



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**ESTADOS EXCITADOS DE COMPUESTOS PURÍNICOS: UN MODELO EN LA FOTOFÍSICA
DEL ADN**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. C. JUAN PABLO VILLABONA MONSALVE

DIRECTOR DE TESIS:
Dr. JORGE PEÓN PERALTA
INSTITUTO DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F. MARZO 2013



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.

Dedico este trabajo a mi familia Villabona Monsalve y a mi esposa Diana Patricia.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias Químicas, siempre estaré orgulloso de pertenecer a esta casa de estudios y a este Posgrado.

Al CONACyT por la beca otorgada para el desarrollo de mis estudios de doctorado y la beca mixta para la realización de una estancia doctoral. #Becario: 211346.

Al Instituto de Química de la UNAM lugar donde se desarrollo este trabajo de investigación.

Quiero agradecer a todas las personas que han contribuido de una u otra forma a la realización de este trabajo, muy especialmente:

Al Dr. Jorge Peón Peralta por permitirme formarme como científico y la esmerada labor que hizo día a día compartiendo su conocimiento y experiencia, así como por permitirme formar parte de su grupo de investigación. Así mismo, a los miembros del comité tutelar: Dr. Miguel Antonio Costas Basín y Dr. Carlos Amador Bedolla.

A mis compañeros y ex-compañeros del Grupo de Espectroscopia Láser del Instituto de Química de la UNAM, gracias por compartir conmigo muchas horas del día durante varios años de sus vidas.

A la Dra. Spiridoula Matsika por la estancia realizada en su grupo de investigación (en *Chemistry Department of Temple University*) para entender la utilización de variadas metodologías de Química Cuántica Computacional.

A los miembros del jurado por sus valiosos aportes en la realización de esta tesis.

A todos mis amigos en México con quienes he compartido muy buenas experiencias académicas y del diario vivir.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Espectroscopia Láser del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Las publicaciones científicas derivadas de este trabajo doctoral son:

“On the accessibility to conical intersections in purines: hypoxanthine and its singly protonated and deprotonated forms” J.P. Villabona-Monsalve, R. Noria, S. Matsika and J. Peón. *Journal of the American Chemical Society*, *134*, 7820 - 7829, 2012.

“Ultrafast Excited State Dynamics of Allopurinol, a Modified DNA Base” Juan P. Villabona-Monsalve, Rosa E. Islas, William Rodríguez-Córdoba, Spiridoula Matsika and Jorge Peón. *The Journal of Physical Chemistry A*. *117*, 898 - 904, 2013.

“Ultrafast Excited State Dynamics of The Guanine Analogous Hypoxanthine: An *Ab-Initio* Study. *Juan. P Villabona-Monsalve, Spiridoula Matsika and Jorge Peón*. En desarrollo.

Presentaciones Orales:

“On the Accessibility to Conical Intersection in Hypoxanthine” 7th Meeting on Photodynamics and Related Aspects - Maresias, Brasil. Octubre de 2012.

“Estados Excitados de Compuestos Purínicos, Un Modelo en la Fotofísica del ADN” QUIMIUNAM, Universidad Nacional Autónoma de México, México. Noviembre de 2012.

“Fotofísica de Bases Purínicas del ADN Modificadas” Simposio Interno del Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México. Diciembre de 2012

RESUMEN

El proceso de conversión interna ultrarrápido ($\tau < 1$ ps) entre los estados electrónicos excitados de baja energía y el estado basal en las bases purínicas es de vital importancia para la fotoestabilidad de las cadenas de ADN y ARN. El estudio de la desactivación de los estados excitados de sistemas análogos a dichas bases nos permite entender de forma más detallada el mecanismo de conversión interna ultrarrápida en las bases naturales y como éste es modulado por parámetros estructurales y electrónicos.

En este trabajo, se estudió la dinámica de desactivación de los estados electrónicos excitados de algunos análogos de la base purínica guanina: hipoxantina, inosina y alopurinol ribósido, usando la técnica de resolución de fluorescencia por suma de frecuencias. Nuestro objetivo fue explorar variantes de bases purínicas del ADN a fin de determinar los parámetros moleculares que incrementan o reducen la accesibilidad a intersecciones cónicas entre los estados electrónicos excitados de baja energía y el estado basal.

A partir de los experimentos en agua y metanol hemos concluido que los tautómeros predominantes de hipoxantina neutra tienen un tiempo de vida del estado excitado ultracorto ($\tau < 0.2$ ps) que es casi un orden de magnitud más corto que el reportado para la guanina (relacionada con hipoxantina). Esto sugiere que la intersección cónica entre el estado electrónico excitado S_1 y el estado basal es más accesible en hipoxantina donde se carece del grupo amino como sustituyente en C2 en comparación con guanina.

También se estudió la dinámica de desactivación del estado emisor S_1 de la especie monoprotonada de hipoxantina. El decaimiento del estado excitado de este sistema mostró

un comportamiento biexponencial con una componente temporal de 1.1 ps (5 %) adicional a la componente temporal ultrarrápida (< 0.2 ps). Este tipo de decaimiento del estado S_1 también se observa para la especie monoprotonada de inosina que presenta un patrón de sustitución similar al de la correspondiente especie monoprotonada de hipoxantina.

Por otra parte, los tiempos de vida del estado excitado S_1 de las especies monodesprotonadas de hipoxantina e inosina son drásticamente diferentes; la especie monodesprotonada de inosina al igual que la especie neutra presenta un decaimiento ultrarrápido ($\tau < 0.2$ ps). Por el contrario, la especie monodesprotonada de hipoxantina muestra un tiempo de vida del estado emisivo mucho más largo ($\tau = 19$ ps). Esta diferencia en los tiempos de vida del estado fluorescente está relacionada con el hecho que los sitios de desprotonación son diferentes para los dos compuestos, lo cual da origen a sistemas con distribuciones electrónicas diferentes aun cuando en los dos casos se trata de moléculas monodesprotonadas.

El alopurinol ribósido en solución acuosa presentó un decaimiento ultrarrápido ($\tau < 0.2$ ps) del estado emisivo S_1 tal como se observó para las especies neutras de hipoxantina e inosina (con un anillo de cinco miembros tipo pirazol). Este resultado muestra que la dinámica de desactivación ultrarrápida del estado S_1 es característica de este tipo de sistemas heterocíclicos. La coordenada dominante de relajación del estado excitado es la pérdida de planicidad en el anillo de seis miembros (pirimidina) con una participación prácticamente nula del anillo de cinco miembros.

En este trabajo, también se hizo uso del método multi-referenciado MR-MP2 con el fin de conocer la naturaleza de los estados electrónicos excitados ópticamente accesibles en nuestros experimentos y tener certeza del carácter y el orden en el conjunto de estados

electrónicos excitados singulete de baja energía, correspondientes para la geometría del estado basal.

Adicionalmente, utilizando el método multi-referenciado MR-CIS se localizaron las intersecciones cónicas entre el estado excitado S_1 y el estado basal (S_0) para los sistemas hipoxantina neutra (tautómeros ceto-N9-H y ceto-N7-H), hipoxantina desprotonada y alopurinol ceto-N1-H. En todos los casos las geometrías correspondientes a las intersecciones cónicas S_1 - S_0 se caracterizan por tener un anillo de seis miembros altamente distorsionado de la planicidad (principalmente los átomos C2 y N3 fuera del plano).

Finalmente, la importancia de este tipo de estudios en sistemas purínicos más simples que las bases purínicas del ADN radica en mostrar y analizar la medida en que cambios estructurales simples, como por ejemplo la sustitución por un grupo amino, o la protonación y desprotonación modifican la accesibilidad a las intersecciones cónicas S_1 - S_0 y por tanto rigen la fotofísica de este tipo de sistemas heterocíclicos.

ABSTRACT

Ultrafast internal conversion ($\tau < 1$ ps) between the low-lying excited states and the ground state of the purinic DNA bases is ubiquitous for the DNA and RNA photostability. The studies on the excited state dynamics of DNA bases analogous systems shed lights on the mechanistic details of the internal conversion process on natural DNA bases and how it is modulated by structural and electronic parameters.

Excited state dynamics following UV excitation of hypoxanthine, inosine and allopurinol riboside were studied through femtosecond fluorescence up-conversion. Our objective was to explore variants of the purinic DNA bases in order to determine the molecular parameters that increase or reduce the accessibility to conical intersections between the first singlet excited state and the ground state.

From experiments in water and methanol solution we conclude that the two predominant neutral tautomers of hypoxanthine exhibit ultrashort excited state lifetimes ($\tau < 0.2$ ps), which are about an order of magnitude shorter than in the related nucleobase guanine. This points to a more accessible S_1 - S_0 conical intersection for the fluorescent state upon removal of the amino group of guanine.

The excited state dynamics of single protonated hypoxanthine was also studied, showing biexponential decays with a 1.1 ps component (5 %) besides a sub-0.2 ps ultrafast component. Similarly, protonated inosine showed a biexponential S_1 excited state decay as well. The resemblance in the excited state decays is concordant with the fact that the conjugated acids of inosine and hypoxanthine have the same substitution pattern.

On the other hand, the S_1 lifetimes of the singly deprotonated forms of hypoxanthine and inosine are very different: the latter remains ultrafast ($\tau < 0.2$ ps) whereas the former shows a much longer lifetime of 19 ps. This significant variation is related to the different deprotonation sites in hypoxanthine and inosine, which produces significantly different resonance structures.

Allopurinol riboside showed an ultrafast S_1 excited state decay ($\tau < 0.2$ ps) in aqueous solution. This result suggests that the ultrafast S_1 deactivation is characteristic for this kind of heterocyclic systems. Besides, the most important S_1 relaxation coordinate is the loss of planarity at the six membered ring without participation of the five membered ring (pirazole for allopurinol and imidazole for hypoxanthine and inosine).

Additionally, our study also includes multi-reference perturbation theory (MR-MP2) excited state calculations in order to determine the nature of the initial electronic excitation in our experiments and clarify the ordering of the states in the singlet manifold at the ground state geometry.

Furthermore, we performed multi-reference configuration interaction calculations (MR-CIS) that identify the presence of low-lying conical intersections for both prominent neutral tautomers of hypoxanthine, deprotonated hypoxanthine and allopurinol keto-N1-H. In all cases, the surface crossings occur at geometries reached by out of plane opposite motions of C2 and N3.

Finally, it is worth mentioning that the study of these simple models of guanine and adenine gives several insights into how small structural modifications, like amino substitution and protonation state and prototropism, determine the accessibility to conical intersections in this kind of heterocycles.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT	v
INTRODUCCIÓN	1
Referencias	10
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS	17
General	17
Específicos	17
CAPÍTULO 1: FUNDAMENTOS TEÓRICOS	19
1.1 Absorción de luz y procesos de relajación, diagrama de Jablonski	20
1.2 Rendimiento cuántico de fluorescencia y tiempo de vida del estado excitado	23
1.3 Resolución temporal de fluorescencia.....	24
1.4 Modelo cuántico del proceso de absorción y conversión interna.....	26
1.5 Métodos computacionales	31
1.5.1 Método multi-configuracional autoconsistente	33
1.5.2 Métodos multi-referenciados.....	34
Método “ <i>multi-reference configuration interaction</i> ” MR-CI.....	35
1.6 Eventos no adiabáticos e intersecciones cónicas.....	37
1.6.1 Aproximación de Born-Oppenheimer y acoplamientos no adiabáticos	38
1.6.2 Intersecciones cónicas	40
Localización de intersecciones cónicas.....	41
Referencias	45
CAPÍTULO 2: PARTE EXPERIMENTAL.....	49
2.1 Espectroscopia estacionaria.....	49
2.2 Diseño experimental para la realización de experimentos de resolución temporal de fluorescencia por suma de frecuencias	50
2.2.1 Sistema de generación de pulsos láser de fs.....	53
2.2.2 Generación de segundo (2ω) y tercer (3ω) armónico del pulso de salida del amplificador regenerativo.....	54
2.3 Suma de frecuencias para la resolución de la fluorescencia.....	56
2.3.1 Polarización de los pulsos de excitación y de prueba, anisotropía de la fluorescencia	61
2.4 Detección de la señal de suma de frecuencias y amplificación.....	63

2.4.1 Amplificador lock-in	64
2.5 Tratamiento matemático de las señales obtenidas en experimentos de resolución de fluorescencia por suma de frecuencias	65
2.6 Materiales	66
Referencias	68
CAPÍTULO 3: MÉTODOS COMPUTACIONALES	71
3.1 Cálculo de las energías de transición vertical en la geometría optimizada del estado basal ...	71
3.2 Optimización de geometría para el estado S_1 y cálculo de intersecciones cónicas S_1-S_0	72
Referencias	74
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
4.1 Espectroscopia estacionaria de hipoxantina y resultados computacionales para la geometría optimizada del estado basal	80
4.1.1 Espectros de absorción y energías de transición vertical	80
4.1.2 Análisis de los estados $\pi-\pi^*$ en las especies neutras, monoprotonada y monodesprotonada de hipoxantina	83
4.1.3 Espectros de emisión de fluorescencia	86
4.2 Espectroscopia estacionaria de inosina (INS)	87
4.3 Decaimiento de los estados excitados de hipoxantina e inosina neutra	88
4.3.1 Fotofísica de las especies neutras de hipoxantina e inosina	89
4.3.2 Cálculo de las intersecciones cónicas para los tautómeros neutros de hipoxantina	94
4.3.3 Comparación de la fotofísica de hipoxantina y guanina	101
4.4 Decaimiento de los estados excitados de hipoxantina e inosina monoprotonadas	104
4.5 Decaimiento de los estados excitados de hipoxantina e inosina monodesprotonadas	107
4.5.1 Cálculo de la intersección cónica en hipoxantina desprotonada	111
4.5.2 Accesibilidad a la intersección cónica S_1-S_0 desde la región de Franck-Condon del estado excitado S_1 ($\pi-\pi^*$) en HPX^-	114
4.6 Espectroscopia estacionaria de alopurinol ribósido y resultados computacionales para la geometría optimizada del estado basal	115
4.7. Decaimiento de los estados excitados de alopurinol ribósido	118
4.7.1 Cálculo de la intersección cónica en alopurinol ceto-N1-H	120
Referencias	123
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	129
Referencias	132
APÉNDICE 1. ASPECTOS GENERALES DE LA RADIACIÓN LÁSER	133
Absorción, emisión espontánea y emisión estimulada	133

Amplificación de la luz por emisión estimulada	135
Inversión de la población	136
Bombeo óptico	137
Amplificación de la luz	138
Referencias	139
APÉNDICE 2. SISTEMAS LÁSER USADOS EN ESTE TRABAJO	141
Oscilador de Titanio:zafiro.....	141
Dispersión temporal de pulsos ultracortos	144
Amplificador regenerativo de pulsos dispersos (“ <i>chirped pulse amplifier</i> ”)	149
Expansor de pulsos ultracortos.....	150
Amplificador regenerativo	151
Compresor de pulsos	155
Referencias	156

ANEXOS

Artículos científicos publicados:

“On the accessibility to conical intersections in purines: hypoxanthine and its singly protonated and deprotonated forms” J.P. Villabona-Monsalve, R. Noria, S. Matsika and J. Peón. *Journal of the American Chemical Society*, *134*, 7820 - 7829, 2012.

“Ultrafast Excited State Dynamics of Allopurinol, a Modified DNA Base” Juan P. Villabona-Monsalve, Rosa E. Islas, William Rodríguez-Córdoba, Spiridoula Matsika and Jorge Peón. *The Journal of Physical Chemistry A*. *117*, 898 - 904, 2013.

LISTA DE ACRÓNIMOS

AL-R	Alopurinol Ribósido
CASPT2	<i>Complete Active Space Perturbation Theory Level Two</i>
CASSCF	<i>Complete Active Space Self Consistent Field</i>
CI	Conversión Interna
CIS	<i>Configuration Interaction with Single Excitations</i>
CISD	<i>Configuration Interaction with Single and Double Excitations</i>
CSF	<i>Configuration State Function</i>
FCE	Función de Configuración de Estado
FCI	<i>Full Configuration Interaction</i>
FWHM	<i>Full Width at Half Maximum</i>
GDD	<i>Group Delay Dispersion</i>
GDIIS	<i>Geometry Optimization by the Direct Inversión of the Iterative Subspace</i>
GVD	<i>Group Velocity Dispersion</i>
HF	Hartree-Fock
HPX	Hipoxantina
IC	Intersección Cónica
ICC	Interacción de Configuraciones
INS	Inosina
MCSCF	<i>Multi-Configurational Self Consistent Field</i>
MP2	<i>Second Order Møller-Plesset Perturbation Theory</i>
MR	Multi-referenciado
MR-CI	<i>Multi-Reference Configuration Interaction</i>
OM	Orbital Molecular
SA-CASSCF	<i>State Average Complete Active Self Consistent Field</i>
SR	<i>Single Reference</i>
TD-DFT	<i>Time Dependent Density Functional Theory</i>
SEP	Superficie de Energía Potencial
UV	Ultravioleta

INTRODUCCIÓN

La dinámica de los estados electrónicos excitados de un sistema particular determina el destino final de una molécula luego de ser excitada. A su vez tal dinámica depende de la organización de los estados electrónicos (energías, acoplamientos, multiplicidad, etc.). Una vez que una molécula absorbe radiación los procesos subsecuentes son tan variados, que no es posible predecir completamente el comportamiento del sistema luego de ser excitado conociendo solamente su estructura química.

En este trabajo estudiamos experimental y teóricamente los mecanismos por los cuales sistemas análogos a las bases purínicas del ADN disipan rápidamente la energía luego de ser excitados con radiación ultravioleta (UV). También se estudió cómo estos mecanismos dependen directamente de la estructura química y electrónica. Nuestro interés se centró en el estudio del proceso de conversión interna (CI), el cual se da por el cruce entre superficies de energía potencial del primer estado singulete excitado (S_1) y el estado basal (S_0). Estos cruces se conocen como intersecciones cónicas (ICs) y corresponden a arreglos moleculares donde dos o más estados electrónicos son degenerados en energía.

Precisamente la alta eficiencia del proceso de conversión interna entre los estados excitados singulete de baja energía y el estado basal es lo que le confiere las principales características fotofísicas a las bases del ADN: un bajo rendimiento cuántico de fluorescencia ($\sim 10^{-4}$) y tiempos de decaimiento ultracortos (< 1 ps) de los estados excitados singulete de baja energía.¹⁻⁴

Algunos trabajos sugieren que estas características fotofísicas particulares debieron ser adquiridas por compuestos antecesores a las bases del ADN a fin de proveer a éstos la fotoestabilidad necesaria para cumplir con su función de almacenamiento de la información genética. Lo anterior dado que estos sistemas debieron operar bajo condiciones adversas severas, como lo habría sido la ausencia de la capa de ozono y una alta concentración de radiación UV en las primeras etapas de surgimiento de la vida en la Tierra.^{3,5-7}

Es importante señalar que el espectro de absorción de las bases del ADN está centrado alrededor de los 260 nm y las contribuciones mayoritarias al espectro de absorción de una cadena de ADN se dan por la excitación de los monómeros que la conforman. Sin embargo, como se ha señalado, aun cuando la radiación UV es absorbida eficientemente por las bases del ADN el mecanismo no radiativo para disipar esta energía es muy eficiente y el daño fotoquímico no es drástico.⁸

Por otra parte, el estudio experimental de la dinámica de desactivación de los estados electrónicos excitados de las bases del ADN y sistemas similares (como los del presente trabajo) ofrece modelos adecuados para probar las metodologías diseñadas para el estudio de la evolución ultrarrápida de estados electrónicos excitados en sistemas moleculares.

El decaimiento de los estados excitados observado en las bases del ADN ocurre en una escala de tiempo menor a los picosegundos (ps), lo cual se debe a la existencia de ICs entre las superficies de energía potencial de los estados excitados de baja energía y el estado basal.⁹ La existencia de ICs como mediadores de reacciones fotoquímicas ultrarrápidas incluídas varias de relevancia biológica (p. ej. la fotoisomerización del retinal¹⁰) es un hecho bien establecido y documentado desde hace casi dos décadas.¹¹

El decaimiento ultrarrápido de las bases del ADN se ha estudiado experimentalmente usando técnicas espectroscópicas con resolución temporal de decenas de femtosegundos (fs) así como métodos *ab-initio* de química cuántica de alto nivel, p. ej., métodos multi-configuracionales. Este tipo de estudios teóricos y experimentales han contribuido para obtener información cada vez más detallada acerca de la relación entre la estructura molecular y la dinámica de desactivación de los estados excitados en los monómeros del ADN.

El entendimiento de la dinámica de los estados excitados del ADN es muy importante dado su papel biológico. En este sentido, el estudio de cromóforos que tienen estructuras similares a las bases nitrogenadas del ADN pero con modificaciones sutiles es bastante útil. El comportamiento fotofísico de este tipo de moléculas nos da información acerca de los arreglos a nivel molecular responsables de las propiedades fotofísicas particulares de las bases del ADN.

A partir de un estado excitado formado por la absorción de radiación UV se puede dar la formación de fotoproductos perjudiciales que a su vez pueden causar mutaciones e interferir con el procesamiento celular normal del ADN. Sin embargo se ha demostrado que la fotodestrucción es altamente inhibida por las propiedades fotofísicas intrínsecas de las bases del ADN.

Particularmente, el decaimiento ultrarrápido de los estados electrónicos excitados singulete de baja energía hacia el estado basal (S_0) por un proceso de CI es el mecanismo propuesto responsable de la alta fotoestabilidad de las bases del ADN. En esencia, la energía electrónica depositada en estos sistemas (a través de la excitación con radiación UV) es eliminada por un mecanismo de decaimiento no radiativo (CI de un S_n a S_0 , $n \geq 1$)

mucho más rápido que el tiempo requerido para que ocurra una reacción química fotoinducida.

Hemos mencionado que el proceso de CI entre el estado S_1 y S_0 es altamente eficiente en las bases del ADN. En términos de las superficies de energía potencial de los estados electrónicos involucrados esto implica la existencia de ICs altamente accesibles desde la región de Franck-Condon en el estado electrónico excitado generado inicialmente.

Los estudios teóricos de la fotofísica de las bases del ADN se enfocan en el uso de métodos *ab-initio* de alto nivel (p. ej., CASSCF/MRCI)^{3,12-15} y simulaciones de dinámica cuántica^{6-7,16-17} con el fin de calcular energías, barreras energéticas, trayectorias y coordenadas de reacción así como parámetros estructurales que caracterizan las ICs. La combinación de estudios experimentales y teóricos ha permitido entender de forma cada vez más detallada la fotofísica de sistemas purínicos.

En este trabajo hemos estudiado experimentalmente (usando la técnica de resolución temporal de fluorescencia por suma de frecuencias) y teóricamente (usando métodos multi-referenciados de estructura electrónica) los mecanismos por los cuales las moléculas hipoxantina (HPX) y alopurinol, análogas a las bases purínicas guanina y adenina (ver Figura 1) disipan rápidamente la energía luego de ser excitadas con radiación UV. También estudiamos la dependencia de los mecanismos de desactivación del estado S_1 de dichos sistemas con la estructura química y electrónica.

Específicamente, uno de los objetivos de nuestro trabajo fue evaluar el efecto del grupo amino en guanina (para dar HPX) sobre el decaimiento del estado emisor S_1 , a través de la comparación de este proceso en HPX y guanina.

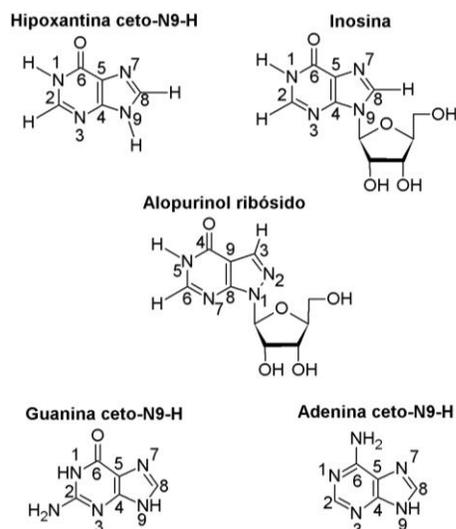


Figura 1. Estructuras de algunos de los sistemas estudiados en este trabajo (hipoxantina, inosina y alopurinol ribósido) y las bases purínicas guanina y adenina.

Por otra parte, el alopurinol tiene un anillo de cinco miembros diferente al presente en hipoxantina e inosina (ver Figura 1). Al estudiar la dinámica de desactivación de los estados excitados de baja energía de este sistema se puede evaluar el rol del anillo de cinco miembros en la fotofísica de la guanina y los sistemas análogos: HPX e inosina (INS). En otras palabras, evaluar cómo cambia el tiempo de vida del estado excitado al cambiar el anillo de cinco miembros de imidazol a pirazol.

Asimismo, hemos estudiado el ribósido de alopurinol dado que éste reduce la complejidad al tratar con mezclas de tautómeros. El alopurinol en solución acuosa se encuentra en al menos dos formas tautoméricas, conocidas como ceto-N1-H y ceto-N2-H,¹⁸⁻²⁰ y no existe una medida exacta de la población relativa de tautómeros a partir de estudios experimentales (RMN-¹³C y espectroscopia UV-Vis)^{19,21-22} Al sustituir la posición N1 por ribosa se elimina el equilibrio tautomérico en alopurinol y la especie alopurinol ribósido está presente como un solo tautómero (ver Figura 1) en solución acuosa.¹⁹

El estudio de este tipo de sistemas estructuralmente más sencillos que las bases guanina y adenina, permite hacer comparaciones a fin de establecer un conjunto mínimo de requisitos de estructura electrónica y química que permita que estas moléculas presenten un canal de decaimiento no radiativo altamente eficiente. Este último inhibe la ocurrencia de procesos fotoquímicos y al contrario favorece el retorno del sistema al estado basal luego de que éste es excitado con radiación UV.

Otro de nuestros objetivos fue evaluar cómo los tiempos de vida de los estados excitados (medidos a través del decaimiento de fluorescencia del estado S_1) de los sistemas purínicos propuestos se ven afectados por cambios menores en la estructura química y a partir de ello deducir factores que modulan la accesibilidad a ICs entre el estado S_1 y el estado basal.

Adicionalmente, también se estudió cómo el estado de protonación de los sistemas de interés afecta la dinámica de desactivación de los estados excitados de baja energía. El cambio del grado de protonación de los sistemas purínicos estudiados no solo modifica el patrón de sustitución del sistema heterocíclico sino también la descripción del sistema en términos de orbitales moleculares.

Debido a lo anterior se ha dado un interés en el estudio de las formas protonadas de algunas bases del ADN.^{1,23-25} Entre los trabajos más destacados están los estudios de la dinámica de desactivación de los estados excitados de baja energía de las especies monoprotonadas de guanina, guanosina y guanosina mono-fosfato los cuales han mostrado que al protonarse la posición N7 del sistema purínico, el tiempo de vida del estado excitado se alarga por un factor mayor a 100.^{24,26}

Esta última observación ha sido bien descrita usando la teoría del funcional de la densidad dependiente del tiempo (TDDFT por sus siglas en inglés), los cuales sugieren que

el tiempo de vida más largo para la especie protonada de guanosina se debe a un cambio en la curvatura de la superficie de energía potencial del estado excitado S_1 , que a su vez cambia la accesibilidad a la IC S_1 - S_0 en comparación con la especie neutra.²⁴ Es importante mencionar que en este trabajo no se determinaron las ICs y el método usado solo predice geometrías para las cuales los estados S_1 y S_0 tienen valores de energía cercanos.

Por otra parte, estudios en fase gas de adenina monoprotonada han demostrado que en este caso el decaimiento del estado excitado no varía drásticamente con respecto al tautómero neutro.^{25,27} Estudios computacionales de los estados excitados de este sistema muestran que la especie monoprotonada más estable, adenina⁺ cetó-N1/N9-H, presenta una IC S_1 - S_0 similar a la calculada en adenina cetó-N9-H.²⁸

En el presente trabajo hemos estudiado cómo la protonación y desprotonación modifica la dinámica de desactivación de los estados excitados de HPX e INS neutra. La protonación de HPX e INS da estructuras análogas (con sustituciones en N7 y N9). Sin embargo, la desprotonación en HPX e INS ocurre en sitios distintos, N1 para INS y N7 o N9 para HPX. Esto da origen a especies desprotonadas con distintos patrones de sustitución y cambia fuertemente la estructura electrónica así como las superficies de energía potencial.

Es importante señalar que la protonación o desprotonación del sistema purínico podría en principio alterar el orden de los estados excitados π - π^* y n - π^* , con lo cual la dinámica de desactivación de los estados excitados podría cambiar de forma drástica en comparación con la especie neutra. La desprotonación por ejemplo, podría generar estados n - π^* más bajos en energía que el estado π - π^* de más baja energía y ópticamente accesible, lo que redundaría en un tiempo de vida del estado excitado inicial más largo debido a que la

población de moléculas podría quedar atrapada en un estado $n-\pi^*$ intermedio no emisivo (“*dark state*”).

Hasta el momento, este es el primer estudio acerca de la fotofísica de especies mono-aniónicas de bases purínicas. Las especies monodesprotonadas de HPX e INS pueden ser estudiadas experimentalmente en solución acuosa gracias a que los valores de pK_a están lo suficientemente separados, haciendo posible tener una población de la especie monodesprotonada mayor o igual al 96% a un $\text{pH} \geq 1$.

A pesar de que el mecanismo de desactivación de los estados excitados singulete de baja energía para las bases del ADN, guanina, adenina, timina y citosina se entiende a un buen nivel de profundidad, dado los aportes hechos con base en la espectroscopia láser con resolución temporal y métodos *ab-initio* de química cuántica, todavía quedan detalles por resolver. Uno de éstos es encontrar características comunes entre las bases del ADN que permitan explicar la desactivación ultrarrápida de los primeros estados excitados en este conjunto de moléculas.

Una aproximación para resolver lo anterior es encontrar la similitud en la estructura electrónica (en la teoría de orbitales moleculares) que comparten estas moléculas y permite que tengan tiempos de desactivación ultrarrápidos del estado S_1 así como rendimientos cuánticos de fluorescencia muy bajos ($\sim 10^{-4}$).

Acerca de los tiempos de vida de los estados excitados de sistemas purínicos que se han determinado experimentalmente, en la Tabla 1 se resumen los resultados más relevantes para el presente trabajo. Principalmente, es importante resaltar cómo algunas modificaciones sutiles en el patrón de sustitución de sistemas purínicos puede afectar drásticamente el tiempo de vida del estado excitado S_1 ($\pi-\pi^*$). Uno de los ejemplos más

destacados de este efecto es la diferencia en el tiempo de vida del estado excitado de los sistemas adenina (6-amino purina) y 2-amino purina (ver Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de los tiempos de vida del estado excitado S_1 de distintas guaninas y adeninas sustituidas en solución acuosa.

Sistema	Tiempo de vida del estado S_1 (ps)
Guanosina	0.46^{29} $0.69^{23,30}$
Guanosina monofosfato	0.86^{23} $0.2 \text{ \& } 0.9^{24}$
Deoxi-guanosina	$0.16 \text{ \& } 0.78^4$
Deoxi-guanosina monofosfato	$0.20 \text{ \& } 0.89^4$
7-metil guanosina monofosfato ⁺	180^{31}
Guanosina ⁺ (ceto-N7-H)	196^{26}
Adenina (ceto-N9-H)	0.18^{33}
Adenina (ceto-N7-H)	8.8^{33}
2-amino purina (N9-H)	$9.3 \times 10^{-3} - 11.8 \times 10^{-3}^{34-35}$
N9-metil adenina	0.22^{33}
N7-metil adenina	4.23^{33}
N1-metil adenina	0.26^{33}
Adenina ⁺ (N1-metil, N9-H)	0.23^{32}
Adenina ⁺ (N1-H, N9-H)	0.18^{32}

Los datos mostrados en la Tabla 1 ejemplifican cómo distintas modificaciones en las bases purínicas cambian los tiempos de vida del estado excitado en diferente medida, como ya se discutió. Por lo anterior, una de las motivaciones de este trabajo fue determinar cómo se afecta la eficiencia del proceso no radiativo en un grupo de purinas modificadas (HPX y alopurinol) con respecto a los sistemas purínicos guanina y adenina que han sido ampliamente estudiados.

Varias modificaciones estructurales en sistemas purínicos han mostrado afectar la dinámica de desactivación de los estados excitados de baja energía incluyendo algunas que se podrían considerar mínimas en la estructura química, p. ej.: protonación, desprotonación y el patrón de sustitución de grupos metilo, amino y carbonilo.^{23-24,27,33,36-38}

Otro tópico interesante que hemos abordado es acerca del tipo de moléculas que podrían haber sido suficientemente fotoestables (resistentes a la destrucción por procesos fotoquímicos) para prevalecer en condiciones ambientales poco favorables como eran una alta intensidad de radiación UV debido a la ausencia de la capa de ozono en las primeras etapas de formación de vida en la Tierra, ésto se logra evaluando la fotofísica de bases del ADN modificadas y otros compuestos estructuralmente similares.^{30,33,36-37,39-41}

Esta tesis se organiza de la siguiente manera: en el capítulo 1 se presentan los fundamentos teóricos de los procesos fotofísicos en sistemas moleculares, haciendo especial atención al proceso de conversión interna. Asimismo, se exponen conceptos importantes de los métodos de estructura electrónica usados en este trabajo. En el capítulo 2 se describen los métodos experimentales que hemos empleado. Las metodologías teórico-computacionales utilizadas para el estudio de la fotofísica de los sistemas propuestos se presentan en el capítulo 3. En el capítulo 4 se muestran todos los resultados obtenidos tanto experimentales como teóricos y se hace la discusión de los mismos. Finalmente, las conclusiones del presente trabajo son presentadas en el capítulo 5.

Adicionalmente, se desarrollaron dos apéndices donde se dan los fundamentos de la generación de radiación láser, la generación de pulsos láser de duración ultracorta así como la descripción detallada de los sistemas láser usados en este trabajo.

Referencias

- (1) Crespo-Hernández, C. E.; Cohen, B.; Hare, P. M.; Kohler, B. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1977-2019.
- (2) 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.

-
- (3) Serrano-Andres, L.; Merchán, M. *J. Photochem. Photobiol., C: Photochem. Rev.* **2009**, *10*, 21-32.
- (4) Onidas, D.; Markovitsi, D.; Marguet, S.; Sharonov, A.; Gustavsson, T. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 11367-11374.
- (5) Gustavsson, T.; Improta, R.; Markovitsi, D. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 2025-2030.
- (6) Barbatti, M.; Aquino, A. J. A.; Szymczak, J. J.; Nachtigallová, D.; Hobza, P.; Lischka, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2010**, *107*, 21453-21458.
- (7) Barbatti, M.; Szymczak, J. J.; Aquino, A. J. A.; Nachtigallova, D.; Lischka, H. *J. Chem. Phys.* **2011**, *134*, 014304.
- (8) Markovitsi, D.; Gustavsson, T.; Banyasz, A. *Mutat. Res-Rev. Mutat.* **2010**, *704*, 21-28.
- (9) Matsika, S.; Krause, P. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2011**, *62*, 621-643.
- (10) Polli, D.; Altoe, P.; Weingart, O.; Spillane, K. M.; Manzoni, C.; Brida, D.; Tomasello, G.; Orlandi, G.; Kukura, P.; Mathies, R. A.; Garavelli, M.; Cerullo, G. *Nature* **2010**, *467*, 440-443.
- (11) Robb, M. A. In *Conical Intersections: Theory, Computation and Experiment*; World Scientific Publishing Company, Incorporated, **2011**, p 3-50.
- (12) Yamazaki, S.; Domcke, W. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 7090-7097.
- (13) Matsika, S. *J. Phys. Chem. A.* **2004**, *108*, 7584-7590.
- (14) Mburu, E.; Matsika, S. *J. Phys. Chem. A.* **2008**, *112*, 12485-12491.
- (15) Mercier, Y.; Santoro, F.; Reguero, M.; Improta, R. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 10769-10772.

-
- (16) Lan, Z. G.; Frutos, L. M.; Sobolewski, A. L.; Domcke, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2008**, *105*, 12707-12712.
- (17) Barbatti, M.; Lischka, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6831-6839.
- (18) Chenon, M.-T.; Pugmire, R. J.; Grant, D. M.; Panzica, R. P.; Townsend, L. B. *J. Heterocycl. Chem.* **1973**, *10*, 431-433.
- (19) Bergmann, F.; Frank, A.; Neiman, Z. *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1* **1979**, *0*, 2795-2802.
- (20) Hernández, B.; Luque, F. J.; Orozco, M. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5964-5971.
- (21) Babushkina, T. A.; Leonova, T. S.; Chernyshov, A. I.; Yashunskii, V. *G. Khim. Geterotsikl. Soedin.* **1979**, 1543-1546.
- (22) Shukla, M. K.; Mishra, P. C. *Spectrochim. Acta, Part A* **1996**, *52*, 1547-1557.
- (23) Peon, J.; Zewail, A. H. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *348*, 255-262.
- (24) Karunakaran, V.; Kleinermanns, K.; Improta, R.; Kovalenko, S. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5839-5850.
- (25) Brøndsted Nielsen, S.; Sølling, T. I. *ChemPhysChem* **2005**, *6*, 1276-1281.
- (26) Fujiwara, T.; Kamoshida, Y.; Morita, R.; Yamashita, M. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **1997**, *41*, 114-121.
- (27) Nolting, D.; Weinkauff, R.; Hertel, I. V.; Schultz, T. *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 751-755.
- (28) Marian, C.; Nolting, D.; Weinkauff, R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*, 3306-3316.

-
- (29) Pecourt, J.-M. L.; Peon, J.; Kohler, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9348-9349.
- (30) Pecourt, J. M. L.; Peon, J.; Kohler, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10370-10378.
- (31) Georghiou, S.; Nordlund, T. M.; Saim, A. M. *Photochem. Photobiol.* **1985**, *41*, 209-212.
- (32) Hare, P. M. *Excited State Dynamics in DNA Base Monomers: the Effects of Solvent and Chemical Modification on Ultrafast Internal Conversion*. Ohio State University, **2007**.
- (33) Cohen, B.; Hare, P. M.; Kohler, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13594-13601.
- (34) Neely, R. K.; Magennis, S. W.; Dryden, D. T. F.; Jones, A. C. *J. Phys. Chem. B.* **2004**, *108*, 17606-17610.
- (35) Somsen, O. J. G.; Hoek, v. A.; Amerongen, v. H. *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *402*, 61-65.
- (36) Gustavsson, T.; Sharonov, A.; Onidas, D.; Markovitsi, D. *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *356*, 49-54.
- (37) Serrano-Andres, L.; Merchan, M.; Borin, A. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2006**, *103*, 8691-8696.
- (38) Chen, J.; Kohler, B. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 10677-10682.
- (39) Kohler, B. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 2047-2053.

(40) Zgierski, M. Z.; Patchkovskii, S.; Fujiwara, T.; Lim, E. C. *Chem. Phys. Lett.* **2007**, *440*, 145-149.

(41) Gustavsson, T.; Sharonov, A.; Markovitsi, D. *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *351*, 195-200.

HIPÓTESIS

Las modificaciones estructurales en las moléculas hipoxantina, inosina y alopurinol modulan el orden y carácter de los estados excitados y por tanto la dinámica de desactivación de los mismos. Esta última, dirigida por la eficiencia del proceso de conversión interna entre los estados electrónicos excitados singlete y el estado basal. La desprotonación de un sistema purínico desestabiliza los estados excitados con carácter $n-\pi^*$ y aumenta el tiempo de vida del estado excitado ópticamente activo $\pi-\pi^*$, debido al proceso adicional de conversión interna entre los estados $\pi-\pi^*$ y $n-\pi^*$ que debe ocurrir previo a la conversión interna $n-\pi^* \rightsquigarrow S_0$.

Los tiempos de vida del estado excitado van a reflejar características particulares de las superficies de energía potencial de los estados involucrados en la relajación de los sistemas moleculares estudiados luego que estos son excitados con radiación UV.

OBJETIVOS

General

Estudiar experimental y teóricamente la dinámica de desactivación de los estados electrónicos excitados de baja energía en los sistemas análogos a las bases purínicas del ADN: hipoxantina, inosina y alopurinol ribósido, con el fin de conocer detalles del proceso de conversión interna ultrarrápida en este tipo de sistemas.

Específicos

Obtener los espectros de absorción y emisión de fluorescencia de las especies propuestas.

Obtener las curvas de decaimiento ultrarrápido de los primeros estados singuletes excitados de los sistemas propuestos usando la técnica de resolución temporal de fluorescencia por suma de frecuencias.

Determinar los tiempos en los que transcurren los procesos de conversión interna entre los primeros estados singuletes para los sistemas de interés.

Analizar el efecto de la protonación y desprotonación en la dinámica de decaimiento de los estados excitados de los sistemas propuestos.

Identificar las especies responsables de los distintos tiempos de decaimiento para los compuestos que presentan prototropismo.

Encontrar las intersecciones cónicas entre el estado S_1 y el estado S_0 para sistemas más sencillos que la guanina a fin de establecer similitudes y las claves estructurales de la fotofísica ultrarrápida de la guanina.

Evaluar si las diferencias o similitudes observadas experimentalmente entre los decaimientos de los estados electrónicos excitados de los distintos sistemas a estudiar se reflejan como detalles de las superficies de energía potencial de los estados electrónicos involucrados.

Evaluar cómo distintas modificaciones estructurales en la guanina afectan la dinámica de desactivación de los estados excitados.

Proponer mecanismos para la fotofísica de las especies estudiadas a partir de los resultados experimentales y teóricos obtenidos.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

La radiación UV es absorbida fuertemente por el ADN, generando estados electrónicos excitados que algunas veces pueden desencadenar fotoreacciones que en principio podrían destruir el material genético (p. ej., la foto-formación del dímero de timina).¹⁻² Por su parte, los canales de desactivación de los estados excitados de las bases del ADN (canales fotoquímicos o fotofísicos) constituyen un tópico estudiado ya desde hace varias décadas.

El progreso hacia dilucidar completamente la dinámica de los estados excitados de las bases del ADN (guanina, adenina, timina, etc.) ha avanzado rápidamente en los años recientes gracias a las técnicas espectroscópicas con resolución temporal en la escala de fs así como el desarrollo de métodos teóricos de alto nivel que permiten estudiar sistemas moleculares en estados electrónicos excitados.

Precisamente en este capítulo describiremos los fundamentos teóricos detrás del desarrollo del presente estudio. El área más general del trabajo que hemos realizado es la interacción de moléculas con radiación electromagnética. Específicamente, se estudió la dinámica de desactivación de los estados excitados de hipoxantina, inosina y alopurinol ribósido, los cuales son sistemas análogos a las bases purínicas guanina y adenina.

Por lo anterior, las distintas secciones de este capítulo cubren el tópico general del proceso de absorción de radiación UV y los procesos fotofísicos y fotoquímicos

subsecuentes que ocurren en una molécula.

En la parte final de este capítulo se describirán las bases teóricas implementadas en los métodos de estructura electrónica que aquí se usaron para describir las superficies de energía potencial (SEP) de los estados electrónicos singulete. Estas metodologías permiten establecer los mecanismos de desactivación de un sistema molecular en términos de puntos particulares de las SEP, llamados: región de Franck-Condon, puntos estacionarios, mínimos de energía e intersecciones cónicas.

1.1 Absorción de luz y procesos de relajación, diagrama de Jablonski³⁻⁴

La excitación de una molécula usando radiación UV conduce a la misma a un estado electrónico superior cambiando su configuración electrónica y ganando la energía del fotón absorbido. Esta energía electrónica depositada en la molécula se disipa posteriormente a través de diferentes procesos, entre los que se incluyen, emisión de fotones, transiciones no radiativas al estado basal o a estados excitados intermedios, y para el caso de las bases del ADN en menor medida la formación de fotoproductos.

El primer acercamiento a la dinámica de los estados electrónicos excitados de cualquier sistema se da conociendo las energías de los estados electrónicos superiores relativas al estado electrónico basal, lo cual se logra a través de la interacción del sistema de interés con radiación electromagnética en el intervalo de ~200 nm a ~800 nm.

La absorción de radiación electromagnética en el intervalo señalado genera transiciones electrónicas desde el estado basal de la molécula hacia estados electrónicos de mayor energía, o mejor conocidos como estados electrónicos excitados. La regla de selección de espín para transiciones electrónicas exige que si el estado basal (S_0) es un estado singulete sólo serán permitidas las transiciones electrónicas a estados superiores con

la misma multiplicidad de espín, S_n , con $n \geq 1$, este tipo de transiciones se muestran en el diagrama de Jablonski de la Figura 1.1

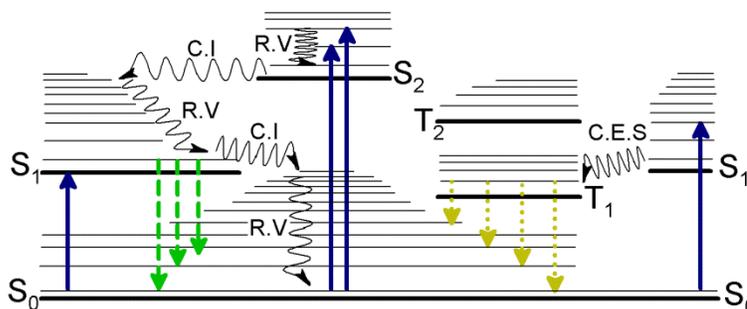


Figura 1.1. Diagrama de Jablonski representando los procesos de absorción (flechas sólidas verticales), relajación vibracional (R.V), conversión interna (C.I), cruce entre sistemas (C.E.S), emisión de fluorescencia (flechas verticales cortadas) y emisión de fosforescencia (flechas verticales punteadas).

Cuando una molécula absorbe luz de la longitud de onda adecuada para que ocurra la transición electrónica de su estado singlete basal a un estado singlete superior, el estado excitado es inherentemente un estado de no equilibrio, por lo cual el sistema tiende a eliminar el exceso de energía electrónica a través de una gran variedad de procesos (fotofísica o fotoquímica de la molécula).

Los procesos fotofísicos subsecuentes a la excitación pueden dividirse en dos grandes grupos: los radiativos y los no radiativos, los cuales a su vez pueden dividirse teniendo en cuenta la multiplicidad de los estados inicial y final involucrados en el proceso. A continuación describiremos cada uno de los procesos que se esquematizan en el diagrama de Jablonski de la Figura 1.1.

Relajación vibracional: una molécula que se encuentra en un estado vibro-electrónico excitado en solución puede eliminar el exceso de energía vibracional transfiriendo dicha energía a las moléculas de disolvente al chocar con ellas.

Fluorescencia: es el proceso de emisión de un fotón acompañado por la transición electrónica del sistema entre dos estados singlete. La energía del fotón emitido equivale a

la diferencia de energía entre los niveles en que ocurre la transición. Generalmente, la fluorescencia se da desde el estado singulete excitado de más baja energía (S_1) en su nivel vibracional más bajo ($\nu = 0$) hacia el estado basal (S_0) en alguno de sus niveles vibracionales. El hecho que la emisión desde el estado singulete S_1 , independientemente del estado electrónico excitado al que se accede inicialmente se conoce como la regla de Kasha.³⁻⁴

Conversión interna: es un proceso no radiativo y ocurre gracias a la proximidad entre los niveles vibro-electrónicos más bajos de un estado excitado singulete inicial y los niveles vibro-electrónicos superiores del estado final. Por ejemplo, como se muestra en el diagrama de Jablonski de la Figura 1.1 el proceso de conversión interna puede ocurrir desde el estado vibro-electrónico $S_1, \nu = 0$ que se acopla con los estados vibro – electrónicos superiores de $S_0, \nu = n$ ($n \geq 6$). El proceso de conversión interna juega un papel determinante en la desactivación rápida de los estados excitados de las bases del ADN y varios sistemas análogos como los estudiados en este trabajo por lo cual más adelante se tratará con mayor detalle.

Cruce entre sistemas: es un proceso no radiativo y ocurre desde un estado singulete hacia un estado triplete casi degenerado. En principio, según las reglas de selección de espín este proceso es prohibido, sin embargo debido al acoplamiento espín-orbita tal proceso puede ocurrir. La eficiencia de este proceso no radiativo aumenta a medida que el estado inicial y final se encuentran más cerca en energía.

Fosforescencia: es un proceso radiativo que ocurre por la transición electrónica desde un estado triplete de baja energía, generalmente T_1 , hacia un estado singulete de menor energía, generalmente S_0 . Las bases nitrogenadas y varios de sus análogos en

solución no presentan emisión por fosforescencia o el rendimiento cuántico de ese proceso es muy bajo ($\sim 10^{-4}$).

Además de los procesos fotofísicos que se acaban de describir, una molécula en un estado excitado puede sufrir cambios en su estructura o reaccionar con otras moléculas. Esto hace parte del estudio de la fotoquímica del sistema. Entre los procesos fotoquímicos podemos encontrar: transferencia intramolecular o intermolecular de protones, electrones y energía.

El proceso de CI es el que predomina en la relajación del estado S_1 de las bases nitrogenadas lo que induce una desactivación fuerte de la emisión. El proceso de CI, la absorción de radiación UV y la emisión de fluorescencia ($S_1 \rightarrow S_0 + h\nu$) son los procesos que nos interesan en este trabajo.

1.2 Rendimiento cuántico de fluorescencia y tiempo de vida del estado excitado

Dos de las propiedades más importantes para describir un fluoróforo son el rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ_F) y el tiempo de vida del estado excitado. El primero se define como el número de fotones emitidos relativo al número de fotones absorbidos. Considerando los procesos de desactivación del estado S_1 a través de los cuales el sistema retorna a S_0 , se define una constante de emisión de fluorescencia (k_{rad}) y una constante total para los procesos de desactivación no radiativos (conversión interna y cruce entre sistemas) $k_{n.r.}$. De esta manera, el rendimiento cuántico de fluorescencia está dado por:

$$\phi_F = \frac{k_{rad}}{k_{rad} + k_{n.r.}} \quad (1.1)$$

ϕ_F se determina usualmente con referencia a un estándar, es decir un compuesto de rendimiento cuántico de fluorescencia conocido. Con el fin de disminuir posibles inexactitudes en los factores de corrección de los espectros de emisión, se selecciona

preferiblemente un estándar que pueda ser excitado a la misma longitud de onda y con un espectro de emisión de fluorescencia en un intervalo de longitudes de onda similar respecto al compuesto de interés. La relación de los rendimientos cuánticos está dada por:

$$\frac{\Phi_F}{\Phi_{FR}} = \frac{n^2}{n_R^2} \times \frac{\int_0^\infty I_F(\lambda_E, \lambda_F) d\lambda_F}{\int_0^\infty I_{FR}(\lambda_E, \lambda_F) d\lambda_F} \times \frac{1 - 10^{-A_R(\lambda_E)}}{1 - 10^{-A(\lambda_E)}} \quad (1.2)$$

donde n se refiere a los índices de refracción de los solventes usados en las soluciones del compuesto de interés y el de referencia (R), I_F e I_{FR} son los espectros de fluorescencia corregidos^a para el compuesto de interés y el de referencia respectivamente, y A es la absorbancia de las soluciones a la longitud de onda de excitación (λ_E). Para que se cumpla la relación (1.2) se debe usar soluciones diluidas del estándar y el compuesto de interés ($A < 0.05$), y los espectros de emisión deben ser obtenidos bajos las mismas condiciones experimentales.

