



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“MEDICIÓN DEL DECAIMIENTO DE LA EXCITACIÓN
ELECTRÓNICA EN COMPUESTOS HETEROCÍCLICOS:
ALOPURINOL Y SU RIBÓSIDO**

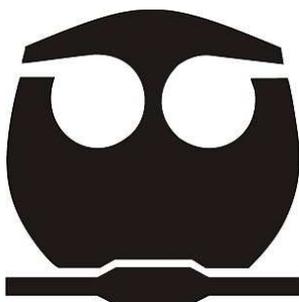
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Q U Í M I C A

PRESENTA

ROSA ELIA ISLAS VIGUERAS



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Dr. Rafael Moreno Esparza
VOCAL: Profesor: Dr. Manuel Fernando Rubio Arroyo
SECRETARIO: Profesor: Dr. Jorge Peón Peralta
1er. SUPLENTE: Profesor: Dra. Norma Angélica Macías Ruvalcaba
2° SUPLENTE: Profesor: M. en C. Carlos Octavio Olvera Bermúdez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA: JORGE PEÓN PERALTA

SUSTENTANTE: ROSA ELIA ISLAS VIGUERAS

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó con el apoyo financiero de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), en el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) proyecto IN212907 y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) proyecto 79494.

Al Dr. Jorge Peón Peralta

Por permitirme ser parte de su grupo de investigación y por el tiempo dedicó para dirigir esta tesis.

A William y a Juan Pablo

Por su colaboración en la realización de la parte experimental de esta tesis.

A mis compañeros de trabajo en especial a Jimena, Elizabeth y Eddy.

Al jurado revisor de esta tesis: Dr. Rafael Moreno Esparza y al Dr. Manuel Fernando Rubio Arroyo.

A mis padres y hermanos:

Gracias por todo el apoyo, por sus sacrificios y por el cariño que me han brindado.

Al M. en C. Diego Pérez Martínez

Al Dr. Antonio Morales Serna

Al M. en C. Jorge Cárdenas Pérez

A mis compañeros de trabajo del laboratorio 2-8.

A mis amigos: Olivia, Jesica, Jimena, Mauricio, Kim, Elizabeth, Eréndira

ÍNDICE

Resumen	8
1. Introducción	9
2. Antecedentes	11
2.1. Procesos de relajación de las moléculas en estado excitado.	11
2.2. Medición de Fluorescencia con resolución temporal	13
2.3. Características generales y de tipo espectroscópico de las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos	16
2.4. Dinámica de estados excitados del monofosfato de guanosina (GMP)	18
2.5 Cálculos de los tautómeros más estables en estado basal del alopurinol .	21
3. Hipótesis	23
4. Objetivo General	24
4.1. Objetivos específicos	24
5. Parte Experimental	25
5.1. Experimentos en estado estacionario	25
5.2. Descripción de la técnica de fluorescencia por suma de frecuencias	26
6. Resultados y Discusión	29
6.1. Espectroscopia UV-Vis de alopurinol y su dependencia con el pH.	29
6.1.1. Espectros de absorción y de emisión, de disoluciones de alopurinol a diversos valores de pH	29

6.1.2. Datos obtenidos por la técnica de fluorescencia por suma de frecuencias	31
6.2. Espectroscopia UV-Vis del ribósido del alopurinol	38
6.2.1. Espectros de absorción en estado estacionario	38
6.2.2. Datos obtenidos por la técnica de fluorescencia por suma de frecuencias	38
6.3. Mecanismo propuesto para la desactivación del estado excitado en GMP y en alopurinol.	44
7. Conclusiones	48
8. Bibliografía	49
9. Anexos	52
9.1. Tratamiento del pulso señal	52
9.2. Anisotropía de Fluorescencia	55

RESUMEN

El estudio de la dinámica de estados excitados del heterociclo alopurinol es muy importante puesto que pone a prueba los métodos teóricos que existen en la actualidad, para explicar procesos de desactivación del estado excitado que son ultra-rápidos.

El alopurinol es una molécula estructuralmente semejante al monofosfato de guanosina (GMP). De modo que el GMP funciona como la molécula de referencia para los datos que se obtuvieron durante el presente trabajo, sobre todo porque es un sistema que ha sido muy estudiado, tanto experimental como teóricamente.

El estudio del alopurinol se realizó mediante la técnica de fluorescencia por suma de frecuencias, con la cual es posible medir los tiempos de decaimiento del estado electrónico excitado con una resolución de femtosegundos (10^{-15} s). El alopurinol tiene tres valores de pKa conocidos y son 1.35, 9.1 y 11.8, de acuerdo con los cuales el estudio se efectuó en tres valores de pH distintos, 1, 7 y 10. Se encontró que en los tres casos el decaimiento fue biexponencial, presentándose un componente rápido ($\tau_1=0.28$ ps (pH=1), $\tau_1=0.29$ ps (pH=7), $\tau_1=0.4$ ps (pH=10)) y un componente largo ($\tau_2=5.4$ ps (pH=1), $\tau_2=5.9$ ps (pH=7), $\tau_2=23$ ps (pH=10)). El decaimiento fue severamente afectado en pH 10, ya que el segundo tiempo de vida del alopurinol en estas condiciones es muy largo, comparado con los tiempos de vida observados para las especies neutra y monocatiónica.

Se midió el decaimiento de la emisión de fluorescencia del ribósido del alopurinol. Se observó que la descripción del decaimiento es monoexponencial ($\tau_1=0.1$ ps). Al comparar este dato con los tiempos de decaimiento del alopurinol en pH neutro, es posible corroborar la medición de dos especies moleculares distintas, para este último caso. Esta aseveración surge del hecho de que la molécula de ribosa presente en el ribósido del alopurinol, estaciona a la molécula en uno de los tautómeros, de modo que solo se observa un tiempo de decaimiento.

Finalmente se propuso un mecanismo de desactivación del estado excitado para el alopurinol en sus diferentes formas de acuerdo al pH. El mecanismo involucra la existencia de hipersuperficies de energía potencial donde existen las denominadas intersecciones cónicas (ICs), que conectan al primer estado excitado S_1 con el estado basal S_0 , con lo cual se explica el hecho de que el decaimiento de los sistemas de estudio sea ultra-rápido.

1 INTRODUCCIÓN

La dinámica de estados electrónicamente excitados de las bases nitrogenadas del ADN y ARN es un campo de estudio importante. Este tipo de heterociclos absorben fuertemente la radiación UV proveniente del sol, por lo que son propensas al daño fotoquímico. Cabe mencionar que las moléculas en estado excitado tienen mayor probabilidad de transferir electrones, y desencadenar una reacción por radicales libres, que en el caso de los ácidos nucleicos dan lugar a mutaciones. Así mismo, la transferencia de electrones se favorecen aún más, si la molécula retiene la energía electrónica de excitación durante más tiempo, es decir si tiene tiempos de relajación muy grandes.

Las bases nitrogenadas, a pesar de absorber eficientemente la luz de la región del Ultravioleta, fueron consideradas durante mucho tiempo como moléculas no fluorescentes, debido a la limitante de los espectrofluorómetros convencionales en las mediciones de emisión de fluorescencia. Con el surgimiento de láseres ultrarápidos así como la creación de las técnicas de absorción transitoria y la de fluorescencia por suma de frecuencias, ha sido posible medir de forma directa el tiempo permanecen las moléculas en el estado excitado.

De esta forma, en las últimas décadas se ha podido observar directamente la emisión de fluorescencia de los estados excitados, de las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos. Se ha reportado que el tiempo de vida del estado excitado de dichas moléculas ocurre en la escala de los femtosegundos, lo cual les confiere alta estabilidad al daño fotoquímico. De forma paralela a los estudios de espectroscopia ultra-rápida, han surgido teorías que tratan de explicar la razón por la cual, el decaimiento de los estados excitados de dichas moléculas es ultrarrápido. Una de las más importantes es aquella que propone la existencia de hipersuperficies de energía potencial para una molécula con una configuración electrónica y geometría dadas que se cruzan entre sí, generando las denominadas intersecciones cónicas (IC).

En los estudios tanto teóricos como experimentales, que se han realizado al respecto, es común la comparación de bases nitrogenadas con el mismo

esqueleto, es decir aquellas provenientes de la purina por un lado y las originadas por la pirimidina por el otro. Así mismo, se ha estudiado el efecto que causan algunos sustituyentes en el esqueleto de ambos tipos de bases nitrogenadas (A, G, T, C y U) sobre la dinámica de los estados excitados de los mismos, encontrándose que existen diferencias sustanciales entre las bases púricas y pirimídicas presentes de forma natural en los ácidos nucleicos y las modificadas. Es claro que es muy importante estudiar moléculas que son estructuralmente semejantes a la purina (que no son derivados de la misma), que tengan un comportamiento fotofísico conocido. El planteamiento de nuevos sistemas de estudio, como lo es el de la dinámica de estados excitados del alopurinol, permitirá la validación de los métodos teóricos recientes [27,22], siempre y cuando, puedan explicar de forma congruente los datos experimentales que se observen.

En el presente trabajo se realizó el estudio de la emisión de fluorescencia con respecto al tiempo tanto de la molécula del alopurinol como de su ribósido. Se encontró, que existen dos especies que contribuyen al decaimiento del estado electrónico excitado del alopurinol en su forma neutra. Esta se hizo evidente al medir el tiempo de vida de los estados electrónicos excitados del ribósido del alopurinol, porque, al bloquear una de las posiciones generadoras de tautómeros, con la inserción de una molécula de ribosa se observó el tiempo de vida de solo una de las especies. Además, se observó también, el efecto que tiene el pH en el tiempo de vida de los estados excitados del alopurinol, notándose que el cambio en el comportamiento es muy notorio en pH básico, pues los tiempos de vida asociados al decaimiento biexponencial, son muy grandes. En general, los decaimientos del alopurinol son ultra-rápidos en todas las condiciones de estudio, así que se propuso un mecanismo de desactivación del estado excitado, mostrando la analogía con el mecanismo que se ha reportado para los sistemas de guanina y monofosfato de guanosina (GMP).

2. ANTECEDENTES

La luz del sol, para que la vida en la tierra se desarrolle, contiene cantidades significativas de radiación UV ($\lambda < 400$ nm) que es absorbida por las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos. Los fotones UV procedentes del sol son generadores potenciales de carcinógenos. La información genómica contenida en el ADN y ARN ha sido sometida a ataques fotoquímicos desde hace miles de millones de años. Sin embargo, las bases púricas y pirimídicas eliminan eficientemente la energía absorbida, esta fotoestabilidad es debida principalmente a que los mecanismos de desactivación son muy rápidos [1].

Las bases nitrogenadas constituyentes de los ácidos nucleicos presentan rendimientos cuánticos de fluorescencia muy bajos en condiciones fisiológicas de temperatura y pH. De hecho, estos compuestos se describieron como “no fluorescentes”. Los bajos porcentajes de rendimiento cuántico son consecuencia de los tiempos de vida muy cortos de los estados excitados de estas moléculas, es aquí donde la espectroscopia con resolución en femtosegundos es necesaria para estudiar la dinámica de los componentes de los ácidos nucleicos [2-6].

2.1 Procesos de relajación de las moléculas en estado excitado.

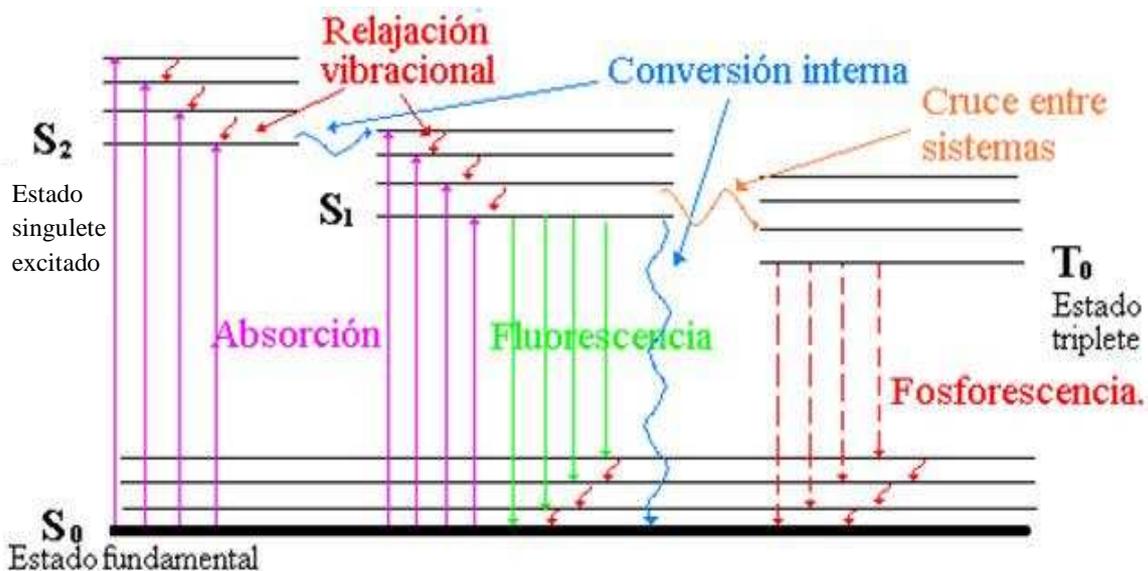


Figura 1. Diagrama de Jablonski-Perrin

Las moléculas en general y las bases nitrogenadas del ADN y ARN que han sido excitadas electrónicamente, por ejemplo, con radiación UV proveniente del sol o de cualquier otra fuente, pueden relajarse mediante numerosos procesos tanto fotofísicos como fotoquímicos. Una molécula no puede permanecer en un estado excitado indefinidamente, así, después de que ha sido llevada a un estado electrónico excitado, invariablemente regresará a su estado electrónico basal. Una manera didáctica de esquematizar los procesos de desactivación, es emplear los diagramas de Jablonski-Perrin, como el que se muestra en la figura 1. Para explicarlo se asumirá que el estado electrónico basal de una molécula dada es un singulete, el cual se denotará por S_0 , de la misma forma el primer estado singulete excitado será S_1 , y se numeraran de manera sucesiva para los siguientes estados singuletes excitados n , como S_n , de forma análoga los estados tripletes se denotarán con la letra T_n y n tomará el número que corresponda de acuerdo al nivel de energía ocupado. Los niveles vibracionales del estado basal y de los estados excitados se indican con líneas horizontales. Cabe señalar que las moléculas tienen asociados niveles rotacionales muy similares en cuanto a energía se refiere, por lo que el espaciamiento entre un nivel rotacional y otro es muy pequeño. Por lo anterior, los niveles rotacionales no aparecen en este diagrama. La absorción de un fotón deja a la molécula en un estado S_1 y a la vez en un estado vibracional excitado, esta transición se representa con flechas verticales (color rosa). La molécula en estado excitado se puede relajar mediante diferentes mecanismos. Las transiciones entre niveles de energía que involucran tanto la absorción como la emisión de radiación son llamadas *transiciones radiativas*. Por otra parte, las transiciones que no involucran la absorción o emisión de radiación son denominadas *transiciones no radiativas*. Los diferentes tipos de flechas indican los tipos de procesos de relajación que pueden ocurrir entre los distintos niveles de energía. Las flechas sólidas indican transiciones radiativas, las flechas onduladas representan transiciones no radiativas en un mismo estado electrónico y las flechas punteadas indican transiciones no radiativas entre dos estados electrónicos. Las colisiones entre la molécula en estado excitado y las demás moléculas del medio propician el intercambio de energía que elimina el

exceso de energía vibracional. Este proceso es conocido como *relajación vibracional*, el cual permite que la molécula en estado excitado se relaje de manera muy rápida al estado vibracional excitado más bajo del estado S_1 . Una vez que la molécula ha alcanzado este nivel, puede relajarse al estado basal S_0 ya sea emitiendo un fotón (proceso radiativo) o nuevamente intercambiando energía con el medio circundante mediante colisiones, en una transición no radiativa desde el estado electrónico excitado a uno de los niveles vibración-rotacionales del estado basal de la molécula en cuestión. El decaimiento radiativo de una transición entre estados de la misma multiplicidad de espín se denominada **fluorescencia**. Por otro lado el decaimiento no radiativo que también implica una transición entre estados de la misma multiplicidad de espín se llama *conversión interna*.

