



Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Centro de Investigaciones Ópticas (CIOp)

(UNLP - CIC - CONICET)

***APLICACIÓN DE TÉCNICAS FOTÓNICAS AL ESTUDIO DE
TRANSPORTE DE ELECTRONES ENTRE PROTEÍNAS Y
COMPUESTOS DE COORDINACIÓN DE METALES DE TRANSICIÓN***

Emilia R. Serrano

Director: Dr. Pedro M. David Gara

LABORATORIO DE PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS

2022

Trabajo final de la Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular

El presente trabajo titulado “Aplicación de técnicas fotónicas al estudio de transporte de electrones entre proteínas y compuestos de coordinación de metales de transición” corresponde a la materia “Laboratorio de Procesos Biotecnológicos” para optar por el título de grado de Licenciada en Biotecnología y Biología Molecular; el mismo ha sido realizado en el Centro de Investigaciones Ópticas (CIOp) (UNLP - CIC - CONICET), bajo la dirección del Dr. Pedro M. David Gara.

Agradecimientos

Agradezco a todos los que me acompañaron en este camino y de una manera u otra hicieron posible la realización de esta tesina.

Quiero agradecer a mi director de tesina, Dr. Pedro M. David Gara, por guiarme en este proceso, por todas las oportunidades que me brindó, por el conocimiento transmitido, por el tiempo dedicado y los mates compartidos.

Agradezco al Centro de Investigaciones Ópticas (CIOp) por proporcionar el lugar y los medios que hicieron posibles este trabajo, y por hacerme sentir cómoda durante toda mi estancia en el centro.

Agradezco al equipo de Vila y Abriata de la Universidad de Rosario por enviarnos la Citocromo c oxidasa para poder realizar los análisis.

A Pablo, mi novio, por el apoyo que me dio todos estos años, los abrazos y las comidas que me dieron fuerzas cuando más las necesitaba.

En lo personal, quisiera agradecer a mi mamá y mi papá, sin los cuales el tránsito por la universidad no hubiera sido posible. Y también a mis amigos, compañía constante durante esta etapa.

¡Las palabras no son suficientes para agradecerles!

Emi

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 LA CÉLULA Y LAS MACROMOLÉCULAS.....	8
1.1.1 La célula.....	8
1.1.2 Las proteínas.....	8
1.1.3 Las enzimas.....	10
1.2 METABOLISMO Y CADENA TRANSPORTADORA.....	13
1.2.1 Introducción al metabolismo.....	13
1.2.2 Redox biológicas.....	14
1.2.3 Fosforilación oxidativa y fotofosforilación.....	15
1.3 COMPLEJOS.....	20
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1 LUGAR DE TRABAJO.....	25
3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	25
3.3 REACTIVOS Y MUESTRAS.....	25
3.3.1 Preparación del agua bidestilada.....	26
3.3.2 Preparación del buffer fosfato.....	26
3.3.3 Preparación de las referencias.....	26
3.3.4 Preparación del stock de proteína.....	27
3.3.5 Preparación de la solución de complejos.....	28
3.3.6 Preparación de la solución de proteína y complejo de Ru(II).....	28
3.4 TÉCNICAS EMPLEADAS.....	29
3.4.1 Espectroscopía de absorción UV-visible y espectrofluorimetría.....	29
3.4.2 Obtención de la proteína recombinante Citocromo c Oxidasa.....	32
3.4.3 Métodos fototérmicos.....	35
3.4.4 Análisis computacional y deconvolución de las señales.....	40
3.4.5 Señal acústica y cálculos calorimétricos.....	41
3.4.6 Determinación del rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete por el complejo de Re.....	45
4. RESULTADOS.....	47

4.1	Análisis de las referencias calorimétricas utilizadas: espectro UV-visible, estabilidad y medidas fotoacústicas	47
4.2	Análisis de los complejos utilizados: espectro UV-visible y medidas fotoacústicas	52
4.3	Análisis de la transferencia de carga entre Citocromo c y Complejo de Ru (II): espectro UV-visible y medidas fotoacústicas	58
4.4	Análisis de la transferencia de carga entre Citocromo c y la subunidad Cu _A de la Citocromo c Oxidasa: espectro UV-visible, estabilidad y medidas fotoacústicas	63
5.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	67
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	70

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA CÉLULA Y LAS MACROMOLÉCULAS

1.1.1 La célula

La célula es la unidad estructural y funcional de todos los organismos vivos. Su límite con el exterior está definido por la membrana plasmática, que separa su contenido del medio externo y además actúa como una membrana semipermeable a iones y otros compuestos. El volumen interno celular está limitado por el citoplasma, compuesto por una solución acuosa y organizado gracias al citoesqueleto, el citosol y una variedad de partículas suspendidas con diversas funciones específicas, entre las cuales se destacan las macromoléculas.

Las macromoléculas son polímeros ordenados y con secuencias específicas, de alta masa molecular, construidos a partir de precursores relativamente simples denominados monómeros, unidos entre sí por diversas interacciones, como enlaces covalentes y no covalentes, dando como resultado estructuras y funciones diversas. Dentro de las macromoléculas pueden encontrarse los ácidos nucleicos, los polisacáridos y las proteínas.

Las células y los organismos mantienen un pH citosólico específico y constante, normalmente cercano a 7, que mantiene las biomoléculas en su estado óptimo. En los organismos multicelulares, el pH de los fluidos extracelulares también se mantiene estrechamente regulado a buffer biológicos de ácidos débiles y su base conjugada.

1.1.2 Las proteínas

Las proteínas son largos polímeros de aminoácidos, cuya composición es altamente variable, y cuya estructura presenta una disposición espacial particular denominada conformación. Las posibles conformaciones de una proteína incluyen cualquier estado estructural que pueda lograrse sin romper enlaces covalentes. La necesidad de la existencia de múltiples conformaciones estables para una misma proteína refleja los cambios que deben producirse cuando se unen a otras moléculas o catalizan reacciones. Las conformaciones existentes en unas condiciones determinadas son generalmente las

más estables termodinámicamente y que poseen, por tanto, la menor energía libre de Gibbs.

Todas las proteínas presentan una estructura nativa, estructura tridimensional en condiciones fisiológicas, la cual se considera la más estable de todas las estructuras posibles y que también es la funcionalmente activa. Si se cambiaran las condiciones ambientales, la estructura nativa se perdería, proceso denominado desnaturalización. La desnaturalización de una proteína puede conseguirse mediante aumento de la temperatura, cambios drásticos de pH, añadiendo agentes caotrópicos (como la urea o el clorhidrato de guanidinio) o mediante disolventes orgánicos como el etanol [Gordon, J. A., & Jencks, W. P. (1963)]. Considerando lo anteriormente mencionado, se puede afirmar que la conformación nativa estable de las macromoléculas está determinada por una gran cantidad de interacciones no covalentes, que permiten al mismo tiempo la flexibilidad necesaria para su función biológica. Por lo tanto, este proceso debe considerarse a la hora de trabajar con proteínas en el laboratorio.

Sin embargo, las proteínas nativas sólo son marginalmente estables. Una cadena polipeptídica determinada puede adoptar teóricamente incontables conformaciones diferentes, lo que hace que su estado desplegado se caracterice por un alto valor de la entropía conformacional. Este valor de la entropía, tiende a favorecer el mantenimiento del estado desplegado de la proteína. Entre las interacciones químicas que contrarrestan estos efectos y estabilizan la conformación nativa se cuentan los enlaces disulfuro (enlaces covalentes) y las interacciones débiles (enlaces no covalentes) como puentes de hidrógeno, interacciones iónicas e interacciones hidrofóbicas [Nemethy, G., Peer, W. J., & Scheraga, H. A. (1981)].

Las interacciones no covalentes son responsables de la fuerza y de la especificidad de reconocimiento entre las biomoléculas, y las propiedades disolventes del agua presentan una gran influencia en dichas interacciones. El agua es la sustancia más abundante en los sistemas vivos, y sus características influyen en la estructura, el autoensamblaje y las propiedades de los componentes celulares. Es por esta razón que el medio en el que se encuentran las proteínas condiciona la estructura y la función que adquieren.

Los enlaces covalentes, ya sea a nivel monomérico como también macromolecular, imponen restricciones sobre la forma que adoptan las biomoléculas grandes. Las macromoléculas, a su vez, interaccionan con otras estructuras macromoleculares y

orgánulos presentes en el organismo para poder llevar a cabo sus diferentes y numerosas funciones metabólicas.

Los compuestos anfipáticos, como las proteínas, contienen regiones que son polares o cargadas y otras regiones que son apolares. Cuando se realiza una disolución de una proteína con agua, la región polar hidrofílica proteica interacciona favorablemente con el solvente y tiende a disolverse, pero la región apolar hidrofóbica tiende a evitar el contacto con el agua. Las interacciones hidrofóbicas entre aminoácidos apolares estabilizan también los patrones de plegamiento tridimensional de las proteínas. Las macromoléculas tales como proteínas, el DNA y el RNA contienen tantos sitios potenciales para la formación de puentes de hidrógeno o interacciones iónicas, de van der Waals o hidrofóbicas que el efecto acumulativo del gran número de pequeñas fuerzas de unión puede ser enorme.

Por lo tanto, se puede decir que la estructura nativa de la mayoría de macromoléculas es aquella en que se maximizan las uniones débiles. Las moléculas de agua fuertemente unidas a macromoléculas son osmóticamente inactivas. El agua fuertemente unida es esencial para la función de muchas proteínas.

1.1.3 Las enzimas

Las enzimas son, en su mayoría, moléculas de naturaleza proteica, que catalizan reacciones químicas siempre que sean termodinámicamente posibles. Es decir, una enzima hace que una reacción química que es energéticamente viable, pero que transcurre a una velocidad muy baja, sea cinéticamente favorable, y por lo tanto transcurra a una mayor velocidad respecto a la ausencia de la enzima. Las enzimas actúan sobre moléculas denominadas sustratos, las cuales se convierten en moléculas diferentes luego de su interacción, denominadas productos. Estas reacciones mediadas por enzimas se las llama reacciones enzimáticas [Cornish-Bowden, A. (2013)].

La conformación nativa de una enzima será la que determine su actividad catalítica, por lo que, si una enzima se desnaturaliza perdiendo su estructura nativa o se disocia en sus subunidades, perderá su actividad catalítica. En consecuencia, podemos afirmar que las estructuras de las proteínas enzimáticas serán esenciales para su actividad catalítica.

Algunas enzimas sólo requieren de sus residuos aminoacídicos para poder llevar a cabo su actividad. No obstante, otras enzimas requieren de componentes adicionales denominados cofactores, los cuales pueden ser de naturaleza inorgánica, tales como Fe^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2} o Zn^{+2} , u orgánica o metaloorgánica compleja, tales como coenzimas. La mayoría de las coenzimas son derivados de vitaminas y actúan como transportadores transitorios de grupos funcionales específicos durante las reacciones enzimáticas. Existen varias enzimas que requieren tanto de uno o más cofactores inorgánicos como de coenzimas, y la unión covalente de una coenzima o ion metálico a una enzima se conoce como grupo prostético. Una holoenzima es, por lo tanto, una enzima catalíticamente activa junto a sus grupos prostéticos, mientras que su parte proteica se denomina apoenzima.

Las enzimas son muy selectivas en el momento de unirse a un sustrato, por lo que el conjunto de enzimas que son sintetizadas en una célula podrá determinar el tipo metabólico presentado por la misma, lo que finalmente dependerá de la regulación de la expresión génica del organismo. La especificidad enzimática requiere de un sitio particular en la superficie de la enzima, llamado sitio activo, donde la catálisis tiene lugar, y el cual posee una estructura tridimensional determinante del sustrato que ingresa.

Entre los sustratos y los grupos funcionales de las enzimas, tales como cadenas laterales específicas de aminoácidos, iones metálicos y coenzimas, se llevan a cabo reacciones químicas de varios tipos basadas en el reordenamiento de los enlaces covalentes durante la reacción. Los grupos funcionales catalíticos enzimáticos pueden activar al sustrato para la reacción en el sitio activo de la enzima, ya sea formando enlaces covalentes transitorios con él o bien transfiriéndolo transitoriamente a la enzima.

Los enlaces covalentes entre enzimas y sustratos disminuyen la energía de activación de la transformación de reactivo a producto, haciendo que este proceso suceda de manera alternativa, por lo que será cinéticamente favorable. Son las interacciones débiles no

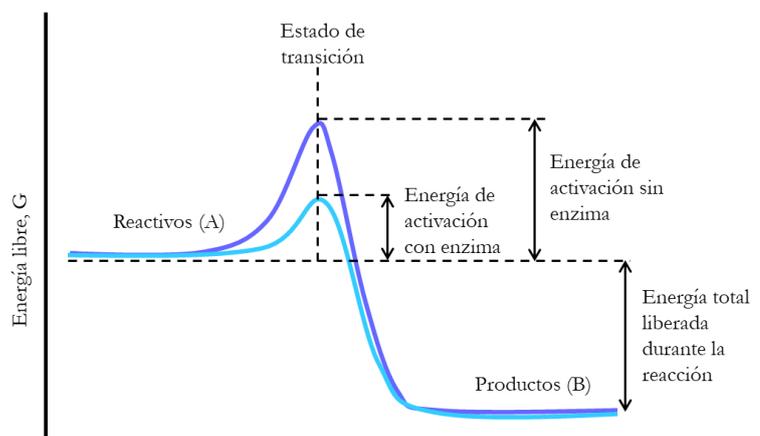


Figura 1.1: Cinética enzimática [Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008)]

covalentes presentes entre el sustrato y la enzima las que proveen gran parte de la energía que se requiere para disminuir la energía de activación. Durante la reacción de formación de productos se forma un complejo enzima-sustrato específico, cuya interacción está directamente mediada por las fuerzas que estabilizan la estructura proteica, como los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas e iónicas. A medida que se van estableciendo interacciones débiles en el complejo enzima-sustrato se libera una pequeña cantidad de energía que ayuda a estabilizar dicha interacción, denominada energía de fijación ΔG_B , lo que finalmente ayuda a la disminución de la energía de activación de la reacción en curso.

El conjunto de reacciones diversas consecutivas catalizadas por enzimas se denominan rutas, y, en ellas, el producto de una reacción será el reactivo del paso siguiente. Las rutas pueden diferenciarse en dos tipos: catabólicas y anabólicas. El catabolismo está compuesto por reacciones degradativas productoras de energía libre, donde los nutrientes orgánicos se degradan para ser transformados en productos finales simples. Ejemplos de reacciones catabólicas son la síntesis de ATP (adenosín trifosfato), la glucólisis, el ciclo de Krebs. Sin embargo, en las células pueden encontrarse también rutas que sintetizan moléculas progresivamente más grandes y complejas a partir de moléculas precursoras pequeñas y simples, constituyentes del anabolismo. Estas reacciones requieren de un invariable aporte energético, y se ven ejemplificadas por la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos.

El metabolismo celular está representado por una mecánica colaborativa entre catabolismo y anabolismo, generando una compleja red de reacciones que son catalizadas por enzimas. Asimismo, existen enzimas clave para cada ruta metabólica, las cuales están reguladas de manera que cada molécula sintetizada alcanzará la concentración fisiológica necesaria, luego de lo cual se mantendrá un equilibrio entre la producción y el consumo de cada intermediario metabólico. Las enzimas pueden regularse mediante alteraciones covalentes en su estructura por procesos de fosforilación o glucosilación, entre otros, las cuales determinarán la funcionalidad enzimática.

1.2 METABOLISMO Y CADENA TRANSPORTADORA

1.2.1 *Introducción al metabolismo*

Los organismos vivos se pueden dividir en dos grandes grupos según la forma química a través de la que obtienen carbono del medio. Los autótrofos (tales como las bacterias fotosintéticas, las algas verdes y las plantas superiores) utilizan dióxido de carbono de la atmósfera como única fuente de carbono a partir de la cual construyen todas sus biomoléculas carbonadas, y además muchos de ellos son fotosintetizadores, es decir que obtienen su energía a partir de la luz solar. Mientras que los heterótrofos (tales como animales multicelulares y la mayoría de microorganismos) no pueden utilizar el dióxido de carbono atmosférico, por lo que deben obtener carbono del ambiente mediante la degradación de moléculas orgánicas relativamente complejas tales como la glucosa. Las rutas degradativas, o catabólicas, convierten las moléculas orgánicas ingeridas (glúcidos, grasas y proteínas) en productos más pequeños y sencillos (ácido láctico, CO_2 , NH_3), liberando energía, la cual se conserva en la formación de ATP y transportadores electrónicos reducidos (nucleótidos de nicotinamida como NADH, NADPH y nucleótidos de flavina como FADH_2); mientras que el resto se pierde en forma de calor. Las rutas biosintéticas, o anabólicas, en cambio, requieren de un aporte de energía, generalmente en forma del potencial de transferencia del grupo fosforilo del ATP y el poder reductor del NADH, NADPH y FADH_2 , lo que les facilita la generación de moléculas complejas a partir de precursores más sencillos.

En los procesos metabólicos, y en todas las transformaciones de energía, se produce una pérdida de energía útil (energía libre) y un aumento inevitable de la cantidad de energía no utilizable (calor y entropía). El metabolismo, que es la suma de todas las transformaciones químicas que se producen en una célula u organismo, tiene lugar en una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente que constituyen las rutas metabólicas. Cada paso de una ruta metabólica ocasiona un pequeño cambio químico específico, normalmente la eliminación, transferencia o adición de un átomo o grupo funcional.

Las transformaciones biológicas de energía obedecen las leyes de la termodinámica. La energía libre de Gibbs expresa la cantidad de energía capaz de realizar trabajo durante una reacción a temperatura y presión constantes, y determina la espontaneidad de una

reacción. Cuando una reacción transcurre con liberación de energía libre, su valor será negativo, y la reacción será exergónica. La entalpía es el contenido calórico del sistema de reacción, y refleja el número y la clase de enlaces químicos en los reactivos y los productos. Cuando una reacción química libera calor, se dice que es una reacción exotérmica; el contenido calórico de los productos es menor que el de los reactivos y la entalpía toma un valor negativo. La entropía es una expresión cuantitativa de la aleatoriedad o del desorden de un sistema. Cuando los productos de una reacción son menos complejos y más desordenados que los reactivos, se afirma que la reacción transcurre con ganancia de entropía. En las condiciones existentes en los sistemas biológicos (incluyendo temperatura y presión constantes), las variaciones en energía libre, entalpía y entropía están relacionadas cuantitativamente:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \rightarrow \Delta G < 0: \textit{reacción espontánea}$$

La energía de activación también consiste en un aspecto importante para que una reacción se lleve a cabo. Las enzimas disminuyen la energía de activación de las reacciones, catalizándolas (aumentan su velocidad). Las reacciones desfavorables (endergónicas) pueden acoplarse a reacciones altamente favorables (exergónicas) para llevarse a cabo.

1.2.2 Redox biológicas

Las reacciones redox biológicas implican la pérdida de electrones por una especie química, que es oxidada, y la ganancia de electrones por otra, que es reducida. El flujo de electrones en las reacciones de redox es responsable, directa o indirectamente, de todo el trabajo realizado por los organismos vivos. En los organismos no fotosintéticos, la fuente de electrones son compuestos reducidos (alimentos); en los organismos fotosintéticos, el dador de electrones inicial es una especie química excitada por absorción de la luz.

La ruta del flujo de electrones en el metabolismo es compleja. Los electrones pasan desde diversos intermediarios metabólicos a transportadores de electrones especializados en reacciones catalizadas por enzimas. Los transportadores ceden, a su vez, los electrones a aceptores con afinidad por los electrones más elevada, liberando energía. Debido a que las dos especies químicas difieren en su afinidad por los

electrones, estos fluyen espontáneamente a través de un circuito, impulsados por una fuerza proporcional a la diferencia en afinidad electrónica, la fuerza electromotriz, FEM.

Las células vivas tienen un circuito biológico, con un compuesto relativamente reducido, tal como la glucosa como fuente de electrones. A medida que la glucosa se oxida enzimáticamente, los electrones liberados fluyen espontáneamente a través de una serie de transportadores de electrones intermediarios a otra especie química, tal como el O_2 . Este flujo de electrones es exergónico, porque el O_2 tiene una afinidad por los electrones mayor que la que tienen los transportadores de electrones intermediarios. La FEM resultante proporciona energía a los diversos transductores moleculares de energía (enzimas y otras proteínas) que realizan el trabajo biológico.

En la mitocondria, enzimas ligadas a la membrana acoplan el flujo de electrones a la producción de una diferencia de puentes de hidrógeno transmembrana y a un potencial eléctrico transmembrana, con lo que se consigue trabajo osmótico y eléctrico. El gradiente de protones así formado tiene energía potencial, a veces llamada fuerza protón-motriz. Otra enzima, la ATP sintasa de la membrana mitocondrial interna, utiliza la fuerza protón-motriz para realizar trabajo químico: síntesis de ATP a partir de ADP (adenosín difosfato) y P_i (fosfato inorgánico) a medida que los protones fluyen espontáneamente a través de la membrana.

1.2.3 Fosforilación oxidativa y fotofosforilación

La fosforilación oxidativa es la culminación del metabolismo productor de energía en los organismos aeróbicos. Todos los pasos oxidativos en la degradación de glúcidos, grasas y aminoácidos confluyen en esta etapa final de la respiración celular en la que la energía de la oxidación impulsa la síntesis de ATP. La fotofosforilación es la forma por la cual los organismos fotosintéticos capturan la energía de la luz solar, la fuente fundamental de energía en la biosfera, y la utilizan para sintetizar ATP. La fosforilación oxidativa y la fotofosforilación aportan conjuntamente la mayor parte del ATP sintetizado por la mayor parte de los organismos la mayor parte de las veces. En los eucariotas la oxidación fosforilativa tiene lugar en la mitocondria, mientras que la fotofosforilación se da en los cloroplastos. En la fosforilación oxidativa se produce la reducción de O_2 a H_2O gracias a los electrones cedidos por el NADH y el $FADH_2$ y tiene lugar tanto en la luz como en la

oscuridad. En la fotofosforilación se produce la oxidación de H_2O a O_2 con NADP^+ como aceptor electrónico fundamental y depende absolutamente de la energía de la luz.