El tiempo de vida del estado excitado S_1 (τ) se define como el tiempo promedio en el que la molécula permanece en el estado excitado antes de retornar al estado S_0 , y está dado por:

$$\tau = \frac{1}{k_{rad} + k_{n.r}} \quad (1.3)$$

El proceso de emisión de fluorescencia es un proceso aleatorio y pocas moléculas emiten fotones de fluorescencia a exactamente $t = \tau$.

1.3 Resolución temporal de fluorescencia

La resolución temporal de fluorescencia es una técnica muy poderosa para estudiar la dinámica de los estados excitados en moléculas. En principio, cuando la fluorescencia proviene de un estado excitado bien definido, la intensidad de ésta refleja directamente la

^a El espectro de emisión se ve distorsionado por la dependencia con la longitud de onda, de la eficiencia del monocromador de emisión y la respuesta del detector. Los factores de corrección son determinados por el fabricante del fluorímetro usando una lámpara de Tungsteno calibrada o un estándar.

población de moléculas en el estado excitado. En la mayoría de las moléculas y en particular para los monómeros de los ácidos nucleicos, el decaimiento de la población en el estado excitado está gobernado por los procesos de desactivación no radiativos que son muy eficientes. Por lo tanto, midiendo el decaimiento de fluorescencia es posible caracterizar el mecanismo de decaimiento no radiativo.

El diagrama de Jablonski particular para los niveles de energía y procesos de desactivación de los estados singulete de baja energía en bases purínicas se muestra en la Figura 1.2.

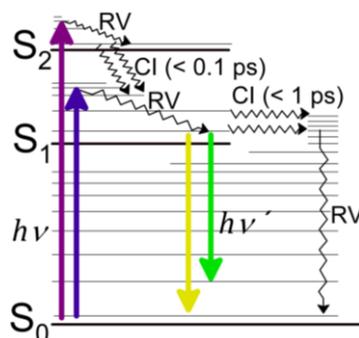


Figura 1.2. Diagrama de Jablonski simplificado para la desactivación de los estados excitados singulete de baja energía. Las flechas verticales hacia arriba indican el proceso de absorción fotones y las flechas verticales hacia abajo indican el proceso de emisión de fotones (fluorescencia), relajación vibracional (RV), conversión interna (CI).

La ecuación cinética para la desactivación del estado S₁ se plantea de la siguiente manera:

$$-\frac{d[S_1]}{dt} = k_{rad}[S_1] + k_{n.r}[S_1] \quad (1.4)$$

donde [S₁] representa la población de moléculas en el estado emisor a un tiempo *t* y *k_{n.r}* es la constante cinética para el proceso de desactivación a través del canal no radiativo (CI). Reordenando (1.4) e integrando, se obtiene que la población de moléculas en el estado S₁ está dada por:

$$[S_1](t) = [S_1]_0 e^{-(k_{rad} + k_{n.r})t} \quad (1.5)$$

Por otra parte, la ecuación cinética para la emisión de fotones desde el estado emisor S_1 está dada por:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_{rad}[S_1](t) = k_{rad}[S_1]_0 e^{-(k_{rad} + k_{n.r})t} \quad (1.6)$$

C_f es la cantidad total de fotones emitidos. Considerando una cantidad finita de fotones ΔC_f emitidos en un intervalo de tiempo Δt se obtiene:

$$\frac{\Delta C_f}{\Delta t} = k_{rad}[S_1]_0 e^{-(k_{rad} + k_{n.r})t} \quad (1.7)$$

La cantidad $\frac{\Delta C_f}{\Delta t}$ es proporcional a la emisión instantánea de fluorescencia a un tiempo dado t . Nótese que la intensidad de la emisión de fluorescencia a un tiempo t es proporcional a la población de moléculas en el estado emisor S_1 , $[S_1](t)$, a través de la constante de proporcionalidad k_{rad} . La emisión instantánea de fluorescencia puede ser resuelta en el tiempo a través de la técnica de suma de frecuencias que se describirá más adelante.

1.4 Modelo cuántico del proceso de absorción y conversión interna⁴

La descripción cuántica más sencilla de los procesos de absorción y CI tiene fundamento en la regla de oro de Fermi para transiciones entre estados electrónicos de sistemas moleculares. La regla de oro de Fermi, que describe la probabilidad de transición dependiente del tiempo (P_n), se formula matemáticamente de la siguiente manera:

$$P_n = \frac{4H_{nm}^2}{\hbar^2} \frac{\sin^2 \frac{1}{2} \Delta\omega t}{\Delta\omega^2} \quad (1.8)$$

donde $H_{nm} = \langle \psi_n | \hat{H}' | \psi_m \rangle$ y \hat{H}' es la parte relevante de cualquier operador Hamiltoniano general que es responsable de acoplar los estados electrónicos final e inicial descritos por las funciones de onda ψ_n y ψ_m respectivamente, $\Delta\omega = \omega_{nm} - \omega$. ω es la frecuencia

angular del campo eléctrico que acopla los dos estados y $\omega_{nm} = (E_n - E_m)/\hbar$ es la diferencia de energía entre los estados n y m en unidades de frecuencia angular.

Para el caso de transiciones verticales entre estados electrónicos por absorción de luz, \hat{H}' es el producto escalar del campo eléctrico y el vector de momento dipolar, y en ese caso: $H_{nm}^2 = E_0^2 |\langle \psi_n | \mu_{x,y,x} | \psi_m \rangle|^2 = E_0^2 |\mu_{nm}|^2$. La cantidad $\langle \psi_n | \mu_{x,y,x} | \psi_m \rangle = \mu_{nm}$, se conoce como el momento dipolar de transición.

En moléculas poliatómicas las transiciones electrónicas ocurren generalmente hacia diferentes niveles vibro-electrónicos. Por ejemplo, una transición de absorción de una molécula poliatómica en solución involucra transiciones a varios niveles de energía vibro-electrónicos como se representa en la Figura 1.3.

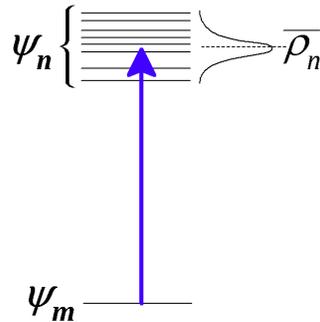


Figura 1.3. Proceso de absorción desde el estado inicial m hacia la banda vibro-electrónica del estado final n con una densidad de estados vibro-electrónicos $\bar{\rho}_n$.

Para una transición electrónica por absorción de un fotón, hay dos razones por las cuales estas ocurren a distintos niveles vibro-electrónicos: (i) en una molécula poliatómica pueden existir un número considerable de niveles de energía cercanos, con energías correspondientes a la energía de excitación, y (ii) siempre hay una distribución espectral de las frecuencias en la fuente de excitación. Para una transición no radiativa, p. ej., conversión interna, también se puede asumir una distribución de niveles de energía cercanamente espaciados en el estado final.

El número de estados vibro-electrónicos en el intervalo de energías E_n a $E_n + dE$ (donde dE toma un valor infinitesimalmente pequeño) se conoce como la densidad de estados, $\bar{\rho}_n$. Si solamente existiera un estado en el intervalo definido por dE la probabilidad de transición estaría dada por la ecuación (1.8), y se conoce como probabilidad de transición de estado a estado.

Si hay ρ_n estados en el intervalo dE , entonces la probabilidad de transición estará dada por ρ_n veces el lado derecho de la ecuación (1.8), la contribución de cada transición desde el estado ψ_m a uno de los estados ψ_n va a depender de sus valores particulares de $\Delta\omega$ y H_{nm} . Para estimar la probabilidad de transición total es necesario determinar la suma de todas las contribuciones individuales. Así, haciendo dE infinitesimalmente pequeño, esta suma toma la forma de una integral sobre el intervalo de energías de transición dE :

$$P_n = \int_{Banda} \frac{4H_{nm}^2}{\hbar^2} \frac{\text{sen}^2 \frac{1}{2} \Delta\omega t}{\Delta\omega^2} \rho_n dE \quad (1.9)$$

A partir de la expresión (1.9) es posible hacer algunas aproximaciones, dado que la función $\text{sen}^2 \frac{1}{2} \Delta\omega t / \Delta\omega^2$ disminuye rápidamente a medida que $\Delta\omega$ aumenta, es decir a medida que la transición electrónica queda fuera de resonancia, se puede aproximar la densidad de estados para los diferentes intervalos de energía como una única densidad de estados promedio al centro de la banda, $\bar{\rho}_n$.

Ahora, dado que $\bar{\rho}_n$ no dependerá de la energía en el intervalo en cuestión entonces puede quedar fuera de la integral. Adicionalmente, se puede asumir que los elementos de matriz H_{nm} no dependen de forma significativa de la energía, en otras palabras estos no cambian considerablemente a medida que la energía del estado final cambia, por lo que H_{nm} también puede sacarse de la integral. Reemplazamos $dE = \hbar d\omega$, con lo cual estas

consideraciones implican:

$$P_n = \frac{4H_{nm}^2 \bar{\rho}_n}{\hbar} \int_{Banda} \frac{\sin^2 \frac{1}{2} \Delta\omega t}{\Delta\omega^2} d\omega \quad (1.10)$$

para resolver la integral en (1.10) hacemos la sustitución $x = \frac{1}{2} \Delta\omega t$ y extendemos los

límites de integración de $-\infty$ a ∞ , con lo cual:

$$P_n = \frac{2H_{nm}^2 \bar{\rho}_n t}{\hbar} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{\sin^2 x}{x^2} dx \quad (1.11)$$

$\int_{-\infty}^{\infty} \frac{\sin^2 x}{x^2} dx = \pi$, entonces, la probabilidad de transición para la banda completa está dada

de manera aproximada por:

$$P_n = \frac{2\pi H_{nm}^2 \bar{\rho}_n t}{\hbar} \quad (1.12)$$

La rapidez de la transición al estado ψ_n está dada por dP_n/dt es decir la rapidez de cambio de la probabilidad de encontrar la molécula en el estado ψ_n como función del tiempo viene dada por la ecuación:

$$\frac{d}{dt} P_n = \frac{2\pi H_{nm}^2 \bar{\rho}_n}{\hbar} \quad (1.13)$$

la expresión (1.13) es conocida como la regla de oro de Fermi.

Aún cuando hemos mostrado el desarrollo matemático para la regla de oro de Fermi asumiendo una transición electrónica por absorción de luz, la forma general de esta expresión, es decir la dependencia con H_{nm} y $\bar{\rho}_n$, es la misma para todas las transiciones entre estados cuánticos, incluyendo las transiciones no radiativas.⁵

Para considerar transiciones no radiativas, $\bar{\rho}_n$ se refiere a la densidad de estados vibro-electrónicos que son isoenergéticos con el nivel vibro-electrónico del estado inicial desde el cual ocurre la transición; p. ej. en fase condensada el proceso de relajación vibracional por choques entre las moléculas de soluto y solvente relaja el sistema al estado

vibracional más bajo del estado electrónico inicial. En la Figura 1.4 se esquematiza una transición no radiativa.

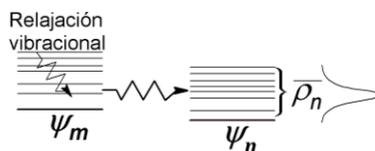


Figura 1.4. Procesos de relajación vibracional (flecha delgada) y transición no radiativa (flecha gruesa).

La parte perturbativa del Hamiltoniano relacionada con las transiciones no radiativas (p. ej., conversión interna) pertenece al Hamiltoniano molecular en sí mismo, como se muestra a continuación.

Conversión interna

La parte del Hamiltoniano molecular responsable de inducir un proceso de conversión interna es el operador de energía cinética nuclear, $\hat{H}_{Nuclear}$. Este operador siempre se transforma como la representación irreducible totalmente simétrica del grupo puntual de simetría al que pertenece el sistema molecular considerado. Por ejemplo, para el formaldehído que pertenece al grupo puntual de simetría C_{2v} , $\hat{H}_{Nuclear}$ se transforma como la representación A_1 .

Por lo anterior, el elemento matricial responsable del proceso de conversión interna $\langle \psi_n | \hat{H}_{Nuclear} | \psi_m \rangle$ será diferente de cero cuando ψ_n y ψ_m sean funciones base para la misma representación irreducible del grupo puntual molecular. En este caso no se intenta separar las funciones de onda moleculares de los estados n y m como el producto de una función de onda electrónica y una función de onda nuclear (aproximación de Born-Oppenheimer). Considérese el caso del proceso de conversión interna $S_1 \rightsquigarrow S_0$, en el que la transición toma lugar usualmente desde el estado vibracional de más baja energía de S_1 , hacia una región de alta densidad de estados vibracionales en S_0 . En este tipo de niveles

vibracionales de alta energía y densidad en S_0 , la aproximación de Born-Oppenheimer deja de ser válida. Sin embargo, aún se aplica la regla de selección que indica que la simetría de los estados inicial y final debe ser la misma.

Si la transición ocurre desde el nivel vibracional más bajo de S_1 , la simetría del estado inicial queda determinada por la simetría de la función de onda electrónica, p. ej. para el formaldehído S_1 ($n-\pi^*$) con simetría a_2 . Por lo cual, la función de onda del estado final debe tener una simetría total (electrónica \otimes nuclear) A_2 . Aunque la densidad de estados vibracionales sea grande en la región relevante, sólo el subconjunto de estados vibro-electrónicos con una simetría A_2 pueden ser estados receptores en el proceso de conversión interna.

1.5 Métodos computacionales⁶

Los métodos computacionales en química cuántica se expanden en un amplio espectro de aplicaciones, empezando con el cálculo de propiedades en el estado basal, extendiéndose hacia interacciones no adiabáticas de distintos estados electrónicos y llegando al campo de métodos que incluyen efectos no relativistas.

Por su parte, el método de Hartree-Fock (HF) genera soluciones de la ecuación de Schrödinger donde la interacción electrón-electrón se reemplaza por una interacción promedio. Usando un conjunto base lo suficientemente grande, la función de onda de un solo determinante de HF calcula ~99% de la energía total, sin embargo, el ~1% de energía restante es a menudo muy importante para describir fenómenos químicos. La energía de correlación se define como la diferencia entre la energía no relativista exacta del sistema y la energía calculada con el método HF en el límite de una base completa.⁷ Físicamente, esta energía corresponde al movimiento correlacionado de los electrones. Existen tres categorías

de métodos de función de onda que incluyen la correlación electrónica, estas son: interacción de configuraciones, teoría de perturbaciones de muchos cuerpos y los métodos de cúmulos acoplados. En esta sección describiremos algunos métodos incluidos en la categoría de interacción de configuraciones que se usaron en este trabajo.

El método HF determina la mejor función de onda de una sola función de configuración de estado adaptada por espín para un conjunto de funciones base dado. Con el fin de mejorar los resultados del método HF, se puede construir una función de onda con más de una determinante de Slater (DS), Φ , esto constituye el principio fundamental de los métodos llamados de interacción de configuraciones (ICC). En los métodos de ICC la función de onda variacional es una combinación lineal de varias determinantes entre las cuales esta incluida la de HF: $\Psi = a_0 \Phi_{HF} + \sum_{i=1} a_i \Phi_i$. Los distintos métodos de ICC difieren en la forma de obtener las determinantes Φ_i .

En algunas implementaciones de los métodos de ICC se hace uso de funciones de configuración de estado (FCE). Una FCE se define como una combinación lineal de determinantes que es función propia del operador \hat{S}^2 .

Las expansiones multi-configuracionales se construyen a partir de n -esimas sustituciones en los orbitales moleculares (OM) no ocupados (o virtuales). Ejemplos de este tipo de metodologías son: CIS (“*configuration interaction with single excitations*”) y CISD (“*configuration interaction with single and double excitations*”). La función de onda en un método de ICC de la siguiente manera:

$$\Psi_{CI} = a_0 \Phi_{HF} + \sum_S a_S \Phi_S + \sum_D a_D \Phi_D + \sum_T a_T \Phi_T + \dots = \sum_{i=0} a_i \Phi_i \quad (1.14)$$

donde las Φ_i 's representan determinantes o FCE con distintos niveles de excitación respecto a la determinante de capa cerrada de HF. Los niveles de excitación se representan

con las letras S (simple), D (doble), T (triple) etc.

1.5.1 Método multi-configuracional autoconsistente⁶

Un tipo particular de función de onda multi-configuracional que se usa de forma extendida en los métodos de estructura electrónica se obtiene usando el método multi-configuracional auto-consistente, MCSCF (“*multi-configurational self-consistent field*”) que explicaremos a continuación.

El método MCSCF se puede considerar como un método variacional de interacción de configuraciones donde se optimizan tanto los coeficientes a_i (en la ecuación 1.14) así como los OMs usados para construir las determinantes.

Una implementación muy común del método MCSFC es el modelo CASSCF (“*complete active space self-consistent field*”) donde la selección de las configuraciones que se incluyen en la expansión multi-configuracional (ecuación 1.14) se hace distribuyendo los OMs en un espacio activo y un espacio inactivo. El espacio activo se conforma generalmente por algunos de los orbitales ocupados de más alta energía y algunos de los orbitales no ocupados de más baja energía que provienen de un cálculo RHF (“*restricted Hartree-Fock*”).

Los orbitales inactivos estarán siempre doblemente ocupados. Los orbitales del espacio activo se re-optimizan, de tal forma que se realiza un cálculo “*full CI*” dentro del espacio activo, usando las FCEs adaptadas por simetría apropiadas o usando determinantes.

La selección de los OMs que forman parte del espacio activo es un paso determinante en el éxito de la metodología CASSCF. En principio, se deben incluir todos los OMs que estén involucrados en el proceso que se desea estudiar. La nomenclatura que se emplea usualmente para el método CASSCF es (n,m) , que indica que se han distribuido

n electrones de todas las formas posibles (para cierta función propia de espín y con una simetría dada) en m OMs activos.

La simplicidad conceptual del modelo CASSCF yace en el hecho de que una vez que los orbitales activos e inactivos han sido seleccionados la función de onda queda completamente especificada, para una geometría dada de la molécula y un conjunto de funciones base seleccionado.⁸ Adicionalmente, en esta metodología surgen ciertas simplificaciones en los procedimientos computacionales usados para obtener los orbitales optimizados y los coeficientes de la expansión de CI.

El número de FCEs incluidas en la expansión CI en el modelo CASSCF, N_{CAS} , se calcula a través de la fórmula de Weyl:

$$N_{CAS} = \frac{2s + 1}{m + 1} \binom{m + 1}{n/2 - s} \binom{m + 1}{n/2 + s + 1} \quad (1.15)$$

donde s es el número cuántico de espín total ($s = 0$ para estados singuletes), m es el número de OMs activos y n es el número de electrones en el espacio activo.

1.5.2 Métodos multi-referenciados⁹⁻¹⁰

El concepto de un espacio de referencia es importante para la clasificación de los métodos de función de onda correlacionados en química cuántica. La mayoría de los métodos *ab-initio* de función de onda son realizados bajo aproximaciones de una sola referencia, SR (“*single-reference*”). Generalmente, esta SR corresponde a un determinante de capa cerrada de tipo Hartree-Fock.

Algunos procesos químicos fundamentales como son la disociación de enlaces en el estado electrónico basal o en un estado electrónico excitado o la intersección de distintos estados, normalmente no son bien descritos por los métodos SR. Generalmente, los métodos de una sola referencia son adecuados y describen adecuadamente mínimos en la

SEP del estado basal, así como también en algunos casos son apropiados para el cálculo de energías de excitación vertical. Sin embargo, las metodologías basadas en una función de onda SR, no describen bien la SEP de estados excitados. Incluso, los resultados obtenidos con la metodología CASSCF al momento de explorar SEPs de estados excitados son a menudo poco satisfactorios dado que esta metodología no incluye efectos de correlación electrónica dinámica.

Los métodos multi-referenciados (MR) se basan en un concepto general, empezando desde una función de onda multi-configuracional como el espacio de referencia para la creación de una expansión multi-referenciada de la función de onda.

Método “*multi-reference configuration interaction*” MR-CI¹¹

Los métodos MR-CI son una de las herramientas más poderosas para calcular SEP así como propiedades moleculares. Los métodos MR-CI dan una descripción global más balanceada de las SEPs en comparación con muchos otros métodos de química cuántica que se basan en una función de onda SR.

Una aplicación muy importante de los métodos MR-CI es el estudio de estados electrónicos excitados. Sin embargo, también hay sistemas donde el estado basal no está bien descrito por una función de onda SR y en los cuales es necesario usar una función de onda MR-CI para obtener una descripción balanceada de los efectos de correlación electrónica. En general una función de onda MR-CI (SD) tiene la forma:

$$\Psi_{MR-CI} = \sum_I c_I \Phi_I + \sum_S \sum_a c_S^a \Phi_a^S + \sum_P \sum_{ab} c_P^{ab} \Phi_{ab}^P \quad (1.16)$$

donde S y D indican que se construirán nuevas FCE a partir de excitaciones simples y dobles de las FCE del espacio de referencia MR, a y b denotan orbitales externos (no

ocupados en las configuraciones de la referencia) y S y P denotan estados con $N-1$ y $N-2$ electrones en el espacio de referencia respectivamente.

El cálculo de las SEP para un grupo de moléculas pequeñas usando el método MR-CI(SD) con una función de onda de referencia CASSCF ha mostrado que esta metodología da resultados muy cercanos a los que se obtienen con el método FCI (“*full configuration interaction*”). Otra ventaja muy importante del método MR-CI es que permite calcular funciones de onda para los estados excitados en las cuales se incluyen los efectos de correlación electrónica dinámica. Además, algunas implementaciones de la metodología MR-CI disponen de los gradientes analíticos. Estos últimos casi al mismo costo computacional del cálculo de energía MR-CI.⁹

Todas estas características de los métodos MR-CI hacen que sean ideales para el estudio de SEP de estados excitados, permitiendo que además de la optimización de puntos estacionarios en las SEPs también sea posible la localización y optimización de intersecciones cónicas entre estados electrónicos.

El principal cuello de botella de los métodos MR-CI es el hecho que el tamaño de la expansión de la función de onda (número de FCEs) y por tanto el costo computacional incrementan rápidamente con el número de configuraciones en el espacio de referencia (generalmente el número de FCEs de la función de onda CASSCF) y reducir a un nivel óptimo la expansión CASSCF previo al cálculo MR-CI no siempre es una tarea sencilla. Asimismo, el costo computacional de esta metodología es razonable, cuando se estudian sistemas moleculares pequeños.

1.6 Eventos no adiabáticos e intersecciones cónicas¹²

Los eventos no adiabáticos en los cuales la aproximación de Born-Oppenheimer (B-O) deja de ser válida son muy frecuentes en química cuántica. Actualmente se considera que dichos eventos están mediados por la presencia de ICs las cuales corresponden a cruces entre SEPs de dos o más estados, es decir geometrías moleculares para las cuales los estados electrónicos involucrados son degenerados.

En esta sección se revisa la teoría de las ICs y cómo estas se pueden estudiar a través de métodos de estructura electrónica de alto nivel. La importancia de las ICs en el presente trabajo, radica en el hecho de que el mecanismo de decaimiento no radiativo altamente eficiente que es responsable de la fotoestabilidad de las bases del ADN es mediado por la existencia de ICs entre los estados singulete de baja energía y el estado basal.

La base para entender los procesos químicos usando mecánica cuántica es la aproximación de (B-O) que se basa en la gran diferencia en la masa del electrón y los núcleos, y que permite considerar por separado el movimiento de estas partículas. La aproximación de B-O es suficiente para describir una cantidad considerable de procesos químicos. Sin embargo, existen procesos en los cuales esta aproximación deja de ser válida y el acoplamiento entre los movimientos electrónicos y nucleares se vuelve importante.

Es en este último caso, donde los eventos no adiabáticos toman lugar y son comunes en la fotofísica y fotoquímica de sistemas moleculares variados, además que gobiernan fenómenos como la fotosíntesis, el mecanismo de la visión a nivel molecular y la fotoestabilidad del ADN.

Las SEPs que se construyen bajo la aproximación de B-O se conocen como SEPs adiabáticas. La parte electrónica de la ecuación de Schrödinger se resuelve a una geometría

nuclear dada, obteniéndose un conjunto de eigenvalores para la energía de los distintos estados electrónicos.

Cuando dos o más SEPs están cerca una de la otra, el acoplamiento de los estados electrónicos a través del operador de energía cinética nuclear se vuelve importante y puede cambiar la forma de las SEPs. Esto significa que mientras el movimiento nuclear toma lugar la configuración electrónica cambia, dado que los movimientos electrónicos y nucleares empiezan a acoplarse, por lo cual estos eventos se conocen como no adiabáticos.

1.6.1 Aproximación de Born-Oppenheimer y acoplamientos no adiabáticos

Con el fin de estudiar las propiedades de sistemas moleculares usando la mecánica cuántica es necesario resolver la ecuación de Schrödinger independiente del tiempo (ES):

$$\hat{H}\Psi(r, R) = E\Psi(r, R) \quad (1.17)$$

en la que R denota las coordenadas nucleares y r las coordenadas electrónicas, el Hamiltoniano total no relativista está dado por:

$$\hat{H}(r, R) = \hat{T}^N(R) + \hat{H}^e(r; R) \quad (1.18)$$

$\hat{T}^N(R)$ es el operador de energía cinética nuclear mientras que $\hat{H}^e(r; R)$ es el operador Hamiltoniano electrónico que incluye el operador de energía cinética electrónico, las interacciones electrón-electrón y la atracción núcleo-electrón. Las funciones propias de $\hat{H}^e(r; R)$ forman un conjunto ortonormal completo ($\langle \Psi_I^e(R) | \Psi_J^e(R) \rangle_r = \delta_{IJ}$) y pueden usarse para expresar la función de onda total de la forma:

$$\Psi(r, R) = \sum_I \Psi_I^e(r; R) \chi_I(R) \quad (1.19)$$

donde $\Psi_I^e(r; R)$ son las eigenfunciones de $\hat{H}^e(r; R)$ con valor propio $E_I^e(r; R)$, y $\chi_I(R)$ son los coeficientes de expansión. La ecuación (1.19) es conocida como la expansión de B-O y es exacta si la suma no es truncada. Reemplazando la ecuación (1.19) en la expresión (1.17), multiplicando a la izquierda por Ψ_I^{e*} e integrando sobre las coordenadas electrónicas

conduce a:

$$[\hat{T}^N + E_I^e(R)]\chi_I - \sum_J \Lambda_{IJ}(R)\chi_J = E\chi_I(R) \quad (1.20)$$

$\Lambda_{IJ} = \delta_{IJ}\hat{T}^N - \langle \Psi_I^e(R) | \hat{T}^N | \Psi_J^e(R) \rangle_r$ depende de los términos f_{IJ} y K_{IJ} que acoplan

los estados electrónicos I y J . Estos últimos términos se originan a partir del operador de energía cinética nuclear actuando en las funciones de onda electrónicas $\Psi_I^e(r; R)$ y se expresan de la forma:

$$f_{IJ}^\alpha = \langle \Psi_I^e(r; R) | \nabla_\alpha \Psi_J^e(r; R) \rangle \quad (1.21)$$

$$K_{IJ}(R) = \sum_\alpha \langle \Psi_I^e(r; R) | \nabla_\alpha^2 \Psi_J^e(r; R) \rangle \quad (1.22)$$

Los elementos de matriz de las ecuaciones (1.21) y (1.22) denotan integración sobre las coordenadas electrónicas, y ∇_α se refiere al gradiente sobre la coordenada nuclear R_α .

Usando $\hat{T}^N = -\frac{1}{2M}\nabla \cdot \nabla = -\frac{1}{2M}\nabla^2$ donde el gradiente ∇ es un vector en el espacio nuclear y M es una masa nuclear promedio se puede demostrar que Λ_{IJ} , K_{IJ} y f_{IJ} se relacionan así: $\Lambda_{IJ} = \frac{1}{2M}[2f_{IJ} \cdot \nabla + K_{IJ}]$.

En la ecuación (1.23), f_{IJ} es el acoplamiento derivado o no adiabático entre los estados electrónicos I y J y es un vector de dimensión equivalente al número de coordenadas nucleares. El acoplamiento no adiabático es una medida de la variación de la función de onda electrónica con las coordenadas nucleares y depende de la diferencia de energía electrónica entre los estados I y J :

$$f_{IJ}(R) = \frac{\langle \Psi_I^e | \nabla \hat{H}^e | \Psi_J^e \rangle}{E_J^e - E_I^e} \quad (1.23)$$

Cuando los estados electrónicos están lo suficientemente separados en energía el acoplamiento no adiabático es pequeño. Sin embargo, si los eigenvalores de las funciones de onda electrónicas son cercanos, un cambio pequeño en las coordenadas nucleares puede

llevar a una gran variación de la función de onda electrónica, en tal caso el acoplamiento no adiabático es importante y se debe usar las ecuaciones (1.20) - (1.22) para describir el sistema molecular.

En realidad, la expansión de la ecuación (1.20) no se puede usar de una forma estrictamente completa, usualmente cuando el acoplamiento no adiabático entre dos o más estados se hace importante, es suficiente con truncar la expansión de la ecuación (1.20) para tal número de estados.

1.6.2 Intersecciones cónicas

La eficiencia de una transición no radiativa entre dos estados depende del vector de acoplamiento no adiabático $f_{IJ}(R)$ entre los estados involucrados. El acoplamiento no adiabático es inversamente proporcional a la diferencia de energía entre los dos estados (ecuación 1.23), por lo cual, cuando esta diferencia es pequeña el acoplamiento no adiabático es grande.

Formalmente, en una IC los estados involucrados son degenerados y la diferencia de energía es cero, por lo cual el acoplamiento no adiabático es infinito, lo cual ofrece la forma más eficiente para que ocurra una transición no radiativa entre estados.

Dado el rol especial que juegan las ICs en los procesos no radiativos una pregunta natural que surge es con qué frecuencia ocurren este tipo de cruces. Para resolver esta pregunta considérese dos estados adiabáticos que se cruzan ψ_1 y ψ_2 . Los dos estados se expanden en términos de dos estados diabáticos ϕ_1 y ϕ_2 . De tal forma que $\psi_1 = c_{11}\phi_1 + c_{21}\phi_2$ y $\psi_2 = c_{12}\phi_1 + c_{22}\phi_2$.

Las energías electrónicas para los estados adiabáticos son los eigenvalores de la matriz Hamiltoniana:

$$\mathbf{H}^e = \begin{pmatrix} H_{11}(R) & H_{12}(R) \\ H_{21}(R) & H_{22}(R) \end{pmatrix} \quad (1.24)$$

donde $H_{ij} = \langle \phi_i | H^e | \phi_j \rangle$. Los eigenvalores de \mathbf{H}^e se obtienen a través de la transformación ortonormal $\mathbf{S}^\dagger \mathbf{H}^e \mathbf{S}$ dada por:

$$\mathbf{S} = \begin{pmatrix} \cos(\alpha(R)/2) & \text{sen}(\alpha(R)/2) \\ -\text{sen}(\alpha(R)/2) & \cos(\alpha(R)/2) \end{pmatrix} \quad (1.25)$$

Los eigenvalores de la energía son:

$$E_{1,2} = \bar{H} \pm \sqrt{\Delta H^2 + H_{12}^2} \quad (1.26)$$

con $\bar{H} = (H_{11} + H_{22})/2$ y $\Delta H = (H_{11} - H_{22})/2$. El ángulo de rotación α define la transformación de estados diabáticos a estados adiabáticos y esta dado por:

$$\text{sen} \alpha = \frac{H_{12}}{\sqrt{\Delta H^2 + H_{12}^2}} \quad (1.27)$$

$$\text{cos} \alpha = \frac{\Delta H}{\sqrt{\Delta H^2 + H_{12}^2}} \quad (1.28)$$

Las eigenfunciones de estado adiabáticas son:

$$\psi_1 = \cos(\alpha/2)\phi_1 + \text{sen}(\alpha/2)\phi_2 \quad (1.29)$$

$$\psi_2 = -\text{sen}(\alpha/2)\phi_1 + \cos(\alpha/2)\phi_2 \quad (1.30)$$

La ecuación (1.26) implica que para que los estados adiabáticos con energías E_1 y E_2 sean degenerados, como debe satisfacerse en la IC se deben cumplir dos condiciones:

$$H_{11}(R) - H_{22}(R) = 0 \quad (1.31)$$

$$H_{12}(R) = 0 \quad (1.32)$$

Para una molécula con N^{int} grados de libertad, las dos condiciones se satisfacen en un espacio de dimensión $N^{int}-2$.

Localización de intersecciones cónicas

Las ICs se han hecho populares dado el progreso en la teoría de estructura electrónica. El desarrollo de métodos que describen varios estados electrónicos

simultáneamente y la disponibilidad de gradientes analíticos han dado las herramientas para estudiar eventos no adiabáticos que involucran más de un estado electrónico y las ICs que actúan como intermediarios.

Como se ha señalado las ICs no existen como puntos aislados en las hiper-superficies de energía potencial, mas bien, existe un espacio multidimensional donde los estados electrónicos están degenerados, “*crossing seam*”. Los métodos actuales de estructura electrónica para estudiar ICs utilizan algoritmos de optimización que localizan el punto de mínima energía en el *crossing seam*. Estos puntos de mínima energía se utilizan como referencia para evaluar la accesibilidad (en términos de energía) a las ICs desde distintos puntos de la SEP de un estado excitado.

Para localizar y optimizar ICs de una manera eficiente, es necesario calcular el acoplamiento no adiabático (ecuación 1.23) así como el gradiente en la SEP del estado de interés. Actualmente, existen métodos de estructura electrónica que junto con técnicas para calcular gradientes analíticos permiten calcular de manera eficiente el acoplamiento no adiabático. Estas metodologías están implementadas en el programa de química cuántica computacional Columbus 5.9.2⁹⁻¹⁰ el cual se usó en el presente trabajo.

La formulación matemática exacta de la metodología para optimizar ICs a través de los algoritmos que dispone el programa Columbus 5.9.2 va más allá del objetivo de este trabajo. Si se desea conocer más detalle se pueden consultar las referencias^{9-10,13-15}. A continuación se describen algunos conceptos particulares acerca de la optimización de intersecciones cónicas.

Con el fin de optimizar una IC en el espacio de dimensión $N^{int}-2$, se deben calcular el gradiente con respecto a una coordenada nuclear x de la diferencia de energía $E^{J,x} - E^{I,x}$ entre dos estados J e I , y la derivada del elemento de matriz del acoplamiento con respecto

a la coordenada nuclear $\langle \mathbf{c}^J | \mathbf{H}(\mathbf{R})^x | \mathbf{c}^I \rangle$. En la terminología del método de interacción de configuraciones H es la matriz de interacción de configuraciones en un conjunto dado de FCEs, \mathbf{c}^I y \mathbf{c}^J son los vectores del método de interacción de configuraciones.

La evaluación del elemento de matriz de acoplamiento no adiabático entre los estados I y J

$$f_{IJ}(R)^x = \left\langle \Psi_J(R) \left| \frac{\partial}{\partial R_x} \Psi_I(R) \right. \right\rangle_r \quad (1.33)$$

dentro del marco del método MR-CI ha sido descrita por Yarkoni, Lengsfeld y Saxe¹⁶. El subíndice r en (1.33) denota integración sobre las coordenadas electrónicas. La función de onda $\Psi_I(\mathbf{r}; \mathbf{R}) \equiv \Psi_J(\mathbf{R})$ se define en términos de las FCEs $\psi_i(\mathbf{r}; \mathbf{R})$ como:

$$\Psi_I(\mathbf{r}; \mathbf{R}) = \sum_i c_i^I(\mathbf{R}) \psi_i(\mathbf{r}; \mathbf{R}) \quad (1.34)$$

Los orbitales moleculares que se usan para construir las FCEs, $\psi_i(\mathbf{r}; \mathbf{R})$, se obtienen de un cálculo del tipo MCSSCF (p.ej., CASSCF). El elemento de matriz $f_{IJ}(R)^x$ se puede dividir en dos contribuciones (para más detalles ver Yarkoni *et al*¹⁷)

$$f_{IJ}(R)^x = f_{JI}^{CI}(R)^x + f_{JI}^{CSF}(R)^x \quad (1.35)$$

definiendo:

$$f_{JI}^{CI}(R)^x = \left\langle \mathbf{c}^J(R) \left| \frac{\partial}{\partial R_x} \mathbf{c}^I(R) \right. \right\rangle_{\text{CSF}} \quad (1.36)$$

$$f_{JI}^{CSF}(R)^x = \sum_{ij} c_j^J(R) c_i^I(R) \left\langle \psi_j(\mathbf{r}; \mathbf{R}) \left| \frac{\partial}{\partial R_x} \psi_i(\mathbf{r}; \mathbf{R}) \right. \right\rangle_r \quad (1.37)$$

El subíndice CSF en la ecuación (1.36) indica un producto escalar en el espacio de FCEs. Dicho producto escalar implica una integración con respecto a las coordenadas electrónicas. El término $f_{JI}^{CI}(R)^x$ puede reescribirse^{15,17} de la forma:

$$\hat{f}_{JI}^{CI}(R)^x = \langle \mathbf{c}^J(R) | \mathbf{H}(\mathbf{R})^x | \mathbf{c}^I(R) \rangle_{\text{CSF}} \quad (1.38)$$

con lo cual se obtiene el elemento de matriz de acoplamiento no adiabático entre los

estados I y J queda definido como:

$$f_{IJ}(R)^x = [E^I(R) - E^J(R)]^{-1} \hat{f}_{JI}^{CI}(R)^x + f_{JI}^{CSF}(R)^x \quad (1.39)$$

En la versión más simple de los algoritmos usados para optimizar intersecciones cónicas se minimiza la energía de uno de los estados involucrados bajo la restricción que la diferencia de energía entre los dos estados sea cero.¹⁸ Adicionalmente, algunas metodologías incluyen la restricción que el acoplamiento H_{IJ} sea cero. Empezando la optimización de la IC en un punto R que no está en la intersección cónica, para obtener una IC se deben satisfacer las siguientes condiciones:

$$\Delta E(R) + g(R)\delta R = 0 \quad (1.40)$$

$$h(R) \cdot \delta R = 0 \quad (1.41)$$

donde $\Delta E(R) = E_I^e(R) - E_J^e(R)$. $g(R)$ y $h(R)$ son los vectores unitarios del gradiente de la diferencia de energía y el gradiente del acoplamiento respectivamente. Cuando se usan los dos criterios de las ecuaciones 1.40 y 1.41 se minimiza siguiente Lagrangiano:

$$L(R, \lambda_1, \lambda_2) = E_1(R) + \lambda_1 \Delta E(R) + \lambda_2 H_{IJ} \quad (1.42)$$

donde λ_1 y λ_2 son multiplicadores de Lagrange. Para buscar extremos del Lagrangiano de la ecuación (1.42) se establece la ecuación de Newton-Raphson:

$$\begin{bmatrix} Q & g & h \\ g & 0 & 0 \\ h & 0 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \partial R \\ \partial \lambda_1 \\ \partial \lambda_2 \end{bmatrix} = - \begin{bmatrix} \nabla L \\ \partial L / \partial \lambda_1 \\ \partial L / \partial \lambda_2 \end{bmatrix} \quad (1.43)$$

Al resolver la ecuación (1.43) se obtiene una solución para ∂R . Los elementos de matriz de H están dados por $Q_{ij} = \frac{\partial^2 L}{\partial R_i \partial R_j}$ y se usan las relaciones $\frac{\partial^2 L}{\partial R_i \partial \lambda_1} = g_i$ y $\frac{\partial^2 L}{\partial R_i \partial \lambda_2} = h_i$.

Para que exista una intersección cónica en R se debe cumplir:

$$\nabla(\Delta H) \cdot \partial R = 0 \quad (1.44)$$

$$\nabla H_{IJ} \cdot \partial R = 0 \quad (1.45)$$

De acuerdo con (1.44) y (1.45) ∂R debe ser ortogonal al espacio expandido por los vectores $\nabla(\Delta H)$ y ∇H_{IJ} para que la degeneración de los dos estados permanezca. Este espacio se conoce como el espacio de bifurcación (“*branching space*”) o espacio *g-h* y se caracteriza por que la degeneración se pierde de forma lineal en cualquiera de las dos direcciones definida por los vectores mencionados. Las coordenadas adaptadas para la intersección se definen a partir de los respectivos siguientes vectores unitarios:

$$x = g/g = \frac{\nabla(\Delta H)}{g} \quad (1.46)$$

$$y = h/h = \frac{\nabla(H_{IJ})}{h} \quad (1.47)$$

El método que hemos descrito se ha implementado usando los gradientes analíticos para funciones de onda MR-CI¹³⁻¹⁵ y se encuentra disponible en el programa de química cuántica computacional COLUMBUS 5.9.2.⁹

Referencias

- (1) Markovitsi, D.; Gustavsson, T.; Banyasz, A. *Mut. Res-Rev. Mut. Res.* **2010**, *704*, 21-28.
- (2) Ravanat, J.-L.; Douki, T.; Cadet, J. *J. Photochem. Photobiol. B:* **2001**, *63*, 88-102.
- (3) Valeur, B. *Molecular fluorescence: principles and applications*; Wiley-VCH, **2002**.
- (4) Gilbert, A.; Baggott, J. E. *Essentials of molecular photochemistry*; CRC Press, **1991**.
- (5) Avouris, P.; Gelbart, W. M.; El-Sayed, M. A. *Chem. Rev.* **1977**, *77*, 793-833.

- (6) Jensen, F. *Introduction to Computational Chemistry*; John Wiley & Sons, **2006**.
- (7) Szabó, A.; Ostlund, N. S. *Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*; Dover Publ., **1989**.
- (8) Roos, B. O. *Lecture notes in quantum chemistry*; Springer-Verlag, **1992**.
- (9) Lischka, H.; Müller, T.; Szalay, P. G.; Shavitt, I.; Pitzer, R. M.; Shepard, R. *Wiley Interdiscip. Rev: Comput. Mol. Sci.* **2011**, *1*, 191-199.
- (10) Lischka, H.; Shepard, R.; Pitzer, R. M.; Shavitt, I.; Dallos, M.; Muller, T.; Szalay, P. G.; Seth, M.; Kedziora, G. S.; Yabushita, S.; Zhang, Z. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3*, 664-673.
- (11) Werner, H.-J.; Knowles, P. J. *J. Chem. Phys.* **1988**, *89*, 5803-5814.
- (12) Matsika, S.; Krause, P. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2011**, *62*, 621-643.
- (13) Dallos, M.; Lischka, H.; Shepard, R.; Yarkony, D. R.; Szalay, P. G. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 7330-7339.
- (14) Lischka, H.; Dallos, M.; Shepard, R. *Mol. Phys.* **2002**, *100*, 1647-1658.
- (15) Lischka, H.; Dallos, M.; Szalay, P. G.; Yarkony, D. R.; Shepard, R. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 7322-7329.
- (16) Saxe, P.; Lengsfeld Iii, B. H.; Yarkony, D. R. *Chem. Phys. Lett.* **1985**, *113*, 159-164.
- (17) Lengsfeld III, B. H.; Saxe, P.; Yarkony, D. R. *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 4549-4553.

- (18) Matsika, S. In *Rev. Comput. Chem.*; John Wiley & Sons, Inc.: **2007**,
p 83-124.

CAPÍTULO 2

PARTE EXPERIMENTAL

En este capítulo se desarrollan los siguientes temas:

- Las metodologías usadas para la obtención de los espectros de absorción y emisión de fluorescencia (espectroscopia estacionaria).
- El arreglo experimental usado en los experimentos de resolución temporal de fluorescencia por suma de frecuencias.
- El tratamiento matemático de la señal de fluorescencia para obtener ajustes de decaimientos exponenciales.
- Las propiedades más destacables de los compuestos estudiados así como la preparación de muestras.

2.1 Espectroscopia estacionaria

Los espectros de absorción se obtuvieron en celdas de cuarzo de 1 cm o 1 mm de paso óptico usando un espectrofotómetro Cary-50 (Varian) a temperatura ambiente (20 ± 1 °C). Los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron en celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico en un fluorímetro Cary-Eclipse (Varian) a temperatura ambiente.

2.2 Diseño experimental para la realización de experimentos de resolución temporal de fluorescencia por suma de frecuencias

El propósito de un diseño experimental para medir el decaimiento de la señal fluorescencia (previa excitación de la muestra) es obtener una medida directa o indirecta de la señal de fluorescencia en función del tiempo.

En el caso de la técnica de resolución temporal de fluorescencia por suma de frecuencias (conocida por su nombre en Inglés como “*fluorescence up-conversion*”) el objetivo es resolver el decaimiento de la señal de fluorescencia en sistemas donde este proceso ocurre en una escala temporal muy corta: de decenas de fs a algunas decenas de ps.

En esta técnica el decaimiento de la señal de fluorescencia se mide de manera indirecta a través de la conversión de una de las componentes espectrales de la emisión a fotones con mayor energía. Esto se logra mediante un proceso de óptica no lineal donde interactúan los fotones de fluorescencia y los fotones de un pulso de luz láser con energía por fotón característica (pulso de prueba) como se explica en la sección 2.3.

La importancia del desarrollo de la técnica de resolución temporal de la fluorescencia por suma de frecuencias radica en la escala temporal del tipo de eventos que se puede estudiar. Es bien sabido que la duración del evento físico que queremos medir define tanto el ancho temporal de los eventos individuales de medición como la separación temporal entre cada uno de dichos eventos. De esta forma, si sabemos que para las bases del ADN el tiempo de vida del estado excitado y por tanto el decaimiento de fluorescencia ocurre en menos de 1ps, es necesario que el ancho temporal de cada evento de medición ocurra en la escala temporal de fs.

El uso de un pulso de excitación (o pulso de inicio para el evento de emisión de fluorescencia) del orden de ~ 150 fs y un pulso de prueba (o pulso de compuerta) del mismo

orden de ancho temporal permite resolver de manera adecuada el decaimiento de fluorescencia de duración ultracorta ($< 1\text{ps}$). Es decir, la resolución temporal de la técnica esencialmente está limitada por el ancho temporal de los pulsos láser involucrados.

El proceso de suma de frecuencias (usado para la resolución de la fluorescencia) ocurre solamente durante la duración del pulso de prueba, por lo cual la resolución temporal de la técnica es comparable al ancho temporal del mismo. Retrasando temporalmente el pulso de prueba con respecto al pulso de excitación usando una etapa mecánica es posible obtener un tipo de escáner óptico con resolución temporal.¹

Los principales elementos de la configuración experimental usada en la técnica de *fluorescence up-conversion* son:

- Un sistema láser que genera pulsos de 700 nm a 900 nm con ~ 150 fs de duración.
- Las unidades ópticas de generación del segundo y tercer armónico del pulso de luz láser fundamental.
- Una etapa de retraso óptico.
- El sistema para contener la solución del compuesto a estudiar así como la celda de flujo.
- El arreglo óptico para la colección de la fluorescencia, el cristal de óptica no lineal (beta borato de Bario, β -BBO) donde se da la suma de frecuencias de una de las componentes espectrales de la fluorescencia con el pulso de prueba.
- El sistema de detección y adquisición de la señal de suma de frecuencias.

Los componentes nombrados y su organización se esquematizan en la Figura 2.1.

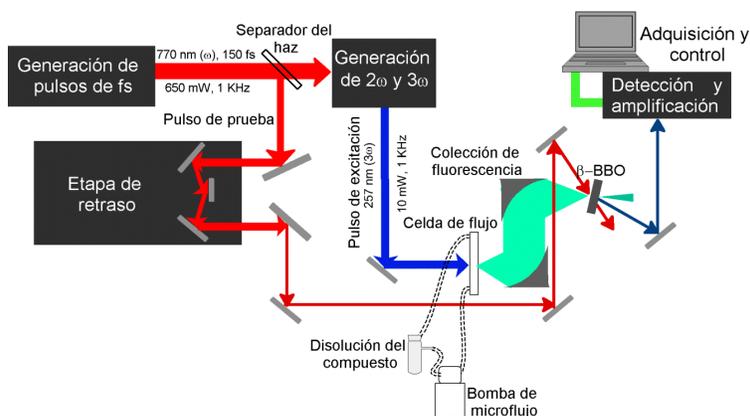


Figura 2.1. Esquema general del experimento de resolución temporal de fluorescencia por suma de frecuencias.

A continuación se describen los detalles de la técnica de *up-conversion* que se ha utilizado. La solución del compuesto de interés fluye a través de una celda de cuarzo de 1 mm de camino óptico, para lo cual se utiliza una bomba de microflujo (MicroPump Cole-Palmer). La muestra es excitada con el tercer armónico ($\lambda = 257$ nm) del pulso láser proveniente de un amplificador regenerativo de Ti:zafiro (LEGEND-F – COHERENT, $\lambda_0 = 770$ nm, ancho temporal = 150 fs, frecuencia de repetición = 1/3 KHz). El amplificador regenerativo es bombeado por un láser ORC 1000 y usa como haz semilla el pulso láser proveniente de un oscilador de Ti:zafiro (NJA-5 Clark Marx Corporation, ancho temporal = 130 fs).

El haz de excitación pasa a través de un modulador óptico antes de llegar a la celda de flujo, de esta forma la frecuencia del haz de excitación se reduce a 1/3 de la correspondiente a la salida del amplificador regenerativo (1 KHz).

La emisión de fluorescencia es colectada con un par de espejos parabólicos y enfocada en un cristal β -BBO, donde se cruza con el pulso de prueba ($\lambda = 770$ nm) para obtener la señal de suma de frecuencias.

El haz resultante de la suma de frecuencias es enfocado en un monocromador doble (ORIEL) y detectado con un tubo fotomultiplicador. Esta señal se amplifica usando un amplificador tipo “lock-in” (detección sensible a la fase, SR830 Stanford Research Systems).

