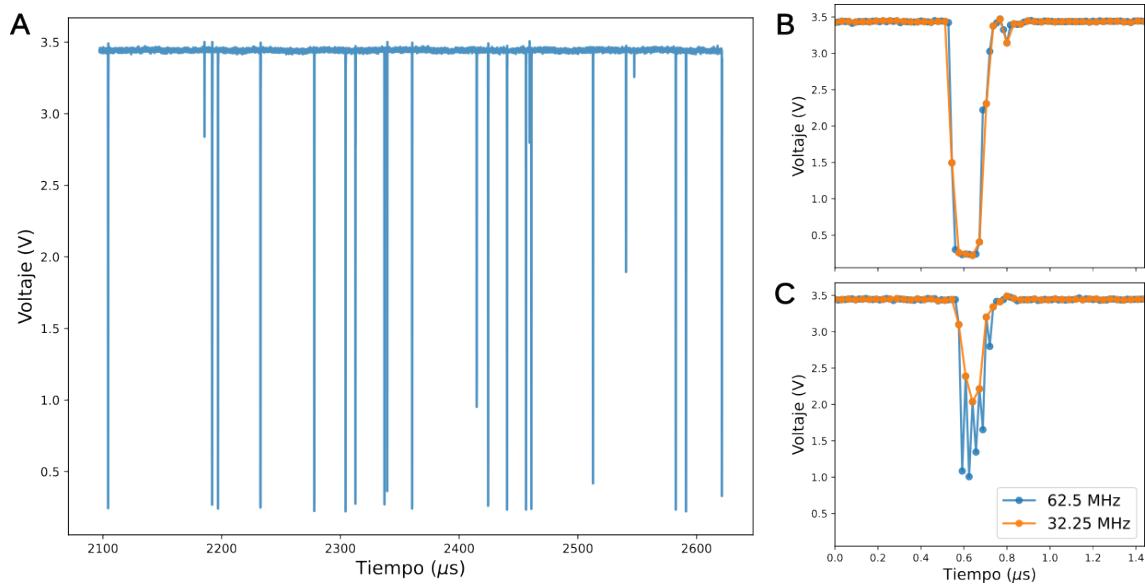


Figura 2.5: Señal del PMT. (A) Medición de la señal del PMT en una ventana de la RP. Medidos a 62.5 MHz en azul y 31.25 MHz en naranja:(B) detalle de un pulso que satura al PMT, (C) Detalle de un pulso que no satura el PMT.

asimetría en ellos, sus colas presentan dos rebotes alrededor de 2 y 3 V (**Fig. 2.5B**). Por otro lado, los picos que no saturan presentan oscilaciones de alta frecuencia en el máximo. Estos efectos se ven atenuados al medir a menores frecuencias de muestreo (**Fig. 2.5C**).

La figura (2.6) muestra un histograma del voltaje de los puntos de una señal tomada con una frecuencia de muestreo de 31.25 MHz. Para eliminar la base de la señal se tomaron sólo los puntos con voltajes menores a 3.4 V. Se pueden ver dos picos en el histograma, uno para voltajes menores a 1 V, que corresponde a los pulsos que saturan al PMT, y otro para mayores a 3 V, que se pueden adjudicar al ruido y a los rebotes de la señal en las colas de los pulsos. El eje vertical en escala logarítmica permite diferenciar un salto alrededor de 1.4 V, éste corresponde a los pulsos que no saturan y cuyas oscilaciones de alta frecuencia se ven atenuadas a 31.25 MHz. Viendo el histograma de la altura de los pulsos, tomamos como criterio considerar un pulso de la señal como un fotón que llegó al detector a todos ellos cuyo pico sea menor a 1 V. Además de esta medición a iluminación constante analizamos la señal sin iluminar, concluyendo que la corriente de oscuridad es suficientemente baja como para no considerarla en el conteo.

Para estimar el ancho promedio de los pulsos calculamos la autocorrelación a partir de la medición de múltiples ventanas de la señal del PMT bajo iluminación constante. La relación entre la desviación estandar σ de una distribución gaussiana, y la desviación estandar σ_c su autocorrelación está dada por $\sigma = \sigma_c/\sqrt{2}$. Aproximando a los pulsos que llegan al detector por gaussianos, y usando que el ancho total a mitad de altura (FWHM) de una gaussiana es $\text{FWHM} = 2\sqrt{2 \ln 2}\sigma$, podemos obtener el FWHM de los pulsos con la fórmula $\text{FWHM} = 2\sqrt{2 \ln 2}\sigma_c/\sqrt{2}$ Por lo tanto, ajustamos el resultado de las autocorrelaciones por una gaussiana y realizamos un histograma de las desviaciones estandar de los pulsos $\sigma = \sigma_c/\sqrt{2}$ obtenidas (**Fig.**

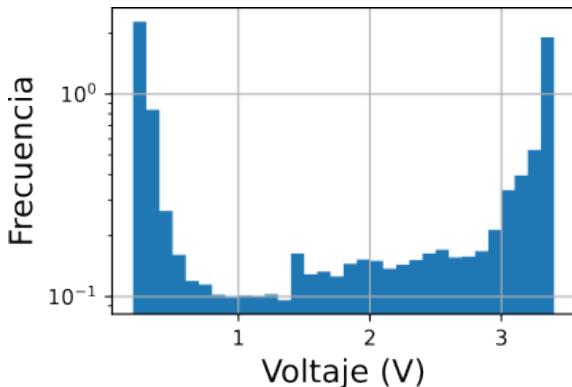


Figura 2.6: Histograma de voltajes de una señal del PMT tomada con la RP a 31.25 MHz. El eje vertical está en escala logarítmica.

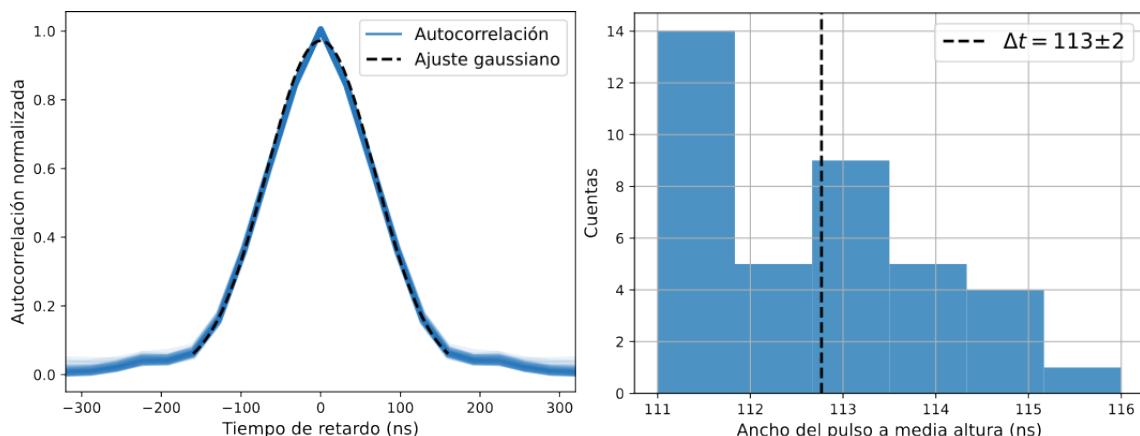


Figura 2.7: Autocorrelación de las ventanas medidas por la RP a 31.25 MHz. A la izquierda se ve la autocorrelación de cada ventana y un ajuste gaussiano a una de ellas. A la derecha, un histograma de las desviaciones estandar de las gausianas.

2.7). Como resultado, el ancho temporal de los pulsos a mitad de altura es de ($\Delta t = 113 \pm 2$) ns, donde definimos el error como dos desviaciones estándar de la media. Esto nos permite definir una tasa máxima R de fotones por segundo que podemos detectar con el PMT. Bajo iluminación continua, la probabilidad de que un fotón llegue al detector en un tiempo t al medir en un intervalo T es uniforme. Entonces, la probabilidad P de que otro fotón se solape debe ser $P = R \times T$, por lo que si queremos que la probabilidad máxima sea del 90 %, podremos adquirir a una tasa de fotones por segundo de $R = P/T = 0,1/113 \times 10^9$ Hz = $8,9 \times 10^5$ Hz.

Las mediciones que mostramos en esta sección fueron útiles para determinar que un pulso de la señal es un fotón sólo si su máximo es menor a 1 V. Además, nos permitieron limitar la tasa máxima con la que se miden fotones a $R = 8,9 \times 10^5$ fotones por segundo para tener un 10 % de chances de que se solapen.

2.2.2. Conteo de fotones

Una vez que la RP obtiene la señal del PMT, el paso que queda para convertirla a intensidad lumínica es hacer un conteo de la cantidad de pulsos para la ventana de tiempo que midió. Para esto, se necesita un algoritmo que tome como entrada la señal temporal del PMT $s(t)$, que muestreada es un conjunto discreto $\{s(t_i)\}$