A pesar de sus diferencias, estos dos procesos convertidores de la energía de gran eficiencia transcurren a través de mecanismos muy similares: 1) en ambos procesos interviene un flujo de electrones a través de una cadena de transportadores ligados a membrana; 2) la energía libre puesta a disposición por este flujo de electrones cuesta abajo (exergónico) esta acoplada al transporte cuesta arriba de protones a través de una membrana impermeable a los protones, conservándose la energía libre de oxidación de los combustibles metabólicos en forma de potencial electroquímico transmembrana; 3) el flujo transmembrana de protones a favor de su gradiente de concentración mediante canales proteicos específicos proporciona la energía libre para la síntesis de ATP, catalizada por un complejo proteico asociado a la membrana (la ATP sintasa) que acopla el flujo de protones a la fosforilación del ATP.

La mitocondria es el sitio celular donde se realiza la fosforilación oxidativa en los eucariotas. Las mitocondrias tienen dos membranas: la membrana mitocondrial externa (fácilmente permeable a pequeñas moléculas e iones, que se mueven libremente a través de canales transmembrana compuestos por una familia de proteínas integrales de membrana llamadas porinas), y la membrana interna (impermeable a la mayoría de moléculas pequeñas e iones, incluido el protón (H^+); las únicas especies que cruzan esta membrana lo hacen a través de transportadores específicos).

La matriz mitocondrial, el espacio acotado por la membrana interna, contiene el complejo de la piruvato deshidrogenasa y los enzimas del Ciclo de Krebs, de la ruta de la β -oxidación de los ácidos grasos y de las rutas de oxidación de los aminoácidos, es decir, todas las rutas de oxidación de combustibles excepto la glucólisis, que tiene lugar en el citosol. Mientras tanto, la membrana interna mitocondrial contiene los componentes de la cadena respiratoria y la ATP sintasa. Debido a que la membrana interna tiene una permeabilidad selectiva, separa los intermediarios y enzimas de las rutas metabólicas citosólicas de los de los procesos metabólicos que se producen en la matriz. Sin embargo, el piruvato, los ácidos grasos y los aminoácidos o sus derivados α -ceto son llevados por transportadores específicos a la matriz para poder acceder a la maquinaria del ciclo de Krebs. El ADP y el P_i son transportados específicamente al interior de la matriz al mismo tiempo que el recién sintetizado ATP es transportado al exterior.

La fosforilación oxidativa empieza con la entrada de electrones en la cadena respiratoria. La mayor parte de los cuales proviene de la acción de deshidrogenasas que captan electrones en vías catabólicas y los canalizan hacia aceptores universales de electrones: NAD^+ o NADP^+ o FMN o FAD. Posteriormente, una serie de transportadores electrónicos actúan secuencialmente, siendo la mayoría de ellos proteínas integrales con grupos prostéticos capaces de aceptar y ceder uno o dos electrones.

Hay tres tipos de transferencias electrónicas en la fosforilación oxidativa: 1) transferencia directa de electrones (Fe^{+3} a Fe^{+2}); 2) transferencia de un átomo de hidrogeno ($\text{H}^+ + e^-$) y 3) transferencia de un ion hidruro ($:\text{H}^-$) portador de dos electrones. Además del NAD y de las flavoproteínas, hay otros tres tipos de moléculas transportadoras de electrones que funcionan en la cadena respiratoria: una quinona hidrofóbica (ubiquinona) y dos tipos diferentes de proteínas con hierro (citocromos y proteínas ferro-sulfuradas).

Los transportadores de electrones de la cadena respiratoria están organizados en complejos supramoleculares anclados en membranas. Los Complejos I (NADH:ubiquinona oxidorreductasa o NADH deshidrogenasa) y II (succinato deshidrogenasa) catalizan la transferencia de electrones a la ubiquinona a partir de dos dadores electrónicos diferentes: NADH (Complejo I) y succinato (Complejo II). El Complejo III transporta electrones desde la ubiquinona reducida al citocromo c, y el Complejo IV completa la secuencia transfiriendo electrones desde el Citocromo c al O_2 .

Para el estudio de esta tesina nos centraremos en el análisis de los complejos III y IV.

El Complejo III (complejo citocromo bc_1 o ubiquinona:Citocromo c oxidorreductasa) acopla la transferencia de electrones desde el ubiquinol (QH_2) al Citocromo c con el transporte vectorial de protones de la matriz al espacio intermembrana. La unidad funcional del Complejo III es un dímero con las dos unidades monoméricas del citocromo b rodeando una caverna en el centro de la membrana, en la que la ubiquinona tiene libertad para moverse desde el lado de la matriz de la membrana al espacio intermembrana a medida que transfiere electrones y protones a través de la

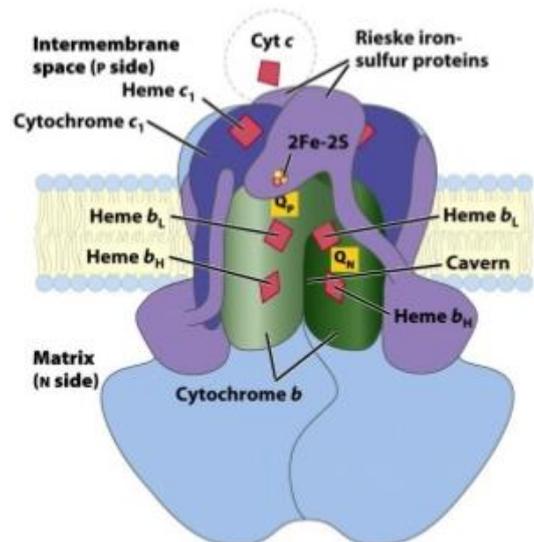
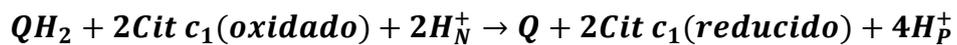


Figura 1.2: Complejo III [Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008)]

membrana mitocondrial interna, modelo de transferencia denominado ciclo Q. El ciclo Q adapta el cambio entre el transportador de dos electrones, la ubiquinona, y los transportadores de un electrón, los citocromos b_{562} , b_{566} , c_1 y c , y explica la estequiometría medida de cuatro protones translocados por cada par de electrones que pasan del Complejo III al citocromo c . Aunque la vía de los electrones por este segmento de la cadena respiratoria es complicada, el efecto neto de la transferencia es simple: QH_2 se oxida a Q , al tiempo que se reducen dos moléculas de citocromo c . El Citocromo c es una proteína soluble del espacio intermembrana. Después de que su único hemo acepte un electrón del Complejo III, el Citocromo c se desplaza hacia el Complejo IV para ceder el electrón a un centro de cobre binuclear.



La proteína Citocromo c oxidasa (CcO), también conocida como complejo IV de la cadena transportadora de electrones, es una proteína integral de membrana que funciona como proteína terminal de la cadena respiratoria aeróbica, la cual se encuentra acoplada con reacciones de transferencia electrónica y de traslocación protónica a través de la membrana mitocondrial [Babcock, G. T., & Wikström, M. (1992)].

La transferencia de electrones a través de la CcO se da desde una proteína soluble, el citocromo c , al centro binuclear de cobre Cu_A , el cual es el aceptor primario de la CcO, y de ahí al sitio activo catalítico donde el oxígeno se reduce a agua. Por cada cuatro electrones que pasan a través del complejo, la enzima consume cuatro sustratos de la matriz, convirtiendo el O_2 en $2\ H_2O$ [Ramirez, B. E., Malmström, B. G., Winkler, J. R., & Gray, H. B. (1995)].

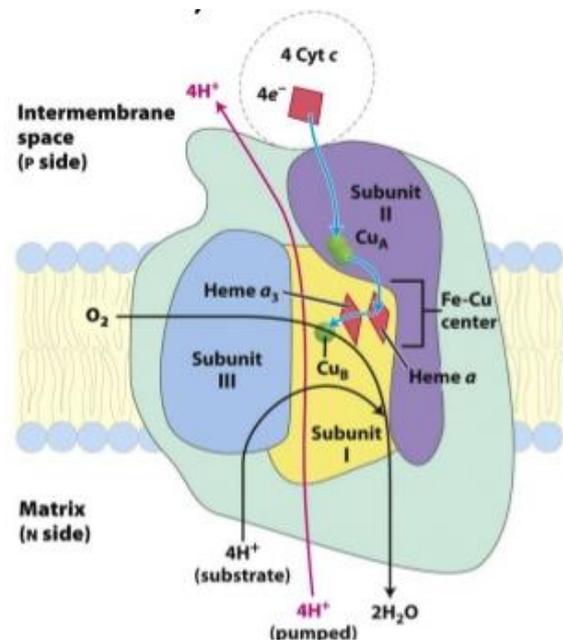


Figura 1.3: Complejo IV [Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008)]

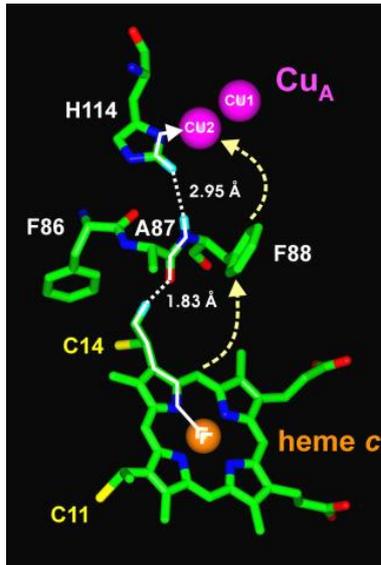
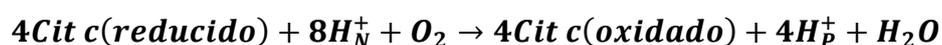


Figura 1.4: Modelo de la transferencia de carga Citocromo c y la CcO de *T. thermophilus* basado en la mayor estructura energética [Muresanu, L., Pristovsek, P., L. hr, F., Maneg, O., Mukrasch, M. D., R. terjans, H., ... & L. cke, C. (2006)].

La energía desprendida por la reacción redox que tiene lugar en el sitio activo ayuda al bombeo de protones hacia el espacio intermembrana por cada electrón que pasa, añadiéndose al potencial electroquímico producido por el transporte del protón impulsado por el potencial redox a través de los Complejos I y III. El gradiente electroquímico generado por el movimiento de protones genera síntesis de ATP a partir de ADP y Pi mediante la acción catalítica de la enzima ATP sintasa [Richter, O. M., & Ludwig, B. (2003)].

A pesar de contar con un vasto conocimiento estructural de la CcO, el mecanismo molecular de la translocación de protones, y particularmente la naturaleza del acoplamiento entre los pasos redox y la bomba de protones aún se desconoce [Richter, O. M., & Ludwig, B. (2003)].

La reacción global catalizada por la CcO es una reducción del O₂ donde por cuatro electrones intervienen centros redox que transportan un único electrón al mismo tiempo, y se ha de dar sin la liberación de los intermedios incompletamente reducidos tales como el peróxido de hidrógeno o los radicales hidroxilo libres, especies muy reactivas que dañarían los componentes celulares. Los intermedios se mantienen fuertemente unidos al complejo hasta que se convierten completamente en agua.



Los citocromos son proteínas que presentan una absorción de la luz visible característica, la cual se debe a la presencia del grupo prostético hemo que contiene hierro. Las mitocondrias contienen tres clases de citocromos que se distinguen por diferencias en su espectro de absorción de la luz y que se designan a, b y c. Cada tipo de citocromo en su estado reducido (Fe^{+2}) tiene tres bandas de absorción en el espectro visible. La banda de longitud de onda más larga está cerca de 600 nm en los citocromos del tipo a, cerca de 560 nm en los del tipo b y cerca de 550 nm en los del tipo c [Dixon, M., Hill, R., & Keilin, D. (1931)]. Los grupos hemo de los citocromos del tipo c están unidos de forma covalente a través de residuos Cys. El Citocromo c de la mitocondria es una proteína soluble que se asocia mediante interacciones electrostáticas con la parte exterior de la membrana mitocondrial interna.

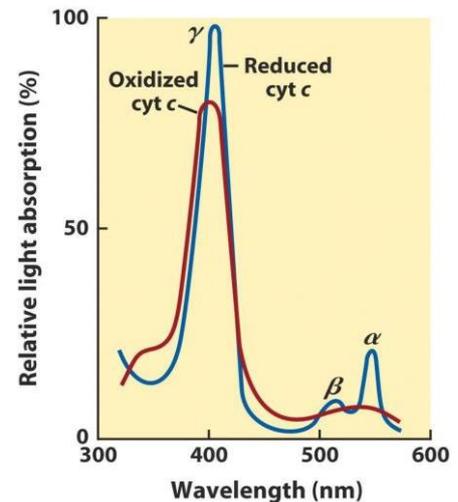


Figura 1.5: Espectro de absorción de Citocromo c [Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2008)]

Una de las limitaciones del trabajo con el Citocromo c consiste en su estructura de dicha proteína consiste en estructuras relativamente irregulares, lo que hace que pueda formar diferentes estructuras a medida que el sitio redox activo sufre modificaciones químicas y se mueve a varias posiciones diferentes a lo largo de la superficie de la proteína [Mauk, A. G. (1999)].

1.3 COMPLEJOS

Los complejos de metales de transición comprenden un campo interesante y ampliamente extendido para estudios de transferencia de electrones, conversión de energía solar y catálisis, además de posibles aplicaciones como sensores luminiscentes y materiales moleculares para dispositivos ópticos. Particularmente, complejos de metales de transición luminiscentes de Re(I) y Ru(II) con ligandos cromóforos polipiridílicos han demostrado tener un comportamiento rico en sus estados excitados y en su química redox, así como también en su estabilidad térmica y fotoquímica [Kumar, A., Sun, S. S., & Lees, A. J. (2009)]. Además, también son usados como marcadores

biológicos y como sondas no covalentes para iones y biomoléculas [Louie, M. W., Fong, T. T. H., & Lo, K. K. W. (2011)].

La ventaja del uso de estos complejos radica en que exhiben una luminiscencia fuerte en la región del espectro visible, sus propiedades se pueden modificar de acuerdo a las necesidades específicas, y son relativamente estables frente a la fotodescomposición, En cada caso, la coordinación de un ligando orgánico con un metal introduce nuevas transiciones electrónicas como transferencia de carga metal-a-ligando (metal-to-ligand charge transfers MLCTs), cuyos estados excitados muestran un marcado efecto metálico, con un rendimiento cuántico de entrecruzamiento de sistemas unitario [Ragone, F., Gara, P. D., Einschlag, F. S. G., Lappin, A. G., Ferraudi, G. J., Wolcan, E., & Ruiz, G. T. (2018)]. La emisión de los complejos usualmente se origina a partir de estos estados excitados tripletes MLCTs, y además depende de la naturaleza del ambiente y son influenciados por el solvente, la temperatura y el pH [Sun, S. S., & Lees, A. J. (2002)].

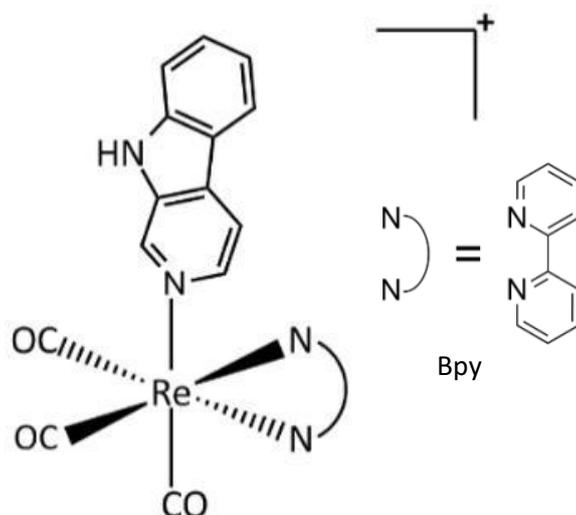


Figura 1.6: Estructura del complejo de Re utilizado [Maisuls, I., Cabrerizo, F. M., David-Gara, P. M., Epe, B., & Ruiz, G. T. (2018)].

Los espectros de absorción de los complejos están caracterizados por una transición electrónica intraligando de alta energía ($\pi \rightarrow \pi^*$) (metal y piridina) y una transición electrónica de transferencia de carga de metal-a-ligando de más baja energía ($d\pi(\text{Re}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$), las cuales presentan un pico de absorción entre 250-320 y 340-390 nm respectivamente [Louie, M. W., Fong, T. T. H., & Lo, K. K. W. (2011)].

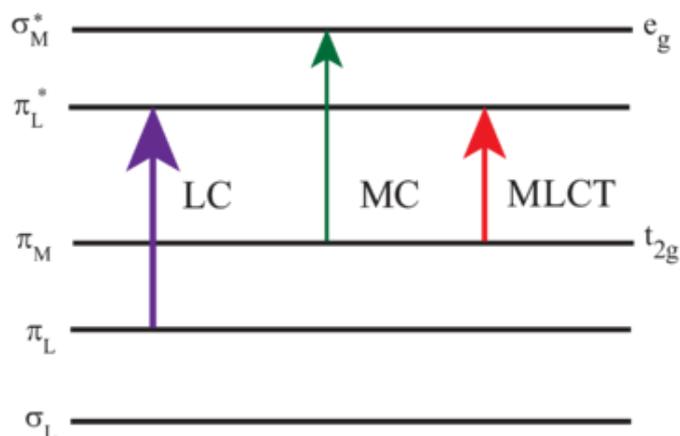


Figura 1.7: Diagrama de los niveles de energía del complejo de Re.

Los complejos de Re en estado de oxidación 1+ presentan una configuración electrónica en la cual los orbitales 5d poseen 6 electrones. En general, los complejos de metales de transición d^6 que poseen en su esfera de coordinación ligandos polipiridínicos, presentan estados excitados que se asemejan mucho a los observados para el $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$.

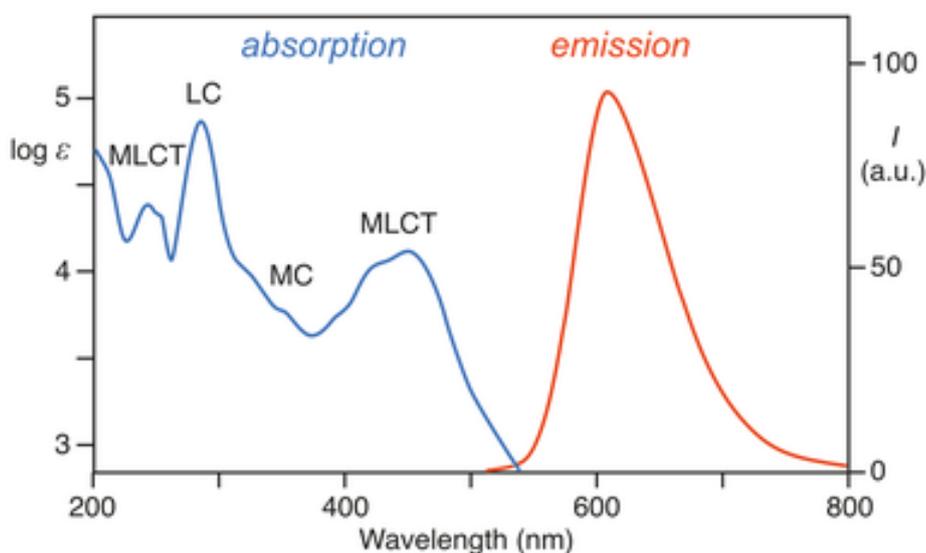


Figura 1.8: Espectro de absorción-emisión del complejo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$.

Los complejos de Ru(II) permiten estudiar la transferencia de carga, ya que puede ser fotoexcitado a un estado de transferencia de carga metal-a-ligando $\text{Ru}(\text{II}^*)$, que es un agente reductor más fuerte, y puede transferir un electrón al centro redox de una proteína en una escala de los nanosegundos [Pan, L. P., Hibdon, S., Liu, R. Q., Durham, B., & Millett, F. (1993)]. Además, el complejo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ tiene una luminiscencia con un

rendimiento cuántico bajo, del orden de 0,4 en agua y en aire. Se utiliza como estándar para determinar rendimientos cuánticos de emisión de manera relativa. Dicho rendimiento cuántico probablemente es debido al estado excitado tripletes de MLCT completo con eficiencia unitaria [Wang, X. Y., Del Guerso, A., & Schmehl, R. H. (2004)].

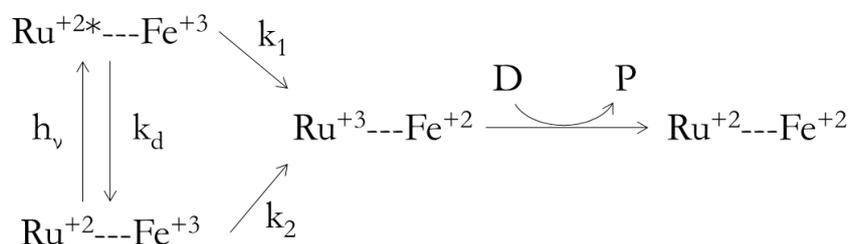


Figura 1.9: Esquema de la transferencia de carga entre $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ y el grupo férrico hemo del Citocromo c [Pan, L. P., Hibdon, S., Liu, R. Q., Durham, B., & Millett, F. (1993)].