La resolución temporal de la emisión de fluorescencia se logra retrasando el pulso de compuerta con respecto al haz de excitación, cambiando el camino óptico que recorre el primero. Para el análisis posterior de los decaimientos de fluorescencia la función de respuesta del instrumento se considera gaussiana y es un parámetro variable (FWHM ~550 fs) en todos los experimentos.

En todos los casos se verificó que no existiera señal de suma de frecuencias en soluciones acuosas blanco a pH neutro, ácido y básico. A continuación vamos a describir de forma detallada cada una de las distintas componentes del arreglo experimental utilizado en esta tesis.

2.2.1 Sistema de generación de pulsos láser de fs

Este sistema consta de un oscilador láser de Ti:zafiro y un amplificador regenerativo como se esquematiza en la Figura 2.2, y permite obtener pulsos láser de duración de decenas de fs y aproximadamente 650 μ J de energía por pulso.



Figura 2.2. Sistema de generación de pulsos láser de sub-fs

La energía por pulso es amplificada a través de un amplificador regenerativo de pulsos ultracortos (LEGEND, Coherent Inc) usando como haz semilla el proveniente del

oscilador de Ti:zafiro pulsado a 1 MHz (NJA-5, Clark MXR) y como láser de bombeo (láser de bombeo 2) un láser Nd:YAG (ORC-100, Clark MXR) con doblado de frecuencia a través de un cristal de LBO (1 KHz, 527 nm).

El bombeo para el oscilador de Ti:zafiro se realiza usando un láser continuo de Nd:YVO₄ (Verdi, Coherent Inc) con doblado de frecuencia a través de un cristal LBO. Las características de los diferentes pulsos de luz involucrados en la generación de luz láser de 800 nm de alta intensidad se muestran en la Figura 2.2 Los fundamentos de la generación de pulsos láser con duración de fs, la amplificación regenerativa así como otros conceptos relacionados con las propiedades de pulsos láser de duración ultracorta se detallan en el apéndice 2.

2.2.2 Generación de segundo (2ω) y tercer (3ω) armónico del pulso de salida del amplificador regenerativo

Dado que para generar los estados electrónicos excitados de baja energía de los sistemas de interés en este trabajo era necesario excitar con radiación UV entre 250 nm y 270 nm los pulsos de radiación láser del sistema amplificado ($\lambda_0 = 770$ nm, ancho temporal ~ 150 fs, frecuencia de repetición = 1 KHz) debían ser convertidos a radiación láser de mayor energía por fotón.

Este proceso se conoce como generación de segundo y tercer armónico del haz fundamental. Brevemente, consiste en obtener pulsos láser con el doble (2ω) y el triple (3ω) de la frecuencia del haz fundamental, a través de procesos de óptica no lineal.

El diseño experimental para la generación del segundo y tercer armónico se esquematiza en la Figura 2.3. El haz proveniente del amplificador regenerativo se divide en dos partes a través de los divisores de haz: DH1 y DH2. Una de las fracciones ($\sim 50\%$) del

haz inicial obtenida luego de que el haz pasa por DH2 se usa para la generación del segundo armónico. Esto se logra haciendo interactuar el haz fundamental con un cristal de β -borato de Bario (β -BBO 1), con lo cual se genera un haz láser de 385 nm con polarización vertical (paralela al eje z de la Figura 2.3). En el esquema mostrado en la Figura 2.3, el eje de ajuste de fases para el β -BBO 1 corresponde al eje y .

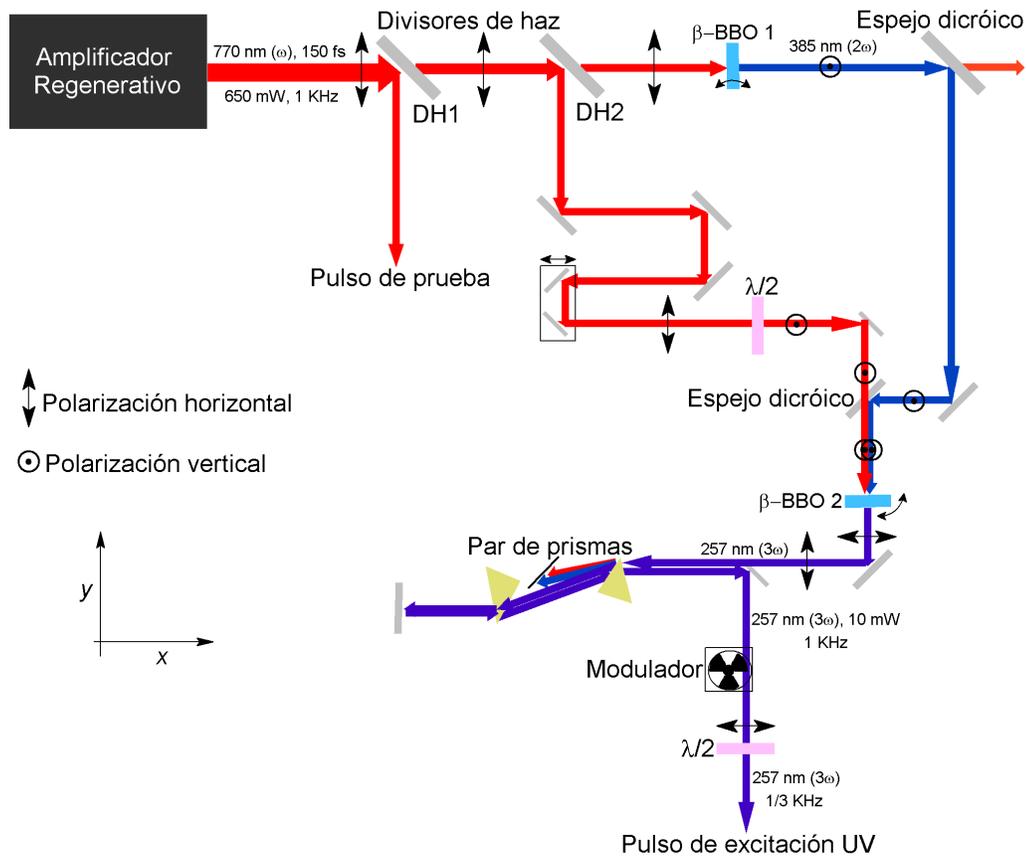


Figura 2.3. Generación del segundo y tercer armónico del pulso láser fundamental proveniente del amplificador regenerativo.

La segunda fracción ($\sim 50\%$) obtenida a partir de DH2 cambia de polarización luego de pasar por un retardador de fases $\lambda/2$. La generación del tercer armónico ocurre por la interacción de una fracción del haz fundamental con el haz del segundo armónico en el cristal de β -BBO 2. La suma de frecuencias de los haces que viajan colinealmente genera el tercer armónico (257 nm) del haz fundamental. El eje de ajuste de fases para que ocurra la

suma de frecuencias en el cristal de β -BBO 2 corresponde al eje z , como se esquematiza en la Figura 2.3. El haz láser de 3ω obtenido tiene polarización horizontal (en el plano x - y de la Figura 2.3).

Para compensar la dispersión temporal del haz del tercer armónico se usa un par de prismas. Adicionalmente, el primer prisma con el que interactúa el haz láser del tercer armónico permite separar los remanentes del haz fundamental y el haz de segundo armónico.

La frecuencia de pulsación del haz del tercer armónico se modifica a 1/3 KHz usando un modulador óptico (“*optical chopper*”). Asimismo, la polarización del haz de excitación (3ω , 257 nm) puede modificarse entre horizontal y vertical usando un retardador de fases $\lambda/2$.

En la Figura 2.4 se muestra la secuencia de pulsos usada en nuestros experimentos de resolución temporal de la fluorescencia por suma de frecuencias (*up-conversion*).

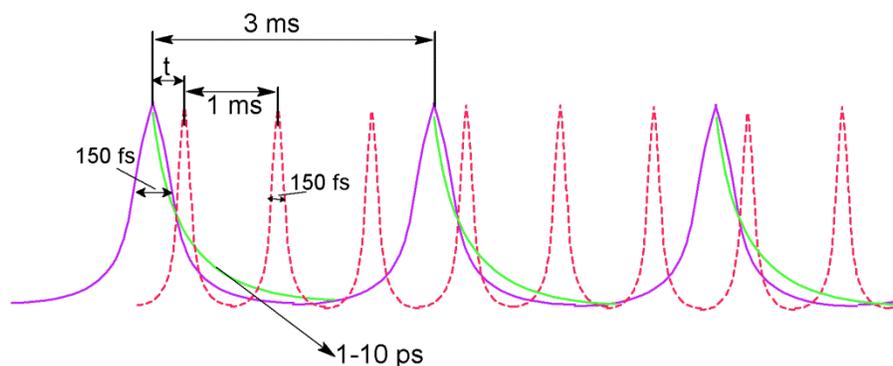


Figura 2.4. Secuencia de pulsos con los respectivos tiempos para los eventos de excitación (tren de pulsos violeta), detección (pulso de compuerta, línea punteada roja) y decaimiento de fluorescencia (línea verde), t es el tiempo de retardo entre el pulso de excitación y el pulso de compuerta. La figura no está a escala.

2.3 Suma de frecuencias para la resolución de la fluorescencia

En la técnica de *fluorescence up-conversion* la señal de fluorescencia no es detectada directamente, sino que una de las componentes espectrales de la emisión de

fluorescencia se suma con el pulso de prueba (ver Figura 2.5). La señal de suma de frecuencias es la señal que posteriormente es detectada y amplificada.

La suma de frecuencias se da a través de un cristal de β -BBO como se muestra en la Figura 2.5. El pulso de prueba con polarización vertical se suma a una de las componentes espectrales de la emisión de fluorescencia. El ángulo de ajuste de fases para el cual se da la suma de frecuencias para una componente espectral (específica de la fluorescencia) con el pulso de prueba se ajusta rotando el cristal alrededor del eje z en el esquema presentado en la Figura 2.5 B.

La longitud de onda correspondiente al haz de suma de frecuencias se puede calcular mediante la ecuación: $\lambda_{\text{suma de Frecuencias}} = (\lambda_{\text{pulso de prueba}}\lambda_{\text{componente espectral}}) / (\lambda_{\text{pulso de prueba}} + \lambda_{\text{componente espectral}})$. La dirección para el vector de onda \vec{k} del haz de suma de frecuencias se considera como la correspondiente a la suma de los vectores de onda de la emisión de fluorescencia y el haz de prueba, como se muestra en la Figura 2.5 B.

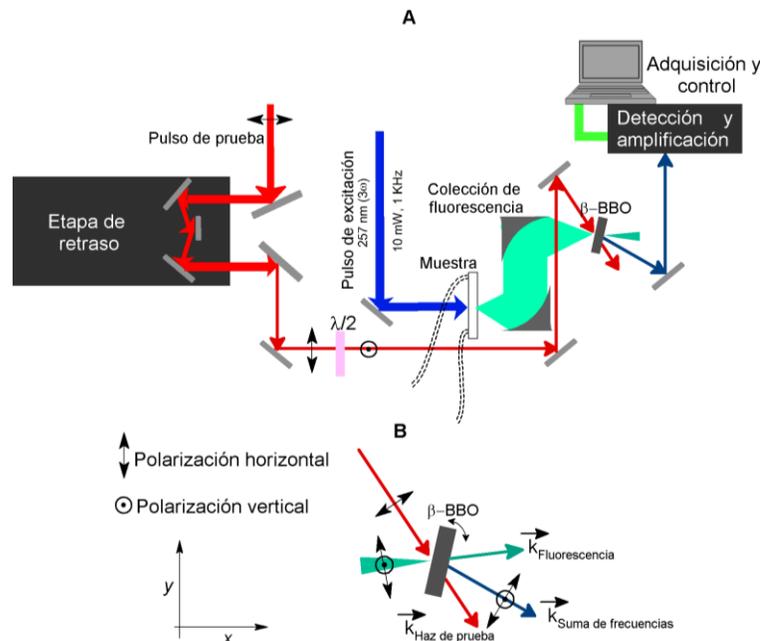


Figura 2.5. A) Experimento de resolución temporal de la fluorescencia usando la señal de suma de frecuencias o experimento de *up-conversion*. B) Suma vectorial de la fluorescencia y el haz de prueba.

Para ilustrar el proceso de suma de frecuencias, considérese dos pulsos láser con frecuencias angulares ω_1 y ω_2 con sus respectivos vectores de onda \vec{k}_1 y \vec{k}_2 . Para que ocurra la generación de un pulso láser de suma de frecuencias (ω_3, \vec{k}_3) se debe cumplir:

$$\omega_1 + \omega_2 = \omega_3 \quad (2.1)$$

$$\vec{k}_1 + \vec{k}_2 = \vec{k}_3 \quad (2.2)$$

La condición establecida en la ecuación (2.2) se conoce como condición de ajuste de fases y sólo se puede cumplir usando un material birrefringente en el cual el índice de refracción que experimenta una onda electromagnética depende de la dirección de propagación en el material y la polarización de la misma. En un cristal anisotrópico uniaxial negativo (e. g., el cristal de β -BBO) el índice de refracción (n_z) que experimenta una onda electromagnética propagándose en uno de los ejes del cristal conocido como eje extraordinario ($n_z = n_e$) es menor que el índice de refracción en los otros dos ejes ($n_y = n_x = n_o$) llamados ejes ordinarios.

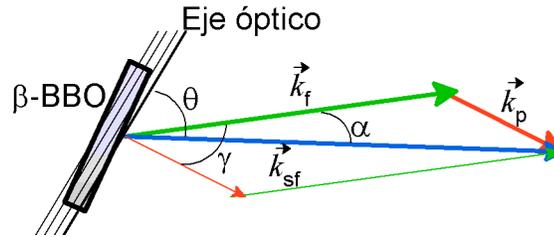


Figura 2.6. Orientación de los vectores de onda para las señales de fluorescencia (\vec{k}_f), pulso de prueba \vec{k}_p y suma de frecuencias \vec{k}_{sf} .

Una característica de la interacción de tres ondas electromagnéticas con distintas frecuencias, en materiales de óptica no lineal, es que dos de ellas están polarizadas en el mismo plano y una tercera estará polarizada en un plano perpendicular. En el ajuste de fases tipo I (como en el caso del cristal de β -BBO) y en el caso particular para la suma de frecuencias para resolver la señal de fluorescencia se obtiene la ecuación vectorial:

$$\vec{k}_f^o + \vec{k}_p^o = \vec{k}_{sf}^e \quad (2.3)$$

La condición de ajuste de fases para haces no colineales (con polarización en el eje ordinario del cristal) se deriva a partir del esquema de la Figura 2.6 y está dada de acuerdo a la ley del coseno por la siguiente ecuación escalar:

$$k_{sf}^e{}^2 = k_f^o{}^2 + k_p^o{}^2 - 2k_f^o k_p^o \cos(\pi - \gamma) \quad (2.4)$$

donde los superíndices *o* y *e* indican polarización en el eje ordinario y extraordinario del cristal respectivamente.

La magnitud de los vectores de onda k_i^o (con $i = f$ o p) se puede calcular a partir de la expresión:

$$k_i^o = \frac{n^o(\omega_i) \cdot \omega_i}{c} \quad (2.5)$$

donde ω_i es la frecuencia angular, c es la velocidad de la luz y el índice de refracción en el eje ordinario (n^o) para cualquiera de los haces de fluorescencia (f) o el pulso de prueba (p), se calcula a través de la ecuación de Sellmeier para el β -BBO:

$$n^o{}^2(\lambda(\mu m)) = 2.7359 + \frac{0.01878}{(\lambda^2 - 0.01822)} - 0.01354 \cdot \lambda^2 \quad (2.6)$$

siendo λ la longitud de onda del haz correspondiente.

Una vez determinado k_{sf}^e mediante la ecuación (2.4) se calcula el valor del índice de refracción en el eje extraordinario correspondiente para el haz de suma de frecuencias:

$$n_{sf}^e = \frac{k_{sf}^e \cdot c}{\omega_{sf}} \quad (2.7)$$

y usando la ecuación paramétrica se calcula el valor del ángulo de ajuste de fases θ correspondiente al índice de refracción de (2.7) mediante:

$$\theta = \frac{\pi}{2} - \cos^{-1} \left(\frac{\sqrt{n_{sf}^e{}^2 - n_{sf}^o{}^2}}{\sqrt{n_{\lambda_{sf}}^e{}^2 - n_{sf}^o{}^2}} \right) \quad (2.8)$$

Los valores necesarios para obtener θ mediante la expresión (2.8) se calculan usando la ecuación de Sellmeier para determinar el índice de refracción en el eje ordinario

(2.6) a la longitud de onda de la suma de frecuencias (n_{sf}^o) y para el índice de refracción en el eje extraordinario de la longitud de onda correspondiente a la suma de frecuencias ($n_{\lambda_{sf}}^e$).

$$n^{e2}(\lambda(\mu m)) = 2.3753 + \frac{0.01224}{(\lambda^2 - 0.01667)} - 0.015161 \cdot \lambda^2 \quad (2.9)$$

El ángulo de ajuste de fases θ entre el eje óptico del cristal y el vector de onda del haz de suma de frecuencias (\vec{k}_{sf}) se determina así a partir de las ecuaciones (2.3) a (2.9).

En la Figura 2.7 se muestra el ángulo de ajuste de fases en función de la longitud de onda de fluorescencia para dos valores distintos de γ y una longitud de onda del pulso de prueba, $\lambda_p = 800$ nm.

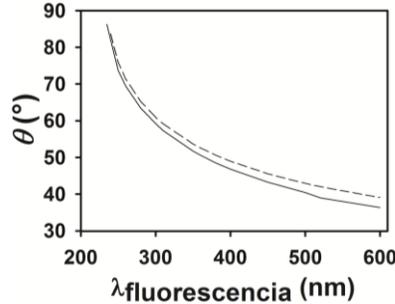


Figura 2.7. Ángulo de ajuste de fases θ en función de la longitud de onda de fluorescencia para un ángulo entre el haz de fluorescencia y el haz de prueba (γ) de $\gamma = 2^\circ$ (línea sólida) y $\gamma = 10^\circ$ (línea punteada); $\lambda_p = 800$ nm.

La resolución temporal del decaimiento de fluorescencia en el experimento de *up-conversion* se logra obteniendo la señal de suma de frecuencias para distintos tiempos de retardo del pulso de prueba respecto al pulso de excitación. El tiempo de retardo se puede cambiar a través de cambiar el camino óptico que recorre el pulso de prueba respecto al camino óptico que recorre el pulso de excitación (ver etapa de retraso en la Figura 2.5 A). Cuando estas dos distancias son iguales se considera $t = 0$, si el pulso de prueba recorre un camino óptico más largo que el pulso de excitación se considera $t > 0$.

La señal que se obtiene del decaimiento de la señal de suma de frecuencias (que es proporcional al decaimiento de fluorescencia) es la convolución de tres señales: el pulso de

excitación, el decaimiento de fluorescencia y el pulso de prueba, como se esquematiza en la Figura 2.8

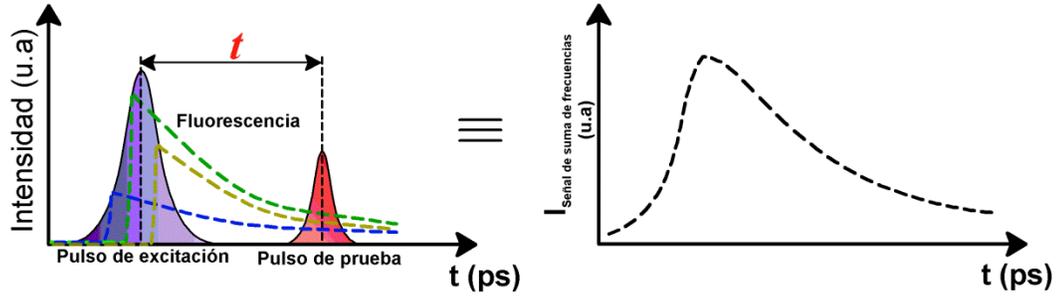


Figura 2.8. Decaimiento de fluorescencia y convolución de señales en el experimento de *up-conversion*.

2.3.1 Polarización de los pulsos de excitación y de prueba, anisotropía de la fluorescencia²

En las Figuras 2.3 y 2.5 se puede observar que existen dos configuraciones para la polarización de los pulsos de excitación y prueba. La primera corresponde al pulso de excitación y el pulso de prueba ambos con polarización vertical, la intensidad de la señal de suma de frecuencias obtenida con esta configuración se denomina como I_{VV} . Una segunda configuración corresponde a los pulsos de excitación y prueba con polarizaciones horizontal y vertical respectivamente (la polarización del haz de excitación puede ser cambiada usando un retardador de fases $\lambda/2$, ver Figura 2.3). La intensidad de la señal de suma de frecuencias obtenida con este segundo esquema se denomina como I_{HV} .

La anisotropía de la fluorescencia se define en el experimento de *up-conversion* como:

$$r = \frac{I_{VV} - I_{HV}}{I_T} = \frac{I_{VV} - I_{HV}}{I_{VV} + 2I_{HV}} \quad (2.10)$$

siendo I_T la intensidad total de la señal de suma de frecuencias. Es posible obtener una expresión para la anisotropía de fluorescencia a partir del momento dipolar de transición para la absorción $\vec{\mu}_{absorción}$, y el ángulo que forma este vector con los ejes de polarización

del pulso de excitación (y o z para la polarización horizontal y vertical respectivamente) θ y ϕ como se esquematiza en la Figura 2.9.

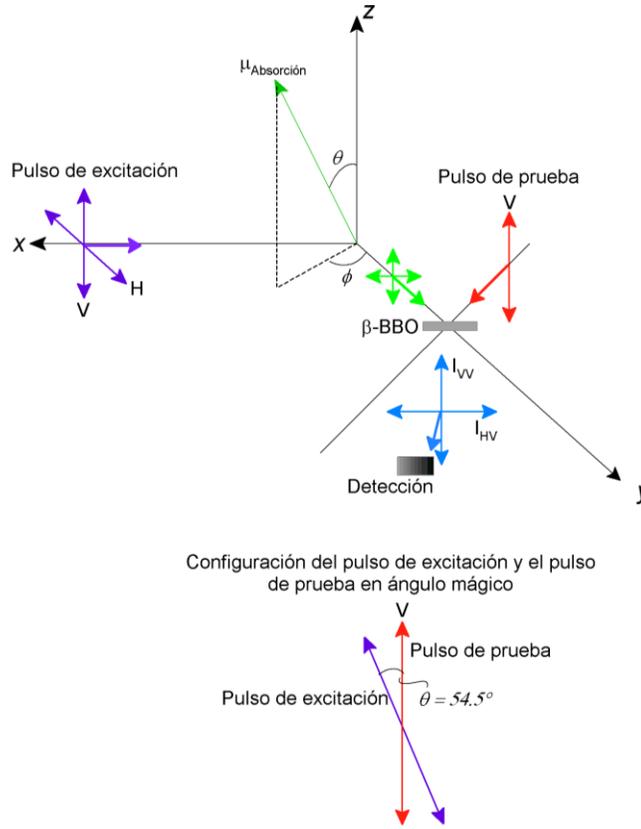


Figura 2.9. Esquemas de polarización del pulso de excitación y el pulso de prueba. H, polarización horizontal; V, polarización vertical; I_{VV} , intensidad de la señal de suma de frecuencias para la configuración del pulso de excitación y de prueba ambos con polarización vertical; I_{HV} , intensidad de la señal de suma de frecuencias para la configuración del pulso de excitación con polarización horizontal y el pulso de prueba con polarización vertical. La configuración donde la polarización del pulso de excitación y el pulso de prueba forman un ángulo $\gamma = 54.7^\circ$ se conoce como ángulo mágico.

Dado que $I_{VV} \propto \cos^2 \theta$ e $I_{HV} \propto \sin^2 \phi \sin^2 \theta$, la contribución correspondiente para I_{HV} se promedia sobre ϕ (de 0° a 90°) con lo cual $I_{HV} \propto 1/2 \sin^2 \theta$. Usando estas expresiones para I_{VV} e I_{HV} y reemplazando en (2.10) obtenemos para la anisotropía:

$$r = \frac{3\cos^2 \theta - 1}{2} \quad (2.11)$$

En la expresión 2.11 cuando $\theta = 54.7^\circ$, $r = 0$, y por ello este valor particular del ángulo θ se conoce como ángulo mágico. Ahora bien, se puede lograr que las contribuciones I_{VV} e I_{HV} sean iguales en un único experimento, cuando el pulso de excitación está polarizado linealmente y su vector de polarización forma un ángulo de 54.7° (ángulo mágico) con respecto al vector de polarización del pulso de prueba, que en nuestro caso consideramos esta polarizado verticalmente, como se esquematiza en la parte baja de la Figura 2.9.

En este caso último caso, la intensidad de la señal de suma de frecuencias medida es directamente proporcional a la intensidad total de la señal (I_T) y se suprimen los efectos de polarización. Finalmente, también se puede estimar la intensidad total de la señal haciendo experimentos independientes para determinar I_{VV} e I_{HV} y utilizar la expresión $I_T = I_{VV} + 2I_{HV}$.

2.4 Detección de la señal de suma de frecuencias y amplificación

La detección de la señal de suma de frecuencias se logra enfocando el haz y seleccionando en el monocromador la longitud de onda respectiva. La señal se detecta usando un tubo fotomultiplicador y es amplificada usando un amplificador tipo *lock-in*.³⁻⁵ Lo anterior se esquematiza en la Figura 2.10.

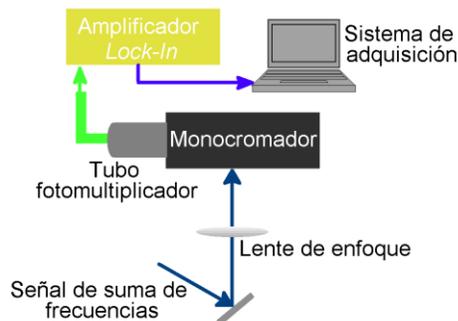


Figura 2.10. Detección, amplificación y adquisición de la señal de suma de frecuencias en el experimento *de up-conversion*.

2.4.1 Amplificador *lock-in*³⁻⁵

Un amplificador tipo *lock-in* se usa para medir señales de una amplitud pequeña, incluso si dicha señal presenta un nivel de ruido considerable. La señal se detecta usando la técnica conocida como detección sensible a la fase. Básicamente, la señal se extrae como una única componente con una frecuencia de referencia y fase específicas. Las señales que forman el ruido y tienen frecuencias diferentes de la frecuencia de referencia se ignoran y no afectan la medida.

En el caso particular del experimento de *up-conversion* el pulso de excitación tiene una frecuencia de pulsación fija (1/3 KHz) y la señal que se detecta en el *lock-in* es la respuesta de un experimento a la frecuencia de pulsación fija. En el diagrama mostrado en la Figura 2.11 se ejemplifica la señal de referencia como una onda cuadrada con frecuencia ω_r . Considerando que la excitación en el experimento se da de forma pulsada. La señal de respuesta estará dada por: $V_{Señal} \text{sen}(\omega_r t + \theta_{Señal})$. El amplificador *lock-in* genera su propia función sinusoidal (referencia *lock-in* en la Figura 2.11): $V_{L-i} \text{sen}(\omega_{L-i} t + \theta_{Ref})$

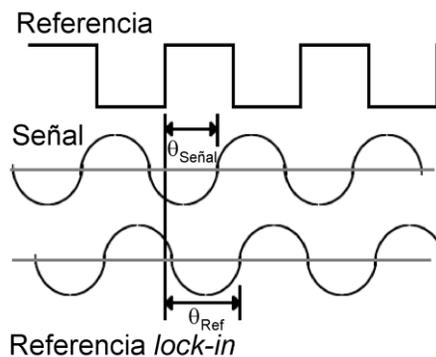


Figura 2.11. Ejemplo de las señales usadas en un amplificador *lock-in*.

La señal es amplificada y multiplicada por la función seno de la referencia *lock-in* usando un detector o multiplicador de la señal sensible a la fase. La señal de salida del detector será el producto de dos funciones seno:

$$V_{Detector} = V_{Señal}V_{L-i}sen(\omega_r t + \theta_{Señal})sen(\omega_{L-i}t + \theta_{Ref})$$

$$V_{Detector} = \frac{1}{2}V_{Señal}V_{L-i}COS([\omega_r - \omega_{L-i}]t + \theta_{Señal} - \theta_{Ref}) - \frac{1}{2}V_{Señal}V_{L-i}COS([\omega_r + \omega_{L-i}]t + \theta_{Señal} + \theta_{Ref}).$$

La señal de salida del detector son dos funciones que oscilan a la diferencia de las frecuencias $(\omega_r - \omega_{L-i})$ y la suma de las frecuencias $(\omega_r + \omega_{L-i})$. Si se cumple que $\omega_r = \omega_{L-i}$ y se remueve de la señal la componente de corriente alterna a la frecuencia $(\omega_r + \omega_{L-i})$, usando un filtro electrónico de paso bajo lo que queda es una señal de corriente directa:

$$V_{Detector} = \frac{1}{2}V_{Señal}V_{L-i}COS(\theta_{Señal} - \theta_{Ref}) \quad (2.12)$$

Esta señal de salida del detector es muy apropiada ya que es proporcional a la amplitud de la señal que se desea medir.

2.5 Tratamiento matemático de las señales obtenidas en experimentos de resolución de fluorescencia por suma de frecuencias

El decaimiento de la señal de suma de frecuencias, que es una medida del decaimiento de la fluorescencia, típicamente tiene la forma mostrada al lado derecho de la Figura 2.8. Esto corresponde a la convolución de tres funciones dependientes del tiempo: el pulso de excitación, el decaimiento de la fluorescencia y el pulso de prueba.

El pulso de excitación y el pulso de prueba se consideran funciones gaussianas y el decaimiento de fluorescencia se asume como una o la combinación lineal de funciones exponenciales representadas por $e^{-\frac{t-t_r}{\tau}}$. La intensidad de la señal convolucionada ($I_{señal}(t_r)$) en función de la intensidad de los pulsos gaussianos de excitación y de prueba, I_{exc} y I_p respectivamente, está dada por:

$$I_{señal}(t_r) = \int_{t=-\infty}^{t=\infty} \left\{ \int_{t=-\infty}^{t=\infty} I_{exc}(t') \cdot I_p(t - t') dt' \right\} \cdot e^{-\frac{t-t_r}{\tau}} dt \quad (2.13)$$

donde t' y t_r son las variables auxiliares para la convolución.

La convolución de las señales gaussianas del pulso de excitación y el pulso de prueba representada por la integral entre llaves de la expresión (2.13) es otra función gaussiana conocida como la señal de correlación cruzada $I_{cc}(t)$ expresada como:

$$I_{cc}(t) \propto e^{-\frac{t^2}{2\mathfrak{J}_{cc}^2}} \quad (2.14)$$

donde \mathfrak{J}_{cc}^2 se define a través de:

$$\mathfrak{J}_{cc}^2 = \frac{(FWHM_{cc})}{2.35} \quad (2.15)$$

$FWHM_{cc}$ es el ancho a la mitad de la altura máxima de la función de respuesta instrumental que se considera gaussiana y se obtiene experimentalmente.

Mediante un método de ajuste no lineal de mínimos cuadrados (algoritmo de Marquardt-Levenberg) implementado en un software creado para este propósito es posible ajustar los datos obtenidos experimentalmente a la suma de decaimientos exponenciales convolucionados con la función de respuesta instrumental del experimento.

El método trata de minimizar la función χ^2 :

$$\chi^2(a, b, \dots, n) = \sum_{i=1}^N [y_i - f(x_i, a, b, \dots, n)]^2 \quad (2.16)$$

a , b y n son los parámetros variacionales que minimizan la función χ^2 , x_i y y_i corresponden a los datos experimentales a ajustar: las constantes de decaimiento τ en (2.13), $FWHM_{cc}$ en la ecuación (2.15) como parámetro de ajuste de la función de respuesta instrumental.

2.6 Materiales

Los compuestos hipoxantina (HPX), inosina (INS) y alopurinol ribósido (AL-R) se obtuvieron comercialmente (Sigma-Aldrich y Berry & Associates, Inc) con una pureza >99% y se usaron sin realizar procesos de purificación adicionales. Las soluciones acuosas se prepararon disolviendo los compuestos en agua desionizada ultrapura obtenida en un sistema de purificación MILLIPORE (Milli-Q).

El pH de las soluciones para el estudio de las especies monoprotonadas y monodesprotonadas se ajustó usando soluciones acuosas de HCl o NaOH respectivamente. Para los experimentos de resolución temporal la concentración de las soluciones era tal que se obtuviera una absorbancia de ~1 a la longitud de onda de excitación (257 nm o 266nm) en un celda de cuarzo de 1 mm de paso óptico.

Para la obtención de los espectros de emisión de fluorescencia, se prepararon las soluciones de manera tal que la absorbancia fuera menor o igual a 0.05 a la longitud de onda de excitación (250 nm – 266 nm).

Los valores de pK_a de la HPX siendo la especie monoprotonada la especie más ácida son 2.044, 8.643 y 11.550.⁶ De esta forma, en una solución acuosa de pH = 1 predomina la especie monoprotonada (~92%), en la solución acuosa de pH = 10 predomina la especie monodesprotonada (~93%) y en la solución acuosa de pH = 5 predomina la especie neutra (~100 %). Esto se resume en el diagrama de predominio de especies para HPX presentado en la Figura 2.12.

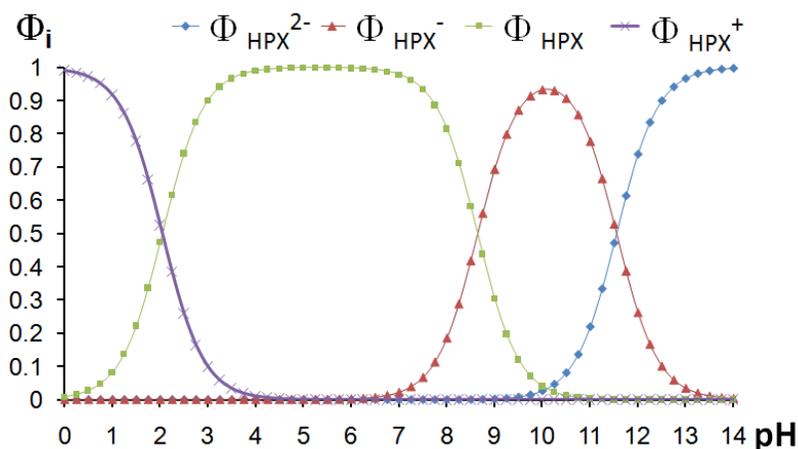


Figura 2.12. Diagrama de predominio de especies en función del pH para hipoxantina. $\Phi_{HPX^{2-}}$, fracción total de especie doblemente desprotonada; Φ_{HPX^-} , fracción total de especie monodesprotonada; Φ_{HPX} , fracción total de especie neutra; Φ_{HPX^+} , fracción total de especie monoprotonada.

Para la INS los valores de pK_a reportados en la literatura son: 0.97, 8.50 y 11.65.⁷⁻⁸ Para estudiar la especie monoprotonada se preparó una solución de INS en HCl 1N (pH ~0). En esta solución predomina la especie monoprotonada (~90%) con una contribución pequeña de la especie neutra. La especie neutra se estudió usando una solución acuosa neutra (pH = 6, predominio >99%) y la especie monodesprotonada se estudió usando una solución básica (pH = 10) donde hay un predominio del 95% de ésta. El diagrama de predominio de especies para INS se muestra en la Figura 2.13.

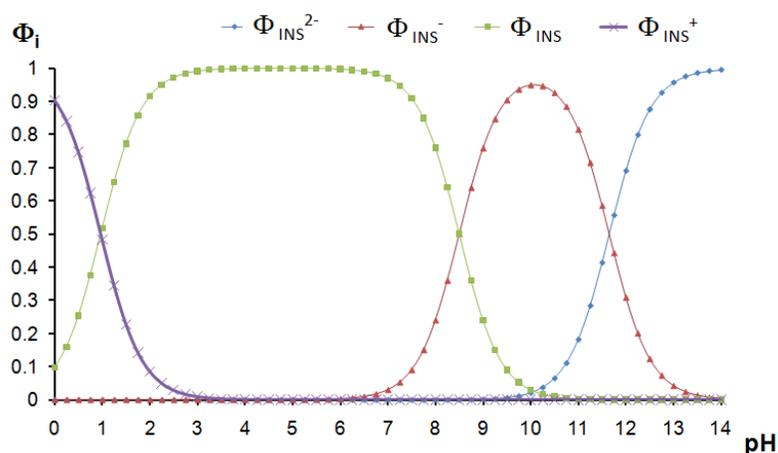


Figura 2.13. Diagrama de predominio de especies en función del pH para inosina. Φ_{INS}^{2-} , fracción total de especie doblemente desprotonada; Φ_{INS}^{-} , fracción total de especie monodesprotonada; Φ_{INS} , fracción total de especie neutra; Φ_{INS}^{+} , fracción total de especie monoprotonada.

El alopurinol ribósido se estudió en solución acuosa neutra, donde es conocido que existe como una sola especie tautomérica.⁹

Referencias

- (1) Xu, J.; Knutson, J. R. In *Methods Enzymol.*; Ludwig, B., Michael, L. J., Eds.; Academic Press: **2008**; Vol. Volume 450, p 159-183.
- (2) Valeur, B. *Molecular fluorescence: principles and applications*; Wiley-VCH, **2002**.

- (3) *Manual de usuario "MODEL SR830 DSP Lock-In Amplifier"*;
Stanford Research Systems: Sunnyvale, California 94089, **2011**.
- (4) Probst, P. A.; Collet, B. *Rev. Sci. Instrum.* **1985**, *56*, 466-470.
- (5) Wolfson, R. *Am. J. Phys.* **1991**, *59*, 569-572.
- (6) Linder, P. W.; Stanford, M. J.; Williams, D. R. *J. Inor. Nucl. Chem.*
1976, *38*, 1847-1849.
- (7) Izatt, R. M.; Christen, J.; Rytting, J. H. *Chem. Rev.* **1971**, *71*, 439-481.
- (8) Tauler, R.; Cid, J. F.; Casassas, E. *J. Inorg. Biochem.* **1990**, *39*, 277-
285.
- (9) Bergmann, F.; Frank, A.; Neiman, Z. *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1*
1979, 2795-2802.

CAPÍTULO 3

MÉTODOS COMPUTACIONALES

En este capítulo se describen los aspectos técnicos de los métodos teórico-computacionales usados para estudiar la fotofísica de los sistemas de interés del presente trabajo. El primer paso fue la optimización de geometría en la superficie de energía potencial del estado basal para posteriormente calcular las energías de transición vertical. La segunda parte fue explorar la superficie de energía potencial del primer estado excitado con el fin de encontrar mínimos globales así como cruces con la superficie de energía potencial del estado basal (ICs S_1 - S_0).

3.1 Cálculo de las energías de transición vertical en la geometría optimizada del estado basal

La optimización de geometría en el estado basal se realizó al nivel de teoría MP2 (“*second order Møller-Plesset perturbation theory*”) usando el conjunto de funciones base cc-pvdz de Dunning (“*correlation-consistent double- ζ plus polarization*”) y restringida a simetría C_s (mínimo de energía con geometría plana verificado por el cálculo de frecuencias).

El uso del conjunto base cc-pvdz se justifica a partir del hecho que los resultados obtenidos con este conjunto en el estudio de la fotofísica de las bases pirimidínicas citosina, timina y uracilo usando métodos MR-CI,¹⁻⁵ son consistentes con los que se han obtenido

usando otras metodologías multi-configuracionales empleando conjuntos base mas extensos.⁴⁻⁷

Las energías de excitación vertical y las fuerzas de oscilador respectivas se calcularon al nivel de teoría SA-CASSCF (“*state average complete active space self consistent field*”) usando un espacio activo de 18 electrones en 13 orbitales moleculares activos (18,13) y el conjunto de funciones base 6-31G+(d). Se promediaron cuatro estados singulete con representación A' (el estado basal y tres estados excitados) y cuatro estados excitados singulete con representación A''. Las energías de excitación vertical se corrigieron al nivel de teoría MR-MP2 (“*multi-reference MP2*”),⁸⁻⁹ usando como función de onda de referencia la obtenida con la metodología SA-4-CASSCF/6-31G+(d)

En todos los sistemas estudiados el espacio activo estaba constituido de tres orbitales moleculares correspondientes a los pares de electrones no enlazantes (uno del átomo de oxígeno y dos de los átomos de nitrógeno) y 10 orbitales moleculares π (seis orbitales π y cuatro orbitales π^*).

El nivel de teoría empleado en este trabajo para el cálculo de las energías de transición vertical y las fuerzas de oscilador se ha usado de forma extensa y exitosamente en el estudio de los estados excitados de sistemas purínicos.¹⁰⁻¹³ Los cálculos descritos en esta sección se realizaron con el paquete computacional GAMESS,¹⁴ y para la visualización de los orbitales moleculares se usó la interfaz gráfica Macmolplt.¹⁵

3.2 Optimización de geometría para el estado S_1 y cálculo de intersecciones cónicas S_1 - S_0

Las energías de los estados S_1 y S_0 se calcularon al nivel de teoría MR-CIS (“*multi-reference configuration interaction with single excitations*”) usando como referencia una

función de onda SA-CASSCF. El espacio activo de la función de onda de referencia CASSCF se conformó de 12 electrones en 9 orbitales moleculares activos (12,9). Se utilizó el conjunto de funciones base de Dunning cc-pvdz, y el promedio de estados se realizó sobre cuatro estados (el estado basal, dos estados π - π^* y un estado n- π^*).

El cálculo de las energías de excitación al nivel de teoría MR-CIS/SA-CASSCF(12,9)/cc-pvdz incluye menos correlación electrónica que el nivel de teoría MR-MP2/SA-CASSCF(18,13)/6-31G+(d), fundamentalmente por el hecho que el espacio activo usado en el primer nivel de teoría es de menor dimensión que el empleado en el segundo nivel de teoría. Sin embargo, se ha observado que la reducción en el nivel de teoría para la optimización del estado S_1 y la búsqueda de ICs S_1 - S_0 es apropiada y no presenta errores sistemáticos.¹⁶

Con el fin de verificar que no existieran cambios en el orden del carácter del estado excitado S_1 , se compararon los resultados obtenidos para las energías de transición vertical (geometría optimizada del estado basal) al nivel de teoría MR-CIS y MR-MP2. En los dos casos el estado S_1 correspondió al estado π - π^* de más baja energía.

El mínimo en la superficie de energía potencial del estado S_1 y el mínimo en la intersección cónica, MXS (“*minimum on the crossing seam*”) fueron calculados a través de algoritmos de gradiente restringido usando las derivadas analíticas de la función de onda MR-CIS. Dicha metodología está implementada en el paquete de química cuántica computacional COLUMBUS 5.9.2,¹⁷ y ha demostrado ser adecuada para la optimización de ICs y la búsqueda de puntos estacionarios en las superficies de energía potencial de los estados excitados en las bases del ADN y sistemas análogos.^{2-3,10,18}

Tanto la optimización del estado excitado (búsqueda del mínimo en la SEP) como la optimización de la IC, se hicieron sin restricciones de simetría a la geometría de la molécula. La existencia de estos puntos particulares en las SEPs así como sus energías relativas nos permitieron establecer un mecanismo para la fotofísica ultrarrápida de los sistemas estudiados.

Referencias

- (1) Kistler, K. A.; Matsika, S. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 8708-8716.
- (2) Kistler, K. A.; Matsika, S. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 2650-2661.
- (3) Matsika, S. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 7584-7590.
- (4) Perun, S.; Sobolewski, A. L.; Domcke, W. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 13238-13244.
- (5) Delchev, V. B.; Sobolewski, A. L.; Domcke, W. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 5007-5015.
- (6) Mercier, Y.; Santoro, F.; Reguero, M.; Imbrota, R. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 10769-10772.
- (7) Merchán, M.; González-Luque, R.; Climent, T.; Serrano-Andrés, L.; Rodríguez, E.; Reguero, M.; Peláez, D. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 26471-26476.
- (8) Hirao, K. *Chem. Phys. Lett.* **1992**, *190*, 374-380.
- (9) Nakano, H. *J. Chem. Phys.* **1993**, *99*, 7983-7992.
- (10) Barbatti, M.; Lischka, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6831-6839.
- (11) Mburu, E.; Matsika, S. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 12485-12491.
- (12) Perun, S.; Sobolewski, A. L.; Domcke, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6257-6265.

- (13) Serrano-Andres, L.; Merchan, M.; Borin, A. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2473-2484.
- (14) Schmidt, M. W.; Baldrige, K. K.; Boatz, J. A.; Elbert, S. T.; Gordon, M. S.; Jensen, J. H.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K. A.; Su, S.; Windus, T. L.; Dupuis, M.; Montgomery, J. A. *J. Comput. Chem.* **1993**, *14*, 1347-1363.
- (15) Bode, B. M.; Gordon, M. S. *J. Mol. Graphics Modell.* **1998**, *16*, 133-138.
- (16) Barbatti, M.; Szymczak, J. J.; Aquino, A. J. A.; Nachtigallova, D.; Lischka, H. *J. Chem. Phys.* **2011**, *134*, 014304.
- (17) Lischka, H.; Müller, T.; Szalay, P. G.; Shavitt, I.; Pitzer, R. M.; Shepard, R. *Wiley Interdisc. Rev: Comput. Mol. Sci.* **2011**, *1*, 191-199.
- (18) Barbatti, M.; Aquino, A. J. A.; Szymczak, J. J.; Nachtigallova, D.; Hobza, P.; Lischka, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2010**, *107*, 21453-21458.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Antes de discutir los resultados experimentales y teóricos es conveniente presentar las estructuras químicas predominantes de los compuestos estudiados en solución acuosa a distinto valor de pH. Los compuestos estudiados en este trabajo pueden ser considerados variantes de las bases nitrogenadas guanina y adenina. En la Figura 4.1 se muestran las estructuras predominantes para cada compuesto en sus formas neutra, monoprotonada y monodesprotonada. Las estructuras mostradas en la Figura 4.1 han sido determinadas por estudios de espectroscopia Raman, UV-Vis y resonancia magnética nuclear, (RMN, ^1H y ^{13}C), así como estudios teóricos.¹⁻¹⁴

Para la HPX neutra (solución acuosa de pH = 5) se considera que el tautómero ceto-N9-H es el que predomina, sin embargo el tautómero ceto-N7-H puede estar presente en una concentración significativa. Los datos estimados para la relación de población de los dos tautómeros en solución acuosa difieren de forma sustancial, tanto los valores estimados experimentalmente como por cálculos de química computacional.

Por lo anterior, no hay consenso en el valor de la concentración de cada tautómero en solución acuosa a temperatura ambiente y aún no existe una medida precisa y confiable de dichas cantidades.^{5,8-9,15-16} Por otra parte, existe un estudio reciente donde se determinó de manera exacta la población de cada tautómero de HPX en metanol-D₄ a 204 K usando

RMN (^1H y ^{13}C), siendo estas 54% para el tautómero ceto-N7-H y 46% para el tautómero ceto-N9-H, a 303 K dichos valores corresponden a 53% y 47% respectivamente.¹⁷

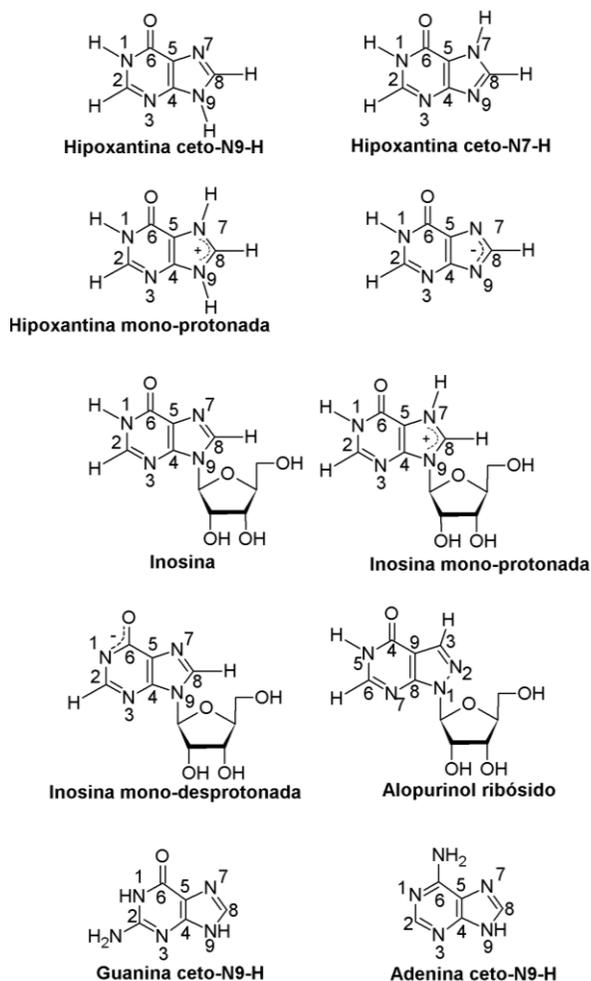


Figura 4.1. Estructuras químicas de las especies estudiadas en este trabajo así como las bases purínicas adenina y guanina.

Las respectivas especies monoprotonada (HPX^+), y monodesprotonada (HPX^-) para HPX han sido establecidas en las referencias 2 y 6, usando espectroscopia UV-Vis y RMN (^1H y ^{13}C) y cálculos de teoría de funcionales de la densidad.¹⁸⁻²⁰ Dado que el equilibrio prototrópico para la HPX neutra se da entre las posiciones N7 y N9 parece lógico suponer que los sitios más lábiles para la protonación y desprotonación son precisamente estos mismos.

Incluso, Sun y Lee⁵ predicen las posiciones N9 y N7 como las más ácidas para los tautómeros ceto-N9-H y ceto-N7-H respectivamente. Los resultados de estos autores también indican. Estos autores también indican que el tautómero ceto-N9-H es el más estable (estructura canónica), en el cual la posición más básica (mayor afinidad protónica) es N7.

Estudios de espectroscopia Raman,³ y espectroscopia de infrarrojo y UV-Vis⁴ han determinado que la única especie tautomérica de la INS presente en solución acuosa es la mostrada en la Figura 4.1. La especie monodesprotonada de INS ha sido propuesta también en la referencia 4.

El estudio realizado por Bergmann *et al.*¹⁴ sugiere que el alopurinol ribósido (AL-R) existe en una sola forma tautomérica (la ceto-N5-H mostrada en la Figura 4.1), la cual se determinó a través de estudios de RMN (¹³C).