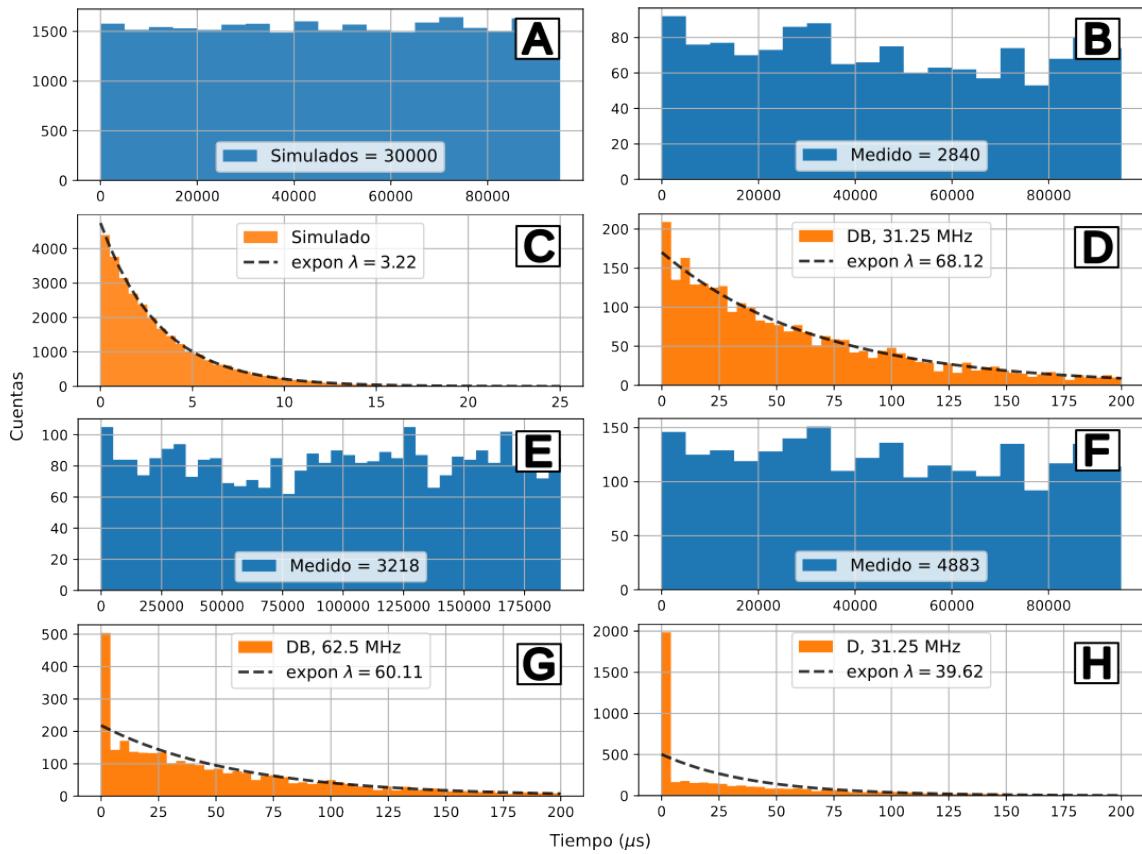


Figura 2.8: Comparación de distintos métodos de conteo de fotones. (A) distribución de pulsos simulados en un intervalo $T \sim 96$ ms y (C) distribución del tiempo Δt entre esos pulsos. Análogamente, (B) y (D) para datos de pulsos medidaos con frecuencia de muestreo de 31.25 MHz y detectados con el algoritmo DB. (E) y (G) medidaos a 62.5 MHz y detectados con DB. (F) y (H) medidaos a 31.25 MHz y detectados con D.

y devuelva como salida el conjunto de tiempos $\{t_p\}$ en los que hay un pulso. El algoritmo debe cumplir con dos condiciones: tiene que ser preciso para no sesgar los espectros y tiempos de vida, y tiene que ser rápido para que las mediciones se puedan hacer en tiempo real.

Nuestra implementación, que llamaremos DB, consiste en tres pasos, (i) binariza la señal temporal, (ii) busca los puntos en los que la derivada hace un salto y (iii) elimina los puntos que están muy cerca en el tiempo. La binarización consiste en convertir en 1 a los puntos que sobrepasan (es decir, cuyo voltaje es menor que) cierto umbral V_b y en 0 a los que no. Luego, se calcula la diferencia entre los puntos consecutivos $\Delta s(t_i) = s(t_{i+1}) - s(t_i)$, y se toma el conjunto $\{t_j\}$ en los que la diferencia es negativa. Por último, se eliminan los puntos que estén a menos de Δt_{min} de otros. Si bien tanto V_b como Δt_{min} son configurables, los valores por defecto son $V_b = 1V$, que se tomó según lo encontrado en la sección 2.2.1, y $\Delta t_{min} = 0$, ya que vimos que cambiar este último valor no generaba una diferencia en los pulsos detectados. Si bien existen otros algoritmos más sofisticados para encontrar picos, como la función `find_peaks_cut` del paquete de Python `scipy`, estos suelen aplicar

técnicas costosas computacionalmente, y por lo tanto lentas a comparación de tomar la derivada y binarización⁴¹.

Una vez elegido el algoritmo, es necesario asegurarse que estuviera contando pulsos correctamente. Para eso iluminamos una muestra con intensidad constante durante un intervalo T de medición, calculamos la distribución de Δt_j y la comparamos con una simulación equivalente (**Fig. 2.8**). La diferencia $\Delta t_i = t_{i+1} - t_i$ entre dos variables aleatorias uniformemente distribuidas, y ordenadas de forma tal que $t_1 < \dots < t_i < t_{i+1} < \dots < t_N$ es otra variable aleatoria con distribución exponencial y valor medio T/N , donde N es el número de pulsos detectados⁴². La simulación consiste en $N = 30000$ pulsos uniformemente distribuidos en un intervalo de ~ 96 ms, lo que da un valor medio de $\lambda \equiv \langle \Delta t_j \rangle = 3.22 \mu\text{s}$ (**Fig. 2.8A y C**). Se tomó $N = 30000$ para tener una buena estadística a la hora de comparar con la distribución de probabilidad exacta (línea punteada en **Fig. 2.8C**) con el mismo valor medio. Realizamos la medición por el mismo intervalo de tiempo con una frecuencia de muestreo de 62.5 MHz al iluminar una muestra con CW. El algoritmo *DB* detectó 3218 pulsos, y se ve que la distribución de Δt_j parece seguir una exponencial excepto por el primer intervalo del histograma que tiene un número de cuentas mucho mayor que el resto (**Fig. 2.8E y G**). Esto se debe a las fluctuaciones de alta frecuencia, que hacen que *DB* detecte dos t_j para un mismo pulso de la señal. Para resolver este problema se puede aumentar Δt_{min} o reducir la frecuencia de muestreo. La frecuencia de 31.25 MHz sigue siendo capaz de detectar pulsos (ver 2.2.1), por lo que realizamos el mismo análisis sub-muestreando la señal original. En este caso *DB* detectó 2840 pulsos, y se ve que la distribución de Δt sigue una exponencial con valor medio $\lambda = 68.12$ (**Fig. 2.8B y D**). A modo de comparación, también procesamos la señal a 31.25 MHz pero usando un algoritmo *D* que consiste en tomar los puntos en los que la derivada es menor a un umbral (en este caso de -0.5). Éste detectó 4883 pulsos, y se puede ver que también tiene el problema de detectar fluctuaciones de alta frecuencia, aumentando sintéticamente la cantidad de pulsos que hay en la señal (**Fig. 2.8F y H**).

Por último, para tener una medida cuantitativa de la bondad de ajuste al modelo exponencial, calculamos el χ^2 dado por la fórmula

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^{n=50} \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}, \quad (2.1)$$

donde n es el número de barras en el histograma, O_i es la cantidad de cuentas observadas, y E_i es la cantidad de cuentas esperadas, asumiendo que la distribución de los datos debería ser una exponencial con el valor medio observado $\langle \Delta t \rangle$. Obtuvimos los estadísticos de la tabla 2.1, donde el χ^2 crítico es el correspondiente a un test de hipótesis con significancia $\alpha = 0.05$ ⁴³. Después de esta comparación entre algoritmos de detección y frecuencias de sampleo, concluimos que la elección óptima es tomar los datos a 31.25 MHz y usar el algoritmo de detección *DB*.

Método	χ^2
DB 31.25 MHz	48
D 31.25 MHz	5690
DB 62.5 MHz	486
Crítico	65

Tabla 2.1: Comparación del estadístico χ^2 para los distintos métodos.

Capítulo 3

Software y protocolos de medición

3.1. Software

Para reemplazar el rol que cumplía el *software* FelixGX en el espectrofluorímetro original desarrollamos, junto con Hernán Grecco, dos paquetes de Python de control de instrumental y adquisición de datos^{44,45}. El código corre en la CPU de la RP y permite controlar al espectrofluorímetro a través de una interfaz de programación de aplicaciones (API) y una interfaz gráfica simple (GUI) desarrollada con el paquete *Jupyter Widgets* de *IPython*. El programa conformado por ambos paquetes está compuesto de cuatro capas principales (**Fig. 3.1**):

- **RedpiPy:** Es uno de los dos paquetes que desarrollamos. Consiste en un *wrapper* (llamado *rpwrap*) de la API original de la RP que resulta en que el código esté mejor organizado para hacer una aplicación en Python. Se compone de funciones y clases que permiten manejar el *hardware* de la RP a bajo nivel, como *RPDO* que controla los pines digitales, así como algunas clases de más alto nivel como *Oscilloscope* que permite manejar el osciloscopio.
- **Clases de dispositivos:** Controlan componentes individuales del espectrofluorímetro, como los monocromadores, el láser pulsado, y los motores de los monocromadores permitiendo el control de todas las partes por separado.
- **Clase Spectrometer:** Coordina el *hardware* para protocolos de medición específicos (por ejemplo, adquirir un espectro de emisión). Es fácil de usar desde un script en Python o desde la línea de comandos. Además, es la encargada de contar los pulsos de voltaje negativo registrados por el PMT (ver sección 2.2.2). Es utilizada por la interfaz gráfica.
- **Interfaz gráfica (GUI):** proporciona herramientas de adquisición similares a las de FelixGX. Se accede a través de la web y utiliza el paquete *Jupyter Widgets* de *IPython*.

Gracias a este diseño la parte del código que implementa el control del instrumento es completamente general y está desacoplada del resto, por lo que debería funcionar para cualquier modelo de espectrofluorímetro cuyos monocromadores sean controlados por motores por paso, y la señal de luminiscencia se lea con un PMT.