Cuando algunos de los estados rotacionales y vibracionales del estado electrónico excitado S_1 se superponen a estados vibracionales y rotacionales del estado electrónico T_1 de una molécula dada, es posible que ocurra una transición entre estados de distinta multiplicidad, este proceso se denomina como *cruce entre sistemas*. Este mecanismo de desactivación es más lento que el proceso de conversión interna dado que implica un cambio en la multiplicidad del sistema. Si el cruce entre sistemas produce una molécula en un estado T_1 con exceso de energía vibracional, entonces ocurrirá una relajación vibracional hasta llegar al estado vibracional de más baja energía. Nuevamente la molécula puede relajarse mediante dos caminos, el primero involucra una transición radiativa denominada *fosforescencia* y el segundo es una transición no radiativa (otro ejemplo de cruce entre sistemas). Se debe hacer notar que estos dos últimos procesos implican un cambio en la multiplicidad en el sistema ($T_1 \rightarrow S_0$), por lo cual la fosforescencia es un proceso más lento que la fluorescencia en la que no hay cambios en la multiplicidad de espín [7].

2.2 Medición de fluorescencia con resolución temporal.

La espectroscopia de fluorescencia es una de las técnicas más usadas para el estudio de la estructura y funcionamiento de macromoléculas en biología y

química. Muchos de los procesos de decaimiento de fluorescencia ocurren en una ventana de tiempo del orden de unos cuantos picosegundos hasta algunos nanosegundos; por lo que las mediciones requieren del uso de pulsos de luz muy cortos. Por fortuna, en los últimos años han surgido láseres ultrarrápidos (como el láser de Ti: Zafiro), así como otros instrumentos optoelectrónicos que han permitido realizar mediciones en escalas de tiempo muy cortas.

La técnica de fluorescencia por suma de frecuencias (llamada “*upconversion*”), es una correlación cruzada entre la fluorescencia y el pulso de prueba. En el tiempo $t = 0$, la muestra está electrónicamente excitada ya sea por el segundo o tercer armónico de un láser ultrarrápido pulsado con frecuencia ω_p . La fluorescencia de naturaleza no coherente (ω_f) y el pulso de prueba (o pulso de compuerta ω_p) que llegan en un tiempo $t = \tau$ son enfocados en un cristal de óptica no lineal el cual es orientado a un ángulo apropiado con respecto a la fluorescencia y al rayo láser.

La suma de frecuencias se obtiene solo durante el tiempo en el que el rayo de prueba está presente en el cristal, actuando como luz de compuerta. La evolución temporal de la fluorescencia se obtiene mediante la variación del tiempo de retraso τ del pulso de prueba. El análisis de la suma de frecuencias (pulso señal) muestra que la intensidad de la señal con un tiempo de retraso τ dado, es proporcional a la función de correlación de la intensidad de fluorescencia con la intensidad del pulso de prueba (Ver figura 2) [8].

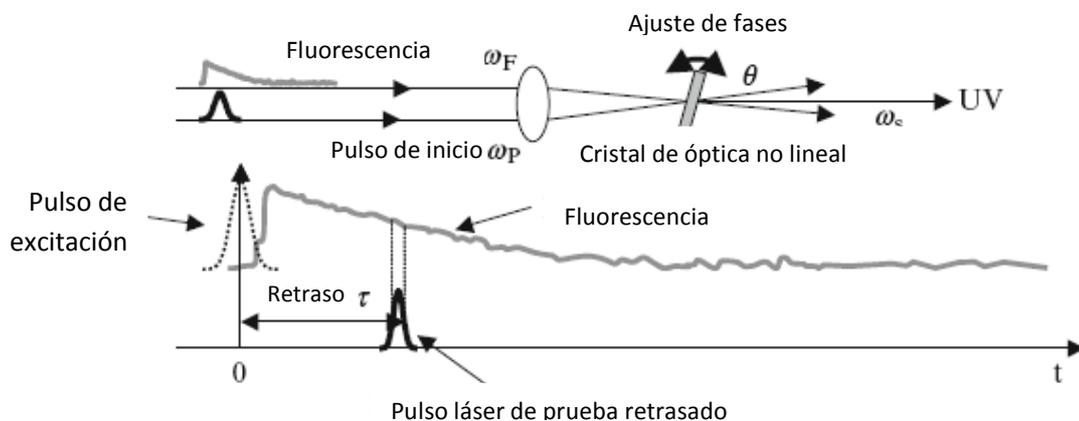


Figura 2. Esquema simplificado que muestra el principio básico de la técnica de fluorescencia por suma de frecuencias.

Para que el proceso de suma de frecuencias sea eficiente es necesario que las condiciones de ajuste de fases sean las adecuadas, esto último solo pasa para un intervalo muy estrecho de longitudes de onda centradas en cierta frecuencia, determinada por el ángulo de ajuste de fases θ_m . Para simplificar el problema, se considerará el caso de ajuste de fases colineal, y las ecuaciones apropiadas para describirlo son las siguientes [8]:

$$\omega_F + \omega_P = \omega_S, \quad h\nu_F + h\nu_P = h\nu_S \quad (1)$$

$$\vec{\kappa}_F + \vec{\kappa}_P = \vec{\kappa}_S \quad \Rightarrow \quad \frac{n_F(\lambda)}{\lambda_F} + \frac{n_P(\lambda)}{\lambda_P} = \frac{n_S(\lambda)}{\lambda_S} \quad (2)$$

Donde ω (o ν), h , $\vec{\kappa}$, y n representan la frecuencia de la onda electromagnética, la constante de Planck, el vector de onda y el índice de refracción respectivamente. Los subíndices F, P y S denotan el rayo de fluorescencia, el rayo de prueba y la generación de la suma de frecuencias, respectivamente. Asumiendo que θ es el ángulo entre la dirección y $\vec{\kappa}$; n_o y n_e son los índices de refracción del eje ordinario (o) y el eje extraordinario (e) respectivamente, de la elipsoide de revolución del cristal BBO. Para un cristal uniaxial en donde el eje óptico se encuentra en la dirección del eje z, el índice de refracción $n(\theta)$ satisface la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{n^2(\theta, \lambda)} = \frac{\sin^2(\theta)}{n_e^2(\lambda)} + \frac{\cos^2(\theta)}{n_o^2(\lambda)} \quad (3)$$

Los índices n_o y n_e del cristal varían con respecto de la longitud de onda, y se pueden obtener de la ecuaciones de Sellmeier en la literatura [9]. En este proyecto, se usó un ajuste de fases tipo I, así que el ángulo es el descrito por la siguiente ecuación:

$$\sin^2(\theta_m) = \frac{[n_s(\theta_m)]^{-2} - (n_{o,s})^{-2}}{(n_{e,s})^{-2} - (n_{o,s})^{-2}}, \quad (4)$$

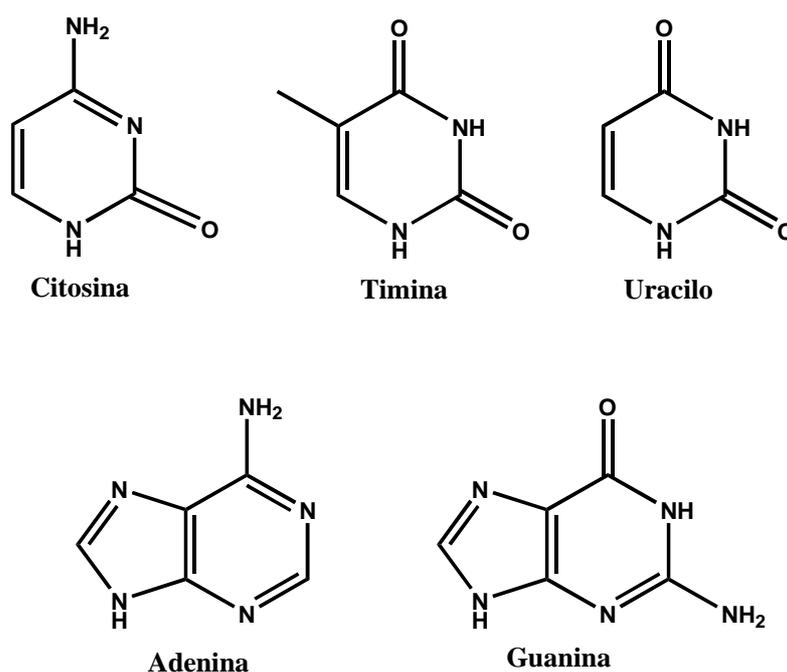
Donde $n_s(\theta_m)$ es:

$$n_s(\theta_m) = n_{F,s} \frac{\lambda_S}{\lambda_F} + n_{o,P} \frac{\lambda_S}{\lambda_P} \quad (5)$$

2.3 Características generales y de tipo espectroscópico de las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos.

Es importante hacer notar que antes de la formación de la capa de ozono (hace aproximadamente 400 millones de años) el planeta Tierra recibía directamente toda la radiación electromagnética proveniente del sol, incluyendo la radiación UV. De modo que la naturaleza a través de la evolución, seleccionó a las moléculas que poseían mecanismos muy eficientes de desactivación del estado excitado para formar parte de los ácidos nucleicos.

Para entender la fotofísica de los biopolímeros ADN y ARN, es esencial como primer paso el estudio y descripción detallada de la dinámica de estados excitados de las bases nitrogenadas individuales. Las estructuras de las 5 bases nitrogenadas se muestran a continuación en el esquema 1[1].



Esquema 1.

Las bases nitrogenadas derivadas de la purina son la adenina y la guanina, y las que son derivadas de la pirimidina son la citosina y timina, las cuatro bases se encuentran formando el ADN. En cambio en el ARN, la base pirimidica uracilo sustituye a la timina. Los ribonucleósidos y los 2'-desoxiribonucleósidos se forman

mediante la unión química de la ribosa o desoxiribosa en la posición N1 de las bases pirimídicas, o en la posición N9 de las bases púricas. Al unir un grupo fosfato a la posición 5' de la (desoxi) ribosa se forma un mononucleótido, que es la unidad monomérica de los polinucleótidos.

Cada una de las bases nitrogenadas tiene isómeros estructurales formados mediante la permutación de los átomos de hidrógeno en los diferentes heteroátomos que constituyen dichas moléculas. Los isómeros estructurales posibles son conocidos como tautómeros. La tautomería complica la interpretación de los experimentos de fotofísica de dichas moléculas porque la estructura electrónica difiere significativamente para cada uno de los tautómeros. Debido a lo antes expuesto, es de suma importancia, la determinación de los tautómeros que están presentes en un experimento dado. Se piensa que los tautómeros que forman las cadenas del ADN (según Watson y Crick) son los que presentan menor energía en disolución.

Se usa la siguiente notación ${}^1\pi \rightarrow \pi^*$ para expresar que se lleva a cabo una transición electrónica desde un orbital tipo π al orbital de antienlace π^* .

Las bases nitrogenadas presentan fuertes transiciones ${}^1\pi \rightarrow \pi^*$ (asociadas al estado S_1) las cuales son responsables de las bandas que se observan en un espectro de absorción [10]. También se pueden dar transiciones del tipo ${}^1n \rightarrow \pi^*$ debido a la presencia de pares de electrones libres de los heteroátomos de las bases.

La longitud de onda de excitación determinará el estado singulete excitado (S_1, S_2, \dots, S_N) que estará inicialmente poblado [1]. La relajación de la energía electrónica y vibracional es ultrarrápida en disolución para estados singuletes superiores con el resultado de que las propiedades observables son aquellas transiciones que ocurren desde el nivel vibracional del estado excitado más bajo S_1 .

Considerando que el *tiempo de vida de fluorescencia*, τ_f , de cualquier molécula es proporcional al rendimiento cuántico de fluorescencia, ϕ_f ,

$$\tau_f = \phi_f \tau_0 \quad (6)$$

Donde τ_0 es el tiempo de vida radiativo, el cual es inversamente proporcional a la constante radiativa ($\tau_0 = K_{rad}^{-1}$) y debido a que no es posible medirse de forma directa, es necesario estimar su valor a partir de los espectros de absorción y fluorescencia en estado estacionario [13]. El tiempo de vida de radiación depende inversamente de la fuerza oscilador de la banda de absorción de menor energía. El valor de τ_0 es de algunos nanosegundos para cromóforos que presentan transiciones permitidas, tales como las bases del ADN y el ARN. La ecuación 6 indica que los rendimientos cuánticos de fluorescencia bajos dan lugar a tiempos de vida de fluorescencia muy cortos. Se sabe que los rendimientos cuánticos de fluorescencia de las bases nitrogenadas son muy bajos, de ahí el hecho de que se les considere como no fluorescentes. En 1971, Daniels y Hauswirth reportaron las primeras mediciones de los rendimientos cuánticos de fluorescencia de las bases de los ácidos nucleicos en disolución acuosa y a temperatura ambiente [8]. También se han reportado mediciones más recientes hechas por Callis [11], Vigny y Cadet [12], las cuales confirmaron los bajos rendimientos, los cuales varían entre 3×10^{-5} (para Uracilo) y 2.6×10^{-4} para Adenina.

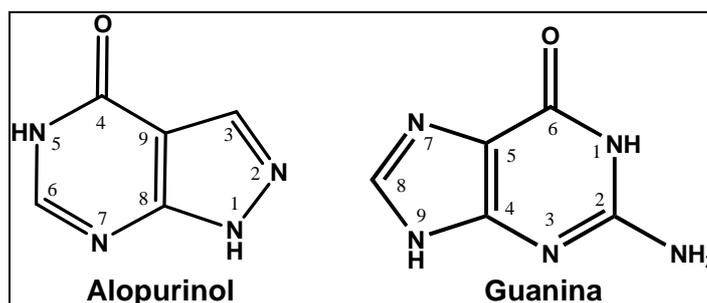
La regla de Kasha [14] (“la emisión de un fotón siempre se lleva a cabo desde el nivel vibracional de menor energía del estado excitado y que posea una multiplicidad de espín cualquiera”) se cumple frecuentemente en dinámica de estados excitados, de modo que “el tiempo de vida del estado S_1 ” es comúnmente usado como un sinónimo para el τ_f , de manera que esta convención también es usada en la fotofísica de los ácidos nucleicos.

Los estados singuletes excitados de las bases del ADN y del ARN difieren dramáticamente de los de los hidrocarburos aromáticos. Estos últimos generalmente poseen tiempos de relajación del estado excitado muy largos [1].

2.4 Dinámica de estados excitados de la Guanosina Monofosfato (GMP).

En los últimos años las bases nitrogenadas (presentes en el ADN y ARN) y los nucleótidos correspondientes, en estados excitados electrónicamente, han sido objeto de estudio tanto por medio de experimentos de absorción transitoria como

de *upconversion*, y también usando métodos de química cuántica, para tratar de explicar los mecanismos de desactivación del estado excitado [25-36]. Para los fines del presente trabajo, es necesario rescatar la información que se tiene hasta el momento de la molécula de la guanina y su nucleótido guanosina monofosfato (GMP). Esto es debido a la semejanza en la estructura química entre dicha molécula y el alopurinol, lo cual no ocurre con la adenina y mucho menos con las bases derivadas de la pirimidina (ver esquema 2).



