



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO EXPERIMENTAL DE INTERSECCIONES CÓNICAS DE
NICOTINAMIDA Y SUS ANÁLOGOS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA**

PRESENTA

BEATRIZ GONZÁLEZ CANO

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

AÑO 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 Alejandro Pisanty Baruch

VOCAL: Profesora Norma Angélica Macías Ruvalcaba

SECRETARIO: Profesor Jorge Peón Peralta

1er. SUPLENTE: Profesora Elizabeth Hernández Marín

2° SUPLENTE: Profesor Jorge Martín del Campo Ramírez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE ESPECTROSCOPIA LÁSER, INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA

Dr. Jorge Peón Peralta

SUPERVISOR TÉCNICO

M. en C Rafael Eduardo López Arteaga

SUSTENTANTE

Beatriz González Cano

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo en los proyectos de Ciencia Básica 220392, Fronteras de la ciencia 179 y el estímulo de Ayudante de Investigador SNI III 13523.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica por el proyecto IN208614.

RESUMEN

El dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido (NADH) es una coenzima necesaria para llevar a cabo reacciones enzimáticas en el metabolismo celular, está involucrada en la generación de energía para la célula mediante el intercambio de protones y electrones. Para llevar a cabo su rol, el dinucleótido se encuentra en una forma oxidada y una reducida; es decir, en equilibrio redox. Específicamente, el nucleótido de nicotinamida permite al NADH convertirse en un agente reductor u oxidante.

El dinucleótido de adenina y nicotinamida oxidado (NAD^+) y el NADH tienen un comportamiento fotofísico diferente entre sí. NAD^+ absorbe en 259 nm y no fluoresce. Por otro lado, NADH absorbe en 259 nm y 340 nm y presenta fluorescencia; estas características se usan como herramientas en ensayos enzimáticos. No obstante, aún no se ha descrito la fotofísica básica causante de estos cambios.

Para abordar este problema se estudiaron tres moléculas análogas al nucleótido de nicotinamida —que simulan la especie oxidada y reducida— mediante técnicas de espectroscopía ultrarrápida. Estas moléculas son: nicotinamida, 1-bencil-1,4-dihidronicotinamida (NBz) y bromuro de 3-aminocarbonil-1-bencilpiridinio (NBzOx).

Cuando una molécula es irradiada con luz UV o visible es promovida a un estado electrónicamente excitado, desde el cual ocurren diferentes procesos fotofísicos o fotoquímicos que desactivan a la molécula. Dichos procesos ocurren en escalas de tiempo que van desde los femtosegundos a los milisegundos, para medirlos se utilizan técnicas de espectroscopía ultrarrápida. La técnica de resolución de fluorescencia por suma de frecuencias utiliza pulsos de femtosegundos y permite dar seguimiento a la población de moléculas en el estado excitado mediante señales de fluorescencia.

Con esta técnica hemos observado por primera ocasión que el estado excitado de la nicotinamida y de NBzOx se desactivan en tiempos menores a 300 fs. En cambio, la molécula NBz, análoga de la nicotinamida reducida, presenta un tiempo de vida de fluorescencia de 510 ps. Estos resultados indican que la nicotinamida y NBzOx se desactivan por una intersección cónica; NBz se desactiva por varios caminos fotofísicos incluyendo la emisión de fotones.

La intersección cónica es conocida desde principios del siglo pasado y se ha convertido en una llave para entender procesos fotofísicos. En este proyecto obtuvimos pruebas que permiten aseverar la presencia de una intersección cónica como mediadora del proceso de desactivación de algunos de los cromóforos celulares más importantes. Esto permite proporcionar herramientas para el entendimiento y uso de las señales luminosas de estas moléculas para la comprensión de diversos procesos celulares.

LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

EEE	Estado electrónico excitado
EtOH	Etanol
fs	Femtosegundos; 1×10^{-15} segundos
ICO	Intersección cónica
MeOH	Metanol
NAD⁺	Dinucleótido de adenina y nicotinamida oxidado
NADH	Dinucleótido de adenina y nicotinamida reducido
NBz	1-bencil-1,4-dihidronicotinamida
NBzOx	Bromuro de 3-aminocarbonil-1-bencilpiridinio
nm	Nanómetro; 1×10^{-9} metros
ps	Picosegundos; 1×10^{-12} segundos
redox	Reducción-oxidación
RMN	Resonancia Magnética Nuclear

CONTENIDO

Resumen	V
Lista de acrónimos y abreviaturas	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 OBJETIVOS	5
1.1.1 Objetivo general	
1.1.2 Objetivos particulares	
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1 Preámbulo fotofísico	
2.1.2 Dinámica de relajación de estados electrónicamente excitados	
2.2 Intersección cónica	
2.3 Rendimiento de fluorescencia y tiempo de vida	
2.4 Anisotropía de fluorescencia	
2.5 Técnica de suma de frecuencias	
3. METODOLOGÍA	18
3.1 Reactivos	
3.2 Espectroscopía estática	
3.3 Técnica de suma de frecuencias	
3.4 Medición de anisotropía de fluorescencia	
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1 Espectroscopía estática	
4.1.1 NBz	
4.1.2 NBzOx y nicotinamida	
4.2 Espectroscopía resuelta en tiempo	
4.2.1 NBz	

4.2.1.1	Anisotropía de fluorescencia	
4.2.2	NBzOx y nicotinamida	

5. CONCLUSIÓN	36
6. REFERENCIAS	38
Apéndice	42

1. INTRODUCCIÓN

La molécula de NADH (Figura 1A) está compuesta por un dinucleótido, adenina y nicotinamida. Esta coenzima tiene la función, dentro de una célula, de donar electrones para generar ATP (por sus siglas en inglés, adenosine triphosphate) o alimentar pasos reductores en vías biosintéticas. Para llevar a cabo esta función, la coenzima se encuentra en equilibrio redox entre la molécula de NADH y NAD^+ . Este equilibrio se lleva cabo con la reducción del anillo de nicotinamida (Figura 1B).¹

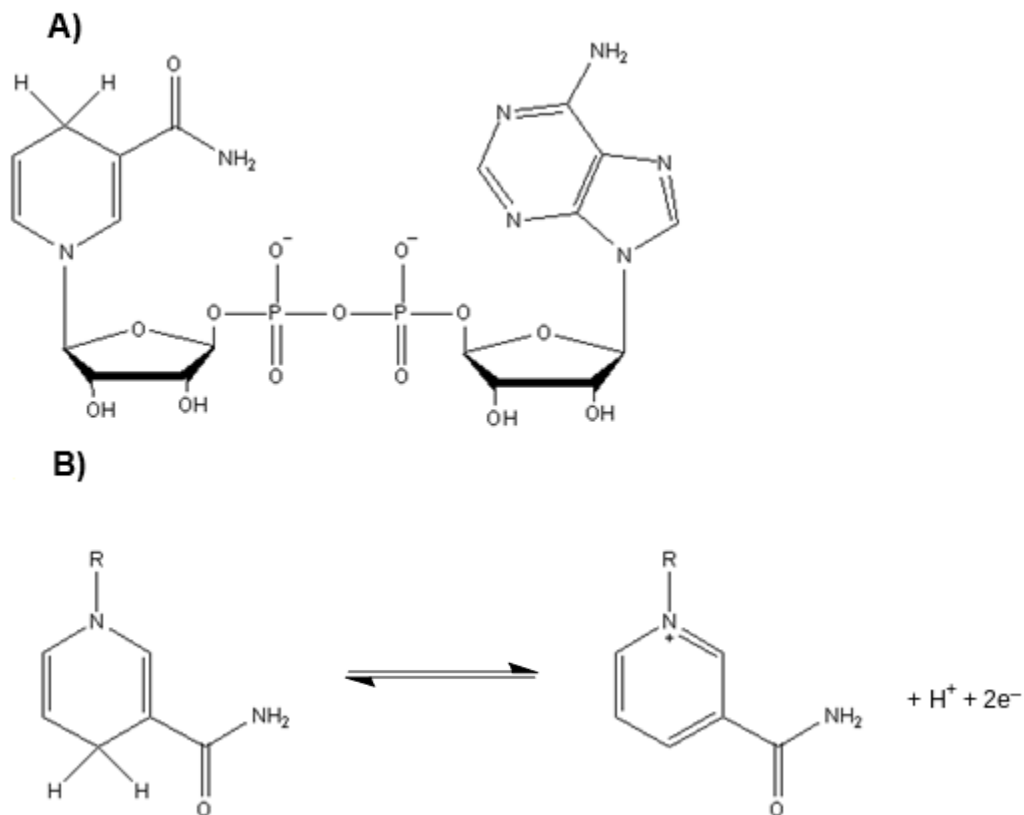


Figura 1. Estructura y reacción redox del dinucleótido de adenina y nicotinamida. A) Estructura de NADH. B) Equilibrio redox de NADH y NAD^+ .

La reducción del anillo de nicotinamida tiene como consecuencia que estas especies sean espectroscópicamente diferentes. Ambas moléculas absorben en una longitud de onda de 259 nm —banda que corresponde a la adenina—; sin embargo, se ha reportado que solamente NADH presenta una banda adicional en

340 nm que pertenece a la nicotinamida reducida.² Asimismo, NAD^+ es una molécula que hasta ahora se había considerado sin emisión de fluorescencia.

Por otro lado, la emisión de fluorescencia de NADH es tan significativa que se considera un biomarcador importante de funciones metabólicas.³ Al ser nicotinamida la molécula que da la pauta a todos los cambios espectroscópicos, decidimos estudiarla de forma individual.

Para abordar las propiedades fotofísicas de nuestro sistema, es necesario tener en mente la interacción que la radiación electromagnética tiene con la materia. La idea principal de este proceso es la absorción de esta energía parte del analito, esto produce un estado electrónico excitado (EEE); cuando la molécula se desactiva produce una respuesta medible.

El EEE de una molécula está regulado por diferentes canales de desactivación envueltos en una competencia cinética que disipan la energía para retornar al estado de mínima energía. El camino cinéticamente favorecido estará en función de la conformación química de la molécula y del medio en el que esté la misma.⁴

Los procesos de desactivación de un EEE pueden ser radiativos o no radiativos; entre los procesos no radiativos toma lugar el cruce entre sistemas y la conversión interna; un tipo de conversión interna es el que se media por una intersección cónica (ICO). Se han reportado estudios de desactivaciones ultrarrápidas vía ICO, en piridina; una molécula simple, análoga a nicotinamida.⁵⁻⁹ Sin embargo, no hay estudios que muestren la respuesta de nicotinamida a la radiación electromagnética.