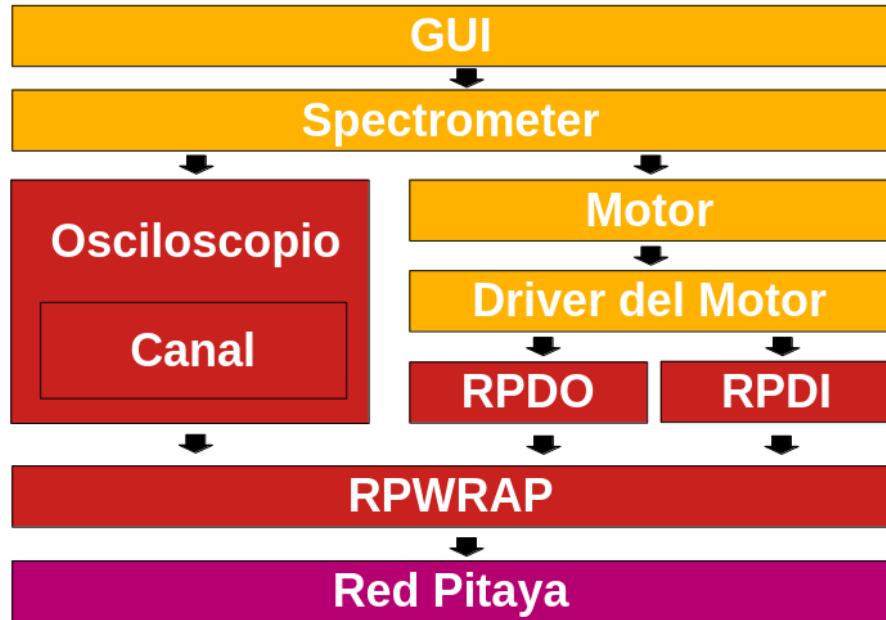


Figura 3.1: Estructura del *software*. Cada elemento del *software* está ordenado de alto nivel (arriba) a bajo nivel (abajo). En amarillo se ven las componentes de *refurbishedPTI*, en rojo las de *redpipy*, en rosa la API y el *hardware* de la RP.

Por otro lado, la API pública le permite al usuario avanzado crear sus propios protocolos de medición que se pueden ejecutar sin la supervisión de un operario. Tanto *RedpiPy* como *RefurbishedPTI* (el paquete que controla al espectrofluorímetro) se encuentran públicos en repositorios de GitHub con sus respectivas instrucciones de instalación. El apéndice B explica detalladamente algunos ejemplos que muestran cómo medir un espectro estacionario y el tiempo de vida para distintas longitudes de onda, ambos a través de la API y de la GUI. En las próximas secciones explicaremos cuál es el protocolo del software para hacer mediciones espetrales estáticas y dinámicas, independientemente de la interfaz que se use para obtenerlas.

3.2. Protocolo de medición estática

El espectro estático de emisión(excitación) de una muestra consiste en la medición de su intensidad de luminiscencia al iluminar(observar) en una longitud de onda fija, y observar(iluminar) barriendo un rango de longitudes de onda. Por lo tanto, antes de iniciar una medición deben estar definidos sus parámetros que en este caso son el tiempo de integración t_{int} , la longitud de onda de iluminación(medición) λ_e , y la longitud de onda inicial λ_i y final λ_f del barrido, así como el paso λ_s entre cada medición de intensidad. En el caso de tomar un espectro de UCNP, dado que la iluminación proviene del diodo láser de 976 nm, también es necesario configurar la potencia óptica de excitación.

Una vez configurados los parámetros, el espectrofluorímetro debe realizar los siguientes pasos:

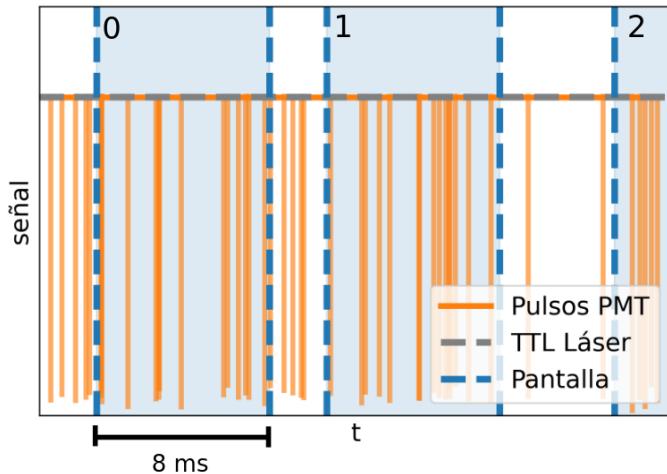


Figura 3.2: Diagrama de medición estática. En naranja se ve la señal del PMT. La línea punteada gris alta indica que el láser está en modo CW. En azul se ven las ventanas de la señal que lee la RP.

1. **Iniciar los monocromadores** haciendo girar los motores en una misma dirección hasta que la señal del fin de carrera de cada uno sea de 5 V. Esto sirve para que la longitud de onda guardada por el *software* coincida con la real.
2. **Mover el monocromador estático** de emisión(excitación) hasta λ_e .
3. **Mover el monocromador dinámico** de excitación(emisión) hasta λ_f en pasos de λ_s . Para cada longitud de onda los pasos (a) y (b) se deben repetir n veces, donde n es tal que $n \times t_{max} \geq t_{int}$ y t_{max} es el máximo tiempo de medición que soporta la RP (0.5 ms):
 - a) Medir la señal del PMT (**Fig. 3.2A**).
 - b) Contar los picos en esa señal (ver sección 2.2.2) y acumularlos. Al finalizar, el resultado es la cantidad de picos (fotones) contados por segundo.

Una vez que el monocromador dinámico llega a λ_f la cantidad de cuentas por segundo para cada longitud de onda se guarda en una tabla y termina la medición. Al caracterizar UCNPs la excitación se da a través del láser externo, por lo que se deben configurar sus parámetros independientemente y el monocromador de excitación, que selecciona la longitud de onda de la lámpara que ilumina a la muestra, no toma ningún rol. Como siempre se miden pantallas enteras, los tiempos de integración posibles son múltiplos de 0.5 ms. Esto no es un problema porque los tiempos de integración necesarios suelen ser típicamente del orden de los segundos, dos o tres órdenes de magnitud mayores a la duración de la pantalla. Además, la tabla de datos resultante de una medición contiene el tiempo de integración para cada punto con un error de ~ 15 ns. En caso de que sea necesario medir con un tiempo de integración más preciso, esto se puede lograr modificando levemente el *software* de *refurbishedPTI*.

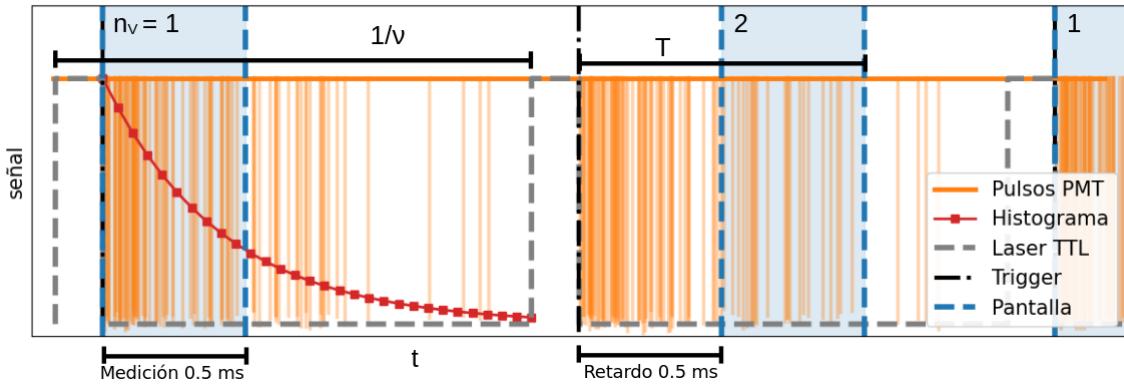


Figura 3.3: Diagrama de medición dinámica. La muestra es excitada intermitentemente con el láser (gris punteado). Al apagarse, el trigger de la RP se ejecuta y comienza a medir (azul) la señal (naranja) luego de esperar por t_{ret} . El resultado es un histograma (rojo) con la cantidad de fotones que llegaron en cada intervalo de tiempo.

3.3. Protocolo de medición dinámica

La medición de los tiempos de vida de las nanopartículas de *upconversion* se realiza mediante la técnica de TCSPC (ver sección 1.2.3). Dado que estos tiempos de vida están en el rango de cientos de microsegundos, no son necesarios varios de los componentes de electrónica rápida típicos de la TCSPC utilizada en mediciones en el rango de nanosegundos, como el CFD y el TAC, los cuales son reemplazados por componentes más simples y menos costosos. Contradicatoriamente, esto hace que no se puedan caracterizar UCNPs utilizando equipos de fluorescencia de uso general, dado que el tiempo total de adquisición necesario difiere en órdenes de magnitud. En nuestro caso, llevamos a cabo la técnica utilizando el trigger configurable a través de las entradas analógicas de la RP, y la señal TTL proveniente de la fuente de alimentación del láser. Otra diferencia con TCSPC tradicional es el modo de excitación de la muestra. Como la mayoría de fluoróforos orgánicos presentan su luminiscencia a través de la excitación de transiciones dipolares eléctricas, pierde energía por fonones, y re-emisión a través de otra transición dipolar, todos fenómenos que ocurren en el orden de los nanosegundos, es posible estudiar su espectro dinámico al excitar con un pulso del láser. En el caso de las UCNPs, su luminiscencia se da por la dinámica no lineal de la interacción entre sus dopantes lantánidos (Yb^{+3} y Er^{+3}), procesos que incluyen la excitación sucesiva sus electrones y por lo tanto ocurren en el orden de los microsegundos. Por este motivo, es necesario iluminar a la muestra por algunos milisegundos para asegurarse de llegar al estado estacionario del sistema antes de medir su decaimiento. Esto se hace aprovechando la función de alimentación pulsada (*Quasi Continuous Wave* ó QCW) que ofrece la fuente ITC4020, la cual permite configurar frecuencia de pulsado ν , y ciclo de trabajo dc (Fig. 3.3).