Esquema 2.

La molécula de Guanina presenta tautomería de tipo ceto-enol, además de los tautómeros que aparecen al protonar a las posiciones 7 ó 9 del anillo de purina (tautómeros 7H y 9H respectivamente) [15-17]. De acuerdo con cálculos de mecánica cuántica, los tautómeros 7H-ceto y 9H-ceto son los que presentan menor energía en disolución. Asimismo, se ha predicho que el orden en las energías de transición para el isómero 9H-ceto es el siguiente: $S_1(^1\pi\pi^*) < S_2(^1\pi\pi^*) < S_3(^1n\pi^*)$ [18].

Por otro lado, se han hecho diversos estudios de estas moléculas en el estado excitado, cambiando las condiciones de acidez de las disoluciones. El más reciente es el de Karunakaran, *et al* [19], en el cual se reporta el comportamiento fotofísico de la GMP en un intervalo de pH de 1.3 hasta 7, también se indica que la GMP se encuentra protonada en la posición 9 cuando el valor del pH es de 2 (GMPH⁺). Cabe mencionar Karunakaran y colaboradores emplearon la técnica de absorbancia transitoria para realizar sus mediciones, de manera que observaron que la GMPH⁺ describe una curva biexponencial ultra-rápida ($\tau_1= 0.4\text{ps}$, $\tau_2= 2.2\text{ ps}$), seguido de la conversión interna lenta con $\tau_3= 167\text{ ps}$, en la zona espectral de (293-500 nm). Sin embargo, la GMP no protonada, lo cual ocurre en el intervalo de

pH de 4-7, tiene un decaimiento biexponencial ($\tau_1= 0.22$ ps, $\tau_2= 0.9$ ps) en la zona de 400-900 nm del espectro electromagnético, mientras que en la región de 270-400 nm tiene un comportamiento triexponencial con un crecimiento de $\tau_1= 0.25$ ps, y dos decaimientos, $\tau_2= 1.0$ ps, $\tau_3= 2.5$ ps, respectivamente.

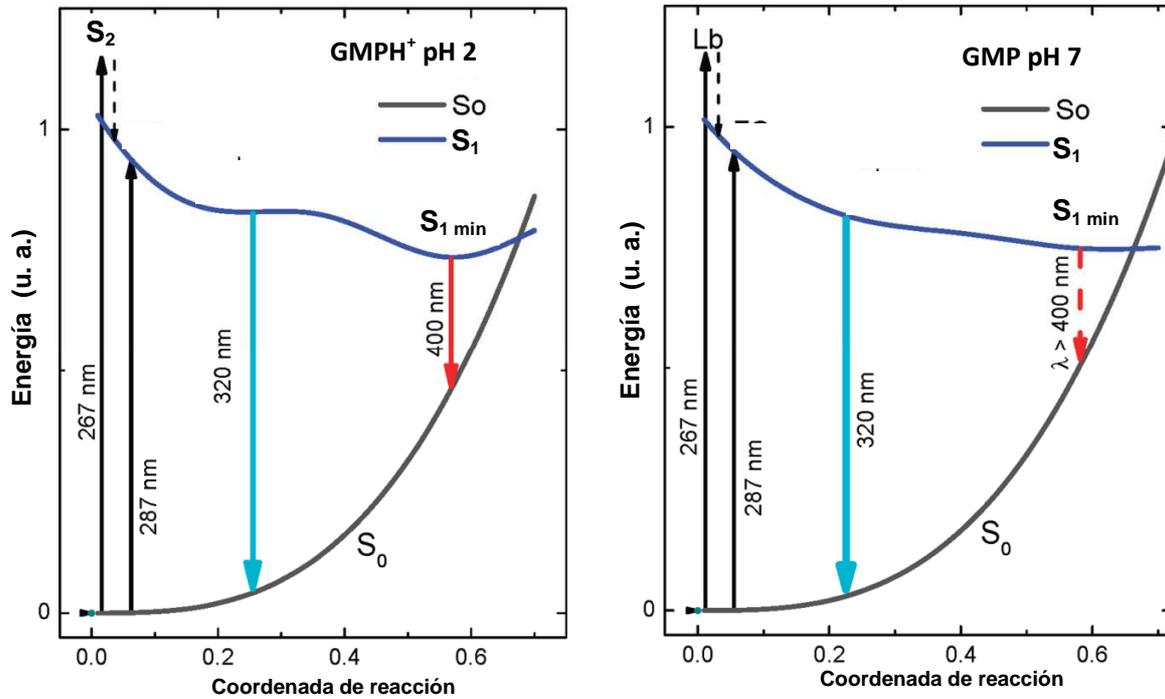
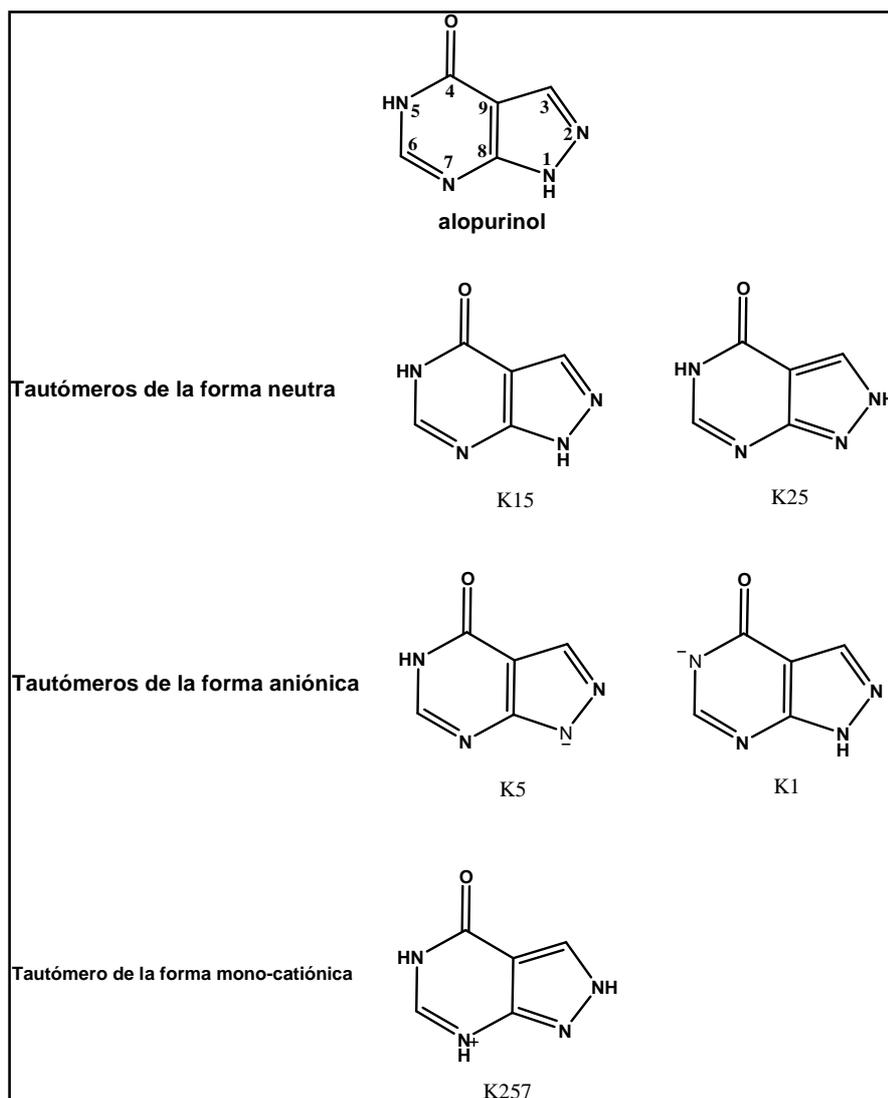


Figura 3. Diagrama de Energía Potencial en el cual se esquematiza el mecanismo de desactivación del estado excitado de la molécula de GMPH+ y GMP neutra [19].

Además, con ayuda de cálculos de mecánica cuántica, presentan la evolución del estado excitado de dichas moléculas, en los que se toma en consideración el efecto del disolvente. La evolución del sistema involucra mayormente a los estados S_1 y S_2 . Así también, de manera independiente del pH, la evolución indica primeramente una conversión ultra-rápida $S_2 \rightarrow S_1$ ($\tau_{S_2 \rightarrow S_1} \ll 100$ fs) y exhibe la presencia de un pozo de energía potencial en donde S_1 posee una geometría plana. En el caso de la GMP en su forma neutra, esta zona está comunicada de forma directa con una IC (intersección cónica) del estado basal, dando lugar al decaimiento ultra-rápido de estas especies. De forma contraria, el sistema $GMPH^+$, presenta otro mínimo de energía potencial denominado $S_{1 \text{ min}}$ que obstaculiza la evolución de la molécula hacia la IC. El estado $S_{1 \text{ min}}$, se caracteriza

por una deformación fuera del plano de los grupos NH y CH. Lo anterior explica el tiempo tan largo de fluorescencia de la GMPH^+ (167 ps), ver figura 11.

2.5. Cálculos de los tautómeros más estables en estado basal del Alopurinol.



Esquema 3.

El heterociclo alopurinol, al igual que la Guanina presenta tautomería ceto-enol, así como también los tautómeros N(1)-H y N(5)-H [20]. Costas y colaboradores, han hecho un estudio detallado, por medio de DFT de los isómeros más estables

del alopurinol en sus formas neutra [21], aniónica [22] y las formas mono y dicatiónicas [23,24]. Se encontró que para la forma neutra del Alopurinol, el isómero K15 (forma ceto y protonado en las posiciones 1 y 5) es el más estable, seguido de la forma K25. Así mismo, se reportó que la primer posición que se protona para formar el mono-catión del alopurinol es la 7, dando lugar al tautómero (K257)¹⁺. Finalmente los isómeros más estables en forma de aniones son, el tautómero (K5)¹⁻, seguido de la forma (K1)¹⁻ (ver el esquema 3)

3. HIPÓTESIS

En virtud del comportamiento respecto al pH del alopurinol se espera que al realizar las mediciones correspondientes de las disoluciones del alopurinol a distintos valores de pH, se observen diferencias en la dinámica de estados excitados conforme cambie esta variable dentro del experimento.

Por otro lado, considerando que el alopurinol presenta un gran número de tautómeros, siendo los más estables (en pH neutro) los ceto N(1,5) y ceto N(2,5). Es de esperarse que ambos contribuyan al decaimiento de la intensidad de fluorescencia. Sin embargo, en el caso del nucleósido del alopurinol, una de las posiciones que es propensa a sufrir tautomería, estará bloqueada por una molécula de ribosa. De esta manera se impedirá la formación de una de las especies de manera que la emisión de fluorescencia observada se deberá al otro tautómero. En suma, se espera medir el decaimiento de los estados excitados de dos formas moleculares distintas.

4. OBJETIVO GENERAL

Realizar la medición directa del tiempo de vida de los estados excitados de moléculas estructuralmente semejantes a las bases nitrogenadas que conforman a los ácidos nucleicos, con la finalidad de comparar el comportamiento fotofísico entre ambos tipos de compuestos y finalmente proponer un mecanismo de desactivación congruente con dicho comportamiento.

4.1 Objetivos Específicos

- Medir de forma directa el tiempo de decaimiento del estado excitado de los sistemas de estudio, en el caso particular del alopurinol en diferentes valores de pH. Comparar los tiempos de decaimiento tanto de las especies protonadas como las no protonadas del alopurinol con la finalidad de establecer diferencias en el comportamiento fotofísico.
- Comparar el efecto que causa un sustituyente (como lo es el anillo de ribosa) en el decaimiento de los estados excitados electrónicamente del alopurinol.
- Comparar la influencia del esqueleto purínico de la guanina en contraste con el sistema heterocíclico del alopurinol y su ribósido en los decaimientos ultrarrápidos de los estados S_1 de los compuestos de este tipo.
- Proponer un mecanismo de desactivación del estado excitado para las moléculas estudiadas.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Experimentos en el estado estacionario.

Los espectros de absorción fueron obtenidos en un espectrofotómetro Cary 50 (Varian). Los espectros de emisión de fluorescencia en estado estacionario se obtuvieron en un espectrofotómetro Cary Eclipse (Varian). Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente (20°C) usando disolventes grado HPLC (del inglés high-performance-liquid chromatography).

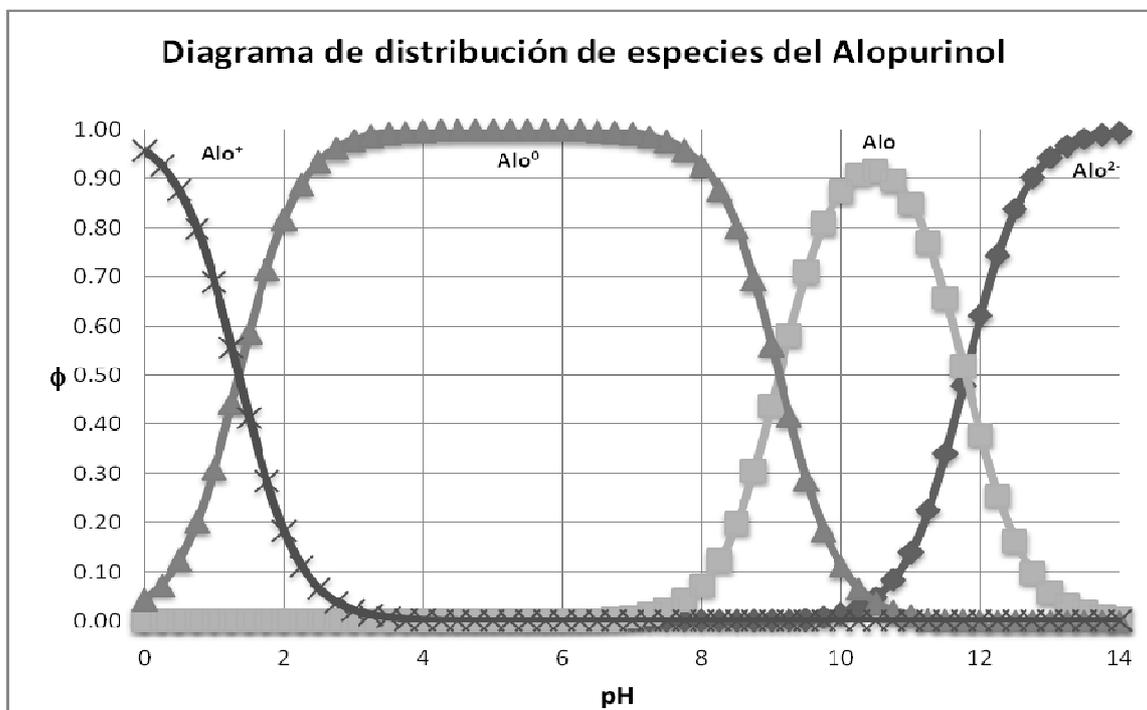
Los sistemas estudiados fueron alopurinol y su ribósido, ambos adquiridos de la compañía Aldrich y se usaron sin purificación adicional.

Las disoluciones de alopurinol y el ribósido se usaron con concentraciones de 2×10^{-3} M (2mM) en los espectros de absorción y 6.6×10^{-5} M en los espectros de emisión. Las disoluciones se prepararon en la ausencia de disolución amortiguadora del pH y sin controlar la fuerza iónica, con la finalidad de que dichas especies no intervinieran en el experimento.