En este trabajo se busca indagar sobre la fotofísica de nicotinamida (Figura 2C), así como analizar el proceso de ICO que media la desactivación de las moléculas de estudio (Figura 2A y 2B). La nicotinamida como anteriormente mencionamos forma parte del NADH y es primordial para la síntesis de NAD^+ , del mismo modo, es un

precursor de la vitamina B3.¹⁰ Asimismo, se ha estudiado que disminuye significativamente el tamaño del daño de lesiones cerebrales,¹¹ mejora la vida útil de replicamiento celular¹² y es método quimiopreventivo para reducir los efectos de la radiación UV.¹³

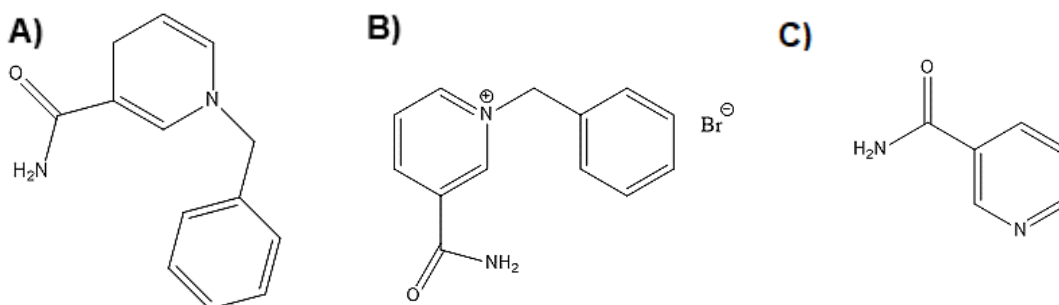


Figura 2. Estructura de las moléculas estudiadas en este trabajo. A) 1-bencil-1,4-dihidronicotinamida (NBz), B) bromuro de 3-aminocarbonil-1-bencilpiridinio (NBzOx), C) nicotinamida.

El estudio de estas moléculas permite demostrar el tipo de competencia cinética y los diferentes canales de relajación. Se trabajó con la técnica de espectroscopía láser de pulso ultracortos, que permite medir la desactivación de EEE que generalmente sucede en escalas de tiempo de femtosegundos a milisegundos.

Específicamente, la técnica de resolución de fluorescencia por suma de frecuencias consiste en utilizar pulsos de femtosegundos que permite dar seguimiento a la población de moléculas en EEE mediante señales de fluorescencia. La intensidad de emisión del cromóforo determina el proceso de desactivación de la molécula, así como el tiempo de vida de fluorescencia que tenga.

Se determinaron los tiempos de vida de nicotinamida y de dos moléculas análogas en estado oxidado y reducido (NBzOx y NBz, respectivamente; que se muestra en la Figura 2) que permitieron conocer la dinámica de estos estados en moléculas con la misma estructura base.

Asimismo, se midió la anisotropía de fluorescencia de NBz que permite estudiar la movilidad de la molécula y su difusión orientacional. Esta técnica permite dilucidar el EEE implicado en la transición original y su interacción con el disolvente, lo que permite complementar este estudio.

1.1 OBJETIVOS

1.1.2 Objetivo general

Estudiar la dinámica de relajación de los estados electrónicamente excitados de las moléculas nicotinamida, NBz y NBzOx por espectroscopía estática y espectroscopía resuelta en tiempo y con base en esta información demostrar experimentalmente la existencia de una intersección cónica en las moléculas tipo nicotinamida en su forma oxidada.

1.1.3 Objetivos particulares

- ◆ Síntesis y purificación de la molécula NBzOx.
- ◆ Determinar el rendimiento de fluorescencia de cada molécula.
- ◆ Optimizar el sistema óptico de la técnica de suma de frecuencias con resolución de femtosegundos.
- ◆ Estudiar la relajación de las moléculas que lo ameriten por espectroscopia resuelta en tiempo.
- ◆ Mediante el cambio de polarización del haz de excitación determinar la anisotropía involucrada en el sistema con las moléculas pertinentes, usando una excitación selectiva que da como resultado una población parcialmente orientada de moléculas.

2. MARCO TEÓRICO

En esta sección se abarcan los conceptos más importantes que permiten entender el objetivo principal de esta investigación. Para iniciar se habla sobre la interacción de la luz con la materia. Además, se aborda los diferentes caminos cinéticos por los cuales la molécula es capaz de relajarse, entre ellos el rol de la ICO.

También se revisan conceptos como rendimiento de fluorescencia y tiempo de vida de fluorescencia que permiten entender las características fotofísicas intrínsecas de las moléculas tras acceder a un EEE. Además, se abordan los temas de anisotropía de fluorescencia y la técnica de suma de frecuencias para comprender el trasfondo teórico de los experimentos elaborados en esta tesis.

2.1 Preámbulo fotofísico

Cuando una fuente de luz con la energía adecuada promueve a una molécula de un estado de mínima energía a un EEE, comienza una competencia cinética entre todos los canales involucrados en el sistema, a través de las cuales la energía se disipará o se consumirá. Esto ocurre en escalas de tiempo muy rápidas.

La interacción de la luz con moléculas orgánicas genera procesos fotofísico y fotoquímicos. Los procesos de naturaleza química implican el rompimiento o la formación de un enlace, por otro lado, un proceso fotofísico implica la desactivación energética —es decir, el regreso al estado electrónico basal— con o sin emisión de luz.¹⁴

Estas transiciones están sujetas a ciertas restricciones llamadas Reglas de Selección.¹⁵ Si una transición es favorecida por una regla de selección se dice que está *permitida*, si no es así la transición está *prohibida*, sin embargo, algunas reglas de selección están formuladas con base en sistemas ideales por lo tanto algunas transiciones prohibidas pueden llegar a ocurrir en algunas circunstancias.¹⁶

Para que una transición sea permitida es necesario que el momento dipolar de transición entre los estados m y n no se anule, es decir, que cumpla la siguiente condición:

$$\langle m | \mu_x | n \rangle \neq 0$$

Esta condición define algunas de las reglas de selección y depende de la función de onda del estado inicial n y del estado final m de la transición.¹⁷

Alguna de estas reglas es la selección de espín; cuando una transición ocurre sin un cambio de multiplicidad singlete-singlete y triplete-triplete la transición es permitida. Las transiciones de espín prohibido son las singlete-triplete. En pocas palabras, la transición es permitida cuando el estado de transición final e inicial tiene la misma multiplicidad. Otros ejemplos son la regla de simetría y el principio de Frank-Condon, entre otras.¹⁸

Ahora, en la Figura 3 se muestra el diagrama de Jablonski, donde se representan las transiciones posibles. Los estados electrónicos singlete basal, primero y segundo, están representados por S_0 , S_1 , S_2 , respectivamente. Así como los estados electrónicos tripletes: T_1 , T_2 . Los niveles vibracionales asociados con cada estado se denotan como $v = 0, 1, 2 \dots n$, en orden creciente de energía. La desactivación no radiativa se expresa con flechas punteadas y las flechas rectas simbolizan la desactivación radiativa.

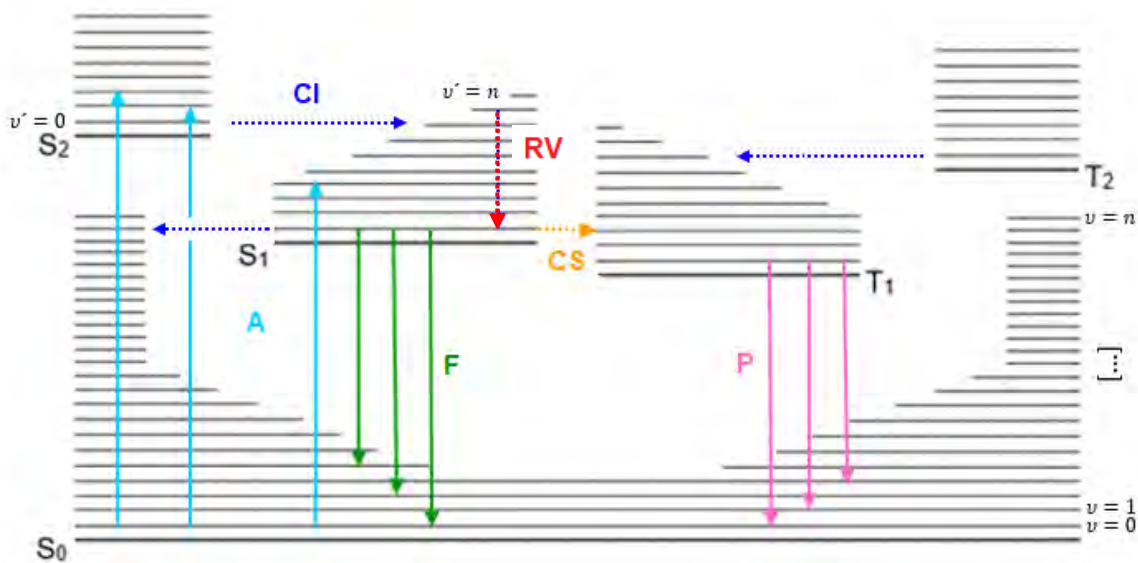


Figura 3. Diagrama de Jablonski. Ilustra los procesos fotofísico de los estados excitados. Los procesos están divididos por colores con sus respectivas etiquetas: CI, conversión interna; A, absorción; F, fluorescencia; P, fosforescencia; CS, cruce entre sistemas y RV, relajación vibracional.

2.1.1 Dinámica de relajación electrónica de estados excitados

Seguido de la absorción de luz (flechas azul claro, Fig. 3), varios procesos entran en competencia cinética. Como mencionamos anteriormente, existen dos tipos de relajación, radiativa y no radiativa. Los procesos radiativos se distinguen por la emisión de un fotón, que ocurre cuando la molécula regresa al estado basal. ^{3,4,15,19}

Fluorescencia (flechas verdes, Fig. 3). La fluorescencia involucra transiciones radiativas entre estados de la misma multiplicidad, usualmente del estado vibracional de menor energía del primer estado singlete hacia cualquier estado vibracional del singlete basal. La frecuencia del fotón emitido corresponde a la diferencia de energía entre los estados involucrados en la transición. El intervalo de tiempo de este fenómeno está entre 10^{-5} a 10^{-8} s, es decir, que la constante cinética asociada a estos procesos puede ser de 10^{-5} s^{-1} a 10^{-8} s^{-1} .

Fosforescencia (fechas rosas, Fig. 3). La fosforescencia es la transición radiativa entre dos estados de diferente multiplicidad, es decir, ocurre un cambio en la multiplicidad del espín. Este fenómeno ocurre en tiempos de 10^{-1} a 10^{-3} s.

Ahora, los procesos no radiativos son aquellos en donde no involucra la emisión de un fotón^{3,4,15}:

Relajación vibracional (flecha roja, Fig.3). La relajación vibracional es el proceso mediante el cual la energía de un estado vibracional superior es disipada al medio generando un estado vibracional de menor energía dentro de un mismo estado electrónico. Este proceso ocurre en escala de tiempo promedio de 10^{-12} s.

Conversión interna (fechas moradas, Fig. 3). La conversión interna es la relajación desde estados superiores — S_n — a un estado electrónico de menor energía con la misma multiplicidad, las transiciones intramoleculares no radiativas son entre estados vibroelectrónicos de la misma energía, es decir, estados isoenergéticos. La transición por conversión interna de S_n-S_1 se caracteriza por tener un tiempo de 10^{-14} s y las transiciones de S_1-S_0 son más lentas debido a la diferencia de energía que hay entre estos estados, en estos casos el tiempo promedio es de 10^{-4} a 10^{-6} s.

Cruce entre sistemas (fecha naranja, Fig. 3). El cruce entre sistemas ocurre entre estados de diferente multiplicidad, la transición es entre estos también es isoenergética. El intervalo de tiempo de este fenómeno es de 10^{-6} a 10^{-10} s.