Para hacer una medición de TCSPC es necesario definir la longitud de onda λ en la que se detectará la emisión, el intervalo de tiempo T en el que se van a contar los fotones luego del trigger, y la cantidad de veces N que se va a medir ese

intervalo. Alternativamente, se podría definir un número de fotones N_{fot} al que se quiere llegar, y medir el intervalo T hasta que la cantidad de fotones medidos n sea mayor a N_{fot} . El protocolo por defecto de nuestro *software* requiere determinar N . Además, el intervalo de tiempo T en el que se mide después del *trigger* debe ser un múltiplo del tiempo máximo que puede medir la RP por ventana, $t_{max} = 0,5$ ms. Por este motivo, en vez de especificar T , vamos a especificar N_V , el número de ventanas que queremos medir después del *trigger* (**Fig. 3.3**). Entonces, el protocolo para realizar la medición es:

1. **Iniciar los monocromadores** de forma análoga a la explicada en la sección anterior.
2. **Mover el monocromador** de emisión hasta λ .
3. **Iniciar el láser en modo QCW** y configurarlo para que se prenda y se apague con frecuencia ν y ciclo de trabajo dc .
4. **Configurar la RP** para que espere un trigger en el canal analógico adecuado antes de medir.
5. **Configurar un tiempo de retardo** $t_{ret} = (n_v - 1) \times t_{max}$, donde $1 \leq n_V \leq N_V$. t_{ret} es el tiempo que la RP pasa sin medir después del *trigger* para poder mover la ventana de medición (**Fig. 3.3**). Repetir N veces:
 - a) **Adquirir una ventana** después del *trigger* y t_{ret} .
 - b) **Encontrar los tiempos de llegada** de los pulsos usando el algoritmo explicado en la sección 2.2.2 y acumularlos.

Al finalizar, el resultado es una tabla con los tiempos en los que llegaron los fotones después del *trigger*.

Con la tabla de datos final se construye un histograma (**Fig. 3.3**), al cual se le puede ajustar un modelo de decaimiento para obtener el tiempo de vida de las partículas.

Capítulo 4

Caracterización de UCNPs

En este capítulo, vamos a utilizar el Horiba PTI QM 400 renovado y con su ampliación de capacidades para realizar mediciones de espectros estáticos de excitación y emisión, así como mediciones de tiempo de vida. En la primera sección vamos a medir y comparar los espectros estacionarios de la rodamina B usando el instrumento renovado y el original. En la segunda sección vamos a caracterizar ópticamente un lote de UCNPs. Todas las partículas usadas en este trabajo fueron sintetizadas por el equipo colaborador del INQUIMAE, liderado por Beatriz Barja y María Claudia Marchi. Las nanopartículas utilizadas consisten en una red cristalina de fluoruro de ítrio NaYF_4 dopadas con los lantánidos iterbio (Yb) y erbio (Er), que en conjunto conforman una de las UCNPs más eficientes descriptas hasta el momento $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{+3},\text{Er}^{+3}$ ³⁶. El método de síntesis empleado escapa el alcance de esta tesis, pero está detalladamente documentado en la literatura⁴⁶.

4.1. Espectros estacionarios de la rodamina B

La rodamina es un fluoróforo extensamente usado en microscopía de fluorescencia debido a su fotoestabilidad y sus propiedades fotofísicas^{47,48}. Debido a su popularidad, sus espectros de excitación y emisión así como sus métodos de síntesis son ampliamente conocidos y reproducibles. En particular, se caracteriza por tener un pico en 551 nm para la absorción y uno en 576 nm para la emisión. A modo de verificación de que la medición de un espectro estático, tanto de excitación como de emisión, es el mismo utilizando el *software* y el *hardware* renovado y el original. En la figura (4.1) se ven los cuatro espectros normalizados por su máximo de intensidad. Se puede ver que los espectros medidos con el instrumento original (azul) se solapan completamente con los medidos con nuestra renovación (naranja). Dado que las transiciones electrónicas presentes en la rodamina son dipolares sus tiempos de vida medios son del orden de los nanosegundos, por lo que son imposibles de medir con nuestro instrumento con resolución mínima de ~ 100 ns. En la siguiente sección utilizamos el espectrofluorímetro renovado para su propósito inicial: la caracterización óptica de UCNPs.

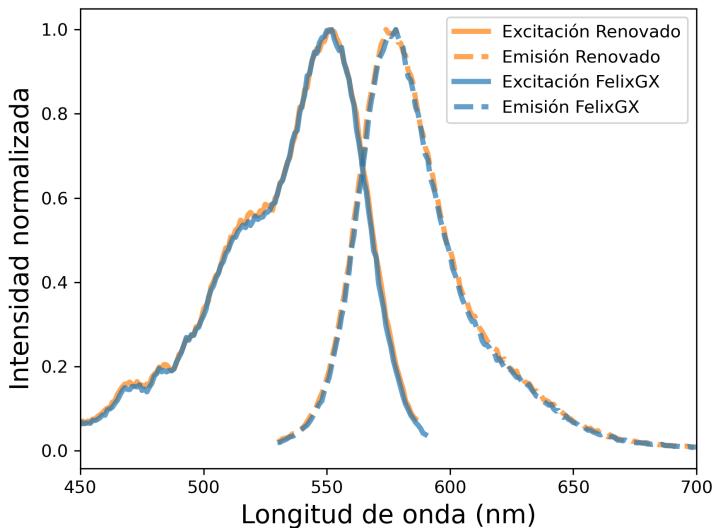


Figura 4.1: Espectros de la rodamina 6B, tanto de excitación (punteado) como de emisión (sólido). Ambos fueron medidos con el *software* y *hardware* original (azul) como con el renovado (naranja).

4.2. Caracterización óptica de UCNPs

Nuestra plataforma adaptada nos permitió medir el espectro dinámico dependiente de la potencia de las UCNPs sintetizadas (**Fig. 4.2**), y sus tiempos de vida (**Fig. 4.4**) al ser excitadas con un láser de diodo IR de 976 nm. Como fue detallado en la sección 1.3, la conversión ascendente es un proceso óptico no lineal en el que dos o más fotones se absorben secuencialmente entre niveles de energía igualmente espaciados, lo que lleva a la emisión de luz con una longitud de onda más corta que la incidente. Debido a las particularmente largas vidas medias (del orden de los cientos de microsegundos) y a los niveles de energía escalonados de los iones de tierras raras, se pueden observar espectros de conversión ascendente de UCNPs en el rango visible incluso a bajas potencias de excitación. En este caso, medimos los espectros estáticos con densidades de potencia que varían entre 16 mW cm^{-2} y 80 mW cm^{-2} al excitar con el láser de forma continua (CW) (**Fig. 4.2A**). El espectro estático muestra los picos de emisión conocidos de los iones Er^{3+} , que van desde la energía más baja hasta la más alta del espectro visible. Comenzando por el lado de menor energía, etiquetamos las regiones de emisión como rojo (R, 630–690 nm), amarillo (Y, 535–570 nm) y verde (G, 500–535 nm), correspondientes a las transiciones ${}^4\text{F}_{9/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$, y ${}^4\text{S}_{3/2}, {}^2\text{H}_{11/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$, respectivamente. El espectro también muestra azul (B, 397–425 nm) y ultravioleta (UVA, 372–390 nm), que provienen de transiciones de niveles excitados más altos, como ${}^2\text{H}_{9/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$ (410 nm) o ${}^4\text{G}_{11/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$ (383 nm)²⁷. Como se mencionó en la sección 1.3, aunque las UCNPs muestran una relación no lineal entre la intensidad de emisión y la densidad de potencia de excitación, esto solo es apreciable cuando se abarcan varios órdenes de magnitud³⁸. La intensidad de emisión de conversión ascendente (I_{UC}) está relacionada de manera no lineal con la densidad de potencia de excitación, $I_{UC} = P^\alpha$, donde α es el número efectivo de fotones involucrados en el proceso de absorción por fotón de mayor energía emitido, y P es la potencia incidente³⁷. El gráfico $\log(I_{UC})$ vs $\log(P)$ (**Fig. 4.3**) muestra que, para este rango de potencias, cada región de emisión está caracterizada por una

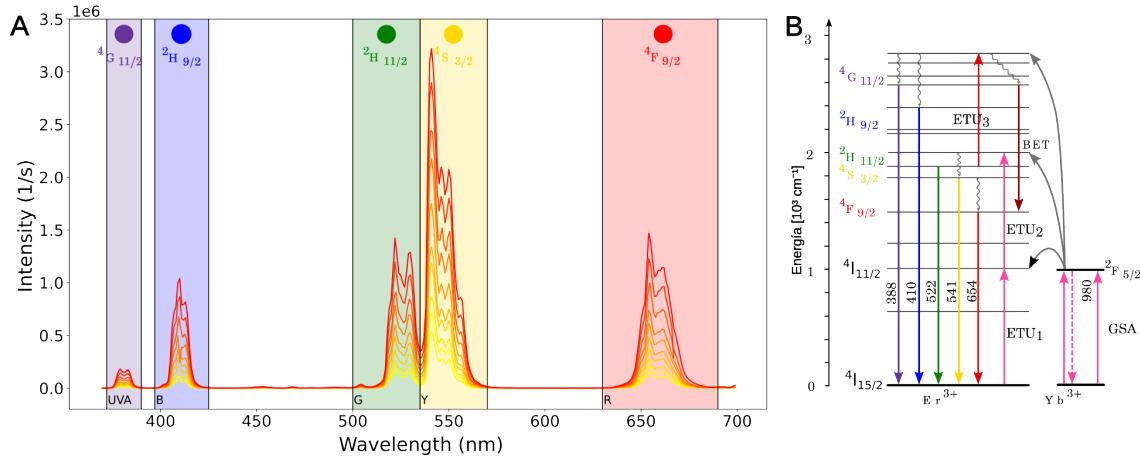


Figura 4.2: Espectro de las UCNPs dependiente de la potencia. (A) Espectro de emisión bajo excitación CW por un diodo láser de 976 nm para distintas densidades de potencia de excitación entre 16 mW cm^{-2} y 80 mW cm^{-2} . (B) Esquema de niveles de Yb^{3+} y Er^{3+} , marcados con colores los niveles excitados del Er^{3+} cuya emisión corresponde a las regiones del espectro.

pendiente relacionada con el número de fotones involucrados en cada proceso (**Fig. 4.3 inset**). No se observaron cambios en estas pendientes para cada longitud de onda (UV, B, G, R), lo que indica que los mecanismos fotofísicos que causan la conversión ascendente son los mismos para todas las potencias. Esto está en línea con el hecho de que la relajación cruzada y la transferencia de energía hacia atrás (BET) desde Er^{3+} hacia Yb^{3+} son despreciables en estos límites de baja potencia^{49 50}.