Generalmente, puede considerarse que las moléculas del complejo en su estado basal presentan una distribución electrónica en donde todos sus electrones se encuentran apareados, es decir, son de naturaleza singletes (la multiplicidad global de la molécula es igual a 1). Una transición a un estado triplete, estado en la cual el electrón promovido sufrió un cambio de spin, es prohibida por spin y por lo tanto existirá una baja probabilidad de poblar ese estado desde uno basal singlete.

Los compuestos basados en $\text{Re}(\text{I})$ y $\text{Ru}(\text{II})$, por lo tanto, ofrecen algunas ventajas en la elucidación de varias propiedades de los estados excitados de los complejos organometálicos, así como también en análisis fotoquímicos de transferencias de carga.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

El **objetivo principal** de este plan de trabajo es la formación en el área de la fotobiología y la fotofísica, adquiriendo conocimientos experimentales en diferentes técnicas fotónicas, en el manejo de láseres y el desarrollo de experiencia en el laboratorio. Para lograrlo se plantó el inicio del entrenamiento en cuestiones básicas del laboratorio como son las normas de seguridad, el manejo de diferentes equipos y la planificación, toma de muestras, medidas experimentales, su posterior análisis y discusión, y finalmente la escritura y presentación de los resultados y conclusiones del trabajo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Durante el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1: Caracterizar la cinética y termodinámica de la transferencia de carga metal-ligando en compuestos de coordinación en solución, utilizando técnicas fotoacústicas, fotólisis de destello, luminiscencia resuelta en tiempo y espectroscopías inducidas por láser.

Objetivo 2: Caracterizar la cinética y termodinámica en procesos fotoinducidos de transferencia de carga entre proteínas y complejos en solución. En particular los procesos que tienen lugar entre centros metálicos de proteínas de interés biológico, como los citocromos y donores de electrones (los complejos de Ru(II) o Re(I)) asociados a la proteína en diferentes posiciones a lo largo de la cadena peptídica.

Objetivo 3: Identificar los cambios estructurales y energéticos generados a partir de procesos fotoinducidos de transferencia de carga entre proteínas pertenecientes a la cadena transportadora de electrones en las células. Se estudiarán el Citocromo c y el dominio Cu_A soluble de la subunidad II de la Citocromo c Oxidasa.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE TRABAJO

El desarrollo del presente trabajo se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Ópticas (CIOp). El establecimiento cuenta con las instalaciones, el equipamiento y los recursos necesarios para el desarrollo de las prácticas correspondientes en las condiciones adecuadas.

3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

A fin de lograr los objetivos propuestos se realizaron las siguientes actividades:

- A. Búsqueda de nuevas referencias bibliográficas. Curso de seguridad para el manejo de láseres.
- B. Caracterización fotofísica de compuestos de coordinación: Se emplearon diferentes técnicas espectroscópicas para la caracterización de los complejos metálicos en solución.
- C. Estudio de los procesos fotoinducidos de transferencia de carga entre proteínas y complejos metálicos donores de carga: Se analizaron los procesos de transferencia de carga inducidos por láser en soluciones acuosas de Citocromo c en presencia de los complejos metálicos previamente estudiados (Re(I) y Ru(II)), con el fin de obtener información cinética y termodinámica de estos procesos. Además, se analizaron los procesos de transferencia de carga entre Citocromo c y la subunidad Cu_A de la Citocromo c Oxidasa.

3.3 REACTIVOS Y MUESTRAS

Todas las muestras que se utilizaron para la realización de la presente tesina se prepararon en función del valor de absorbancia deseado a la longitud de onda definida para su estudio.

3.3.1 Preparación del agua bidestilada

El agua destilada de tipo I que se empleó como solvente para la preparación de todas las soluciones utilizadas en el presente trabajo se filtró mediante un sistema Millipore (resistividad $>18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$, $< 20 \text{ ppb}$ de carbono orgánico).

3.3.2 Preparación del buffer fosfato

Para poder trabajar con la proteína en suspensión, se preparó una solución buffer fosfato 0,1M. El ácido fosfórico es un ácido es un ácido triprótico, por lo que presenta varias constantes de disociación a diversos pHs, lo que le confiere propiedades amortiguadoras. Además, como el sistema de buffer fosfato tiene un pKa cercano a 7, es elegido muchas veces para preparaciones de soluciones biológicas.

Para preparar el buffer fosfato, se mezclaron cantidades predefinidas de fosfatos mono y dibásicos (1,0203 gr de KH_2PO_4 con 0,8725 gr de K_2HPO_4), ajustando el volumen final a 250 ml de agua bidestilada. Las masas de los compuestos utilizados fueron pesadas utilizando una balanza analítica RADWAG AS220.R2 PLUS 220g/0.1mg. Para el ajuste final del pH del buffer se utilizaron soluciones de HCl y NaOH concentrados (aprox 1M). El medidor de pH utilizado fue un OAKTON WD-35801-00. El pH final de la solución del buffer fosfato fue de $7,00 \pm 0,2$.

El buffer preparado también se utilizó como blanco para calibrar la medida de la absorbancia de las muestras y eliminar el aporte del solvente al obtener los valores del espectrofotómetro.

3.3.3 Preparación de las referencias

Debido a que las soluciones que fueron utilizadas para la realización de la tesina se usaron de manera recurrente, se preparó desde el inicio una solución stock a alta concentración para poder utilizarlas para todos los experimentos. Para ello se preparó 10 ml de cada solución de referencia, ajustando la concentración aproximadamente a un valor de 0,6Abs de las muestras para el pico característico de cada una. Para preparar las referencias se utilizó como solvente el buffer fosfato preparado y sólidos de New Coccine (NC) e Índigo Carmín (IC).



Figura 3.1: New Coccine e Índigo Carmín en cubetas de cuarzo previo a realizar la medida espectrofotométrica.

El intervalo de longitud de onda de corrida para la medida de la absorbancia de las referencias fue de 1100-200nm y se utilizó agua mili-Q como blanco. Luego de la adición del sólido al buffer fosfato se sonicaron las 2 soluciones para favorecer la disolución del colorante.

Luego de ser utilizados, el buffer fosfato se mantiene conservado en heladera y las referencias se colocan en un frasco color caramelo a temperatura ambiente.

Para la completa disolución de la referencia previo a la medida de la absorbancia por métodos espectrofotométricos, se sonicaron por al menos 20 minutos en un baño termostático. Este se llevó a cabo observando la absorbancia obtenida luego de 15 minutos de sonicado y después cada 5 minutos.

3.3.4 Preparación del stock de proteína

Para poder trabajar con la proteína en suspensión, se preparó una solución stock utilizando polvo liofilizado de Citocromo c marca Sigma Aldrich. Se quería lograr una absorbancia entre 1-1,5 considerando que el pico de absorción del Citocromo c es a 410nm [Dixon, M., Hill, R., & Keilin, D. (1931)], para lo cual se fue adicionando una pequeña cantidad de polvo liofilizado al buffer fosfato hasta que se llegó a 1,108Abs. La solución stock obtenida fue guardada en la heladera, en un matraz aforado.

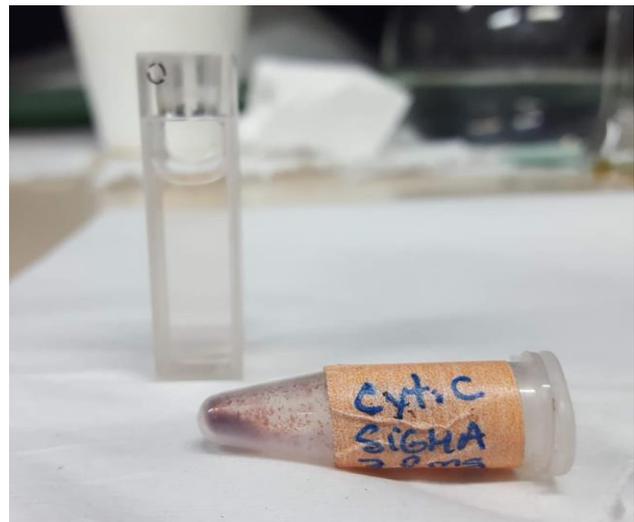


Figura 3.3: Solución de Citocromo c.

Para la preparación del stock de Citocromo c oxidasa se realizó un procedimiento similar.

Para la completa disolución de todas las muestras previo a la medida de la absorbancia por métodos espectrofotométricos, se sonicaron por 30 minutos.

3.3.5 Preparación de la solución de complejos

Para preparar las soluciones de los complejos se utilizó como solvente el buffer fosfato preparado y sólidos de los complejos de Ru(II) y Re(I). Sin embargo, si bien en un primer momento se realizaron medidas experimentales tanto con $[\text{Re}(\text{bpy})(\text{CO})_3(\text{nHo})]^+$ [Maisuls, I., Cabrerizo, F. M., David-Gara, P. M., Epe, B., & Ruiz, G. T. (2018)] como con $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ (donde bpy = 4,4'-bipiridina), finalmente se resolvió utilizar $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ como complejo donador de electrones [Natali, M., Campagna, S., & Scandola, F. (2014)]. Esto se decidió en base a su capacidad de asociación a diferentes posiciones a lo largo de la cadena peptídica del Citocromo c y a su disponibilidad en el laboratorio.

Para el caso del complejo también se realizó una solución stock y, considerando que $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ es un complejo de rutenio el cual posee un pico de absorbancia aproximadamente a 300 nm debido a que presenta una transición d-d entre los orbitales del rutenio, su medida se realizó a 355 nm. Como ya se explicó anteriormente, la muestra de complejo en buffer fosfato se sonicó hasta llegar a un valor de absorbancia estable, el cual se obtuvo luego de 35 minutos y fue de 0,380 Abs.

3.3.6 Preparación de la solución de proteína y complejo de Ru(II)

La solución de proteína con $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ es la única que debe prepararse inmediatamente antes de usar para reducir la posibilidad de que se den otros fenómenos relacionados a la reacción entre complejo y proteína, por lo que no puede prepararse un stock. Para aumentar la probabilidad de que la mayor cantidad de proteínas se encuentren unidas al complejo se colocó una menor cantidad de proteína que la necesaria.

Sabiendo que la celda posee un volumen final de 2 ml, se ajustó la absorbancia de forma tal que el complejo se encuentre a una concentración similar a la definida (aproximadamente 0,2-0,15-0,1).

3.4 TÉCNICAS EMPLEADAS

Para la realización de esta tesis se utilizaron diversos equipos ópticos, tales como láseres, detectores fotoacústicos, detector de oxígeno singlete, espectrofotómetros UV-Visible, espectrofluorómetro, y otros dispositivos ópticos.

3.4.1 Espectroscopía de absorción UV-visible y espectrofluorimetría

3.4.1.1 Espectroscopía

Para poder comparar la forma en la que las soluciones utilizadas reaccionan ante el mismo estímulo lumínico se decidió normalizar la absorción de la luz de la muestra mediante el uso de un espectrofotómetro.

En el espectrofotómetro hay una fuente de luz que emite en un amplio espectro, la cual incide sobre un monocromador que permite la selección y transmisión del haz a una longitud de onda determinada. Luego, la luz proveniente del monocromador pasa a través de la muestra situada en una cubeta de cuarzo de paso óptico l , donde es absorbida por la muestra de manera proporcional a la concentración de la especie absorbente dentro de la muestra. Luego de pasar por la muestra, el haz continúa por el camino óptico y llega finalmente al detector, el cual presentará el valor de la medida de la intensidad de la luz transmitida.

La ley de Lambert-Beer es una relación empírica de la fracción de luz incidente absorbida por la muestra a una determinada longitud de onda, del espesor de la muestra (paso óptico) y de la concentración de la muestra absorbente. Considerando I_0 como la intensidad de la luz incidente, I como la intensidad de la luz transmitida, la razón I/I_0 como la transmitancia, ϵ como el coeficiente de absorción molar, C como la concentración de la especie absorbente y l como paso óptico de la muestra que absorbe la luz, la ley de Lambert-Beer se puede expresar como:

$$\log \frac{I}{I_0} = A = \epsilon Cl$$

El coeficiente de absorción ϵ molar depende de varios factores, ya que varía con la naturaleza del compuesto absorbente, del solvente, de la longitud de onda, y también

con los puentes de hidrógeno presentes si la especie absorbente está en equilibrio con un estado de ionización que tiene diferentes propiedades de absorbancia.

La ley de Lambert-Beer supone que la luz que incide sobre la muestra es paralela y monocromática (es decir, de una sola longitud de onda) y que las moléculas de solvente y de soluto están orientadas al azar. La expresión $\log(I/I_0)$ es la absorbancia, designada como A , y es, considerando la ecuación de la ley de Lambert-Beer, directamente proporcional a la concentración del soluto absorbente.

Para poder obtener los espectros de las referencias y las muestras se ajustó la longitud de onda en un rango entre 1100 y 200nm, y se tomó el valor de absorbancia de ambas a 355 nm y 532 nm. Para realizar dichas medidas con el láser, se cambian los dobladores (o generadores de armónicos) manualmente.

Las medidas de absorbancia se realizaron con un espectrofotómetro UV-Vis UV-1650PC Shimadzu, y las celdas utilizadas fueron de cuarzo de 1.0 cm de camino óptico.



Figura 3.4: Posición de las celdas de muestra y blanco.

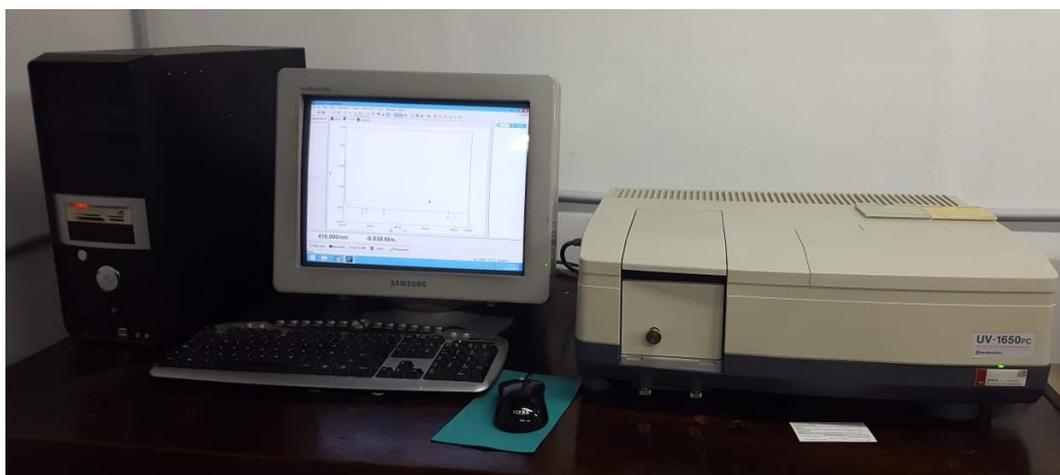


Figura 3.5: Espectrofotómetro UV-Vis UV-1650PC Shimadzu utilizado.

3.4.1.2 Espectrofluorimetría

La espectrometría de fluorescencia es un tipo de espectroscopía electromagnética que analiza la emisión de una muestra. Cuando una sustancia química absorbe un tipo de radiación, sus electrones pasan de un estado basal a un estado electrónico excitado. Al absorber, muchas sustancias disipan el exceso de energía en forma de calor, sin embargo, solo un grupo de especies pierde una cantidad del exceso de energía en forma de calor, y emite la energía restante en forma de radiación electromagnética de mayor longitud de onda que la absorbida. En este caso se utiliza un haz de luz, por lo general luz UV, que excita los electrones de las moléculas de ciertos compuestos y provoca que emitan luz de una menor energía, generalmente luz visible. La emisión de fluorescencia tiene lugar en nanosegundos y durante este período de tiempo suceden numerosos procesos moleculares (interacciones proteína-ligando, desplazamiento de biomoléculas, fenómenos de hidratación, etc.) que pueden inducir modificaciones en alguna de las propiedades de los compuestos fluorescentes (espectros, vidas medias, rendimiento cuántico, anisotropía de fluorescencia, etc.). Estas modificaciones pueden ser medidas dando información sobre dichos procesos moleculares.

De la misma forma que sucede con el espectrofotómetro, las medidas del espectrofluorómetro RF-5301PC Shimadzu pueden iniciarse luego de que el equipo realizó todos los chequeos necesarios.



Figura 3.6: Espectrofluorómetro RF-5301PC Shimadzu utilizado.

El equipo cuenta con un monocromador de excitación que permite seleccionar una determinada longitud de onda de la fuente de Xe. El haz resultante se focaliza sobre la cubeta. La emisión de la muestra se detecta a 90° con respecto al haz de excitación para evitar interferencias por efecto de la luz dispersada. El espectro de emisión se obtiene

por barrido de un segundo monocromador (de emisión). El detector es un tubo fotomultiplicador R928 sensible al rojo. Las rendijas de excitación y emisión se ajustaron a un paso de banda de 5 y 1,5 nm. El ancho de rendija es un condicionante de la cantidad de luz emitida por el equipo, la cual influye en la emisión o fluorescencia. El espectrofotómetro registra los espectros en unidades arbitrarias (UA) con un máximo de emisión de 1000 UA. La celda utilizada en este caso fue de cuarzo de 1.0 cm de camino óptico con las 4 caras transparentes.

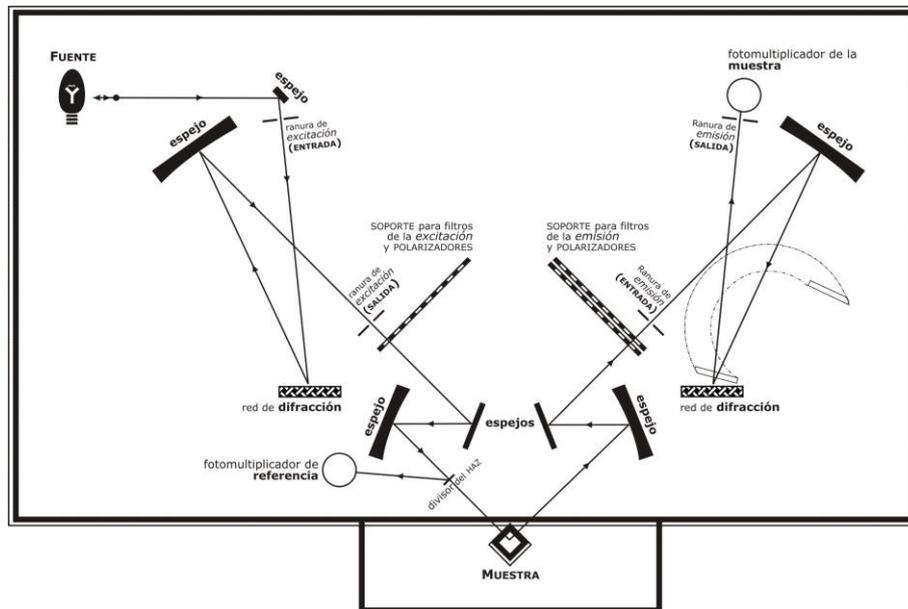


Figura 3.7: Diagrama esquemático del sistema óptico del espectrofluorómetro utilizado para la obtención de las matrices de excitación - emisión de fluorescencia.

3.4.2 Obtención de la proteína recombinante Citocromo c Oxidasa

La obtención de la Citocromo c Oxidasa se realizó en Rosario, por el equipo de trabajo de Vila y Abriata, utilizando el método de clonado de expresión.

El procedimiento del clonado de un clonado de expresión consta de dos partes. En un primer momento se realiza un clonado del gen de interés para poder obtenerlo, para finalmente clonar el fragmento de interés a un vector de expresión que permitirá la producción de las proteínas recombinantes usando maquinaria bacteriana.

La porción soluble Cu_A de la Citocromo c oxidasa fue amplificada a partir de DNA genómico de *T. thermophilus* utilizando protocolos estándar de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El fragmento wild-type fue truncado del constructo original (T0) que corresponde al dominio Cu_A más proteolizado. El DNA obtenido a partir de la biblioteca

genómica contiene un truncamiento de 10 aminoácidos en comparación con el fragmento original (T10). Para realizar el clonado por expresión se diseñan los primers con las secuencias de corte de *NdeI* (sitio ATG más cercano del RBS) y *BamHI*, enzimas de restricción que permiten eliminar secuencias no necesarias, dejando una proteína más pura. El fragmento Cu_A de la ba3 oxidasa de *Thermus thermophilus* obtenido durante el clonado, se expresó en el plásmido de expresión pET9ACuAWTT9 (KanR) en una cepa de expresión *E. coli* BL21(DE3), las que se pusieron a crecer en medio rico LB en presencia de Kanamicina para generar una presión de selección. La obtención del mutante fue verificada mediante secuenciamiento del DNA, utilizando ABI Prism 3700 DNA Analyzer and 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) en el DNA Sequencing Core Laboratory del California Institute of Technology. Ambas hebras del gen (obtenidas a partir de los primers forward y reverse) se secuenciaron utilizando los sitios de restricción para verificar que no se hayan incorporado mutaciones secundarias al clon seleccionado [Fernández, C. O., Cricco, J. A., Slutter, C. E., Richards, J. H., Gray, H. B., & Vila, A. J. (2001)].



Figura 3.8: Modelo estructural del complejo entre el Citocromo c y la CcO de *T. thermophilus* [Muresanu, L., Pristovsek, P., L hr, F., Maneg, O., Mukrasch, M. D., R terjans, H., ... & L cke, C. (2006)].