Se estudió la dependencia de la dinámica de estados excitados del heterociclo alopurinol con respecto a las variaciones en el pH, en un intervalo de 1-10. El pH de dichas disoluciones fue ajustado con ácido clorhídrico e hidróxido de sodio de alta pureza y fue determinado potenciométricamente, la determinación se llevó a cabo al inicio y al final de los experimentos con resolución temporal, para verificar que el pH de estudio no se modificara durante el transcurso del mismo, encontrándose que las variaciones no fueron superiores a 0.1.

Cabe mencionar que los valores de pH (de las disoluciones de alopurinol) que se eligieron para ser estudiados fueron aquellos en los cuales se tenía un predominio de las especies: neutra, catiónica y aniónica respectivamente. De acuerdo con el diagrama de distribución de especies se usaron los valores de pH igual a 7, en el cual la especie predominante fue la neutra con un porcentaje por del 99%, de igual forma con pH de 1 se obtuvo un predominio de la especie catiónica del 70% y finalmente se preparó una disolución con pH de 10 en el cual la primer especie aniónica predomina en un porcentaje del 88% (Ver esquema 4). Es necesario aclarar que en pH 1 el potenciómetro usado tiene una sensibilidad que es igual al

límite inferior lo cual implica la consideración del error sistemático en la medición final.



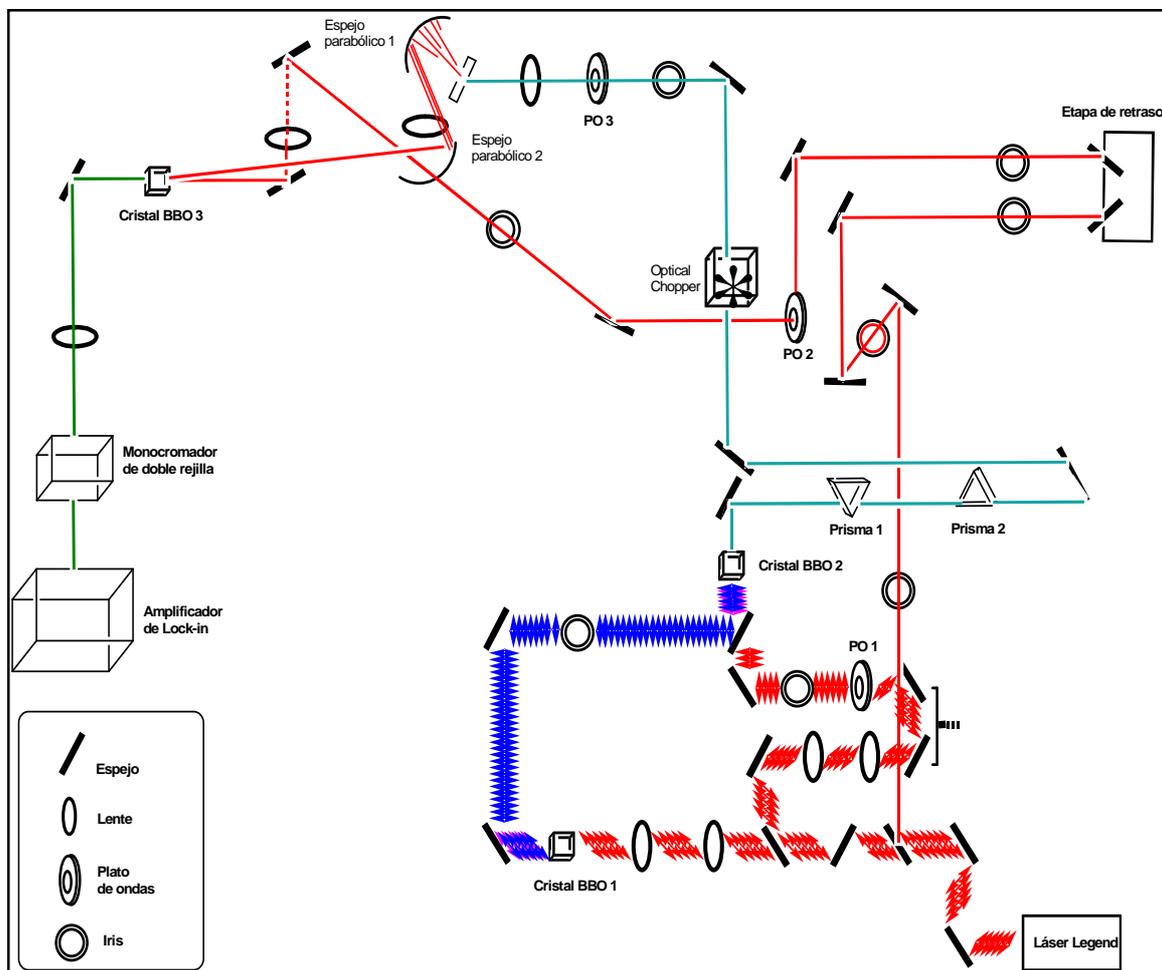
Esquema 4.

5.2 Descripción de la técnica de fluorescencia por suma de frecuencias

Los estudios de dinámica de estados excitados se hicieron mediante la detección de fluorescencia por suma de frecuencias, una técnica espectroscópica que consiste en hacer incidir un haz láser pulsado en la escala de tiempo de los femtosegundos con longitud de onda en la zona del UV-vis (llamado pulso de inicio), sobre una muestra que absorbe fuertemente en dicha longitud de onda de forma que se induce una población de los estados excitados de las moléculas en disolución. Algunas de estas moléculas en el estado excitado se desactivan mediante la emisión de fluorescencia, la cual se capta, se colima y se enfoca sobre un cristal de β -BBO (beta-borato de bario) con ayuda de un par de espejos parabólicos. De manera simultánea se hace incidir sobre el cristal β -BBO un segundo pulso ultracorto, llamado de compuerta, que al coexistir con la radiación

de fluorescencia proveniente de la muestra generan un tercer pulso llamado señal, cuya frecuencia corresponde a la suma de las frecuencias de ambos pulsos. La intensidad de la fluorescencia observada es proporcional a la población de moléculas en el estado excitado S_1 .

La señal de suma de frecuencias se cuantifica en distintos intervalos de tiempo con una resolución de femtosegundos debido a que los pulsos de excitación y de compuerta son retrasados de manera diferencial con trayectorias ajustables en décimas de micrómetro. El pulso señal se registra con intervalos en esa misma magnitud.



Esquema 5.

En el esquema 5 se muestra la descripción gráfica de la técnica empleada. En primera instancia un láser continuo (Verdi V5 de 5W Coherent Inc.) bombea luz de

532 nm al oscilador óptico de titanio-zafiro (NJA-5 Clark-MXR) en el cual se generan pulsos ultracortos. A la salida del oscilador, el haz láser posee nuevas características: está formado por pulsos de 50 fs de duración, que tienen una frecuencia de repetición de 100 MHz, 3 nJ de energía por pulso y están centrados en 800nm. Sin embargo, la energía por pulso no es suficiente para la generación de estados excitados así que el láser pulsado pasa por un sistema óptico formado por un expansor, un amplificador y un compresor (Legend Coherent) en el que adquiere una energía de 300 μ J por pulso. Cabe mencionar que la polarización de la luz que sale del láser Legend es horizontal.

Es importante hacer notar que las moléculas de este estudio absorben principalmente en la región del UV así que el haz de 800 nm (haz de frecuencia fundamental) no es de utilidad para generar estados excitados. Por esta razón es necesario obtener el 3ω del fundamental, para lo cual en primer lugar se hace incidir el haz de 800nm en un cristal de β -BBO con el ángulo de ajuste de fases adecuado para generar el 2ω con polarización vertical. Posteriormente el 2ω es redireccionado hasta hacerlo incidir sobre un segundo cristal de β -BBO en el que a su vez incide de forma simultánea el haz fundamental proveniente del láser Legend para finalmente generar el 3ω . El rayo que posee la frecuencia necesaria para excitar a la muestra es denominado pulso de inicio. El 3ω es conducido mediante espejos hacia una lente con foco en una celda de 1 mm de espesor que contiene a la muestra. Antes de pasar por la muestra el rayo de inicio atraviesa un plato de ondas que ajusta la polarización del haz al ángulo mágico (54.7°), o bien permite ajustar el plano de polarización para los experimentos de anisotropía.

Una vez que la muestra se excita, las moléculas emitirán fluorescencia en todas las direcciones, misma que será recolectada por un par de espejos parabólicos y enfocada hacia un tercer cristal de β -BBO en donde se lleva a cabo el fenómeno de suma de frecuencias; la del haz fundamental y la fluorescencia emitida por la muestra, para generar un nuevo pulso denominado señal, que es proporcional a la intensidad de fluorescencia emitida en ese instante. La dependencia temporal de la intensidad de fluorescencia se obtiene al hacer pasar al haz fundamental o haz

de compuerta por una etapa de retraso que permite de forma precisa adelantar o retrasar el pulso con respecto al pulso de inicio.

El pulso denominado señal es direccionado a un monocromador de doble rejilla de difracción. La señal es amplificada con ayuda de un Fotomultiplicador (PMT) posteriormente llega al amplificador de Lock-in en donde se realiza la discriminación del ruido de la señal. Finalmente el amplificador está conectado a un ordenador para visualizar y manipular los datos en forma de gráficos.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Espectroscopia UV-Vis del alopurinol y su dependencia con el pH.

6.1.1 Espectros de absorción y de emisión de disoluciones del alopurinol a diversos valores de pH.

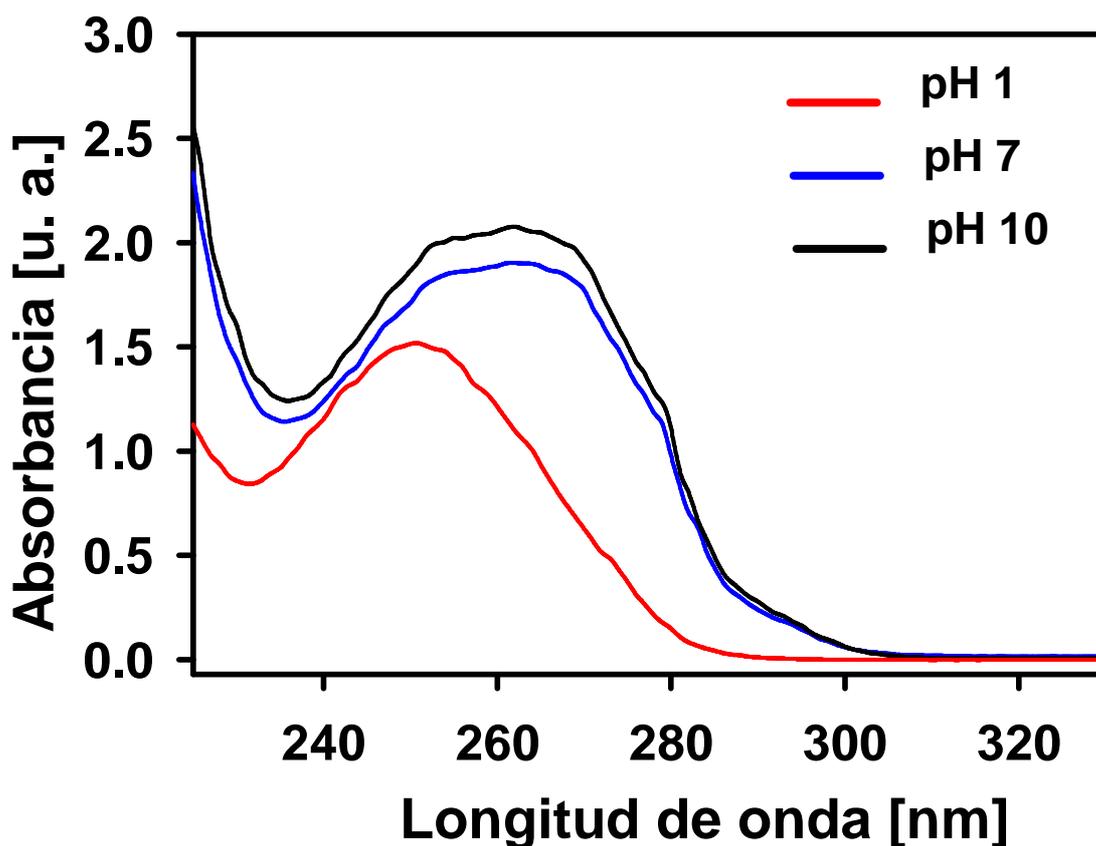


Fig. 4 Espectros de absorción de una disolución de alopurinol (2 mM) en agua a pH 1, pH 7 y pH 10 respectivamente.

Los espectros de absorción, que muestran la variación de la intensidad de señal con respecto a los valores de pH propuestos, se muestran en la figura 4. De la misma forma los espectros de emisión de fluorescencia de los tres tipos de disoluciones se observan en la figura 5. Para la obtención de estos últimos, se eligió una longitud de onda de excitación (λ_{exc}) de 257 nm porque el tercer armónico del haz láser de inicio se centró en ese valor de longitud de onda.

Cabe mencionar que la importancia de obtener los espectros de absorción radica en que es necesario conocer la longitud de onda de excitación en la cual sería posicionado el láser para generar los estados excitados. De la misma forma los espectros de emisión permiten conocer la longitud de onda en la cual la emisión presentaría una mayor intensidad, para así poder posicionar el monocromador de doble rejilla en dicha longitud de onda.

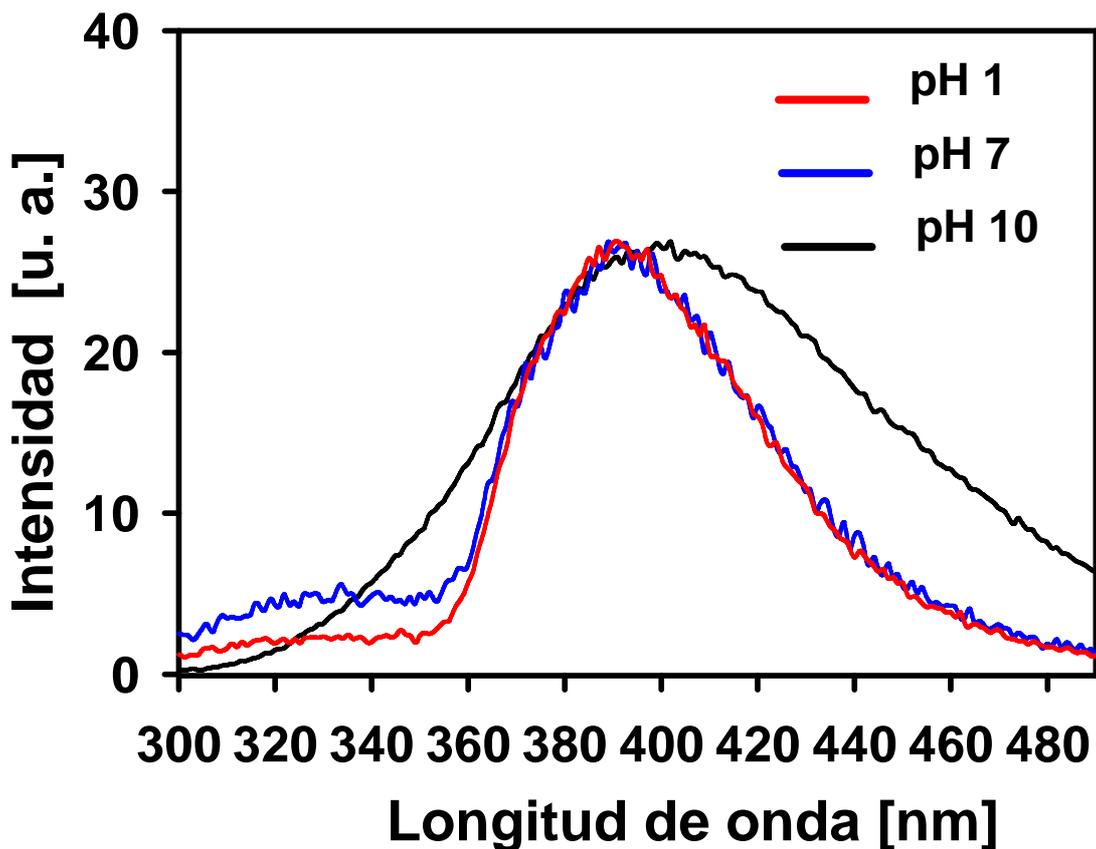


Fig. 5 Espectros de emisión de una disolución de alopurinol en agua a pH 1, pH 7 y pH 10 respectivamente, se excitó la muestra con una $\lambda_{exc} = 257$ nm.