Además de obtener los espectros estacionarios de las UCNPs, medimos el tiempo de vida medio en los picos de emisión de cada una de las regiones espectrales (**Fig. 4.4**), esto es para las longitudes de onda 379, 410, 522, 541 y 654 nm. Ajustamos los histogramas de tiempo de arriba de los fotones con una curva de decaimiento monoexponencial, comenzando a los $100 \mu\text{s}$ después de que se detuvo la excitación para medir solo la desocupación de los estados excitados. El resultado son vidas medias que varían entre ~ 125 y $\sim 400 \mu\text{s}$. Se observa una disminución en la vida media para los fotones de longitud de onda más corta, correspondientes a estados excitados de mayor energía, lo que es consistente con un mayor número de vías de relajación. Adicionalmente, medimos el tiempo de vida para el pico de emisión de 541 nm a dos potencias distintas de excitación, 3 y 87 mW **4.5**. Al igual que con la relación entre potencia e intensidad, el cambio en tiempo de vida no presenta diferencias significativas para el rango de potencias en el que medimos.

Para este rango de potencias de excitación, no se llegan a medir diferencias significativas ni en la relación funcional entre potencia e intensidad, ni en el tiempo de vida para el pico más intenso de emisión. En el futuro, se podrían repetir las mediciones excitando a densidades de potencia en el rango de 10^0 mW cm^{-2} y 10^2 mW cm^{-2} , en el que se observan cambios en la pendiente de los gráficos $\log(I)$ vs $\log(P)$ ⁵¹. Sin embargo, estas mediciones demuestran la posibilidad de realizar una caracterización óptica completa de las nanopartículas de *upconversion* con las modificaciones que realizamos en el espectrofluorímetro QM 400. Tanto las mediciones

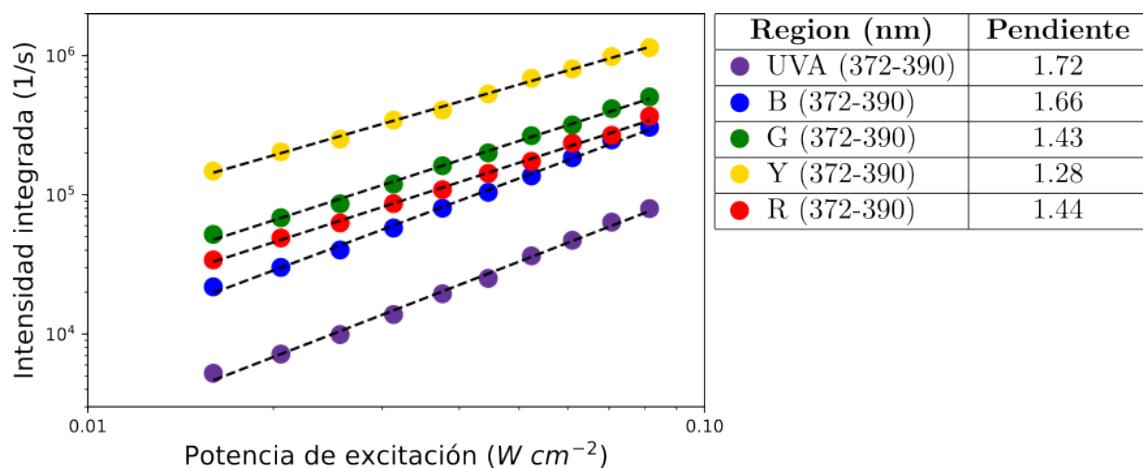


Figura 4.3: Gráfico Log-Log de I vs P. Codificado con colores se encuentran las intensidades para cada potencia de excitación para cada uno de las regiones del espectro definidas. La tabla muestra la pendiente de un ajuste lineal para cada rango.

de espectro en función de la potencia como las de tiempo de vida fueron realizadas automáticamente con secuencias de comandos programadas en Python. La plataforma permite desarrollar una secuencia de comandos más compleja que mida un espectro completo, detecte los picos de emisión y mida los tiempos de vida en esos picos, de forma que el usuario sólo tendría que colocar la muestra en la cámara y ejecutar el programa para realizar una caracterización óptica completa.

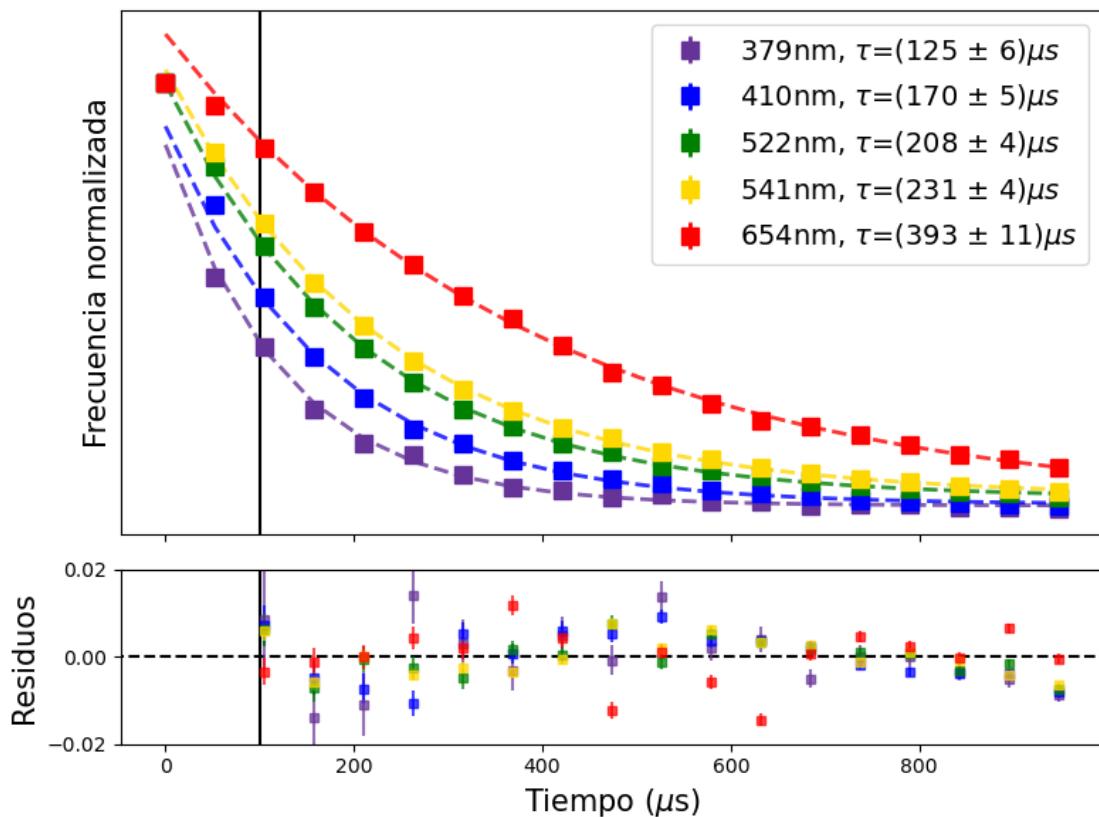


Figura 4.4: Histogramas de tiempos de vida. Tiempo de arribo de los fotones (cuadrados) y ajuste de decadimiento exponencial (lineas sólidas) para cada región del espectro. Los tiempos de vida se midieron a 976 nm, 0.087 mW cm^{-2} .

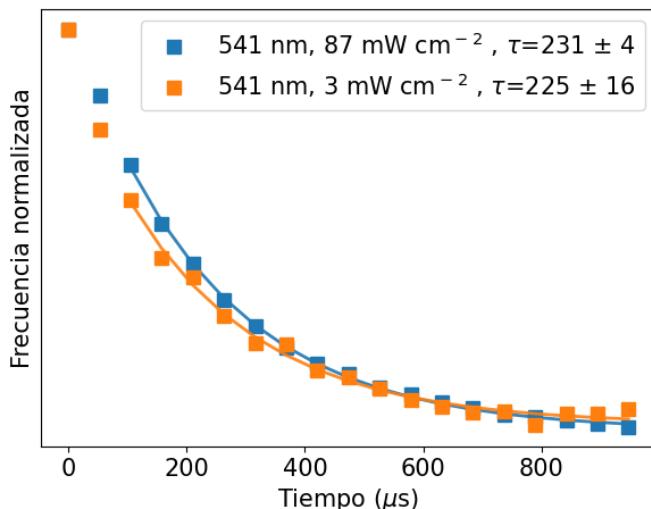


Figura 4.5: Tiempo de vida a distintas potencias. Tiempo de arribo de los fotones (cuadrados) para el pico de emisión de 541 nm y dos potencias de excitación distintas, 3 mW cm^{-2} y 87 mW cm^{-2} .

Capítulo 5

Conclusiones

Renovamos un espectrofluorímetro Horiba PTI Quanta Master 400 obsoleto. Si bien sus elementos ópticos y de detección como los monocromadores y el PMT son componentes de altísima precisión, la utilización del instrumento resultaba dificultosa principalmente debido a su antigua PC de control con sistema operativo Windows 95. Más allá de hacer tedioso su uso por la extracción de datos en disquette, la PC presenta una amenaza para la vida útil del fluorímetro: una falla en su funcionamiento puede dejarlo inutilizable y sin reparación, ya que el producto está fuera de soporte y sus partes no se consiguen en el mercado. Nuestra renovación reemplazó la electrónica de control y la PC por una CPU y FPGA Red Pitaya, junto con dos paquetes de código abierto desarrollados en Python que cumplen el rol de *software* de control y adquisición. Para imitar el funcionamiento del fluorímetro original, hicimos una extensa caracterización del PMT y del algoritmo de conteo de fotones.

Además de la renovación, agregamos un láser externo pulsado de 980 nm que nos permitió adaptar el fluorímetro para hacer mediciones de espectros de emisión estáticos y dinámicos de nanopartículas de *upconversion*. Debido a los efectos no lineales que causan su luminiscencia, una caracterización óptica completa de estas partículas requiere medir sus espectros y tiempos de vida, del orden de milisegundos, para un rango de densidades de potencia de excitación. Estas mediciones requieren el uso del fluorímetro por largos períodos de tiempo, en especial para potencias de excitación bajas en las que los tiempos de integración son largos. Con nuestra plataforma estas mediciones se pueden programar en una rutina de Python, de forma tal que el usuario sólo debe depositar la muestra en la cubeta e iniciar la medición.