La elección del sistema de expresión depende del tamaño y la cantidad de proteína a clonar. En el caso de *E. coli*, la cepa se utiliza cuando no importan las modificaciones post-traduccionales de las proteínas, aunque favorece la formación de cuerpos de inclusión. La elección de las cepas receptoras de *E. coli* como modelo se basa en la habilidad de la cepa de crecer en un medio químico definido y su rápida tasa de crecimiento (su duplicación se lleva a cabo cada 20-30 min). Las cepas usadas para clonado generalmente con $hsdR^-$ o $hsdS^-$; además deberá ser $recA^-$ para evitar rearrreglos posteriores a la transformación mediante recombinación, lo que aumentaría la cantidad de monómeros y estabilizaría plásmidos con secuencias repetitivas disminuyendo la cantidad de plásmidos con la estructura deseada. Las proteasas del huésped pueden interferir con el aislamiento de proteínas recombinantes intactas lisándolas, por lo que se usan huéspedes deficientes en proteasas, y además debe tener suprimida la síntesis de proteínas endógenas. Finalmente, la cepa deberá ser sensible al antibiótico del plásmido para que puedan seleccionarse las cepas que incorporaron el plásmido en cuestión, ya que los plásmidos no son estables en ausencia de una presión de selección. Deberá expresar la T7 RNA pol.

La cepa de *E. coli* BL21(DE3) presenta un gen que codifica a la RNA pol del fago T7 bajo el control de un promotor inducible por IPTG. Lo que permite que luego de la obtención de la cepa de expresión con el fragmento de interés se realiza un ensayo de expresión a mini-escala. En primer lugar, se cultiva la cepa en un medio rico, y se induce la expresión de la proteína con IPTG, análogo no metabolizable de la glucosa, y se realiza un SDS-PAGE donde se pone en contacto la solución de proteínas con SDS (detergente desnaturizante que elimina la conformación tridimensional de las mismas, y hace que las proteínas migren en el gel en relación a su tamaño), se siembra un marcador de PM, proteína sin IPTG y con IPTG. Finalmente se verifica la obtención de la proteína.

El plegado correcto de la proteína obtenida luego del clonado de expresión afectará directamente su solubilidad. La purificación de las proteínas de los lisados celulares se realizó resuspendiendo el pellet de 1 litro de cultivo en 25 mL de 50mM Tris-HCl, pH 8,0, 4 mg/ml de lisozima, 40 unidades/ml de DNasa I, 3 unidades/ml de RNasa A y 0,1% de Triton X-100. Para inhibir la proteólisis se agregaron 2mM de PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), y se incubó el extracto a 30°C por al menos 30 minutos. Finalmente, se separaron los desechos celulares del extracto proteico mediante centrifugaciones secuenciales, el sobrenadante se colocó en una columna de flujo por gravedad CM-

Sepharose, y las fracciones de interés fueron dializadas y posteriormente liofilizadas. Entre los pasos de centrifugación, el pH de la solución fue monitoreado y corregido, se agregaron 15 μL / mL de una solución de Cu(II)(His)_2 100 mM para formar el sitio Cu_A de la CcO , y además se realizó un tratamiento térmico a 65°C por 10 minutos para ayudar a la precipitación de los restos celulares no deseados [Slutter, C. E., Sanders, D., Wittung, P., Malmström, B. G., Aasa, R., Richards, J. H., ... & Fee, J. A. (1996). Water-soluble, recombinant Cu_A -domain of the cytochrome ba_3 subunit II from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry*, 35(11), 3387-3395]. Los rendimientos generales obtenidos fueron de 13 mg/L.

3.4.3 Métodos fototérmicos

Los métodos fototérmicos están representados por un grupo de métodos de alta sensibilidad, originalmente utilizados para medir absorción óptica, pero con el potencial de dar acceso a una gran variedad de estudios termodinámicos y cinéticos analizando los eventos inducidos en una muestra por absorción de luz.

Por lo tanto, los métodos fototérmicos son usados para cuantificar parámetros termodinámicos y constantes de velocidad de reacciones inducidas por luz, parámetros que no pueden obtenerse solamente usando otros métodos espectroscópicos. Es debido a esto que los métodos fototérmicos son esenciales para completar el entendimiento de los mecanismos de redistribución energética entre reacciones fotoinducidas.

Entre los métodos fototérmicos más utilizados se destacan: laser induced optoacoustic spectroscopy, thermal lensing, photothermal beam deflection, thermal grating, etc. Este tipo de técnicas, implementadas en el CIOp en los últimos años, serán básicamente con las que se trabajará en este proyecto.

La sensibilidad de estos métodos permite detectar cambios en el índice de refracción debido a cambios en la densidad (resultante del cambio de volumen), en la absorbancia (mediante la relación de Kramers-Kronig) y en la temperatura. Cuando la luz es absorbida y subsecuentemente disipada como calor sin otros efectos (volumen estructural y cambios en el índice de refracción debidos a la absorbancia transitoria), la muestra se calienta. Este calentamiento lleva a cambios en la temperatura y en los parámetros termolásticos de la muestra que están relacionados a la temperatura. Considerando esto, la base para todos los métodos fototérmicos espectroscópicos reside en la medida de

parámetros como la temperatura, la presión o los cambios de densidad que ocurren debido a cambios en la absorción.

Existen otro tipo de señales, que no tienen un origen térmico, y que están superpuestas en las que generan cambios entálpicos, los que aumentan el grado de complejidad del análisis.

La determinación fotoacústica del cambio de volumen en el tiempo durante reacciones fotoinducidas genera una onda de presión, produciendo cambios térmicos o estructurales, la cual permite “escuchar” el movimiento proteico, aun cuando dicho movimiento se realiza en escalas de tiempos muy cortos. Como se dijo anteriormente, estos cambios volumétricos pueden ser de origen térmico o no térmico [Gensch, T., & Viappiani, C. (2003)].

Los métodos fototérmicos utilizan principalmente fuentes de luz láser. La pureza de alto espectro y potencia, como también el perfil espacial del haz, permiten obtener señales más altas que con fuentes convencionales de luz. Además, el corto tiempo de duración de los pulsos de luz láser permite la resolución en el tiempo en escala de nanosegundos.

Para la realización del presente trabajo se utilizó la técnica de espectroscopía optoacústica (o fotoacústica) inducida por láser LIOAS (laser-induced, time-resolved optoacoustic spectroscopy). Esta técnica permite el monitoreo de los cambios de presión inducidos en una muestra líquida luego de la excitación con un pulso láser.

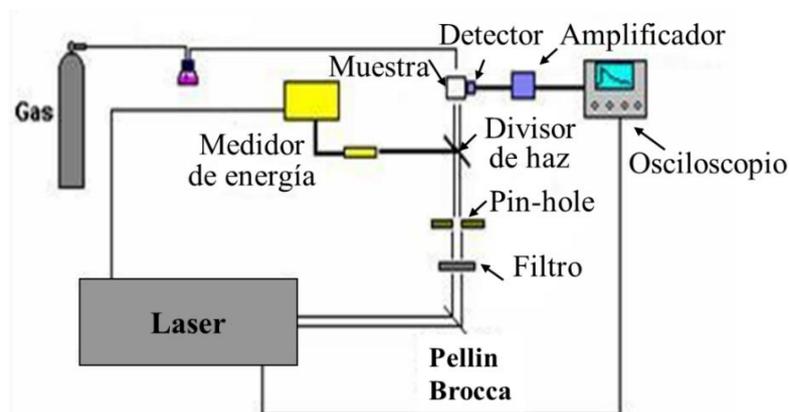


Figura 3.9: Configuración experimental para llevar a cabo la técnica LIOAS.

3.4.3.1 Disposición de los equipos

Un equipo de fotoacústica (o LIOAS) convencional para realizar un análisis fotoquímico de una muestra consta de tres partes principales: un arreglo experimental para producir un corto e intenso pulso de luz, un reactor o celda de reacción y un sistema de detección.

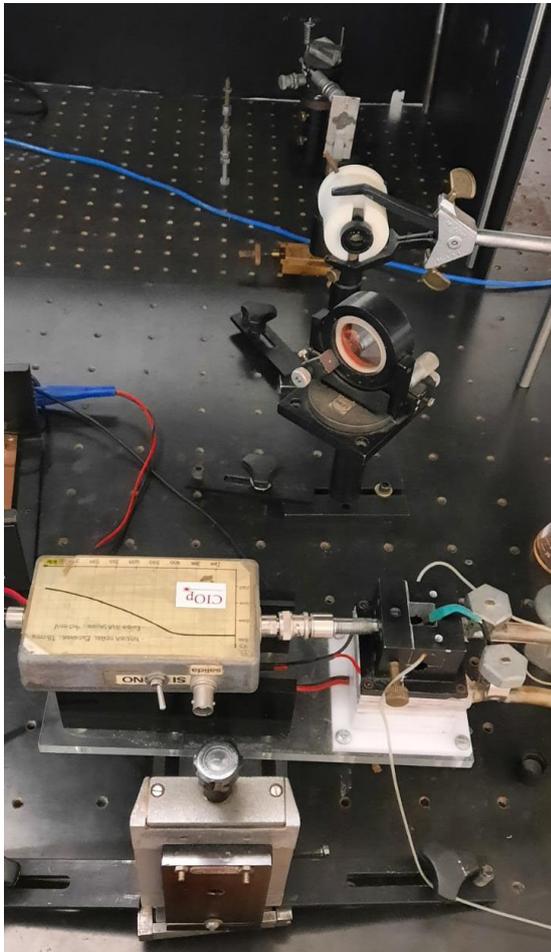


Figura 3.10: Camino óptico con sus componentes.

Para poder dirigir el haz de luz que sale del láser se utilizaron diversos instrumentos ópticos como un prisma de Pellin Broca, un pinhole, un polarizador, un divisor de haz. En el caso del presente trabajo, se utilizó un prisma de Pellin Broca que cumplió varias funciones: por un lado, permitió el ajuste de la altura del haz, rotando el plano de polarización en 90° , y de esta forma haciéndolo paralelo a la mesa óptica, y por otro permitió la separación de los distintos armónicos para que incidiera sobre la muestra el armónico de interés. El pinhole consiste en una placa metálica de hierro con una apertura circular de 1mm de diámetro, lo que permitió que la zona irradiada en la celda sea de un área determinada. El rol del polarizador en el camino óptico del haz consistió en posibilitar la variación de la potencia del haz por atenuación frente a unas mismas condiciones experimentales de potencia de salida del láser y temperatura.

Para el análisis realizado en la presente tesina, la fuente de excitación fue el segundo y tercer pulso armónico (532 nm y 355 nm respectivamente) de un láser Q-switched Nd:YAG (Surelite II, Continuum, 7 ns ancho completo a la mitad del pulso). La cubeta se colocó en un soporte con control de temperatura integrado (con una sensibilidad de $\pm 0.05^{\circ}\text{C}$).

Para controlar el funcionamiento del láser resulta conveniente disponer de sistemas para monitorear en forma permanente la emisión de la salida, como un detector de potencia

que entregue un valor de energía irradiada. En el caso del presente trabajo consistió en un radiómetro.

El sistema de detección de la señal fotoacústica consistió en un transductor piezoeléctrico de cerámica de 4 mm de grosor por 4 mm de diámetro, dentro de un dedo de acero inoxidable desarrollado en el instituto, el cual se situó en contacto con la cubeta en una pared perpendicular a la dirección del haz del láser que incide sobre la muestra. Las señales acústicas detectadas fueron aumentadas con un amplificador casero, el cual aumenta la señal del piezoeléctrico con una señal máxima a la entrada de 18mV y una de salida de 40mV, y procesadas por un osciloscopio digital Tektronix TDS 3032, el cual permitió monitorear la evolución en el tiempo de la presión del pulso. La señal eléctrica proveniente del detector es digitalizada por el osciloscopio y, mediante el programa OpenChoice Desktop, pudieron adquirirse tanto la forma de la curva como los datos de la misma.



Figura 3.11: Osciloscopio Tektronix TDS 3032.

Para mejorar la detección de la señal acústica obtenida se colocó vaselina en la punta del micrófono, lugar donde se pone en contacto con la muestra.



Figura 3.12: Radiómetro Rm-6600

En última instancia, el divisor de haz permitió desdoblar el haz en dos para que uno de ellos incida sobre la muestra y el otro sobre un detector conectado a un Radiómetro universal Rm-6600, el cual entrega los valores de potencia de la luz detectada. De esta forma se pudo determinar la potencia del haz que llegaba a la muestra, determinante de la respuesta

acústica obtenida en el osciloscopio Tektronix TDS 3000 Series. Dicho osciloscopio,

como se dijo anteriormente, obtiene la altura del pico de la señal proveniente de la muestra al incidir la luz del láser con la potencia que devuelve el radiómetro.

Las señales generadas por 64 disparos del láser a cada temperatura, tanto para la muestra como para la referencia calorimétrica (New Coccine e Índigo Carmín) cada vez bajo las mismas condiciones, fueron promediadas para obtener una mejor señal disminuyendo el ruido.

Las medidas se realizaron en un régimen lineal de amplitud versus energía radiante del láser, que fue de un máximo de 100 μJ por pulso. El espectro de absorción de la solución fue determinado antes y después de cada set de medidas de láser para poder determinar una posible degradación o desnaturalización de la muestra.

La temperatura se controló por circulación de agua destilada por la camisa con un termostato alrededor de la muestra, agua proveniente de un baño termostático Julabo F12, y se midió dentro de la celda de reacción con un termómetro digital CT Lutron PH-206.



Figura 3.13: Baño termostático.

3.4.3.2 *Obtención de las señales fotoacústicas de las muestras de estudio*

Durante todo el desarrollo de la presente tesina se realizó la experiencia con la referencia en un primer momento, y luego la de la muestra.

Se realizaron la medida a distintas temperaturas, entre 7°C y 25°C, cambiando de temperatura al azar (subiéndola y bajándola) para disminuir la probabilidad de errores sistemáticos. La elección de los límites de temperatura entre 7°C y 25°C se basó en que a temperaturas menores a 7°C se obtenía mucho ruido en la medida y a temperaturas mayores a 25°C podría desnaturalizarse la proteína. El intervalo de temperatura entre medidas fue entre 3 y 5 °C, tratando de obtener al menos 10 medidas para poder contar con un espacio muestral estadísticamente significativo.

La temperatura debe mantenerse 10 minutos para poder realizar la medida y permitir que haya una temperatura homogénea en la celda. Para las medidas realizadas a temperaturas bajas se debe controlar también que la cubeta no esté condensada, ya que esto modificaría la potencia de luz absorbida por la muestra. Para eliminar la

condensación formada se pasa aire seco por las caras externas de la celda. Tanto el aire como el agitador, el cual ayuda a la homogenización de la muestra frente a los cambios bruscos de temperatura, se detuvieron al momento de la toma de muestra para evitar cambios en la señal por estos.

Para cumplir el tercer objetivo de esta tesina se estudiaron los cambios de volumen generados por los procesos de transferencia electrónica fotoinducidos entre el Citocromo c y el centro Cu_A de la CcO [Babcock, G. T., & Wikström, M. (1992)].

Los pasos experimentales para el estudio de la transferencia de carga entre el Citocromo c y el centro Cu_A de la CcO fueron similares a los realizados para el análisis de transferencia de carga entre el Citocromo c y los complejos de Re(I) y Ru(II), y la fuente de excitación utilizada fue el segundo pulso armónico (532 nm) del láser.

3.4.4 Análisis computacional y deconvolución de las señales

Con respecto a la adquisición, análisis y presentación de datos experimentales se dispuso de los programas necesarios que permitirán realizar estas tareas. Además, se realizó una correlación entre los resultados de los complejos metálicos solos y los complejos asociados a la proteína.

Para realizar el análisis de los datos obtenidos se utilizó el programa Sound Analysis 32. Sin embargo, previo a la realización de dicho análisis, los datos deben ajustarse según ciertos parámetros de medidas.

En un primer momento se utilizaron los datos obtenidos del osciloscopio. Del archivo con los 10.000 datos de la curva se importaron los valores para realizar la deconvolución, y del archivo de imagen se obtuvo la transmitancia de la muestra. La transmitancia óptica, definida como la fracción de luz incidente a una longitud de onda especificada, que pasa a través de una muestra representará el valor del $t=0$ de los datos obtenidos, por lo que dicho valor se restó en toda la columna del tiempo. Se corrige el tiempo al disparo del láser en el eje x, y el offset de la señal en el eje y.

Los valores promediados de las columnas se obtuvieron en una nueva ventana. Una vez restado el promedio se normalizaron los datos por el valor de potencia del láser. Finalmente, se graficaron las curvas obtenidas para muestra y referencia a distintas temperaturas.

La deconvolución genera una función para la referencia y la muestra, y permite separar las componentes térmicas y estructurales, ya que la referencia sólo tiene contribución de la primera. Luego de las deconvoluciones se obtiene un modelo del resultado para distinto número de especies formadas. Dicha formación de especies se consideró secuencial, empezando con el calor puesto en juego como la primera especie generada.

Una vez importados los valores al Sound Analysis 32 se genera una simulación que se ajuste al comportamiento observado experimentalmente. La simulación debe condecirse con la curva de la muestra, sobre todo en el primer pico, pero mejora si es similar o se ajusta al resto de la curva acústica. Dicha simulación es la que permitió observar los fenómenos fisicoquímicos que ocurren en la muestra, como desprendimiento de calor, transferencia de carga.

Además de haber analizado las ondas acústicas se realizó un análisis de residuos, los cuales deben oscilar en el menor rango posible. Los residuos tendrán una mayor dispersión con respecto al 0 en las zonas donde la simulación no se superponga a la curva obtenida experimentalmente de la muestra, es decir, cuando haya un mayor error en la simulación generada.

Finalmente, también se analiza la autocorrelación de la simulación, cuya oscilación a medida que aumenta el tiempo debe tender a 0. Una restricción del sistema consiste en el valor de $\tau > 10^4\text{ns}$, el cual no permite la separación en los procesos reales del sistema, o está fuera de la ventana temporal de los procesos de estudio.

3.4.5 Señal acústica y cálculos calorimétricos

Como se mencionó anteriormente, los pulsos de presión detectados en una muestra iluminada, provienen de los cambios de volumen producidos por relajación no radiativa (ΔV_{th}) y rearrreglos estructurales a nivel molecular (ΔV_r). La relajación en dichas reacciones se origina tanto por el decaimiento no radiativo de los estados excitados como por el calor liberado (cambio de entalpía), incluyendo el calor involucrado en el rearrreglo del solvente. En la figura inferior puede observarse un esquema de los cambios entálpicos (Q) que se convierten a cambios en la temperatura a través de la capacidad calorífica (VC_{pp}), y a cambios de volumen en la solución a través del coeficiente de expansión isobárica (β). ξ representa todos los reordenamientos moleculares, atómicos y electrónicos del soluto y de las moléculas de solvente que conducen a un cambio de

volumen estructural. Los cambios de presión provenientes de las variaciones volumétricas son mediados por la compresibilidad isotérmica (κ_T) [Callis, J. B., Parson, W. W., & Gouterman, M. (1972)].

$$\begin{array}{c}
 Q \xrightarrow{V c_p \rho} \Delta T \xrightarrow{\beta = \frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial T} \right)_p} \Delta V_{th} \xrightarrow{\kappa_T = \frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial P} \right)_T} \Delta P \\
 \text{(Térmico)} \\
 \xi \xrightarrow{\hspace{10em}} \Delta V_r \\
 \text{(Estructural)}
 \end{array}$$

Los cambios en el volumen estructural reflejan el movimiento de las moléculas excitadas y/o del solvente circundante en respuesta a eventos tales como el cambio de momento dipolar, transferencia de carga y fotoisomerización. Para entender mejor la generación de la señal fotoacústica y tener en cuenta tanto arreglos experimentales (cara frontal y ángulo recto) como la cinética de relajaciones no radiactivas se han desarrollado aproximaciones teóricas [Puchenkov, O. V., & Malkin, S. (1996), Puchenkov, O. V., Kopf, Z., & Malkin, S. (1995), Puchenkov, O. V. (1995) y Diebold, G. J. (1998)].

Usando una aproximación heurística, los cambios de presión total ΔP pueden ser expresados en función del volumen iluminado V y la compresibilidad isotérmica (κ_T) como [Braslavsky, S. E., & Heibel, G. E. (1992), Schulenberg, P. J., & Braslavsky, S. E. (1997) y Peters, K. S., & Snyder, G. J. (1988)]:

$$\Delta P = -\frac{1}{\kappa_T} \left(\frac{\Delta V}{V} \right)_T = -\frac{1}{\kappa_T} \left(\frac{\Delta V_{th} + \Delta V_r}{V} \right)_T$$

La señal también está relacionada linealmente con la cantidad de fotones absorbidos, n_{abs} , la cual es dependiente de la absorbancia A de la solución a la longitud de onda de estudio λ , de la constante de Avogadro N_A y del número de fotones incidentes N_{ph} :

$$n_{abs} = \frac{N_{ph}}{N_A} (1 - 10^{-A})$$

Considerando lo anteriormente mencionado, la señal total será dada por la ecuación:

$$H^S = k n_{abs}^S \left(\alpha \frac{\beta}{C_p \rho} E_\lambda + \Delta V_e \right)$$

Donde $E_\lambda = N_A h c \lambda$ es la energía de un mol de fotones de longitud de onda λ (= 1 Einstein), $\alpha = Q / E_\lambda$ es la fracción de la energía absorbida E_λ liberada como calor Q , ΔV_e es el

cambio de volumen estructural por cada Einstein absorbido, C_p es la capacidad calorífica a presión constante, ρ la densidad y β el coeficiente cúbico de expansión térmica de la solución. Para soluciones diluidas, estas propiedades son las mismas del solvente.