Vale la pena mencionar que los espectros de absorción en estado estacionario corresponden con los reportados en la literatura [23]. Los espectros obtenidos a los distintos valores de pH, tienen un máximo cerca de 250 nm. Sin embargo, al variar las condiciones de acidez, es decir, al aumentar el pH, el máximo de absorción se desplaza de 250 nm a 260nm, además se observa un ligero ensanchamiento en la banda correspondiente al máximo.

Con respecto a los espectros de emisión es posible resaltar que el alopurinol a pH 1 muestra un pico de emisión cerca de 400 nm, en pH neutro el máximo de emisión también está cercano a 400 nm y también se observa emisión en el intervalo de 300-350nm. En pH alcalino solo se observa un pico cerca de 390 nm.

6.1.2 Datos obtenidos por la técnica de fluorescencia por suma de frecuencias.

En las figuras 6 y 7 aparece el comportamiento de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo ($I(t)$), los cuales se obtuvieron excitando las muestras con un haz láser de 257 nm, es importante resaltar que la polarización del haz de excitación se ajustó con ayuda de un plato de ondas al valor correspondiente de ángulo mágico (54.7°). La señal de fluorescencia se detectó en λ_{det} de 240.3 nm con la ayuda de un monocromador de doble rejilla de difracción.

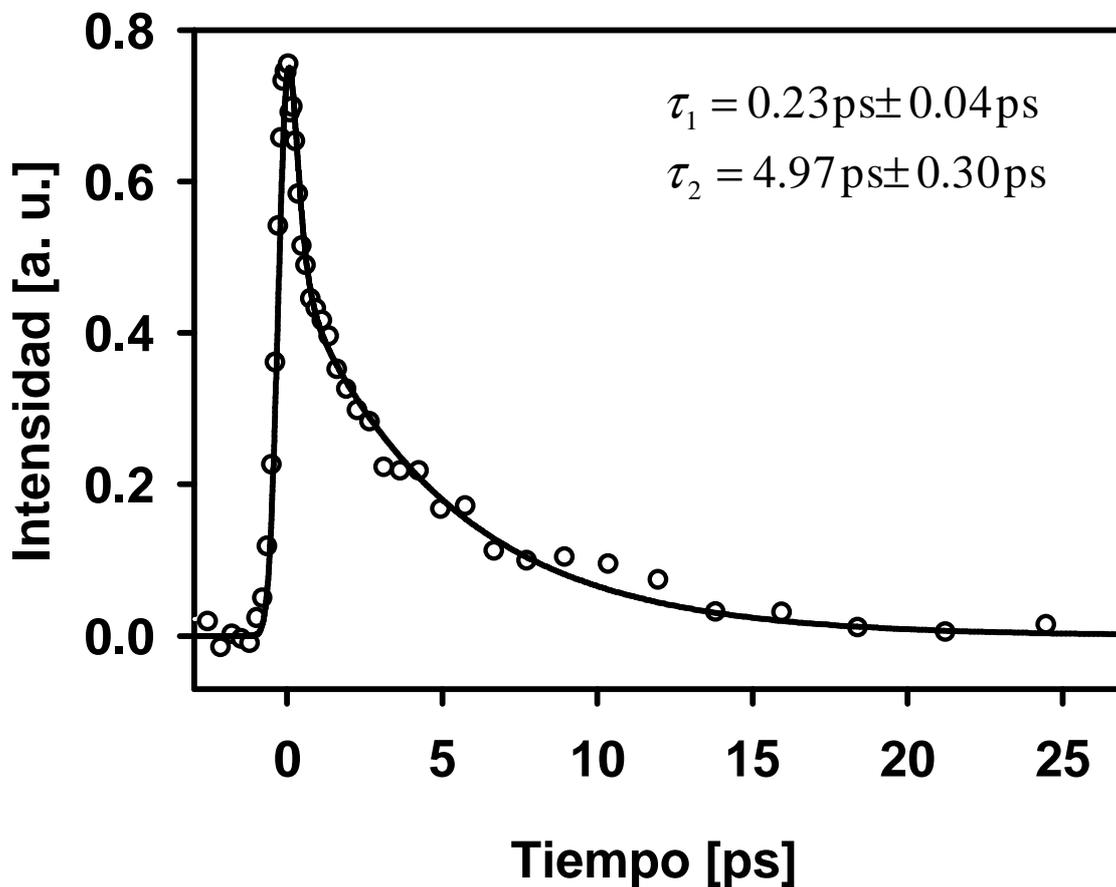


Fig. 6 Comportamiento de la intensidad de fluorescencia de la disolución de alopurinol a pH = 7 para una longitud de onda de detección (λ_{det}) de 240.3 nm, con la polarización del haz de inicio en 54.7°. Los datos originales se representan mediante círculos de color negro. La línea continua de color negro muestra el ajuste de los datos, es decir la convolución de la función de respuesta y la fluorescencia de la muestra.

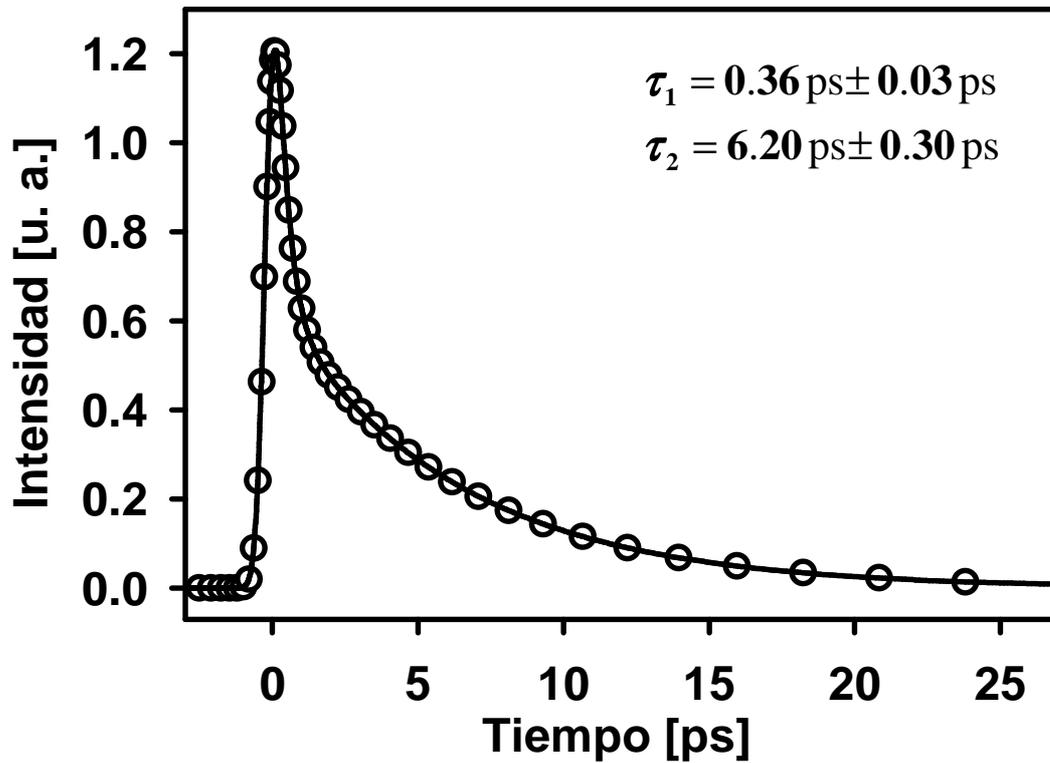


Fig. 7 Comportamiento de la intensidad de fluorescencia de la disolución de alopurinol a pH = 1 para una λ_{det} de 240.3 nm con ajuste de polarización del haz de inicio en ángulo mágico. Los datos originales se representan mediante círculos de color negro. La línea continua y gruesa muestra el ajuste de los datos, es decir la convolución de la función de respuesta y la fluorescencia de la muestra.

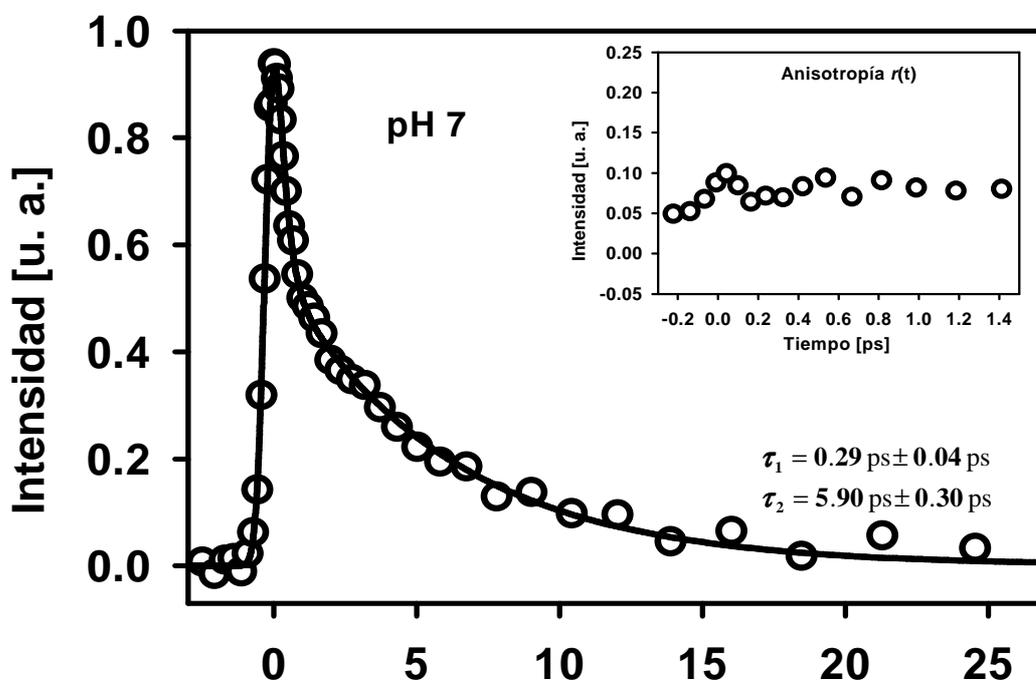


Fig. 8. Comportamiento de la intensidad de fluorescencia de la disolución de Alopurinol a pH = 7 para una λ_{det} de 240.3 nm. Los datos mostrados corresponden con un ajuste de polarización del haz de inicio en ángulo mágico, mismos que fueron calculados usando la intensidad (de fluorescencia en función del tiempo) resultante de un ajuste de la polarización del haz de inicio en paralelo y perpendicular. Los valores de anisotropía en función del tiempo para cada disolución, se ubican en la parte superior derecha de cada gráfica. Los datos observados se representan mediante círculos de color negro. La línea gruesa muestra el ajuste de los datos.

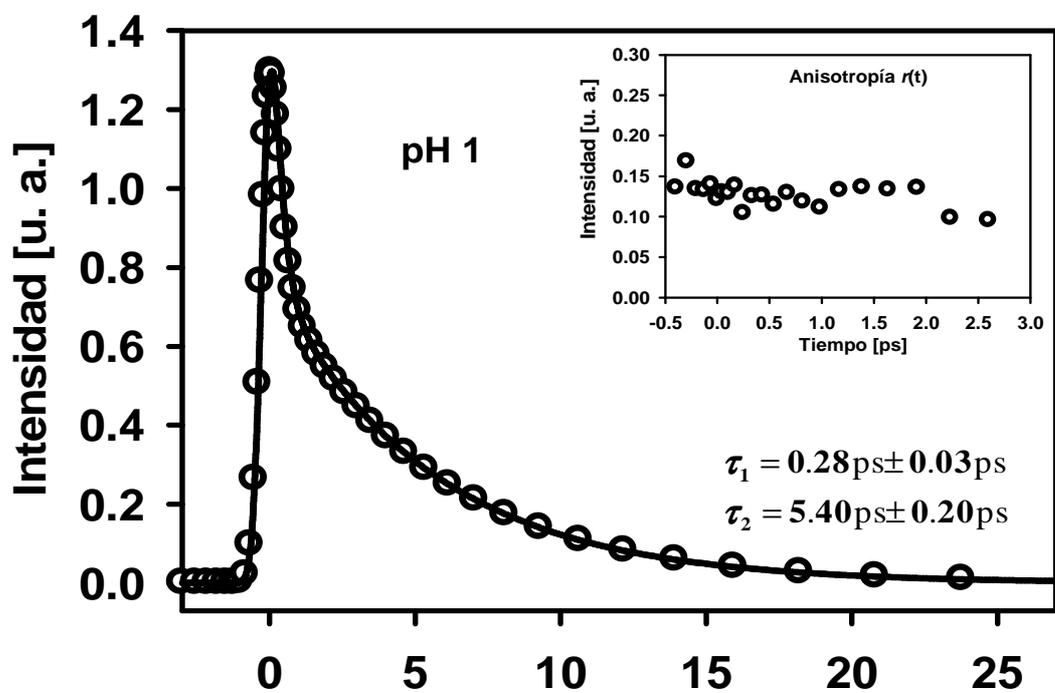


Fig. 9. Comportamiento de la intensidad de fluorescencia de la disolución de alopurinol a pH = 1 para una λ_{det} de 240.3 nm. Los datos mostrados corresponden con un ajuste de polarización del haz de inicio en ángulo mágico, mismos que fueron calculados usando la intensidad (de fluorescencia en función del tiempo) resultante de un ajuste de la polarización del haz de inicio en paralelo y perpendicular. Los valores de anisotropía en función del tiempo para cada disolución, se ubican en la parte superior derecha de cada gráfica. Los datos originales se representan mediante círculos de color negro. La línea gruesa muestra el ajuste de los datos.