Por último, utilizamos nuestro desarrollo para hacer una caracterización óptica completa de UCNPs. Las nanopartículas caracterizadas están compuestas por una matriz cristalina de fluoruro de ítrio dopada con iones lantánidos de iterbio y erbio, $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{+3},\text{Er}^{+3}$, y fueron sintetizadas por el grupo de fotofísica del INQUIMAE, liderado por Beatriz Barja y María Claudia Marchi. Medimos su espectro estacionario y y tiempos de vida para los picos de emisión en un rango de densidades de potencia entre 16 mW cm^{-1} y 80 mW cm^{-1} . Si bien los mecanismos no lineales de interacción entre los dopantes de las nanopartículas hacen que éstas tengan una respuesta no lineal con la potencia, no vemos ese comportamiento en nuestras mediciones. Esto es porque el rango de potencias en el que excitamos es demasiado pequeño como para que haya un cambio en los mecanismos de *upconversion*.

De cara al futuro, vemos que hay tres líneas en las que se puede progresar: (i) realizar mejoras en la plataforma que ya desarrollamos, (ii) aplicar nuestra plataforma a otros fluorímetros y (iii) aprovechar la automatización del instrumento para hacer mediciones más inteligentes. En primer lugar, si bien la plataforma que desarrollamos cumple con la tarea de poder caracterizar UCNPs y renovar el fluorímetro, muchas de sus partes, como la GUI y la placa con la conexión a los instrumentos no son robustas. Ahora que demostramos que las modificaciones funcionan, se podrían diseñar placas PCB, comprar conectores estandar y mejorar la GUI.

En segundo lugar, una vez que tengamos un diseño más robusto de las partes podríamos aprovechar para aplicar la renovación a los fluorímetros presentes en los institutos de Buenos Aires.

Por último, como se comentó en la introducción, la interacción entre los dopantes de las UCNPs se puede modelar con un sistema de ODEs con ~ 50 parámetros desconocidos. Ajustar este modelo haciendo mediciones variando la potencia de excitación, longitud de onda de medición y ciclo de trabajo con fuerza bruta resulta impráctico. En cambio, con nuestra plataforma se podría implementar un algoritmo que tome mediciones, haga un ajuste en tiempo real, y determine cuál es la próxima medición más informativa a realizar. De esa forma, nuestra plataforma nos permitiría estudiar los mecanismos internos de interacción de las nanopartículas de *upconversion*. quizás es muy vendehumo esto

Bibliografía

- [1] *Molecular Fluorescence*, John Wiley & Sons, Ltd, 2012, ch. 1, pp. 1–30.
- [2] K. Suhling, L. M. Hirvonen, J. A. Levitt, P.-H. Chung, C. Tregidgo, A. Le Ma-rois, D. A. Rusakov, K. Zheng, S. Ameer-Beg, S. Poland, S. Coelho, R. Hen-derson and N. Krstajic, *Medical Photonics*, 2015, **27**, 3–40.
- [3] E. Baggaley, J. A. Weinstein and J. A. G. Williams, 2015, 205–256.
- [4] *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, ed. J. R. Lakowicz, Springer US, Bos-ton, MA, 2006.
- [5] N. Yokoi, G. A. Georgiev, H. Kato, A. Komuro, Y. Sonomura, C. Sotozono, K. Tsubota and S. Kinoshita, *American Journal of Ophthalmology*, 2017, **180**, 72–85.
- [6] KURT. LANGE and L. J. BOYD, *Archives of Internal Medicine*, 1944, **74**, 175–184.
- [7] A. Kristoffersen, S. Erga, B. Hamre and Ø. Frette, *Journal of Fluorescence*, 2018, **28**, 1–9.
- [8] *Molecular Fluorescence*, John Wiley & Sons, Ltd, 2012, ch. 3, pp. 53–74.
- [9] W. Demtröder, in *Atoms, Molecules and Photons: An Introduction to Atomic-, Molecular- and Quantum Physics*, ed. W. Demtröder, Springer, Berlin, Heidel-berg, 2010, pp. 247–288.
- [10] A. G. Ryder, S. Power, T. J. Glynn and J. J. Morrison, *Biomarkers and Biolo-gical Spectral Imaging*, 2001, pp. 102–109.
- [11] D. R. Ciocca and G. Delgado, *Cell Stress and Chaperones*, 2017, **22**, 847–852.
- [12] T. Wenzel, *PLOS Biology*, 2023, **21**, e3001931.
- [13] J. Arancio, *Environmental Science & Policy*, 2023, **150**, 103576.
- [14] International Symposium in Honor of Gregorio Weber's Seventieth Birthday, author, New York, 1989.
- [15] Z. Li, H. Lin, L. Wang, L. Cao, J. Sui and K. Wang, *Science of The Total Environment*, 2022, **838**, 156515.

- [16] X.-L. Hu, H.-Q. Gan, F.-D. Meng, H.-H. Han, D.-T. Shi, S. Zhang, L. Zou, X.-P. He and T. D. James, *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 2022, **16**, 1425–1437.
- [17] A. Powell, *Media, Culture & Society*, 2012, **34**, 691–708.
- [18] M. Oellermann, J. W. Jolles, D. Ortiz, R. Seabra, T. Wenzel, H. Wilson and R. L. Tanner, *Integrative and Comparative Biology*, 2022, **62**, 1061–1075.
- [19] J. T. Collins, J. Knapper, J. Stirling, J. Mduda, C. Mkindi, V. Mayagaya, G. A. Mwakajinga, P. T. Nyakyi, V. L. Sanga, D. Carbery, L. White, S. Dale, Z. J. Lim, J. J. Baumberg, P. Cicuta, S. McDermott, B. Vodenicharski and R. Bowman, *Biomedical Optics Express*, 2020, **11**, 2447–2460.
- [20] G. Tunens, E. Einbergs, K. Laganovska, A. Zolotarjovs, K. Vilks, L. Skuja and K. Smits, *HardwareX*, 2024, **18**, e00530.
- [21] C. R. Harris, K. J. Millman, S. J. van der Walt, R. Gommers, P. Virtanen, D. Cournapeau, E. Wieser, J. Taylor, S. Berg, N. J. Smith, R. Kern, M. Picus, S. Hoyer, M. H. van Kerkwijk, M. Brett, A. Haldane, J. F. del Río, M. Wiebe, P. Peterson, P. Gérard-Marchant, K. Sheppard, T. Reddy, W. Weckesser, H. Abbasi, C. Gohlke and T. E. Oliphant, *Nature*, 2020, **585**, 357–362.
- [22] H. E. Grecco, M. C. Dartiallh, G. Thalhammer-Thurner, T. Bronger and F. Bauer, *Journal of Open Source Software*, 2023, **8**, 5304.
- [23] J. Bujjamer, *PhD Thesis*, LEC, Departamento de Física, FCEyN, UBA, 2020.
- [24] W. Becker, *Journal of Microscopy*, 2012, **247**, 119–136.
- [25] J. Shen, L. Zhao and G. Han, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013, **65**, 744–755.
- [26] E. L. Guryev, A. S. Smyshlyaeva, N. Y. Shilyagina, E. A. Sokolova, S. Shanwar, A. B. Kostyuk, A. V. Lyubeshkin, A. A. Schulga, E. V. Konovalova, Q. Lin, I. Roy, I. V. Balalaeva, S. M. Deyev and A. V. Zvyagin, *Molecules*, 2020, **25**, 4302.
- [27] M. Haase and H. Schäfer, *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, **50**, 5808–5829.
- [28] S. Hao, Y. Shang, D. Li, H. Ågren, C. Yang and G. Chen, *Nanoscale*, 2017, **9**, 6711–6715.
- [29] A.-R. Hong, J.-H. Kyhm, G. Kang and H. S. Jang, *Nano Letters*, 2021, **21**, 4838–4844.
- [30] O. A. Savchuk, J. J. Carvajal, C. Cascales, J. Massons, M. Aguiló and F. Díaz, *Journal of Materials Chemistry C*, 2016, **4**, 6602–6613.
- [31] J. M. Bujjamer, M. Illescas, M. C. Marchi, H. E. Grecco and B. C. Barja, *Methods and Applications in Fluorescence*, 2021, **9**, 044001.

- [32] *Benefiting from the Unique Properties of Lanthanide Ions / Accounts of Chemical Research*, <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ar0400894>.
- [33] A. Nadort, J. Zhao and E. M. Goldys, *Nanoscale*, 2016, **8**, 13099–13130.
- [34] *Basics of Lanthanide Photophysics / SpringerLink*, https://link.springer.com/chapter/10.1007/4243_2010_3.
- [35] H.-X. Mai, Y.-W. Zhang, L.-D. Sun and C.-H. Yan, *The Journal of Physical Chemistry C*, 2007, **111**, 13721–13729.
- [36] R. R. M. Dijkstra, *Brightness characterization of single core and core/shell Yb^{3+}, Er^{3+} -doped $NaYF_4$ upconversion nanoparticles*, 2012, <http://essay.utwente.nl/65898/>.
- [37] A. F., *Chemical Reviews*, 2004.
- [38] M. Pollnau, G. D. R., L. S. R., G. H. U. and H. M. P., *Physical Review B*, 2000.
- [39] R. B. Anderson, S. J. Smith, P. S. May and M. T. Berry, *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2014, **5**, 36–42.
- [40] *3.4.4. Deep Memory Acquisition (DMA) — Red Pitaya 2.05-37 Documentation*, <https://redpitaya.readthedocs.io/en/latest/appsFeatures/remoteControl/deepMemoryAcquisition.html>
- [41] P. Du, W. A. Kibbe and S. M. Lin, *Bioinformatics*, 2006, **22**, 2059–2065.
- [42] S. Das and S. I. Maiti, *STATISTICS APPLICATIONS*, 217.
- [43] A. G. Frodesen, O. Skjeggestad and H. Tfte, *Probability and Statistics in Particle Physics*, Universitetsforl., 1979.
- [44] T. Di Napoli, *Tdinapoli/refurbishedPTI*, 2024, <https://github.com/tdinapoli/refurbishedPTI>.
- [45] H. Grecco, *Hgrecco/Redpipy*, 2024, <https://github.com/hgrecco/redpipy>.
- [46] J. Zhang, B. Li, L. Zhang and H. Jiang, *Chemical Communications*, 2012, **48**, 4860.
- [47] M. Beija, C. A. M. Afonso and J. M. G. Martinho, *Chemical Society Reviews*, 2009, **38**, 2410–2433.
- [48] N. Abbass, S. Jameel and A. Alfahdawi, 2007.
- [49] J. F. Suyver, A. Aebsicher, S. García-Revilla, P. Gerner and H. U. Güdel, *Physical Review B*, 2005, **71**, 125123.
- [50] M. T. Berry and P. S. May, *The Journal of Physical Chemistry A*, 2015, **119**, 9805–9811.
- [51] J. Bujjamer, M. Claudia Marchi, B. Barja and H. Grecco, *Energy Reports*, 2020, **6**, year.