El alopurinol neutro en solución acuosa presenta al menos dos especies tautoméricas predominantes, mostradas en la Figura 4.2.^{14,22-23} La población de cada uno de los tautómeros no se ha determinado de forma exacta, aún cuando se han hecho algunas aproximaciones teóricas y experimentales (RMN ¹³C y espectroscopia UV-Vis) para medir estas cantidades.^{14,24-25}

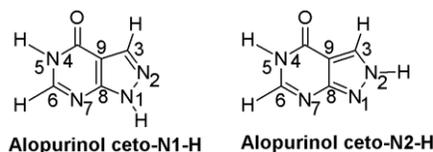


Figura 4.2. Estructuras de los tautómeros más estables de alopurinol en solución acuosa.

La fotofísica de estas especies neutras de alopurinol en solución acuosa ya ha sido estudiada en nuestro grupo de investigación²¹ y es bastante más compleja que la de HPX neutra en solución acuosa donde también coexisten dos tautómeros en solución. En la

presente tesis se estudió el AL-R en solución acuosa dado que esto elimina la complejidad relacionada al tratar con mezclas tautoméricas.

A continuación, se describen y discuten los resultados obtenidos a través de espectroscopia estacionaria (espectros de absorción y emisión) de los sistemas de interés, así como los cálculos computacionales para las transiciones verticales (en la geometría optimizada para el estado S_0).

4.1 Espectroscopia estacionaria de hipoxantina y resultados computacionales para la geometría optimizada del estado basal

4.1.1 Espectros de absorción y energías de transición vertical

En la Figura 4.3 se muestran los espectros de absorción de las especies neutra, monoprotonada y monodesprotonada de HPX en metanol, así como en solución acuosa a distintos valores de pH.

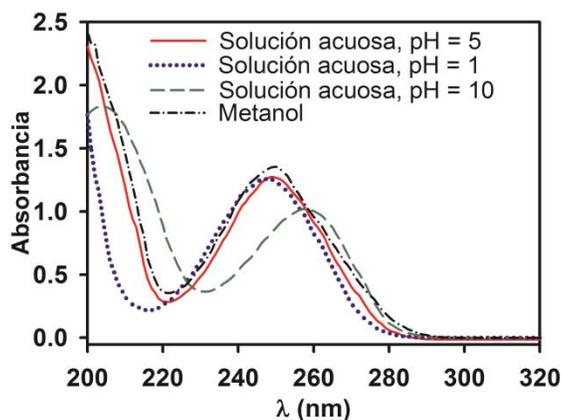


Figura 4.3. Espectros de absorción de hipoxantina en metanol y en solución acuosa a distintos valores de pH.

Los tautómeros neutros de hipoxantina (ceto-N9-H y ceto-N7-H) presentan una sola banda principal de absorción centrada en ~ 250 nm, tanto en solución acuosa (pH = 5) como en metanol (ver Figura 4.3). En solución acuosa es probable que la banda de absorción

principal esté formada por dos transiciones $\pi\text{-}\pi^*$ para cada uno de los tautómeros, como explicaremos a continuación.

Para los dos tautómeros que predominan en solución acuosa las primeras transiciones $\pi\text{-}\pi^*$ son bastante cercanas en energía, como se ha mostrado a través de estudios teóricos de teoría de funcionales de la densidad.^{11,26} Asimismo, en el presente trabajo estas transiciones también son calculadas usando métodos *ab initio* multi-referenciados.

El máximo en la banda de absorción principal de la especie monoprotonada de HPX presenta un pequeño desplazamiento (< 2 nm) hacia el azul (menor longitud de onda) respecto a la especie neutra, en tanto que para la especie monodesprotonada de HPX el desplazamiento es más apreciable (~ 10 nm) y hacia el rojo (mayores longitudes de onda) respecto a la especie neutra.

Las energías de transición vertical así como las fuerzas de oscilador para las transiciones con carácter $\pi\text{-}\pi^*$, $S_0 (^1A')$ \rightarrow $S_n (^1A')$, y las transiciones con carácter $n\text{-}\pi^*$, $S_0 (^1A')$ \rightarrow $S_n (^1A'')$, con $n \geq 1$ se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Energías de transición verticales (eV) calculadas al nivel de teoría MR-MP2 y fuerzas de oscilador calculadas al nivel de teoría CASSCF (18,13) para los primeros tres estados excitados A' y A'' de los tautómeros neutros de hipoxantina.^{a,b}

Sistema	$2 ^1A'$	$3 ^1A'$	$4 ^1A'$	$1 ^1A''$	$2 ^1A''$	$3 ^1A''$
HPX-ceto-N9-H	4.485 (0.146)	5.442 (0.029)	6.103 (0.001)	5.252	5.282	5.446
HPX-ceto-N7-H	4.637 (0.101)	5.252 (0.026)	6.225 (0.192)	4.876	5.146	6.056

^aPara la 9-metil-hipoxantina las energías de transición vertical reportadas son 4.41 eV, 5.18 eV, 6.04 eV y 6.42 eV en fase gaseosa y 4.59 eV, 4.77 eV, 4.98 eV y 6.2 eV en solución acuosa a pH 6.1.²⁷ El máximo en el espectro de absorción de hipoxantina en solución acuosa de pH = 5 es 4.98 eV (reportado en este trabajo). ^bLas fuerzas de oscilador aparecen en paréntesis.

Los resultados de la Tabla 4.1 confirman que cada tautómero de HPX tiene dos transiciones π - π^* de baja energía con una fuerza de oscilador significativa que deben ser las responsables de la banda de absorción centrada en 250 nm (4.98 eV). Como se mostrará más adelante, el cálculo de las energías de transición vertical es esencial para describir la fotofísica observada para HPX en metanol, dado que en este disolvente, como ya se comentó, los dos tautómeros están presentes aproximadamente en la misma proporción.

En la Tabla 4.2 se muestran los resultados de las energías de transición vertical para las especies monoprotonada y monodesprotonada de HPX calculadas de la misma manera como se ha descrito para los tautómeros neutros de HPX.

Tabla 4.2. Energías de transición vertical (en eV) calculadas al nivel de teoría MR-MP2 y fuerzas de oscilador calculadas al nivel de teoría CASSCF (18,13) para los tres primeros estados excitados A' y A'' de las especies monoprotonada y monodesprotonada de hipoxantina.^{a,b}

Sistema	$2^1A'$	$3^1A'$	$4^1A'$	$1^1A''$	$2^1A''$	$3^1A''$
HPX ⁺	4.520 (0.049)	4.678 (0.244)	5.927 (0.001)	4.616	5.334	5.756
HPX ⁻	5.039 (0.031)	5.222 (0.123)	5.609 (0.024)	4.910	4.915	5.057

^aEl máximo en el espectro de absorción en solución acuosa de pH = 1 (hipoxantina monoprotonada) y pH = 10 (hipoxantina monodesprotonada) es 5.00 eV y 4.80 eV (reportados en este trabajo). ^bLas fuerzas de oscilador aparecen en paréntesis.

Para la especie monodesprotonada de HPX los cálculos de las transiciones verticales al nivel de teoría MR-MP2 predicen que la transición de más baja energía ($S_0 \rightarrow 2^1A'$) tiene carácter π - π^* . Esta transición junto con la siguiente del mismo tipo ($S_0 \rightarrow 3^1A'$), sustentan la banda de absorción alrededor de 250 nm observada para la especie monoprotonada de HPX en solución acuosa (ver Figura 4.3).

Por otra parte, las dos primeras transiciones de más baja energía para la especie monodesprotonada de HPX reportadas en la Tabla 4.2 son de tipo n - π^* ($S_0 \rightarrow 1^1A''$ y S_0

→ $2^1A'$) y las transiciones π - π^* que dan origen a la banda de absorción se localizan a energías mayores. Este ordenamiento de las transiciones puede explicar el corrimiento del espectro de hipoxantina monodesprotonada (pH = 10) hacia el rojo, comparado con las especies neutras y monoprotonada (ver Figura 4.3).

Es importante destacar que nuestro trabajo es el primero en reportar las energías de transición vertical para el tautómero ceto-N7-H, la especie monoprotonada y la especie monodesprotonada de HPX usando una metodología *ab-initio* de alto nivel (MR-MP2).

4.1.2 Análisis de los estados π - π^* en las especies neutras, monoprotonada y monodesprotonada de hipoxantina

Los estados electrónicos π - π^* , que pertenecen a la representación A' en el grupo de simetría C_s pueden ser etiquetados adicionalmente con la nomenclatura propuesta por Platt que típicamente se aplica a moléculas asimétricas. Es común que los dos estados π - π^* de más baja energía que pertenecen a la representación A' tengan valores de energía cercanos, por lo cual están fuertemente acoplados y es deseable diferenciarlos de alguna forma.

De esta manera, los estados que se etiquetan como 1L_a o 1L_b se pueden diferenciar a través de sus propiedades electrónicas. Generalmente, los vectores de momento dipolar de transición para la excitación desde el estado basal hacia cada uno de estos dos estados excitados están orientados de forma diferente y comúnmente estos vectores son casi ortogonales.²⁸

Resumiendo, la etiqueta 1L_a se asigna al estado con una contribución mayoritaria de la FCE construida por la excitación simple HOMO → LUMO y la etiqueta 1L_b se asigna al estado con una contribución mayoritaria de la FCE construida por la excitación simple HOMO → LUMO+1.²⁹ La Tabla 4.3 muestra las contribuciones de las FCE a los estados

$^1A'$ ($\pi-\pi^*$) y la orientación de los vectores de momento dipolar de transición respectivos.

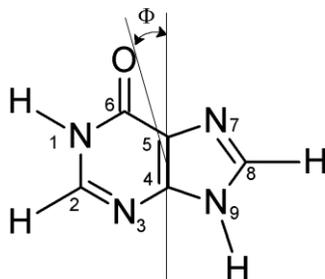
Tabla 4.3. Contribuciones de las funciones de configuración de estado (FCE) a los estados excitados $2^1A'$ y $3^1A'$ de hipoxantina (HPX) neutra (tautómeros cetó-N9-H y cetó-N7-H), monoprotonada y monodesprotonada.^a

Sistema	FCE	$2^1A'$ (%) ^b	$3^1A'$ (%)
HPX cetó-N9-H	H → L	62	2.6
	H → L +1	3.3	36
	H - 1 → L	0.4	29
	H - 2 → L	2.6	1.2
HPX cetó-N7-H	H → L	58	2.5
	H → L +1	6.2	35
	H - 1 → L	0.5	24
	H - 2 → L	2.3	1.0
HPX ⁺	H → L	48	19
	H → L +1	15	44
	H - 1 → L	< 0.1	3.1
	H - 2 → L	0.3	< 0.1
HPX ⁻	H → L	80	0.4
	H → L +1	< 0.1	42
	H - 1 → L	0.6	24
	H - 2 → L	1.0	0.9

^aLos valores en paréntesis son las direcciones de los momentos dipolares de transición (Φ) en grados ($^\circ$) de acuerdo a la convención de Tinoco – DeVoe mostrada a continuación.⁶

^bLos porcentajes de contribución se calcularon como el cuadrado de los coeficientes tomados de la función de onda SA-4-CASSCF(18,13).

Convención de Tinoco-DeVoe



El análisis de la Tabla 4.3 muestra que el estado 1L_a es el primer estado electrónico excitado para los dos tautómeros neutros de HPX. De acuerdo con las energías de la Tabla 4.1 y los datos de la Tabla 4.3 nuestros resultados concuerdan con los reportados para las

transiciones verticales de los tautómeros neutros de HPX al nivel de teoría TD-DFT (“*time-dependent density functional theory*”) y TD-DFT/PCM (“*TD-DFT & polarizable continuum model*”) donde se sugiere que la banda de absorción centrada en 250 nm es una banda compuesta por dos transiciones $\pi\text{-}\pi^*$.^{11,30} Dichas transiciones corresponden en nuestro caso a: $S_0 \rightarrow {}^1L_a$ y $S_0 \rightarrow {}^1L_b$.

Además de las transiciones $\pi\text{-}\pi^*$, nuestros cálculos al nivel de teoría MR-MP2 indican la existencia de cuatro estados con carácter $n\text{-}\pi^*$ de mayor energía que el primer estado con carácter $\pi\text{-}\pi^*$ (1L_a) para los tautómeros neutros y la especie monoprotonada de HPX (ver Tablas 4.1 y 4.2). Los estados $n\text{-}\pi^*$ para adenina y guanina se desestabilizan considerablemente en solución acuosa con respecto a fase gas debido a las interacciones específicas de tipo puente de hidrogeno con el solvente.³¹⁻³²

Los cálculos al nivel de teoría MR-MP2 para las especies monoprotonada y monodesprotonada de HPX muestran que en ambos casos, también existen dos transiciones $\pi\text{-}\pi^*$ ópticamente accesibles (con un valor significativo de la fuerza de oscilador, es decir una probabilidad de transición diferente de cero) en la región de la primera banda de absorción respectiva (ver Tabla 4.2).

El primer estado excitado con carácter $\pi\text{-}\pi^*$ de las especies HPX^+ y HPX^- tiene la etiqueta 1L_a y la transición a este estado tiene una fuerza de oscilador de ~25% la correspondiente a la transición $S_0 \rightarrow {}^1L_b$ ($\pi\text{-}\pi^*$) (ver Tablas 4.2 y 4.3). Nuestros cálculos MR-MP2 para HPX^- predicen la existencia de dos estados $n\text{-}\pi^*$ cercanos en energía al estado que se accede ópticamente, 1L_a ($\pi\text{-}\pi^*$) de HPX^- . Como fue discutido para las especies neutras, es probable que la banda de absorción principal (centrada en ~250 nm para HPX^+ y ~260 nm para HPX^-) sea una banda compuesta de dos transiciones $\pi\text{-}\pi^*$

siendo el estado 1L_a el de más baja energía.

En resumen, el primer estado excitado singlete de tipo $\pi-\pi^*$ de las distintas especies estudiadas de HPX tiene la etiqueta 1L_a . En términos de excitaciones entre orbitales moleculares esto corresponde a una transición con carácter principalmente HOMO \rightarrow LUMO. Adicionalmente, la primera banda de absorción observada está compuesta de las dos transiciones $\pi-\pi^*$ de más baja energía ($S_0 \rightarrow ^1L_a$ y $S_0 \rightarrow ^1L_b$). Estas características espectrales también han sido establecidas y estudiadas ampliamente para la guanina.^{6,29,33-34}

4.1.3 Espectros de emisión de fluorescencia

Las especies neutras de HPX en solución acuosa no presentaron emisión de fluorescencia detectable usando $\lambda_{\text{excitación}} = 250 \text{ nm} - 266 \text{ nm}$, por lo que no fue posible obtener un espectro de emisión estático preciso. Esto indica un rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ_F) menor de 10^{-4} .

La Figura 4.4 muestra los espectros de emisión para las especies monoprotonada y monodesprotonada de HPX. La emisión en estos sistemas es bastante débil y su espectro se distribuye en un amplio intervalo de longitudes de onda desde $\sim 300 \text{ nm}$ hasta $\sim 440 \text{ nm}$.

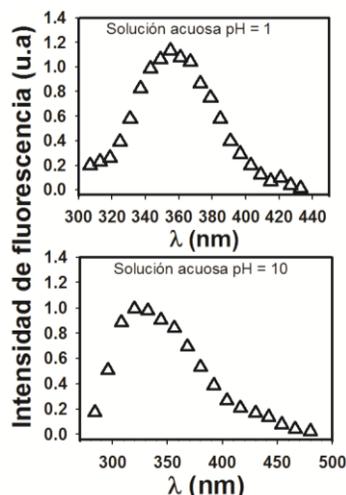


Figura 4.4. Espectros de emisión de hipoxantina monoprotonada (pH = 1) y monodesprotonada (pH = 10) en solución acuosa.

4.2 Espectroscopia estacionaria de inosina (INS)

La Figura 4.5 muestra los espectros de absorción para las especies neutra (pH = 6), monodesprotonada (pH = 10) y monoprotónada (HCl 1N) de inosina.

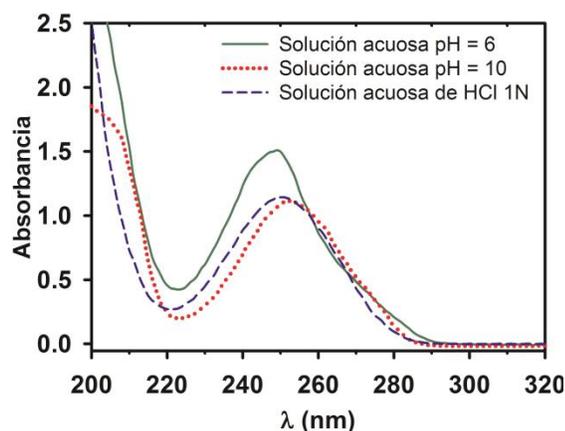


Figura 4.5. Espectros de absorción de inosina en solución acuosa a distintos valores de pH.

La banda principal de absorción para la INS neutra se puede descomponer como una transición principal centrada en 249 nm y una segunda transición entre 260 nm y 290 nm, como se discutirá a continuación. Esta banda característica ha sido reportada también en el espectro de absorción de 9-metil-HPX en solución acuosa (pH = 6.1) y ha sido relacionada con la presencia de dos transiciones fuertes, una predominante entre 259 nm – 277 nm y otra centrada a ~249 nm.⁷

Las características espectrales del tautómero ceto-N9-H de HPX (sección 4.1) se pueden extrapolar a la INS dado que los dos sistemas tienen el mismo patrón de sustitución en el cromóforo principal HPX (N9-H para HPX y N9-ribosa para INS). Por esto, se puede inferir que la banda principal de absorción de las especies de INS está compuesta por dos transiciones π - π^* . Lo anterior ha sido demostrado experimentalmente usando espectroscopia de dicroísmo circular magnético,²⁶ ya que esta técnica permite descomponer bandas de absorción que están sobrepuestas en el espectro de absorción UV-Vis y además

permite obtener la orientación relativa de los momentos dipolares de transición de las transiciones involucradas.

Voelter *et al.*²⁶ determinaron que para la INS en solución acuosa (pH = 7) la banda centrada a ~248 nm está compuesta de dos transiciones ópticamente activas con carácter π - π^* la primera a 263 nm y la segunda a 242 nm. El ángulo relativo entre los vectores de momento dipolar de transición determinado para estas dos transiciones fue 72° .²⁶ Este trabajo también mostró que las características espectroscópicas para la INS en solución acuosa de pH = 7 no difieren de las observadas a pH = 2, es decir, la especie neutra y protonada de INS tienen la misma banda principal compuesta por dos transiciones π - π^* .

En cuanto a los espectros de emisión de la inosina no fue posible obtener señales de emisión de fluorescencia medibles en solución acuosa a ninguno de los valores de pH usados y a temperatura ambiente, esto implica un ϕ_F menor de 10^{-4} . El espectro de emisión de fluorescencia de inosina neutra y monodesprotonada ha sido obtenido a muy baja temperatura (~77 K) en una solución buffer de acetato 0.1 M con 0.25% de glucosa, el espectro es similar para las dos especies y se caracteriza por ser ancho, desde 294 nm hasta 357 nm con un máximo a ~317 nm.³⁵

4.3 Decaimiento de los estados excitados de hipoxantina e inosina neutra

En esta sección se presentan los resultados de la dinámica de decaimiento del estado excitado S_1 de HPX e INS neutra. Cabe recordar que el nucleósido INS permite inferir el comportamiento del tautómero ceto-N9-H de HPX, ya que al sustituir en N9 por ribosa se impide el tautomerismo prototrópico entre las posiciones N7 y N9 de HPX.

Las soluciones acuosas a temperatura ambiente fueron excitadas a 257 nm y la desactivación del estado excitado que ocurre en la escala de decenas de fs fue resuelta en el

tiempo detectando la emisión de fluorescencia a 350 nm usando la técnica de resolución de fluorescencia por suma de frecuencias.

4.3.1 Fotofísica de las especies neutras de hipoxantina e inosina

Nuestros resultados muestran que en solución acuosa, los dos tautómeros predominantes de HPX así como la INS, presentan tiempos de decaimiento ultracortos ($\tau < 0.2$ ps), como se observa en la Figura 4.6. Una función de respuesta instrumental gaussiana con un ancho temporal a la mitad del máximo (FWHM) de ~ 550 fs permite obtener una resolución temporal de ~ 200 fs e. g., ver la parte inferior de la Figura 4.6 y la sección 2.5. De acuerdo a lo anterior para los ajustes exponenciales convolucionados con la función de respuesta que den constantes de decaimiento $\tau < 200$ fs solamente se puede establecer que el decaimiento de dicha señal ocurre en una escala de tiempo menor a este valor.

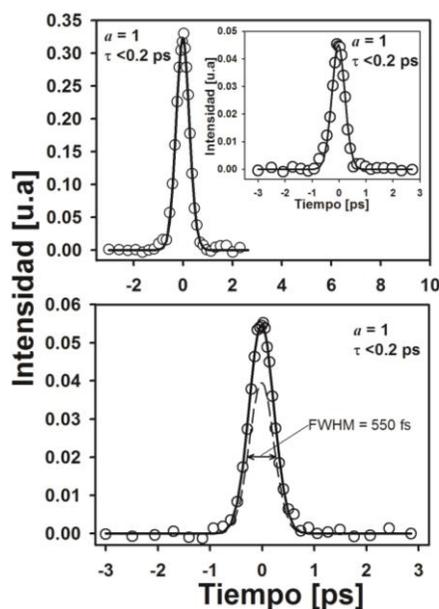


Figura 4.6. Experimentos de decaimiento de fluorescencia por suma de frecuencias para hipoxantina (superior) e inosina (inferior) en solución acuosa de pH = 5 y pH = 6 respectivamente. Recuadro solución de hipoxantina en metanol. $\lambda_{\text{excitación}} = 257$ nm y $\lambda_{\text{detección}} = 350$ nm. Las líneas sólidas representan ajustes de decaimientos exponenciales ($a \cdot e^{-t/\tau}$) convolucionados con la función de respuesta instrumental gaussiana (FWHM ~ 550 fs) a través de un método no lineal de mínimos cuadrados. La línea punteada representa la función de respuesta instrumental gaussiana.

El decaimiento monoexponencial ultrarrápido de la emisión ($\tau < 0.2$ ps) de la HPX en solución neutra y en metanol implica que los dos tautómeros predominantes a $\text{pH} = 6$ no difieren en el tiempo de vida del estado excitado S_1 . Asimismo, este decaimiento ultrarrápido implica que el proceso de conversión interna mediado por la presencia de una IC altamente accesible entre el estado S_1 y S_0 es muy eficiente.

Los resultados mostrados en la sección 4.1 (Tablas 4.1 y 4.3) así como cálculos previos al nivel de teoría TD-DFT^{11,30} (en fase gas e incluyendo los efectos del solvente explícitamente) y con métodos multi-configuracionales,³⁰ son consistentes en la asignación del primer estado excitado como un estado $\pi\text{-}\pi^*$ ópticamente activo (1L_a para los dos tautómeros neutros de HPX). Esto implica que la emisión detectada en todos los sistemas de este estudio corresponde a la emisión de fluorescencia desde el primer estado excitado emisivo, $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu$.

A partir de los resultados de resolución temporal de la fluorescencia y lo que se ha expuesto en el párrafo anterior podemos inferir que existe un proceso de CI, $S_2 \rightsquigarrow S_1$, casi instantáneo que alimenta de población el estado fluorescente S_1 , toda vez que la excitación láser a 257 nm es sobre la banda compuesta por dos transiciones $\pi\text{-}\pi^*$, como ya se discutió.

En otras palabras, la energía de excitación usada en los experimentos de resolución temporal de fluorescencia, puede en principio generar moléculas en el estado 1L_a ó 1L_b , que evolucionarán de la forma $^1L_b \rightsquigarrow S_1$ (1L_a) $\rightarrow S_0 + h\nu$ ó S_1 (1L_a) $\rightarrow S_0 + h\nu$. Este mecanismo de desactivación de los estados excitados ópticamente activos (1L_a y 1L_b) también ha sido documentado ampliamente para la guanina.^{31,36-37}

Aunque en solución acuosa se reconoce la presencia de dos tautómeros predominantes de HPX pero sin un valor exacto para la concentración de cada uno de ellos,

es posible inferir indirectamente de los decaimientos de fluorescencia de HPX en metanol (recuadro de la Figura 4.6) y de INS en agua (Figura 4.6 inferior) que los dos tautómeros neutros de HPX tienen un tiempo de vida del estado excitado ultracorto ($\tau < 0.2$ ps).

Lo anterior se deduce recordando que en metanol-D₄ se conoce de forma precisa la población tautomérica (53% – 54% para el tautómero ceto-N7-H), como ya fue señalado, y que el compuesto HPX en metanol presenta un decaimiento monoexponencial. Además, la INS que tiene el mismo patrón de sustitución que el tautómero ceto-N9-H de HPX, también muestra un decaimiento monoexponencial del estado excitado ($\tau < 0.2$ ps).

De acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla 4.1 la primera transición para los dos tautómeros neutros de HPX tienen una fuerza de oscilador comparable, lo que implica que para las dos especies se genera una población de moléculas en el estado excitado significativa y cercana al mismo valor (considerando una población de tautómeros en el estado basal casi equivalente). Por lo cual, la contribución de cada tautómero a la emisión de fluorescencia resuelta en el tiempo $S_1 \xrightarrow{k_R} S_0 + h\nu$ es de intensidad comparable. La intensidad de emisión de fluorescencia está determinada por la constante radiativa, k_R , y la población inicial de tautómeros en el estado S_0 .³⁸

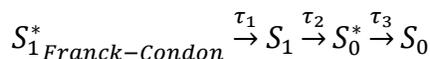
La INS debe mostrar una fotofísica similar a la del tautómero ceto-N9-H de HPX, dado que para los dos sistemas la posición N7 es de tipo imínico, y el N9 tiene hibridación sp^3 , formando un enlace σ con un H (HPX ceto-N9-H) o una ribosa (INS). El decaimiento ultrarrápido de la fluorescencia en INS (detectado a 350 nm) mostrado en la Figura 4.6 que se ajusta a un decaimiento monoexponencial ($\tau < 0.2$ ps), es completamente consistente con el decaimiento ultrarrápido del estado S_1 para el tautómero ceto-N9-H de HPX.

Este resultado para la INS junto con los resultados para los tautómeros neutros de HPX (ceto-N7-H y ceto-N9-H) confirman que el cromóforo purínico neutro que es el biológicamente relevante en el tipo de sistemas estudiados en este trabajo tiene un tiempo de decaimiento del estado S_1 intrínsecamente ultrarrápido independiente de cuál sea la posición de tipo imínico, N7 o N9.

La fotofísica de las especies neutras de HPX e INS en solución ha sido estudiada recientemente usando las técnicas de absorbancia transitoria y de resolución temporal de fluorescencia por suma de frecuencias.³⁹⁻⁴⁰ Chen & Kohler⁴⁰ reportan un tiempo de vida del estado excitado S_1 de 130 ± 20 fs. Adicionalmente, la detección de la absorbancia transitoria a 250 nm indicó que el proceso de relajación vibracional (enfriamiento vibracional) desde los estados vibracionales de alta energía hacia los de baja energía en el estado electrónico S_0 , S_0 (“hot”) \rightsquigarrow S_0 (“cold”), que toma lugar luego del proceso de conversión interna desde S_1 hacia S_0 ocurre en una escala de ~ 2.3 ps.

Temps *et al.*³⁹ concluyeron que la INS y la HPX presentan un mecanismo de decaimiento del estado excitado con subsecuente relajación vibracional hacia los niveles vibracionales de baja energía del estado S_0 . Los autores describen la dinámica de desactivación del estado ópticamente activo S_1 (π - π^*) a través de tres eventos que ocurren a diferentes velocidades. El más rápido de todos ($\tau_1 \leq 0.1$ ps) corresponde a la relajación inicial del estado excitado ópticamente activo de las moléculas en la región de Franck-Condon de S_1 , $\tau_2 = 0.21 \pm 0.08$ ps corresponde al tiempo de vida del estado excitado con respecto a la CI hacia S_0 . Se sugiere que el proceso de CI está mediado por una IC a la que se accede de forma directa y sin barrera de energía. Un tercer proceso ($\tau_3 = 1.80 \pm 0.4$ ps) describe la recuperación de la población inicial en el estado basal luego de que el sistema

ha transitado la región de la IC. Los tres procesos descritos se representan en el Esquema 4.1.



Esquema 4.1 Modelo de desactivación del estado excitado S_1 propuesto por Temps *et al.*³⁹

El trabajo de Temps *et al.*³⁹ empleó la técnica de absorbancia transitoria excitando la muestra inicialmente con un pulso de luz láser de 260 nm, así como la técnica de resolución temporal de fluorescencia por suma de frecuencias usada en el presente trabajo.

Nuestros resultados⁴¹ muestran un tiempo de vida del estado excitado S_1 ultracorto ($t < 0.2$ ps) para HPX e INS. Los trabajos de las referencias 39 y 40 coinciden en que el tiempo de vida del estado excitado S_1 de HPX (130 ± 20 fs) es el más corto reportado hasta la fecha para una base purínica natural o modificada. Este tiempo es incluso más corto que el reportado para el tautómero ceto-N9-H de adenina (~ 180 fs).⁴² Por otra parte, el decaimiento del estado excitado S_1 de HPX es diferente al reportado para la guanosina que presenta un decaimiento biexponencial en solución ($\tau_1 = 0.16$ ps y $\tau_2 = 0.78$).^{31,36} La primer componente del decaimiento corresponde a la relajación desde el estado de Franck-Condon del estado S_1 hacia dos tipos de regiones en la SEP, la primera caracterizada por la existencia de un punto estacionario donde la molécula tiene geometría plana y la segunda relacionada con la existencia de un mínimo de energía correspondiente a una geometría distorsionada de la planicidad. La segunda componente del decaimiento del estado excitado corresponde al proceso de CI desde la región en la SEP relacionada con el mínimo de energía del estado S_1 hacia el estado S_0 .³¹

Esta diferencia en la desactivación del estado excitado S_1 entre HPX o INS y guanosina, puede ser interpretada en términos de una mayor accesibilidad a la IC en HPX o

INS en comparación con guanina, como se mostrará más adelante.

4.3.2 Cálculo de las intersecciones cónicas para los tautómeros neutros de hipoxantina

La Tabla 4.4 muestra las energías de transición vertical calculadas al nivel de teoría MR-CIS usando una función de onda SA-4-CASSCF (12,9) para las geometrías optimizadas del estado basal de los tautómeros ceto-N9-H y ceto-N7-H de hipoxantina. Debido a las diferencias que tienen la metodología MR-MP2 y la metodología MR-CIS al tratar la correlación electrónica, las energías de transición vertical calculadas al nivel MR-CIS difieren de las calculadas al nivel MR-MP2 (ver Tabla 4.1).

El método MR-CIS/SA-4-CASSCF (12,9) recupera una menor parte de la correlación electrónica comparado con el método MR-MP2/SA-4-CASSCF (18,13), dado que la dimensión del espacio activo es más pequeña en el primero, por lo cual las energías de transición vertical calculadas difieren significativamente al comparar las dos metodologías. Como ejemplo se muestra en la Tabla 4.1 las energías de transición vertical para el estado S_1 calculadas a diferentes niveles de teoría (diferentes niveles de correlación electrónica) para el tautómero ceto-N9-H de guanina.⁴³

Para los tautómeros ceto-N9-H y ceto-N7-H de HPX no se encontraron puntos estacionarios de mínima energía en la SEP del estado S_1 usando el nivel de teoría MR-CIS junto con el algoritmo de optimización GDIIS (“*geometry optimization by the direct inversión of the iterative subspace*”).

Tabla 4.4. Energías de transición vertical (en eV) para el estado S_1 (π - π^*) y energía de las intersecciones cónicas S_1 (π - π^*)- S_0 (en eV) para los tautómeros relevantes de hipoxantina y guanina.

Energías de transición vertical ^a		
Guanina cetó-N9-H		
MR-CIS ⁴³	CASPT2 ²⁹	CASPT2 ⁴⁴
5.82	4.93	4.51
Guanina cetó-N7-H / CASPT2		
4.37 ⁴⁵		
HPX cetó-N9-H		
MR-CIS	MR-MP2	
5.30	4.48	
HPX cetó-N7-H		
MR-CIS	MR-MP2	
5.88	4.64	
Energías para las intersecciones cónicas S_1 (π - π^*)- S_0 ^{a,b}		
Guanina cetó-N9-H		
MR-CIS ⁴³	CASPT2 ²⁹	CASPT2 ⁴⁴
4.07 (1.75) E ₂	4.3 (0.63) ² E	3.4 (1.11) E ₂
Guanina cetó-N7-H / CASPT2 ⁴⁵		
4.02 (0.35)		
HPX cetó-N9-H		
MR-CIS	MR-MP2	
3.79 (1.51) E ₂	3.65 (0.83)	
HPX cetó-N7-H		
MR-CIS	MR-MMP2	
3.65 (2.23) E ₂	3.58 (1.05)	

^aLa energía se calculó tomando como referencia la energía del sistema en la geometría optimizada del estado basal al mismo nivel de teoría usado para calcular la energía de transición vertical y la de la intersección cónica. ^bE₂ y ²E se refieren a los términos para la configuración geométrica de la intersección cónica de acuerdo a la nomenclatura de Boeyens para sistemas heterocíclicos. Los valores en paréntesis son las diferencias de energía para el estado S_1 en la región de Franck-Condon y en la intersección cónica S_1 (π - π^*)- S_0 , (ΔE_{FC-CI}).

Sin embargo, se localizaron puntos estacionarios con geometría plana para los dos tautómeros. Usando el algoritmo GDIIS implementado en COLUMBUS 5.9.2⁴⁶ se localizó y optimizó el mínimo en el cruce de las SEPs de los estados S_1 (π - π^*) y S_0 , MXS o también llamado punto de mínima energía en la IC S_1 (π - π^*)- S_0 .

Las energías relativas del MXS para los tautómeros neutros de HPX se presentan en la Tabla 4.4. La geometría para el MXS (Figura 4.7) es bastante distorsionada de la planicidad (E_2 en la nomenclatura propuesta por Boeyens⁴⁷). Adicionalmente, este tipo de estructuras para los MXS también se ha encontrado en guanina ceto-N9-H y ceto-N7-H. Para la intersección cónica fotofísicamente relevante encontrada por Serrano-Andrés *et al.* en guanina ceto-N9-H los parámetros geométricos importantes son: $r(\text{C4C5}) = 1.453 \text{ \AA}$ y $d(\text{C6N1C2N3}) = -73.605^\circ$.²⁹ Domcke *et al.*⁴⁴ reportaron $d(\text{C4N3C2N1}) = 69^\circ$ y 72.5° para dos intersecciones cónicas encontradas en guanina ceto-N9-H. Yamazaki & Domcke⁴⁵ reportan $d(\text{C4N3C2N1}) = 71^\circ$ para la geometría de la intersección cónica encontrada en guanina ceto-N7-H. Estos valores son comparables con los que hemos encontrado para el MXS de las ICs en los tautómeros neutros de HPX, como se muestra en la Figura 4.7.

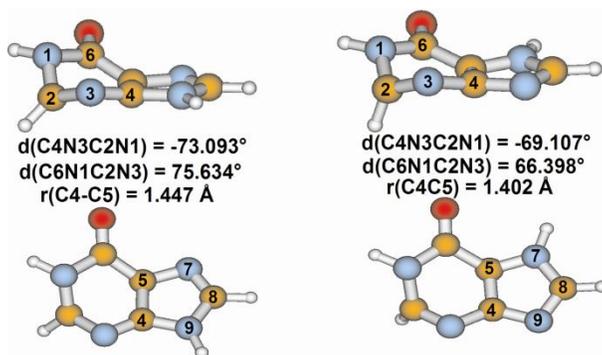


Figura 4.7. Geometrías en el mínimo del cruce de las superficies de energía potencial S_1 (π - π^*) y S_0 , MXS, para hipoxantina ceto-N9-H (izquierda) y ceto-N7-H (derecha).

La distorsión de la geometría se debe principalmente al movimiento fuera del plano y en sentido opuesto de los átomos C2 y N3, tanto en HPX como en guanina. Esto se puede describir cuantitativamente a través del parámetro de pérdida de planicidad, Q (“ring puckering parameter”) propuesto por Cremer y Pople.⁴⁸ Básicamente, $Q = 0$ cuando la molécula tiene una geometría plana y cambia hacia valores positivos a medida que la geometría deja de ser plana.

En la Tabla 4.4 se muestran las energías calculadas al nivel MR-MP2 para las ICs encontradas al nivel MR-CIS, para corregir las energías MR-CIS/SA-4-CASSCF (12,9) a un nivel de teoría más alto, MR-MP2/SA-4-CASSCF (18,13), como el usado en la sección 4.1. Es importante mencionar que al nivel de teoría MR-MP2 los estados S_1 y S_0 no son degenerados para la IC calculada al nivel MR-CIS ($\Delta E_{S_1-S_0} = 0.43 \text{ eV}$ para HPX ceto-N9-H y $\Delta E_{S_1-S_0} = 0.39 \text{ eV}$ para HPX ceto-N7-H), por lo cual la energía reportada para las ICs al nivel de teoría MR-MP2 se calculó como el valor medio de las energías de S_1 y S_0 . Estas energías son menores que las del estado S_1 (1L_a) en la geometría de Franck-Condon (S_0 min) como se espera para una IC que sea accesible desde el estado excitado inicial.

La diferencia de energía entre S_1 y S_0 calculada al nivel MR-MP2 para el MXS indica que esta geometría (encontrada al nivel de teoría MR-CIS) es un buen punto de partida para iniciar la búsqueda y optimización de la IC S_1-S_0 al nivel de teoría MR-MP2/SA-4-CASSCF (18,13).

El análisis de la función de onda CASSCF (18,13) para la geometría del MXS calculado con la metodología MR-CIS revela que las contribuciones más importantes a los estados S_1 y S_0 son la excitación simple HOMO \rightarrow LUMO y la determinante de capa cerrada.

La eficiencia de la desactivación por conversión interna depende de que las ICs se localicen a una energía menor que la correspondiente al estado excitado en la región de Franck-Condon (transición vertical). También es necesario que en la región de la SEP que conecta el estado de Franck-Condon con la IC no exista una barrera de energía, es decir, que la IC sea accesible desde el estado de Franck-Condon.

Domcke *et al.*⁴⁴ y Yamasaki *et al.*⁴⁵ evaluaron la accesibilidad a las ICs $S_1(\pi-\pi^*)-S_0$ en guanina construyendo curvas de energía en las cuales el ángulo diedro d(C4N3C2N1) se usó como coordenada de reacción y las energías de los estados $S_1(\pi-\pi^*)$ y S_0 se calcularon al nivel de teoría CASPT2. Lo que se encontró es que las trayectorias desde el estado de Franck-Condon a la IC $S_1(\pi-\pi^*)-S_0$ no presentan barreras de energía para los dos tautómeros de guanina (ceto-N9-H y ceto-N7-H).

Sin embargo, otro estudio usando la metodología TD-DFT predice que la curva de energía para el estado $S_1(^1L_a)$ desde el estado de Franck-Condon hacia la IC S_1-S_0 presenta una región plana, lo cual podría explicar el componente temporal cercano a 1 ps observado en el decaimiento del estado excitado de guanina y otros de sus derivados.^{31,49} La Figura 4.8 resume lo discutido acerca de la accesibilidad a las ICs en guanina.

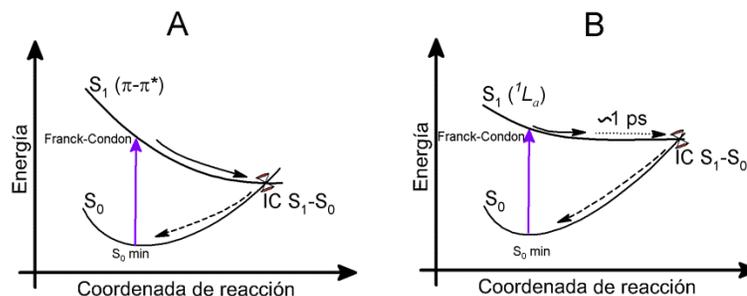


Figura 4.8. Mecanismos de desactivación del estado S_1 propuestos para guanina. A) Sin barrera energética y con el gradiente a favor (Domcke *et al.*⁴⁴ y Yamasaki *et al.*⁴⁵). B) Sin barrera energética pero con una región plana (cerca a la intersección cónica) en la superficie de energía potencial de S_1 (Kovalenko *et al.*³¹). La flecha vertical representa la absorción de luz UV, las flechas curvadas indican la evolución del sistema desde el estado inicial de Franck-Condon hasta retornar al estado basal pasando por la intersección cónica entre los estados S_1 y S_0 .

Dado que en nuestro trabajo no se encontró un mínimo en la SEP del estado S_1 de los tautómeros neutros de HPX, pero en cambio localizamos una IC entre los estados S_1 y S_0 , también se puede inferir en principio una trayectoria directa y sin barrera energética desde el estado de Franck-Condon a la IC. Esto se comprobó construyendo la curva de energía potencial para los estados S_1 y S_0 en HPX ceto-N9-H tomando como coordenada de

reacción el ángulo diedro $d(\text{C6N1C2N3})$, el cual cuantifica la pérdida de planicidad del sistema heterocíclico. Es decir, la geometría en el estado S_1 se optimizó para valores fijos de $d(\text{C6N1C2N3})$.

La optimización de geometría también se hizo al nivel de teoría MR-CIS/SA-4-CASSCF(9,12)/cc-pvdz. Las curvas de energía como función de $d(\text{C6N1C2N3})$ para los estados S_1 y S_0 se construyeron desde S_0 min (región de Franck-Condon del estado S_1) hasta el MXS de la IC S_1 - S_0 , como se muestra en la Figura 4.9.

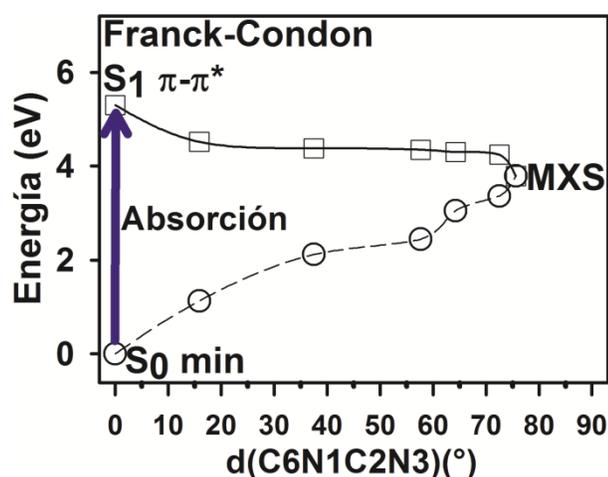


Figura 4.9. Curvas de energía para los estados S_1 y S_0 como función del ángulo diedro $d(\text{C6N1C2N3})$ para hipoxantina cetona-N9-H. Las geometrías se optimizaron para distintos valores de $d(\text{C6N1C2N3})$ en la superficie de energía potencial del estado S_1 al nivel de teoría MR-CIS/SA-4-CASSCF(9,12)/cc-pvdz.

Los resultados de la Figura 4.9 muestran que, la accesibilidad a la intersección cónica es directa desde la región de Franck-Condon del estado S_1 (π - π^*) y sin barrera energética. La principal característica, además de la relajación de energía en la SEP del estado S_1 a medida que la molécula deja de ser plana (el ángulo $d(\text{C6N1C2N3})$ pasa de 0 a $\sim 76^\circ$), es el rápido incremento en la energía del estado S_0 . Este resultado obtenido para HPX cetona-N9-H concuerda con lo encontrado para guanina como se representó en la Figura 4.8.

Adicionalmente, en este trabajo proponemos el cociente de la diferencia de energía entre la región de Franck-Condon para S_1 y la IC S_1-S_0 dividido en el parámetro Q (el cual cuantifica la pérdida de planicidad del sistema heterocíclico), $\Delta E_{FC-IC}/Q$, para evaluar la accesibilidad a la IC en los tautómeros neutros de HPX en comparación con guanina. Los valores de los parámetros involucrados se presentan en las Tablas 4.4 y 4.5.

Tabla 4.5. Parámetro de pérdida de planicidad, Q (Å) y $\Delta E_{FC-IC}/Q$ (eV/Å) para los tautómeros neutros de hipoxantina y guanina ceto-N9-H.

Q, ($\Delta E_{FC-IC}/Q$) ^a		
Guanina-9H		
MR-CIS ⁴³	CASPT2 ²⁹	CASPT2 ⁴⁴
0.51 (3.43)	0.61 (1.03)	0.69 (1.61)
HPX ceto-N9-H		
MR-CIS	MRMP2	
0.62 (2.44)	0.62 (1.33)	
HPX ceto-N7-H		
MR-CIS	MRMP2	
0.53 (4.21)	0.53 (1.98)	

^a ΔE_{FC-IC} son los valores presentados en paréntesis en la Tabla 4.4 y corresponden a la energía en la región de Franck-Condon menos la energía en la intersección cónica S_1-S_0 para el estado S_1 . Los valores de $\Delta E_{FC-CI}/Q$ se presentan en paréntesis después del respectivo parámetro Q.

Como una primera aproximación mientras más grande sea el valor de $\Delta E_{FC-CI}/Q$ se puede considerar que la IC es más accesible, dado que esto refleja una trayectoria donde la energía del estado S_1 decrece de acuerdo con un valor de gradiente grande desde la región de Franck-Condon hacia la IC $S_1(\pi-\pi^*)-S_0$, como se representa en la Figura 4.8 A.

Los valores mostrados en la Tabla 4.5 se deben tomar con reserva dado que distintas metodologías computacionales pueden dar distintas geometrías para las ICs, así como valores de energía para las transiciones verticales y las ICs que pueden diferir. Sin embargo, a partir de nuestros resultados experimentales (Figura 4.6) y los valores calculados de $\Delta E_{FC-CI}/Q$ para guanina ceto-N9-H y los tautómeros neutros de HPX

mostrados en la Tabla 4.5, podemos deducir que las ICs para HPX son altamente accesibles desde el estado ópticamente activo generado por la absorción de luz UV (256 nm), lo cual explica la relajación ultrarrápida para el estado S_1 de HPX.

La diferencia experimental en los tiempos de vida del estado S_1 para HPX e INS (< 0.2 ps) y guanina (~ 0.78 ps) muestra que las moléculas HPX e INS acceden a la IC en una escala de tiempo más corta en comparación con guanina. Esto se discutirá en más detalle a continuación.

4.3.3 Comparación de la fotofísica de hipoxantina y guanina

Uno de los resultados más importantes de nuestro trabajo es que la dinámica de los estados excitados en solución acuosa de HPX e INS es diferente de la que se observa para guanina y guanosina donde la población del estado S_1 muestra un comportamiento biexponencial con $\tau_1 = 0.16$ ps y $\tau_2 = 0.78$ ps (para 2'-deoxi-guanosina).^{31,36} Cálculos al nivel de teoría TD-DFT que además incluyen los efectos del solvente (moléculas de agua incluidas explícitamente en la primera capa de solvatación) sugieren que este comportamiento biexponencial se debe a la evolución en la SEP del estado excitado S_1 empezando desde la región de Franck-Condon y pasando por una región plana en la SEP de S_1 (ver Figura 4.8 B).^{31,50}

El decaimiento ultrarrápido de la emisión de fluorescencia en HPX e INS indica un cambio en la forma de la SEP del estado S_1 en comparación con guanina. El cambio está relacionado probablemente con una trayectoria más favorable que lleva a la IC, lo cual conllevaría a tiempos de vida de fluorescencia más cortos. Esta diferencia está necesariamente asociada a la carencia del grupo amino (-NH₂) en la posición C2 para HPX, lo cual puede cambiar la SEP en la región de la coordenada de reacción.

El decaimiento ultrarrápido de los estados excitados de baja energía de guanina en fase gaseosa muestra un comportamiento biexponencial con $\tau_1 = 0.148$ ps y $\tau_2 = 0.36$ ps, usando una técnica que combina la generación de un haz molecular (fase gas) con experimentos de inicio-prueba usando fotoionización resonante.⁵¹ Estos resultados han sido objeto de variadas interpretaciones con base en resultados de química cuántica computacional.^{29,34,44,52-53}

Serrano Andrés *et al.*²⁹ proponen un modelo fotofísico para la guanina en el cual están involucrados tres estados: S_0 , $S_1(\pi-\pi^*)$ y $S_2(n-\pi^*)$, en la desactivación del estado ópticamente activo y calcularon las trayectorias de mínima energía para las SEP de los estados involucrados. A partir de los resultados obtenidos la constante de decaimiento más rápida observada ($\tau_1 = 0.148$) se asocia con la existencia de una IC debida a la pérdida de planicidad dirigida por el átomo C2.²⁹ Los autores sugieren que $\tau_2 = 0.36$ ps se debe a la participación de un estado $n-\pi^*$ el cual también se cruza con el estado S_1 , es decir la población inicial de moléculas en el estado excitado S_1 puede seguir dos canales de desactivación, lo cual redundaría en una distribución de la población y por tanto un decaimiento biexponencial.

Por otra parte, se han hecho simulaciones de dinámica no adiabática iniciando desde el estado excitado S_1 en la región de Franck-Condon, y calculando las SEP con distintas metodologías para guanina. Langer *et al.* usaron la metodología ROKS (“*restricted open shell Kohn-Sham*”),⁵⁴ Lan *et al.* usaron la metodología semiempírica OM2 & MR-CI (“*ortogonalization model 2 & multi-reference configuration interaction*”),⁵² y más recientemente Barbatti *et al.* usaron métodos multi-referenciados y la parte dinámica se incluyó a través del método “*on-the-fly surface hopping*”.⁴³

Las dos simulaciones más recientes^{43,52} de la dinámica de desactivación de los estados excitados de guanina en fase gaseosa muestran que el proceso de desactivación ocurre casi exclusivamente en el estado S_1 a través de la IC S_1-S_0 . Sin embargo, estos cálculos no predicen el mismo tipo de ICs. El método OM2-MR-CI determina la existencia de un canal de desactivación de S_1 asociado a una IC con un desplazamiento fuera del plano bastante pronunciado de C2 (IC etilénica II de acuerdo a la referencia 43). El adjetivo etilénica dado a este tipo de ICs en guanina se debe a su relación con las ICs encontradas en etileno y etilenos sustituidos.⁵⁵

El método OM2-MR-CI también predice la existencia de un canal de desactivación asociado a una segunda IC caracterizada por una distorsión fuera del plano del grupo amino con una fuerte elongación del enlace C2-N3 y distorsión de C5 y C6.

Los cálculos MR-CIS de Barbatti *et al.* muestran la participación de dos conformaciones en la desactivación del estado S_1 . En este caso las dos ICs presentan distorsiones de C2 (fuera del plano) y son llamadas etilénica I y etilénica II.⁴³ Esta última IC coincide con una de las predichas por la metodología OM2-MR-CI y también con una IC citada en la referencia 29.