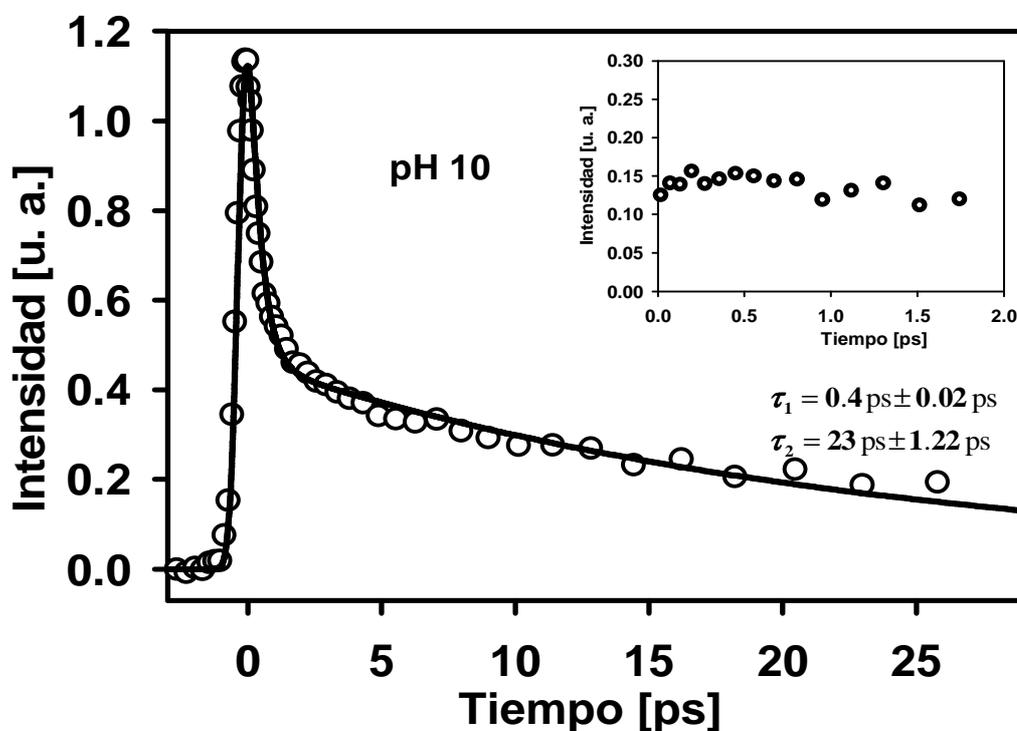


Fig. 10. Comportamiento de la intensidad de fluorescencia de la disolución de alopurinol a pH =10 para una λ_{det} de 240.3 nm. Los datos mostrados corresponden con un ajuste de polarización del haz de inicio en ángulo mágico, mismos que fueron calculados usando la intensidad (de fluorescencia en función del tiempo) resultante de un ajuste de la polarización del haz de inicio en paralelo y perpendicular. Los valores de anisotropía en función del tiempo para cada disolución, se ubican en la parte superior derecha de cada gráfica. Los datos originales se representan mediante círculos de color negro. La línea gruesa muestra el ajuste de los datos.

Las figuras 8, 9 y 10 muestran los espectros de decaimiento de la señal de fluorescencia en función del tiempo, así como el cálculo de anisotropía para las disoluciones de alopurinol en los tres valores de pH elegidos para el estudio. Es importante hacer notar que los datos originales de intensidad de fluorescencia, mostrados en estas gráficas, se obtuvieron a partir del cálculo manual de la intensidad de fluorescencia en ángulo mágico. Es decir, se realizan mediciones por separado, de la $I(t)$ usando el haz de inicio con una polarización paralela (con respecto al haz de prueba) y de $I(t)$ con un haz de inicio polarizado en dirección perpendicular (con respecto al haz de prueba). Finalmente los datos obtenidos de estas mediciones se emplean en la ecuación 7 para el cálculo de la $I(t)$ en ángulo mágico.

$$I(t)_{AM} = \frac{I(t)_{Paralelo} + 2I(t)_{Perpendicular}}{3} \quad (7)$$

Por otra parte, el cálculo de la anisotropía de fluorescencia en función del tiempo se hizo empleando la ecuación 8.

$$r(t) = \frac{I(t)_{Paralelo} - I(t)_{Perpendicular}}{I(t)_{Paralelo} + 2I(t)_{Perpendicular}} \quad (8)$$

El cálculo de la anisotropía de fluorescencia permite conocer si la excitación inicial es igual al estado emisor, es decir si $r(0) = 0.4$ ó de lo contrario si la excitación inicial en realidad origina una sobre posición de los estados S_2 y S_1 ($r(0) < 0.4$).

Al comparar los datos de las figuras 6 y 7 (datos obtenidos con $I(t)$ en ángulo mágico) y los datos de las figuras 8 y 9 (datos obtenidos con $I(t)$ calculada manualmente en ángulo mágico) es posible observar una similitud en el tipo de decaimiento, ya que en ambos es biexponencial y además los tiempos de decaimiento son de igual forma muy semejantes. Esto último, es un hecho que es necesario resaltar puesto que corrobora la validez de los resultados experimentales, al evidenciar que la polarización del pulso de inicio, ajustada con el plato de ondas fue la correcta.

6.2 Espectroscopia UV-Vis del ribósido del alopurinol.

6.2.1 Espectro de absorción en estado estacionario.

La figura 11 muestra el espectro de absorción del ribósido del alopurinol en donde se observa una transición de mayor probabilidad en aproximadamente 251 nm, así mismo se indica la longitud de onda elegida para excitar las muestras en los experimentos dependientes del tiempo.

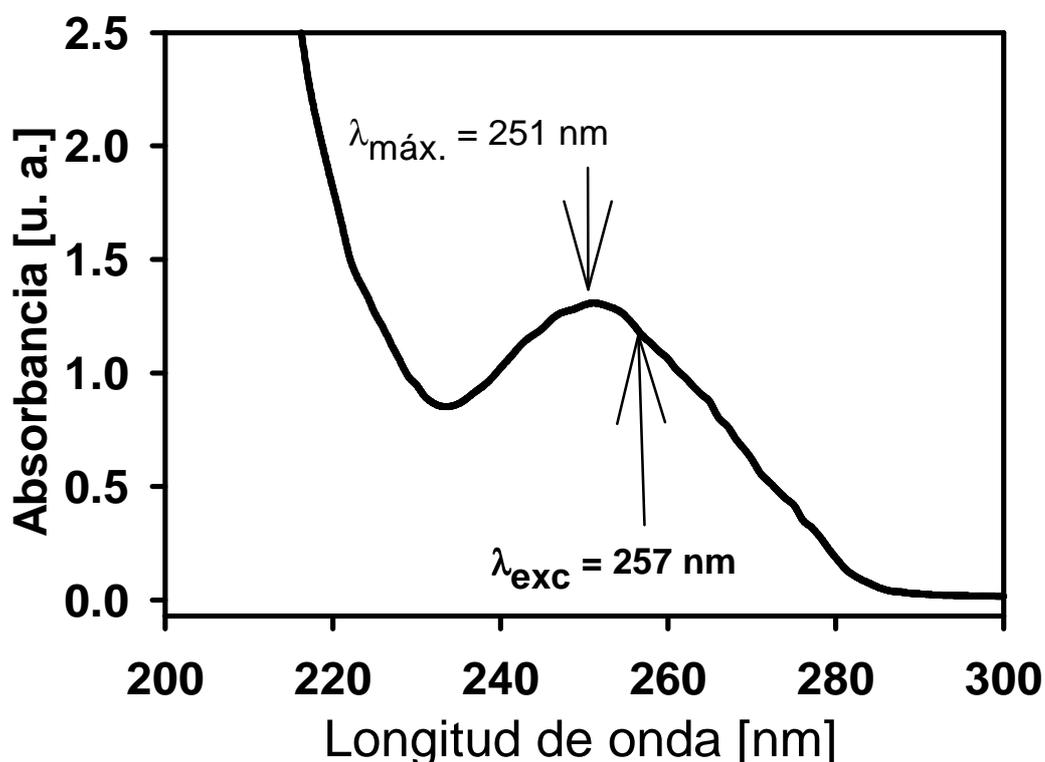


Fig. 11. Espectro de absorción en estado estacionario del nucleósido del alopurinol. El espectro fue adquirido en una celda de 1 mm a una concentración de 2 mM y un pH de 7.

6.2.2 Datos obtenidos por la técnica de fluorescencia por suma de frecuencias.

En las figuras 12 y 13 se muestran los decaimientos de la señal de fluorescencia obtenidos con las condiciones que se indican en el pie de figura de cada imagen.

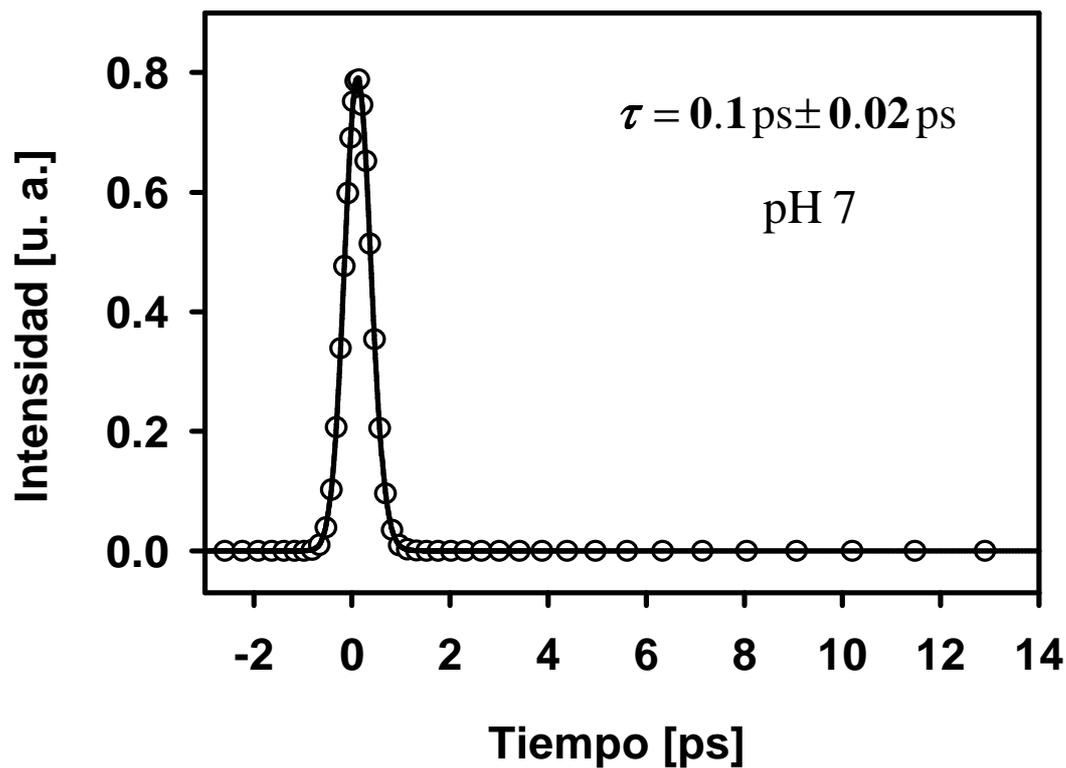


Fig. 12 Decaimiento de la intensidad de fluorescencia de la disolución del ribósido del alopurinol para una λ_{det} de 240.3 nm, con la polarización del haz de inicio en ángulo mágico. Los datos originales se representan mediante círculos de color negro. La línea gruesa muestra el ajuste de los datos a una curva monoexponencial.

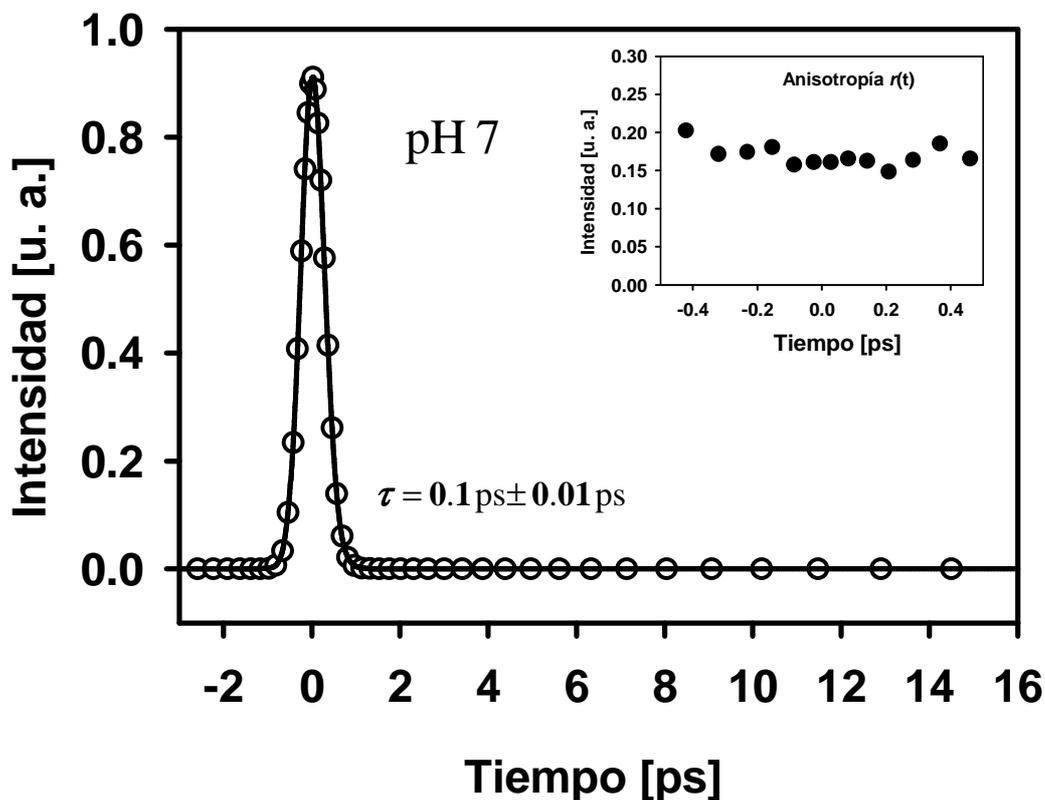


Fig. 13 Decaimiento de la intensidad de fluorescencia de la disolución del ribósido del alopurinol para una λ_{det} de 240.3 nm. Los datos mostrados corresponden con un ajuste de polarización del haz de inicio en ángulo mágico, mismos que fueron calculados usando la intensidad (de fluorescencia en función del tiempo) resultante de un ajuste de la polarización del haz de inicio en paralelo y perpendicular. Los valores de anisotropía en función del tiempo se ubican en la parte superior derecha de la gráfica. Los datos originales se representan mediante círculos de color negro. La línea gruesa muestra el ajuste de los datos a una curva monoexponencial.

Tabla 1. Tiempos de decaimiento de la intensidad de fluorescencia de las muestras de alopurinol en los tres valores de pH estudiados.

Tiempo (ps)	pH 1	pH 7	pH 10
τ_1	0.28 ± 0.03	0.29 ± 0.04	0.4 ± 0.02
τ_2	5.40 ± 0.20	5.90 ± 0.30	23 ± 1.22

Tabla 2. Tiempos de decaimiento de la señal de fluorescencia del alopurinol y su ribósido, ambos a pH 7.

Tiempo (ps)	Alopurinol	Ribósido de Alopurinol
τ_1	0.29 ± 0.04	0.1 ± 0.02
τ_2	5.90 ± 0.30	-----

Tabla 3. Valores promedio de anisotropía de fluorescencia $r(t)$ para cada disolución en un intervalo de tiempo de -0.1 a 1.0 ps.