- [52] *Welcome to the Red Pitaya Documentation — Red Pitaya 2.05-37 Documentation*, <https://redpitaya.readthedocs.io/en/latest/>.

Appendices

A. instrucciones de armado

A.1. Renovación del Horiba PTI Quanta Master 400

El proceso de ensamblaje para la renovación del espectrómetro Horiba PTI Quanta Master 400 se puede organizar en cinco pasos: (1) conectar el motor de excitación M_1 (**Fig. 2.2**), (2) conectar el fin de carrera de excitación, (3) conectar el motor de emisión M_2 , (4) conectar el fin de carrera de excitación y (5) conectar la salida del PMT. Las fuentes de alimentación deben permanecer apagadas hasta que todo esté correctamente conectado, como se muestra en el esquema (**Fig. A1**). Es necesario asegurarse de que el voltaje de GND sea el mismo en todas las conexiones. **Advertencia:** configurar límite de corriente del controlador DRV8825 esté configurado correctamente (en nuestro caso, para limitar a 0.7 A) y que los pines estén conectados adecuadamente, de lo contrario existe el riesgo de que circule demasiada corriente por los bobinados de los motores y se dañen.

1. Conectar el motor de excitación

- a) Conectar los pines P6 y P7 del RP a los pines STEP y DIR del DRV8825, respectivamente (**Fig. A1**).
- b) Conectar los pines restantes: utilizando 3.3 V del RP como nivel alto digital, coloque los pines SLEEP y RESET del controlador del motor en alto, y conecte el GND lógico al GND del RP. Los pines ENABLE, M0, M1, M2 y FAULT pueden dejarse flotantes.
- c) Ajustar el límite de corriente de salida del DRV8825 al máximo soportado por el motor paso a paso; en este caso, el motor M061CS02 tiene un límite de 0.7 A.
- d) Provea la fuente de alimentación del motor conectando los pines VMOT y GND a una fuente de 12 V que pueda suministrar al menos $2 \times$ límite de corriente. Conectar un capacitor de $100 \mu F$ en paralelo.
- e) Conectar el controlador del motor al motor paso a paso: desconecte el conector original del motor M_1 y conecte los pines A1 y A2 del DRV8825 a los pines 1 y 7 del motor, y los pines B1 y B2 a los pines 3 y 5 (**Fig. 2.2B**).

2. Conectar el fin de carrera de excitación

- a) Alimentar con 5 V y GND a los pines 1 y 2, respectivamente, del fin de carrera junto al motor M_1 (**Fig. 2.2C**).
- b) Conectar el pin 3 del fin de carrera al pin digital P2 del RP para el fin de carrera de M_1 , utilizando una resistencia pull-up externa al nivel lógico de 3.3 V del RP.

3. Conectar el motor de emisión

- a) Conectar los pines P4 y P5 del RP a los pines STEP y DIR del controlador del motor, respectivamente.

- b) Repetir los pasos (b) a (e) del ítem (1) para el motor M_2 .

4. Conectar el fin de carrera de emisión

- Alimentar con 5 V y GND a los pines 1 y 2, respectivamente, del fin de carrera junto al motor M_2 (**Fig. 2.2C**).
- Conectar el pin 3 del fin de carrera al pin digital P3 del RP para el fin de carrera de M_2 , utilizando una resistencia pull-up externa al nivel lógico de 3.3 V del RP.

5. Conectar la salida del PMT

- Conectar el cable BNC-SMA a la entrada analógica 1 del RP y configure el modo de alto voltaje.
- Conectar una ficha T BNC al extremo BNC del cable BNC-SMA conectado al RP.
- Conectar una terminación de 50Ω a uno de los extremos de la ficha T para conformar pulsos de 40 a 100 ns.
- Conectar el otro extremo de la ficha T a la salida del PMT utilizando un cable BNC-BNC.

Después de estos pasos, el instrumento estará listo para realizar mediciones estacionarias.

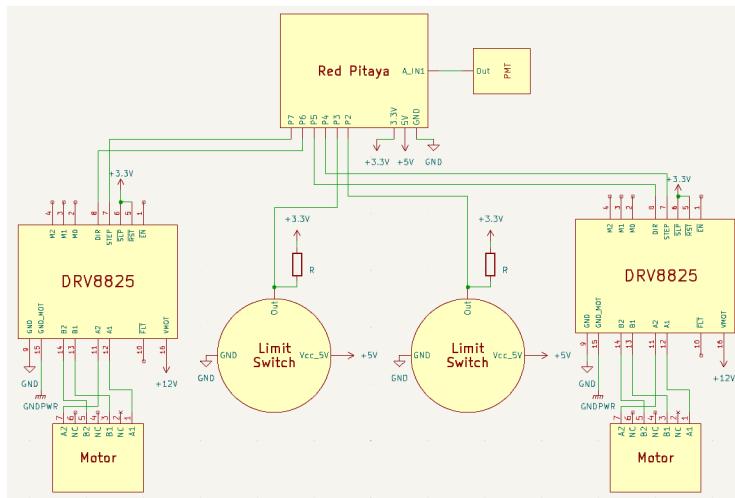


Figura A1: Esquemático de las conexiones que contiene la placa PCB de prueba para conectar las componentes del hardware a la RP.

A.2. Ampliación para mediciones dinámicas

Para añadir la funcionalidad de medir tiempos de vida con el espectrómetro Horiba PTI, además de las instrucciones anteriores, deben realizarse los siguientes pasos adicionales:

1. Conectar la fuente de luz externa al puerto externo utilizando un cable de fibra óptica.

2. Conectar el puerto USB tipo B del ITC4020 al puerto USB tipo A del RP.
3. Conectar la salida BNC R3 (salida TTL de 5 V del ITC4020) en el panel trasero del ITC4020 a un adaptador BNC a SMA, y luego conectarlo a la entrada analógica 2 del RP configurando ese canal en modo de alto voltaje.

Nuestro software está diseñado para trabajar con el controlador láser ITC4020, pero se puede utilizar otro siempre y cuando se añadan clases de control específicas al software.

A.3. Instalación y configuración del software

Seguir las instrucciones en este enlace⁴⁴ para instalar nuestro paquete Python en su RP. Una vez conectados los componentes de hardware, se deben calibrar los motores de los monocromadores y las entradas analógicas del Red Pitaya. Las instrucciones para calibrar las entradas analógicas del RP están disponibles en su documentación oficial⁵².

Para calibrar los monocromadores, desarrollamos un intérprete de línea de comandos que guía el proceso paso a paso y genera un archivo YAML con los parámetros de calibración (**Tabla A1**). El siguiente código en Python abre el menú para calibrar el monocromador de emisión:

```
from refurbishedPTI import Spectrometer
spec = Spectrometer.constructor_default()
spec.emission_mono.calibrate()
```

El comando `save_to_yaml` guarda el archivo de configuración en el directorio del RP indicado por el método `.get_config_path()` de la clase Motor. Una vez calibrado el monocromador de emisión, repita el proceso para el monocromador de excitación:

```
spec.excitation_mono.calibrate()
```

Repetir los mismos pasos que para el monocromador de emisión para completar la configuración.

Parámetro	Tipo de dato	Descripción
<code>greater_wl_cw</code>	bool	True si la longitud de onda incrementa al girar en sentido horario, Falso en el caso contrario.
<code>max_wl</code>	float	Longitud de onda máxima (en nanómetros) que permitirá configurar la API del monocromador
<code>min_wl</code>	float	Longitud de onda mínima (en nanómetros) que permitirá configurar la API del monocromador
<code>wl_step_ratio</code>	float	Cambio (en nanómetros) de longitud de onda por cada paso que da el motor.
<code>home_wavelength</code>	float	Longitud de onda (en nanómetros) en la que se activa la señal del fin de carrera.

Tabla A1: Parámetros de la API de la clase Monochromator.

B. Instrucciones de uso

Como se comentó en la sección 3.1, hay dos formas de operar el espectrómetro renovado: a través de la API de Python y mediante la interfaz gráfica Jupyter Notebook con IPython Widgets.

Para ambos modos de operación, todos los instrumentos listados en la explicación de la sección A.1 deben estar conectados, y tanto el PMT como la lámpara deben estar encendidos. Se deben ajustar las rendijas de Em y Ex (**Fig. 2.1**) según las necesidades del experimento. Una vez completados estos pasos, se puede proceder con las siguientes secciones para el modo de operación por script o GUI.

B.1. Modo de operación GUI

La interfaz gráfica del espectrómetro se encuentra en un Jupyter Notebook que permite al usuario cambiar los parámetros del instrumento mediante Widgets de Jupyter. La GUI se compone de dos secciones: el panel de parámetros y el panel de gráficos (**Figs. A2 y A3**). El panel de parámetros contiene menús desplegables, botones y campos de texto para especificar los parámetros de medición y del archivo de medición. El panel de gráficos incluye dos gráficos, uno para mediciones de espectro y otro para mediciones de tiempo de vida.