Los compuestos que trabajan como referencias calorimétricas son sustancias que no presentan ni fluorescencia ni muestran transientes con tiempos de vida más largos que unos pocos nanosegundos, son fotoquímicamente estables y son 100% eficientes en entregar la energía absorbida al medio como calor cuando las moléculas excitadas regresan a sus estados fundamentales. No deberían exhibir efectos de desnaturalización multifotónica o del estado fundamental por acción de la fluencia del láser usado en el experimento [Gensch, T., & Viappiani, C. (2003)]. Se debe tener mucho cuidado de no usar sustancias con bajos coeficientes de extinción a la longitud de onda de excitación ya que se necesitarían altas concentraciones (mM a M) de estos, lo cual podría afectar el coeficiente de expansión térmico. De esta manera se podrían introducir errores sistemáticos en los datos y llevar a determinaciones erróneas de los cambios entálpicos y volumétricos [Schulenberg, P. J., Rohr, M., Gärtner, W., & Braslavsky, S. E. (1994) y Logunov, S. L., & El-Sayed, M. A. (1997)]. La referencia calorimétrica y la solución muestra deben ser medidas bajo condiciones experimentales idénticas, es decir, igual solvente, temperatura, longitud de onda de excitación y geometría.

Para especies transientes con tiempos de vida dentro del tiempo de integración de presión, la información cinética es obtenida considerando que la señal es una convolución temporal entre la función de transferencia, $H_n^R(t)$, del instrumento, obtenida con la referencia calorimétrica, y el derivado del tiempo, $H(t)$, de la relación dependiente del tiempo H_n^S / H_n^R :

$$H_n^S(t) = \int_0^t H_n^R(t) H(t - t') dt'$$

Reconvoluciones numéricas han sido utilizadas para obtener parámetros cinéticos, entálpicos y volumétricos [Melton, L. A., Ni, T., & Lu, Q. (1989), Small, J. R. (1992) y Small, J. R., Libertini, L. J., & Small, E. W. (1992)], así como métodos de deconvoluciones directas [Puchenkov, O. V. (1995)]. Los métodos de reconvolución asumen una sumatoria de funciones de decaimiento exponencial simple para la evolución en el tiempo de las amplitudes de señal LIOAS normalizadas por la fluencia de muestra y referencia, obteniendo una función de $H(t)$ simplificada para dicho análisis:

$$H(t) = \sum_i \frac{\varphi_i}{\tau_i} e^{-\frac{t}{\tau_i}}$$

Donde τ_i es el tiempo de vida medio del transiente i y φ_i es la contribución fraccional al cambio de volumen medido. Esta suposición no tiene implicaciones en cuanto al mecanismo involucrado, ya que para varios mecanismos se llega a una función similar a la anterior.

Las amplitudes fraccionales φ_i contienen el calor liberado Q_i y el cambio de volumen estructural $\Delta V_{e,i}$ del paso i -ésimo, y ambas contribuciones pueden considerarse aditivas siempre que la evolución temporal sea la misma. Las amplitudes fraccionales, entonces, dependerán de las fracciones de energía absorbidas $\alpha_i = Q_i / E_\lambda$ y del volumen estructural $\Delta V_{e,i} = \Phi_i \Delta V_{R,i}$, donde Φ_i es el rendimiento cuántico del paso i . El calor liberado Q_i está relacionado a la entalpía de las especies producidas, incluyendo la reorganización de la energía del medio. $\Phi_i \Delta V_{R,i}$ representa el cambio de volumen estructural molar del paso i -ésimo, lo que incluye cambios intrínsecos en el cromóforo así como también en las interacciones soluto-solvente [Gensch, T., & Viappiani, C. (2003)]. Considerando lo anteriormente mencionado, las amplitudes fraccionales pueden calcularse según:

$$\varphi_i = \alpha_i + \frac{\Phi_i \Delta V_i}{E_\lambda} \left(\frac{C_p \rho}{\beta} \right)_T \xrightarrow[\Delta V_{e,i} = \Phi_i \Delta V_{R,i}]{\alpha_i = \frac{q_i}{E_\lambda}} \varphi_i = \frac{q_i}{E_\lambda} + \frac{\Phi_i \Delta V_i}{E_\lambda} \left(\frac{C_p \rho}{\beta} \right)_T$$

Esta separación entre la disipación de calor y los términos estructurales se logra por la medida de la señal como función de la relación $C_p \rho / \beta$ [Callis, J. B., Parson, W. W., & Gouterman, M. (1972), Braslavsky, S. E., & Heibel, G. E. (1992) y Peters, K. S., & Snyder, G. J. (1988)]. En solución acuosa, $C_p \rho / \beta$ depende fuertemente de la temperatura (dependencia debida principalmente a los cambios en β). Así, la separación de las contribuciones térmicas y volumétricas se obtiene mediante la realización de mediciones a diferentes temperaturas en un rango relativamente pequeño cercano a la temperatura ambiente. La relación $C_p \rho / \beta$ para el agua pura se obtiene de valores tabulados. En particular, $\beta_{H_2O} = 0$ a $3,9^\circ \text{C}$ ($T_{\beta=0}$), mientras que es positivo por encima y negativo por debajo de esta temperatura. A $T_{\beta=0}$ el calor liberado no da lugar a ninguna señal. Esta característica en particular permite la evaluación directa de la existencia de cambios en el volumen estructural. Para soluciones acuosas de sales u otros aditivos a

concentraciones mM o mayores, $(C_p\rho/\beta)_T$ y $T_{\beta=0}$ se debe determinar por comparación de la señal obtenida para una referencia calorimétrica en el solvente de interés y en agua [Gensch, T., & Viappiani, C. (2003)].

El calor liberado en cada etapa (Q_i) es interpretado en términos de los cambios de entalpía usando el balance de energía de la ecuación:

$$E_\lambda = \Phi_f E_f + \sum_i Q_i + E_{almacenada}$$

En esta ecuación, la energía de entrada (E_λ) es igual al total de la energía liberada como emisión (por ejemplo, fluorescencia; Φ_i y E_λ son los rendimientos cuánticos de emisión y energía del estado emisor respectivamente; la fosforescencia no se tiene en cuenta) y el calor disipado (cambios en el contenido de energía de los estados excitados más la energía asociada con las interacciones soluto-solvente) en cada una de las etapas. $E_{almacenada}$ representa la energía acumulada en las especies que viven más tiempo que el de presión-integración del experimento. El análisis de la información calorimétrica requiere conocer el esquema de reacción y los parámetros asociados con el proceso tales como rendimientos cuánticos y niveles de energía derivados, por ejemplo, de medidas ópticas [Gensch, T., & Viappiani, C. (2003)].

3.4.6 Determinación del rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete por el complejo de Re

State	Orbital Assignment	
$^1\Sigma_g^+$	$\begin{array}{c} \uparrow \\ \text{---} \\ \downarrow \end{array} \pi \quad \begin{array}{c} \downarrow \\ \text{---} \\ \uparrow \end{array} \pi$	El oxígeno atómico tiene número atómico ocho y presenta una configuración electrónica de $1s^2 2s^2 2p^4$. El estado basal del O_2 es un triplete ($^3\Sigma_g^-$), paramagnético, debido a sus dos electrones no apareados. Los dos estados electrónicamente excitados energéticamente más próximos son singletes, cuyas notaciones espectroscópicas son $^1\Delta_g$ y $^1\Sigma_g^+$. El oxígeno singlete (1O_2) es, entonces, una especie electrónicamente excitada del oxígeno molecular (O_2) y participa en numerosas reacciones de oxidación como especie activada.
$^1\Delta_g$	$\begin{array}{c} \uparrow\downarrow \\ \text{---} \\ \uparrow\downarrow \end{array} \pi \quad \begin{array}{c} \text{---} \\ \text{---} \\ \text{---} \end{array} \pi$	
$^3\Sigma_g^-$	$\begin{array}{c} \uparrow \\ \text{---} \\ \uparrow \end{array} \pi \quad \begin{array}{c} \uparrow \\ \text{---} \\ \uparrow \end{array} \pi$	

Figura 3.14: Estados triplete y singlete del oxígeno [DeRosa, M. C., & Crutchley, R. J. (2002)].

La producción de oxígeno singlete ($O_2(^1\Delta_g)$) sensibilizada por el complejo de Re(I) se realizó por la comparación de la emisión en el infrarrojo cercano (1270 nm) producida por el decaimiento del oxígeno del estado excitado $^1\Delta_g$ al estado fundamental $^3\Sigma_g^-$.

La longitud de onda de excitación empleada en los experimentos fue 355 nm del tercer armónico del láser de Nd-YAG previamente descrito. La potencia del láser fue medida con el Radiómetro universal Rm-6600. La fosforescencia de oxígeno singlete ($^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$) se mide colocando un filtro de banda de 1270 nm en frente del detector, un fotodiodo de Ge (Applied Detector Corporation, tiempo de resolución de 1 μ s) acoplado a un amplificador. Las medidas se realizaron en soluciones de acetonitrilo equilibradas con aire. Se registró el promedio de 64 señales generadas por disparos de láser para mejorar la relación señal-ruido. Se realizó un ajuste de los decaimientos exponenciales de la emisión a 1270 nm excluyendo la parte inicial de la señal. El valor del rendimiento cuántico Φ_Δ se calculó comparando la intensidad de fosforescencia del complejo con la de una solución del sensibilizador de referencia (fenalenona $\Phi_\Delta = 0.98$) en las mismas condiciones experimentales.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis de las referencias calorimétricas utilizadas: espectro UV-visible, estabilidad y medidas fotoacústicas

Se midieron los espectros UV-visible de las soluciones de ambas referencias calorimétricas. Los resultados se muestran en la figura 4.1:

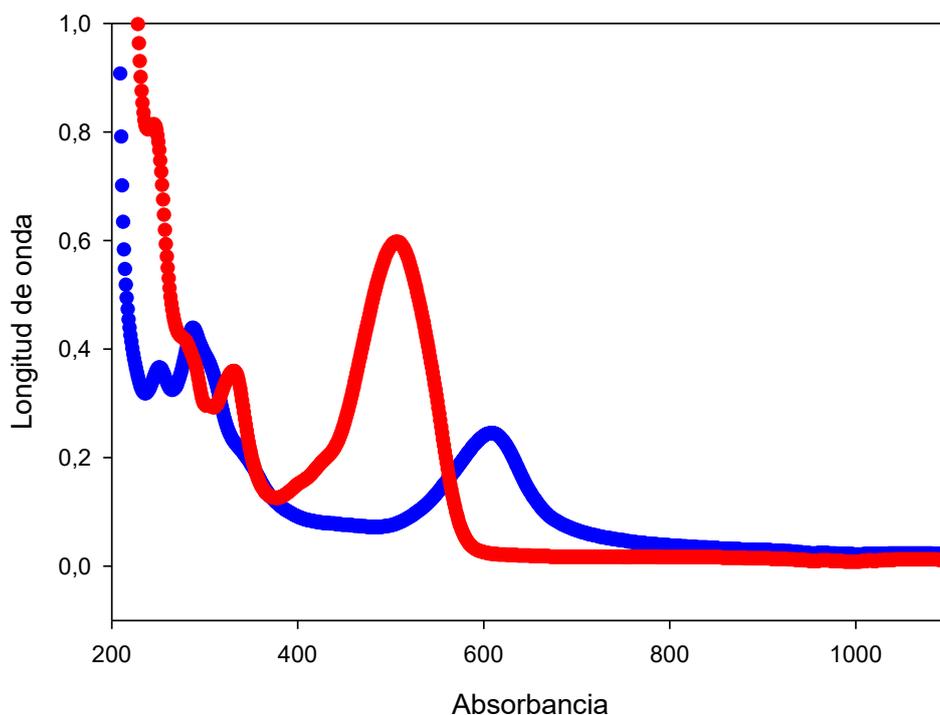


Figura 4.1: Espectros UV-visible para las referencias calorimétricas utilizadas: New Coccine (rojo) e Índigo Carmín (azul).

Se observó que el compuesto New Coccine tiene un pico de absorbancia alrededor de los 500 nm y también presenta varios picos por debajo de 380 nm. Mientras que, el compuesto Índigo Carmín presenta zonas de absorción centradas en 600 nm y por debajo de 370 nm.

En un primer momento se realizaron las medidas a 532 nm, llevando la absorbancia de las referencias a un valor cercano a una absorbancia de 0,2 utilizando el buffer fosfato como solvente. Aun cuando los valores de las absorbancias de muestra y referencias se normalicen posteriormente durante el análisis de los datos, se trató de conseguir absorbancias similares a las longitudes de onda de estudio en cada experiencia para poder comparar los valores obtenidos mientras se realizaba la obtención de los datos

experimentales. Si las absorbancias hubieran sido muy diferentes podrían ocurrir procesos distintos en las muestras o las referencias, escenario que se trató de evitar para obtener procesos comparables.

$$A_{NC, 532nm} = 0,203$$

$$A_{IC, 532nm} = 0,203$$

$$A_{NC, 355nm} = 0,167$$

$$A_{IC, 355nm} = 0,163$$

Para confirmar la correcta disolución de las referencias, se estudió la variación de los espectros UV-visible después de sucesivas sonicaciones y el scattering o dispersión de luz por la presencia de material particulado no correctamente disuelto. En la tabla 4.1, se muestran las absorbancias luego de las 3 primeras sonicaciones (en los tiempos indicados) para 3 longitudes de onda. Las longitudes de onda más altas evidencian el scattering de la muestra debido a que ninguna de las dos sustancias tiene absorción en esas zonas. Cuando el sistema se encuentra completamente disuelto, no se observan partículas en suspensión y por lo tanto no presenta scattering la muestra. Se observó que las diferencias entre el segundo y tercer sonicado son mínimas por lo que se tomaron estas últimas muestras como completamente disueltas.

Stock de New Coccine en buffer fosfato

15 minutos	+5 minutos	+5 minutos
$\lambda_{1100nm} = -0,001$	$\lambda_{1100nm} = -0,003$	$\lambda_{1100nm} = -0,002$
$\lambda_{800nm} = -0,002$	$\lambda_{800nm} = -0,004$	$\lambda_{800nm} = -0,004$
$\lambda_{355nm} = 0,953$	$\lambda_{355nm} = 0,966$	$\lambda_{355nm} = 0,960$

Tabla 4.1: Medidas de absorbancia para sonicados sucesivos a longitudes de onda donde absorbe el complejo y donde hay scattering.

Por otro lado, se hicieron medidas de los espectros de ambos colorantes después de irradiar durante tiempos crecientes las soluciones con el láser, para verificar la fotoestabilidad de los compuestos durante las medidas optoacústicas. Las figuras se muestran a continuación para ambos colorantes luego de una irradiación durante 40 minutos:

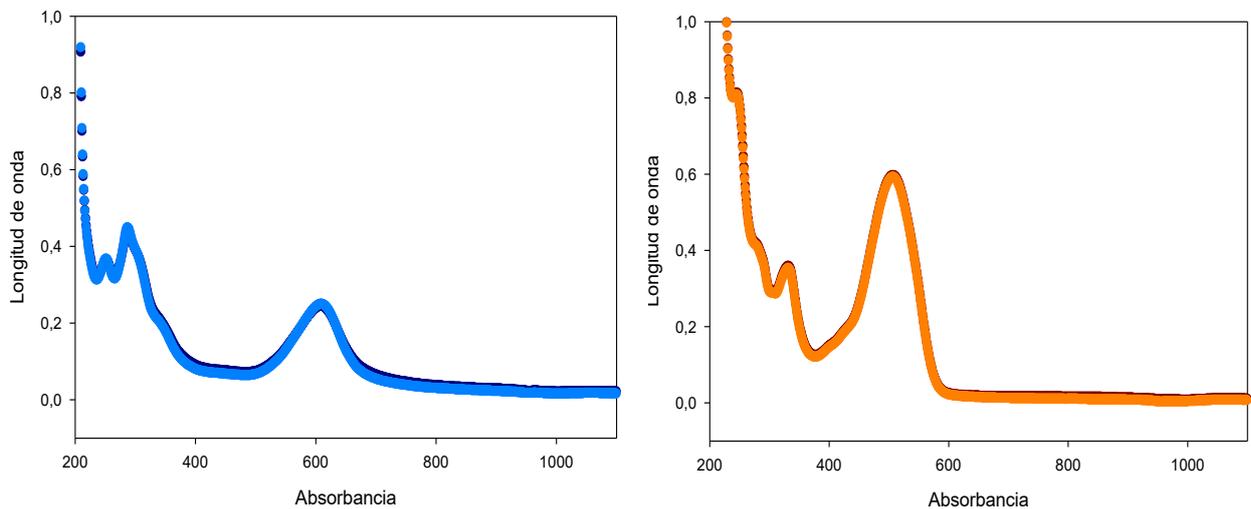


Figura 4.2: Espectros obtenidos para el ensayo de estabilidad post irradiación para ambas referencias. *Izquierda:* Índigo carmín. *Derecha:* New Coccine.

Se observa que, para ambos colorantes, después de 40 minutos de irradiación con el láser de Nd-YAG, los espectros no varían, por lo que, se pueden considerar fotoestables y pueden ser utilizados, por lo tanto, como referencias en las condiciones experimentales empleadas en esta tesis. Este procedimiento se repitió para todas las muestras empleadas luego de cada serie de medidas. En todos los casos, los espectros antes y después de la experiencia no mostraron cambios ni en su forma ni en el valor de las absorbancias a las longitudes de onda de trabajo.

Como las dos longitudes de onda utilizadas en los ensayos son las correspondientes al segundo y tercer armónico del láser de Nd-YAG (532 nm y 355 nm respectivamente), se decidió utilizar como referencia para todos los ensayos el compuesto New Coccine, ya que presenta absorción considerable en ambas longitudes de onda.

Posteriormente se comenzaron los ensayos optoacústicos con la referencia elegida. En primer lugar, se observó la linealidad de la respuesta de la señal optoacústica con la intensidad de la luz irradiada y con la absorbancia de las muestras. En la Figura 4.3, se muestran los puntos experimentales correspondientes a la diferencia de alturas del primer pico para las distintas energías de láser utilizadas, con soluciones de 3 absorbancias distintas (0,101A en negro, 0,144A en rojo y 0,164A en celeste). En todos los casos se observó una buena correlación entre las dos variables (con coeficientes de correlación mayores que 0,998). En el recuadro del gráfico principal se muestra la dependencia de las pendientes de estas regresiones en función de la fracción de luz absorbida por la muestra. Nuevamente se observó una excelente correlación entre

ambas, lo que indica que los rangos de absorbancia y potencia del láser utilizados son adecuados, ya que no presentan desviaciones del comportamiento esperado.

Para el tratamiento de las señales LIOAS, se usó una ecuación que relaciona la amplitud pico a pico de la primera señal fotoacústica (H) con la fracción de la fluencia del láser de excitación (F) absorbida por la muestra:

$$H = K\alpha F(1 - 10^{-A})$$

En esta ecuación, la constante experimental K contiene los parámetros termoelásticos de la solución como también los factores instrumentales, A es la absorbancia de la muestra a la longitud de onda de excitación y α es la fracción de energía liberada al medio como calor rápido, es decir, dentro del tiempo de resolución del experimento [Martínez Saavedra, H. H. (2015)]. Considerando esto, se realizó una regresión lineal con los valores obtenidos de potencia de luz que incide sobre la muestra (μJ) vs altura de pico H (V).

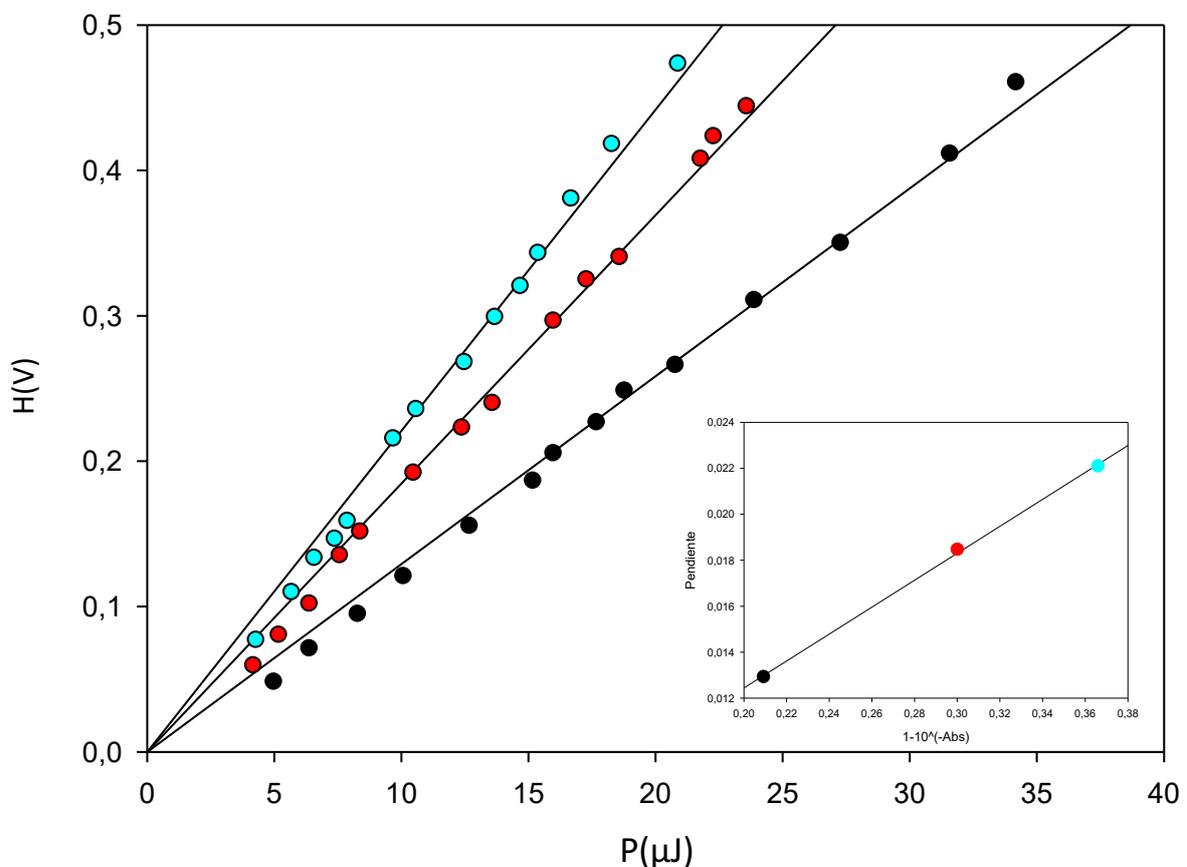


Figura 4.3: Análisis de la linealidad de la respuesta optoacústica para la referencia calorimétrica New Coccine.