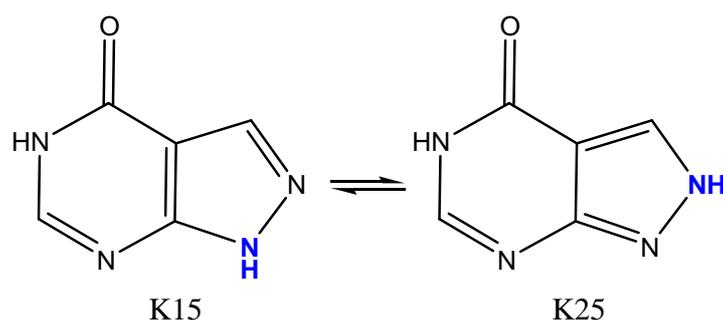
pH de la disolución de Alopurinol	Anisotropía $r(t)$
1	0.16 ± 0.31
7	0.09 ± 0.11
10	0.13 ± 0.50

En la tabla 1 se hace un resumen de los tiempos de decaimiento obtenidos de una función biexponencial que se describe con la ecuación 9:

$$I(t) = ae^{-t/\tau_1} + be^{-t/\tau_2} \quad (9)$$

Al observar las figuras 8, 9 y 10 así como la tabla 1 es posible notar que las disoluciones con pH 1 y 7 tienen tiempos de decaimiento prácticamente iguales, mientras que la disolución con pH básico posee un comportamiento muy distinto de las dos anteriores el que se ve reflejado en un segundo tiempo de decaimiento, el cual es muy largo (23 ps). El hecho de que los decaimientos sean de tipo

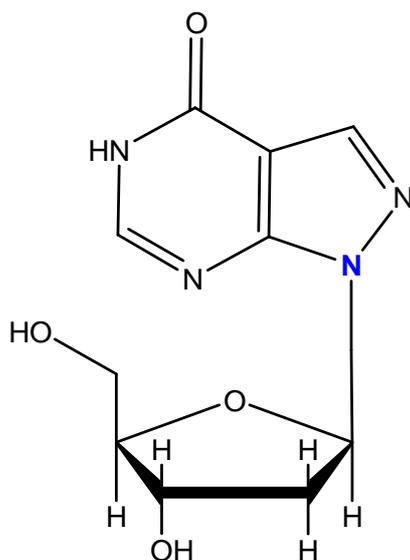
biexponencial hace suponer que más de un tautómero es el responsable de la emisión de fluorescencia. De acuerdo con cálculos de DFT hechos recientemente [24-26], los tautómeros más estables del alopurinol en su forma neutra son los de tipo cetona: el tautómero ceto protonado en las posiciones N(1,5) y el tautómero ceto protonado en las posiciones N(2,5), como se vio anteriormente. De manera que se propone que al siguiente equilibrio tautomérico:



Esquema 6.

Para comprobar dicha hipótesis es necesario determinar el tiempo de vida de la molécula de alopurinol que tenga bloqueada una de las posiciones susceptibles de tautomerizarse. En este trabajo se usó para este fin al ribósido del alopurinol, en el cual, la posición N(1) del anillo pirazólico está ocupada por una molécula de ribosa.

Al observar las figuras 12 y 13, y revisar la comparación descrita en la tabla 2, es importante ver el hecho de que al cambiar un protón por una molécula de ribosa en la estructura del alopurinol cambia de manera radical la dinámica de estados excitados, es decir la molécula de alopurinol presenta un decaimiento de tipo biexponencial, mientras que el decaimiento de la $I(t)$ del ribósido del alopurinol tiene un comportamiento monoexponencial, lo cual corrobora la suposición hecha anteriormente, es decir que en la molécula de alopurinol en pH neutro existen dos tautómeros que dan lugar a la emisión de fluorescencia. En suma, cuando se fija la sustitución en la posición N(1) del alopurinol, desaparece el tiempo de vida largo (τ_2), así que es posible aseverar que el tautómero responsable del τ_1 (observado) es el K15.



Esquema 7.

Así mismo es necesario resaltar que en los valores de pH ácido y básico (1 y 10 respectivamente) las especies monocationica y aniónica no son especies cien por ciento mayoritarias. En el esquema 4 se observa que en pH 1 el alopurinol monoprotonado se encuentra en una proporción de 80% mientras que el 20% restante se debe al alopurinol en su forma neutra. De la misma forma, en pH 10 la especie aniónica está presente en disolución en un 88% y el 12% restante corresponde a la contribución de la especie neutra. La situación anterior complica la interpretación de los decaimientos de la intensidad de fluorescencia en los dos valores de pH, ya que en ambos hay contribución de más de una especie, además se debe considerar que la molécula neutra y la monoaniónica tienen asociados uno más tautómeros (ver esquema 3). Sin embargo, es posible destacar que los tiempos de decaimiento observados en pH ácido y básico son de tipo ultra-rápido, independientemente de la proporción de especies que los generan.

Por otro lado en la tabla 3 se presentan los valores promedio de la anisotropía de fluorescencia en función del tiempo, en un intervalo muy pequeño, dado que ninguno de estos valores es igual o cercano a 0.4, es posible afirmar que al excitar al alopurinol con luz de 257 nm, esta molécula alcanza una configuración que es

denominada una sobreposición de estados, es decir una combinación lineal entre los estados de energía distinta: S_1 y S_2 , (Ecuación 10).

$$\varphi = C_1 S_1 + C_2 S_2 \quad (10)$$

De esta manera el método teórico que sea empleado para explicar el comportamiento del alopurinol, deberá obtener resultados congruentes con los presentados en este trabajo, los cuales servirán para validar su método. Es decir, deberá predecir que en la longitud de onda de excitación de 257 nm, el sistema se excita directamente a una sobreposición de los estados S_1 y S_2 .

6.3 Mecanismo propuesto para la desactivación del estado excitado en GMP y en alopurinol.

Como se mencionó anteriormente las moléculas estudiadas, al igual que las bases nitrogenadas que forman al ADN, tienen tiempos de vida del estado excitado muy cortos, esta es, en la escala de los femto y picosegundos (10^{-15} s y 10^{-12} s respectivamente), es decir, el decaimiento no radiativo de dichas especies es muy eficiente. Recientemente se han propuesto algunas teorías que explican dicho comportamiento para el ADN, una de las más importantes se asocia con el cruzamiento de distintas hipersuperficies de energía potencial (PEHs) en las denominadas Intesecciones Cónicas (IC). Los cruzamientos funcionan como embudos en cuya vecindad la transferencia de población entre estados distintos es muy favorable [28-30].

La molécula de monofosfato de guanosina (GMP) tanto en su forma protonada como neutra se ha estudiado tanto en experimentos de absorción transitoria con resolución de femtosegundos, como también en cálculos de mecánica cuántica y se ha propuesto la existencia de ICs que conectan al primer estado excitado (S_1) con la curva de energía potencial del estado basal (S_0), ver figura 14 [22].

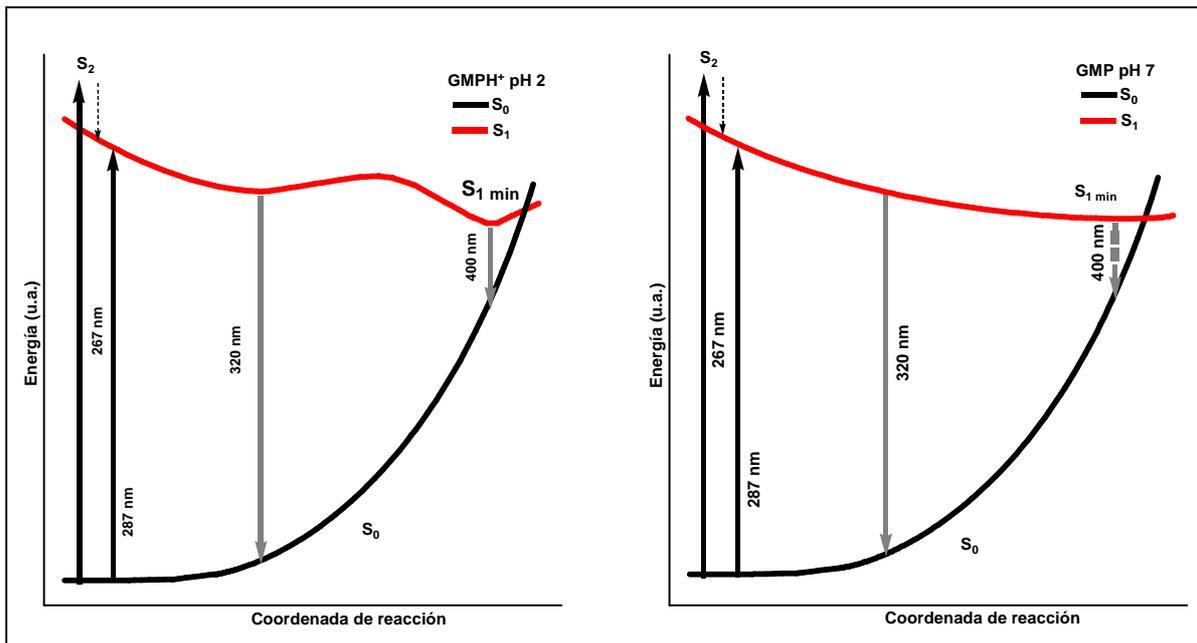


Figura 14. Diagrama de Energía Potencial en el cual se esquematiza el mecanismo de desactivación del estado excitado de la molécula de GMPH⁺ y GMP neutra.

La molécula de GMPH⁺ presenta una relajación que incluye un tiempo de vida largo $\tau=167\text{ps}$ (debido a la conversión interna $S_1 \rightarrow S_0$). Por otra parte, la GMP no protonada, en el intervalo de pH de 4-7, tiene un comportamiento biexponencial en la zona de 400 – 900 nm ($\tau_1=0.22\text{ ps}$ y $\tau_2=0.9\text{ ps}$).

Las curvas de energía potencial que se muestran arriba explican de manera esquemática la razón por la cual existe la diferencia entre el comportamiento dinámico de la GMPH⁺ frente a la GMP en su forma neutra. A pesar de que en los dos sistemas se propone la existencia de ICs, los caminos que permiten el acceso a este tipo de cruzamientos son distintos en ambos casos. En la GMPH⁺, el sistema evoluciona a lo largo de una coordenada molecular que está caracterizada por una deformación fuera del plano de los grupos NH y CH, que impide la comunicación directa del estado S₁ con la curva correspondiente a S₀, lo cual explica el tiempo de vida de fluorescencia tan largo (167 ps), ya que se trata de un

proceso activado. En cambio en el esquema propuesto para GMP neutra, no se observa la presencia de barreras energéticas que obstaculicen la evolución del sistema hacia la IC, debido a esto la molécula presenta un comportamiento ultra-rápido en estado excitado en los experimentos de absorción transitoria.

El alopurinol y el nucleósido del alopurinol son heterociclos estructuralmente semejantes a las bases derivadas de la purina, como lo son la guanina y la adenina. Dada la semejanza en estructura química de los compuestos ya mencionados, también se observó, una desactivación del estado excitado de tipo ultra-rápido. Lo cual permite extrapolar el mecanismo de dinámica de estados excitados propuesto para GMP al sistema de estudio del presente trabajo. Es decir, es posible que el comportamiento ultra-rápido se deba a la presencia de ICs que comuniquen al primer estado excitado (S_1) con el estado basal.

De la tabla 1 se sabe que para el intervalo de pH de 1-7, el heterociclo alopurinol tiene una relajación de tipo biexponencial con $\tau_1 \leq 0.29$ ps y $\tau_2 \leq 5.9$ ps. Sin embargo, el alopurinol en pH 10 presenta tiempos de vida mucho más largos que a valores de pH bajos ($\tau_1 = 0.4$ ps y $\tau_2 = 23$ ps). De esta forma, muy probablemente en el intervalo de pH que va de 1-7 el sistema tenga asociada una curva de energía potencial en la que no existan obstáculos que impidan la conexión de S_1 con S_0 (ver figura 15). De forma contraria, en la curva de S_1 del alopurinol monoaniónico (pH=10) es creíble la existencia de barreras de energía que impiden el acceso directo a la IC (ver figura 16).

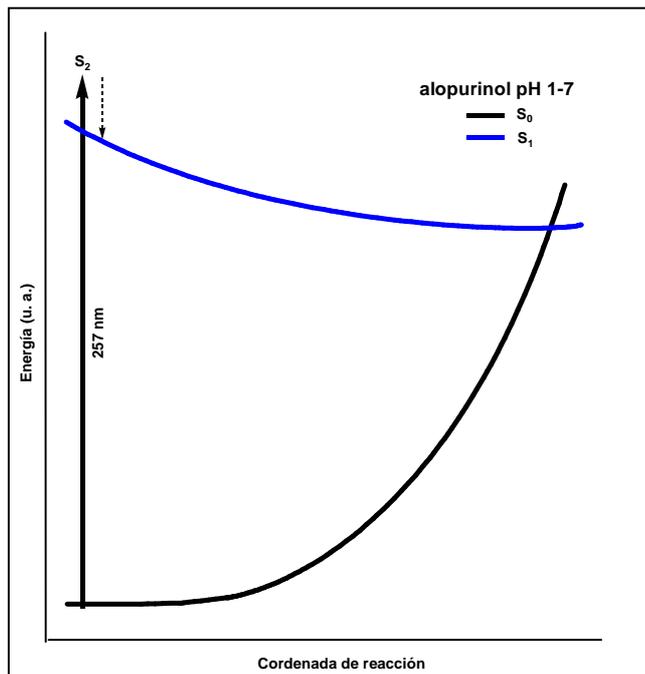


Figura 15. Diagramas de energía potencial en el cual se esquematiza el mecanismo de desactivación del estado excitado de la molécula de alopurinol en el intervalo de pH 1-7.

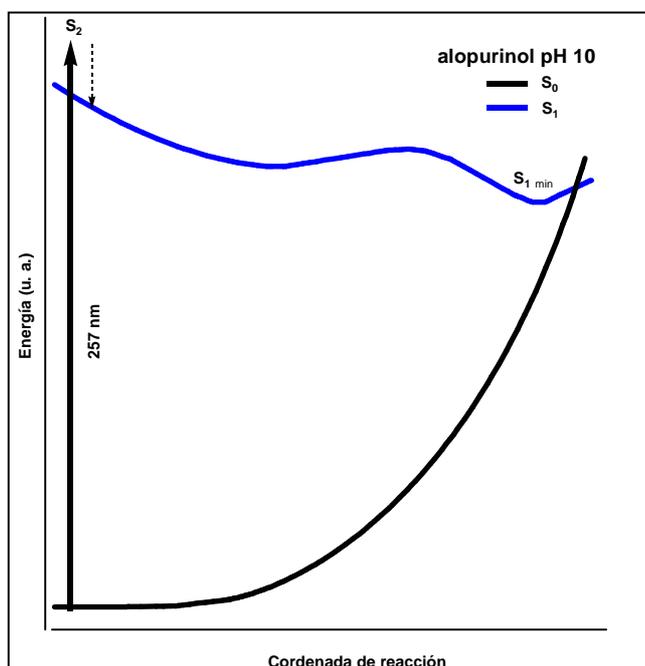


Figura 16. Diagramas de energía potencial en el cual se esquematiza el mecanismo de desactivación del estado excitado de la molécula de alopurinol en pH 10.