2.2 Intersecciones cónicas

Un tipo particular de conversión interna es aquella que se realiza a través de una intersección cónica (ICO), hoy en día se considera que muchos procesos fotofísicos proceden a través de este tipo de fenómenos.²⁰

Cuando se excita a un sistema molecular se accede a un estado de mayor energía, la región de Frank-Condon —región de la superficie de energía potencial final a la que se accede mediante una transición vertical—. Una vez en esta región la

molécula se relaja mediante cambios en su geometría que se dan debido a la evolución del sistema en la superficie de energía potencial.

Estas superficies de energía potencial se pueden cruzar llegando a un equilibrio en el cual el estado superior y el de menor energía coinciden en un punto de energía degenerada, a esta situación se le conoce como intersección cónica,¹⁷ en la Fig. 4 se ve un ejemplo de intersección cónica propuesta para la molécula guanina en una tesis de doctorado del año 2013 de la Universidad Nacional Autónoma de México.²¹

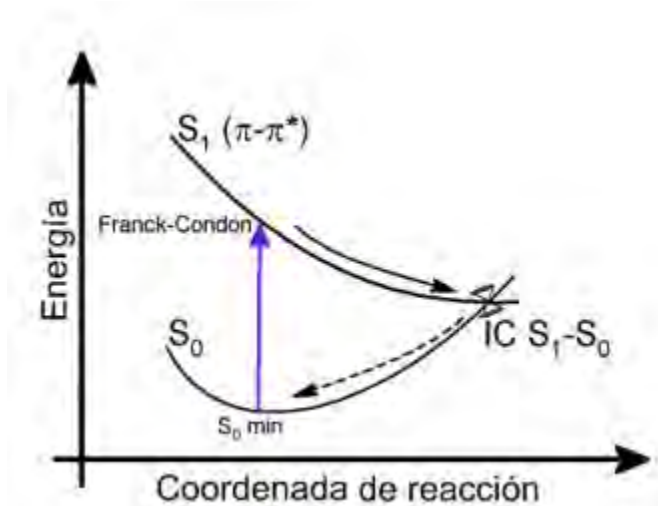


Figura 4. Mecanismo de desactivación del estado S_1 para guanina. La flecha morada representa la absorción de luz, las flechas negras, la evolución del sistema. *Imagen tomada de una tesis doctoral de 2013.*²¹

Esta transición permite la desactivación de una molécula sea de manera casi instantánea, dando pauta en algunos casos a diferentes fenómenos como la formación y rompimiento de enlaces, transferencias de electrones o simplemente la relajación no radiativa.²²

2.3 Rendimiento de fluorescencia y tiempo de vida

Como vimos anteriormente, cuando una molécula accede a un EEE entran en competencia con diferentes caminos fotofísicos entre ellos la fluorescencia. Para estudiar este fenómeno debemos tener claro la definición de rendimiento de fluorescencia y el tiempo de vida de fluorescencia.

El rendimiento de fluorescencia es un cociente de cuantos fotones se emiten con respecto a la los fotones absorbidos, esta relación se describe en la siguiente ecuación:²³

$$\phi_f = \frac{k_f}{k_f + \Sigma k_t}$$

Donde

k_f es la constante de velocidad de emisión de fluorescencia y Σk_t es la suma de las constantes de velocidad de los procesos de desactivación de EEE que compiten con la fluorescencia.

Por otro lado, el tiempo de vida de fluorescencia (τ_0) es el tiempo promedio en el que la población de moléculas está en el estado excitado. La población de moléculas excitadas a $t = 0$ comienza a disminuir exponencialmente a través de las transiciones radiativas (k_r) o no radiativas (k_{nr}).

$$\tau_0 = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$$

La intensidad de fluorescencia $I(t)$ emitida en función del tiempo es proporcional a la concentración de la molécula en el estado excitado.

El tiempo de vida de fluorescencia, tiene un significado físico, es el tiempo necesario para que la intensidad de fluorescencia disminuya $1/e$ de su valor inicial I_0 según la siguiente ecuación:

$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau_0}}$$

2.4 Espectros de emisión resueltos en tiempo

Los espectros de emisión resueltos en tiempo (TRES por sus siglas en inglés Time Resolved Emission Spectra) permiten ver la evolución temporal de los estados electrónicamente excitados con respecto a las longitudes de onda, además permite ver la dependencia que existe con el disolvente.

Los espectros de emisión de resolución temporal se obtienen mediante la medición de los decaimientos resueltos en el tiempo a varias longitudes de onda en todo el espectro de emisión. La intensidad depende de la longitud de onda, las longitudes de onda cortas decaen más rápidamente que las longitudes de onda más largas.

Esto ocurre porque la emisión en el lado de longitud de onda corta del espectro disminuye tanto por emisión como por relajación a longitudes de onda más largas. Por otro lado, la emisión en longitudes de onda largas requiere que los fluoróforos se relajen antes de la emisión, y por lo tanto se retrasa por el tiempo de relajación. Para el cálculo del TRES, los decaimientos se analizan generalmente en términos del modelo multiexponencial.³

$$I(\lambda, t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i(\lambda) e^{\frac{-t}{\tau_i(\lambda)}}$$

Donde

$I(\lambda, t)$ es la intensidad de emisión a cada longitud de onda, $\alpha_i(\lambda)$ son los factores preexponenciales y $\tau_i(\lambda)$ son los tiempos del decaimiento.

2.5 Anisotropía de fluorescencia

La medición de la anisotropía de fluorescencia permite estudiar la movilidad molecular y la orientación, así como los procesos que la afectan. Esta medición se basa en el principio de excitación fotoselectiva de fluoróforos con luz polarizada.

En una solución isotrópica, las moléculas están orientadas aleatoriamente. Tras la excitación con luz polarizada, los fotones cuyo campo eléctrico este alineado paralelamente con el momento de transición del fluoróforo serán absorbidos; esta excitación selectiva da como resultado una población parcialmente orientada de moléculas.^{3,18}

La anisotropía de fluorescencia se determina mediante la siguiente ecuación:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

Donde

r es la anisotropía de la muestra, I_{\parallel} es la intensidad de fluorescencia de la emisión polarizada verticalmente y I_{\perp} es la intensidad de fluorescencia de la emisión polarizada horizontalmente cuando la luz de excitación inicial está polarizada verticalmente.

El plano de polarización de un fotón de fluorescencia emitido se define por la orientación del momento de transición de emisión de la molécula, por lo tanto, por la orientación de la molécula en el momento de la emisión. La anisotropía es una cantidad adimensional y suele ser más alta en el momento de la excitación, luego disminuye con respecto al tiempo. La razón común de esto es el movimiento molecular aleatorio, algunos factores son: la difusión rotacional, el movimiento browniano, la viscosidad, la temperatura, etc.^{14,18}

2.6 Técnica de suma de frecuencias

Para estudiar eventos ultrarrápidos —que ocurren en 1ns o menos—, se requiere un equipo con una alta resolución temporal, es decir, debe poseer un componente que cambie más rápido o al menos, tan rápido cómo el proceso bajo investigación. La técnica de suma de frecuencias permite medir fenómenos en escalas de femtosegundos debido a la duración de los pulsos que se emplean.¹⁴ La resolución temporal de esta técnica depende de la duración de los pulsos y no de la rapidez con que el detector transforma las señales ópticas en señales digitales.¹⁹

La técnica permite dilucidar el tipo de desactivación de una molécula, esto recae en la intensidad de emisión que presenta el cromóforo; la medición del decaimiento de fluorescencia en función del tiempo puede ayudar a determinar el tipo de desactivación. El pulso de inicio promueve a la molécula a algún EEE, este estado se desactivará por diferentes vías, como hemos visto antes, entre ellas la emisión espontánea de fluorescencia, incluso, hasta cierto punto se puede controlar el estado al que se accede mediante la longitud de onda con que se irradia la muestra.

Esta técnica consiste en excitar a la muestra con cierta longitud de onda de un láser pulsado, la fluorescencia que es emitida en todas direcciones es colectada y enfocada, con ayuda de un par de espejos parabólicos, a un cristal de óptica no lineal junto con un pulso prueba. Este último presenta un retraso espacial, que se traduce en un retraso temporal respecto al pulso de excitación, esto se controla con un sistema de retardo en el camino óptico del pulso prueba.

El cristal de β -BBO (Beta Borato de Bario) es un medio birrefringente en donde el índice de refracción que experimenta una onda electromagnética polarizada depende de su dirección de propagación.¹⁹ Este cristal permite un ajuste de fase tipo I, esta característica permite que el ajuste de fases se dé sólo cuando los pulsos interactuantes tiene la misma polarización; el pulso resultante estará polarizado a 90° con respecto a los de origen.

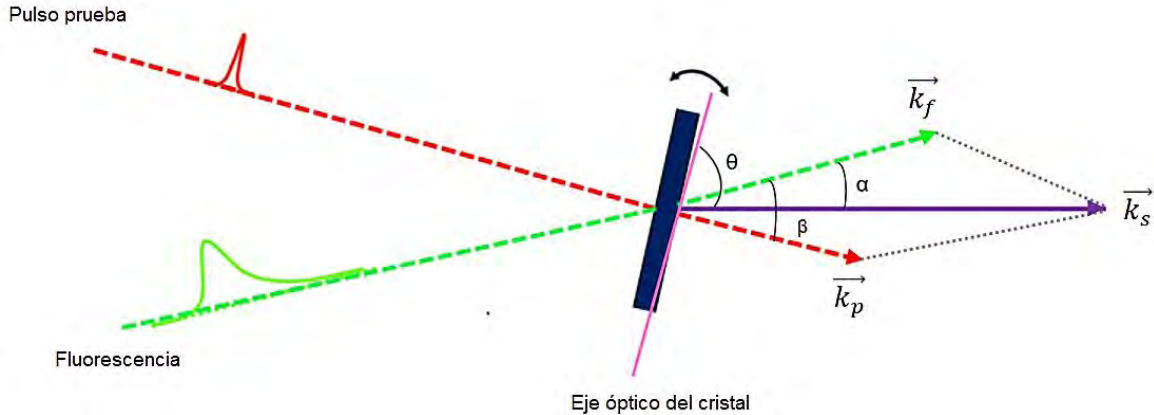


Figura 5. Esquema de ajuste de fase de dos pulsos en el cristal de β -BBO.

En la Figura 5 se observa de forma clara que el ajuste de fase es una suma vectorial entre el vector de onda de la fluorescencia (\vec{k}_f) y el vector de onda del pulso prueba (\vec{k}_p), el resultado de esta operación vectorial resulta en la señal (\vec{k}_s). El ángulo de ajuste θ se controla rotando el eje z del cristal.²⁴ Para obtener una orientación idónea con respecto a las polarizaciones, el pulso de inicio se ajusta a un ángulo de polarización igual al ángulo mágico (54.7°).¹⁹

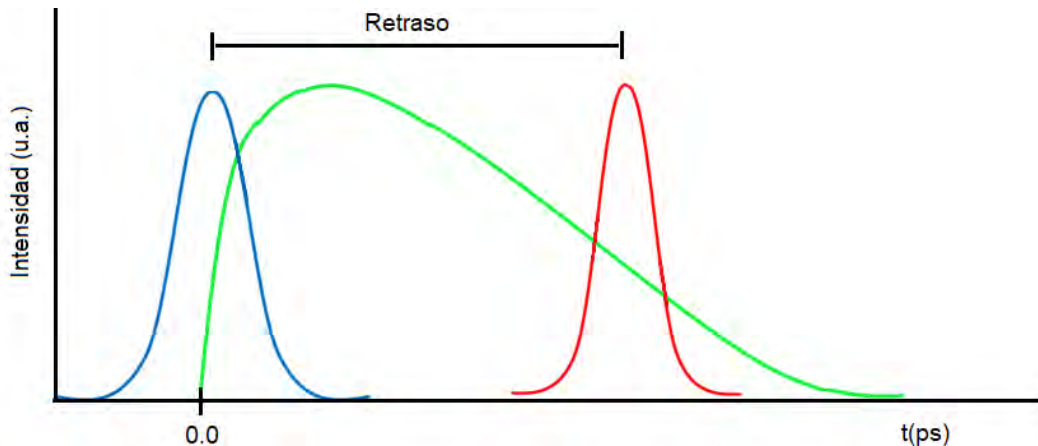


Figura 6. Esquema para la suma de frecuencias entre el pulso de prueba y la fluorescencia. Línea azul, pulso de inicio; línea roja, pulso de prueba, línea verde, fluorescencia.