Sin embargo, los cálculos MR-CIS de Barbatti *et al.* no predicen la presencia de la segunda IC encontrada para guanina con la metodología OM2-MR-CI, en cambio, se encontró una IC donde el átomo C2 está también fuera del plano, pero el grupo $-NH_2$ se encuentra formando un ángulo diedro de $80^\circ - 90^\circ$ con respecto al heterociclo de purina, esta IC se denomina etilénica I.

Los decaimientos de los estados excitados de HPX e INS son concluyentes respecto al hecho que el grupo $-NH_2$ no es esencial para el decaimiento ultrarrápido del estado S_1

($\pi-\pi^*$) y que la dinámica de desactivación en solución acuosa es mucho más rápida que en los sistemas guanina y guanosina.

Podemos señalar que los resultados experimentales presentados en nuestro trabajo indican que la HPX puede servir como un caso de estudio modelo para evaluar métodos de estructura electrónica y simulaciones dinámicas pretender predecir la desactivación ultrarrápida de los estados electrónicos excitados en moléculas orgánicas y particularmente en sistemas purínicos.

Los resultados experimentales indican que para las ICs que hemos calculado y que presentan una estructura distorsionada de la planicidad, debida a la piramidalización del átomo C2 como los casos citados para guanina, se accede de una forma más directa en la HPX. La caracterización de nuestro sistema purínico HPX el cual es similar a guanina pero más simple debe también poder evaluar la participación de otras ICs, y en conjunto, contribuir para decidir cuál podría ser un nivel de teoría conveniente y eficiente a fin de predecir el comportamiento observado experimentalmente.

4.4 Decaimiento de los estados excitados de hipoxantina e inosina monoprotonadas

En solución acuosa de $\text{pH} = 1$ las especies monoprotonada (HPX^+) y neutras (ceto-N9-H y ceto-N7-H) de HPX existen en una concentración relativa de 92% y 8% respectivamente. Por otra parte, en una solución acuosa 1N de HCl la especie HPX^+ puede alcanzar una concentración del 99%. Esto se puede concluir de los diagramas de población de especies como función del pH contruídos a partir de los valores de $\text{p}K_a$ para HPX reportados en la literatura.^{2,6}

El decaimiento de fluorescencia para HPX^+ (solución acuosa de $\text{pH} = 1$) se muestra en la Figura 4.10. A diferencia de la especie neutra, la especie HPX^+ muestra un

decaimiento biexponencial en solución acuosa ($\tau_1 < 0.2$ ps y $\tau_2 = 1.1$ ps). El segundo componente temporal está relacionado con ~5% de la amplitud total de la señal de emisión a 350 nm. Este resultado es similar al obtenido para HPX⁺ en solución acuosa de HCl 1N (ver recuadro Figura 4.10).

Vale la pena recordar que la función de respuesta instrumental gaussiana con FWHM ~550 fs permite obtener una resolución temporal del experimento de ~200 fs por lo cual para los ajustes exponenciales convolucionados con la función de respuesta instrumental con $\tau_1 < 200$ fs únicamente se puede establecer que el decaimiento de dicha componente temporal ocurre en < 200 fs (p. ej., ver Figura 4.10 superior). El decaimiento biexponencial de la señal de fluorescencia para la especie INS⁺ se representa para cada una de las componentes temporales ($\tau_1 = 0.39$ ps y $\tau_2 = 2.5$ ps) convolucionadas con la función de respuesta en la parte inferior de la Figura 4.10.

Hemos asignado la primera componente temporal de decaimiento ($\tau_1 < 0.2$ ps) a la evolución del estado S₁, lo que incluye decaimiento de la población y algo de evolución del paquete de ondas desde el estado de Franck-Condon. Dada la existencia de una segunda componente temporal ($\tau_2 = 1.1$ ps) es probable que tome lugar una división de la población hacia un segundo canal de desactivación, de tal forma que la desactivación de una fracción inicial de la población en S₁ toma lugar luego de la evolución inicial, dando origen a esta segunda componente temporal.

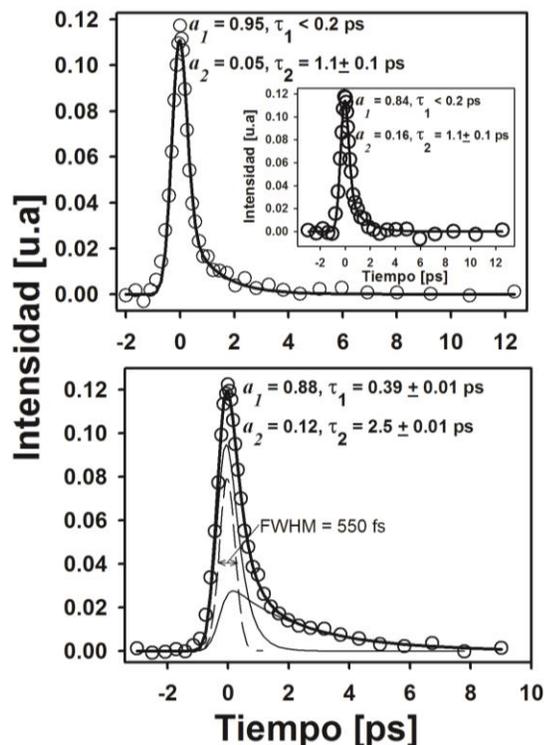


Figura 4.10. Experimentos de decaimiento de fluorescencia por suma de frecuencias para las especies monoprotonadas de hipoxantina (superior) e inosina (inferior) en solución acuosa de pH = 1 y HCl 1N respectivamente. Recuadro: hipoxantina en solución acuosa de HCl 1N. $\lambda_{\text{excitación}} = 257 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{detección}} = 350 \text{ nm}$. Las líneas sólidas gruesas representan ajustes de decaimientos biexponenciales ($a_1 \cdot e^{-t/\tau_1} + a_2 \cdot e^{-t/\tau_2}$) convolucionados con la función de respuesta instrumental gaussiana (FWHM $\sim 550 \text{ fs}$) a través de un método no lineal de mínimos cuadrados. Las líneas sólidas delgadas representan cada una de las componentes de decaimiento convolucionadas con la función de respuesta. La línea punteada representa la función de respuesta instrumental gaussiana.

En relación con el decaimiento biexponencial, se debe tener en cuenta que los estados 1L_a y 1L_b tienen una diferencia de energía más pequeña comparada con la respectiva cantidad para los tautómeros neutros.

De acuerdo con los valores de pK_a reportados, la especie monoprotonada INS^+ predomina en HCl 1N ($\sim 91\%$).^{2,56} Las especies HPX^+ e INS^+ presentan un decaimiento del estado excitado S_1 biexponencial similar ($\tau_1 = 0.39 \text{ ps}$ y $\tau_2 = 2.5 \text{ ps}$ para INS^+) como se muestra en la Figura 4.10. Este comportamiento similar es el esperado teniendo en cuenta la semejanza de las estructuras de HPX e INS monoprotonadas, como se muestra en la Figura

4.1. Para los dos sistemas la protonación se da en N7 y la carga positiva se deslocaliza a través del sistema π .

Para las especies monoprotonadas de guanina también se ha observado un decaimiento biexponencial. Sin embargo, tanto la guanina monoprotonada como la guanosina monoprotonada (GMPH^+) tienen tiempos de decaimiento mucho más largos (τ_2 de hasta 196 ps).^{31,57} A partir de nuestros resultados experimentales podemos concluir que el efecto del grupo $-\text{NH}_2$ (ausente en HPX^+ e INS^+) redundaría en diferencias importantes en la fotofísica, haciendo que los tiempos de vida del estado S_1 sean mucho más cortos en HPX^+ e INS^+ en comparación con las especies guanina y guanosina monoprotonadas. El efecto de la ausencia del grupo amino es más marcado en las especies protonadas que en las especies neutras. Lo anterior implica un cambio significativo en la SEP debido a la alteración del sustituyente en el anillo de seis miembros, específicamente en C2.

Se ha sugerido que la coordenada de reacción responsable de la desactivación lenta del estado S_1 de las especies monoprotonadas de guanina (p. ej. 196 ps para guanosina en solución acuosa de $\text{pH} = 1$ ⁵⁷) es un movimiento fuera del plano y en sentido opuesto de los átomos de H enlazados a C8 y N7.³¹

Es importante señalar que el grupo amino de las bases pirimidínicas (timina, citosina y uracilo) tiene un efecto importante en el decaimiento de fluorescencia, e. g., la remoción del grupo $-\text{NH}_2$ en citosina hace que el tiempo de vida del estado excitado aumente.⁵⁸

4.5 Decaimiento de los estados excitados de hipoxantina e inosina monodesprotonadas

Para el estudio de las especies monodesprotonadas de HPX e INS (HPX^- e INS^- respectivamente) se disolvieron los respectivos compuestos en una solución acuosa de $\text{pH} =$

10 (ajustado con solución acuosa de NaOH). Para este valor de pH la concentración de la especie monodesprotonada es máxima en comparación con la especie neutra, mientras que la forma doblemente desprotonada permanece en una concentración baja (< 7% para HPX y < 6% para INS).^{2,6}

En la Figura 4.11 se muestran los decaimientos de fluorescencia para las especies HPX⁻ e INS⁻ en solución acuosa.

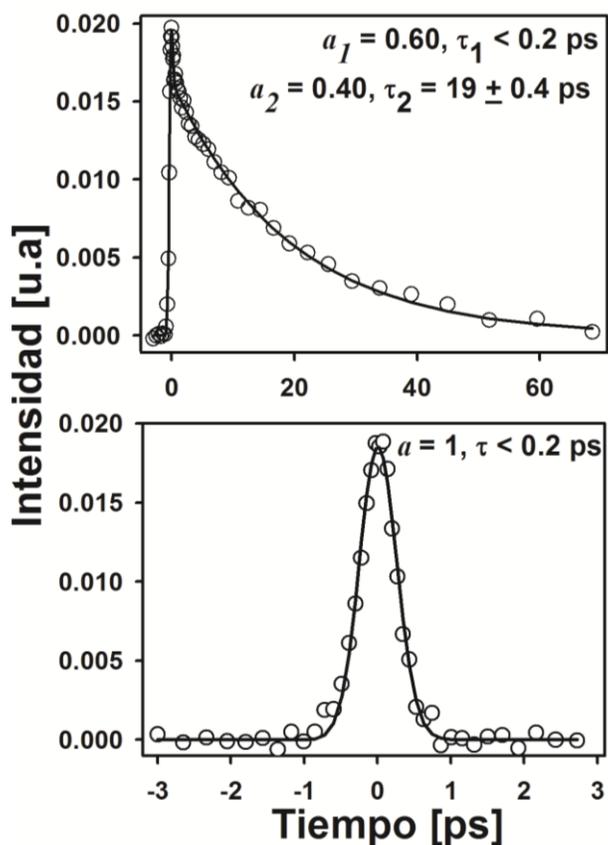


Figura 4.11. Experimentos de decaimiento de fluorescencia por suma de frecuencias para la especie monodesprotonadas de hipoxantina (superior) e inosina (inferior) en solución acuosa de pH = 10. $\lambda_{\text{excitación}} = 257 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{detección}} = 350 \text{ nm}$. Las líneas sólidas representan ajustes de decaimientos exponenciales ($a_1 \cdot e^{-t/\tau_1} + a_2 \cdot e^{-t/\tau_2}$) convolucionados con la función de respuesta instrumental gaussiana (FWHM $\sim 550 \text{ fs}$) a través de un método no lineal de mínimos cuadrados.

El decaimiento de fluorescencia para HPX⁻ en solución acuosa de pH = 10 es biexponencial con $\tau_1 < 0.2 \text{ ps}$ (60%) y $\tau_2 = 19 \text{ ps}$ (40%), ver Figura 4.11. En estas

condiciones los tautómeros neutros de HPX alcanzan una concentración de ~7%, que podría ser suficiente para contribuir en cierta medida al componente ultrarrápido ($\tau_1 < 0.2$ ps) del decaimiento de fluorescencia a 350 nm. Sin embargo, si el comportamiento biexponencial se debiera solamente a la presencia de dos especies en solución (HPX neutra y HPX⁻) con sus respectivos tiempos de vida del estado S₁, τ_1 y τ_2 , los factores preexponenciales correspondientes, a_1 y a_2 , deberían dar la concentración relativa de las dos especies (asumiendo coeficientes de absorción y constantes radiativas similares para HPX y HPX⁻).

Suponiendo que las especies neutras y la desprotonada (HPX⁻) son responsables de las componentes temporales τ_1 y τ_2 respectivamente, la concentración relativa de HPX⁻ debería ser aproximadamente $a_2/(a_1+a_2) = 0.6$ (ver Figura 4.11 para los factores preexponenciales). El valor de 0.6 es muy bajo para representar la concentración relativa de HPX⁻ a pH = 10 que es 0.93 (de acuerdo al valor de $pK_{a2} = 8.64$).

Por lo anterior, lo más probable es que el comportamiento biexponencial sea intrínseco de la forma monodesprotonada, HPX⁻, y que la componente ultrarrápida ($\tau_1 < 0.2$ ps) puede estar relacionada con la evolución del estado excitado desde la región de Franck-Condon con alguna contribución menor de la especie neutra (que tiene un decaimiento ultrarrápido).

El decaimiento de fluorescencia en HPX⁻ con $\tau_2 = 19$ ps es una característica destacable del presente trabajo, dado que dicho decaimiento refleja un cambio importante en la forma de la SEP del estado emisivo debido a la ausencia de un protón en el sistema heterocíclico.

Adicionalmente, el efecto que da origen a esta segunda componente temporal podría también estar relacionado con la presencia de estados $n-\pi^*$ cerca del estado ópticamente activo ${}^1L_a(\pi-\pi^*)$ en la geometría de Franck-Condon, como se infiere de las Tablas 4.2 y 4.3 para las respectivas energías de los estados $2\ {}^1A'(\pi-\pi^*)$ y $1\ {}^1A''(n-\pi^*)$

Lo más interesante de las formas monodesprotonadas es que la HPX^- y la INS^- tienen decaimientos del estado excitado $\pi-\pi^*$ de más baja energía muy diferentes, como se observa en la Figura 4.11. La INS^- conserva completamente el comportamiento monoexponencial y ultrarrápido del decaimiento de fluorescencia de la especie neutra ($\tau_1 < 0.2$ ps) y es dos órdenes de magnitud más corto que el tiempo de vida de fluorescencia de HPX^- ($\tau_2 = 19$ ps).

La diferencia tan pronunciada en la fotofísica de las especies monodesprotonadas HPX^- e INS^- puede estar relacionada directamente con las diferencias en la estructura química, principalmente el sitio de desprotonación. Por una parte, en la HPX^- la posición N1 está protonada y las posiciones N7 y N9 están desprotonadas, en tanto que en INS^- la posición N9 tiene como sustituyente una ribosa, y la posición N1 está desprotonada. Los resultados experimentales muestran claramente que sitios de desprotonación distintos producen un efecto opuesto en la evolución del estado excitado.

Otro aspecto interesante es que la desactivación del estado excitado es más lenta en HPX^- donde la desprotonación ocurre en el anillo de pirazol (anillo de cinco miembros) que es el involucrado en el equilibrio tautomérico de HPX neutra.

De forma similar a la guanina y a los tautómeros neutros de HPX , la pérdida de planicidad en el anillo pirimidínico (anillo de seis miembros) es probablemente el efecto responsable de la evolución en la SEP del primer estado excitado $\pi-\pi^*$ de HPX^- .³¹ La

desprotonación en HPX parece tener un efecto a larga distancia en la coordenada de pérdida de planicidad en la SEP del estado emisor, mientras que en INS^- (desprotonación en N1) el decaimiento permanece inalterado, lo que sugiere una SEP del estado emisor similar a la de su respectiva especie neutra.

4.5.1 Cálculo de la intersección cónica en hipoxantina desprotonada

El efecto más pronunciado en la dinámica de desactivación de la HPX neutra ocurre a través de la desprotonación. Como se acaba de mostrar en esta sección para HPX^- , el tiempo de vida del primer estado excitado $\pi-\pi^*$ es bastante largo ($\tau_2 = 19$ ps), por lo cual se investigó a través de cálculos de estructura electrónica el efecto que da origen a este tiempo de vida largo del estado emisor.

Primeramente, se buscó un mínimo en la SEP de S_1 , que pudiera sustentar la hipótesis de que la población de moléculas en S_1 puede ser atrapada y permanecer un tiempo considerable, lo cual da origen a una emisión de fluorescencia de mayor duración temporal.

Es importante recordar que para los tautómeros neutros de HPX no se localizó un mínimo en la SEP del estado S_1 ($\pi-\pi^*$) y que la accesibilidad a la IC S_1-S_0 es directa desde la región de Franck-Condon del estado S_1 . Asimismo, es necesario mencionar que para la HPX^- al nivel de teoría MR-MP2 usado en nuestro trabajo se predicen dos estados $n-\pi^*$ más bajos en energía que el estado ópticamente activo 1L_a ($\pi-\pi^*$). Sin embargo, al nivel de teoría MR-CIS/SA-4-CASSCF(12,9)/cc-pvdz el estado excitado de más baja energía tiene carácter $\pi-\pi^*$ y los estados $n-\pi^*$ se localizan a energías más altas.

La Tabla 4.6 presenta las energías para distintos puntos en la SEP del estado S_1 , localizados usando el nivel de teoría MR-CIS/SA-4-CASSCF(12,9)/cc-pvdz y con la

misma metodología usada y descrita en la sección 4.3 para explorar la SEP del estado excitado S_1 en los tautómeros neutros de HPX.

Tabla 4.6. Energías de los estados S_1 y S_0 en puntos particulares de la superficie de energía potencial de S_1 .

	E (eV) S_1^a	E (eV) S_0
S_0 min (Franck-Condon)	5.00 (0.117) ^b , HOMO \rightarrow LUMO(66%) ^c	0
S_1 plano	4.66 (0.090), HOMO \rightarrow LUMO(53%)	0.38
S_1 min	4.42 (0.056), HOMO \rightarrow LUMO (73%)	1.60
S_1 - S_0 MXS	3.60	3.60

^aTodas las energías se tomaron usando como referencia la energía del estado basal en la geometría optimizada. ^bLas fuerzas de oscilador para la transición $S_1 \rightarrow S_0$ se muestran en paréntesis. ^cLas contribuciones de la función de configuración de estado con la transición HOMO \rightarrow LUMO a la función de onda SA-CASSCF se presentan como porcentajes (%).

El primer punto estacionario que localizamos en la SEP del estado S_1 para HPX⁻ corresponde a una geometría plana (S_1 plano, Tabla 4.6), sin embargo este punto no es un mínimo (tiene varias derivadas de segundo orden negativas). Adicionalmente, el cambio en las coordenadas internas en S_1 plano no es muy sustancial en comparación con S_0 min. Para S_1 plano, la contribución principal a la función de onda SA-4-CASSCF viene de la FCE con la excitación simple HOMO \rightarrow LUMO y S_1 sigue teniendo el carácter 1L_a (π - π^*). En S_1 plano la diferencia de energía S_1 - S_0 se reduce a 4.28 eV comparado con el valor respectivo en la región de Franck-Condon (S_0 min, transición vertical) de 5.00 eV, este punto estacionario puede representar la región de la SEP del estado S_1 hacia donde se da la relajación inicial del sistema.

Por otra parte, la geometría de S_1 min para HPX⁻ (Figura 4.12) está bastante distorsionada de la planicidad. La distorsión más importante corresponde al anillo de seis miembros, $d(C6N1C2N3) = -55.035$.

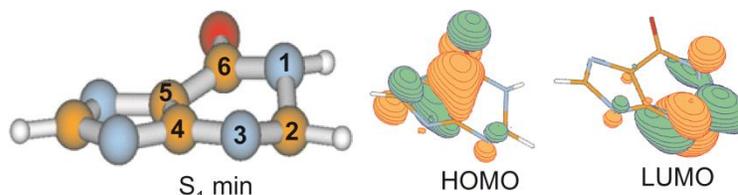


Figura 4.12. Geometría del mínimo en la superficie de energía potencial del estado S_1 (S_1 min) para la hipoxantina monodesprotonada calculada al nivel de teoría MR-CIS. También se muestran los orbitales moleculares HOMO y LUMO respectivos.

A partir de S_1 min la energía de transición $S_1 \rightarrow S_0$ es 2.82 eV (~ 439 nm) con una fuerza de oscilador $f = 0.056$. La principal contribución a la función de onda SA-4-CASSCF del estado excitado S_1 en esta geometría es de la FCE construida con la excitación simple HOMO \rightarrow LUMO (ver Tabla 4.6). Aunque en S_1 min el sistema no pertenece al grupo de simetría C_s , por lo cual los orbitales moleculares no se transforman como las representaciones de este grupo puntual, es posible asignar al estado emisor el carácter π^* , a partir de la simetría local de los orbitales HOMO y LUMO que se muestran en la Figura 4.12.

La IC entre el estado S_1 y S_0 representada por el MXS también corresponde a una geometría bastante distorsionada de la planicidad ($d(C6N1C2N3) = -65.483$), más que la correspondiente para S_1 min. En la Figura 4.13 se muestra la geometría correspondiente para el MXS de la IC S_1 - S_0 así como los respectivos orbitales HOMO y LUMO para HPX $^-$.

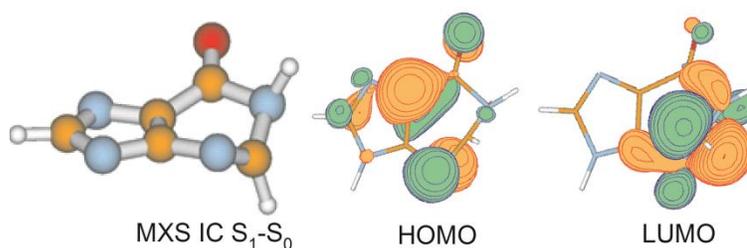


Figura 4.13. Geometría y orbitales moleculares HOMO y LUMO para el mínimo en el cruce de las superficies de energía potencial de los estados S_1 y S_0 , MXS IC S_1 - S_0 en la hipoxantina desprotonada.

4.5.2 Accesibilidad a la intersección cónica S_1 - S_0 desde la región de Franck-Condon del estado excitado S_1 (π - π^*) en HPX⁻

Para evaluar la accesibilidad a la IC desde la región de Franck-Condon del estado ópticamente activo S_1 (π - π^*) en HPX⁻, hemos construido las curvas de energía para los estados S_1 y S_0 a través de la coordenada $d(\text{C6N1C2N3})$ en la SEP del estado S_1 . Para cada valor del ángulo diedro $d(\text{C6N1C2N3})$, todas las demás coordenadas internas se optimizaron para obtener la energía mínima del estado S_1 correspondiente. Las energías se calcularon también al nivel de teoría MR-CIS/SA-4-CASSCF(12,9)/cc-pvdz. En la Figura 4.14 se muestran los resultados obtenidos para las energías de S_1 y S_0 a través de la coordenada de reacción $d(\text{C6N1C2N3})$.

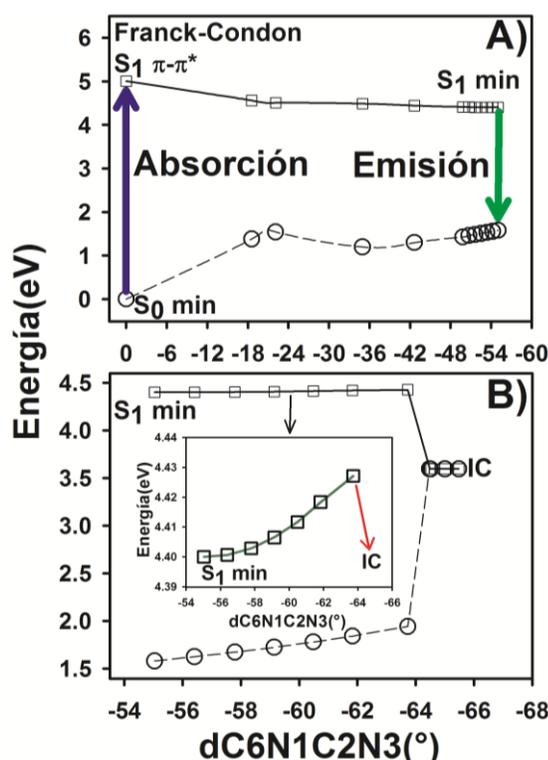


Figura 4.14. Energías para los estados S_1 y S_0 a través de la coordenada de reacción $d(\text{C6N1C2N3})$ para hipoxantina desprotonada. A) Desde S_0 min (región de Franck-Condon) a S_1 min. B) Desde S_1 min a la intersección cónica (IC) S_1 - S_0 . Las energías corresponden a cada geometría optimizada (correspondiente a un valor fijo del ángulo diedro) en la superficie de energía potencial del estado S_1 . Energías calculadas al nivel de teoría MR-CIS.

Los resultados mostrados en la parte A de la Figura 4.14 permiten inferir que desde la región de Franck-Condon al mínimo en la SEP del estado S_1 (S_1 min) existe una trayectoria de relajación sin barrera energética, es decir se accede directamente al mínimo en la SEP del estado emisivo, y es en esta región donde se da el proceso de emisión de fluorescencia. Por otra parte, los resultados mostrados en el recuadro inferior de la Figura 4.14 sugieren que para acceder al MXS de la IC S_1 - S_0 desde S_1 min es necesario superar una pequeña barrera energética (~ 0.03 eV). La existencia de esta pequeña barrera energética entre S_1 min y el MXS de la IC S_1 - S_0 puede ser suficiente para que se dé origen a una segunda componente temporal (~ 19 ps) en el decaimiento de fluorescencia, dado que la población de moléculas es atrapada en la región alrededor de S_1 min.

Estudios en otros sistemas moleculares como GMP y $GMP(H)^+$ por Kovalenko *et al.*³¹ y de la fotodinámica del retinal por Olivucci *et al.*⁵⁹, señalan que si la región alrededor del mínimo en la SEP de un estado excitado es plana, la existencia de una barrera energética, aun cuando esta sea muy pequeña es suficiente para inducir un decaimiento biexponencial del estado excitado; este también parece ser el caso para el sistema HPX^- de acuerdo a nuestros resultados experimentales y teóricos.

4.6 Espectroscopia estacionaria de alopurinol ribósido y resultados computacionales para la geometría optimizada del estado basal

La Figura 4.15 muestra los espectros de absorción y emisión del alopurinol ribósido en solución acuosa neutra.

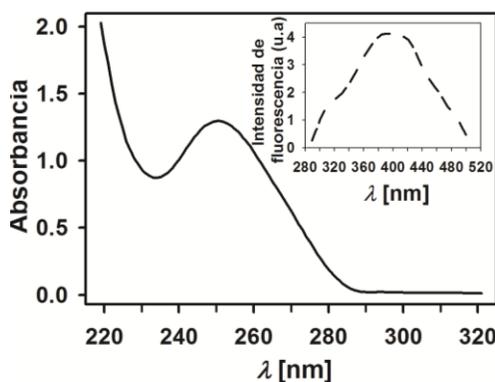


Figura 4.15. Espectros de absorción y emisión (recuadro) de alopurinol ribósido en solución acuosa.

El espectro de absorción de AL-R en solución acuosa muestra una banda principal a energías bajas que es ancha, desde ~ 240 nm hasta ~ 280 nm con un máximo de absorción cercano a 250 nm. La segunda banda de absorción empieza a crecer desde los 230 nm hacia energías mayores. La banda centrada en 250 nm se debe a la superposición de varias transiciones de baja energía con carácter π - π^* como se mostrará más adelante en los resultados de las energías de transición vertical calculadas al nivel de teoría MR-MP2. El espectro de emisión del AL-R en solución acuosa es ancho y consistente con un ϕ_F menor a 10^{-4} . El máximo de emisión se localiza alrededor de 400 nm.

Los espectros de absorción y emisión para el alopurinol en solución acuosa a distintos valores de pH ya han sido reportados previamente.²⁵ Particularmente, el espectro de absorción de alopurinol en solución acuosa a pH = 7.2 presenta un máximo cercano a 250 nm. A este mismo valor de pH, el espectro de emisión de fluorescencia muestra un máximo en ~ 335 nm. Sin embargo, estas características espectrales están asociadas a la presencia de al menos dos tautómeros coexistentes en solución acuosa.

A continuación se presentaran los resultados de las energías de transición verticales calculadas al nivel de teoría MR-MP2 sobre la geometría optimizada del estado basal de alopurinol ceto-N1-H (ver Figura 4.2) al nivel de teoría MP2/cc-pvdz. Las transiciones

verticales se calcularon para el tautómero ceto-N1-H a fin de reducir el costo computacional. Sin embargo, estos resultados son descriptivos de la molécula AL-R dado que ambos sistemas comparten el mismo patrón de sustitución (N1-H para el tautómero ceto-N1-H de alopurinol y N1-ribose para el AL-R) en el cromóforo heterocíclico común.

La Tabla 4.7 muestra las energías de transición verticales así como los valores de fuerza de oscilador para las transiciones respectivas, calculadas para los primeros tres estados excitados $\pi\text{-}\pi^*$ (A') y los primeros tres estados excitados $n\text{-}\pi^*$ (A'') del sistema alopurinol ceto-N1-H.

Tabla 4.7. Energías de transición vertical (ΔE , en eV) calculadas al nivel de teoría MR-MP2 y fuerzas de oscilador (f) calculadas al nivel de teoría CASSCF(18,13) para los tres primeros estados excitados $\pi\text{-}\pi^*$ y $n\text{-}\pi^*$ del tautómero ceto-N1-H de alopurinol

Estado ^a	ΔE	f	Contribución
2 $^1A'$ ($\pi\text{-}\pi^* - ^1L_a$)	4.840	0.097	H \rightarrow L (62%) ^b
3 $^1A'$ ($\pi\text{-}\pi^* - ^1L_b$)	5.277	0.055	H \rightarrow L+1 (33%)
4 $^1A'$ ($\pi\text{-}\pi^*$)	5.536	0.030	-
1 $^1A''$ ($n\text{-}\pi^*$)	5.080	-	-
2 $^1A''$ ($n\text{-}\pi^*$)	5.348	-	-
3 $^1A''$ ($n\text{-}\pi^*$)	5.814	-	-

^aSe usó una función de onda de referencia SA-4-CASSCF y el conjunto de funciones base 6-31G+(d).^bSe muestran los valores de los cuadrados de los coeficientes para las contribuciones de las funciones de configuración de estado en la función de onda CASSCF(18,13).

El espectro de absorción del AL-R en solución acuosa presenta un máximo a 4.94 eV (251 nm), mientras que el cálculo al nivel de teoría MR-MP2 de alopurinol ceto-N1-H predice dos transiciones $\pi\text{-}\pi^*$ a 4.84 eV (256 nm) y 5.28 eV (234 nm) que se correlacionan con la primera banda de absorción (centrada en 251 nm) del AL-R en solución acuosa. De la misma manera que para HPX, el primer estado electrónico excitado con carácter $\pi\text{-}\pi^*$ tiene la etiqueta 1L_a , lo que corresponde a que en la función de onda CASSCF para este estado la principal contribución es de la FCE que porta la excitación HOMO \rightarrow LUMO (ver Tabla 4.7).

4.7. Decaimiento de los estados excitados de alopurinol ribósido

El decaimiento del estado ópticamente activo, S_1 (π - π^*) de AL-R, se resolvió usando la técnica de resolución temporal de fluorescencia por suma de frecuencias detectando la emisión a 350 nm y 385 nm. También se usó un pulso láser de excitación de 257 nm o 266 nm. Los decaimientos de fluorescencia se muestran en la Figura 4.16.

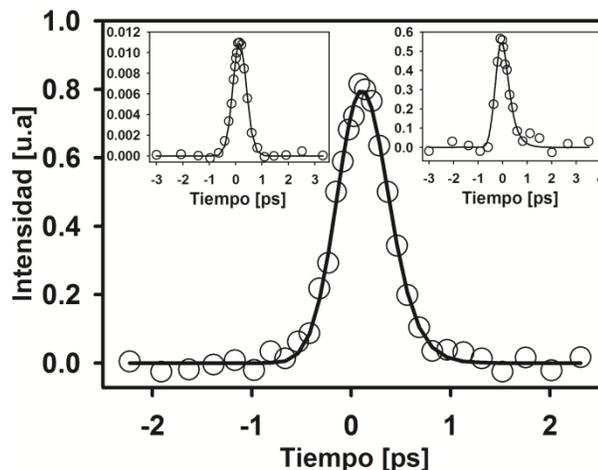


Figura 4.16. Experimentos de decaimiento de fluorescencia por suma de frecuencias para alopurinol ribósido en solución acuosa (pH = 7), $\lambda_{\text{Excitación}} = 257$ nm y $\lambda_{\text{Detección}} = 350$ nm. Recuadro izquierdo: $\lambda_{\text{Excitación}} = 266$ nm y $\lambda_{\text{Detección}} = 350$ nm. Recuadro derecho: $\lambda_{\text{Excitación}} = 266$ nm y $\lambda_{\text{Detección}} = 385$ nm. Las líneas sólidas representan ajustes de decaimientos monoexponenciales ($a \cdot e^{-t/\tau}$) convolucionados con la función de respuesta instrumental gaussiana (FWHM ~ 550 fs) a través de un método no lineal de mínimos cuadrados.

Para las tres combinaciones de $\lambda_{\text{excitación}}$ y $\lambda_{\text{detección}}$ de la Figura 4.16 y usadas para estudiar la desactivación del estado emisor S_1 (π - π^*) se observó un decaimiento ultrarrápido que alcanza solamente la escala de sub ps. Todos los decaimientos se ajustaron a una función monoexponencial ($\tau < 0.2$ ps) convolucionada con la función gaussiana de respuesta instrumental (ver Figura 4.16). Esto indica que no hay un efecto de la energía de excitación en la dinámica de desactivación.

Finalmente, los decaimientos de fluorescencia detectando la emisión a 350 nm y 385 nm presentan las mismas características ($\tau < 0.2$ ps). Lo anterior indica que el

decaimiento del espectro de fluorescencia completo ocurre en una escala temporal muy corta y que no hay una evolución espectral, e.g., desplazamientos hacia el rojo, o que al menos no existe una evolución espectral observable con la resolución temporal de nuestro experimento.

Debido a la escala temporal en la que ocurre el evento de desactivación del estado excitado y el límite de resolución temporal de nuestro experimento, la constante de decaimiento no pudo determinarse de forma exacta. Sin embargo, a partir del análisis de la señal convolucionada se pudo establecer un límite superior para el tiempo de vida del estado fluorescente de $\tau < 0.2$ ps. Este decaimiento ultrarrápido de la emisión de fluorescencia es idéntico al de HPX e INS discutidos en la sección 4.3. Esto tiene una implicación muy importante y es que el cambio en el anillo de cinco miembros de imidazol (en HPX e INS) a pirazol (en AL-R), no afecta la dinámica de desactivación del estado S_1 (π - π^*).

Al-R, INS³⁹ y HPX⁴⁰⁻⁴¹ pertenecen al grupo de moléculas con tiempos de vida del estado excitado S_1 más cortos reportados hasta la fecha junto con adenosina y el tautómero cetó-N9-H de adenina.⁴² Los tiempos de desactivación del estado excitado de este grupo de moléculas, son más cortos que los correspondientes para guanina y sus respectivos ribósido y nucleótido, que presentan un decaimiento biexponencial con constantes de decaimiento de hasta 890 fs.³⁸ Nuestros resultados para HPX, INS y AL-R sugieren que la accesibilidad a la IC S_1 - S_0 es más directa cuando se carece del grupo amino (presente en guanina como sustituyente en C2).

Otro aporte muy importante de nuestros resultados es que demuestran que el anillo de cinco miembros no está involucrado en la dinámica de desactivación. Más adelante

mostraremos que la IC S_1 - S_0 para alopurinol ceto-N1-H involucra la pérdida de planicidad solamente en el anillo de seis miembros, mientras que el anillo de pirazol permanece con una estructura plana.

Debemos señalar que las energías de excitación usadas (257 nm y 266 nm) pueden generar una población compuesta por los dos estados excitados ópticamente activos (π - π^*) para AL-R, como lo sugieren los resultados teóricos de la Tabla 4.7.

Considerando nuestros resultados de resolución temporal y la similitud de AL-R con los demás sistemas estudiados en este trabajo, HPX e INS, así como otros ya analizados como guanina, podemos asumir que existe un proceso de decaimiento no-radiativo ultrarrápido desde el estado 1L_b al estado S_1 1L_a . Por tanto, aún cuando el sistema inicialmente pueda estar en una superposición de estados, la población de moléculas en el estado excitado se transfiere de manera completa al estado emisivo S_1 1L_a .

4.7.1 Cálculo de la intersección cónica en alopurinol ceto-N1-H

Para entender de una forma más detallada la dinámica de desactivación ultrarrápida de AL-R, se determinó la IC S_1 - S_0 para el sistema modelo alopurinol ceto-N1-H al nivel de teoría MR-CIS usando una función de onda SA-6-CASSCF(12,9) como referencia. La precisión de los cálculos computacionales usando este espacio activo reducido (12,9) se verificó a través de la comparación de los resultados de las energías de transición vertical con las respectivas calculadas con el espacio activo (18,13). Antes de localizar y optimizar la IC, buscamos un mínimo en la SEP del estado S_1 . Usando el algoritmo GDIIS junto con el nivel de teoría MR-CIS se localizó un punto estacionario de geometría plana (S_1 plano) y con varias frecuencias imaginarias.

La diferencia de energía S_1-S_0 para S_1 plano es 3.96 eV, la cual es significativamente menor que la transición vertical $S_1 \rightarrow S_0$ (5.45 eV). Sin embargo, al nivel de teoría usado, no se encontró un mínimo en la SEP del estado S_1 . Al igual que la HPX neutra, la ausencia de un mínimo accesible desde el estado de Franck-Condon en la SEP del estado emisor redundaba en tiempos de vida del estado excitado ultracortos.

La búsqueda de la IC S_1-S_0 se inició desde una geometría distorsionada de la planicidad ya que para este tipo de sistemas la IC S_1-S_0 tiene una geometría de este tipo, es decir, la probabilidad de un cruce entre los estados S_1 y S_0 se maximiza en geometrías distorsionadas de la planicidad para sistemas purínicos.⁶⁰⁻⁶³

La Figura 4.17 muestra la geometría para el MXS de la IC S_1-S_0 para alopurinol ceto-N1-H encontrada con el algoritmo GDIIS y el nivel de teoría MR-CIS/SA-6-CASSCF(9,12)/cc-pvdz. Esta geometría está bastante distorsionada de la planicidad, comparada con la geometría de S_0 min. El principal cambio se da en el anillo de seis miembros como muestran los ángulos diedros en la Figura 4.17, por otra parte el anillo de cinco miembros permanece plano como en S_0 min.

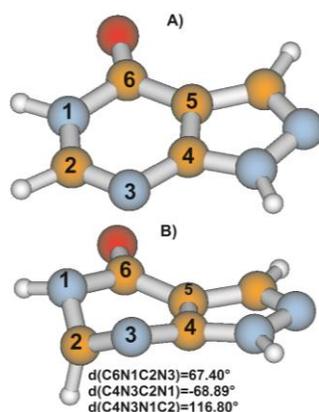


Figura 4.17. Mínimos de energía para la superficie de energía potencial de A) estado S_0 y B) en la intersección cónica S_1-S_0 , MXS para alopurinol ceto-N1-H.

La geometría para el MXS encontrada para alopurinol ceto-N1-H es similar a las reportadas para guanina ceto-N9-H^{29,44,52-53} y HPX ceto-N9-H en este trabajo. La pérdida

de planicidad en el anillo de seis miembros puede ser descrita por los ángulos diedros $d(\text{C6N1C2N3})$, $d(\text{C4N3C2N1})$ y $d(\text{C4N3N1C2})$ a fin de comparar con las respectivas geometrías de las ICs S_1 - S_0 encontradas en otros sistemas heterocíclicos similares.

Por ejemplo, algunos valores reportados para las ICs S_1 - S_0 en guanina ceto-N9-H son: $d(\text{C6N1C2N3}) = -73.605^\circ$,²⁹ $d(\text{C4N3C2N1}) = 69^\circ$ y 72.5° ,⁴⁴ $d(\text{C4N3N1C2}) = 106.6^\circ$ ⁵³ y 157° ,⁵² mientras que los encontrados en este trabajo para alopurinol ceto-N1-H son $d(\text{C6N1C2N3}) = 67.40^\circ$, $d(\text{C4N3C2N1}) = -68.89^\circ$ y $d(\text{C4N3N1C2}) = 116.80^\circ$. La Tabla 4.8 resume los resultados de los cálculos del estado excitado S_1 (π - π^*) de alopurinol ceto-N1-H, en términos de las energías de los estados S_1 y S_0 , para las tres geometrías relevantes en la fotofísica de este sistema, S_0 min, S_1 plano y el MXS de la IC S_1 - S_0 .

Tabla 4.8. Energías (en eV) para los estados S_0 y S_1 (π - π^*) de alopurinol ceto-N1-H en distintas geometrías.^a

	S_0	S_1 (π - π^*) ^b
S_0 min	0	5.45 (64%)
S_1 plano	0.78	4.74 (67%)
S_1 - S_0 CI MXS	3.92	3.92

^aLas energías se calcularon al nivel de teoría MR-CIS con una función de onda SA-6-CASSCF como referencia. ^bLos números en paréntesis indican la contribución de las funciones de configuración de estado con la excitación HOMO \rightarrow LUMO a la función de onda SA-6-CASSCF.

A partir de los resultados de la Tabla 4.8, lo que se establece para la fotofísica ultrarrápida de alopurinol ceto-N1-H, y que se extrapola a AL-R, es que desde la región de Frank-Condon del estado excitado S_1 el sistema se relaja a un punto estacionario con una geometría plana (S_1 plano) donde la diferencia de energía S_1 - S_0 se reduce significativamente. Esta geometría se puede asumir como representativa de una región intermedia, a partir de la cual los estados S_1 y S_0 puedan evolucionar a ser casi degenerados y por ende, la IC S_1 - S_0 se alcanza eventualmente después de este punto. La IC S_1 - S_0 queda representada por el MXS. Este mecanismo explica el decaimiento ultrarrápido del estado

excitado S_1 y el bajo rendimiento cuántico de fluorescencia de S_1 a través de excitación UV.

Para apoyar lo que hemos sugerido acerca de que el anillo de cinco miembros no participa directa o indirectamente en la dinámica de desactivación de los sistemas heterocíclicos estudiados en este trabajo (hipoxantina, inosina y alopurinol ribósido) cabe mencionar el trabajo teórico de la dinámica de desactivación del estado S_1 (π - π^*) de la 4-pirimidinona (Figura 4.18) al nivel de teoría CASPT2/CASSCF realizado por Delchev y colaboradores.⁶⁴

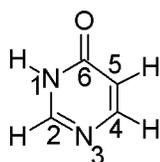


Figura 4.18. Estructura de la 4-pirimidinona.

La estructura de la 4-pirimidinona corresponde al anillo de seis miembros presente en hipoxantina, inosina y alopurinol. Para este sistema heterocíclico de seis miembros se localizó una IC S_1 - S_0 bastante accesible y la pérdida de planicidad es la coordenada que dirige la relajación en el estado excitado S_1 desde la región de Franck-Condon hacia la IC S_1 - S_0 . La geometría correspondiente a la IC S_1 - S_0 está distorsionada de la planicidad: $d(C6N1C2N3) = -71.468^\circ$, $d(C4N3C2N1) = 74.613^\circ$ y $d(C4N3N1C2) = -110.909^\circ$.⁶⁴ Estos valores para los ángulos diedros son similares a los reportados en nuestro trabajo para las ICs en las especies de hipoxantina y alopurinol.

Referencias

- (1) Linder, P. W.; Stanford, M. J.; Williams, D. R. *J. Inor. Nucl. Chem.* **1976**, *38*, 1847.
- (2) Izatt, R. M.; Christen, J.; Rytting, J. H. *Chem. Rev.* **1971**, *71*, 439.

- (3) Medeiros, G. C.; Thomas, G. J. *Biochim. Biophys. Acta* **1971**, 238, 1.
- (4) Psoda, A.; Shugar, D. *Biochim. Biophys. Acta* **1971**, 247, 507.
- (5) Sun, X. J.; Lee, J. K. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 6548.
- (6) Benoit, R. L.; Frechette, M. *Can. J. Chem.* **1985**, 63, 3053.
- (7) Clark, L. B.; Tinoco, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 11.
- (8) Lichtenb.D; Neiman, Z.; Bergmann, F. *Isr. J. Chem.* **1972**, 10, 805.
- (9) Chenon, M. T.; Pugmire, R. J.; Grant, D. M.; Panzica, R. P.; Townsend, L. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 4636.
- (10) Kondratyuk, I. V.; Samijlenko, S. P.; Kolomiets, I. M.; Hovorun, D. *M. J. Mol. Struct.* **2000**, 523, 109.
- (11) Shukla, M. K.; Leszczynski, J. *Int. J. Quantum Chem* **2005**, 105, 387.
- (12) Fernandez-Quejo, M.; de la Fuente, A.; Navarro, R. *J. Mol. Struct.* **2005**, 744, 749.
- (13) Gogia, S.; Jain, A.; Puranik, M. *J. Phys. Chem. B* **2009**, 113, 15101.
- (14) Bergmann, F.; Frank, A.; Neiman, Z. *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1* **1979**, 2795.
- (15) Costas, M. E.; AcevedoChavez, R. *J. Phys. Chem. A* **1997**, 101, 8309.
- (16) Roman-Zimbron, M. L. S.; Costas, M. E.; Acevedo-Chavez, R. *J. Mol. Struct:Theochem* **2004**, 711, 83.
- (17) Bartl, T.; Zacharova, Z.; Seckarova, P.; Kolehmainen, E.; Marek, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2009, 1377.
- (18) Costas, M.; Acevedo-Chávez, R. *J. Solution Chem.* **2012**, 41, 864.

- (19) Costas, M. E.; Acevedo-Chavez, R. *J. Mol. Struct:Theochem* **1999**, 489, 73.
- (20) Costas, M. E.; Acevedo-Chavez, R. *J. Mol. Struct:Theochem* **2000**, 499, 71.
- (21) Islas-Vigueras, R. E., Universidad Nacional Autónoma de México, 2010.
- (22) Chenon, M.-T.; Pugmire, R. J.; Grant, D. M.; Panzica, R. P.; Townsend, L. B. *J. Heterocycl. Chem.* **1973**, 10, 431.
- (23) Hernandez, B.; Luque, F. J.; Orozco, M. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 5964.
- (24) Babushkina, T. A.; Leonova, T. S.; Chernyshov, A. I.; Yashunskii, V. *G. Khim. Geterotsikl. Soedin.* **1979**, 1543.
- (25) Shukla, M. K.; Mishra, P. C. *Spectrochim. Acta, Part A* **1996**, 52, 1547.
- (26) Voelter, W.; Records, R.; Bunnenberg, E.; Djerassi, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 6163.
- (27) Dallos, M.; Lischka, H.; Shepard, R.; Yarkony, D. R.; Szalay, P. G. *J. Chem. Phys* **2004**, 120, 7330.
- (28) Platt, J. R. *J. Chem. Phys* **1949**, 17, 484.
- (29) Serrano-Andres, L.; Merchan, M.; Borin, A. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 2473.
- (30) Shukla, M. K.; Leszczynski, J. *J. Phys. Chem. A* **2003**, 107, 5538.
- (31) Karunakaran, V.; Kleinermanns, K.; Improta, R.; Kovalenko, S. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 5839.

- (32) Ludwig, V.; da Costa, Z. M.; do Amaral, M. S.; Borin, A. C.; Canuto, S.; Serrano-Andrés, L. *Chem. Phys. Lett.* **2010**, *492*, 164.
- (33) Mennucci, B.; Toniolo, A.; Tomasi, J. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 7126.
- (34) Marian, C. M. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 1545.
- (35) Klenwächter, V.; Drobnik, J.; Augenstein, L. *Photochem. Photobiol.* **1967**, *6*, 133.
- (36) Onidas, D.; Markovitsi, D.; Marguet, S.; Sharonov, A.; Gustavsson, T. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 11367.
- (37) Heggen, B.; Lan, Z.; Thiel, W. *PCCP* **2012**, *14*, 8137.
- (38) Peon, J.; Zewail, A. H. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *348*, 255.
- (39) Röttger, K.; Siewertsen, R.; Temps, F. *Chem. Phys. Lett.* **2012**, *536*, 140.
- (40) Chen, J.; Kohler, B. *PCCP* **2012**, *14*, 10677.
- (41) Villabona-Monsalve, J. P.; Noria, R.; Matsika, S.; Peón, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7820.
- (42) Cohen, B.; Hare, P. M.; Kohler, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13594.
- (43) Barbatti, M.; Szymczak, J. J.; Aquino, A. J. A.; Nachtigallova, D.; Lischka, H. *J. Chem. Phys.* **2011**, *134*, 014304.
- (44) Yamazaki, S.; Domcke, W.; Sobolewski, A. L. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 11965.
- (45) Yamazaki, S.; Domcke, W. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 7090.

- (46) Lischka, H.; Müller, T.; Szalay, P. G.; Shavitt, I.; Pitzer, R. M.; Shepard, R. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* **2011**, *1*, 191.
- (47) Boeyens, J. C. A. *J. Chem. Crystallogr.* **1978**, *8*, 317.
- (48) Cremer, D.; Pople, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1354.
- (49) Miannay, F.-A.; Gustavsson, T.; Banyasz, A.; Markovitsi, D. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 3256.
- (50) Gustavsson, T.; Improta, R.; Markovitsi, D. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 2025.
- (51) Canuel, C.; Mons, M.; PiuZZi, F.; Tardivel, B.; Dimicoli, I.; Elhanine, M. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*.
- (52) Lan, Z. G.; Fabiano, E.; Thiel, W. *Chemphyschem* **2009**, *10*, 1225.
- (53) Chen, H.; Li, S. H. *J. Chem. Phys.* **2006**, *124*, 154315.
- (54) Langer, H.; Doltsinis, N. L. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 2742.
- (55) Barbatti, M.; Ruckebauer, M.; Szymczak, J. J.; Aquino, A. J. A.; Lischka, H. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 482.
- (56) Tauler, R.; Cid, J. F.; Casassas, E. *J. Inorg. Biochem.* **1990**, *39*, 277.
- (57) Fujiwara, T.; Kamoshida, Y.; Morita, R.; Yamashita, M. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **1997**, *41*, 114.
- (58) Kistler, K. A.; Matsika, S. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 2650.
- (59) Olivucci, M.; Lami, A.; Santoro, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5118.
- (60) Serrano-Andres, L.; Merchan, M. *J. Photochem. Photobiol., C: Photochem. Rev.* **2009**, *10*, 21.