7 CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis se reporta el estudio del decaimiento de estados excitados de la molécula de alopurinol y su ribósido en disolución acuosa. Para este fin se utilizó la técnica de fluorescencia por suma de frecuencias, usando una λ_{exc} de 257 nm. La influencia causada por el pH en el decaimiento del estado excitado, se obtuvo al realizar el mismo experimento en los valores de pH de 1, 7 y 10. De la misma forma, se usó dicha técnica, para analizar el efecto de un sustituyente (ribosa) en el decaimiento de la emisión del alopurinol. Las señales de fluorescencia en función del tiempo para el alopurinol, fueron de tipo biexponencial en todos los valores de pH. Se encontraron diferencias sustanciales en el decaimiento de las especies protonada y neutra, en comparación con la especie aniónica. Esta última, se genera en un pH de 10 y presentó un tiempo de decaimiento muy largo (23 ps). Se observó, que el decaimiento del ribósido del alopurinol (en pH neutro) fue de tipo monoexponencial ($\tau_1 = 0.1$ ps), en contraste con el decaimiento biexponencial del alopurinol en las mismas condiciones de pH ($\tau_1 = 0.29$ ps, $\tau_2 = 5.9$ ps). Es decir, en el decaimiento del estado excitado del alopurinol, participan dos tautómeros. Al bloquear una posición susceptible de tautomerizarse con una molécula de ribosa, se obtiene el decaimiento de uno solo de los tautómeros (tautómero 15, $\tau = 0.1$ ps). Se corroboró que el anillo purínico presente en la Guanina y en la GMP, no determina el hecho de que existan decaimientos ultra-rápidos en moléculas que no son derivados de este heterociclo. Finalmente, se propuso un mecanismo de desactivación del estado excitado para los heterociclos estudiados. El cual implica la existencia de ICs que comunican al primer estado excitado S_1 con el estado basal S_0 .

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Crespo-Hermández, C.E.; Cohen, B.; Hare, P. M.; Kohler, B. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1977-2019.
2. Cohen, B.; Hare, M. P.; Kohler, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13594-13601.
3. Peon, J.; Zewail, A.H. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *348*, 255-262.
4. Middleton, C.T.; de La Harpe, K.; Su, C.; Law, Y.K.; Crespo-Hernández, C.E.; Kohler, B. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2009**, *60*, 217-239.
5. Daniels, M.; Hauswirth, W. *Science* **1971**, *171*, 675.
6. Murphy, C.J. *Adv. Photochem.* **2001**, *26*, 145.
7. McQuarrie, D. A., Simon, J.D. (1997) *Physical Chemistry A Molecular Approach* University Science Books: Sausalito, CA; p 592.
8. Shen, Y.R. (1984). *The principles of nonlinear optics*. Wiley-Interscience, New York.
9. Liu, L.Q.; Nagashima, K. *Opt. Laser Technol.* **1999**, *31*, 283.
10. Voet, D.; Gratzer, W. B.; Cox, R.A.; Doty, P. *Biopolymers* **1963**, *1*, 193.
11. Callis, P. R. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1983**, *34*, 329.
12. Cadet, J.; Vigny, P. In *Bioinorganic Photochemistry*, Morrison, H., Ed.; Wiley: New York, 1990; Vol. 1, p 1.
13. Strickler, S.J.; Berg, R.A. *J. Chem. Phys.* **1962**, *37*, 814.
14. Kasha, M. *Faraday Discuss.* **1950**, *9*, 14.
15. Chin, W.; Mons, M.; Dimicoli, I.; Piuze, F.; Tardivel, B.; Elhanine, M. *Eur. Phys. J. D* **2002**, *20*, 347.

16. Nir, E.; Plutzer, C.; Kleinmanns, K.; de Vries, M. *Eur. Phys. J. D.* **2002**, *20*, 317.
17. Mons, M.; Dimicoli, I.; PiuZZi, F.; Tardivel, B.; Elhanine, M. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 5088.
18. Fülischer, M. P.; Serrano-Andrés, L.; Roos, B. O. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6168.
19. Karunakaran, V.; Kleinmanns, K.; Improta, R.; Kovalenko, S.A. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5839-5850.
20. Shukla, M.K.; Mishra, P.C. *Spectrochim. Acta, Part A* **1996**, *52*, 1547.
21. Costas, M.E.; Acevedo-Chávez, R. *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, 200.
22. Costas, M.E.; Acevedo-Chávez, R. *J. Mol. Struct. (Theochem)* **2001**, *543*, 243-258.
23. Costas, M.E.; Acevedo-Chávez, R. *J. Mol. Struct. (Theochem)* **2000**, *504*, 105-118.
24. Costas, M.E.; Acevedo-Chávez, R. *J. Mol. Struct. (Theochem)* **2002**, *587*, 129-146.
25. Costas, M.E.; Acevedo-Chávez, R. *J. Mol. Struct. (Theochem)* **2002**, *587*, 129-146.
26. Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Borín, A.C. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2473-2484.
27. Olivucci, M., Ed. *Computational Photochemistry*; Elsevier; Amsterdam, 2005.
28. Domcke, W.; Yarkony, D.R.; Köppel, H. Eds. *Conical Intersections*; World Scientific; Singapore, 2004.
29. Serrano-Andrés, L.; Merchán, M.; Borín, A.C. *J. Photochem. Photobiol. C: Photochemistry Reviews* **2009**, *10*, 21-32

30. Gustavsson, T.; Banyasz, A.; Lazzarotto, E.; Markovitsi, D.; Scalamani, G.; Frisch, M.J.; Barone, V.; Improta, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 607.
31. Gustavsson, T.; Banyasz, A.; Lazzarotto, E.; Markovitsi, D.; Improta, R. *Chem. Phys. Lett.* **2006**, 429, 551.
32. Klessinger, M.; Michl, J. *Excited States and Photochemistry of Organic Molecules*, VCH Publishers, New York, 1995.
33. Köppel, H.; Domcke, W.; Cederbaum, L.S. *Adv. Chem. Phys.* **1984**, 57, 59.
34. Gustavsson, T.; Sharonov, A.; Onidas, D.; Markovitsi, D.; *Chem. Phys. Lett.* **2002**, 356, 49-54.
35. Middleton, C.T.; de La Harpe, K; Su, C.; Law, Y.K.; Kohler, B. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2009**, 60, 217-239.
36. Pecourt, J.-M. L.; Peon, J.; Kohler B. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 10370-10378.
37. Cadet, J.; Vigny, P. In *Bioinorganic Photochemistry*, Morrison, H., Ed.; Wiley: New York, 1990; Vol. 1, p 1.
38. Morales Cueto Rodrigo, Tesis doctoral: “*Dinámica de estados excitados en compuestos poliaromáticos nitrados*” UNAM, **2008**.
39. Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, Singapore, 2006.

9 ANÉXOS.

9.1 Tratamiento del pulso señal.

Las curvas de $I(t)$ que se presentan en la sección de resultados y discusión, son el resultado de la convolución de varias funciones.

En primera instancia la $I(t)$ inducida por la excitación de un pulso de luz, corresponde a la convolución de la función de decaimiento de la fluorescencia $I_{fluo}(t)$ con la función $I_{inicio}(t)$ de intensidad del pulso de inicio.

De modo que calcular $I_{fluo}(t)$ es equivalente a calcular la convolución de la función $I_{inicio}(t)$ con la función $\varphi(t) = e^{-t/\tau}$.

$$I_{fluo}(t) = I_{ini}(t) \otimes e^{-(t/\tau)} = \int I_{ini}(t') e^{-(t-t')/\tau} dt'$$

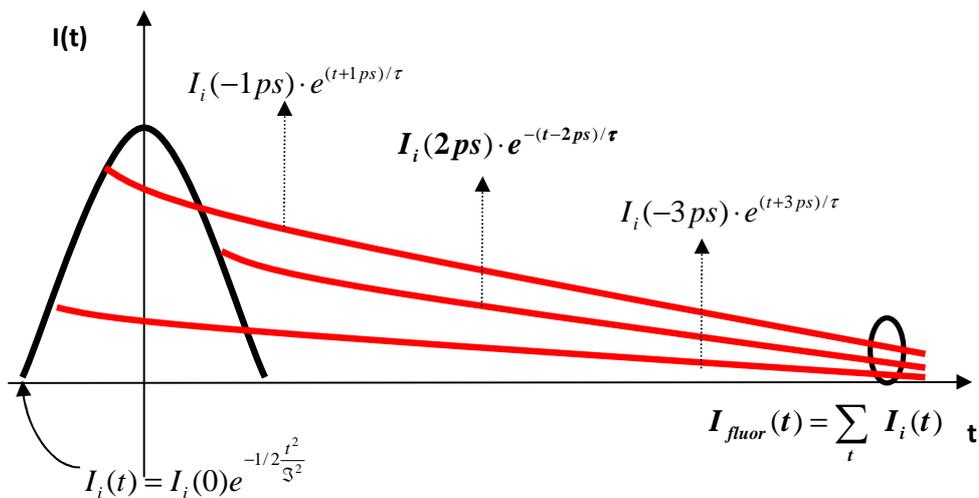


Figura 27. La curva gruesa de color negro representa la intensidad como función del tiempo del pulso de inicio ($I_{inicio}(t)$, en la muestra). Las líneas de color rojo, representan la fluorescencia iniciada gradualmente por el pulso de inicio. El óvalo de color negro, indica la suma de las funciones de intensidad de fluorescencia inicia en función del tiempo.

Sin embargo, en la técnica de fluorescencia por suma de frecuencias, el esquema de detección involucra un segundo pulso (el de prueba o de compuerta $I_{comp}(t)$)

que tiene un retraso t_R con respecto del pulso de inicio. De modo que en el pulso señal $I_{señal}(t)$ existe otra convolución además de las ya mencionadas.

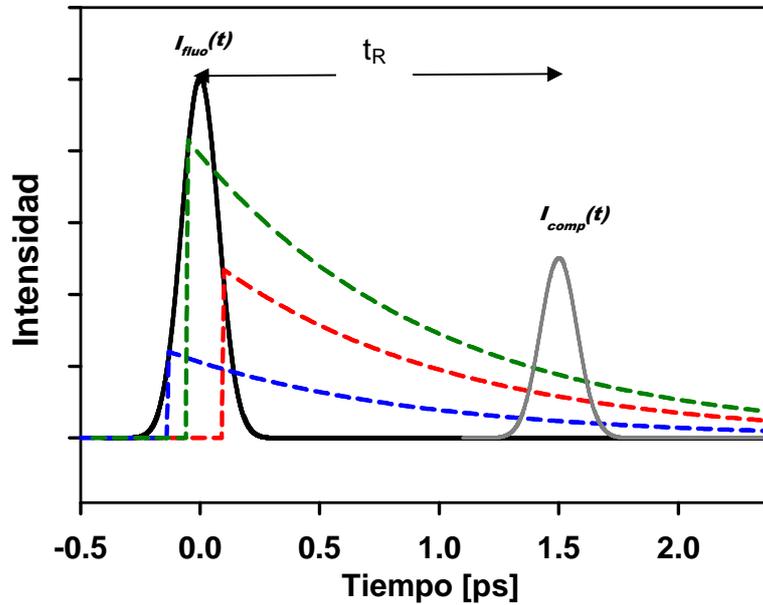


Figura 28. La curva gruesa de color negro representa la intensidad en función del tiempo del pulso de inicio ($I_{inicio}(t)$, en la muestra). Las líneas punteadas representan la fluorescencia iniciada gradualmente por el pulso de inicio. La curva de color gris representa la intensidad en función del tiempo del pulso de compuerta.

Es decir el pulso que se detecta (cuya intensidad total se integra en el fotomultiplicador) se genera por la interacción de $I_{comp}(t)$ con $I_{fluo}(t)$.

$$I_{señal}(t_R) = I_{ini} \otimes e^{(-t/\tau)} \otimes I_{comp} = I_{ini} \otimes I_{comp} \otimes e^{(-t/\tau)}$$

Para obtener el resultado de la ecuación anterior es necesario resolver la siguiente integral:

$$I_{señal}(t_R) = \int \left[\int I_{ini}(t') e^{-(t-t')/\tau} dt' \right] I_{comp}(t - t_R) dt$$

Para realizar el análisis de las señales, es necesario extraer τ de la función $I_{señal}(t_R)$. La integral $I_{señal}(t_R)$ tiene la siguiente forma analítica:

$$I_{señal}(t_r) = 1/2 \cdot c \cdot \left[2 - \operatorname{erfc}\left(t_r \cdot \sqrt{\ln 16}\right) / \Delta t - \Delta t \cdot b / \left(2 \cdot \sqrt{\ln 16}\right) \right] * e^{\frac{\Delta t^2 \cdot b^2}{4 \cdot \ln 16}} * e^{-b \cdot t_r}$$

donde

$$\Delta t \equiv FWHM_{CC}$$

$$b \equiv 1/\tau$$

$$c \equiv \text{amplitud decaimiento exponencial, } c \text{ en } c \cdot e^{-t/\tau}$$

$$t_r = t_r'(\text{datos experimentales}) - t_0(\text{parámetro que define } t = 0)$$

$$\operatorname{erfc}(z) \equiv \text{función de error complementaria} \equiv \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_z^{\infty} e^{-x} dx$$

La función de error complementaria de ajuste se aproxima con un polinomio, con ayuda de software especializado (DataFit©)[36].

9.2 Anisotropía de fluorescencia [37].

Generalmente ocurre que, cuando una muestra se excita con luz polarizada, la emisión de fluorescencia de la muestra también está polarizada. El grado de polarización de la emisión se describe en términos de la anisotropía (r). Se dice que una muestra presenta emisión polarizada, si exhibe anisotropías distintas de cero. El origen de la anisotropía es la existencia de momentos dipolares de transición en las moléculas fluorescentes, que están orientados en distintas direcciones. En una disolución homogénea, las moléculas en estado basal, se encuentran orientadas aleatoriamente. Sin embargo, cuando la muestra es irradiada con un haz polarizado, las moléculas que se excitan preferentemente, son aquellas que tienen su momento dipolar de transición orientado en la dirección del campo eléctrico de la luz incidente. De modo que la población de moléculas en estado excitado, está parcialmente orientada.

En los experimentos de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario, la muestra se excita generalmente con luz polarizada en dirección vertical. El vector eléctrico de la luz de excitación está orientado en dirección paralela al eje vertical. La intensidad de emisión es medida a través de un polarizador. Cuando el polarizador de emisión está orientado paralelamente a la dirección de excitación, la intensidad de fluorescencia observada se denomina $I_{paralela}$. De la misma manera, cuando el polarizador está alineado de forma perpendicular a la luz de excitación, la intensidad se denomina $I_{perpendicular}$. Estos valores de intensidad son usados para calcular la anisotropía:

$$r = \frac{I_{paralela} - I_{perpendicular}}{I_{paralela} + 2I_{perpendicular}}$$

La anisotropía es una cantidad adimensional e independiente de la intensidad total de la muestra. Esto es porque la diferencia ($I_{paralela} - I_{perpendicular}$) está normalizada por la intensidad total $I_T = I_{paralela} + 2I_{perpendicular}$.

Así mismo, cuando un pulso de luz polarizado es el que excita a la muestra, la anisotropía evoluciona a través del tiempo y se describe mediante la siguiente ecuación:

$$r(t) = r_0 e^{-t/\theta}$$

donde r_0 es la anisotropía a $t=0$, y θ es el tiempo de correlación de rotación de una esfera.

Si una molécula se excita con un pulso de luz polarizado verticalmente, y esta rota con un solo tiempo de correlación, el decaimiento de la anisotropía se determina al medir los decaimientos de la emisión polarizada horizontal y verticalmente. Si los momentos de transición de la emisión y la absorción son colineales, la anisotropía a tiempo-cero es 0.4. En este caso la intensidad inicial del componente en paralelo (vertical) es tres veces más grande que el componente perpendicular (horizontal). Si la anisotropía fundamental r_0 es mayor que cero, el pulso de excitación polarizado verticalmente, resulta en una población inicial de moléculas que en su mayoría están orientadas en dirección paralela al pulso. El decaimiento de la anisotropía se obtiene calculando la diferencia entre la $I(t)_{\text{paralela}}$ y $I(t)_{\text{perpendicular}}$ y se normaliza con la intensidad total.