La señal de suma de frecuencias se obtiene retrasando el pulso de prueba a varios tiempos por medio de una platina. Cuando la distancia entre el pulso de prueba y la fluorescencia son iguales se dice que se mide la emisión a tiempo cero —es decir inmediatamente después de la excitación, el retraso es cero—. En la Figura 6 se muestra un ejemplo en donde el pulso de prueba tiene un retraso de tiempo t respecto al pulso de inicio, sin embargo, al estar temporalmente dentro del intervalo de tiempo en el que la molécula aún está emitiendo fotones, interaccionará constructivamente en el cristal de β -BBO.

A continuación, la señal de suma de frecuencias es dirigida y enfocada a un monocromador con un tubo fotomultiplicador y un amplificador. La señal entra al primer monocromador para luego pasar al segundo monocromador de forma que solamente los fotones de la longitud de onda que se fijó en éstos lleguen al tubo fotomultiplicador. Una vez en el fotomultiplicador, los fotones son transformados en una señal eléctrica y a su vez en una señal de voltaje que es enviado al amplificador para ser procesada.¹⁹

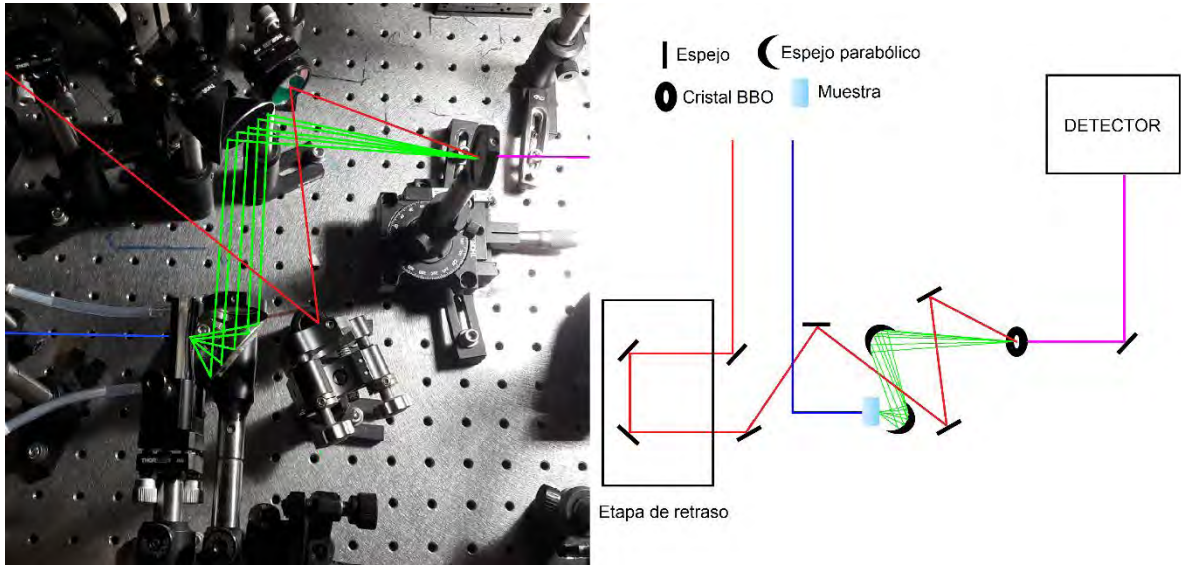


Figura 7. Esquema de la técnica de suma de frecuencias. Del lado izquierdo se observa una imagen de la alineación real de la técnica. De lado derecho, un esquema simplificado de la técnica. La línea de color azul representa el haz de bombeo que excitará a la muestra. La línea roja el haz de prueba. Las líneas verdes son la fluorescencia emitida por la muestra. La línea rosa es la suma resultante de la fluorescencia y el láser de prueba.

3. METODOLOGÍA

En este capítulo se abordan los pasos y detalles experimentales que se siguieron para obtener los espectros estáticos de NBz, NBzOx y nicotinamida. Así como la descripción de la técnica de suma de frecuencias, técnica que permite considerar este trabajo como novedoso en el campo de investigación de las intersecciones cónicas en este tipo de moléculas.

3.1 Reactivos

La molécula de nicotinamida se obtuvo de Sigma Aldrich, con una pureza de mayor al 99.5%. NBz fue adquirido de TCI Chemicals con una pureza superior al 95%. Las moléculas patrón que permitieron alinear el sistema óptico, cumarina 102 (Cu102), fue adquirida en MP Biomedicals, grado láser y p-terfenil con calidad HPLC se obtuvo de Sigma Aldrich. Los disolventes empleados fueron metanol, etanol y ciclohexano con calidad HPLC, adquiridos en Sigma Aldrich.

La molécula NBzOx se sintetizó mediante una reacción de sustitución nucleofílica a partir de nicotinamida con base en el trabajo de Caroline E. Paul de 2013.²⁵ Se pesó 4.88 g de nicotinamida que fueron disueltos en 40 mL de acetonitrilo y 4.8 mL de bromuro de bencilo. La reacción se llevó a reflujo bajo agitación constante por una hora. Se observó un precipitado blanco con un rendimiento de 98%; se caracterizó por RMN (Apéndice).

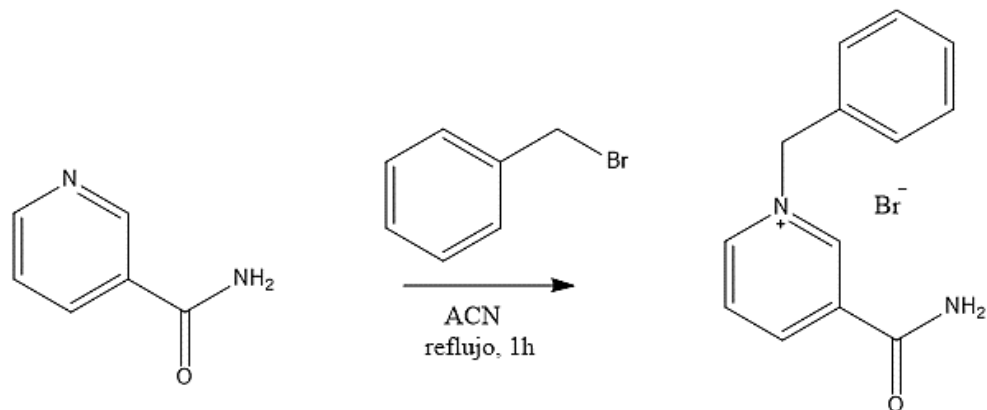


Figura 8. Síntesis de NBzOX.

3.2 Espectroscopía estacionaria

Los espectros de absorbancia se obtuvieron en una celda de cuarzo de un 1 cm de paso óptico en un espectrofotómetro Cary-50. Los espectros de emisión y excitación se tomaron con la misma celda en un fluorímetro Cary Eclipse. Los espectros de Cu102, p-terfenil y NBz se adquirieron con una absorbancia aproximada 0.05.

Los espectros de nicotinamida y NBzOx, al observar su mínima emisión, se tomaron en cuenta con una absorbancia aproximada de 1.0. Con estos parámetros se obtuvieron los espectros de emisión y excitación para cada molécula. Para los espectros de NBz, NBzOx y nicotinamida se usó metanol como disolvente; para Cu102 se usó EtOH y para p-terfenil se usó ciclohexano.

Para obtener el rendimiento de fluorescencia de nuestros sistemas se usó la siguiente ecuación:

$$\Phi = \Phi_R \frac{I}{I_R} \frac{OD_R}{OD} \frac{n^2}{n_R^2}$$

Dónde:

Φ es el rendimiento de fluorescencia de la molécula estudiada, Φ_R es el rendimiento de fluorescencia de la molécula de referencia, I es el área bajo la curva del espectro

de emisión de la molécula estudiada, I_R es el área bajo la curva del espectro de emisión de la molécula de referencia, OD es la densidad óptica a una longitud de onda, del espectro de absorción de la molécula estudiada, OD_R es la densidad óptica a una longitud de onda, del espectro de absorción de la molécula de referencia, n es el índice de refracción del disolvente en el que está disuelta la molécula estudiada y n_R es el índice de refracción del disolvente en el que está disuelta la molécula de referencia.

Para NBz se tomó como referencia Cu102¹⁸ y se calculó el promedio de los rendimientos de fluorescencia obtenidos para las longitudes de onda de 260, 320, 320, 340 y 350 nm. En cambio, para NBzOx y nicotinamida se tomó como referencia p-terfenil²⁶ y se calculó el promedio de los rendimientos de fluorescencia a las longitudes de onda de 250, 260 y 270 nm.

3.3 Técnica de suma de frecuencias

El arreglo de suma de frecuencias es alimentado por un oscilador de Ti: Zafiro, bombeado por un láser de diodos (Verdi, Coherent Inc) de 4 W, en modo continuo. El oscilador es sintonizable de 750 a 890 nm y produce un láser pulsado con una duración por pulso de 100 fs, una frecuencia de repetición de 100 MHz y una energía por pulso de 2.5×10^{-9} J/s. Después pasa por un sistema de amplificación que permite obtener un haz con una frecuencia de repetición de 1 KHz y una energía por pulso de 650×10^{-6} J/s.

El haz al salir del sistema de amplificación con polarización horizontal y una longitud de onda de 800 nm, se divide en tres haces como se muestra en la Figura 9. La primera división del haz se envía a una etapa de retardo, este haz llega al mismo tiempo que la fluorescencia al cristal de β -BBO para que se lleve a cabo la suma de frecuencias.

La segunda fragmentación se dirige a otra etapa de retraso que también va un cristal de β -BBO para generar el 3ω (266 nm). Por último, la tercera fracción incide sobre

un cristal de β -BBO para obtener 2ω (380 nm). Este último, al ser generado en el cristal de β -BBO tiene dos caminos: dirigirse para formar el 3ω o desviarse para excitar a la muestra.