- (61) Barbatti, M.; Aquino, A. J. A.; Szymczak, J. J.; Nachtigallová, D.; Hobza, P.; Lischka, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2010**, *107*, 21453.
- (62) Barbatti, M.; Lischka, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6831.
- (63) Hassan, W. M. I.; Chung, W. C.; Shimakura, N.; Koseki, S.; Kono, H.; Fujimura, Y. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 5317.
- (64) Delchev, V. B.; Sobolewski, A. L.; Domcke, W. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 5007.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

En este trabajo se abocó al estudio de la dinámica de desactivación de los estados electrónicos excitados de baja energía de sistemas análogos a las bases purínicas del ADN (guanina y adenina) a fin de establecer qué características estructurales son las responsables de la fotofísica ultrarrápida en este tipo de sistemas heterocíclicos. Por ello, se estudiaron sistemas heterocíclicos con modificaciones menores en comparación con la guanina mediante la técnica de resolución temporal de fluorescencia por suma de frecuencias y métodos *ab-initio* multi-referenciados para explorar las superficies de energía potencial del primer estado excitado y el estado basal. Un tipo de modificación que presentó efectos interesantes en la dinámica de desactivación fue la protonación y desprotonación del sistema heterocíclico en distintas posiciones. A continuación citamos las conclusiones más importantes de nuestro trabajo.

La fotofísica de la hipoxantina es sustancialmente diferente a la de otros sistemas purínicos. Los tautómeros predominantes de hipoxantina en solución acuosa cercana a pH neutro: ceto N9-H y ceto N7-H, así como su ribósido la inosina, tienen un canal de decaimiento ultrarrápido para el estado S_1 ($\tau < 0.2$ ps) que es tan rápido como el que se ha medido para la base nitrogenada adenina y mucho más rápido que el correspondiente a guanina. Esto puede estar relacionado directamente con la ausencia del grupo amino en la posición C2 para hipoxantina en contraste con la guanina. De esta forma, nuestros

resultados indican que la estructura de la hipoxantina permite acceder a la intersección cónica S_1-S_0 de una forma más eficiente a través de la pérdida de planicidad del anillo de seis miembros con la correspondiente piramidalización de C2 (ver Figura 4.7).

Adicionalmente, la sustitución por H en hipoxantina en lugar de NH_2 como en guanina puede tener un efecto en la cinemática de la relajación del estado excitado S_1 a través de esta coordenada (piramidalización de C2), lo que se refleja directamente en los tiempos de vida de los estados excitados de las respectivas especies.¹

La monoprotonación de HPX para generar $HPX(H)^+$ da como resultado que el decaimiento de fluorescencia del estado S_1 sea sólo un poco más lento en comparación con los tautómeros neutros, lo cual se refleja como una segunda componente temporal de 1.1 ps (5%) en el decaimiento. Este comportamiento de la especie monoprotonada de hipoxantina contrasta con lo observado para la guanina, donde la especie monoprotonada se asocia con un incremento mucho mayor en el tiempo de vida del estado excitado S_1 , hasta 196 ps para las especies monoprotonadas de guanina, guanosina y guanosina monofosfato,²⁻³ en comparación con las especies neutras (p. ej., $\tau_1 = 0.16$ ps y $\tau_2 = 0.78$ ps para guanosina).³⁻⁴ Este comportamiento tan diferente de las especies monoprotonadas de hipoxantina y guanina, como para el caso de las especies neutras, puede estar relacionado con la ausencia del grupo amino, lo que incrementa de forma sustancial la accesibilidad a la intersección cónica S_1-S_0 en hipoxantina monoprotonada.

La desprotonación de hipoxantina tiene un efecto bastante marcado en la dinámica de desactivación del estado S_1 . El estado emisor de la especie monodesprotonada de hipoxantina tiene un tiempo de vida de 19 ps, es decir, dos órdenes de magnitud mayor que el de las especies neutras. Este decaimiento más lento se relaciona con la ausencia de

protones en N7 y N9, y la sustitución por H únicamente en la posición N1. La superficie de energía potencial del estado S_1 para hipoxantina desprotonada presenta un mínimo en el cual la población de moléculas puede ser atrapada y por tanto darse la emisión de fluorescencia.

Por el contrario, el monoanión de inosina al igual que la especie neutra presenta un decaimiento ultrarrápido ($\tau < 0.2$ ps) del primer estado excitado $\pi-\pi^*$ y no presenta la componente temporal larga (19 ps) medida para la especie monodesprotonada de hipoxantina. La diferencia en los tiempos de vida del estado excitado $\pi-\pi^*$ de las especies monodesprotonadas de hipoxantina e inosina puede estar asociada directamente con el hecho que la desprotonación en inosina modifica fuertemente la distribución electrónica, dado que la desprotonación se da en la posición N1 a diferencia de hipoxantina donde la desprotonación se da en la posición N7 o N9 (ver Figura 4.1).

Adicionalmente, se estudió la fotofísica del sistema alopurinol ribósido en solución acuosa. La desactivación del estado excitado S_1 de esta base del ADN modificada mostró que aunque se altere el anillo de cinco miembros en comparación con otros sistemas como hipoxantina, inosina y guanina, el decaimiento ultrarrápido del estado excitado S_1 ($\pi-\pi^*$) se conserva ($\tau < 0.2$ ps). De forma similar a otros sistemas heterocíclicos, el decaimiento ultrarrápido del estado S_1 ($\pi-\pi^*$) se debe a un proceso no radiativo muy eficiente mediado por la existencia de intersecciones cónicas S_1-S_0 durante la relajación del sistema desde la región de Franck-Condon del estado S_1 .

Para alopurinol ceto-N1-H la pérdida de planicidad del heterociclo de seis miembros dirige la desactivación del estado excitado S_1 ($\pi-\pi^*$) generado inicialmente y la intersección cónica S_1-S_0 tiene una geometría similar a la que se ha encontrado para hipoxantina. Las

intersecciones cónicas reportadas en este trabajo se encontraron usando en nivel de teoría MR-CIS/SA-6-CASSCF.

Ya que para la geometría correspondiente a la intersección cónica S_1-S_0 en alopurinol ceto-N1-H el anillo de cinco miembros permanece plano (como para S_0 min), se puede concluir que en general la dinámica de desactivación ultrarrápida del estado excitado S_1 en estos sistemas heterocíclicos está dominada por los movimientos de los átomos N1, C2 y N3 fuera del plano. La pérdida de planicidad en el anillo de cinco miembros (pirazol en alopurinol y imidazol en hipoxantina, inosina y guanina) se considera que no participa como coordenada de relajación del estado excitado S_1 ($\pi-\pi^*$).

Referencias

- (1) Hudock, H. R.; Levine, B. G.; Thompson, A. L.; Satzger, H.; Townsend, D.; Gador, N.; Ullrich, S.; Stolow, A.; Martínez, T. J. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 8500.
- (2) Fujiwara, T.; Kamoshida, Y.; Morita, R.; Yamashita, M. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **1997**, *41*, 114.
- (3) Karunakaran, V.; Kleinermanns, K.; Improta, R.; Kovalenko, S. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5839.
- (4) Onidas, D.; Markovitsi, D.; Marguet, S.; Sharonov, A.; Gustavsson, T. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 11367.

APÉNDICE 1. ASPECTOS GENERALES DE LA RADIACIÓN LÁSER¹

La generación de pulsos láser ultracortos es la parte central del desarrollo de técnicas espectroscópicas con resolución temporal en la escala de sub-picosegundos como la técnica de resolución temporal de fluorescencia por suma de frecuencias usada en este trabajo. En este apéndice se desarrollan los fundamentos teóricos de la generación de pulsos láser ultracortos. Sólo dos décadas después de la invención del láser fue posible obtener pulsos ultracortos, de tal forma que se pudo superar la duración de pulsos láser del orden de ns a fs. Ahora expondremos algunos conceptos fundamentales relacionados con la generación de radiación láser.

Láser es el acrónimo en Inglés para “*light amplification by stimulated emission of radiation*”. Los elementos básicos de un sistema láser son una cavidad óptica, un medio activo o de ganancia y un sistema de bombeo. Los procesos fotofísicos involucrados en la generación de radiación láser son absorción de radiación electromagnética, inversión de la población y emisión estimulada. A continuación describiremos cada uno de estos procesos.

Absorción, emisión espontánea y emisión estimulada

Para entender el proceso de emisión estimulada iniciamos con las ecuaciones de Einstein para un sistema atómico de dos niveles de energía n y m con los valores respectivos de energía E_n y E_m como se muestra en la Figura A.1.1

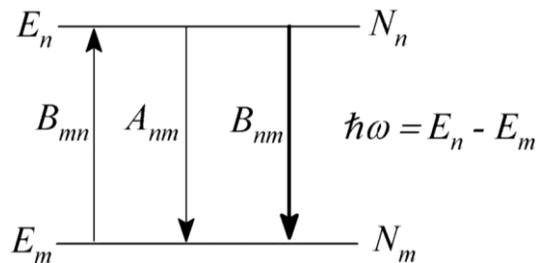


Figura A.1.1. Diagrama de un sistema atómico de dos niveles de energía.

Las cantidades A_{nm} , B_{mn} y B_{nm} se conocen como coeficientes de Einstein. En este sistema de dos niveles si un fotón con energía $\hbar\omega = E_n - E_m$ es absorbido se induce la transición $m \rightarrow n$ con una probabilidad B_{mn} . Para el sistema en el estado n también existe la posibilidad A_{nm} de que un fotón con energía $\hbar\omega = E_n - E_m$ sea emitido, este proceso se conoce como emisión espontánea.

En 1917 Einstein postuló que debería existir un canal adicional de relajación del estado superior n , con una probabilidad B_{nm} , este canal se conoce como emisión estimulada, y solo ocurre en presencia de radiación electromagnética con energía $\hbar\omega$.

Considérese un conjunto de N átomos con los niveles de energía n y m previamente descritos. En este conjunto encontramos un número N_m de átomos en el estado basal m y un conjunto de N_n átomos en el estado excitado n . Adicionalmente, considérese que tal conjunto de átomos es iluminado con radiación electromagnética de frecuencia angular ω tal que $\hbar\omega = E_n - E_m$, con una intensidad $I(\omega)$, a una temperatura dada T .

En un estado estacionario, el número de fotones absorbidos iguala el número de fotones emitidos (situación de equilibrio del cuerpo negro). Teniendo en cuenta los coeficientes para la absorción y emisión de luz (espontánea y estimulada), para el sistema en equilibrio tenemos:

$$N_m B_{mn} I(\omega) = N_n B_{nm} I(\omega) + N_n A_{nm} \quad (\text{A. 1.1})$$

A partir de la ecuación de distribución de población de Boltzman para un sistema de dos niveles separados por una energía $\hbar\omega$ a una temperatura T , $N_n/N_m = \exp(-\hbar\omega/kT)$, y reemplazando en (A.1.1), se obtiene:

$$I(\omega) = \frac{A_{nm}}{B_{mn} e^{\hbar\omega/kT} - B_{nm}} \quad (\text{A. 1.2})$$

La ecuación (A.1.2) es equivalente a la distribución de Planck:

$$I(\omega) = \frac{\hbar\omega^3}{\pi^2 c^2 (e^{\hbar\omega/kT} - 1)} \quad (\text{A. 1.3})$$

Además, se debe cumplir que $B_{nm} = B_{mn}$, es decir, la probabilidad de absorción de fotones es igual a la probabilidad de emisión estimulada. Al comparar (A.1.2) con (A.1.3) se obtiene que: $A_{nm}/B_{nm} = \hbar\omega^3/\pi^2 c^2$, por lo cual si se conoce la probabilidad de absorción de luz entonces se puede conocer la probabilidad de emisión espontánea y emisión estimulada.

Amplificación de la luz por emisión estimulada

Consideremos un sistema atómico como el mostrado en la Figura A.1.2. Las respectivas poblaciones por unidad de volumen en cada nivel de energía son N_1 y N_2 .

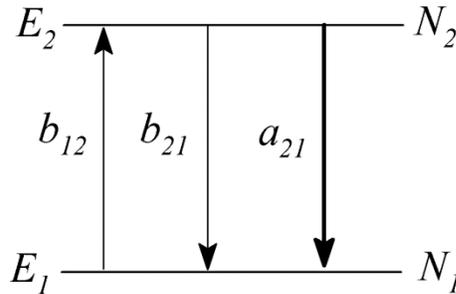


Figura A.1.2. Diagrama de energía para un sistema atómico de dos niveles.

El sistema es irradiado con un haz de fotones a n fotones por segundo por unidad de volumen, con una energía por fotón: $\hbar\omega = E_2 - E_1$. La absorción de luz en este medio es proporcional a: la probabilidad de transición, el número de fotones en una longitud z en el medio y la población de átomos en el estado 1 por unidad de volumen.

Usando la ley de conservación de la energía, la variación del número de fotones n como función de la longitud z dentro del medio está dada por:

$$\frac{dn}{dz} = (N_2 - N_1)b_{12}n + a_{21}N_2 \quad (\text{A. 1.4})$$

donde $b_{12} = b_{21}$ y a_{21} están relacionados con los coeficientes de Einstein ($B_{nm} = B_{mn}$ y A_{nm}) a través de cantidades constantes.

Por simplicidad se puede ignorar la emisión espontánea, y expresar el número de fotones como función de la distancia de propagación z así:

$$n(z) = n_0 e^{(N_2 - N_1)b_{12}z} \quad (\text{A. 1.5})$$

donde $n_0 = n(0)$ es el número de fotones que inciden en el medio. Si $N_2 < N_1$, la ecuación (A.1.5) se reduce a la ley de Lambert-Beer $n(z) = n_0 e^{-\alpha z}$, $\alpha = (N_1 - N_2)b_{12} > 0$ y corresponde a la situación en la que un material se encuentra a temperatura ambiente: existen más átomos en el estado basal con capacidad para absorber radiación que átomos en el estado excitado capaces de emitir radiación.

Una segunda situación corresponde para $N_1 = N_2$, muestra que el número de fotones permanece constante a través de la dirección de propagación: $n(z) = n_0$. Finalmente, si $N_2 > N_1$, existe una población mayor de átomos en el estado excitado que en el estado basal, y se considera que ha ocurrido inversión de la población, entonces: $n(z) = n_0 e^{gz}$ y $g = (N_2 - N_1)b_{12} > 0$. En esta situación el medio se ha convertido en un medio de ganancia en el que la radiación de energía $\hbar\omega = E_2 - E_1$ es amplificada.

Inversión de la población

Para construir un resonador óptico el primer paso es encontrar cómo amplificar la radiación, y hemos visto que ésto es posible bajo la condición en la cual se ha creado inversión de la población en un medio de ganancia. Sin embargo, en un sistema electrónico de dos niveles de energía no es posible lograr la inversión de la población. Esto se deduce teniendo en cuenta que la función de onda para cada estado es anti-simétrica al intercambio de partículas, por lo cual se obedece la distribución estadística de Fermi-Dirac:

$$\frac{N_2}{N_1} = \frac{1}{e^{\Delta E/kT} + 1} \quad (\text{A. 1.6})$$

Cuando $T \rightarrow 0$, $N_2/N_1 \rightarrow 0$, de esta forma a $T = 0$ K, $N_2 = 0$ y $N_1 = N_0$. Por el contrario, cuando $T \rightarrow \infty$, $N_2 = N_1/2$, es decir en el mejor de los casos para un sistema de dos niveles se logra que la población de átomos en el estado excitado sea la mitad de la correspondiente al estado basal, y no se puede lograr la inversión de la población en el material a través de calentamiento.

Bombeo óptico

Los sistemas de dos niveles son en realidad escasos, por lo cual la dificultad para lograr la inversión de la población en un sistema de dos niveles descrita en la sección anterior es básicamente un ejercicio meramente académico. Un sistema atómico o molecular consta de una serie de estados electrónicos más compleja que sólo dos niveles. Para explicar el bombeo óptico vamos a considerar por simplicidad primero un sistema de tres niveles, como el mostrado en la Figura A.1.3.

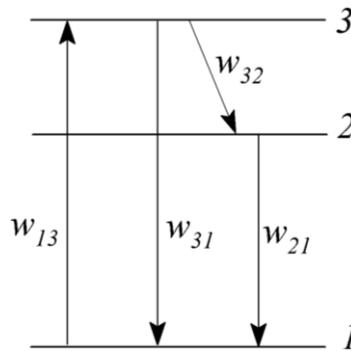


Figura A.1.3. Sistema de tres niveles usado para ejemplificar la inversión de la población a través de bombeo óptico.

El sistema es irradiado con fotones de energía $\hbar\omega = E_3 - E_1$, las probabilidades de transición entre los distintos niveles de energía n y m están dadas por w_{nm} . Los electrones

son promovidos del estado 1 al estado 3 con una probabilidad w_{13} por unidad de tiempo que tiene en cuenta la sección eficaz de absorción y la intensidad de la radiación incidente.

Desde el estado 3 puede ocurrir una transición al estado 2 con una probabilidad w_{32} o al estado basal con una probabilidad w_{31} . Suponiendo que $w_{32} \gg w_{31}$, que la transición radiativa de interés es $2 \rightarrow 1$ y que el estado 2 tiene un tiempo de vida más largo que el correspondiente al estado 3 ($w_{21} \ll w_{32}$); el estado 2 se conoce como un estado metaestable. Las ecuaciones cinéticas para la población de átomos en los estados 3 y 2 son:

$$\frac{dN_3}{dt} = w_{13}N_1 - w_{32}N_3 - w_{31}N_3 \quad (\text{A. 1.7})$$

$$\frac{dN_2}{dt} = w_{32}N_3 - w_{21}N_2 \quad (\text{A. 1.8})$$

Una solución para las ecuaciones (A.1.7) y (A.1.8) es la que corresponde a poblaciones de cada estado que son constantes en el tiempo:

$$\frac{N_2}{N_1} \approx \frac{w_{13}}{w_{21}} \left(\frac{w_{32}}{w_{32} + w_{31}} \right) \quad (\text{A. 1.9})$$

Si la velocidad de bombeo es lo suficientemente grande para superar la emisión espontánea entre los estados 2 y 1 ($w_{13} \gg w_{21}$), entonces la población de átomos en el estado 2 es mayor que en el estado 1, se ha logrado la inversión de la población, toda vez que ya consideramos que $w_{32} \gg w_{31}$.

Amplificación de la luz

Una vez que se ha logrado la inversión de la población en un medio de ganancia, ésta se puede usar para amplificar la luz. Si consideramos un sistema de tres niveles en el que ha ocurrido la inversión de la población ($\Delta N = N_1 - N_2$, $\Delta N < 0$), en cambio en la

intensidad de una onda electromagnética que se propaga en el eje z es proporcional a la inversión de la población ΔN y a la intensidad de la onda:

$$\frac{dI(z)}{dz} = -I(z)\Delta N\sigma_{21} \quad (\text{A. 1.10})$$

donde σ_{21} es la sección eficaz de la transición de emisión estimulada y depende del medio y la longitud de onda de la luz incidente.

Referencias

(1) Rulliere, C. *Femtosecond Laser Pulses: Principles and Experiments*; Springer, **2004**.

APÉNDICE 2. SISTEMAS LÁSER USADOS EN ESTE TRABAJO

Oscilador de Titanio:zafiro¹

El principal elemento en espectroscopia láser con resolución temporal es el oscilador o láser de Titanio:zafiro. Este sistema pertenece a la categoría de láseres sintonizables y de estado sólido. El oscilador de Ti:zafiro también se clasifica como un láser vibro-electrónico debido a las características de los estados involucrados en la emisión de radiación. El medio activo tiene niveles de energía que están formados por bandas que contienen varios sub-niveles vibracionales dentro de un mismo estado electrónico.

El nombre vibro-electrónico se debe al hecho que el considerable ensanchamiento de banda para las transiciones de absorción y emisión (Figura A.2.1) se debe al fuerte acoplamiento entre los niveles electrónicos del Ti^{+3} y los modos vibracionales de la red cristalina de Al_2O_3 (zafiro).

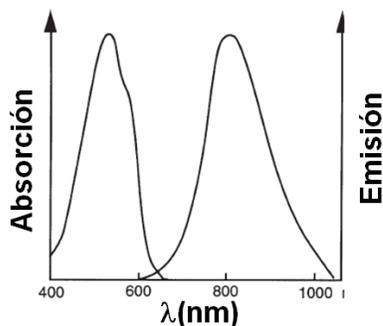


Figura A.2.1. Espectro de absorción (banda a la izquierda) y emisión (banda a la derecha) para el material láser Ti:zafiro.

En la Figura A.2.2 se muestran los niveles vibro-electrónicos involucrados en la generación de radiación láser de este medio activo. Como se observa, las transiciones a distintos niveles vibracionales del estado basal en este sistema son las que permiten un intervalo de sintonización entre ~700 nm y ~1000 nm.

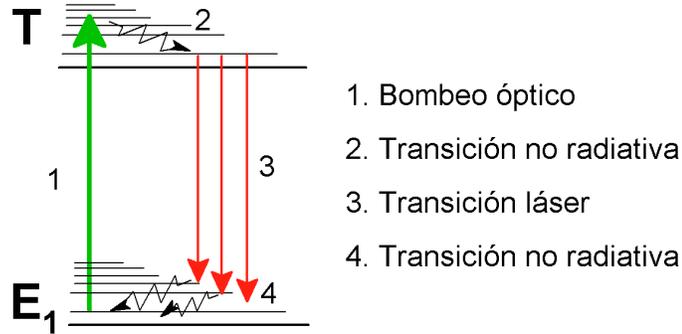


Figura A.2.2. Niveles de energía y respectivas transiciones en un láser vibro-electrónico.

El diseño típico de un láser de Ti:zafiro se muestra en la Figura A.2.3, el cual consiste de una fuente láser externa de bombeo que puede ser un láser de Nd:YO₄ con doblado de frecuencia ($\lambda_{\text{Bombeo}} = 527 \text{ nm}$). La cavidad óptica está formada por un par de espejos cóncavos y se usa un par de prismas para compensar la dispersión temporal del pulso.

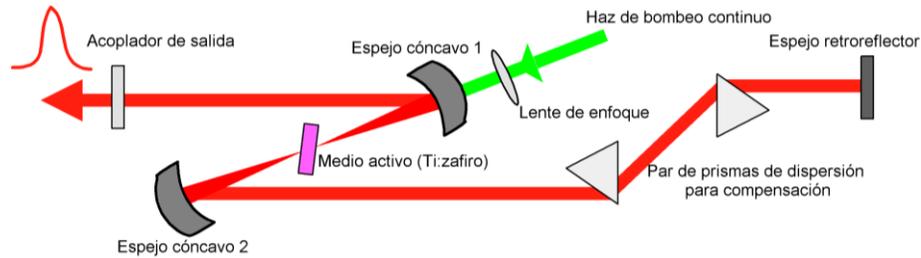


Figura A.2.3. Esquema de los componentes principales de un láser de Ti:zafiro.

Este sistema láser permite obtener pulsos ultracortos ($\sim 150 \text{ fs}$) a través de la técnica de amarre de modos longitudinales o simplemente amarre de modos (“*mode-locking*”). Esta técnica consiste en ajustar la fase de las componentes espectrales del pulso de luz de tal forma que la relación de fase entre todas las componentes longitudinales del pulso dentro de la cavidad sea constante. Para este sistema laser se puede demostrar¹ que el período de tiempo que hay entre cada pulso de luz esta dado por: $T = 2L/c$ mientras que la duración de un pulso de luz, t_p , está dada por:

$$t_p = \frac{T}{N} = \frac{2L}{cN} \quad (\text{A. 2.1})$$

donde N es el número de modos longitudinales generados en el resonador óptico, L es la longitud del resonador y c es la velocidad de la luz (ver Figura A.2.4).

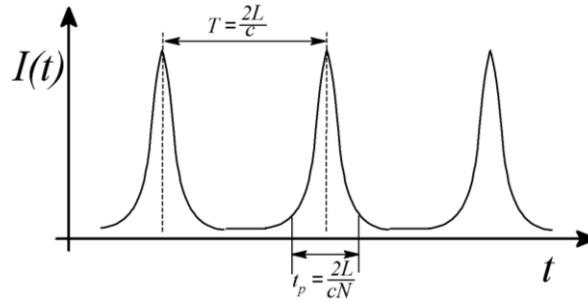


Figura A.2.4. Evolución temporal de la intensidad en un láser que opera en *mode-locking*.

El número de modos longitudinales, N , depende del ancho de banda de la ganancia láser para el espectro de emisión estimulada del medio activo (titanio-zafiro), $\delta\lambda$:

$$N = \frac{4L\delta\lambda}{\lambda_0^2} \quad (\text{A. 2.2})$$

A partir de las ecuaciones (A.2.1) y (A.2.2) se deduce que mientras más grande sea el número de modos longitudinales involucrados en una transición espectral ancha, la duración temporal del pulso será más corta. Como ejemplo, el número de modos longitudinales puede variar de unas cuantas unidades en láseres de gas (p. ej. láseres de He-Ne) a $\sim 10^4$ o más en láseres de colorantes y algunos láseres de estado sólido, como el láser de Titanio:zafiro. El ensanchamiento espectral de las líneas de emisión en el medio activo Ti:zafiro hace posible generar pulsos láser ultracortos, del orden de fs.

El principio de incertidumbre de Heisenberg establece que las desviaciones estándar de t y E relacionan de acuerdo a $\Delta t \Delta E = \hbar$; para un pulso de luz Δt denota la incertidumbre temporal y puede asumirse como t_p , y $\Delta E = \hbar \Delta \omega$ define la incertidumbre en la energía correspondiente a un ancho espectral $\Delta \omega$. Considérese un pulso de luz cuyo campo eléctrico E tiene una dependencia temporal como una función gaussiana:

$$\mathbf{E}(t) = \frac{E_0}{\tau} \exp\left(-\frac{t^2}{2\tau^2}\right) \quad (\text{A. 2.3})$$

Usando las propiedades de la transformada de Fourier^b se puede obtener que para un pulso de luz con un perfil temporal gaussiano, limitado por transformación (de Fourier) el producto $\Delta t \Delta E$ es equivalente a:

$$\Delta t_{\text{FWHM}} \Delta \nu_{\text{FWHM}} = 0.441 \quad (\text{A. 2.4})$$

La relación (A.2.4) se cumple sólo cuando los modos longitudinales del pulso de luz están perfectamente sincronizados unos con otros. Esto equivale a decir que la fase espectral, $\Phi(\omega)$, es una función lineal de la frecuencia, por lo cual para cada modo longitudinal con frecuencia ω se debe cumplir que:

$$\mathbf{E}(\omega) = A(\omega) e^{i\Phi(\omega)} \quad (\text{A. 2.5})$$

$$\Phi(\omega) = \Phi_0 + \Phi_l(\omega - \omega_0) \quad (\text{A. 2.6})$$

donde ω_0 es la frecuencia central de la emisión láser con fase Φ_0 . Para que ocurra el amarre de modos es crucial que todos los componentes de frecuencia (uno por cada modo longitudinal) tengan el mismo tiempo de ida y regreso en la cavidad, lo cual se asegura al cumplirse la ecuación (A.2.6).

Dispersión temporal de pulsos ultracortos

Debido a la dispersión de un material cada componente espectral viaja con una velocidad de grupo diferente y la fase espectral es una función más compleja que la mostrada en la ecuación (A.2.9), lo cual da origen a la dispersión del retardo de grupo, GDD (“*group delay dispersión*”) que explicaremos a continuación. El campo eléctrico de un pulso láser limitado por transformación se puede expresar como:

^b La transformada de Fourier de la ecuación (A.2.3) es $\mathbf{E}(\omega) = \frac{E_0}{2\pi} \exp\left(-\frac{\tau^2}{2}(\omega - \omega_0)^2\right)$

$$E(t) = \int E(\omega) e^{i(\omega t + \Phi(\omega))} d\omega \quad (\text{A. 2.7})$$

La fase espectral $\Phi(\omega)$ se puede expresar como una expansión de Taylor alrededor de la frecuencia central ω_0 :

$$\Phi(\omega) = \Phi(\omega_0) + \Phi'_{\omega_0}(\omega - \omega_0) + \frac{\Phi''_{\omega_0}}{2}(\omega - \omega_0)^2 + \dots \quad (\text{A. 2.8})$$

Usando $\Delta\omega = \omega - \omega_0$, truncando la expansión de Taylor hasta la primera derivada Φ'_{ω_0} y reemplazando la ecuación (A.2.8) en (A.2.7) se obtiene:

$$E(t) = e^{i(\omega_0 t + \Phi(\omega_0))} \int_{-\infty}^{\infty} E(\omega) e^{i\Delta\omega(t + \Phi'_{\omega_0})} d\omega \quad (\text{A. 2.9})$$

La cantidad $t + \Phi'_{\omega_0}$ redefine el origen temporal, en tanto que $\tau_g = |\Phi'_{\omega_0}|$ se define como el retraso de grupo. Ahora, considérese un material óptico a través del cual las distintas componentes espectrales recorren una distancia L . Para cada componente espectral definimos: $E(\omega) = A_\omega \cos(\omega t - k(\omega)x)$, con lo cual $\Phi(\omega) = -k(\omega)x$, siendo x la distancia recorrida por una componente espectral en el material. Considérese que cada componente espectral recorre una distancia L , con lo cual se obtiene:

$$\Phi(\omega) = -k(\omega)L \quad (\text{A. 2.10})$$

y el retraso de grupo es entonces:

$$\tau_g = |\Phi'_{\omega_0}| = k'_{\omega_0}L = \left. \frac{dk}{d\omega} \right|_{\omega_0} L \quad (\text{A. 2.11})$$

$(k'_{\omega_0})^{-1}$ tiene unidades de velocidad (L/τ_g) y se define como la velocidad de grupo, v_g , recordando que $k(\omega) = \frac{\omega}{c}n(\omega)$, donde c es la velocidad de la luz en el vacío y n es el índice de refracción del material, se puede obtener:

$$v_g = \frac{c}{n(\omega_0)} \left(1 + \frac{\omega_0}{n(\omega_0)} \cdot \left. \frac{dn}{d\omega} \right|_{\omega_0} \right)^{-1} \quad (\text{A. 2.12})$$

Ahora bien, si incluimos hasta el tercer término de la expansión de Taylor para la fase espectral en la ecuación (A.2.8) obtenemos para el campo eléctrico:

$$E(t) = e^{i(\omega_0 t + \Phi(\omega_0))} \int_{-\infty}^{\infty} E(\omega) e^{i\Delta\omega(t + \Phi'_{\omega_0} + \frac{1}{2}\Phi''_{\omega_0}\Delta\omega)} d\omega \quad (\text{A. 2.13})$$

La ecuación (A.2.13) muestra que la fase de grupo no es independiente de la frecuencia ω , sino que más bien cada componente espectral tendrá un retraso que va a depender de la frecuencia debido al término $\frac{1}{2}\Phi''_{\omega_0}\Delta\omega$. La segunda derivada de la fase espectral evaluada para ω_0 , Φ''_{ω_0} , corresponde a la GDD.

Considérese dos componentes espectrales con frecuencias ω_1 y ω_2 que forman parte de un pulso de luz. Los correspondientes retrasos de grupo serán $\tau_g^1 = |\Phi'_{\omega_1}|$ y $\tau_g^2 = |\Phi'_{\omega_2}|$. Después de pasar por un elemento dispersivo, las dos componentes espectrales tendrán una separación temporal relativa dada por:

$$\Delta\tau_g = \tau_g^2 - \tau_g^1 = |\Phi'_{\omega_2}| - |\Phi'_{\omega_1}| \quad (\text{A. 2.14})$$

que se puede aproximar como:

$$\Delta\tau_g \sim \Phi''_{\omega_1}(\omega_2 - \omega_1) \quad (\text{A. 2.15})$$

Supóngase un pulso de luz con un perfil gaussiano centrado en ω_0 para el cual dos grupos de componentes espectrales representados por las frecuencias angulares ω_1 y ω_2 respectivamente se muestran en la Figura A.2.5.

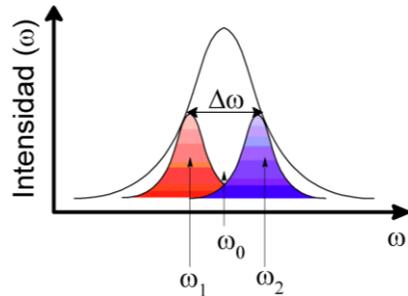


Figura A.2.5. Pulso de luz láser gaussiano centrado en ω_0 , se representan dos grupos de componentes espectrales ω_1 y ω_2 , $\Delta\omega = \omega_2$ y ω_1 .

$\Delta\tau_g$ mide la diferencia del retraso de los dos componentes en los extremos espectrales y por tanto es una medida de la dispersión temporal de pulso, dado $\Delta\tau_g \sim \Phi''_0(\omega_2 - \omega_1)$, y Φ''_0 se puede considerar como una medida de la dispersión temporal por unidad de ancho de banda. A partir de $\Delta\tau_g \sim \Phi''_0(\omega_2 - \omega_1)$ se puede ver que Φ''_0 tiene las dimensiones de $[\Phi''_0] \equiv \frac{[t]}{[t^{-1}]} \equiv [t^2]$. Si el valor de Φ''_0 es significativo entonces el pulso puede tener una duración muy larga, lo cual se puede aplicar por ejemplo en la expansión temporal de pulsos ultracortos.

Hemos mencionado que para obtener pulsos láser ultracortos, con un período de repetición definido por $T = 2L/c$, es necesario que el sistema láser opere en un régimen conocido como amarre de modos. Existen varias formas de lograr que la fase de los modos longitudinales que coexisten en un resonador óptico mantenga una relación constante. Una de estas formas es con la que trabaja el oscilador de Titanio:zafiro del que se dispone en nuestro laboratorio, es la más común y es conocida como amarre de modos por efecto Kerr.

El amarre de modos por efecto Kerr no requiere de elementos ópticos adicionales en el resonador óptico, ya que el medio activo (Titanio:zafiro) en sí mismo trabaja como un elemento óptico que permite la auto-modulación de la fase de los modos longitudinales en el resonador óptico.

El efecto Kerr se conoce desde hace bastante tiempo en óptica no lineal, implica que el índice de refracción es una función de la intensidad de la luz:

$$n = n_0 + n_2 I \quad (\text{A.2.16})$$

Esto indica que el efecto Kerr genera una variación del perfil del haz dependiente de la intensidad, de hecho para un haz con un perfil gaussiano en la dirección transversal, la distribución espacial del índice de refracción es:

$$n(r) = n_0 + n_2 I(r) \quad (\text{A. 2.17})$$

donde $I(r)$ está dado por una distribución gaussiana $I(r) = \exp(-\rho r^2)$. La Figura A.2.6 muestra la distribución del índice de refracción en el eje x para un haz gaussiano que se propaga en el eje z .

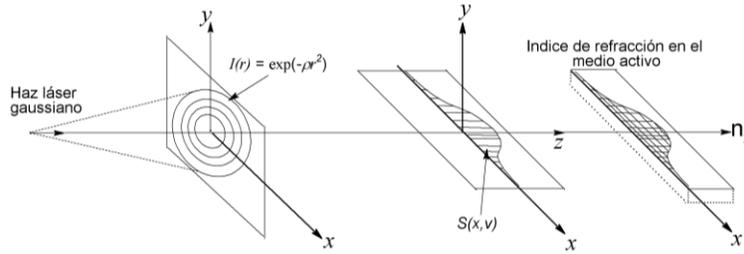


Figura A.2.6. Representación de la dependencia del índice de refracción con la intensidad del medio activo como lente $S(x, v)$ es el vector de Poynting siendo v la velocidad de propagación del haz.

Como se observa en la Figura A.2.6 el cambio en el índice de refracción en un medio sigue la distribución de la intensidad del haz láser. Si $n_2 > 0$, el índice de refracción tiene un máximo en $x = 0$, en el centro del haz gaussiano y es mucho más pequeño en los extremos. Por lo anterior, el índice de refracción no se distribuye homogéneamente en un material que presente el efecto Kerr, y corresponde a la situación en la cual se ha introducido un elemento adicional en el resonador óptico que actúa como un lente de forma gaussiana.

El lente formado en el material con efecto Kerr enfoca el haz láser hacia el centro como se muestra en la Figura A.2.7. Si adicionalmente se introduce una apertura dentro del resonador este empieza a actuar como un obturador selectivo.

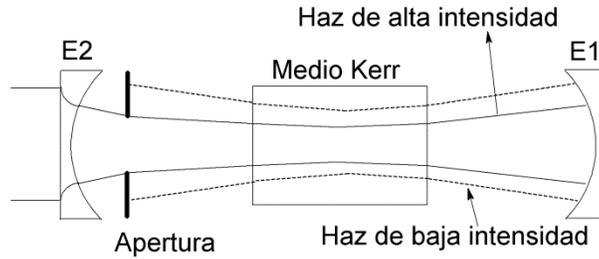


Figura A.2.7. Modulación de la amplitud por un lente Kerr en un resonador óptico.

Este obturador induce preferencialmente más pérdidas en los extremos del haz (selección por tamaño), el cual sigue siendo una onda continua, permitiendo que el modo central pulsado domine la ganancia en el medio activo. Los modos de alta intensidad son transmitidos a través de la apertura debido a un fuerte enfoque por efecto Kerr, mientras que los modos de baja intensidad no pueden transmitirse al espejo E2 a través de la apertura y estos se pierden.

El haz de alta intensidad es entonces reflejado por el espejo E2 con algunas pérdidas en la apertura y pasa por el medio activo nuevamente donde es amplificado. El proceso de pérdida-amplificación se repite cada ida y vuelta lo que conduce a la modulación de la amplitud de los modos en el resonador y durante el amarre de modos.

Este tipo de amarre de modos es conocido como autoamarre de modos ya que el lente Kerr es el mismo cristal láser. En principio, la auto-modulación de la fase no requiere ningún elemento activo o pasivo en el resonador, incluso, la apertura de la Figura A.2.7 (o apertura dura) para la selección de modos basada en el tamaño de la sección transversal no es necesaria, dado que una apertura natural se forma por el perfil de ganancia dentro del medio activo (cristal láser).

Amplificador regenerativo de pulsos dispersos (“*chirped pulse amplifier*”)

El sistema de amplificación regenerativa permite amplificar los pulsos provenientes del oscilador de Ti:zafiro (800 nm, 100 MHz y $\sim 3\text{nJ/pulso}$) en un factor del orden de 10^5 (0.65

mJ/pulso) alterando de forma mínima las características espectrales y temporales del pulso semilla. Básicamente, este sistema consta de tres partes: el expansor de pulsos ultracortos, una cavidad donde ocurre la amplificación y el compresor de pulsos. A continuación se describe en qué consiste cada una de estas componentes.

Expansor de pulsos ultracortos

El principal elemento del expansor de pulsos es una rejilla de difracción donde al incidir el haz proveniente del oscilador de Ti:zafiro provoca que las componentes espectrales del pulso de entrada se dispersen. Bajo la configuración adecuada de la rejilla de difracción se logra que las componentes espectrales de mayor frecuencia recorran una mayor distancia que las componentes de menor frecuencia luego de que el pulso de entrada es dispersado.

Como resultado las componentes de menor frecuencia logran salir primero del expansor y el pulso se expande temporalmente. Este proceso se esquematiza en la Figura A.2.8.

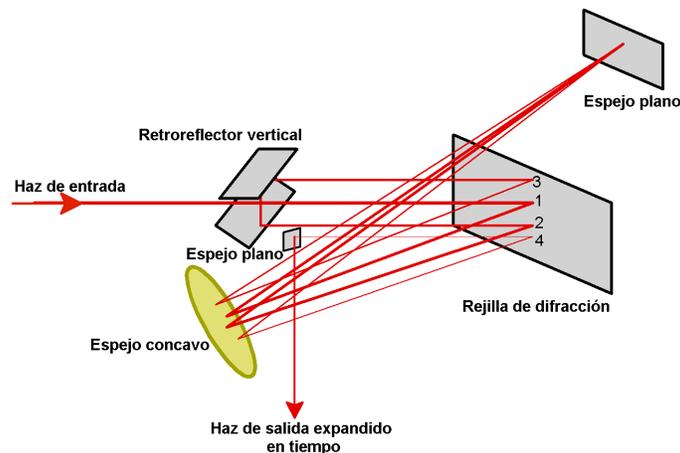


Figura A.2.8. Arreglo óptico del expansor de pulsos ultracortos.

El haz de entrada tiene un total de cuatro reflexiones en la rejilla de difracción. El grosor de las líneas representa la forma como el haz se expande temporalmente, desde las líneas más gruesas (mayor duración del pulso) hacia las líneas más delgadas que representan el pulso expandido en el tiempo. El arreglo de elementos ópticos en el expensor, permite usar una sola rejilla de difracción para realizar varios pasos de expansión temporal.

Amplificador regenerativo¹

Un amplificador regenerativo de pulsos láser de baja energía permite obtener de manera eficiente pulsos de alta energía y potencia. La energía por pulso a la salida de un oscilador de Ti:zafiro típicamente no excede unos cuantos nJ. En muchas aplicaciones, como por ejemplo, experimentos donde es necesario doblar o triplicar la frecuencia de emisión láser fundamental del oscilador de Ti:zafiro es indispensable disponer de un haz láser con mayor energía por pulso.

Las tres maneras más importantes para la amplificación de pulsos láser son: amplificador de potencia multipasos, amplificador multipasos y el amplificador regenerativo. Este último tipo de amplificación es la que se usó en el presente trabajo y se describe a continuación.

En la Figura A.2.9 se presentan los principales componentes de un amplificador regenerativo. Un amplificador regenerativo consta de un medio activo (cristal de Ti:zafiro), un par de celdas Pockels (CP1 y CP2), un retardador de fases $\pi/2$ ($\lambda/4$) y un polarizador ubicado entre los espejos M1 y M2. El medio de ganancia es bombeado con radiación correspondiente al segundo armónico de un láser Nd:YAG que tiene una duración por pulso de ≈ 150 ns con una potencia de ≈ 4.5 W.

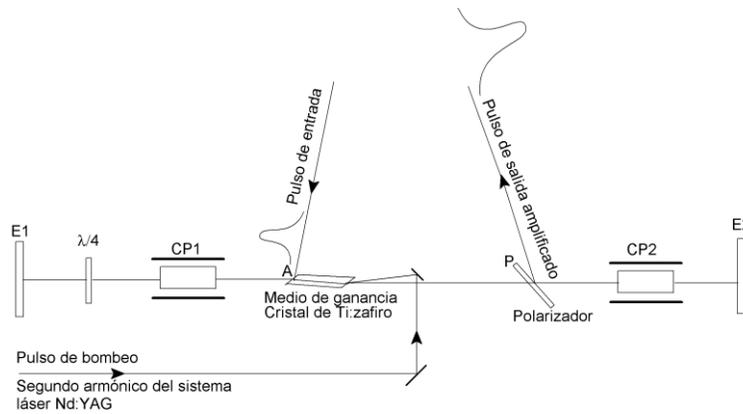


Figura A.2.9. Esquema de un amplificador regenerativo. E1: espejo 1, $\lambda/4$: retardador de fases $\pi/2$. CP1: celda Pockels 1, CP2: celda Pockels 2, P: polarizador y E2: espejo 2.

Uno de los pulsos del tren de pulsos proveniente del oscilador Ti:zafiro es seleccionado a través de polarización para entrar al amplificador regenerativo (pulso de entrada o pulso semilla). El pulso de entrada queda atrapado en el amplificador donde será amplificado en cada paso por el cristal. Al atravesar el medio de ganancia varias veces (10 – 20) el pulso de luz gana más energía. Una vez el aumento en la energía es del orden de 10^6 éste saldrá de la cavidad (pulso de salida amplificado).

El número de pasos de amplificación depende del tiempo de ida y vuelta entre los espejos E1 y E2 en el amplificador, e.g. si el tiempo de ida y vuelta es 10 ns y la duración del pulso de bombeo es 250 ns la evolución típica de la energía del pulso es como la que se muestra en la Figura A.2.10.

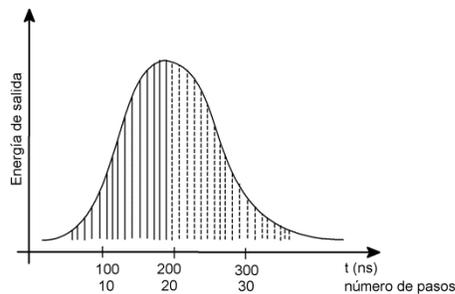


Figura A.2.10. Evolución temporal de la energía del pulso amplificado (líneas verticales) en función del tiempo y el número de pasos de ida y vuelta entre los espejos E1 y E2. La curva envolvente representa el pulso de bombeo.

La energía del pulso amplificado sigue la forma del pulso de bombeo, originándose debido a la disminución de la población de átomos en estado excitado (en el medio de ganancia Ti:zafiro). De la Figura A.2.10 se puede inferir que el pulso debe ser extraído del amplificador después de cierto número de pasos donde la ganancia es máxima y la energía del pulso es la más grande posible, p. ej., en la Figura A.2.10, cercano a 20 pasos.

Ahora se explicara cómo se logra ingresar el pulso semilla y mantener los subsecuentes pulsos amplificados dentro del amplificador. El principio es atrapar el pulso cambiando la polarización del haz láser en el amplificador. Es importante recordar que:

- i) Un retardador de fases $\lambda/4$ cambia la polarización lineal de un pulso láser a circular.
- ii) Un retardador de fases $\lambda/2$ rota 2α la polarización lineal de un pulso láser, siendo α es el ángulo entre el vector de polarización y el eje óptico del material.
- iii) El polarizador actúa como un polarizador por reflexión. Es decir, si un haz láser no polarizado incide al ángulo de Brewster, el haz reflejado tendrá polarización perpendicular al plano de reflexión. En tanto que el haz transmitido estará polarizado principalmente en una dirección paralela al plano de reflexión.
- iv) Una celda Pockels puede actuar como un retardador de fases $\lambda/4$ o $\lambda/2$ dependiendo del voltaje externo aplicado a las mismas. Si no se aplica un voltaje (“off”), la celda Pockels no cambia la polarización del haz.

La forma como el pulso semilla es atrapado y amplificado en la cavidad es la siguiente: el pulso ingresa a la cavidad cuando es reflejado por una de las caras del cristal

de Ti:zafiro en el punto A de la Figura A.2.9. El ángulo de incidencia en A es el ángulo de Brewster, por lo cual si el haz incidente tiene polarización lineal en una dirección perpendicular al plano del dibujo en la Figura A.2.9 (llámese polarización vertical) el haz es reflejado completamente hacia E1.

Así, cuando el haz recorre la siguiente trayectoria: $A \rightarrow \text{CP1}(\text{"off"}) \rightarrow \lambda/4 \rightarrow \text{E1} \rightarrow \lambda/4 \rightarrow \text{CP1}(\text{"off"}) \rightarrow A$, la dirección de polarización del rota 90° debido a que en este recorrido el haz interacciona dos veces con el retardador de fases $\lambda/4$. $\text{CP1}(\text{"off"})$ significa que no se aplica un voltaje a la celda Pockels 1.

Ahora nuevamente en el punto A el haz con polarización en la dirección paralela al plano de reflexión del cristal (polarización horizontal) es refractado y se da el proceso de amplificación debido a la emisión estimulada del medio de ganancia en el cual previamente se ha dado la inversión de la población por bombeo óptico con el segundo armónico de un láser de Nd:YAG.

Posteriormente, el pulso pasa a través del polarizador (P) y la celda Pockels 2, $\text{CP2}(\text{"off"})$ el pulso es reflejado por el espejo E2 y recorre la trayectoria $\text{CP2}(\text{"off"}) \rightarrow \text{P} \rightarrow A \rightarrow \text{CP1}(\text{"off"}) \rightarrow \lambda/4 \rightarrow \text{E1} \rightarrow \lambda/4 \rightarrow \text{CP1}(\text{"off"}) \rightarrow A$ y sale de la cavidad.

Sin embargo, si en la CP1 se aplica el voltaje adecuado para que funcione como un retardador de fases $\lambda/4$ de tal forma que la trayectoria sea: $\text{CP2}(\text{"off"}) \rightarrow \text{P} \rightarrow A \rightarrow \text{CP1}(\text{"on"}\lambda/4) \rightarrow \lambda/4 \rightarrow \text{E1} \rightarrow \lambda/4 \rightarrow \text{CP1}(\text{"on"}\lambda/4) \rightarrow A$, el efecto total del retardador de fases $\lambda/4$ y $\text{CP1}(\text{on}-\lambda/4)$ es $\lambda/4 + \lambda/4 + \lambda/4 + \lambda/4 = \lambda$ y el pulso llega al punto A con polarización horizontal y mientras permanezca $\text{CP1}(\text{"on"}\lambda/4)$ el pulso de luz se propaga entre los espejos E1 y E2 y en cada paso es amplificado.

Cuando el pulso es amplificado al nivel óptimo ($\sim 10^6$ veces), se aplica el voltaje necesario para que la celda Pockels 2 funcione como un retardador de fases $\lambda/4$, CP2(“on” $\lambda/4$) con lo cual en la trayectoria: medio de ganancia \rightarrow P \rightarrow CP2(“on” $\lambda/4$) \rightarrow E2 \rightarrow CP2(“on” $\lambda/4$) \rightarrow P el efecto neto en la polarización del haz es $\lambda/4 + \lambda/4 = \lambda/2$, es decir, cambia a vertical y el haz es reflejado en P con lo cual éste sale del amplificador.

Compresor de pulsos

Una vez que el pulso de luz ha sido amplificado es necesario recuperar la duración temporal del mismo a fin de obtener un pulso de alta energía y duración corta que será usado en las aplicaciones de espectroscopia con resolución temporal. El proceso de compresión temporal de un pulso láser es el proceso inverso a la expansión temporal de pulsos. La Figura A.2.11 muestra las principales componentes de un compresor de pulsos y permite explicar su funcionamiento.

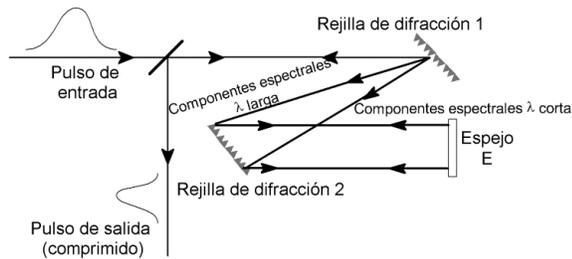


Figura A.2.11. Esquema de las componentes de un compresor de pulsos usando un par de rejillas de difracción.