Para inicializar el modo GUI del QM400 renovado, se debe abrir el notebook `gui.ipynb` ubicado en `/home/jupyter/refurbishedPTI/gui.ipynb`. Al ejecutar la primera celda del notebook con el código:

```
from refurbishedPTI.gui import Gui  
gui = Gui()
```

se inicializa la GUI.

Para realizar una medición seleccionar las opciones **Spectrum** o **Lifetime** en el menú desplegable **Measurement type**. Se especifican los parámetros de la medición utilizando los componentes de la GUI (detallados en las **Tablas A2 y A3**) y comenzar la adquisición. Una vez finalizada la medición, guarde y manipule los datos con los componentes de la GUI (**Tabla A4**).

Parameter Name	Description
Spectrum type	Emission: fixed excitation monochromator and scanning emission monochromator.
	Excitation: fixed emission monochromator and scanning excitation monochromator.
	Laser: scanning emission monochromator external laser excitation.
Static monochromator wavelength	Fixed monochromator wavelength (nm).
Starting wavelength	Starting wavelength of the scanned wavelength range (nm).
Ending wavelength	Ending wavelength of the scanned wavelength range (nm).
Wavelength step	Difference in wavelength between each data point (nm).
Acquire	Starts the measurement.

Tabla A2: Parámetros de configuración de una medición de espectro estático.

Parameter Name	Description
Pump power	Laser pump power (mW).
Frequency	Laser on and off TTL signal frequency.
Duty Cycle	Duty cycle of TTL signal in %.
Emission monochromator wavelength	Wavelength at which the lifetime will be measured (nm).
Amount of counts	Amount of counts that will be measured until the measurement ends.
Starting time	Time after trigger before start counting (ms).
Ending time	Time after trigger before stop counting (ms).
Acquire	Starts the measurement.

Tabla A3: Parámetros de configuración de una medición dinámica.

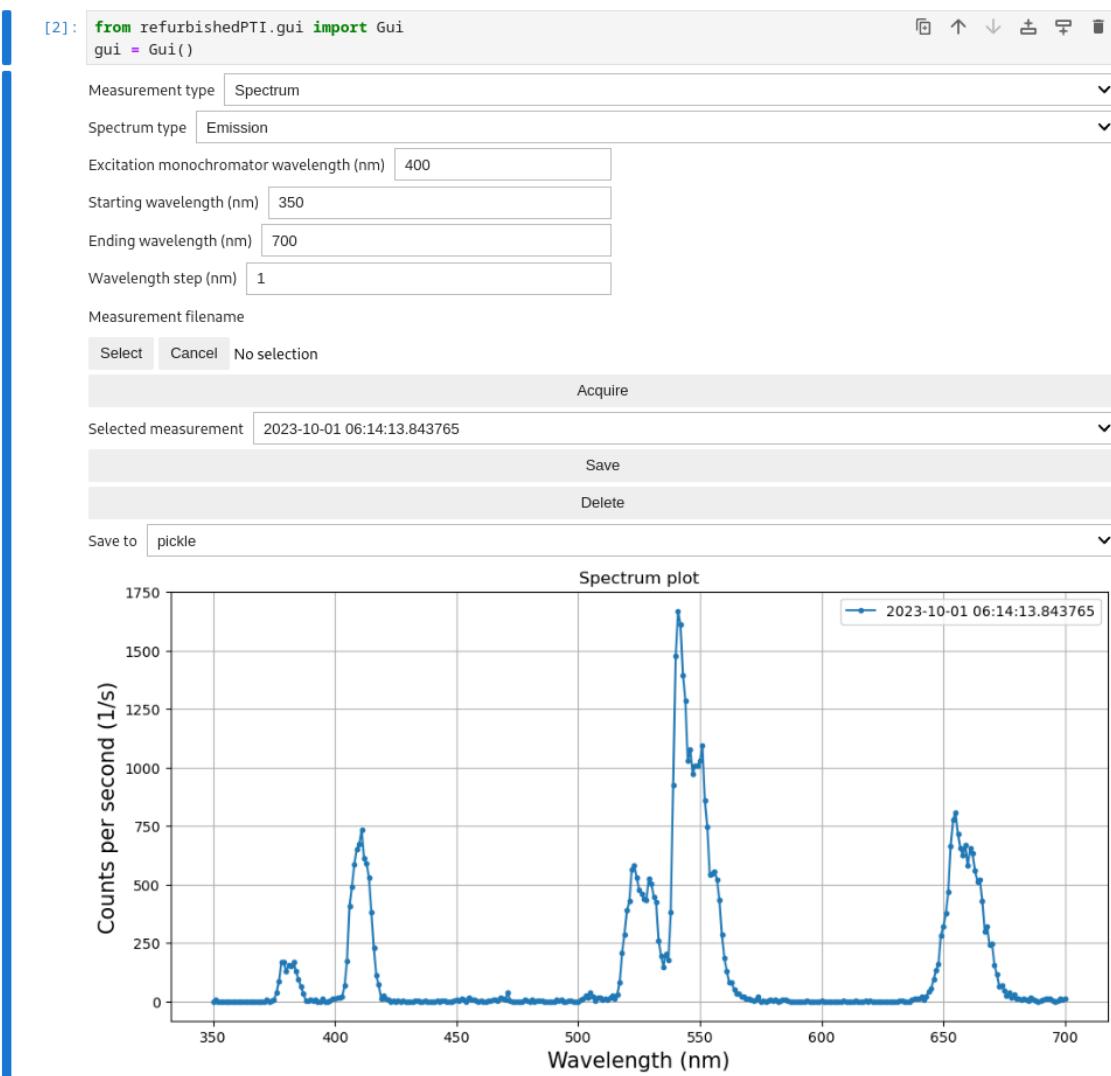


Figura A2: GUI para medir espectros estacionarios.

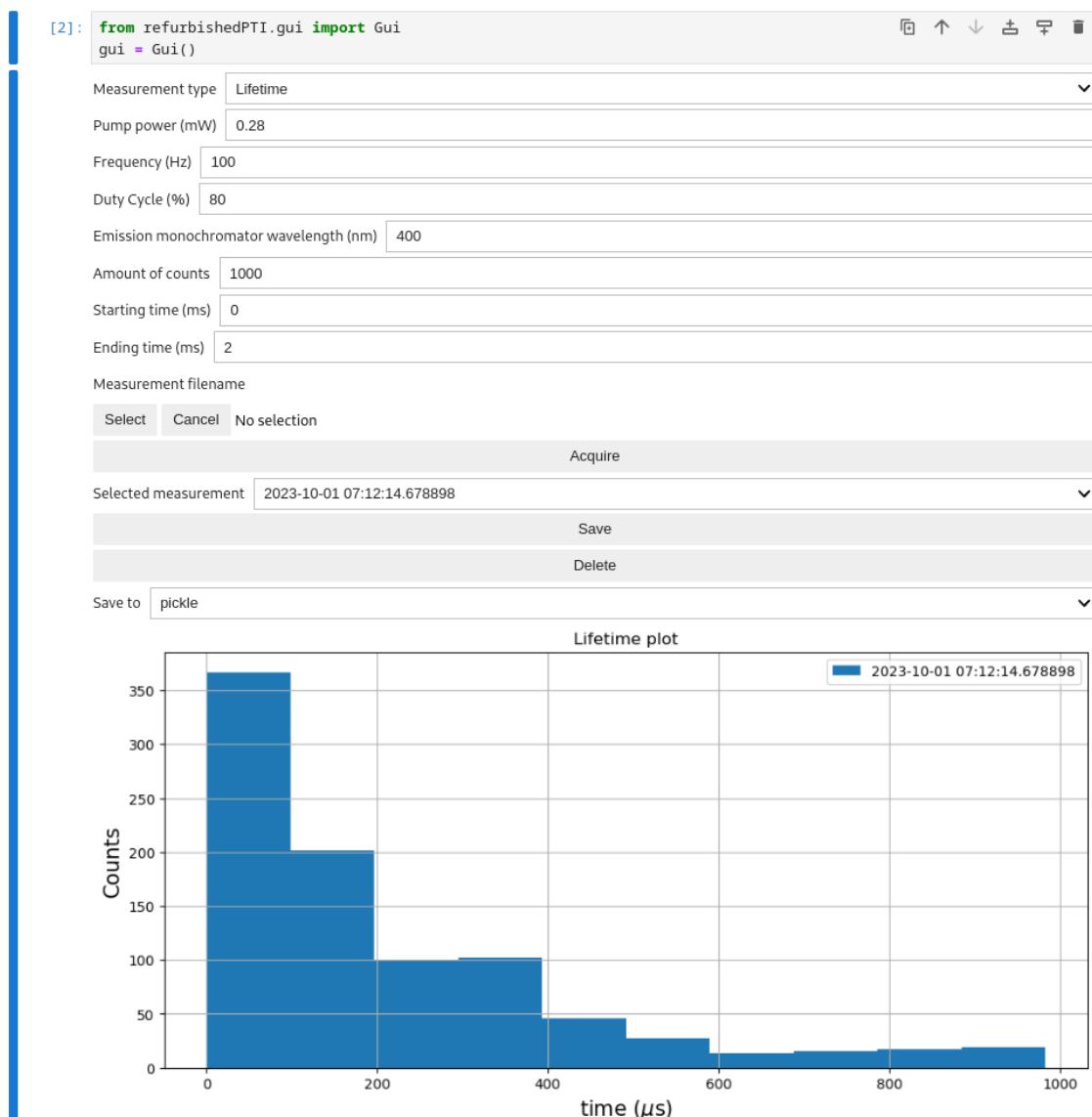


Figura A3: GUI para medir tiempos de vida.

Parameter Name	Description
Measurement filename	Select a filename and directory where the measurement will be saved once the Save button is pressed. If no filename is selected at the time of pressing the Acquire button, the filename will be the current date and time.
Selected measurement	Select a measurement to Save it or Delete it.
Save	Save measurement with selected filename, directory, and format.
Delete	Delete selected measurement.
Save to	File format for the saved measurement. Options: pickle csv excel

Tabla A4: Parámetros de configuración del archivo que guarda los datos de una medición.