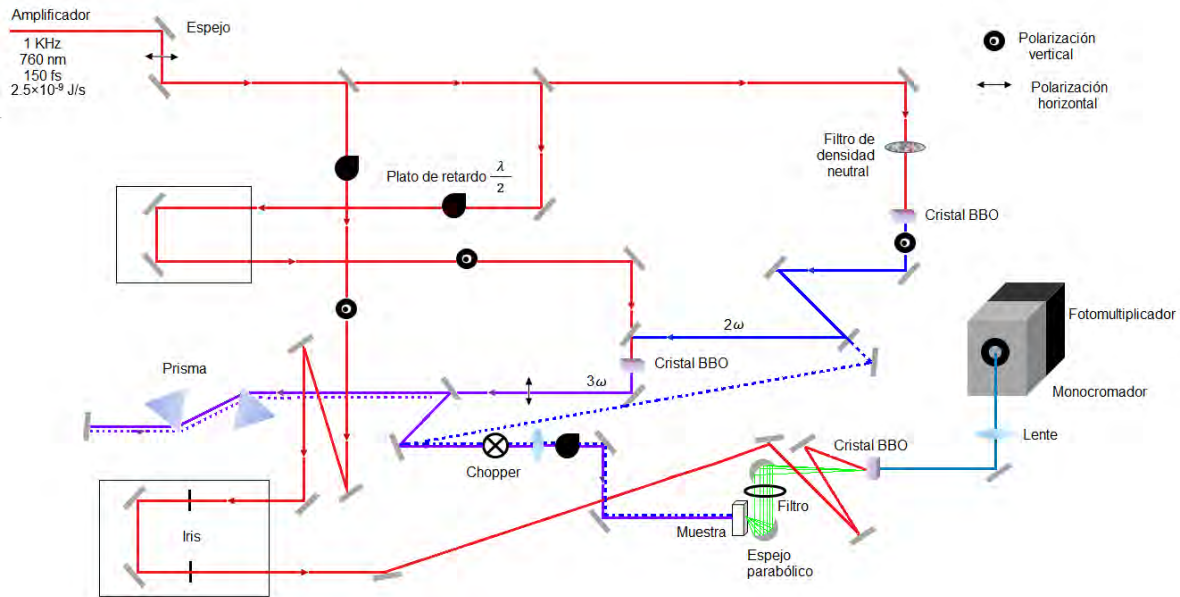


Figura 9. Diagrama del arreglo de la técnica de suma de frecuencias. La línea roja representa el haz de 760 nm, el azul es de una longitud de 380 nm —la línea punteada y la recta representan dos caminos diferentes que dependen del experimento—. La línea morada es un haz de 266 nm —la línea punteada hace referencia a que el haz regresa por el mismo camino—.

Cómo antes mencionamos, el tren de pulsos pasa a través de un cristal de β -BBO que dobla la frecuencia del haz; el segundo armónico se enfoca en la muestra con una potencia de $30\mu W$, la polarización del haz fue controlada con un plato de retardo, para este experimento se ajustó al ángulo mágico (54.7°). La suma de frecuencias se lleva a cabo entre el haz de prueba y la fluorescencia colectada por espejos parabólicos. La señal se enfoca en la entrada del monocromador (Oriol),

este tendrá la función de detectar un rango longitud de onda de la emisión de la muestra.

Para calcular la longitud de onda de detección que identificara el monocromador se usa la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{\lambda_{det}} = \frac{1}{\lambda_{emi}} + \frac{1}{\lambda_{pr}}$$

Donde

λ_{det} es la longitud de onda que se obtiene de la suma de frecuencias entre la longitud de onda de prueba y emisión de la muestra, λ_{emi} es la longitud de onda que emite la muestra al ser irradiada y λ_{pr} es la longitud de onda de prueba, 760nm.

La señal del monocromador se detecta con un tubo fotomultiplicador conectado a un amplificador Lock-in que en conjunto contarán los electrones generados por el fotomultiplicador para obtener la señal que requerimos.

Para NBz se detectó la emisión en el rango de 430-600 nm, cada 10 nm, excitando a 380nm y 266 nm, obteniendo los decaimientos largos y cortos, es decir de -3 a 150 ps y de -3 a 50 ps respectivamente; para NBzOx y nicotinamida se detectó de 310-340 nm, cada 10 nm, excitando a 266nm. Para hacer las mediciones era necesario llevar la platina a un tiempo negativo en donde la molécula no ha sido excitada, además se cambia el ángulo del cristal, y la longitud de onda de detección en los monocromadores.

Asimismo, la alineación del arreglo óptico se optimiza con una solución de Cumarina en metanol para longitudes mayores de 400 nm y menores de 300 nm con p-terfenil en metanol.

3.4 Medición de anisotropía de fluorescencia

La anisotropía de fluorescencia como habíamos mencionado antes nos permite medir la movilidad molecular y su orientación. Este parámetro se midió para la molécula NBz ya que es la única con la señal suficiente para realizar este experimento.

El arreglo de la Figura 9 se mantuvo, sólo se cambió la polarización con el plato de retardo a Horizontal y Vertical, excitando a 266nm y 380 nm. Los resultados fueron tratados en el software Data-Fit© y se obtuvo la anisotropía siguiendo la ecuación descrita en la sección 2.5.

Además, se calculó el ángulo entre el dipolo de transición del estado emisivo y el dipolo de transición del estado excitado con la siguiente ecuación:³

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \right)$$

Donde

r_0 es la anisotropía del sistema y β el ángulo entre el estado de mínima energía y el estado emisivo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para este trabajo.

Se exponen los espectros estáticos y con resolución temporal de las tres moléculas, así como sus respectivas mediciones de anisotropía de fluorescencia.

4.1. Espectroscopía estática

4.1.1 NBz

Los espectros de absorción, emisión y excitación de NBz se muestran en la Figura 10. El espectro de absorción tiene un máximo en 350 nm y el espectro de emisión tiene un máximo en 450 nm. Se obtuvo un rendimiento cuántico de fluorescencia de 0.05, podemos considerar a la molécula como un fluoróforo a la par de NADH y FAD.^{27,28}

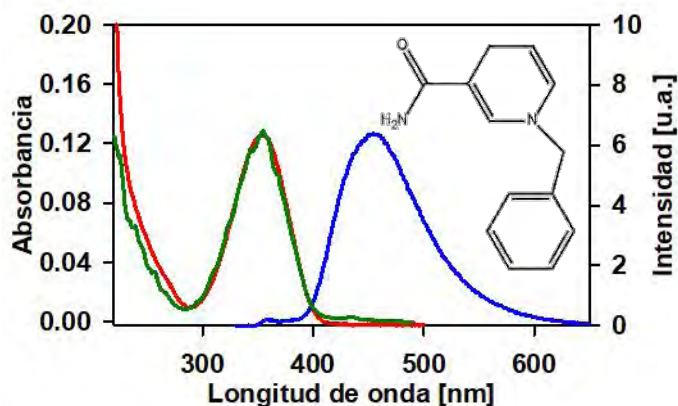


Figura 10. Espectro estático de NBz en MeOH. El espectro de absorción se muestra en color rojo, emisión en azul y excitación en verde. Asimismo, se observa la estructura de la molécula.

El espectro de excitación (corregido) tiene una similitud espectral con respecto al espectro de absorción en la banda del estado emisor, es decir, la banda en 350

nm. Mientras que en los estados superiores se observa un decaimiento en la banda del espectro de excitación, posiblemente por la contribución de absorción del bencilo, que se desactiva de forma no emisiva.

Por otro lado, hay un desplazamiento Stokes entre el espectro de absorción y el de emisión de 100 nm que equivale a 16.4 eV, lo que representa la diferencia de energía entre el fotón absorbido y el fotón emitido.

4.1.2 NBzOx y nicotinamida

En la Fig. 11A se observa el espectro de absorción de NBzOX en metanol con un máximo de 266 nm, se obtuvo un coeficiente de extinción molar de $4059 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

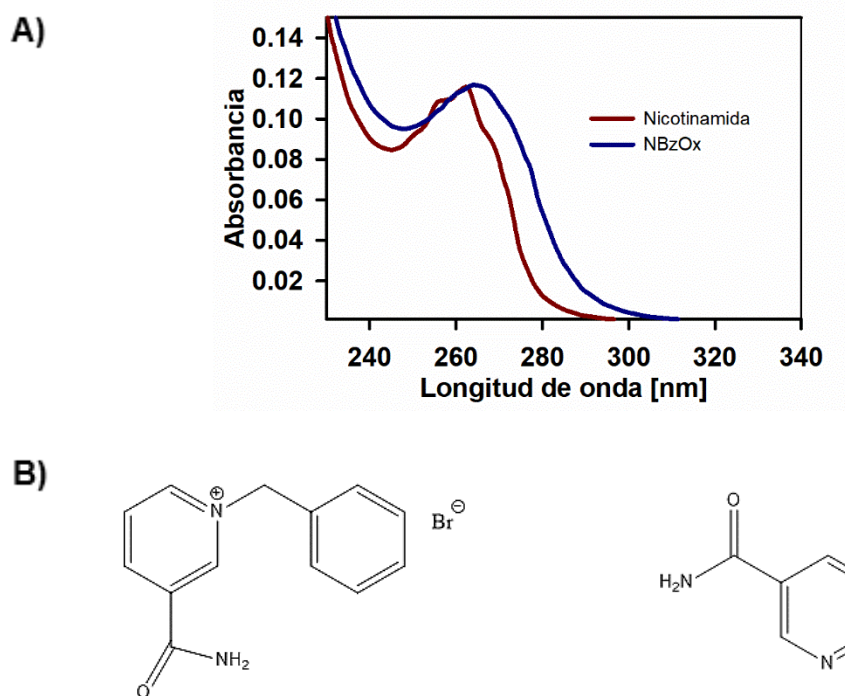


Figura 11. Espectros de absorción y estructuras de NBzOx y nicotinamida en MeOH. A) Espectros de absorción de nicotinamida (rojo) y NBZOx (azul) en metanol. B) Estructura de NBzOx (izquierda) y nicotinamida (derecha).

Además, se observa el espectro de nicotinamida con un máximo en 260 nm, el coeficiente de extinción de esta molécula se ha reportado con un valor de $2670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$,²⁹ bastante bajo comparado con otras bases nitrogenadas como la desoxiadenosina que tiene un coeficiente de extinción molar de $14930 \text{ M}\cdot\text{cm}^{-1}$.³⁰

Cabe destacar que el espectro de absorción de ambas moléculas es prácticamente el mismo, es decir, la energía requerida para alcanzar el estado electrónico S_1 es la misma. Sin embargo, la nicotinamida tiene una estructura más rígida, por lo tanto, se observa un espectro más estructurado que muestra los estados vibracionales excitados en la molécula.

Asimismo, se obtuvieron los espectros de emisión de las dos moléculas (sólo se muestra el de NBzOX) y sus respectivos rendimientos de fluorescencia (usando p-terfenil como estándar para ambas moléculas),²⁶ en ambos casos $\leq 10^{-4}$. En la Fig. 12A se observa el espectro de emisión de NBzOx en MeOH, una señal muy parecida al espectro de emisión de la molécula adenosín monofosfato,³⁰ de la cual se ha reportado que su desactivación es vía ICO.³¹

También podemos ver que el espectro de emisión de NBzOx tiene una estructura particular en la que la intensidad va disminuyendo con respecto a la longitud de onda, eso quiere decir que existe una disminución en la cantidad de fotones detectados debido al proceso de intersección cónica, en la Fig. 12B se representa el diagrama de un proceso de conversión interna vía ICO.