Básicamente, el proceso de la compresión temporal de pulsos ultracortos consiste en lograr que el camino óptico recorrido a través del par de rejillas sea más largo para las componentes espectrales de longitud de onda larga (o componentes espectrales hacia el rojo) que para las componentes de longitud de onda corta (o hacia el azul).

El espejo E refleja el haz hacia la rejilla de difracción 2 y la diferencia en los caminos ópticos recorridos por las componentes espectrales hacia el rojo y hacia el azul

sigue incrementando. Esta configuración del par de rejillas de difracción paralelas genera dispersión de la velocidad de grupo GVD (“*group velocity dispersion*”) negativa. El pulso de entrada tiene GVD positiva y al pasar por las rejillas se reduce su duración temporal debido a la cancelación de GVD positiva con la GVD negativa.

Referencias

- (1) Abramczyk, H. *Introduction to Laser Spectroscopy*; Elsevier Science **2005**.

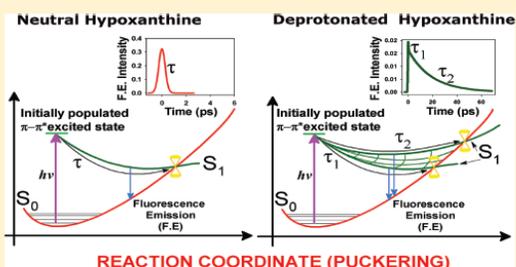
On the Accessibility to Conical Intersections in Purines: Hypoxanthine and its Singly Protonated and Deprotonated Forms

Juan. P. Villabona-Monsalve,[†] Raquel Noria,[†] Spiridoula Matsika,[‡] and Jorge Peón^{*†}

[†]Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México, 04510, D.F., México

[‡]Department of Chemistry, Temple University, 13th and Norris Streets, Philadelphia Pennsylvania 19122, United States

ABSTRACT: The dynamics following electronic excitation of hypoxanthine and its nucleoside inosine were studied by femtosecond fluorescence up-conversion. Our objective was to explore variants of the purinic DNA bases in order to determine the molecular parameters that increase or reduce the accessibility to ground state conical intersections. From experiments in water and methanol solution we conclude that both dominant neutral tautomers of hypoxanthine exhibit ultrashort excited state lifetimes ($\tau < 0.2$ ps), which are significantly shorter than in the related nucleobase guanine. This points to a more accessible conical intersection for the fluorescent state upon removal of the amino group, present in guanine but absent in hypoxanthine. The excited state dynamics of singly protonated hypoxanthine were also studied, showing biexponential decays with a 1.1 ps component (5%) besides a sub-0.2 ps ultrafast component. On the other hand, the S_1 lifetimes of the singly deprotonated forms of hypoxanthine and inosine show drastic differences, where the latter remains ultrafast but the singly deprotonated hypoxanthine shows a much longer lifetime of 19 ps. This significant variation is related to the different deprotonation sites in hypoxanthine versus inosine, which gives rise to significantly different resonance structures. In our study we also include multireference perturbation theory (MRMP2) excited state calculations in order to determine the nature of the initial electronic excitation in our experiments and clarify the ordering of the states in the singlet manifold at the ground state geometry. In addition, we performed multireference configuration interaction calculations (MR-CIS) that identify the presence of low-lying conical intersections for both prominent neutral tautomers of hypoxanthine. In both cases, the surface crossings occur at geometries reached by out of plane opposite motions of C2 and N3. The study of this simpler purine gives several insights into how small structural modifications, including amino substitution and protonation site and state, determine the accessibility to conical intersections in this kind of heterocycles.



INTRODUCTION

Ultrashort excited state lifetimes ($\tau < 1$ ps) and extremely low fluorescence quantum yields ($\sim 10^{-4}$) are the main photo-physical characteristics of the purinic DNA bases.^{1–4} The efficient elimination of electronic energy in these systems is likely to have been a key element in the early stages of the molecular evolution which determined the basic elements of the genetic material.⁵ These systems are also among the most important prototypes to study ultrafast evolution in electronically excited states and nonadiabatic processes since the wavepacket motions result in rapid and highly efficient changes in the electronic states.^{6–8}

The subpicosecond excited state decays observed in these molecules come from crossings between the potential energy surfaces in the low lying electronic states. Over the past few years, it has come into view that these conical intersections (CIs), in fact play a central role in several ultrafast processes of primary relevance in photochemistry.^{2–5,9,10} High level computational methods (e.g., CASSCF/CASPT2) have shed light into the intrinsic reaction coordinates which ensure the

accessibility to a CI. Together with experimental work with femtosecond resolution, the calculations have started to give detailed information on the relations between the molecular structure and the excited state decay dynamics.^{11,12} Several issues however remain open for a full description, including questions about the basic elements in a molecular framework which guarantee the presence of an accessible CI, and how small modifications in the molecular structure affect such accessibility.

In this contribution we present fluorescence up-conversion experiments which explore the evolution of the emissive states in a variant of purinic DNA bases. Our aim was to observe how discrete changes in a molecule produce effects on the fluorescence lifetimes, and from this, deduce factors that influence the accessibility to CIs. We have focused on the most prominent tautomers of hypoxanthine (HPX) and its nucleoside inosine (INS). The compounds of our study can be

Received: January 17, 2012

Published: April 9, 2012

considered as variants of guanine and guanosine respectively, as shown in Figure 1. Specifically, we were interested in how the

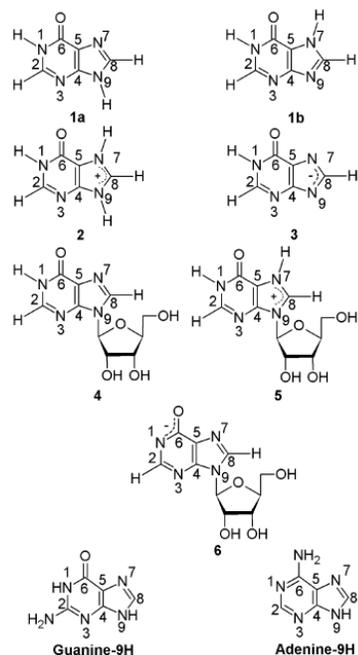


Figure 1. Predominant tautomers of hypoxanthine (HPX) and inosine (INS) at different pH values in aqueous solution: (1a) keto-N9-H HPX tautomeric form, present in pH = 5 aqueous solution; (1b) keto-N7-H HPX tautomeric form, present in pH = 5 aqueous solution; (2) singly protonated form of HPX, predominant in pH = 1 aqueous solution; (3) singly deprotonated form of HPX, predominant in pH = 10 aqueous solution; (4) INS neutral form in pH = 6 aqueous solution; (5) singly protonated INS, predominant in a HCl 1 M aqueous solution; (6) singly deprotonated INS, predominant species in pH = 10 aqueous solution.

removal of the amino group in guanine (to yield hypoxanthine) changes the fluorescent state decay.

We are also interested in studying how the protonation state of these molecules affects the excited state dynamics. Changing the degree of protonation of the purines changes not only the substitution pattern, but also, the molecular orbital description of the system. This has triggered interest in the protonated forms of some nucleic acid bases. Most noteworthy are the studies of singly protonated guanine, guanosine and GMP which have shown that upon protonation at site N7, the S_1 lifetime becomes longer by a factor of more than 100.^{13,14} Such results have been well described by TD-DFT calculations which have shown differences in the shape of the S_1 surface which changes the accessibility to a ground state CI in comparison with the neutral compound (also see Results and Discussion Section).¹³ On the other hand, gas phase studies of monoprotated adenine have demonstrated that in this case, the excited state decay does not vary drastically with respect to the neutral 9-H tautomer.¹⁵ Excited state calculations have shown that for this base, single protonation (to yield 1-H,9-H adenine⁺, the most stable tautomer in gas phase) is associated

with the presence of a similar CI (through an out-of-plane coordinate) to the one in adenine (9-H).¹⁶

In this contribution, we have studied how both protonation and deprotonation modify the dynamics of neutral HPX and INS. For these systems, protonation of HPX and INS produce analogous structures (with hydrogen atoms bonded to N7 and N9), but single deprotonation occurs at different sites producing two different kinds of aromatic systems (see deprotonated species in Figure 1 and below). As far as we know, this is the first study of monoanionic species of this type, which are accessible in HPX and INS thanks to the fact that the first and second deprotonation pK_a values are sufficiently different to have a vast population majority of the singly deprotonated forms at specific pHs.

A sketch of the excited state deactivation process in terms of the different effects on the potential energy surfaces can in principle be inferred from the present fluorescence up-conversion experiments together with theoretical studies. In this contribution we include high level computational studies of the low lying electronically excited states at the ground state geometry in order to determine the type of electronic states accessed by light absorption in the region of the first absorption bands, as well as the nature of the state detected by time-resolved fluorescence. As will be shown this is particularly relevant for the keto-N7-H tautomer and the ionized forms which are hereby addressed for the first time experimentally and computationally. We also include calculations at the multireference configuration interaction level (MR-CIS), which isolate the relevant S_1 - S_0 crossing regions for the most important tautomers of HPX: the keto-N9-H, and the keto-N7-H species. The calculations show the presence of low-energy, highly accessible CIs for both these tautomers. The theoretical studies for the ionized forms will be presented in a separate contribution.

METHODS

Experimental Section. HPX (>99%), INS (>99%), and IMP (>99%) were purchased from Sigma-Aldrich and were used without further purification. Aqueous solutions were prepared dissolving the compounds in ultrapure deionized water obtained from a MILLIPORE (Milli-Q) system. The pH of the solutions was adjusted with very high purity NaOH 0.1 M or HCl 1 M aqueous standard solutions, also acquired from Aldrich. Solute concentrations were adjusted to give an absorbance of approximately 1 in a 1 mm path length quartz cell at the excitation wavelength of 257 nm. Absorption spectra were obtained in a 1 cm or 1 mm quartz cell with a Cary-50 spectrophotometer (Varian). Steady-state fluorescence spectra were measured in a 1 cm quartz cell with a Cary-Eclipse fluorimeter (Varian). In the up-conversion experiment,¹⁷ about 150 mL of solution were flown through a quartz cell (1 mm path length with 1 mm windows), and was excited with the third harmonic pulses ($\lambda = 257$ nm) from a Ti:Sapphire regenerative amplifier (Legend-F, Coherent) with a repetition rate of 1 kHz. The 770 nm seed pulses were obtained from a Ti:Sapphire oscillator (NJA-5, Clark MRX Corporation, repetition rate: 100 MHz). Fluorescence from the sample was collected by two parabolic mirrors and focused in a type I β -BBO crystal where it was crossed with a 770 nm gate pulse to obtain an up-converted signal. The sum-frequency mixing light was focused into a double 10 cm monochromator (ORIEL) and detected by a photomultiplier tube.¹⁸ In all cases, it was verified that the up-conversion signals were absent in blank solutions with the same HCl or NaOH concentrations in back-to-back experiments. All traces were fitted to exponential functions convoluted with the Instrumental Response Function (IRF). This function was considered to be Gaussian with a full width at half-maximum of 550 fs, as determined through nonlinear least-squares fits to fluorescence up-conversion

measurements on *p*-terphenyl in cyclohexane solution at the same wavelength of 350 nm. For the IRF measurement, the instrumental response was taken as an adjustable parameter given that the *p*-terphenyl signal evolution times are much slower than the instrumental response at this wavelength.¹⁹

It is possible that in aqueous solutions, purine type systems may self-associate.^{20–24} This can favor the occurrence of excited state deactivation processes related to the presence of aggregates, including energy transfer, electron transfer, and proton transfer. To rule out these effects, fluorescence up-conversion measurements were checked for concentrations from 0.25 to 2.8 mM. This covers an order of magnitude in concentration, and showed that the decay behavior does not change. To obtain the working absorbance, the concentration was around 2 mM depending on the system. It should also be noted that for the concentration range of our experiments, no association effects on the spectroscopy have been observed in guanine and adenine which are analogous to HPX.^{4,14,25} The pH measurements were done with a high sensitivity digital pH-meter which allows measurements of pH as low as near zero (Orion Research Inc., Ag/AgCl internal reference electrode). All experiments were performed at room temperature (20 ± 0.5 °C).

Computational Methods for the Vertical Transitions at the Ground State Geometry. Geometry optimizations for the electronic ground state were done at the MP2 level of theory and constrained to the *C*_s symmetry, using the double- ζ plus polarization (cc-pvdz) Gaussian basis set of Dunning. Vertical excitation energies and oscillator strengths were computed at the state averaged complete active space self-consistent field (SA-CASSCF) level using an active space of 18 electrons in 13 active molecular orbitals (18,13) with the 6-31G+(d) basis set. Four singlet A' states (ground state and three excited states) and four singlet A'' excited states were state averaged. Excitation energies were corrected at the multireference perturbation theory MRMP2 level.^{26,27} For all the systems the active space includes three molecular orbitals from the lone pairs (one for the oxygen atom and two for the nitrogen atoms) and 10 π molecular orbitals. These high-level multireference methods have been used extensively for the study of excited states of purinic DNA bases.^{6,28–30} The calculations were carried out using the GAMESS quantum package,³¹ and the graphical user interface Macmolplt was used for the molecular orbital visualization.³²

Conical Intersections Calculations. Energies were computed at the multireference configuration interaction with single excitations (MR-CIS) level using as reference a complete active space. The molecular orbitals were obtained from a SA-CASSCF calculation using a complete active space (CAS) of 12 electrons in nine active orbitals (12, 9). The cc-pvdz basis set of Dunning was used. The subsequent MR-CIS calculation used the same CAS and included only single excitations to the virtual space. From an initial excited state analysis, four states were averaged (ground state, two π - π^* states, and one n - π^* state). The excitation energy computations ($S_1 \leftarrow S_0$) at the MR-CIS/SA-CASSCF(12,9)/cc-pvdz level of theory include less correlation than the MRMP2/SA-CASSCF(18,13)/6-31G+(d) level, however, this reduction on the level of theory has been seen to be appropriate and without systematic errors for the geometry optimization of the excited state and the conical intersection search.⁷ The MR-CIS excitation energies in this work were also compared to the MRMP2 to ensure that there is no change on the ordering of states, which could change the results even qualitatively.

Minima on the crossing seam (MXS) for the conical intersections were computed by a restricted gradient algorithm using the analytical derivatives of the MR-CIS wave function as implemented in the COLUMBUS quantum chemistry package.^{33,34} This methodology has been proved to be adequate for the conical intersection optimization on DNA bases.^{6,35–37} Energies at the MXS geometry found with the MR-CIS level of theory were recalculated at the MRMP2 level by using the orbitals from a SA-CASSCF(18,13) computation so that dynamical correlation will be included more adequately. Six states were averaged and the 6-31G+(d) basis set was used in this recalculation.

RESULTS AND DISCUSSION

First, we give an overview of the chemical equilibria important for these systems: HPX global pK_a values are: 2.04, 8.64 and 11.5.³⁸ With these pK_a values, in a pH = 1 HPX aqueous solution, the monoprotonated species predominates (\approx 92%). A pH of 10 HPX aqueous solution maximizes the population of singly deprotonated species (\sim 93%), and in a pH = 5 HPX aqueous solution, the neutral species predominates (>98%). For INS, the pK_a values have been reported to be: 0.97, 8.50, and 11.65.^{39,40} For this case, in order to study the singly protonated specie, the molecule was dissolved in high purity 1 N HCl solution (monoprotonated form: 90% with the rest as the neutral species, pH \sim 0). The neutral specie of INS was studied in pH = 6 aqueous solution, while for the singly deprotonated INS species, the pH was adjusted to 10 (mole fraction = 95%).

In Figure 1 we show the molecular structures of the dominant tautomers of HPX and INS at the different pH values. The relevant tautomers in solution phase have been established in the literature according to Raman, UV-vis, and NMR (¹³C and ¹H) spectroscopy, and theoretical studies.^{38,39,41–51} For neutral HPX, it is accepted that the keto-N9-H tautomeric form (1a in Figure 1) is the dominant tautomer in aqueous solution. However, the keto-N7-H 1b tautomeric form is also considered to be present in significant concentration in aqueous solution, although there are no precise measurements for the relative populations.^{43,46,47,52,53}

From NMR studies, the mol fraction of the HPX keto-N7-H tautomer in D₄-methanol at 204 K is known to be 54%, with the rest corresponding to the keto-N9-H tautomer. At 303 K, these percentages correspond to 53% and 47% respectively,⁵⁴ while in room temperature DMSO, the relative concentrations of keto-N7-H and keto-N9-H are 58% and 42% respectively.⁴⁷ As will be shown, from experiments in water and in methanol, we will be able to ascertain the ultrafast photophysics of both tautomers despite the uncertainty in their relative populations in water. The aforementioned pK_a values and tautomer studies allowed establishing the relevant singly protonated and singly deprotonated species at low (pH \leq 1) and high pH (pH = 10).^{39,44} The respective structures are included in Figure 1.

Steady State Results and Computational Results at the Ground State Geometry. Figure 2 shows the steady state absorption spectra of HPX and INS. As can be seen, the pH = 5 HPX and methanolic systems show a single band centered on 250 nm. The neutral INS solutions on the other hand show some structure in this first band, with a tail or shoulder appearing in the region of 260 to 290 nm besides the maximum centered at 249 nm. This feature is similar to that of 9-methylhypoxanthine as reported by Tinoco et al., and has been related to the presence of two bright electronic transitions in this zone, one predominant in the 259–277 nm zone, and one at 249 nm in water at pH = 6.1.⁴⁵ For the case of HPX aqueous solutions, it is most likely that the single band we observe is also made of the superposition of two states (for both tautomers) as described previously,^{49,55} which is in accord with our theoretical calculations (see next).

Our MRMP2 calculations for the gas phase vertical transitions are summarized in Tables 1 and 2. These results confirm that both dominant tautomers of neutral HPX (keto-N9-H and keto-N7-H) have two low lying transitions with significant oscillator strength which should make up the band centered at 250 nm in aqueous solution. This is to our

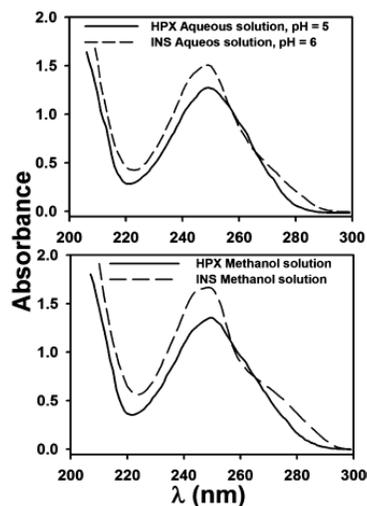


Figure 2. Top: Steady state absorption spectra of hypoxanthine (HPX) and inosine (INS) in neutral aqueous solution. Bottom: Steady state absorption spectrum of HPX in methanol solution.

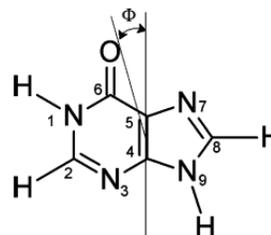
knowledge, the first excited state ab initio high level calculation for the keto-N7-H tautomer, the singly protonated specie (HPX⁺) and a singly deprotonated purine base (HPX⁻). As will be shown, these calculations are essential when assessing the photophysics observed for the HPX/methanol solution since in this solvent, both tautomers are known to be present in approximately the same proportion. According to the analysis in Table 2, the ¹L_a type state is the first electronically excited state for both neutral tautomers. In this sense, the MRMP2 calculations of Table 1 are in good accordance with previous calculations using the TD-DFT and TD-DFT/PCM methodologies which have shown that two $\pi-\pi^*$ states contribute to the first absorption band (composite band as mentioned in the previous paragraph).^{49,56} Besides these $\pi-\pi^*$ transitions, our MRMP2 calculations indicate the presence of three dark $n-\pi^*$ transitions above the first $\pi-\pi^*$ state. As has been established for adenine and guanine, the $n-\pi^*$ states are expected to be significantly destabilized in aqueous solution in comparison with the gas phase due to the specific hydrogen bonding type interactions with the solvent.^{13,57}

The calculations at the same level of theory for the singly protonated and singly deprotonated forms of HPX reveal that in both cases, there are also two bright, $\pi-\pi^*$ transitions in the region of the first electronic band (see Tables 1 and 2). For

Table 2. Contributions of Configuration State Functions (CSF) in the 2 ¹A' and 3 ¹A' Excited States of Hypoxanthine (HPX, keto-N9-H and keto-N7-H Tautomers), Singly Protonated (HPX⁺), and Singly Deprotonated (HPX⁻) Hypoxanthine^a

system	CSF	2 ¹ A' (%) ^b		3 ¹ A' (%)	
keto-N9-H	H → L	62	(115)	2.6	(54)
	H → L + 1	3.3		36	
	H - 1 → L	0.4		29	
	H - 2 → L	2.6		1.2	
keto-N7-H	H → L	58	(-19)	2.5	(17)
	H → L + 1	6.2		35	
	H - 1 → L	0.5		24	
	H - 2 → L	2.3		1.0	
HPX ⁺	H → L	48	(5)	19	(79)
	H → L + 1	15		44	
	H - 1 → L	<0.1		3.1	
	H - 2 → L	0.3		<0.1	
HPX ⁻	H → L	80	(133)	0.4	(24)
	H → L + 1	<0.1		42	
	H - 1 → L	0.6		24	
	H - 2 → L	1.0		0.9	

^aValues in parentheses are the transition dipole moment directions (Φ) in degrees, according to the Tinoco DeVoe convention shown below.⁴⁴ ^bPercentages are the squares of the coefficients taken from the CASSCF wave functions.



both HPX⁺ and HPX⁻, the lowest energy $\pi-\pi^*$ transition is of ¹L_a type and has an oscillator strength of about 25% that of the next electronic $\pi-\pi^*$ state, of ¹L_b type. For HPX⁻ our MRMP2 calculations predicts that there are two dark $n-\pi^*$ states near the optically accessed ¹L_a ($\pi-\pi^*$) excited state. Again, similarly to the neutral tautomers, it is most likely that the first band (at about 250 nm for HPX⁺ and 260 nm for HPX⁻) is a composite with the ¹L_a state as the first bright singlet excited state. In summary, the first $\pi-\pi^*$ singlet excited states for all the systems of our study have been calculated as primarily HOMO→LUMO excitations (¹L_a), but the 250 nm 260 nm region is considered to be a band composed of the two lowest

Table 1. Vertical Excitation Energies (eV) at the MRMP2 Level and Oscillator Strengths at the CASSCF Level for the First Three A' and A'' Excited States of Hypoxanthine (HPX, keto-N9-H and keto-N7-H Tautomers), Singly Protonated Hypoxanthine (HPX⁺) and Singly Deprotonated Hypoxanthine (HPX⁻)^{a,b}

system	2 ¹ A'	3 ¹ A'	4 ¹ A'	1 ¹ A''	2 ¹ A''	3 ¹ A''
keto-N9-H	4.485 (0.146)	5.442 (0.029)	6.103 (0.001)	5.252	5.282	5.446
keto-N7-H	4.637 (0.101)	5.252 (0.026)	6.225 (0.192)	4.876	5.146	6.056
HPX ⁺	4.520 (0.049)	4.678 (0.244)	5.927 (0.001)	4.616	5.334	5.756
HPX ⁻	5.039 (0.031)	5.222 (0.123)	5.609 (0.024)	4.910	4.915	5.057

^aFor 9-methyl-hypoxanthine the reported experimental vertical transitions are 4.41 eV, 5.18 eV, 6.04 and 6.42 eV for the vapor phase, and 4.59 4.77 eV, 4.98 and 6.20 eV in aqueous solution at pH 6.1.³⁴ The HPX experimental values of the maximum on the absorption spectrum in neutral, acidic or basic aqueous solutions are: 4.98 eV (pH 5), 5.00 eV (pH 1) and 4.80 eV (pH 10), this work. ^bOscillator strengths are indicated in parentheses.

energy $\pi-\pi^*$ transitions, which is similar to the situation in guanine.⁴⁴ It should be noted that the energy of 1L_b is more sensitive to the protonation state compared to the energy of 1L_a and so the gap between the two components also changes at different pH.

Excited State Dynamics. The third harmonic of our laser system (257 nm) produces a population of electronically excited molecules through light absorption near the center of the first UV-band for all the systems of this study. As mentioned previously, this band has been described as a composite of transitions for the first two bright states in the neutral HPX and INS solutions.^{28,45,55,56,58} For the neutral HPX and INS solutions (pH = 5 and 6, respectively), it was not possible to obtain accurate steady state emission spectra, implying a fluorescence quantum yield of less than 10^{-4} . This is estimated from comparisons with the emission signal from anthracene solutions in methanol. The up-conversion experiments were set to detect 350 nm since this detection wavelength provided the largest signal in the time-resolved experiments for all the systems (see below). The fluorescence traces included in the insets of Figure 3 show that the faint steady state emissions

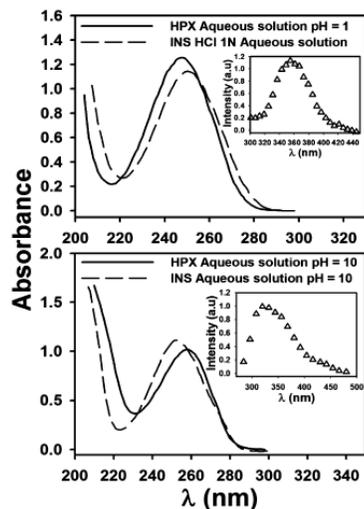


Figure 3. Top: Steady state absorption spectra of hypoxanthine (HPX) and inosine (INS) in acidic aqueous solution. Inset: HPX Fluorescence emission spectrum in pH = 1 solution ($\lambda_{\text{exc}} = 257$ nm). Bottom: Steady state absorption spectra of HPX and INS in basic aqueous solution. Inset: HPX fluorescence emission spectrum in basic aqueous solution ($\lambda_{\text{exc}} = 250$ nm).

from the ionized forms are localized in this spectral region and correspond to emission quantum yields of the order of 10^{-4} .

Photophysics of Neutral Hypoxanthine and Inosine. Figure 4a shows the 350 nm fluorescence decay of HPX in aqueous solutions at pH = 5. It should be noted that this pH is reached by the system at the working concentration without the addition of buffers, and that the neutral tautomers population corresponds to more than 98%. The emission shows an ultrafast decay which can be fitted by a single exponential function with a $\tau < 0.2$ ps decay convoluted with the instrumental response function. All the previous and present theoretical calculations, including TD-DFT (with and without explicit solvent),^{49,56} as well as multireference methods,⁵⁶ are

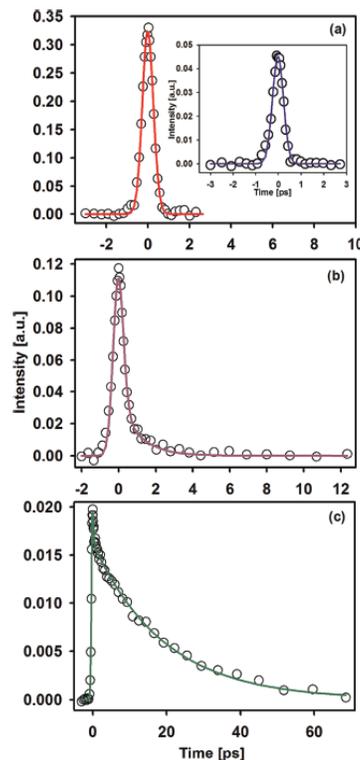


Figure 4. Fluorescence up-conversion measurements of hypoxanthine (HPX) in different aqueous solutions. (a) pH = 5. Inset fluorescence emission decay of hypoxanthine in methanol solution. (b) pH = 1. (c) pH = 10. In all cases the excitation and detection wavelength were 257 and 350 nm respectively. The solid lines are nonlinear least-squares fits to exponential decays convoluted with the instrument response function.

consistent in assigning the first excited state as a bright $\pi-\pi^*$ state (verified to be 1L_a type, for both tautomers in our calculations). This implies that the emission detected in all the systems of this study corresponds to fluorescence from the emissive first singlet excited state. This also indicates nearly instantaneous $S_n \rightarrow S_1$ internal conversion processes populating the fluorescent S_1 state when the original excitation is produced at the composite band. The latter has been also well established for the parent compound guanine.^{13,59} For HPX⁻, it should be noted that our gas phase MRMP2 calculations indicate the presence of two $n-\pi^*$ states at nearly the same energy as the first $\pi-\pi^*$ state (1L_a). For this system, it is assumed that similarly to other systems, the $n-\pi^*$ states are destabilized, in the aqueous media.

The ultrafast depopulation of the fluorescent S_1 state ($\tau < 0.2$ ps) is indicative of a highly accessible conical intersection with the electronic ground state. Such assignment is consistent with recent transient absorption experiments which were reported during the course of this investigation.⁶⁰ Such result verified the subpicosecond repopulation of the electronic ground state in this system. Together with the present study, these results also show that HPX has an electronic deactivation channel comparable with the DNA base with the fastest S_1 decay: adenine (keto-N9-H tautomer).⁶¹

Given that it is likely that to some extent, both the keto-N9-H and keto-N7-H tautomers of HPX are present in aqueous solution at pH = 5, our measurements suggest that both species have ultrafast fluorescence decays. This statement is further demonstrated with the HPX fluorescence decay at 350 nm in methanol solution shown in the inset of Figure 4a. As mentioned previously, in this solvent at room temperature the tautomer populations (keto-N9-H and keto-N7-H) are approximately equal (53–54% for keto-N7-H). Since the methanolic HPX solutions also show a single exponential decay with $\tau < 0.2$ ps, we can conclude that both tautomers have ultrashort lifetimes. It should be noted that according to the calculations mentioned in the previous section, the first transitions for both tautomers have comparable oscillator strengths (see Table 1). This implies that significant excited state populations are created for both tautomers, and that their time-resolved $S_1 \rightarrow S_0$ emissions are of comparable intensity (signal strength is determined by the radiative rate and the initial populations⁵). The nonlinear least-squares fitting parameters of the fluorescence decays for all the systems are summarized in Table 3.

Table 3. Curve Fitting Parameters for Up-Conversion Traces of HPX and INS Aqueous Solutions^a

	pH	a_1	τ_1 [ps]	a_2	τ_2 [ps]
HPX	5	1	<0.2		
HPX	1	0.95	<0.2	0.05	1.1 ± 0.1
HPX	10	0.60	<0.2	0.40	19 ± 0.4
INS	6	1	<0.2		
INS	HCl 1N	0.88	0.39 ± 0.01	0.12	2.5 ± 0.01
INS	10	1	<0.2		

^aData was described by single ($a_2 = 0$) or double-exponential functions, $I(t) = a_1 \exp(-t/\tau_1) + a_2 \exp(-t/\tau_2)$ convoluted with the instrument response function (fwhm ≈ 550 fs). $\lambda_{\text{Exc}} = 257$ nm and $\lambda_{\text{Det}} = 350$ nm. The total amplitudes of the signals were normalized to one.

INS should exhibit similar photophysics to the keto-N9-H tautomer of HPX given that the N7 position is of iminic type in both molecules and that the nitrogen atom at position 9 is in both cases, sp^3 hybridized, with a σ bond to a hydrogen atom or the ribose moiety. Figure 5a shows the fluorescence emission decay at 350 nm for INS in aqueous solutions at pH = 6. The fluorescence decay is again ultrafast with a single decay of $\tau < 0.2$ ps. This result is completely consistent with the ultrafast excited state decay of the tautomer keto-N9-H of HPX. The INS result confirms that the biologically relevant neutral purinic chromophore of these systems has an intrinsically ultrafast S_1 decay independent of whether N9 or N7 is of iminic type.

Calculations of the Conical Intersections for the Neutral Tautomers. Vertical excitation energies for the first $\pi-\pi^*$ excited state of HPX-keto-N7-H and HPX-keto-N9-H at the MR-CIS/SA-CASSCF(12,9)/cc-pvdz level of theory are shown in Table 4. Due to the different treatment of correlation, these energies are higher than those calculated at the MRMP2/SA-CASSCF(18,13)/6-31G+(d) level (see Table 1). Since the MR-CIS method has limited dynamical correlation it is expected that it will overestimate the excitation energies. For guanine-keto-N9-H, different correlated methods have also rendered different vertical excitation energies as shown in Table 4 for comparison.⁷

No minimum energy points on the potential energy surface of the first $\pi-\pi^*$ excited state were found for both tautomers of

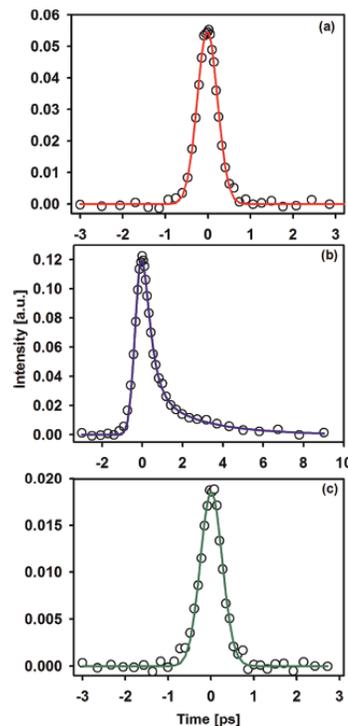


Figure 5. Fluorescence up-conversion measurements of different INS aqueous solutions. (a) pH = 6. (b) INS in HCl 1 N. (c) pH = 10. The excitation and detection wavelength were 257 and 350 nm respectively. The solid lines are nonlinear least-squares fits to exponential decays convoluted with the instrument response function.

HPX, however, some stationary points with planar geometries were found in both cases (not shown). Minima on the crossing seam (MXS) for the $\pi-\pi^*/S_0$ CI of HPX-keto-N7-H and HPX-keto-N9-H were found with the algorithm implemented in COLUMBUS for CI search and optimization. The energies for these MXSs are also included in Table 4. The geometries for the MXSs are highly distorted (E_2 in the nomenclature proposed by Boeyens⁶²) and resemble the geometries of the CIs found in guanine-keto-N9-H as described in Figure 6. The loss of planarity is due mainly to the out of the plane opposite motion of C2 and N3 (for both HPX and guanine). This can be described quantitatively by the ring puckering parameter, Q , proposed by Cremer and Pople.⁶³ Some dihedral angles reported for guanine are used to compare the geometric structure of the CIs (keto-N9-H and keto-N7-H) with those which we found for HPX (see legend on Figure 6).

Corrected energies at the MRMP2 level for the MXSs calculated at the MRCIS level are shown in Table 4. At the MRMP2 level of theory S_1 and S_0 are not degenerate anymore ($\Delta E = 0.43$ and 0.39 eV for HPX-keto-N9-H and HPX-keto-N7-H, respectively), so that, the reported energies for the conical intersections at the MRMP2 level are taken as the mean value of the energies of S_1 and S_0 . These energies are lower than for the S_1 (L_a) state at the FC geometry ($S_{0\text{min}}$) as expected. The small energetic difference between S_1 and S_0 at the MRMP2 level indicates that the CIs calculated at the MRCIS level are near to the CIs that could be predicted at the higher

Table 4. Vertical Excitation Energies and S_1 – S_0 Conical Intersection Energies with Respect to the Optimized S_0 Level for the First π – π^* State for the Relevant Tautomers of Guanine and Hypoxanthine (HPX)

vertical excitation energies ^a (eV)		
	guanine-keto–N9-H	
MR-CIS ⁷	CASPT2 ³⁰	CASPT2 ⁶⁴
5.82	4.93	4.51
	guanine-keto–N7-H CASPT2	
	4.37 ⁶⁵	
	HPX-keto–N9-H	
MR-CIS	MRMP2	
5.30	4.48	
	HPX-keto–N7-H	
MR-CIS	MRMP2	
5.88	4.64	

conical intersection energies π – $\pi^*/g.s.$ ^{a,b} (eV)		
	guanine-keto–N9-H	
MR-CIS ⁷	CASPT2 ³⁰	CASPT2 ⁶⁴
4.07 (1.75) E ₂	4.3 (0.63) ² E	3.4 (1.11) E ₂
	guanine-keto–N7-H CASPT2 ⁶⁵	
	4.02 (0.35)	
	HPX-keto–N9-H	
MR-CIS	MRMP2	
3.79 (1.51) E ₂	3.65 (0.83)	
	HPX-keto–N7-H	
MR-CIS	MRMP2	
3.65 (2.23) E ₂	3.58 (1.05)	

^aVertical excitation energies and conical intersection energies with respect to the optimized ground state (g.s) energy at the same level of theory. ^bE₂ and ²E refer to the geometries of the conical intersections according to the Boeyens⁶² nomenclature for ring puckering. Values in parentheses are the energies at the Franck–Condon region minus the energy at the conical intersection for the first π – π^* state (ΔE_{FC-CI})

level of theory MRMP2. S_1 and S_0 states have mainly contributions from the closed shell and HOMO→LUMO

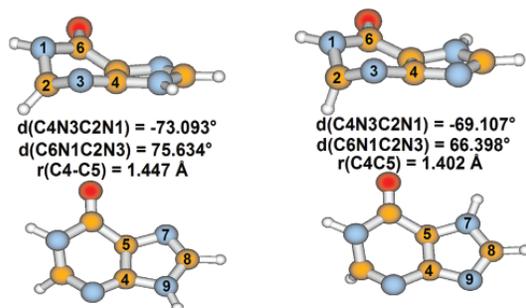


Figure 6. Geometries at the minimum in the crossing seam (MXS) for hypoxanthine-keto–N9-H (left) and hypoxanthine-keto–N7-H (right). (a) For the photophysically relevant conical intersection found by Serrano-Andres et al.³⁰ in guanine-keto–N9-H these geometrical parameters are $r(C4C5) = 1.453$ Å and $d(C6N1C2N3) = -73.605^\circ$. (b) Domcke et al.⁶⁴ reported $d(C4N3C2N1) = 69^\circ$ and 72.5° for two conical intersections in guanine-keto–N9-H. (c) Yamazaki and Domcke⁶⁵ reported $d(C4N3C2N1) = 71^\circ$ at the geometry of the conical intersection found in guanine-keto–N7-H.

configuration state functions at the SA-CASSCF(18,13) level for the MXS geometry found with the MR-CIS methodology.

Domcke et al.⁶⁴ and Yamasaki et al.⁶⁵ have evaluated the accessibility to the π – π^*/S_0 conical intersections by calculating the CASPT2 energies of the π – π^* and S_0 (g.s) states and using the C4–N3–C2–N1 dihedral angle as the reaction coordinate. In summary, those computations predict that the reaction paths from the Franck–Condon region to the π – π^*/S_0 CI are essentially barrierless for both tautomers of guanine (keto–N9-H and keto–N7-H). Other studies however have shown the existence of plateau regions for the ¹L_a state of this molecule in the solution phase, which explains the near 1 ps component for the excited state decay for the guanine and derived systems (see next section).¹³ Since no minima were found in our work for HPX it is also expected that the path from FC to the CI is barrierless.

We have used the relation between the difference between the vertical excitation energy at the FC geometry and the energy of the conical intersection, divided by the ring puckering parameter (Q): $\Delta E_{FC-CI}/Q$, to qualitatively evaluate the accessibility to the CI region in HPX in comparison with guanine. The values for these parameters are included in Tables 4 and 5. As a first approximation, the higher the $\Delta E_{FC-CI}/Q$

Table 5. Ring Puckering Parameter Q (Å) and $\Delta E_{FC-CI}/Q$ (eV/Å) Values for Guanine-keto–N9-H and the Relevant Hypoxanthine Tautomers

Q, ($\Delta E_{FC-CI}/Q$) ^a		
	Guanine-9H	
MR-CIS ⁷	CASPT2 ³⁰	CASPT2 ⁶⁴
0.51 (3.43)	0.61 (1.03)	0.69 (1.61)
	HPX-keto–N9-H	
MR-CIS	MRMP2	
0.62 (2.44)	0.62 (1.33)	
	HPX-keto–N7-H	
MR-CIS	MRMP2	
0.53 (4.21)	0.53 (1.98)	

^a ΔE_{FC-CI} are the values presented in parentheses in Table 4 and correspond to the energies at the Franck–Condon region minus the energy at the conical intersection for the first π – π^* state (eV). The $\Delta E_{FC-CI}/Q$ values are presented in parentheses next to the respective Q parameter.

the CI is considered to be more accessible, given that this reflects a steeper descent path from the Franck–Condon region to the π – $\pi^*/g.s$ CI. The specific values in Table 5 should be taken with some reserve given that different methodologies provide slightly different geometries for the CIs and different energies for the vertical excitations and the CIs. However, from our experimental results and the $\Delta E_{FC-CI}/Q$ values calculated for guanine-9H and the HPX tautomers (see Table 5), we can infer that the CIs in HPX-keto–N7-H and HPX-keto–N9-H are highly accessible which explains the ultrafast pathway for the S_1 state in HPX. The experimental difference in the S_1 lifetimes (sub-200 fs versus up to 0.78 ps) show that the HPX and INS systems actually reach the CI region in a significantly faster time scale in comparison with guanine-9H (see below).

Comparisons with the Guanine Chromophore. Among the most important result of the present study is that the HPX and INS dynamics are different from the case of guanine/guanosine in aqueous solution, where the S_1 population decay shows a biexponential behavior with $\tau_1 = 0.16$ ps and $\tau_2 = 0.78$

ps (2'-deoxyguanosine).^{13,59} Calculations at the TD-DFT level of theory that include the effects of the aqueous solvent shell have indicated that this behavior is due to evolution in the excited state surface starting from the Franck–Condon region and the presence of a plateau region in the S_1 surface.^{9,13} The faster fluorescence decay in HPX and INS indicates a change in the shape of the S_1 potential energy surface in solution in comparison with guanine. The change is likely to be related to a steeper gradient leading to the CI, which would result in significantly shorter fluorescence lifetimes. This difference is necessarily associated to the lack of the amino group at position C2 which can change the potential energy surface in the region of the reaction coordinate in the solution phase. The changes in the solution phase dynamics with respect to guanine could also be specifically related to a reduced capacity to form hydrogen bonds with the solvent.

The gas phase ultrafast excited state conversion of guanine shows a two exponential decay in 0.148 and 0.36 ps (molecular beams, pump–probe resonant ionization⁶⁶), and has been the subject of several interpretations based on computational results.^{8,30,64,67,68} Serrano Andres et al. proposed a three state model from minimum energy paths. From those calculations, the faster time constant in the gas phase was associated to the crossing through a conical intersection due to the puckering of the C2 carbon.³⁰ The longer decay time of 0.36 ps was suggested to be due to participation of an $n-\pi^*$ state. On the other hand, nonadiabatic dynamics for excited guanine have been performed with potential energy surfaces computed by Restricted Open Shell Kohn–Sham methods (ROKS by Langer et al.),⁶⁹ semi empirical methods (OM2-MRCI by Lan et al.),⁸ and most recently, extended ab initio methods based on the MR-CI method, with on-the-fly surface hopping dynamics (MR-CIS by Barbatti et al.).⁷

The two most recent simulations of the gas phase dynamics for guanine^{7,8} have shown that the deactivation process actually occurs nearly exclusively from the first $\pi-\pi^*$ state (S_1-S_0 process). However, these calculations do not predict the participation of the exact same set of conical intersections: the OM2-MRCI method determines the existence of an S_1 decay channel associated to a CI with a pronounced out of plane displacement of the C2 atom (ethylenic II type according to ref 7.). The OM2-MRCI method also determines the existence of a second type of pathway that directs the system to another CI, this one associated with an out-of-plane distortion of the amino group with a strong C2–N3 stretching and puckering at C5 and C6.

The MR-CIS calculations of Barbatti et al. have shown again the major participation of two types of conformations for the S_1 deactivation. In this case, both of them with significantly puckered C2 atoms (named ethylenic I and ethylenic II CIs⁷). One of the CIs of the MR-CIS dynamics calculations of ref 7 coincides with the first intersection mentioned above for the OM2-MRCI method (ethylenic II, also coincident with ref 30). However, the MR-CIS calculations do not predict the presence of the second intersection observed by the OM2-MRCI method, but instead, calculates a so-called ethylenic I type intersection (E_2) where the C2 atom is also puckered (as in the ethylenic II CI), but now, with the amino group at about 80° to 90° with respect to the ring system (see Figure 2 in ref 7).

The present measurements on the HPX and INS systems are conclusive in regards to the fact that the $-\text{NH}_2$ group is not essential for the ultrafast decay of the $\pi-\pi^*$ state, and that the dynamics are much faster than for guanine/guanosine in

aqueous solution. We believe that thanks to the present experimental results, the HPX chromophore can serve as a crucial case-study in calculations and dynamics simulations to fully understand the fundamental aspects of the electronic deactivation in purines. Our experimental results indicate that the CIs we calculated, which are also due to the C2 atom puckering, are reached more directly in the HPX systems. The characterization of this similar but simpler purine should also test for the participation of the other CIs, and overall, contribute to define which is the appropriate level of theory to predict the observed behavior.

Photophysics of Singly Protonated Hypoxanthine and Inosine. At pH = 1, monoprotonated (2, HPX⁺) and neutral (1a + 1b) HPX exist in relative concentrations of 92% and 8% respectively, while in a 1 N HCl solution, the monoprotonated population is estimated to approach 99%. This is concluded from population diagrams as a function of pH built from the reported pK_a values.^{39,44} The results of the up-conversion experiments for the pH = 1 sample are shown in Figure 4b. Differently from the neutral solutions, the low pH solutions show a biexponential decay with $\tau_1 < 0.2$ ps and $\tau_2 = 1.1$ ps, where this last component is related to about 5% of the total signal amplitude. This result is similar for the 1 N HCl HPX solutions $\tau_1 < 0.2$ ps and $\tau_2 = 1.1$ ps (data not shown). We ascribe the first term ($\tau_1 < 0.2$ ps in pH = 1) to the early evolution of the S_1 state for HPX⁺, including population decay and some wave packet evolution from the Franck–Condon region in the $S_1(\pi-\pi^*)$ state (a small fraction of the ultrafast signal could also come from the small fraction (8%) of neutral molecules at this pH). Given the presence of a second component of 1.1 ps, some population branching probably takes place so that the deactivation of a fraction of the S_1 population appears to take place after the initial evolution, giving rise to the 1.1 ps (notice that the 1L_a and the 1L_b states have a smaller gap which could be a related effect).

For INS in HCl 1 N, according to the reported pK_a values,^{39,40} the predominant specie is monoprotonated INS (5) at a mole fraction of 90% (the rest corresponding to neutral INS). Monoprotonated HPX (2) and monoprotonated INS (5) show similar biexponential decays (with $\tau_1 = 0.39$ ps and $\tau_2 = 2.5$ ps for INS⁺, see Table 3 and Figure 5b). This is actually expected since the protonated purinic heterocycle has analogous structures in 2 and 5. That is, in both cases the protonation site is N7, and the formal positive charge is delocalized through the π system. A biexponential behavior has been observed in the parent system, singly protonated guanine. However, monoprotonated guanine, monoprotonated guanosine and GMPH⁺ have much longer fluorescence lifetimes of up to 196 ps.^{13,14} From these results we can conclude that the removal of the amino group (absent in HPX⁺ and INS⁺) again rounds in important differences in the photophysics, making the S_1 lifetimes much shorter in HPX⁺ and in INS⁺ in comparison with the monoprotonated forms of guanine/guanosine. In the monoprotonated guanine systems, the internal reaction coordinate responsible of the slow S_1 deactivation (e.g., 196 ps lifetime for guanosine, pH = 1, ref 14) has been determined to be an opposite out of plane motion of the H atoms bond at C8 and N7.¹³ Our results indicate that the lack of the amino group in these monoprotonated forms reduces the lifetimes drastically, implying significant changes in the potential energy surfaces due to the alteration in the substitution pattern in the six member ring (absence of the $-\text{NH}_2$ group). In pyrimidine bases the amino group has also

been found to be very important in the fluorescence behavior of the bases. For example, removal of the amino group in cytosine makes the lifetimes of the excited state longer.³⁵

Photophysics of Singly Deprotonated Hypoxanthine and Inosine. For the studies of the conjugated bases of hypoxanthine and inosine, the solution was adjusted to have a pH = 10, since in this condition the population of the singly deprotonated form is maximal in comparison with the neutral species, while the doubly deprotonated form remains at a minimal concentration (< 7% for HPX and < 6% for INS).^{39,44} The up-conversion traces for HPX at pH = 10 show a biexponential fluorescence decay with $\tau_1 < 0.2$ ps (60%) and $\tau_2 = 19.0$ ps (40%), see Figure 4c. In these conditions, the neutral forms of HPX (1a/1b) correspond to about 7% of the population, which is enough to contribute to the ultrafast component of the 350 nm fluorescence decay. However, if the biexponential behavior was only due to the presence of different species with different lifetimes (τ_1 and τ_2), the pre-exponential factors would render the relative concentrations of the two species (this, assuming similar absorption coefficients and radiative rates). Supposing that neutral and singly deprotonated hypoxanthine (HPX⁻) are responsible for the τ_1 and τ_2 components respectively, the relative concentration of deprotonated HPX (3) would be approximately: $a_1/(a_1 + a_2) = 0.4$ (see Table 3, note that the signals are convoluted and therefore, the plots do not directly reflect the exponential amplitudes). This value appears too low to represent the population of the singly deprotonated form since the HPX⁻ population at pH 10 is 86% ($pK_{a_2} = 8.6$). Therefore, it is most likely that the biexponential behavior is intrinsic of the deprotonated form, and that the early component might be related to the evolution from the Franck–Condon region with some contribution from the neutral species (which have ultrafast decays). The presence of a 19 ps component is a remarkable feature of this study, since it reflects an important change in the shape of the emissive state surface upon the removal of a single proton, leaving the five membered ring's nitrogens, N7 and N9 atoms in their deprotonated state (see 3 in Figure 1). Furthermore, the effect which produces this time component could also be related with the presence of $n-\pi^*$ states near the optically accessed L_a ($\pi-\pi^*$) singlet state at the FC geometry (see Table 1).