Se realizó un análisis similar con la misma referencia irradiándola a 532 nm, y los resultados se muestran en la tabla siguiente:

Abs	$1 \cdot 10^{-A}$	Pendiente	r^2
0,102	0,209	0,0129	0,999
0,155	0,300	0,0185	0,999
0,198	0,366	0,022	0,998

Tabla 4.2: Determinación matemática de la linealidad de la respuesta.

Por otro lado, se realizaron las medidas de la referencia calorimétrica New Coccine en soluciones preparadas en agua destilada y en el buffer fosfato. En la Figura 4.4 se muestran las rectas de la respuesta de la señal optoacústica en función de la potencia del láser para 355 nm. Los resultados para un ensayo similar, pero irradiando con 532 nm mostraron una relación entre las dos pendientes similar. Esta relación de pendientes se utilizó para obtener el cociente de los parámetros termoelásticos del agua ($C_p \rho / \beta$) para el buffer empleado a partir de los valores de bibliografía para el agua pura [Weast, R. C., Astle, M. J., & Beyer, W. H. 1986–1987].

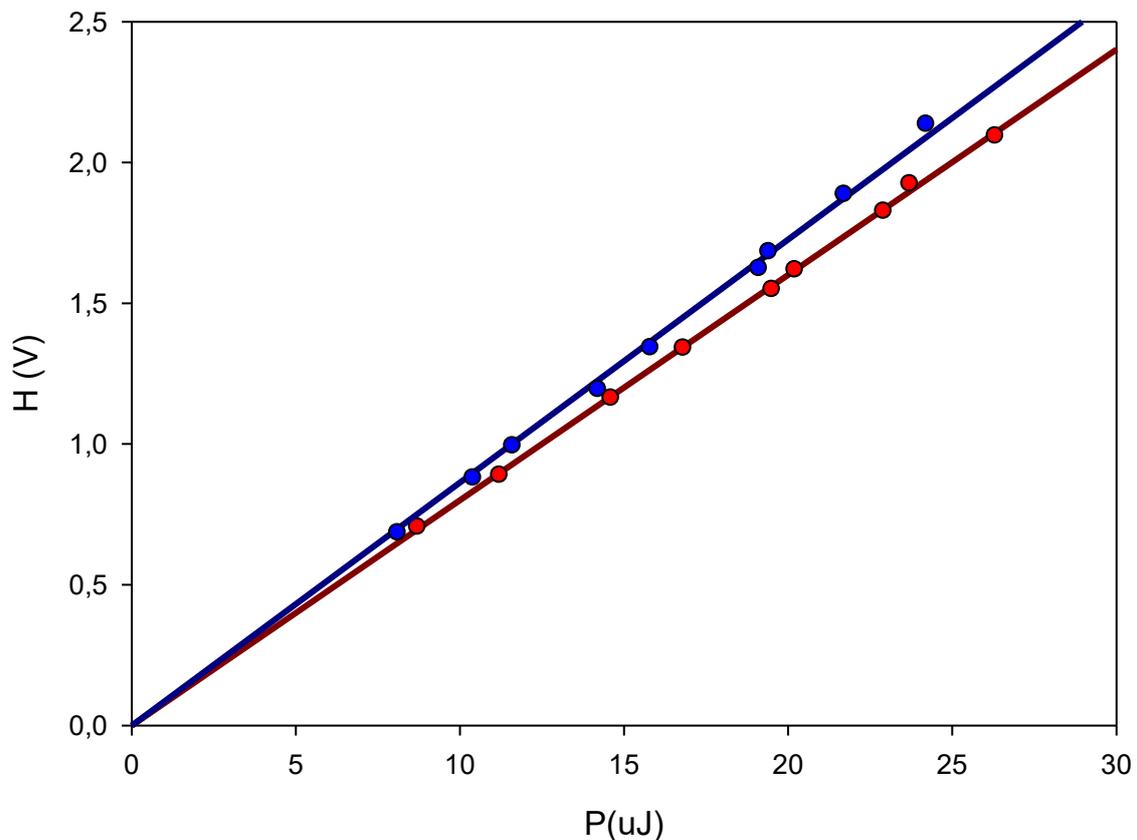


Figura 4.4: Comparación de la linealidad de la respuesta de la referencia calorimétrica New Coccine en agua (rojo) y en buffer (azul) a 23°C.

Valores en agua					Buffer
Temp	ρ	Cp	β	C _{pp} / β	C _{pp} / β
°C	g/mL	J/g	1/K	K*J/mL	K*J/mL
5	1,00000	4,202	1,561E-05	269,24	287,38
7	0,99996	4,198	4,566E-05	91,95	98,15
9	0,99985	4,194	7,410E-05	56,59	60,40
11	0,99968	4,191	1,011E-04	41,46	44,25
13	0,99946	4,188	1,267E-04	33,04	35,27
15	0,99919	4,186	1,510E-04	27,69	29,56
17	0,99886	4,184	1,742E-04	23,98	25,60
19	0,99849	4,182	1,964E-04	21,26	22,69
21	0,99808	4,181	2,176E-04	19,17	20,46
23	0,99762	4,180	2,380E-04	17,52	18,70
25	0,99713	4,180	2,575E-04	16,18	17,27

Tabla 4.3: Parámetros termoelásticos $C_{p\rho/\beta}$ para New Coccine en agua y buffer calculados a las temperaturas de trabajo.

Estos valores de $C_{p\rho/\beta}$ para el buffer se utilizaron para los análisis de los cambios generados por la transferencia de carga de los distintos sistemas que se describirán a continuación.

4.2 Análisis de los complejos utilizados: espectro UV-visible y medidas fotoacústicas

Se midieron los espectros UV-visible de las soluciones de los complejos de Re(I) y Ru (II) en buffer fosfato. Los resultados se muestran en la figura 4.5:

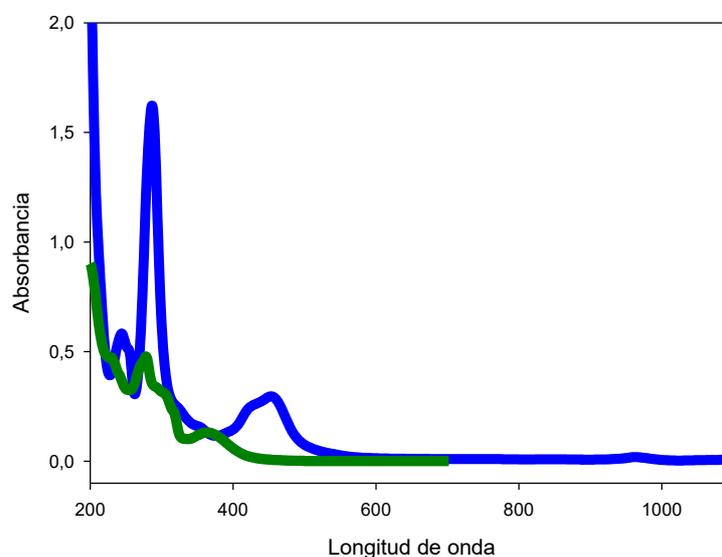


Figura 4.5: Espectros UV-visible de ambos complejos de Re (verde) y Ru (azul).

El espectro del complejo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ muestra picos angostos de absorción a 245 nm y 285 nm, y una banda más ancha y de menor intensidad centrada en 448 nm.

El espectro de absorción y emisión normalizados para $[\text{Re}(\text{bpy})(\text{CO})_3(\text{nHo})]^+$ y $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ se muestran en las figuras 4.6 y 4.7 respectivamente.

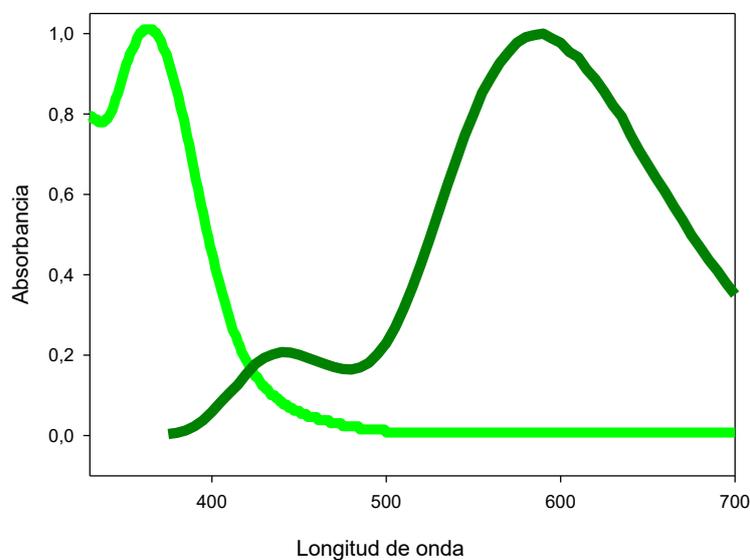


Figura 4.6: Espectros de absorción (verde claro) y emisión (verde oscuro) normalizados del complejo Re. $\lambda_{\text{exc}} = 355$ nm.

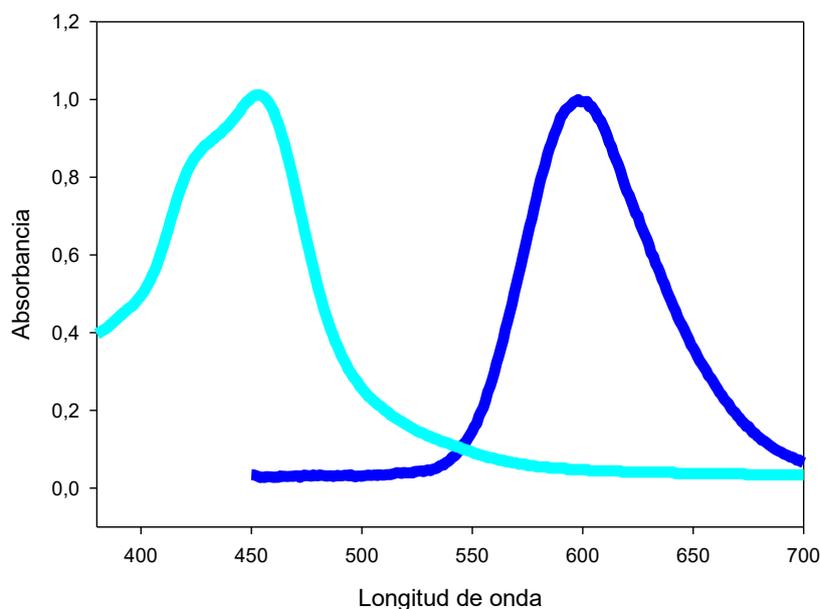


Figura 4.7: Espectros de absorción (celeste) y emisión (azul) normalizados del complejo Ru. $\lambda_{\text{exc}} = 410$ nm.

Se realizó el mismo procedimiento ejecutado en las referencias para estudiar la estabilidad y la correcta disolución de los complejos. Después de dos sonicaciones, la primera de 15 minutos y la segunda de 5 minutos, se alcanzó un valor constante de la

absorbancia en los picos anteriormente mencionados, sin observarse absorción en la zona característica del scattering (longitudes de onda mayores a 600 nm). Por otro lado, no se observaron cambios ni en la forma ni en los valores de las absorbancias de ambos complejos después de cada serie de medidas fotoacústicas, lo que demuestra su estabilidad fotoquímica en las condiciones experimentales utilizadas.

Se realizó el estudio fotoacústico de soluciones en buffer fosfato de los complejos de Ru(II) y Re (I) en un rango de absorbancias entre 0,1Abs y 0,2Abs, usando como fuente de irradiación el 3er armónico del láser (355 nm) donde ambos absorben. Los resultados experimentales mostraron una muy buena correlación de la señal fotoacústica con la potencia de excitación de las muestras para las distintas absorbancias utilizadas en los ensayos. En la Figura 4.8 se muestra una correlación para el complejo de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ en una absorbancia de 0,201, mientras que las referencias calorimétricas presentan una absorbancia similar (New Coccine 0,200Abs). Lo mismo puede concluirse de la Figura 4.9, donde puede observarse la correlación obtenida para el complejo $[\text{Re}(\text{bpy})(\text{CO})_3(\text{nHo})]^+$ y New Coccine a 0,103Abs.

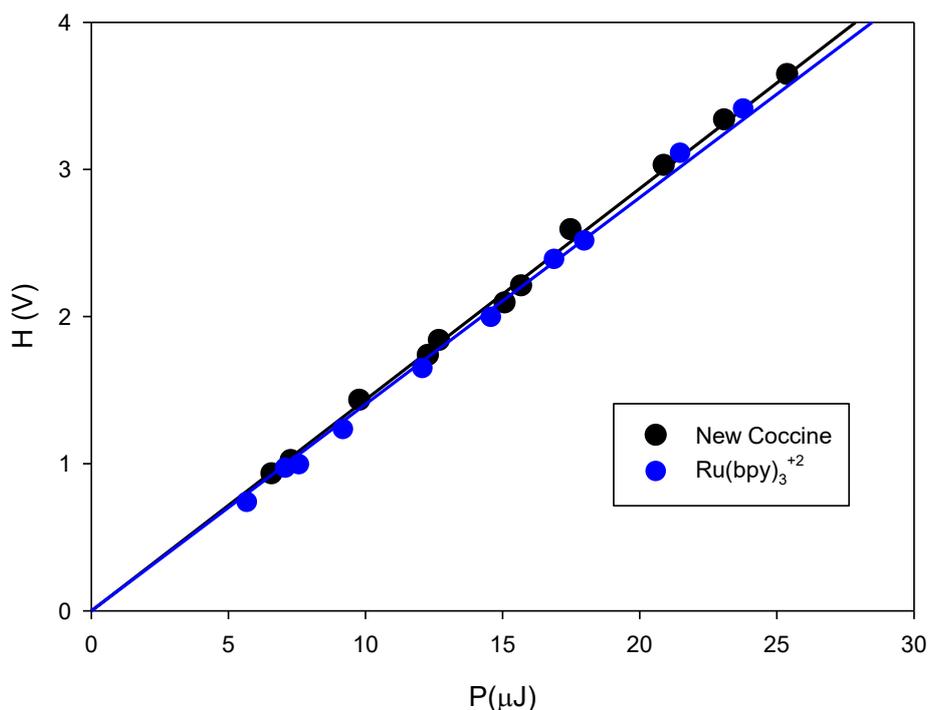


Figura 4.8: Análisis de la linealidad de la respuesta optoacústica para la referencia New Coccine (negro) y el complejo de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ (azul).

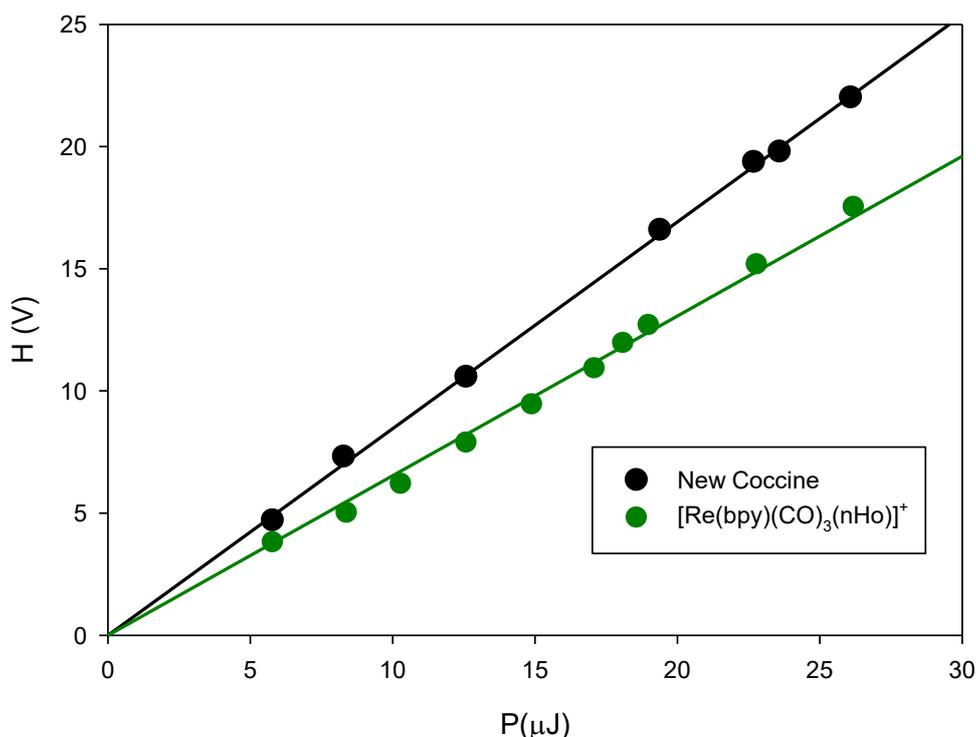


Figura 4.9: Análisis de la linealidad de la respuesta optoacústica para la referencia calorimétrica New Coccine (negro) y del complejo de Re (rojo).

Del análisis de las pendientes de la altura de la señal H en función de la potencia P del láser para cada complejo y la referencia calorimétrica, en condiciones experimentales similares, permite obtener información del balance de energía y los procesos de desactivación luego de la excitación de la muestra. Para este análisis se debe recordar que la referencia calorimétrica sólo se desactiva por emisión de calor liberado rápidamente al medio, por lo que su señal acústica es máxima. Para las sustancias que se desactivan parcialmente por emisión o reacción fotoquímica, disminuye la altura de la intensidad acústica según la ecuación:

$$H(t) = \sum_i \frac{\varphi_i}{\tau_i} e^{-\frac{t}{\tau_i}}$$

Las amplitudes fraccionales pueden calcularse, como se mencionó anteriormente, según la siguiente ecuación:

$$\varphi_i = \frac{q_i}{E_\lambda} + \frac{\Phi_i \Delta V_i}{E_\lambda} \left(\frac{C_p \rho}{\beta} \right)_T$$

Dicha ecuación facilita la obtención del cambio de volumen y de entalpía que ocurre en una reacción. Por lo tanto, luego de realizar las deconvoluciones respectivas para el

complejo de Ru, se obtuvo la Figura 4.10, que muestra la variación de los Φ de cada proceso en función de $C_p \rho / \beta$, y donde se pueden distinguir las correlaciones lineales que caracterizan los procesos de formación y decaimiento del estado excitado del complejo $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$.

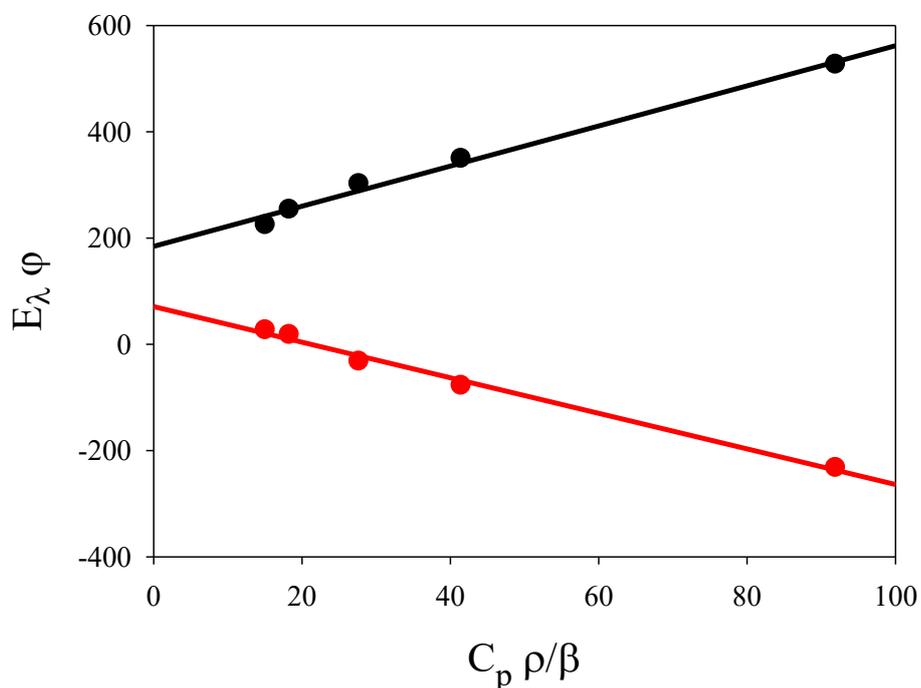


Figura 4.10: Valores de $E_{\lambda \phi_i}$ asociados a la formación (negro) y el decaimiento (rojo) del complejo de Ru vs $(c_p \rho / \beta)$ en el rango de temperatura de 7-25 °C.

Posteriormente se realizó el análisis para la determinación del rendimiento cuántico para oxígeno singlete para el complejo de Re(I), usando fenalenona como referencia, la cual presenta un rendimiento cuántico $\Phi_{\Delta} = 0,98$ [Schmidt, R., Tanielian, C., Dunsbach, R., & Wolff, C. (1994)]. Las cetonas aromáticas son utilizadas comúnmente como estándares potenciales, ya que generalmente presentan rendimientos cuánticos de cruce intersistemas cercanos a la unidad [Martí, C., Jürgens, O., Cuenca, O., Casals, M., & Nonell, S. (1996)].