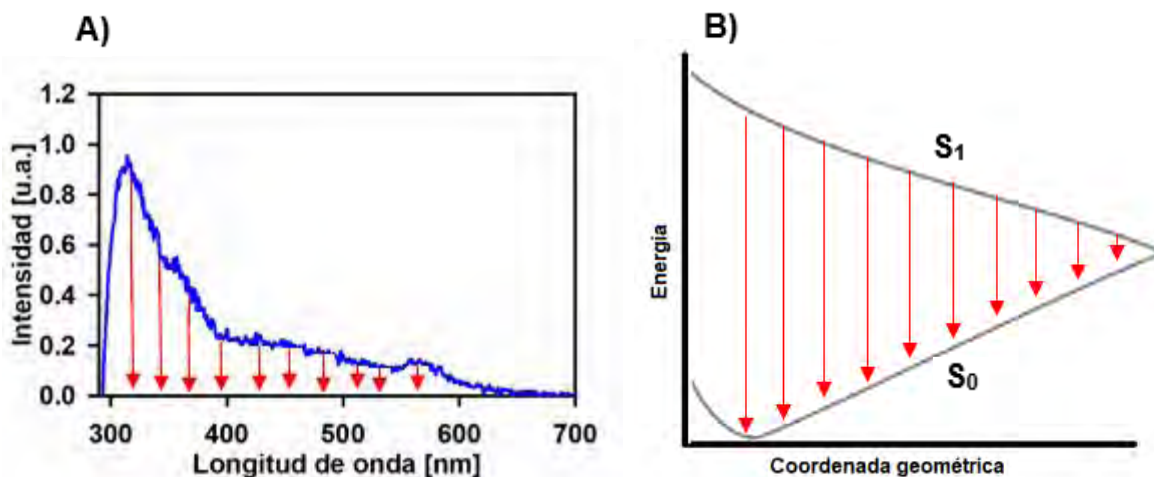


Figura 12. Espectro de emisión y diagrama de ICO. A) Espectro de emisión de NBzOx en MeOH, B) mecanismo de desactivación de S₁ propuesto para NBzOx y nicotinamida.

Como mencionamos en el marco teórico, la desactivación de EEE puede ocurrir mediante diferentes rutas, todas envueltas en una competencia cinética. La escasa fluorescencia de parte de NBzOx y de nicotinamida permite asumir el favorecimiento de un camino de desactivación no radiativo.

Existe una mayor probabilidad de que haya una emisión de fotones a 310 nm — máximo de emisión del espectro—. Conforme la molécula va explorando la superficie de energía potencial, la probabilidad de emisión disminuye, aproximándose a la ICO, es por eso que podemos advertir este espectro, ver Figura 12.

El espectro de emisión de nicotinamida no se reporta en este trabajo debido a que la emisión se encuentra fuera del límite de detección del equipo. El rendimiento de fluorescencia es tan bajo que la emisión no es detectable.

4.2 Espectroscopía resuelta en tiempo

4.2.1 NBz

Los decaimientos de fluorescencia de la Figura 13 se determinaron excitando a 266 nm. Estos resultados se ajustaron a un modelo biexponencial $I(t) = A_1 e^{-t/\tau_1} + A_2 e^{-t/\tau_2}$ y se obtuvieron dos tiempos de vida, uno largo y otro corto, uno para cada longitud de onda de emisión: 440 nm, 500 nm y 600 nm, (las cuales se resumen en la Tabla 1). El tiempo de vida corto, puede atribuirse a la relajación del disolvente —típicamente ocurre en escala de tiempo de <40 ps—³, relajación vibracional y conversión interna. El tiempo largo corresponde al tiempo de vida de fluorescencia de NBz.

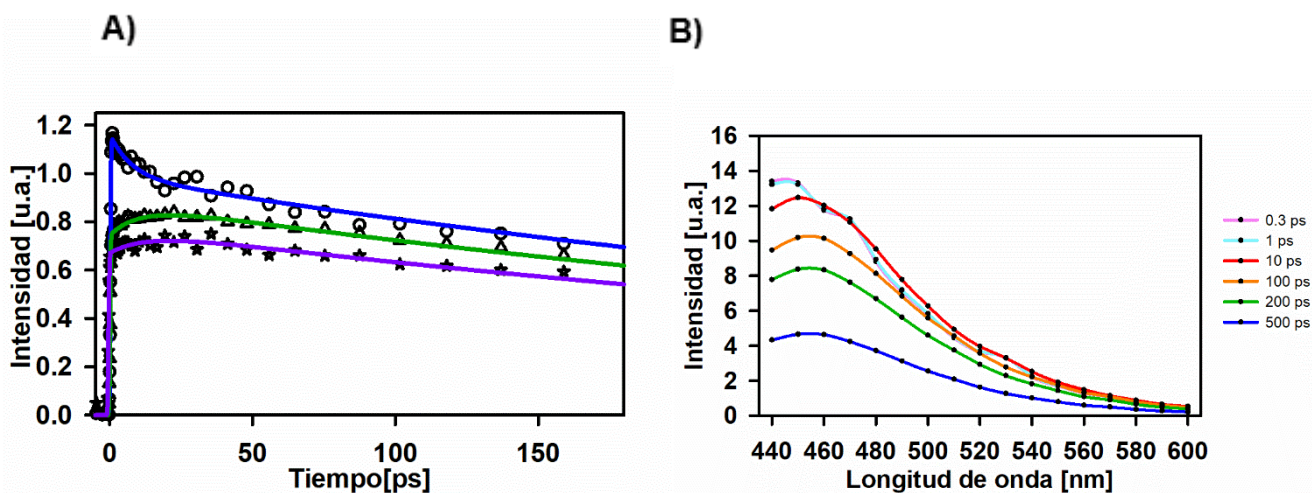


Figura 13. Experimentos de decaimiento de fluorescencia por suma de frecuencias para NBz en MeOH y diagrama de la evolución espectral de emisión resuelta en el tiempo (TRES) de NBz. A) La longitud de onda con la cual se excitó la muestra fue de 266 nm. La emisión se detectó a 440 (azul), 500 (verde) y 600 nm (púrpura). B) La longitud de onda con la cual se excitó la muestra fue de 266 nm.

λ_{emi}	3ω (266 nm)		2ω (380 nm)	
	τ_1 [ps]	τ_2 [ps]	τ_1 [ps]	τ_2 [ps]
440	7.7 ± 1.6	510 ± 12	11 ± 2.3	510 ± 15
500	(-) 10 ± 1.9	510 ± 9.8	(-) 1.6 ± 0.2	510 ± 9.8
600	(-) 12 ± 3.1	510 ± 12	(-) 3.3 ± 0.7	510 ± 17

Tabla 1. Tiempos de vida media de fluorescencia (τ) de NBz en MeOH

Además, las señales a tiempos tempranos para 500 y 600 nm tienen una acumulación de estados emisivos y vibroelectrónicos, por lo que el término preexponencial en el ajuste es negativo. Esto puede representarse como una suma de la relajación del estado emisivo (S_1, v_0) y la relajación de estados vibroelectrónicos calientes o superiores de ($S_1, v>0$) ver Figura 14.

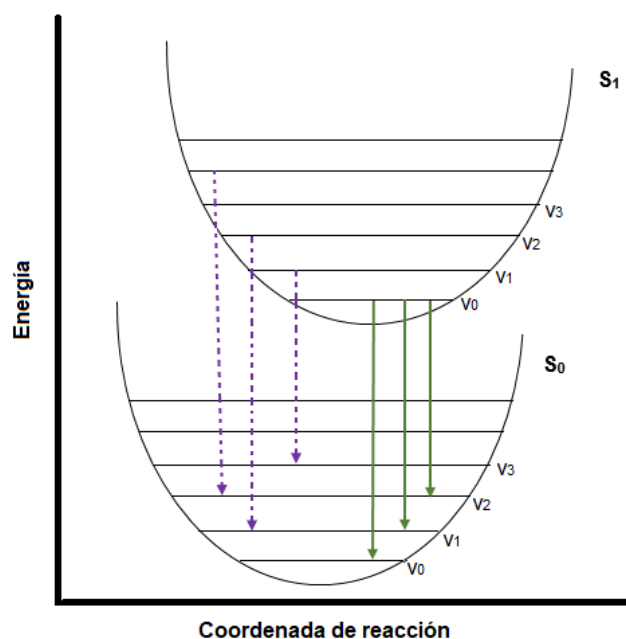


Figura 14. Diagrama ilustrativo de los caminos de relajación del estado S_0 al S_1 . Las flechas verdes son la desactivación por emisión de fluorescencia, las flechas moradas representan la desactivación de los estados vibroelectrónicos calientes, es decir, los estados que no alcanzaron a relajarse al estado $S_0 v_0$.

Adicionalmente, los decaimientos de fluorescencia de la NBz de la Fig. 15 se tomaron excitando a 380 nm. Estos resultados tienen un ajuste biexponencial, igual al experimento anterior; se obtuvieron los decaimientos largos y cortos para tres longitudes de onda de emisión: 440 nm, 500 nm y 600 nm.

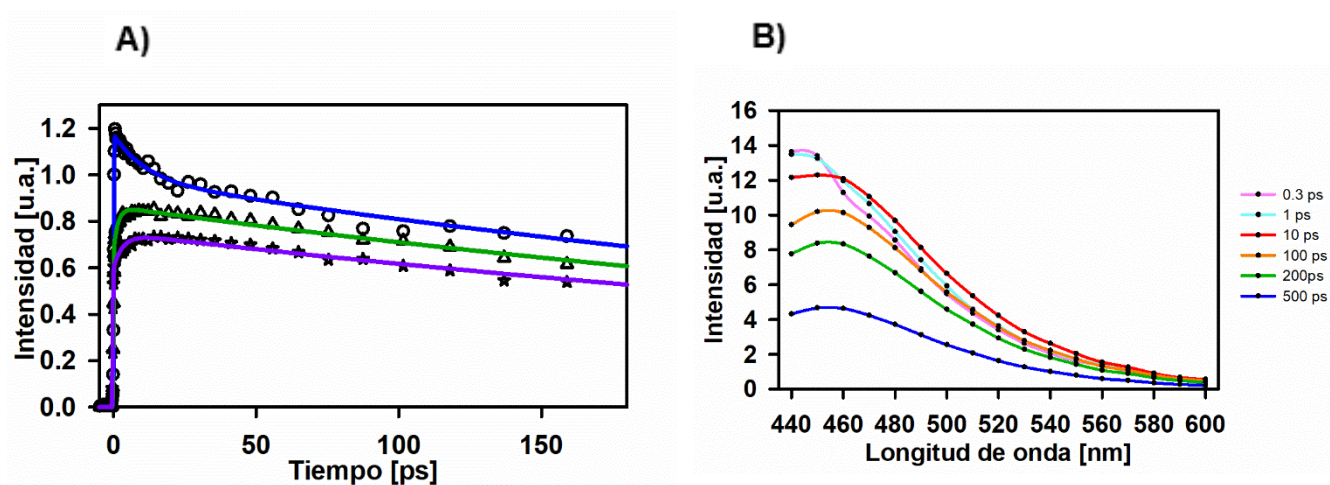


Figura 15. Experimentos de decaimiento de fluorescencia por suma de frecuencias para NBz en MeOH y diagrama de la evolución espectral de emisión resuelta en el tiempo (TRES) de NBz. A) La longitud de onda con la cual se excitó la muestra fue de 380 nm. La emisión se detectó a 440 (azul), 500 (verde) y 600 nm (púrpura), B) la longitud de onda con la cual se excitó la muestra fue de 380 nm.