Most interesting of the monodeprotonated forms is that HPX⁻ (3) and INS⁻ (6) actually have completely different excited state decays. This can be seen in Figure 5c which shows that INS⁻ maintains the single exponential ultrafast fluorescence decay of INS ($\tau < 0.2$ ps), which is 2 orders of magnitude shorter than the HPX⁻ fluorescence lifetime ($\tau_2 = 19$ ps, see Figure 4c). Such large difference in the photophysics can be related directly to differences in the chemical structures of these two basic forms: while in HPX⁻ position N1 is protonated and positions N7 and N9 are deprotonated, in INS⁻, N9 is ribose-substituted while N1 is deprotonated (see 6 in Figure 1). These results make it clear that different deprotonation sites produce contrasting effects in the excited state evolution. Interestingly, the deactivation of the excited state is slower in monoanionic HPX, where deprotonation occurs in the pirazole ring, which is involved in the tautomerism of neutral aqueous HPX. Considering that similarly to guanine, the loss of planarity in the pyrimidinic ring is most likely responsible for the evolution in the first $\pi-\pi^*$ excited state surface,¹³ the deprotonation in HPX appears to have a long-range effect on this puckering

coordinate of the emissive state potential energy surface, while in INS⁻ (N1 deprotonation), the ultrafast decay is unaffected, corresponding to a similar surface to that of the neutral form. Theoretical calculations of the CIs in the ionized forms and studies about the accessibility to the crossing seams will be presented in an upcoming contribution.

CONCLUSIONS

The hypoxanthine heterocyclic system shows very interesting variations in its photophysics in comparison with other purines. The main tautomers at near neutral pH, keto–N7–H and keto–N9–H, and the nucleoside INS have ultrafast S_1 decay channels which are as fast as the natural base adenine, and much faster than the parent compound guanine. This can be related directly to the lack of the amino group at position C2 of guanine. Our results can be already interpreted as an effect of having a more simple six membered cycle in HPX (without the $-\text{NH}_2$ substitution), which reaches the S_1-S_0 CI through a loss of planarity with a C2 pyramidalization (see Figure 6). The CI is highly accessible and this is related to a faster excited state decay in HPX than in guanine.^{13,30} Furthermore, the presence of the NH_2 group in guanine at the C2 position, as opposed to a hydrogen in HPX, may have kinematic effects on the motion along this coordinate.⁷⁰

Single protonation of HPX only produces a somewhat slower fluorescence decay in comparison with the neutral tautomers, with an extra 1.1 ps component (5%). This is in contrast with the parent guanine system where protonation is associated with a much larger increase in the S_1 lifetimes (196 ps for guanosineH⁺), such difference again is likely to be related to the absence of the amino group which greatly increases the accessibility to the S_1-S_0 CI in the HPX⁺ system as well.

Deprotonation of HPX has an important effect, making the emissive state have a long lifetime of 19 ps, 2 orders of magnitude slower than the neutral forms. This slower decay is due to the lack of protons at both N7 and N9, leaving only one H-substituted site at N1. The monoanion of INS on the other hand, keeps the sub 0.2 ps decay of the first $\pi-\pi^*$ state and does not show a long 19 ps component. Such differences between HPX⁻ and INS⁻ can be associated directly to the fact that deprotonation of INS produces a completely different electron distribution given that this system is deprotonated at N1 and ribose-substituted at N9 as seen in Figure 1.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

jpeon@servidor.unam.mx

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

For financial support, we are thankful to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, Grant 79494), and to Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT, Grant IN212907). We thank DGTIC for some of the computational resources. SM acknowledges support from the National Science Foundation under grant CHE 0911474.

REFERENCES

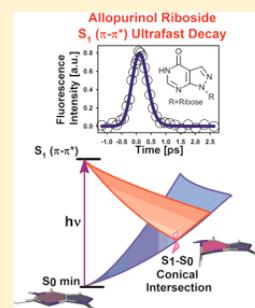
- (1) Pecourt, J. M. L.; Peon, J.; Kohler, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10370–10378.

- (2) Middleton, C. T.; de La Harpe, K.; Su, C.; Law, Y. K.; Crespo-Hernandez, C. E.; Kohler, B. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2009**, *60*, 217–239.
- (3) Crespo-Hernandez, C. E.; Cohen, B.; Hare, P. M.; Kohler, B. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1977–2019.
- (4) Peon, J.; Zewail, A. H. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *348*, 255–262.
- (5) Serrano-Andres, L.; Merchan, M. *J. Photochem. Photobiol., C: Photochem. Rev.* **2009**, *10*, 21–32.
- (6) Barbatti, M.; Lischka, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6831–6839.
- (7) Barbatti, M.; Szymczak, J. J.; Aquino, A. J. A.; Nachtigallova, D.; Lischka, H. *J. Chem. Phys.* **2011**, *134*, 014304.
- (8) Lan, Z. G.; Fabiano, E.; Thiel, W. *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 1225–1229.
- (9) Gustavsson, T.; Improta, R.; Markovitsi, D. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 2025–2030.
- (10) Morales-Cueto, R.; Esquivelzeta-Rabell, M.; Saucedo-Zugazagoitia, J.; Peon, J. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 552–557.
- (11) Zgierski, M. Z.; Fujiwara, T.; Lim, E. C. *Chem. Phys. Lett.* **2008**, *463*, 289–299.
- (12) Hassan, W. M. I.; Chung, W. C.; Shimakura, N.; Koseki, S.; Kono, H.; Fujimura, Y. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 5317–5328.
- (13) Karunakaran, V.; Kleinermanns, K.; Improta, R.; Kovalenko, S. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5839–5850.
- (14) Fujiwara, T.; Kamoshida, Y.; Morita, R.; Yamashita, M. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **1997**, *41*, 114–121.
- (15) Nolting, D.; Weinkauff, R.; Hertel, I. V.; Schultz, T. *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 751–755.
- (16) Marian, C.; Nolting, D.; Weinkauff, R. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*, 3306–3316.
- (17) Plaza-Medina, E. F.; Rodriguez-Cordoba, W.; Morales-Cueto, R.; Peon, J. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 577–585.
- (18) Plaza-Medina, E. F.; Rodriguez-Cordoba, W.; Peon, J. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 9782–9789.
- (19) Boens, N.; Qin, W.; Basarić, N.; Hofkens, J.; Ameloot, M.; Pouget, J.; Lefevre, J.-P.; Valeur, B.; Gratton, E.; vandeVen, M.; Silva, N. D.; Engelborghs, Y.; Willaert, K.; Sillen, A.; Rumbles, G.; Phillips, D.; Visser, A. J. W. G.; van Hoek, A.; Lakowicz, J. R.; Malak, H.; Gryczynski, I.; Szabo, A. G.; Krajcarski, D. T.; Tamai, N.; Miura, A. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 2137–2149.
- (20) Schweize, M.; Broom, A. D.; Tso, P. O. P.; Hollis, D. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 1042–1055.
- (21) Nakano, N. I.; Igarashi, S. *J. Biochemistry* **1970**, *9*, 577–583.
- (22) Morcillo, J.; Gallego, E.; Peral, F. J. *Mol. Struct.* **1987**, *157*, 353–369.
- (23) Martel, P. *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 230–234.
- (24) Hupp, T.; Sturm, C.; Janke, E. M. B.; Cabre, M. P.; Weisz, K.; Engels, B. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 1703–1712.
- (25) Haupl, T.; Windolph, C.; Jochum, T.; Brede, O.; Hermann, R. *Chem. Phys. Lett.* **1997**, *280*, 520–524.
- (26) Hirao, K. *Chem. Phys. Lett.* **1992**, *190*, 374–380.
- (27) Nakano, H. *J. Chem. Phys.* **1993**, *99*, 7983–7992.
- (28) Mburu, E.; Matsika, S. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 12485–12491.
- (29) Perun, S.; Sobolewski, A. L.; Domcke, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6257–6265.
- (30) Serrano-Andres, L.; Merchan, M.; Borin, A. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2473–2484.
- (31) Schmidt, M. W.; Baldrige, K. K.; Boatz, J. A.; Elbert, S. T.; Gordon, M. S.; Jensen, J. H.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K. A.; Su, S.; Windus, T. L.; Dupuis, M.; Montgomery, J. A. *J. Comput. Chem.* **1993**, *14*, 1347–1363.
- (32) Bode, B. M.; Gordon, M. S. *J. Mol. Graphics Modell.* **1998**, *16*, 133–138.
- (33) Lischka, H.; Müller, T.; Szalay, P. G.; Shavitt, I.; Pitzer, R. M.; Shepard, R. *Wiley Interdiscip. Rev.: Comput. Mol. Sci.* **2011**, *1*, 191–199.
- (34) Dallos, M.; Lischka, H.; Shepard, R.; Yarkony, D. R.; Szalay, P. G. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 7330–7339.
- (35) Kistler, K. A.; Matsika, S. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 2650–2661.
- (36) Matsika, S. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 7584–7590.
- (37) Barbatti, M.; Aquino, A. J. A.; Szymczak, J. J.; Nachtigallova, D.; Hobza, P.; Lischka, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 21453–21458.
- (38) Linder, P. W.; Stanford, M. J.; Williams, D. R. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1976**, *38*, 1847–1849.
- (39) Izatt, R. M.; Jj, Christen.; Rytting, J. H. *Chem. Rev.* **1971**, *71*, 439–481.
- (40) Tauler, R.; Cid, J. F.; Casassas, E. J. *Inorg. Biochem.* **1990**, *39*, 277–285.
- (41) Medeiros, G. C.; Thomas, G. J. *Biochim. Biophys. Acta* **1971**, *238*, 1–4.
- (42) Psoda, A.; Shugar, D. *Biochim. Biophys. Acta* **1971**, *247*, 507–513.
- (43) Sun, X. J.; Lee, J. K. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6548–6555.
- (44) Benoit, R. L.; Frechette, M. *Can. J. Chem.* **1985**, *63*, 3053–3056.
- (45) Clark, L. B.; Tinoco, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 11–15.
- (46) Lichtenb., D.; Neiman, Z.; Bergmann, F. *Isr. J. Chem.* **1972**, *10*, 805–817.
- (47) Chenon, M. T.; Pugmire, R. J.; Grant, D. M.; Panzica, R. P.; Townsend, L. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 4636–4642.
- (48) Kondratyuk, I. V.; Samijlenko, S. P.; Kolomiets, I. M.; Hovorun, D. M. *J. Mol. Struct.* **2000**, *523*, 109–118.
- (49) Shukla, M. K.; Leszczynski, J. *Int. J. Quantum Chem.* **2005**, *105*, 387–395.
- (50) Fernandez-Quejo, M.; de la Fuente, A.; Navarro, R. *J. Mol. Struct.* **2005**, *744*, 749–757.
- (51) Gogia, S.; Jain, A.; Puranik, M. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 15101–15118.
- (52) Costas, M. E.; AcevedoChavez, R. *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 8309–8318.
- (53) Roman-Zimbron, M. L. S.; Costas, M. E.; Acevedo-Chavez, R. *J. Mol. Struct.:Theochem* **2004**, *711*, 83–94.
- (54) Bartl, T.; Zacharova, Z.; Seckarova, P.; Kolehmainen, E.; Marek, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009*, 1377–1383.
- (55) Voelter, W.; Records, R.; Bunnenberg, E.; Djerassi, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 6163–6170.
- (56) Shukla, M. K.; Leszczynski, J. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 5538–5543.
- (57) Ludwig, V.; da Costa, Z. M.; do Amaral, M. S.; Borin, A. C.; Canuto, S.; Serrano-Andrés, L. *Chem. Phys. Lett.* **2010**, *492*, 164–169.
- (58) Klenwächter, V.; Drobnik, J.; Augenstein, L. *Photochem. Photobiol.* **1967**, *6*, 133–146.
- (59) Onidas, D.; Markovitsi, D.; Marguet, S.; Sharonov, A.; Gustavsson, T. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 11367–11374.
- (60) Röttger, K.; Temps, F. In: *The Madrid Conference on Femtochemistry FEMTO10*, Madrid, Spain, 2011; p 227.
- (61) Cohen, B.; Hare, P. M.; Kohler, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13594–13601.
- (62) Boeyens, J. C. A. *J. Chem. Crystallogr.* **1978**, *8*, 317–320.
- (63) Cremer, D.; Pople, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1354–1358.
- (64) Yamazaki, S.; Domcke, W.; Sobolewski, A. L. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 11965–11968.
- (65) Yamazaki, S.; Domcke, W. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 7090–7097.
- (66) Canuel, C.; Mons, M.; Piuze, F.; Tardivel, B.; Dimicoli, L.; Elhanine, M. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 074316.
- (67) Chen, H.; Li, S. H. *J. Chem. Phys.* **2006**, *124*, 154315.
- (68) Marian, C. M. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 1545–1553.
- (69) Langer, H.; Doltsinis, N. L. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 2742–2748.
- (70) Hudock, H. R.; Levine, B. G.; Thompson, A. L.; Satzger, H.; Townsend, D.; Gador, N.; Ullrich, S.; Stolow, A.; Martinez, T. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 8500–8508.

Ultrafast Excited State Dynamics of Allopurinol, a Modified DNA Base

Juan P. Villabona-Monsalve,[†] Rosa E. Islas,[†] William Rodríguez-Córdoba,^{†,§} Spiridoula Matsika,[‡] and Jorge Peón^{*,†}[†]Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México, 04510, D.F., México[‡]Department of Chemistry, Temple University, 13th and Norris Streets, Philadelphia, Pennsylvania 19122, United States

ABSTRACT: The decay of electronically excited allopurinol riboside was studied through the fluorescence up-conversion technique and high level ab initio calculations. For the allopurinol system with a pyrazolic five-membered ring, we observed an ultrafast decay of the fluorescence signal in water ($\tau < 0.2$ ps), similar to what has been observed for hypoxanthine and inosine (with an imidazolic five-membered ring). These results show that the S_1 dynamics in this type of heterocyclic systems are general and dominated by the distortion in the pyrimidinic six-membered ring with a negligible influence of the rest of the heterocycle. The measurements are consistent with the presence of a highly accessible conical intersection between the S_1 ($\pi-\pi^*$) excited state and S_0 , as calculated by MR-CIS/CASSCF computations. Our calculations show that the loss of planarity of the six-membered ring is responsible for direct access to the S_1-S_0 degeneracy region without requiring distortions in the rest of the molecule.



■ INTRODUCTION

The existence of accessible excited to ground state conical intersections (CIs) results in ultrafast nonradiative decays in DNA bases and determines their remarkable photostability. This photochemical pathway actually also explains both the lifetimes (< 1 ps) and low fluorescence quantum yields ($\sim 10^{-4}$) of several other heterocyclic chromophores.^{1–5} The interest in the study of systems with ultrafast excited state decays has been motivated in part by the need for model systems which can serve as benchmarks for quantum chemistry methods (static and dynamic).^{1,2,6–11} In addition, the intriguing topic about which type of molecules are photochemically stable enough to have survived the unfavorable environmental conditions (mainly a bath of UV radiation due to the lack of the ozone layer) during the early stages of the earth has led to significant interest about the photophysics of a variety of modified DNA bases and other structurally similar compounds.^{12–18}

The accessibility to CIs from an initially generated Franck–Condon excited state can be studied from both experimental and theoretical viewpoints. Experimentally, femtosecond transient absorption and time-resolved-fluorescence techniques have been used to gain information about the depletion of the excited states and the recovery and vibrational relaxation of the ground state.^{3,13,17,19,20} Theoretical studies focus on the use of high-level ab initio methodologies (e.g., CASSCF/MR-CI)^{6,8,21–23} and quantum dynamics simulations^{9,24–26} to find energies, energetic barriers, reaction pathways, and structural parameters of the CIs. From the combined use of these approaches, a detailed understanding of this fundamental process has been coming into view in recent years.

In this paper we continue the study of modified purinic type systems in order to find the minimal set of structural

parameters which warrant the presence of a highly accessible CI in heterocyclic systems. We present fluorescence up-conversion experiments which follow the population of the S_1 state in the riboside of allopurinol (AL-R; see Chart 1). This molecule has a slight difference in the molecular framework relative to the previously studied hypoxanthine (HPX), its riboside inosine (INS), and guanine (GUA).

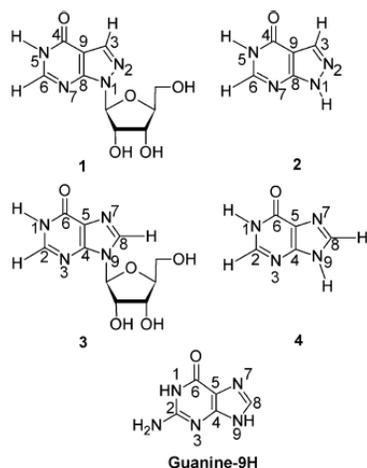
Various structural modifications have been shown to affect the excited state dynamics in purinic systems, including some that could be considered minor (e.g., protonation, deprotonation, and methyl or amino substitution).^{12,17,18,27–29} However, until now the studies on modified neutral purines have only involved modifications in the six-membered ring and changes in the substitution pattern (e.g., methyl and carbonyl substitution).^{30,31} To the best of our knowledge, systems with changes in the five-membered ring itself have not been addressed.

AL-R has a different five-membered ring compared with the hypoxanthine keto-N1-H tautomer and the corresponding riboside INS (see Chart 1 for chemical structures). The objective of this paper was to examine the photophysical implications of considering such a change from an imidazolic to a pyrazolic ring in the molecular structure (i.e., alter the five-membered ring of the heterocycle where N7 and C8 switch their positions). It should be noted that HPX can be considered to be a variant of guanine (GUA) in which the amino group at C2 is absent. The system of this study is in turn a variant of HPX.

Received: October 31, 2012

Revised: January 12, 2013

Published: January 17, 2013

Chart 1. Allopurinol Riboside (AL-R) and Purine Derivatives^a

^a1, AL-R; 2, allopurinol keto-N1-H tautomer; 3, inosine (INS); 4, HPX-keto-N9-H tautomer, guanine-9H.

The DNA base GUA shows an ultrafast S_1 depletion with a biexponential decay (time constants of 148 and 360 fs in the gas phase⁷ or 200 and 890 fs for guanosine monophosphate in aqueous solution³). The biexponential behavior of GUA in aqueous solution has been directly related to the shape of its S_1 potential energy surface, which was calculated to have a steep region near the Franck–Condon geometry, and a more planar or plateau-like potential near the zone where the S_1 – S_0 degeneracy takes place.²⁷ HPX on the other hand actually shows a fast single exponential decay in water (≤ 130 fs);^{30,31} this is one of the molecules with the largest S_1 – S_0 internal conversion rates studied so far. The S_1 decay rate in HPX indicates a more direct access to the CI from the Franck–Condon state in comparison with GUA. This difference has been directly related to the absence of the amino group.³²

In this paper we have studied the riboside of the allopurinol chromophore since this clears the complexities of dealing with tautomeric mixtures: in allopurinol at least two tautomers coexist in aqueous solution (keto-N1-H and keto-N2-H forms),^{33–35} and there is no accurate determination of the relative populations according to theoretical and experimental (¹³C NMR and UV–vis) studies.^{34,36,37} However, Bergmann et al. indicate that the tautomer keto-N5-H for 1-methylallopurinol is the one present in aqueous solution. Given the lack of a tautomeric equilibrium upon substitution at N1,³⁴ the fluorescence decay of a single type of molecule is studied herein with the riboside of allopurinol (N1 ribose-substituted). From our up-conversion results and the quantum chemical study of the deactivation path, we sketched the ultrafast nonradiative process on AL-R showing that the main structural changes to access the S_1 – S_0 CI take place in the six-membered ring, resulting in a marked distortion from planarity.

EXPERIMENTAL METHODS

Allopurinol riboside (AL-R, >99%) was purchased from Sigma-Aldrich and from Berry & Associates Inc. Both samples were used without further purification. The compounds from the two different providers showed identical results. The compound was

dissolved in ultrapure deionized water (Milli-Q quality) and the absorbance was adjusted to ~ 1 in a 1 mm flow cell at the pump wavelength (257 or 266 nm) for time-resolved-fluorescence experiments.

Absorption spectra were obtained in a 1 mm quartz cell with a Cary-50 spectrophotometer (Varian). A Cary-Eclipse fluorimeter (Varian) was used to obtain the fluorescence emission spectra; a 1 cm quartz cell was used in these measurements. We constructed the emission spectrum by exciting a low absorbance (≤ 0.05) aqueous solution of AL-R at three different energies: 250, 256, and 266 nm. The fluorescence spectrum was reconstructed by normalization at the maximum and taking the red ($\lambda_{\text{Excitation}} = 266$ nm) and blue ($\lambda_{\text{Excitation}} = 250$ nm) wings together with the emission spectrum obtained by exciting at 256 nm. This methodology avoids the contamination on the emission spectrum from Raman scattering.

The experimental up-conversion setup has been described extensively elsewhere.^{38,39} Briefly, the third harmonic of the laser emission from a Ti:sapphire regenerative amplifier (Legend-F, Coherent) is obtained by mixing the second and fundamental pulses in a type I β -BBO crystal. In this way pump pulses of 257 or 266 nm are obtained by varying the fundamental emission. The aqueous solutions of the compound were kept flowing through a quartz cell (1 mm path length with 1 mm windows). The fluorescence emission was collected by two parabolic mirrors and focused in a type I β -BBO crystal where it crossed with the ~ 770 nm gate pulses. The up-converted light was focused into a double 10 cm monochromator (ORIEL) and detected with a photomultiplier tube. We verified that no up-converted signal was observed in blank solutions in back-to-back scans. A nonlinear fitting method was used to obtain upper limits for the decay lifetimes from the convoluted signals (exponential fluorescence decay convoluted with the instrumental response function, IRF). We considered a Gaussian IRF with a full width at half-maximum (fwhm) of 550 fs. The full width at half-maximum of the IRF was determined through a nonlinear least-squares fit to the fluorescence up-conversion measurements of *p*-terphenyl in cyclohexane at $\lambda_{\text{Emission}} = 350$ nm.

THEORETICAL METHODS

The geometry optimization for the ground state was performed at the second order Møller–Plesset (MP2) level of theory constrained to the C_s symmetry; therefore, the A' or A'' representation can be assigned to the excited states at this geometry. The correlation-consistent double- ζ plus polarization (cc-pvdz) Gaussian basis set of Dunning was used in this calculation. Vertical excitation energies and oscillator strengths were computed at the state averaged complete active space self-consistent field SA-CASSCF(18,13) level using an active space of 18 electrons in 13 active molecular orbitals; the 6-31G+(d) basis set was used. Four singlet A' states (ground state and three excited states) and four singlet A'' excited states were state-averaged. Excitation energies were corrected at the multireference MR-MP2 level. For all the systems the CAS included three orbitals from the lone pairs (one for the oxygen atom and two for the nitrogen atoms), and 10 π orbitals. Geometry optimization for S_0 at the MP2 level of theory and vertical excitation energies at the MR-MP2/SA-4-CASSCF(18,13) level of theory were computed by using the GAMESS quantum chemistry package.⁴⁰

The search for a minimum on the potential energy surface for S_1 and the optimization on the crossing seam (MXS) for the S_1-S_0 CI were done at the multireference configuration interaction with single excitations (MR-CIS) level using a six averaged states SA-6-CASSCF(12,9) wave function as reference. The cc-pvdz basis set was used in these calculations and no symmetry constraints were imposed since distortions from planarity took place. The accuracy of the reduced active space (12,9) in these calculations was tested by comparing the vertical excitation results with the ones from the (18,13) active space, ensuring that there is no switching in the ordering of states of interest. For these calculations the Columbus 5.9.2 package was used,⁴¹ using the analytic gradients for MR-CIS wave functions⁴² and algorithms for the MXS optimization that are available in this program.⁴³

All the computations were done for AL-keto-N1-H in order to reduce the computational cost, given that this system simulates the substitution pattern on AL-R.

RESULTS AND DISCUSSION

From a previous study, it is known that the absorption spectrum of allopurinol in aqueous solution at pH 7 shows a maximum near 250 nm.³⁷ In that paper, Shukla and Mishra also reported the fluorescence spectra of AL in aqueous solution at pH 7.2 with a maximum fluorescence intensity at about 335 nm. However, these spectral features are likely associated with the presence of more than one tautomer as mentioned previously.³⁷ We report the absorption and fluorescence spectra of AL-R in neutral aqueous solution in Figure 1.

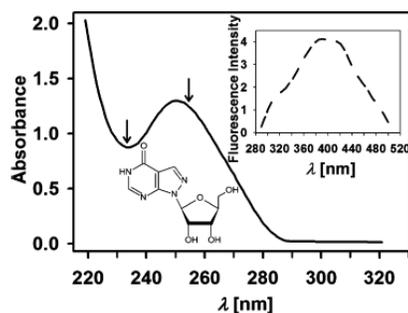


Figure 1. Steady-state absorption spectrum of allopurinol riboside in water. Inset: fluorescence emission spectrum in water, obtained by exciting a low absorbance (≤ 0.05) aqueous solution of allopurinol riboside at $\lambda_{\text{Excitation}} = 257$ nm. The arrows indicate the $\pi-\pi^*$ vertical transitions computed at the multireference second order Møller–Plesset (MR-MP2) level of theory for allopurinol keto-N1-H.

The low energy absorption spectrum for AL-R shows a single broad band with a maximum at approximately 250 nm which is near a more intense band that spreads below 220 nm. As will be shown below, the band at 250 nm is due to the overlap of the lowest energy transitions. For AL-R, fluorescence emission is broad and consistent with a low quantum yield ($\phi_f \leq 10^{-4}$ from comparisons with the spectrum of *p*-terphenyl), showing a maximum near 400 nm.

For the computation of vertical transitions, we studied the keto-N1-H tautomer of allopurinol (AL-keto-N1-H) in order to reduce the computational cost. This tautomer has a substitution pattern analogous to that of AL-R since the N1 atom is substituted either by the ribose moiety or by a hydrogen atom.

A planar structure was obtained for the minimum in the ground state of AL-keto-N1-H at the MP2/cc-pvdz level of theory. The minimum energy geometry was verified by calculating the vibrational frequencies. Vertical transitions were calculated at the optimized geometry of the ground state. Table 1 collects

Table 1. Vertical Excitation Energies (in eV) Corrected at the Multireference Second Order Møller–Plesset (MR-MP2) Level of Theory and Oscillator Strengths (Italics)

$\pi-\pi^*$ states ^a		
$2^1A'$	$3^1A'$	$4^1A'$
4.840, <i>0.097</i>	5.277, <i>0.055</i>	5.536, <i>0.030</i>
H → L (62%) ^c	H → L + 1 (33%)	
1L_a	1L_b	
n- π^* states ^a		
$1^1A''$	$2^1A''$	$3^1A''$
5.080	5.348	5.814

^aThe four averaged states complete active space self-consistent field (SA-4-CASSCF) level of theory and the 6-31G+(d) basis set were used. The first three A' ($\pi-\pi^*$) and the first three A'' (n- π^*) excited states of allopurinol keto-N1-H were computed. ^bFor the nucleoside of allopurinol in aqueous solution the first absorption band maximum is $\lambda_{\text{Abs}} = 251$ nm (4.94 eV). ^cThe squares of the coefficients taken from the CASSCF wave functions are shown.

the transition energies as well the oscillator strengths for the first three $\pi-\pi^*$ (A' states) and the first three n- π^* (A'' states) excited states of AL-keto-N1-H. For AL-R, the maximum of the experimental absorption band in water is 4.94 eV (251 nm), whereas our calculation predicts two $\pi-\pi^*$ transitions at 4.84 eV (256 nm) and 5.28 eV (234 nm) for AL-keto-N1-H, which can be correlated with the first broad absorption band of AL-R. Finally, the first excited state corresponds to the 1L_a $\pi-\pi^*$ state with the main contribution to the CASSCF wave function coming from the H → L transition (see Table 1).

The electronically excited state decay of AL-R was time-resolved by detecting the emission at 350 and 385 nm. The fluorescence decays are shown in Figure 2. The up-conversion signal shows a fast decay component which only expands the subpicosecond region. The trace was fitted to a single

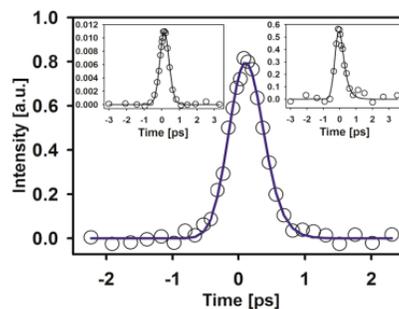


Figure 2. Fluorescence up-conversion measurements of allopurinol riboside in aqueous solution (pH 7) at $\lambda_{\text{Emission}} = 350$ nm and $\lambda_{\text{Excitation}} = 257$ nm. Left inset: $\lambda_{\text{Emission}} = 350$ nm and $\lambda_{\text{Excitation}} = 266$ nm. Right inset: $\lambda_{\text{Emission}} = 385$ nm and $\lambda_{\text{Excitation}} = 266$ nm. The solid lines are nonlinear least-squares fits to single exponential decays convoluted with the instrument response function (Gaussian with fwhm ~ 550 fs).

exponential decay to the baseline, convoluted with the Gaussian IRF (fwhm = 550 fs).

Due to the time scales, the exact time constant of the decay could not be determined; however, an upper limit was established from an analysis of the convoluted signal, indicating a fluorescent state lifetime of $\tau < 0.2$ ps. This ultrafast emission decay is identical to that of the HPX chromophore, which implies that the change of the five-membered ring from imidazolic to pyrazolic does not affect the ultrafast dynamics of that present in HPX or INS.^{30–32} In fact, AL-R, INS, and HPX are among the compounds with the shortest S_1 lifetimes together with adenosine and the keto-N9-H tautomer of adenine.¹² The deactivation times for these systems are, overall, shorter than those of GUA and its riboside and nucleotide which show biexponential behavior with time constants up to 890 fs.²⁹ This comparison points to a more direct access to the S_1-S_0 CI when the amino group (present in GUA) is removed.

Most importantly, our results demonstrate that, as long as the six-membered ring is of the type in HPX or AL-R in the neutral molecules, the CI region is promptly accessed without any involvement or indirect effect of the five-membered ring (AL-R versus HPX and INS). The results from Figure 2 also show that there is no significant effect on the ultrafast fluorescence decay of AL-R upon changes in the excitation energy from 257 to 266 nm (350 nm detection). Finally, the fluorescence up-conversion decay at 385 nm again shows a single exponential decay with $\tau < 0.2$ ps exhibiting that the full spectrum decays in this time scale and that no spectral evolution (like red shifting) can be detected within our time resolution.

It should be pointed out that, considering our theoretical results, both excitation energies (257 and 266 nm) are likely to generate a population of molecules in a superposition of the lowest energy excited states. Considering the time-resolved results, and the similarity to the GUA, HPX, and INS systems, we assume an ultrafast nonradiative transfer of the population to the S_1 ($\pi-\pi^*$) excited state (1L_a) from the originally formed state: a process that cannot be resolved by current experiments. Additionally, time-resolved-fluorescence anisotropy was obtained by using parallel and perpendicular relative polarizations of the pump beam with respect to the detection axis (vertical, at the up-conversion crystal from the *ooe* type I phase matching). The corresponding traces are shown in Figure 3.

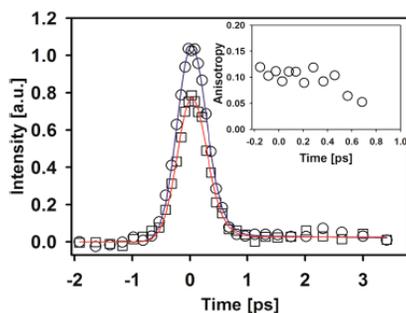


Figure 3. Fluorescence anisotropy up-conversion measurement of allopurinol riboside in aqueous solution with $\lambda_{\text{Emission}} = 350$ nm and $\lambda_{\text{Excitation}} = 257$ nm. Circles, parallel detection; squares, perpendicular detection. The inset shows the anisotropy values calculated directly from the parallel and perpendicular traces.

We calculated an initial anisotropy value of $0.05 < r(0) < 0.15$, which strongly supports the initial generation of a superposition of states. The small value of anisotropy at $t = 0$ proves that the effective transition dipole moment for the initial photon absorption differs from that of the emissive state. As mentioned, the same situation has been observed for GUA and its derivatives, where an ultrafast internal conversion takes place from 1L_b ($\pi-\pi^*$) to 1L_a ($\pi-\pi^*$), where the emissive state 1L_a differs substantially from the initially generated excited state, and as consequence small (~ 0.2) values of $r(0)$ have been observed.^{3,27,44}

Further, our SA-6-CASSCF(12,9)/cc-pvdz level calculations on allopurinol keto-N1-H predict that the transition dipole moments for the two lowest $\pi-\pi^*$ vertical transitions form angles of 75.22° (S_0 to first $\pi-\pi^*$ state) and -29.84° (S_0 to second $\pi-\pi^*$ state) with respect to the axis passing through the C8 and C9 atoms (see Chart 1 for atom numbering). Since these transition dipole moments are not collinear, it is expected for the $t = 0$ anisotropy to differ significantly from the 0.4 value due to excitation into a superposition of the lowest optical transitions, consistent with the experimental value of $0.05 < r(0) < 0.15$.

To gain more information of the ultrafast events in AL-R, the S_1-S_0 CI was evaluated for AL-keto-N1-H at the MR-CIS level of theory by using a SA-6-CASSCF(12,9) wave function as reference. The active space of 12 electrons in 9 active molecular orbitals (12,9) was considered adequate to describe the low lying $\pi-\pi^*$ and $n-\pi^*$ energies from comparisons with larger active spaces (e.g., 18 electrons in 13 orbitals) at the ground state minimum which produced nearly the same energies and the same state ordering.

First of all, we looked for a minimum in the potential energy surface (PES) of S_1 . Using the optimization algorithm, a planar stationary point (S_1 planar in Table 2) with imaginary

Table 2. Energies (in eV) for S_0 and S_1 ($\pi-\pi^*$) States of Allopurinol keto-N1-H at Different Geometries Computed at the Multireference Configuration Interaction with Single Excitations (MR-CIS) Level of Theory with a Six Averaged States Complete Active Space Self-Consistent Field (SA-6-CASSCF) Wave Function as Reference

	S_0	S_1 ($\pi-\pi^*$) ^a
S_0 min	0	5.45 (1L_a H \rightarrow L (64%))
S_1 planar	0.78	4.74 (1L_a H \rightarrow L (67%))
S_1-S_0 CI MXS	3.92	3.92

^aNumbers in parentheses indicate the contribution of the configuration state function (CSF) with the single excitation H \rightarrow L to the SA-CASSCF wave function.

frequencies on the PES of S_1 was found. At this geometry, the S_0-S_1 energy gap is already reduced by 1.49 eV, compared with the S_0-S_1 energy gap at the S_0 minimum (vertical transition). We were not able to locate a minimum on the PES of S_1 at the MR-CIS/SA-6-CASSCF/cc-pvdz level of theory, indicating, in accordance with our experiments, that the S_1 state in AL does not possess an accessible minimum energy geometry in the S_1 surface.

We started the S_1-S_0 CI search from a geometry which is in the gradient path from the Franck-Condon geometry, given that previous computations have shown that the probability of crossing between the S_1 and S_0 PES is maximized for this kind of structures on related purine systems.^{6,25,26,45} The optimiza-

tion locates the minimum energy point on the hyperline of CIs between two states (seam), the so-called minimum on the crossing seam (MXS).

Figure 4 shows the geometry for the MXS found with the geometry optimization by direct inversion of the iterative

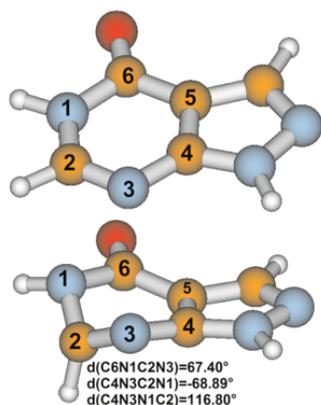


Figure 4. Ground state minimum (top) and MXS S_1 - S_0 CI (bottom) geometries for allopurinol keto-N1-H.

subspace (GDIIS) algorithm as implemented in the Columbus 5.9.2 package.⁴¹ The MXS geometry is highly distorted from planarity. The main change, compared with the S_0 minimum (Franck–Condon transition), is observed at the six-membered ring which is nonplanar at the MXS as shown by the dihedral angles in Figure 4. On the other hand, the five-membered ring remains planar at the MXS as in the S_0 minimum geometry.

The geometry for the MXS found for AL-keto-N1-H is similar to those reported for GUA-keto-N9-H^{4,10,46,47} and HPX-keto-N9-H.³² The nonplanarity in the six-membered ring may be described by the dihedral angles $d(C6-N1-C2-N3)$, $d(C4-N3-C2-N1)$, and $d(C4-N3-N1-C2)$ in order to compare it with the geometry of the S_1 - S_0 CIs found in other similar heterocyclic systems. For instance, some of the values reported for GUA-keto-N9-H are $d(C6-N1-C2-N3) = -73.605^\circ$,⁴ $d(C4-N3-C2-N1) = 69^\circ$ and 72.5° ,⁴⁶ $d(C4-N3-N1-C2) = 106.6^\circ$,⁴⁷ and $d(C4-N3-N1-C2) = 157^\circ$,¹⁰ while for HPX-keto-N9-H $d(C6N1C2N3) = 75.634^\circ$ was predicted.³² Table 2 summarizes our excited state calculations for the S_1 (π - π^*) state of AL-keto-N1-H in terms of the S_1 and S_0 energies. As mentioned, from the Franck–Condon region of the S_1 excited state the system relaxes to a saddle point with a planar geometry where the S_1 - S_0 energy gap is significantly reduced. This aforementioned S_1 planar geometry (see Table 2) can be thought of as representative of a transitional region between the Franck–Condon region and the region where the S_1 and S_0 excited states become nearly degenerate. The S_1 - S_0 CI is best represented by the geometry at the S_1 - S_0 MXS. This mechanism explains the ultrafast decay of S_1 and the low fluorescence quantum yield of S_1 by UV excitation.

In support of our suggestion that the five-membered ring does not play an important role in the ultrafast dynamics of neutral allopurinol and the analogous systems, we would like to mention a previous theoretical study of the S_1 (π - π^*) excited state deactivation of 4-pyrimidinone at the CASPT2/CASSCF level by Delchev et al.⁴⁸ The 4-pyrimidinone structure corresponds to the six-membered ring of allopurinol without

the five-membered ring, and the calculations by Delchev et al. were made considering the exact substitution pattern as in the relevant tautomers of allopurinol riboside, hypoxanthine, and inosine. For 4-pyrimidinone a highly accessible S_1 - S_0 CI was computed, where the loss of planarity guides the relaxation of the excited state from the Franck–Condon region to the S_1 - S_0 CI. The geometry at the S_1 - S_0 CI reported for 4-pyrimidinone is nonplanar: $d(C6-N1-C2-N3) = -71.468^\circ$, $d(C4-N3-C2-N1) = 74.613^\circ$, and $d(C4-N3-N1-C2) = -110.909^\circ$. These values for the dihedral angles are comparable with those reported in Figure 4 for the MXS of the S_1 - S_0 CI of allopurinol keto-N1-H.

CONCLUSIONS

We have studied the ultrafast dynamics of the modified DNA base AL-R in aqueous solution and found that even though the five-membered ring is modified when compared with previously studied systems (HPX, INS, and GUA), an ultrafast decay of the S_1 (π - π^*) excited state was observed ($\tau < 0.2$ ps). Similar to related heterocyclic systems, the ultrafast decay of the S_1 (π - π^*) excited state is due to an efficient nonradiative process mediated by highly accessible S_1 - S_0 CIs in the relaxation path from the Franck–Condon region. The loss of planarity at the six-membered heterocycle guides the deactivation path of the initially generated S_1 (π - π^*) excited state, reaching the S_1 - S_0 MXS with a geometry similar to that of HPX, as found herein at the MR-CIS/SA-6-CASSCF level of theory. Since the five-membered ring continues being planar at the S_1 - S_0 MXS, we conclude that, in general, the ultrafast dynamics of the S_1 excited state in these fused heterocyclic systems is dominated by the out-of-plane movements of N1, C2, and N3 as shown in Figure 4 with no involvement of the pyrazolic (AL-R) or iminic (HPX, INS, etc.) ring.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: jpeon@servidor.unam.mx.

Present Address

[§]Department of Chemistry, Emory University, Atlanta, GA 30322, USA.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

For financial support we thank CONACyT Grant178541 and PAPIIT-UNAM Grant IN 204211. S.M. acknowledges support from the National Science Foundation under Grant CHE 1213614.

REFERENCES

- (1) Middleton, C. T.; de La Harpe, K.; Su, C.; Law, Y. K.; Crespo-Hernandez, C. E.; Kohler, B. DNA Excited-State Dynamics: From Single Bases to the Double Helix. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2009**, *60*, 217–239.
- (2) Gustavsson, T.; Improta, R.; Markovitsi, D. DNA/RNA: Building Blocks of Life under UV Irradiation. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 2025–2030.
- (3) 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.

- (4) Serrano-Andres, L.; Merchan, M.; Borin, A. C. A Three-State Model for the Photophysics of Guanine. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2473–2484.
- (5) Crespo-Hernandez, C. E.; Cohen, B.; Hare, P. M.; Kohler, B. Ultrafast Excited-State Dynamics in Nucleic Acids. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1977–2019.
- (6) Serrano-Andres, L.; Merchan, M. Are the Five Natural DNA/RNA Base Monomers a Good Choice from Natural Selection? A Photochemical Perspective. *J. Photochem. Photobiol., C: Photochem. Rev.* **2009**, *10*, 21–32.
- (7) Canuel, C.; Mons, M.; Piuze, F.; Tardivel, B.; Dimicoli, L.; Elhanine, M. Excited States Dynamics of DNA and RNA Bases: Characterization of a Stepwise Deactivation Pathway in the Gas Phase. *J. Chem. Phys.* **2005**, *122*, 074316.
- (8) Yamazaki, S.; Domcke, W. Ab Initio Studies on the Photophysics of Guanine Tautomers: Out-of-Plane Deformation and NH Dissociation Pathways to Conical Intersections. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 7090–7097.
- (9) Barbatti, M.; Szymczak, J. J.; Aquino, A. J. A.; Nachtigalova, D.; Lischka, H. The Decay Mechanism of Photoexcited Guanine—A Nonadiabatic Dynamics Study. *J. Chem. Phys.* **2011**, *134*, 014304.
- (10) Lan, Z. G.; Fabiano, E.; Thiel, W. Photoinduced Nonadiabatic Dynamics of 9H-Guanine. *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 1225–1229.
- (11) Lan, Z. G.; Fabiano, E.; Thiel, W. Photoinduced Nonadiabatic Dynamics of Pyrimidine Nucleobases: On-the-Fly Surface-Hopping Study with Semiempirical Methods. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 3548–3555.
- (12) Cohen, B.; Hare, P. M.; Kohler, B. Ultrafast Excited-State Dynamics of Adenine and Monomethylated Adenines in Solution: Implications for the Nonradiative Decay Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13594–13601.
- (13) Kohler, B. Nonradiative Decay Mechanisms in DNA Model Systems. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 2047–2053.
- (14) Pecourt, J. M. L.; Peon, J.; Kohler, B. DNA Excited-State Dynamics: Ultrafast Internal Conversion and Vibrational Cooling in a Series of Nucleosides. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10370–10378.
- (15) Zgierski, M. Z.; Patchkovskii, S.; Fujiwara, T.; Lim, E. C. The Role of Out-of-Plane Deformations in Subpicosecond Internal Conversion of Photoexcited Purine Bases: Absence of the Ultrafast Decay Channel in Propanodeoxyguanosine. *Chem. Phys. Lett.* **2007**, *440*, 145–149.
- (16) Gustavsson, T.; Sharonov, A.; Markovitsi, D. Thymine, Thymidine and Thymidine 5'-Monophosphate Studied by Femtosecond Fluorescence Upconversion Spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *351*, 195–200.
- (17) Gustavsson, T.; Sharonov, A.; Onidas, D.; Markovitsi, D. Adenine, Deoxyadenosine and Deoxyadenosine 5'-Monophosphate Studied by Femtosecond Fluorescence Upconversion Spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *356*, 49–54.
- (18) Serrano-Andres, L.; Merchan, M.; Borin, A. C. Adenine and 2-Aminopurine: Paradigms of Modern Theoretical Photochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 8691–8696.
- (19) Markovitsi, D.; Gustavsson, T.; Banyasz, A. Absorption of UV Radiation by DNA: Spatial and Temporal Features. *Mutat. Res.* **2010**, *704*, 21–28.
- (20) Pancur, T.; Schwalb, N. K.; Renth, F.; Temps, F. Femtosecond Fluorescence Up-Conversion Spectroscopy of Adenine and Adenosine: Experimental Evidence for the $\pi\pi^*$ State? *Chem. Phys.* **2005**, *313*, 199–212.
- (21) Matsika, S. Radiationless Decay of Excited States of Uracil through Conical Intersections. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 7584–7590.
- (22) Mburu, E.; Matsika, S. An Ab Initio Study of Substituent Effects on the Excited States of Purine Derivatives. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 12485–12491.
- (23) Mercier, Y.; Santoro, F.; Reguero, M.; Improta, R. The Decay from the Dark $n\pi^*$ Excited State in Uracil: An Integrated CASPT2/CASSCF and PCM/TD-DFT Study in the Gas Phase and in Water. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 10769–10772.
- (24) Lan, Z. G.; Frutos, L. M.; Sobolewski, A. L.; Domcke, W. Photochemistry of Hydrogen-Bonded Aromatic Pairs: Quantum Dynamical Calculations for the Pyrrole-Pyridine Complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 12707–12712.
- (25) Barbatti, M.; Aquino, A. J. A.; Szymczak, J. J.; Nachtigalova, D.; Hobza, P.; Lischka, H. Relaxation Mechanisms of UV-Photoexcited DNA and RNA Nucleobases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 21453–21458.
- (26) Barbatti, M.; Lischka, H. Nonadiabatic Deactivation of 9H-Adenine: A Comprehensive Picture Based on Mixed Quantum-Classical Dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6831–6839.
- (27) Karunakaran, V.; Kleinerhanns, K.; Improta, R.; Kovalenko, S. A. Photoinduced Dynamics of Guanosine Monophosphate in Water from Broad-Band Transient Absorption Spectroscopy and Quantum-Chemical Calculations. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5839–5850.
- (28) Nolting, D.; Weinkauff, R.; Hertel, I. V.; Schultz, T. Excited-State Relaxation of Protonated Adenine. *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 751–755.
- (29) Peon, J.; Zewail, A. H. DNA/RNA Nucleotides and Nucleosides: Direct Measurement of Excited-State Lifetimes by Femtosecond Fluorescence Up-Conversion. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *348*, 255–262.
- (30) Chen, J.; Kohler, B. Ultrafast Nonradiative Decay by Hypoxanthine and Several Methylxanthines in Aqueous and Acetonitrile Solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 10677–10682.
- (31) Röttger, K.; Siewertsen, R.; Temps, F. Ultrafast Electronic Deactivation Dynamics of the Rare Natural Nucleobase Hypoxanthine. *Chem. Phys. Lett.* **2012**, *536*, 140–146.
- (32) Villabona-Monsalve, J. P.; Noria, R.; Matsika, S.; Peón, J. On the Accessibility to Conical Intersections in Purines: Hypoxanthine and Its Singly Protonated and Deprotonated Forms. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7820–7829.
- (33) Chenon, M.-T.; Pugmire, R. J.; Grant, D. M.; Panzica, R. P.; Townsend, L. B. Carbon-13 NMR Spectra of C-Nucleosides. II. A Study on the Tautomerism of Formycin and Formycin B by the Use of CMR Spectroscopy. *J. Heterocycl. Chem.* **1973**, *10*, 431–433.
- (34) Bergmann, F.; Frank, A.; Neiman, Z. Studies on the Chemical-Reactivity and the Physical-Properties of Allopurinol (Pyrzolo 3,4-D Pyrimidin-4-One) and Related Compounds. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1979**, 2795–2802.
- (35) Hernandez, B.; Luque, F. J.; Orozco, M. Tautomerism of Xanthine Oxidase Substrates Hypoxanthine and Allopurinol. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5964–5971.
- (36) Babushkina, T. A.; Leonova, T. S.; Chernyshov, A. I.; Yashunskii, V. G. Study of Tautomerism in Allopurinol and Its Methyl-Derivatives by NMR C-13 Spectroscopy. *Khim. Geterotsikl. Soedin.* **1979**, 1543–1546.
- (37) Shukla, M. K.; Mishra, P. C. Electronic Spectra and Structure of Allopurinol: A Xanthine Oxidase Inhibitor. *Spectrochim. Acta, Part A* **1996**, *52*, 1547–1557.
- (38) Rodriguez-Cordoba, W.; Noria, R.; Guarín, C. A.; Peon, J. Ultrafast Photosensitization of Phthalocyanines through Their Axial Ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4698–4701.
- (39) Plaza-Medina, E. F.; Rodriguez-Cordoba, W.; Morales-Cueto, R.; Peon, J. Primary Photochemistry of Nitrated Aromatic Compounds: Excited-State Dynamics and NO Dissociation from 9-Nitroanthracene. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 577–585.
- (40) Schmidt, M. W.; Baldrige, K. K.; Boatz, J. A.; Elbert, S. T.; Gordon, M. S.; Jensen, J. H.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K. A.; Su, S.; et al. General Atomic and Molecular Electronic Structure System. *J. Comput. Chem.* **1993**, *14*, 1347–1363.
- (41) Lischka, H.; Müller, T.; Szalay, P. G.; Shavitt, I.; Pitzer, R. M.; Shepard, R. Columbus—A Program System for Advanced Multi-reference Theory Calculations. *Wiley Interdiscip. Rev.: Comput. Mol. Sci.* **2011**, *1*, 191–199.
- (42) Lischka, H.; Dallos, M.; Shepard, R. Analytic MRCI Gradient for Excited States: Formalism and Application to the $n-\pi^*$ Valence- and $(3s,3p)$ Rydberg States of Formaldehyde. *Mol. Phys.* **2002**, *100*, 1647–1658.

(43) Lischka, H.; Dallos, M.; Szalay, P. G.; Yarkony, D. R.; Shepard, R. Analytic Evaluation of Nonadiabatic Coupling Terms at the MR-CI Level. I. Formalism. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 7322–7329.

(44) Miannay, F.-A.; Gustavsson, T.; Banyasz, A.; Markovitsi, D. Excited-State Dynamics of DGMP Measured by Steady-State and Femtosecond Fluorescence Spectroscopy. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 3256–3263.

(45) 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.

(46) Yamazaki, S.; Domcke, W.; Sobolewski, A. L. Nonradiative Decay Mechanisms of the Biologically Relevant Tautomer of Guanine. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 11965–11968.

(47) Chen, H.; Li, S. H. Ab Initio Study on Deactivation Pathways of Excited 9H-Guanine. *J. Chem. Phys.* **2006**, *124*, 154315.

(48) Delchev, V. B.; Sobolewski, A. L.; Domcke, W. Comparison of the Non-Radiative Decay Mechanisms of 4-Pyrimidinone and Uracil: An Ab Initio Study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 5007–5015.