Los decaimientos obtenidos en ambos casos se muestran en la Figura 4.11. Las señales de fosforescencia de las soluciones se ajustan a un decaimiento mono-exponencial.

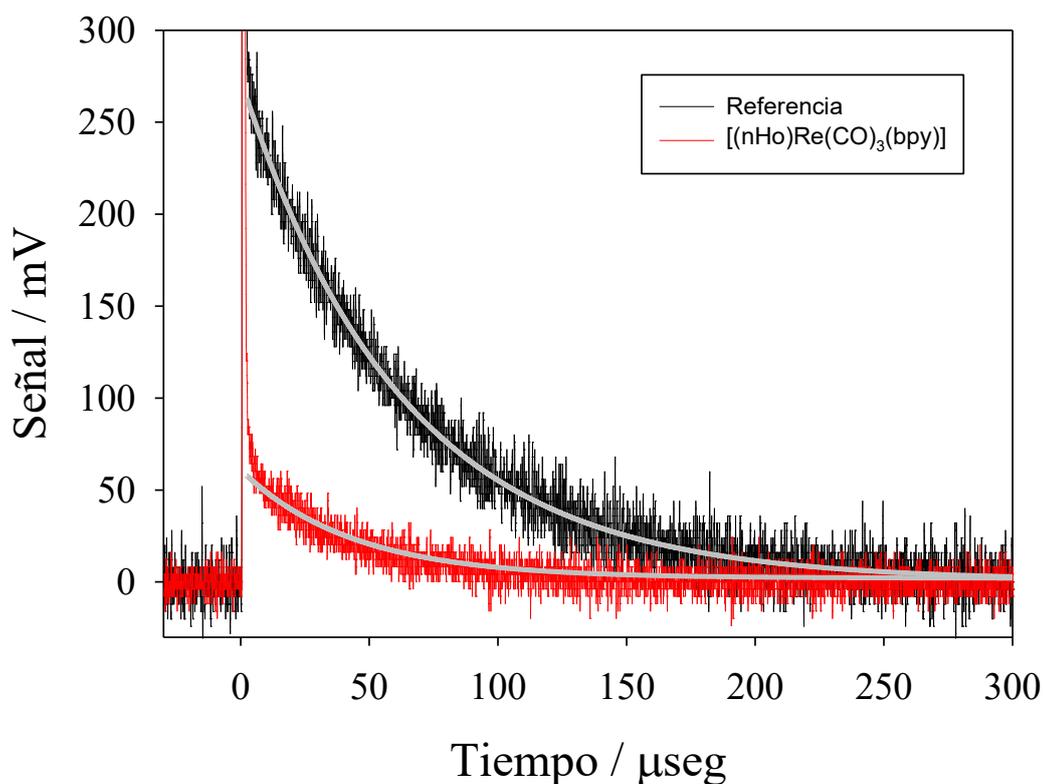


Figura 4.11: Decaimiento de la fosforescencia de $O_2(^1\Delta_g)$ para fenalenona (negro) y el complejo de Re (rojo).

Con el objeto de determinar el valor de Φ_Δ para el complejo, se tomaron señales de fosforescencia a diferentes potencias del láser empleando el método comparativo [Ogilby, P. R., & Foote, C. S. (1982)]. Así, las amplitudes de las señales extrapoladas a tiempo cero (I_0) para ambas muestras (la referencia fenalenona y el complejo $[Re(bpy)(CO)_3(nHo)]^+$ se graficaron en función de la potencia del láser obteniéndose las rectas que se muestran en la Figura 4.12.

En todos los solventes y para todas las fluencias de láser, la porción de decaimiento de las señales puede acomodarse a una función mono-exponencial, cuya intensidad a tiempo cero $S(0)$ está relacionado a Φ_Δ a través de la ecuación:

$$S(0) = \kappa k_R \Phi_\Delta E_1 (1 - 10^{-A})$$

Donde κ es una constante de proporcionalidad que incluye factores geométricos y electrónicos del sistema de detección, k_R es constante de velocidad de decaimiento radiactivo específico del solvente, E_1 es la energía incidente del láser y A es la absorbancia de la muestra. Mayor exactitud en la medida de Φ_Δ se obtiene cuando $S(0)$ se mide como función de E_1 manteniendo A constante [Martí, C., Jürgens, O., Cuenca, O., Casals, M., & Nonell, S. (1996)].

Se obtuvieron correlaciones lineales a partir de los gráficos de la dependencia de la intensidad de emisión de fosforescencia de oxígeno singlete a tiempo cero, $S(0)$, como función de la energía del láser para complejo y referencia. A partir de estas pendientes y del procedimiento descrito previamente, el rendimiento cuántico Φ_{Δ} de producción de $O_2(^1\Delta_g)$ fue de 0,25.

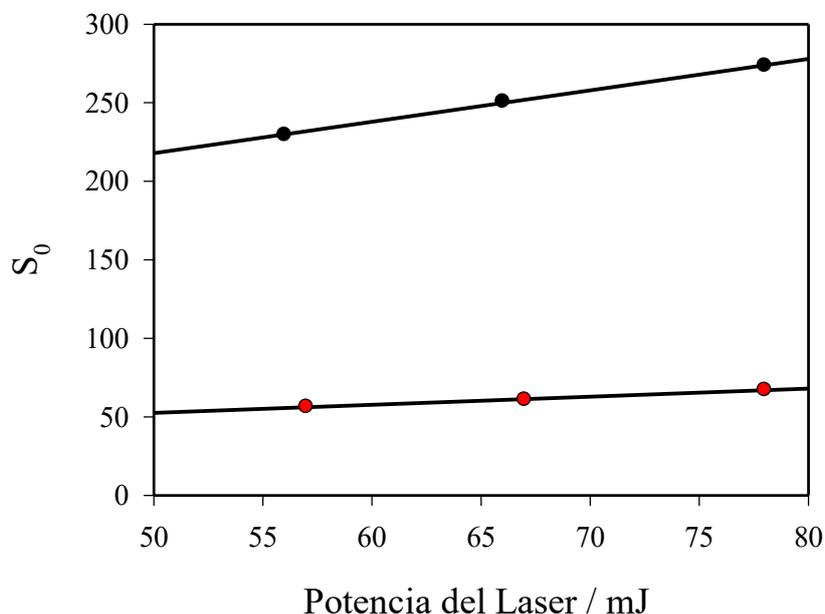


Figura 4.12: Dependencia lineal entre la potencia del láser y la señal para referencia (negro) y muestra (rojo).

A partir de referencias bibliográficas podemos obtener el valor del rendimiento cuántico Φ_{Δ} de producción de $O_2(^1\Delta_g)$ para el complejo $Ru(bpy)_3^{+2}$ como 0,22 en D_2O [García-Fresnadillo, D., Georgiadou, Y., Orellana, G., Braun, A.M. and Oliveros, E. (1996)].

4.3 Análisis de la transferencia de carga entre Citocromo c y Complejo de Ru (II): espectro UV-visible y medidas fotoacústicas

El análisis del Citocromo c se realizó tanto con la proteína sola como con la proteína con el complejo. En un primer lugar, se midieron los espectros UV-visible de las soluciones del Citocromo c y del Citocromo c + $Ru(bpy)_3^{+2}$ en buffer fosfato. Los resultados se muestran en las figuras 4.13:

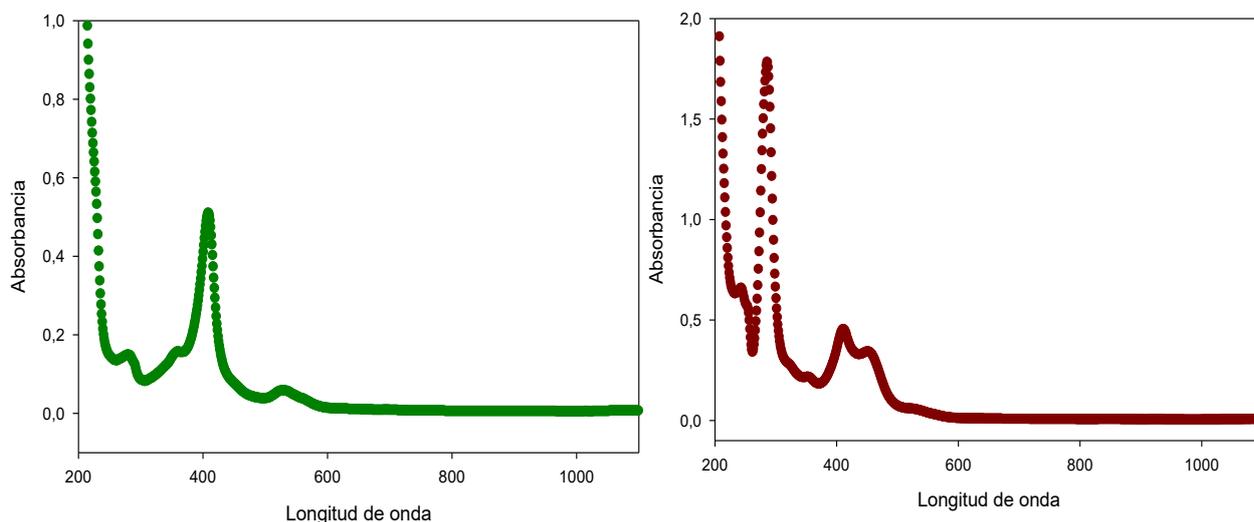


Figura 4.13: Espectros UV-visible de: A: Proteína (verde); B: Proteína+ Ru(bpy)₃⁺² (granate).

Se observó en la Figura 4.13.A que el Citocromo c tiene un pico de absorción muy angosto e intenso a 410 nm con una pequeña banda más ancha centrada en 560 nm. Ésta última se asocia al estado oxidado del citocromo según bibliografía [Dixon, M., Hill, R., & Keilin, D. (1931)].

La Figura 4.13.B muestra el espectro de la mezcla de ambas sustancias, Citocromo c y complejo de Ru(II), donde se observa el pico del complejo mucho más intenso centrado en 285 nm. Por lo tanto, se utilizó como longitud de onda de excitación el tercer armónico del láser (355 nm), donde ambos absorben.

Se realizaron las medidas de todas las soluciones a diversas absorbancias (aproximadamente 0,2Abs, 0,15Abs y 0,1Abs). Para las medidas de la solución que contiene el complejo y el Citocromo c, los valores de absorbancia son mayores debido a que se ajustó el valor de la absorbancia del complejo de la mezcla a valores similares a los utilizados en los blancos anteriores.

New Coccine	0,199 Abs	0,154 Abs	0,101 Abs
Ru(bpy) ₃	0,200 Abs	0,153 Abs	0,101 Abs
Citocromo c + Ru(bpy) ₃ ⁺²	0,300 Abs (0,200 Abs del complejo)	0,214 Abs (0,150 Abs del complejo)	0,100 Abs (0,9 Abs del complejo)

Tabla 4.4: Medidas espectrofotométricas de las soluciones empleadas, cuya absorbancia fue determinada a 355 nm.

En la Figura 4.14 podemos observar las señales fotoacústicas de la referencia calorimétrica y de la solución de la proteína y el complejo a diferentes temperaturas. Se puede observar en ambos casos una dependencia de la altura máxima de la señal con la temperatura, debida a los parámetros termolásticos del solvente. Estas señales posteriormente se analizan por deconvolución de las mismas, comparándolas con la referencia calorimétrica, para obtener la información cinética y termodinámica de los procesos que ocurren luego de la excitación de la muestra con el láser.

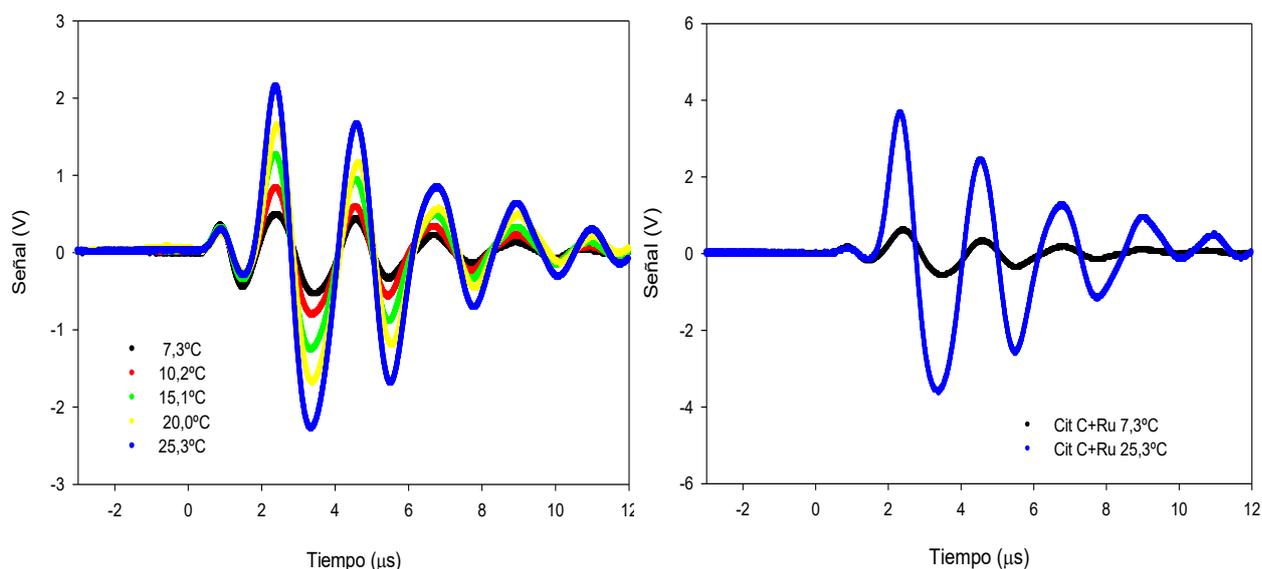


Figura 4.14: Influencia de la temperatura en la señal fotoacústica de la referencia (izquierda) y solución complejo/proteína (derecha).

La señal fotoacústica también se utilizó para comparar el comportamiento de las muestras y las referencias a una misma temperatura, pudiendo observar una similitud entre todas representado en la Figura 4.15. Para la muestra particular de proteína/complejo la señal es mayor, posiblemente debido a que dicha solución se preparó para que el complejo absorba aproximadamente a 0,15 pero la absorbancia total de dicha muestra fue de 0,214 a 355 nm (valores que pueden observarse en la tabla 4.4).

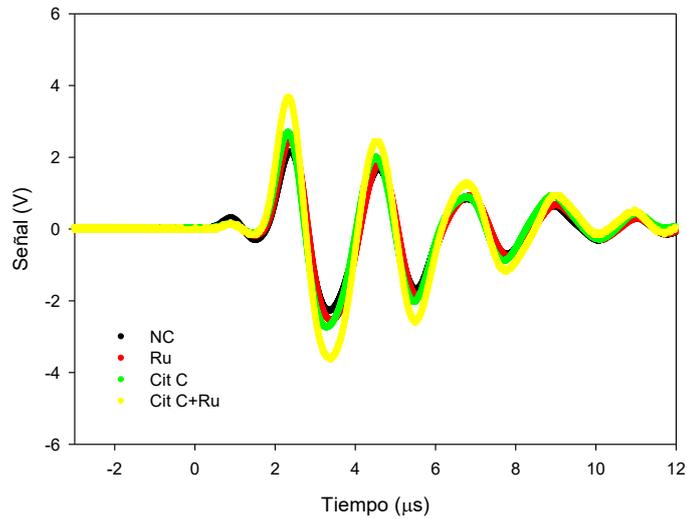


Figura 4.15: Señal fotoacústica de las soluciones empleadas a 25,3°C.

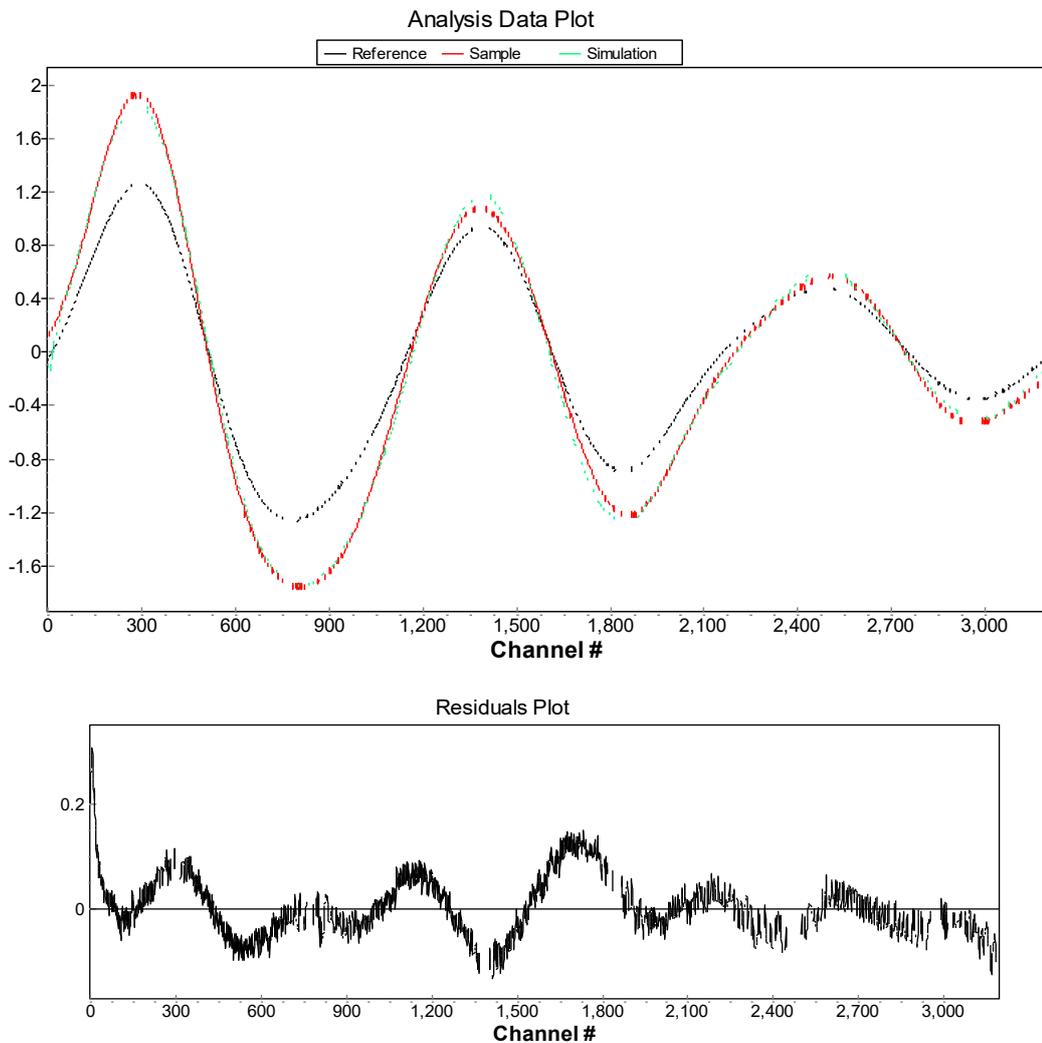


Figura 4.16: *A (Superior):* Señales LIOAS normalizadas según las referencias luego de la excitación láser a 355 nm para la referencia colorimétrica (negro) y el sistema complejo de Ru(II)/Citocromo c (rojo), y la función ajustada de la deconvolución (verde). Las curvas de la muestra y la simulación esencialmente se superponen. *B (Inferior):* Gráfico de residuos.

En la Figura 4.16.A se muestra la deconvolución del sistema complejo/Citocromo c en una solución de buffer fosfato a una temperatura de 15°C, comparándolo con la referencia calorimétrica a la misma temperatura.

En la Figura 4.16.B se observan los residuos que reflejan la dispersión de los valores experimentales respecto a la simulación de los mismos. En todos los análisis realizados, los residuos observados fueron menores al 5% del valor máximo, principalmente en las zonas correspondientes a los picos de señal fotoacústica. La dispersión de los valores simulados y experimentales a tiempos cortos (antes del primer pico) se debe a la dispersión de la luz en el sistema complejo/proteína que aparece después de un tiempo. Esto puede deberse a posibles agregados por interacciones entre el complejo y la proteína, por lo que no se tuvieron en cuenta estos pequeños picos en los análisis.

Como se dijo anteriormente, los parámetros que utiliza el programa para la deconvolución de las señales son los tiempos de vida medio de los distintos procesos (τ) y sus contribuciones fraccionales al cambio de volumen (ϕ_i). El análisis del sistema Citocromo c/complejo requirió un mínimo de 4 procesos para la correcta simulación de los resultados. Debido a la complejidad del sistema, se deben proporcionar alguno de estos valores para un primer análisis. Se utilizaron los τ obtenidos en las deconvoluciones de los blancos del complejo de Ru(II) ($\tau_3 \sim 800$ ns) y del Citocromo c ($\tau_2 \sim 15$ ns) por separado. Los otros dos procesos se ajustaron con tiempos muy cortos ($\tau_1 \sim 7$ ns) y muy largos ($\tau_4 > 10$ μ s). El primero de ellos se corresponde a todos los procesos que ocurren muy rápidamente en el sistema y están incluidos en el ancho del pulso del láser. Los tiempos muy largos incluyen todos los procesos, pudiendo ser más de uno, que ocurren por fuera del intervalo de tiempo del diseño experimental.

Este procedimiento se realizó para las diferentes temperaturas de trabajo en el rango indicado, y los valores de Φ se analizaron en función de los cambios de temperatura. La Figura 4.17 muestra la variación de los Φ de cada proceso en función de $C_p\rho/\beta$. En ella se distinguen buenas correlaciones lineales obtenidas para caracterizar los procesos de formación y decaimiento del estado excitado del complejo proteico. Para el sistema estudiado a 355 nm $E_\lambda = 336,97$ kJ/mol.