El tiempo de vida corto se atribuye a la relajación vibracional del disolvente y el tiempo largo es el tiempo de vida de fluorescencia de la molécula. Además, podemos ver que los decaimientos con emisión a 500 nm y 600 nm tienen también una acumulación de estados emisivos y vibrelectrónicos, por lo que el término preexponencial en el ajuste es negativo.

Excitando NBz con 266 nm se puede acceder a un nivel superior al S_1 , donde la conversión interna y la relajación vibracional permiten que la molécula se relaje para

llegar al estado emisor, sin embargo, excitado las moléculas con 380 nm la excitación al estado emisor es directa.

Se realizó un ajuste global con los datos obtenidos bajo excitación de 266 nm y 380 nm. El ajuste se describe con una ecuación biexponencial; se obtuvo un tiempo general de 510 ps, este tiempo se globalizó para cada longitud de onda.

Adicionalmente se hizo un análisis de la evolución de los espectros de emisión con respecto al tiempo Figura, 13B y 15B. Se construyó a partir de la normalización de los espectros de emisión estática y emisión temporal. El área bajo la curva del componente gaussiano con respecto al tiempo explica la contribución de emisión de la molécula.

El factor de normalización se calculó con la siguiente ecuación:

$$H(\lambda) = \frac{F(\lambda)}{\sum_i \alpha_i(\lambda) \tau_i(\lambda)}$$

Donde

$H(\lambda)$ es el factor de normalización, $F(\lambda)$ es la intensidad del espectro estático, $\alpha(\lambda)$ es el término preexponencial y $\tau(\lambda)$ es el tiempo de vida.

En análisis de TRES, podemos ver los estados vibracionales a tiempos tempranos, que culminan alrededor de 100 ps, ya que esta escala de tiempo el espectro estático es igual al espectro dependiente del tiempo en ambas longitudes de onda de excitación.

4.2.1.1 Anisotropía de fluorescencia

Las Figuras 16 y 17 se muestran los decaimientos de la componente paralela y la perpendicular. La componente paralela decae ligeramente más rápido que la componente perpendicular, debido a que los fluoróforos orientados verticalmente están decayendo por dos procesos: el tiempo de decaimiento τ y la rotación fuera de la orientación vertical con el tiempo de correlación. El componente horizontal

inicialmente decae más lentamente porque se repobla por rotación del exceso de población orientada verticalmente.³

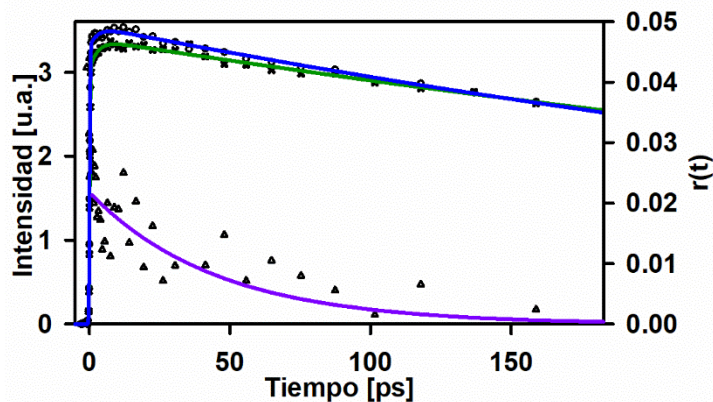


Figura 16. Anisotropía de fluorescencia excitando a 266 nm. Se muestra la tendencia de anisotropía (púrpura) correspondiente a la molécula NBz. El decaimiento con luz polarizada perpendicular (azul) y paralela (verde) con respecto al rayo fundamental.

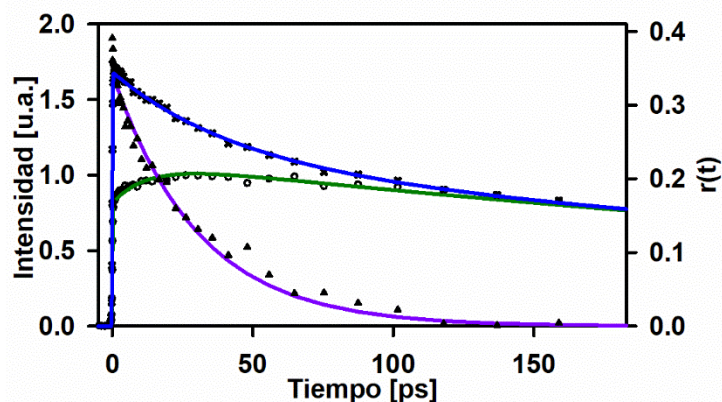


Figura 17. Anisotropía de fluorescencia excitando a 380 nm. Se muestra la tendencia de anisotropía (púrpura) correspondiente a la molécula NBz. El decaimiento con luz polarizada perpendicular (azul) y paralela (verde) con respecto al rayo fundamental.

La anisotropía de la molécula excitada a 380 nm muestra que el dipolo de transición del primer estado excitado de singlete o el estado de emisión está orientado en la misma dirección que la polarización de la luz, un valor de anisotropía de 0.4 se observa cuando los dipolos de absorción y emisión son colineales, es decir, ambos momentos dipolares forman un ángulo de 0° entre ellos, como se muestra en la Figura 18A.

Por otro lado, la anisotropía excitando a 266 nm muestra que el estado excitado y el estado emisor no son el mismo debido a que la anisotropía a tiempo cero de la molécula NBz es aproximadamente 0.02, también podemos observar una disminución lenta hasta 45 ps, el ángulo entre el estado emisor S_1 y el estado excitado, posiblemente S_2 es $\beta = 52.7^\circ$, es decir, el ángulo que forman el momento de absorción y el momento de emisión, ver Figura 18B.

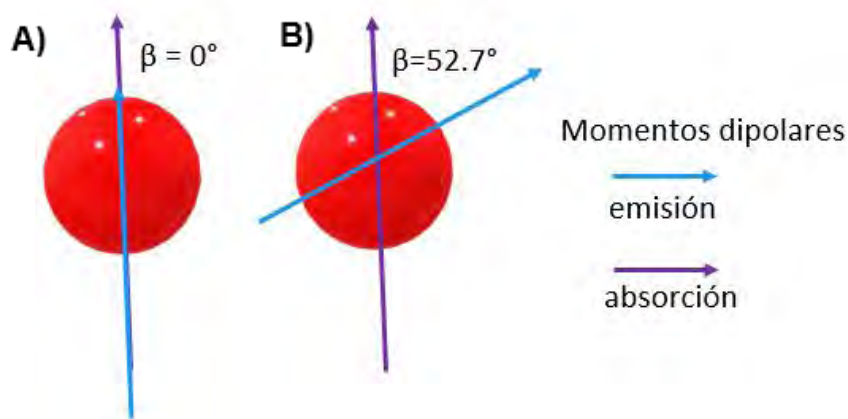


Figura 18. Representación de los momentos dipolares de NBz. En el inciso A se observa la colinealidad de los momentos dipolares de emisión y absorción. En el inciso B se observa un ángulo de 52.7° entre estos momentos dipolares.

Asimismo, a 380 nm la anisotropía es de 0.4 y decae lentamente a 30 ps, el ángulo entre el estado emisor y el estado excitado es 0° porque el estado S_1 es el estado que es excitado y el que emite. El proceso de difusión rotacional ocurre en la escala de aproximadamente 37 ps.

4.2.2 NBzOX y nicotinamida

Los resultados de suma de frecuencias para nicotinamida y NBzOx en metanol se muestran en las Figuras 19 y 20. Se detectaron dos longitudes de onda, se ajustaron a una función monoexponencial.

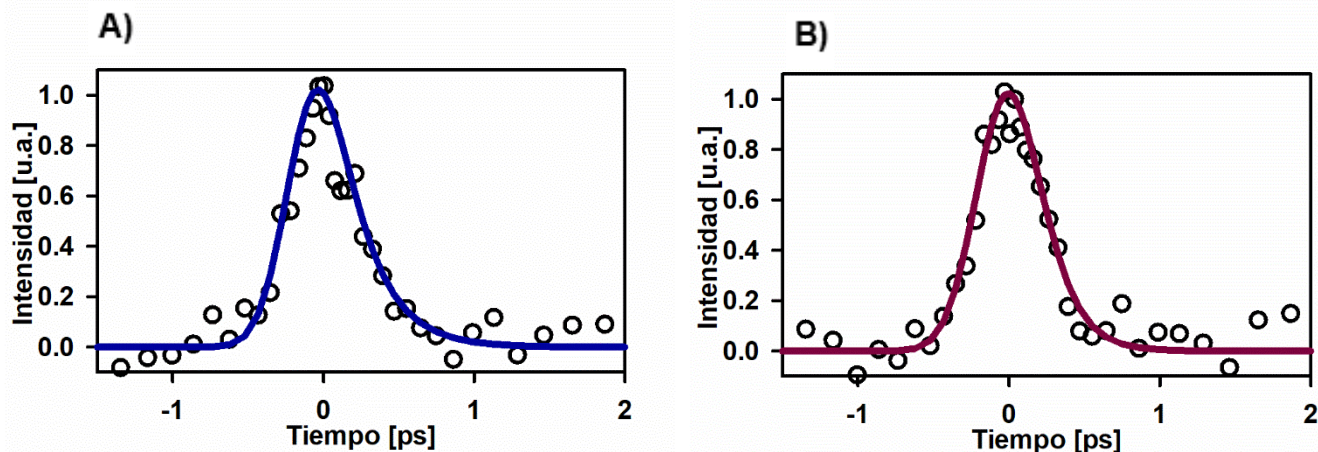


Figura 19. Experimentos de decaimiento de fluorescencia por suma de frecuencias para NBzOx en MeOH. La longitud de onda con la cual se excitó la muestra fue de 266 nm y la emisión fue monitoreada a 330 nm (A) y 340 nm (B).

En ambos casos, los tiempos de vida se encuentran en una escala de temporal de femtosegundos (véase la Tabla 2). Al ser un fenómeno no radiativo, el que se favorece cinéticamente, podemos asumir que este tipo de desactivación es un proceso que involucra una ICO entre el estado emisor y estado basal.

Sin embargo, al ser un proceso mucho más rápido que el fenómeno de conversión interna *per se*, podemos asumir que las moléculas mediante torsiones en su estructura permiten explorar los gradientes de energía potencial hasta llegar a un punto en donde los estados electrónicos isoenergéticos permiten una transición ultrarrápida, una intersección cónica.

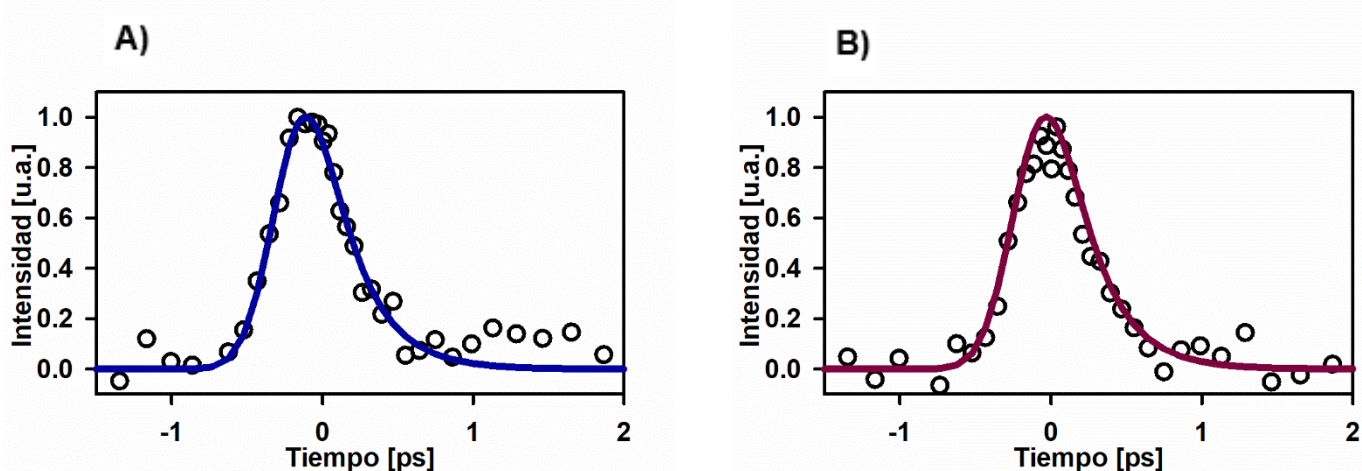


Figura 19. Experimentos de decaimiento de fluorescencia por suma de frecuencias para nicotinamida en MeOH. La longitud de onda con la cual se excitó la muestra fue de 266 nm y la emisión fue monitoreada a 330 nm (a) y 340 nm (b).

	Nicotinamida	NBzOx
λ_{emi}	τ [fs]	τ [fs]
330	250 ± 40	230 ± 40
340	250 ± 70	160 ± 60

Tabla 2. Tiempos de vida media de fluorescencia (τ) de NBzOx y nicotinamida en MeOH

Usando la evidencia experimental y con respecto a los argumentos antes mencionados se puede asumir que el fenómeno por el cual se desactivan NBzOx y nicotinamida es mediante una ICO, adicionalmente, existen estudios teóricos (José Jara, 2018) que demuestran que la desactivación de las moléculas en estado reducido puede ser mediante un estado $\pi\pi^*$ al S_0 .

5. CONCLUSIÓN

En este trabajo se estudió la dinámica de relajación de los EEE de tres moléculas. Se trabajó con nicotinamida y dos moléculas análogas a ésta, NBzOx y NBz.

Los resultados analizados en este trabajo permiten aseverar lo siguiente:

- Mediante las técnicas de espectroscopía estática y suma de frecuencias se vislumbró que la molécula NBz presenta fluorescencia, por lo que la desactivación de ésta es radiativa. Este tipo de desactivación se observó excitando a 266 nm o 380nm.
- Los resultados de anisotropía de fluorescencia permiten conocer la relajación que tiene la molécula entre sus estados electrónicos y su entorno, en el caso de NBz los estados electrónicamente excitados a los que se logró ingresar son S_2 , excitando con 266 nm y S_1 excitando con 380 nm.
- Las moléculas NBzOx y nicotinamida se desactivan de forma no radiativa. Al comparar la espectroscopía temporal y estática concluimos que la relajación entre el estado emisor y el basal ocurre por conversión interna mediada por una intersección cónica, este proceso ocurre en escalas menores a 300 fs.

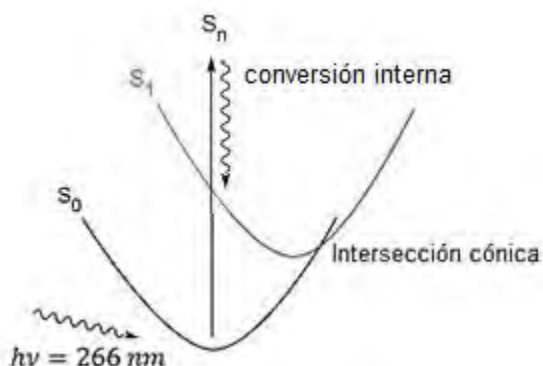


Figura 20. Diagrama que señala la diferencia entre conversión interna y conversión interna mediada por una intersección cónica.

- La intersección cónica es un tipo de conversión interna que media la energía de una molécula electrónicamente excitada y permite la desactivación de ésta en un tiempo casi instantáneo. En esta tesis se probó la presencia de este proceso en moléculas de tipo piridina. En la Figura 20 se esquematiza un diagrama que representa una ICO situación observable en la molécula NBzOx y nicotinamida. Ambas moléculas se excitaron con 266 nm y su evolución en la superficie de energía potencial permite llegar a un mínimo local donde las superficies se intersectan y permite acceder al estado electronicamente basal.

6. REFERENCIAS

- (1) Nelson, L. D.; Cox, M. M. *Lehninger: Principios de Bioquímica*; Omega.; New York, USA. **2009**.
- (2) Chance, B.; Cohen, P.; Jobsis, F.; Schoen, B. Intracellular Oxidation Reduction States in Vivo. *Science*. **1962**, *137*, 499–508.
- (3) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, third.; Springer: New York, USA. **2006**.
- (4) Klessinger, M.; Michl, J. *Excited States and Photochemistry of Organic Molecules*; Wiley-VCH, New York, USA. **1995**.
- (5) Chachisvilis, M.; Zewail, A. H. Femtosecond Dynamics of Pyridine in the Condensed Phase: Valence Isomerization by Conical Intersections. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 7408–7418.
- (6) Sellner, B.; Barbatti, M.; Lischka, H. Dynamics Starting at a Conical Intersection: Application to the Photochemistry of Pyrrole. *J. Chem. Phys.* **2009**, *131*.
- (7) Esboui, M.; Jaidane, N. Non-Radiative Deactivation in Phenol–pyridine Complex: Theoretical Study. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, *14*, 1127–1137.
- (8) Sobolewski, A. L.; Woywod, C.; Domcke, W. Ab Initio Investigation of Potential-Energy Surfaces Involved in the Photophysics of Benzene and Pyrazine. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5627–5641.
- (9) Zhang, F.; Ai, Y. J.; Luo, Y.; Fang, W. H. Nonradiative Decay of the Lowest Excited Singlet State of 2-Aminopyridine Is Considerably Faster than the Radiative Decay. *J. Chem. Phys.* **2009**, *130*, 1–5.
- (10) Xu, P.; Sauve, A. A. Vitamin B3, the Nicotinamide Adenine Dinucleotides and Aging. *Mech. Ageing Dev.* **2010**, *131*, 287–298.

- (11) Hoane, M. R.; Gilbert, D. R.; Holland, M. A.; Pierce, J. L. Nicotinamide Reduces Acute Cortical Neuronal Death and Edema in the Traumatically Injured Brain. *Neurosci. Lett.* **2006**, *408*, 35–39.
- (12) Kang, H. T.; Lee, H. II; Hwang, E. S. Nicotinamide Extends Replicative Lifespan of Human Cells. *Aging Cell* **2006**, *5*, 423–436.
- (13) Yiasemides, E.; Sivapirabu, G.; Halliday, G. M.; Park, J.; Damian, D. L. Oral Nicotinamide Protects against Ultraviolet Radiation-Induced Immunosuppression in Humans. *Carcinogenesis* **2009**, *30*, 101–105.
- (14) Balzani, V.; Ceroni, P.; Juris, A. *Photochemistry and Photophysics*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2014**.
- (15) Wardle, B. *Principles and Applications of Photochemistry*; Wiley, Manchester, UK. **2009**.
- (16) Ball, D. W. *The Basics of Spectroscopy*; SPIE PRESS: Washington, USA **1962**.
- (17) Domcke, W.; Yarkony, D.; Köppel, H. *Conical Intersections: Electronic Structure, Dynamics & Spectroscopy*; World Scientific: London, UK. **2004**.
- (18) Valeur, B. *Molecular Fluorescence Principles and Applications*; Second.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany. **2012**.
- (19) Guarín, C. A. Estudio Espectroscópico de La Fotodinámica de Estados Excitados Superiores de Compuestos Polimetánicos, Universidad Nacional Autónoma de México, **2015**.
- (20) Haas, Y.; Zilberg, S. Photochemistry by Conical Intersections: A Practical Guide for Experimentalists. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2001**, *144*, 221–228.
- (21) Villabona Mosalve, J. P. Estados Excitados de Compuestos Purínicos: Un Modelo En La Fotofísica Del ADN, Universidad Nacional Autónoma de México, **2013**.

- (22) Paterson, M. J.; Bearpark, M. J.; Robb, M. A.; Blancafort, L.; Worth, G. A. Conical Intersections: A Perspective on the Computation of Spectroscopic Jahn–Teller Parameters and the Degenerate ‘Intersection Space.’ *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*, 2100.
- (23) Requena, A.; Zúñiga, J. *Espectroscopía*; Pearson Prentice Hall: Madrid, España. **2005**.
- (24) Diels, J. C.; Rudolph, W. *Ultrashort Laser Pulse Phenomena*; Wiley-VCH; Weinheim, UK. **2006**.
- (25) Paul, C. E.; Gargiulo, S.; Opperman, D. J.; Lavandera, I.; Gotor-Fernández, V.; Gotor, V.; Taglieber, A.; Arends, I. W. C. E.; Hollmann, F. Mimicking Nature: Synthetic Nicotinamide Cofactors for C=C Bio-reduction Using Enoate Reductases. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 180–183.
- (26) Jiao, X.; Peterson, E. M.; Harris, J. M.; Blair, S. UV Fluorescence Lifetime Modification by Aluminum Nanoapertures. *ACS Photonics* **2014**, *1*, 1270–1277.
- (27) Van den Berg, P. A. W.; Widengren, J.; Hink, M. A.; Rigler, R.; Visser, A. J. W. G. Fluorescence Correlation Spectroscopy of Flavins and Flavoenzymes: Photochemical and Photophysical Aspects. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2001**, *57*, 2135–2144.
- (28) Illingworth, J. a; Tipton, K. F. Purification and Properties of the Nicotinamide-Adenine Dinucleotide Phosphate-Dependent Isocitrate Dehydrogenase from Pig Liver Cytoplasm. *Biochem. J.* **1970**, *118*, 253–258.
- (29) Kalyanasundaram, K.; Colassis, T.; Humphry-Baker, R.; Grätzel, M.; Savarino, P.; Barni, E.; Pelizzetti, E. Luminescence, Charge-Transfer Complexes, and Photoredox Processes Involving N-Alkylnicotinamide/Dihydronicotinamide Surfactants. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3300–3311.
- (30) Onidas, D.; Markovitsi, D.; Marguet, S.; Sharonov, A.; Gustavsson, T.

Fluorescence Properties of DNA Nucleosides and Nucleotides: A Refined Steady-State and Femtosecond Investigation. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 11367–11374.

- (31) Hassan, W. M. I.; Chung, W. C.; Shimakura, N.; Koseki, S.; Kono, H.; Fujimura, Y. Ultrafast Radiationless Transition Pathways through Conical Intersections in Photo-Excited 9H-Adenine. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 5317–5328.

Apéndice

A continuación, se presenta el espectro de RMN de NBzOx, que fue tomado con un equipo 700 MHz. Se enumera los picos correspondientes a cada protón.