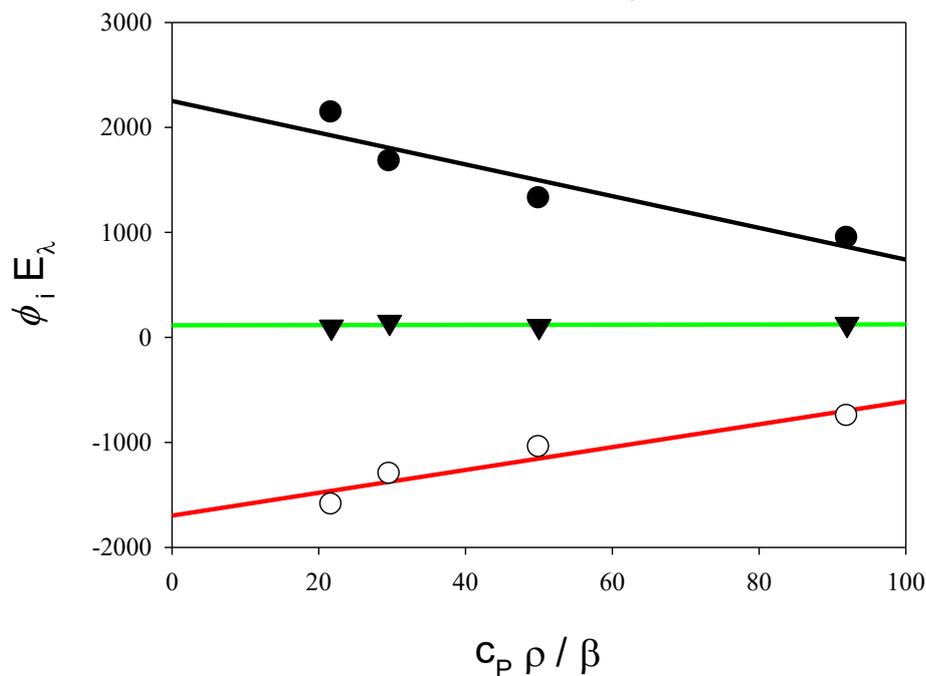


Figura 4.17: Valores de $E_\lambda \phi_i$ asociados a la formación (negro) y los decaimientos (rojo y verde) del complejo/proteína vs $(c_p \rho / \beta)$ en el rango de temperatura de 7-25 °C.

De las pendientes de las rectas obtenidas para las distintas especies se pueden obtener los valores de cambio de volumen, como ya se ha mencionado anteriormente, según la ecuación:

$$\phi_i = \frac{q_i}{E_\lambda} + \frac{\Phi_i \Delta V_i}{E_\lambda} \left(\frac{C_p \rho}{\beta} \right)_T$$

Especies	ΔV (mL/mol)	ΔH
1	-15,1	<0 (Endotérmico)
2	10,9	>0 (Exotérmico)
3	0,1	<0 (Endotérmico)

4.4 Análisis de la transferencia de carga entre Citocromo c y la subunidad Cu_A de la Citocromo c Oxidasa: espectro de absorción y emisión y medidas fotoacústicas

El espectro de absorción y emisión normalizados se muestran en la figura 4.18.

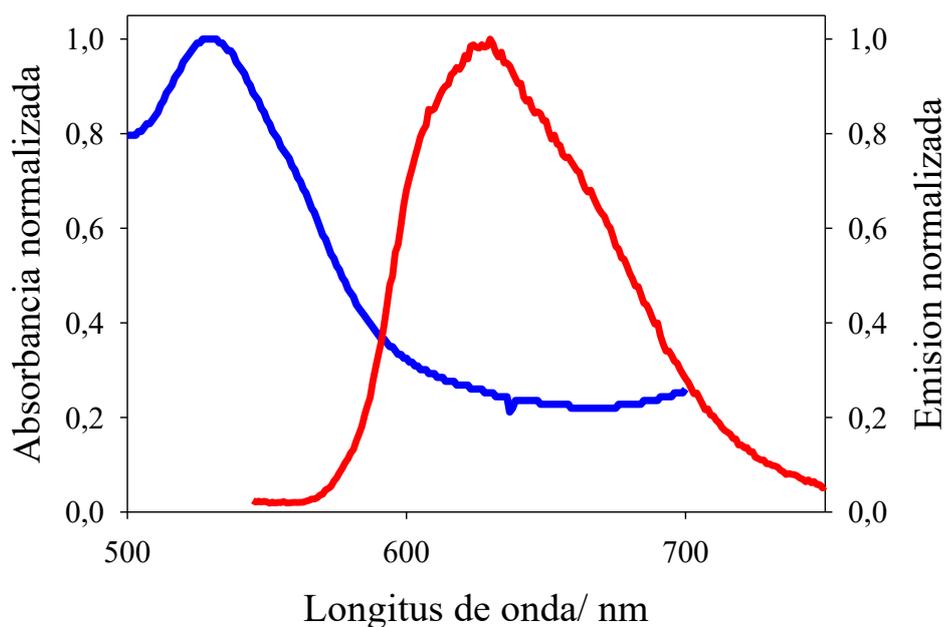


Figura 4.18: Espectros de absorción (azul) y emisión (rojo) normalizados del sistema Citocromo c / centro Cu_A de la Citocromo c Oxidasa en solución buffer. $\lambda_{exc} = 530$ nm.

Las señales LIOAS mostradas a continuación se obtuvieron a 22°C tanto para la referencia calorimétrica y para la muestra proteica, a la misma fluencia del láser, absorción de muestra y configuración del sistema.

De manera similar que para el análisis del Citocromo c y el complejo de Ru(II), luego de realizar las deconvoluciones, se obtuvieron ajustes satisfactorios al usar una suma de 4 funciones de decaimiento exponencial simple para cada caso, con el fin de ajustar la señal de la muestra. Cuando se permite que los 8 parámetros conseguidos (los 4 tiempos de vida y los 4 factores pre-exponenciales) varíen con libertad, se obtuvieron 4 componentes bien separados:

- i. El componente rápido con un tiempo de decaimiento de $\tau_1 < 20$ ns;
- ii. Componentes con tiempos de vida más lentos, $\tau_2 \sim 1.4$ μ s y $\tau_3 \sim 4.4$ μ s;
- iii. El componente con un tiempo de vida mayor que 10 μ s.

El valor de τ_1 fue más o menos arbitrario y relacionado a la suma de los procesos no radiativos (como, por ejemplo, procesos de conversión interna) y relajaciones vibracionales. Este decaimiento fue más rápido que el tiempo experimental de resolución del LIOAS. Al condicionar el parámetro para valores de tiempo entre 1 ps y 20 ns, los valores arrojados para la amplitud asociada fueron similares. El primer componente que

puede, por lo tanto, considerarse como una medida confiable de todos los procesos “rápidos” hasta la formación del (Citocromo c - Cu_A)^{*}.

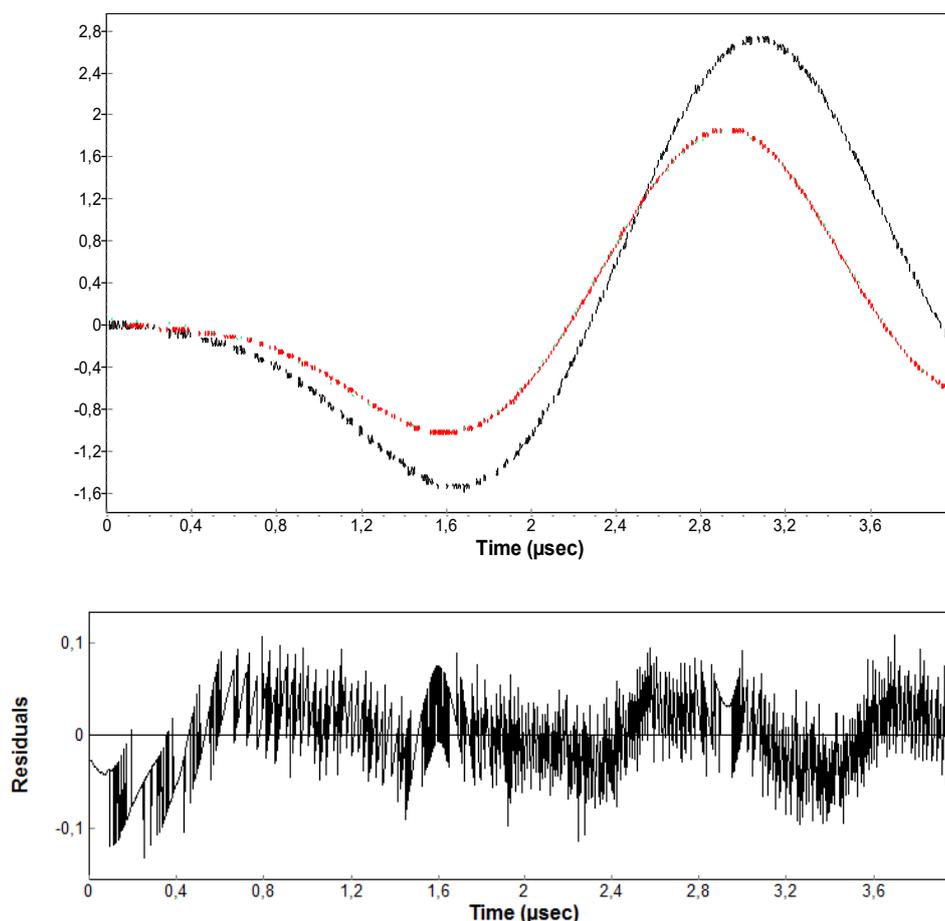


Figura 4.19: Arriba: Señales LIOAS normalizadas según las referencias luego de la excitación láser a 532 nm para la referencia colorimétrica (negro) y el centro Cu_A Citocromo c Oxidasa (rojo), en una solución de buffer fosfato a 22°C, y la función ajustada de la deconvolución (verde). Las curvas de la muestra y la simulación esencialmente se superponen. Abajo: El gráfico de residuos que demuestra la distribución del error de la correlación obtenida.

Los factores de amplitud (pre-exponencial) φ_i de los cuatro componentes a varias temperaturas diferentes en el rango de 7 – 32 °C fueron trazados con un gráfico de $E_\lambda \Phi_i$ vs $(c_p \rho / \beta)$ según la ecuación:

$$\varphi_i = \frac{q_i}{E_\lambda} + \frac{\Phi_i \Delta V_i}{E_\lambda} \left(\frac{C_p \rho}{\beta} \right)_T$$

En todos los casos, se consiguieron buenas correlaciones lineales, análisis que se desprende de la Figura 4.20. Las pendientes de las líneas representan el cambio de volumen estructural asociado a cada proceso, es decir, durante la formación y el decaimiento del estado excitado del complejo proteico, y durante el decaimiento de

especies de vida larga, multiplicadas por el respectivo rendimiento cuántico del proceso en cada caso. La señal rápida generó una contracción total de $\Delta V = - (1.9 \pm 0.5)$ mL/mol, el segundo componente produjo una expansión total de $\Delta V = (5.2 \pm 0.3)$ mL/mol y el tercer componente produjo una nueva contracción de $\Delta V = - (6.8 \pm 0.6)$ mL/mol. Recordando que no se vieron cambios en los espectros luego de varios pulsos, se puede decir además que no se apreció un cambio (dentro del error experimental) en el cambio de volumen total y la muestra volvió al estado fundamental luego de la excitación y de varios procesos de des-excitación.

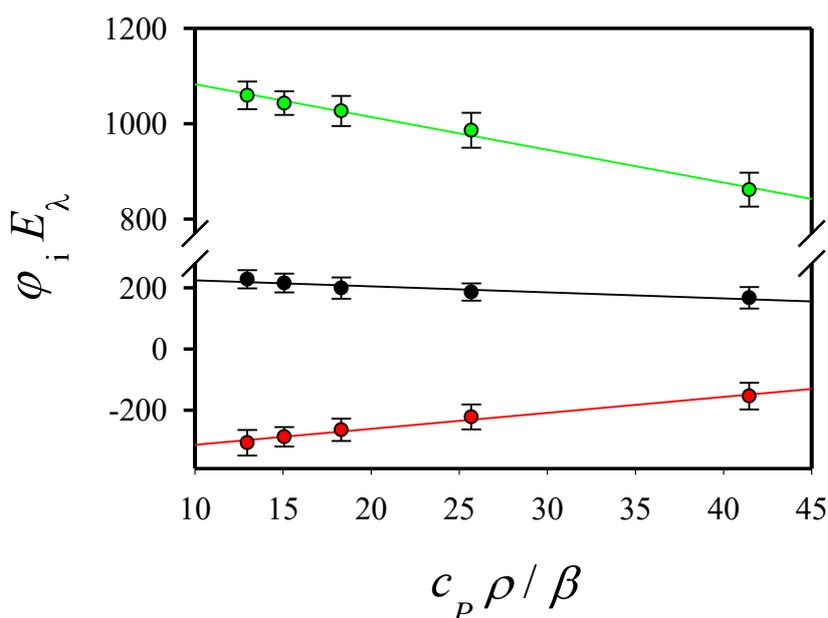


Figura 4.20: Valores de $E_\lambda \phi_i$ asociados a la formación (negro) y los decaimientos (rojo y verde) del complejo proteico vs $(c_p \rho / \beta)$ en el rango de temperatura de 7-32 °C. Las barras representan los valores máximos y mínimos de Φ que permiten un ajuste adecuado a los datos experimentales obtenidos.

El contenido energético de cada una de las especies puede estimarse utilizando el concepto de balance energético y despreciando el efecto de la fluorescencia mediante las siguientes ecuaciones:

$$\Delta H_{I_1} = \frac{E_\lambda - q_1}{\Phi_{I_1}}$$

$$\Delta H_{I_1-2} = \frac{q_2}{\Phi_{I_2}}$$

5. CONCLUSIONES

En la mayoría de los sistemas biológicos y en muchos compuestos naturales los procesos de emisión son poco eficientes y la energía absorbida es utilizada para iniciar una serie de procesos que involucran cambios estructurales permanentes o transitorios. En este último caso, al final del proceso, se produce una entrega neta de calor al medio. Los métodos fototérmicos, que proveen información a partir de la evolución temporal del calor entregado al medio por procesos de desactivación no radiactivos, han adquirido particular relevancia por sí mismos o combinados con otras espectroscopías, ya que permiten identificar especies transientes, eficiencias de formación, determinar cambios entálpicos, identificar cambios estructurales etc.

Las investigaciones llevadas a cabo durante el desarrollo de la presente Tesina permiten concluir, por un lado, que la técnica de LIOAS es un método no destructivo, simple de utilizar y rápido. Esta metodología permitió obtener información de los cambios conformacionales sufridos por las proteínas durante los procesos de transferencia de carga medidos en función del cambio de presión inducido en una muestra líquida luego de la excitación con un pulso láser, directamente relacionados con un cambio de volumen estructural. Además, permitió el análisis del tiempo de vida de las especies transientes durante la transferencia de carga, y la medida de los cambios energéticos sufridos por el sistema de estudio.

Se realizaron medidas espectrofotométricas para todas las muestras, obteniendo los espectros UV-visible tanto para referencias como para las soluciones empleadas (complejos, proteínas, complejo/proteína) y los máximos de absorbancia particulares de cada una. Además, a partir de dichos espectros obtenidos antes y después de la irradiación, se pudo comprobar la fotoestabilidad de las referencias calorimétricas elegidas para el estudio durante las medidas optoacústicas.

En un primer lugar se realizaron ensayos en sistemas más sencillos para obtener experiencia en las técnicas y el análisis de los resultados. Los resultados obtenidos para los complejos de Ru y Re mostraron muy buena concordancia con resultados de bibliografía [Borsarelli, C. D., & Braslavsky, S. E. (1999) y Maisuls, I., Cabrerizo, F. M., David-Gara, P. M., Epe, B., & Ruiz, G. T. (2018)].

Posteriormente se realizaron experimentos fotoacústicos en el sistema Citocromo c asociado a complejos de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$. En este sistema se pudieron observar buenas correlaciones para los procesos de decaimiento y formación de los transientes durante la transferencia de carga, y además pudieron observarse los procesos de contracción y expansión sufridos durante el análisis fotoacústico. El análisis de los cambios conformacionales sufridos por el sistema Citocromo c + complejo de Ru(II) mostraron una contracción seguida de dos expansiones volumétricas. La experiencia obtenida luego de este análisis fue utilizada posteriormente para el análisis de un sistema más complejo.

La simulación por deconvolución luego de la experiencia a distintas temperaturas permitió evidenciar los fenómenos fisicoquímicos que ocurrieron en la muestra al momento de la irradiación con el láser, como son parámetros cinéticos, entálpicos y volumétricos, a partir de los valores de las regresiones lineales obtenidos y la ecuación:

$$\varphi_i = \frac{q_i}{E_\lambda} + \frac{\Phi_i \Delta V_i}{E_\lambda} \left(\frac{C_p \rho}{\beta} \right)_T$$

La intensidad de la señal fotoacústica alcanzada para las muestras utilizadas mostró una dependencia directamente proporcional a la temperatura, así como también una similitud en la señal cuando las distintas muestras se sometieron a la misma temperatura de trabajo.

Considerando que no se vieron cambios significativos en los espectros de las muestras utilizadas, pudiendo afirmar además que son estables frente a la irradiación láser, se puede concluir que no se observó un cambio en el cambio de volumen total, siempre dentro del error experimental, y la muestra volvió al estado fundamental luego de varios procesos de excitación/des-excitación.

Por último, se realizaron los ensayos en un sistema proteico en solución análogo al sistema biológico. Los resultados obtenidos experimentalmente pueden observarse en el siguiente esquema, donde:

- El primer intermediario I_1 es asignado al complejo proteico excitado Citocromo c - Centro Cu_A de la CcO ($\text{Cu}^{\text{I}}_{\text{Cit.Ox.}} - \text{Fe}^{\text{II}}_{\text{Cit.c}}$)*;
- El segundo intermediario I_2 podría estar asociado al estado R del complejo proteico (R = especies ferrosas);

- El tercer intermediario I_3 podría atribuirse al estado A del complejo proteico con el oxígeno (A = especies de oxi-ferrosas);
- El ultimo intermediario I_4 se supone como la transferencia electrónica de corto rango entre el oxígeno y el grupo hemo ($\text{Cu}^{\text{I}}_{\text{Cit.Ox.}}-\text{Fe}^{\text{III}}_{\text{Cit.c}}$).

Finalmente, el sistema vuelve al estado inicial. Las abreviaturas utilizadas se basaron en el trabajo de Belevich, I., Borisov, V. B., & Verkhovsky, M. I. (2007).

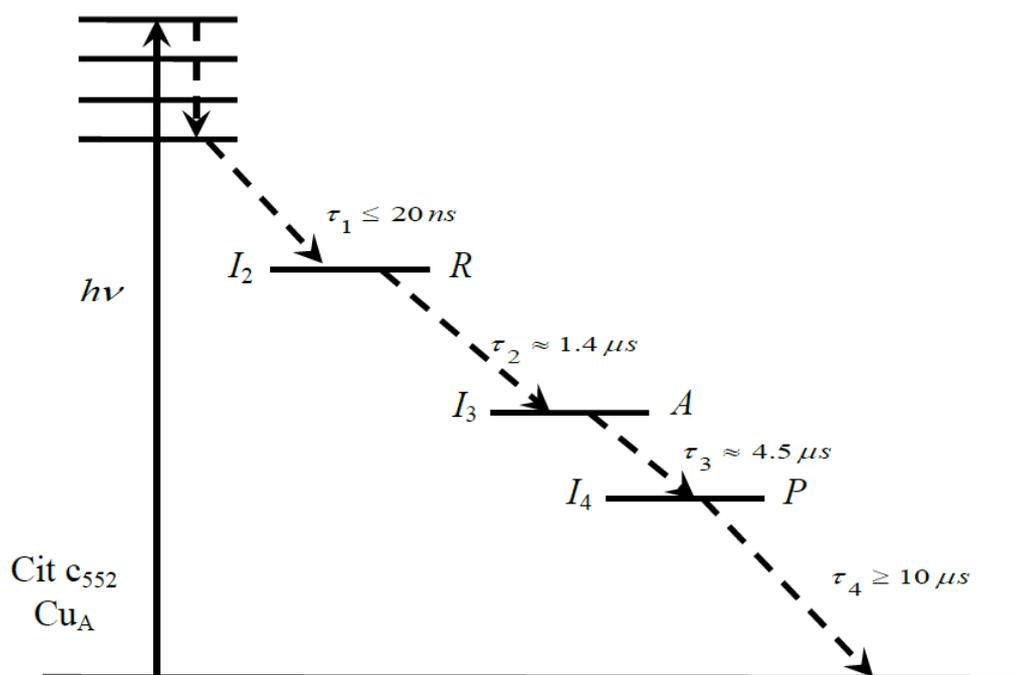


Figura 5.1: Esquema que muestra el proceso que tiene lugar luego de la excitación láser y el decaimiento del complejo proteico Citocromo c - Centro Cu_A de la CcO.

Luego de la excitación a 532 nm del complejo proteico se observaron 4 especies transientes. La excitación no degrada la proteína y el rendimiento cuántico de la fototransformación es ca. 1.

Los transientes observados mediante los experimentos de LIOAS fueron asignados al estado excitado del complejo proteico y los diferentes intermediaries en la transferencia electrónica al oxígeno. Dichos transientes fueron previamente observados por varios autores [Belevich, I., Borisov, V. B., & Verkhovsky, M. I. (2007), Hill, B. C. (1991), Hill, B. C., & Greenwood, C. (1984)].

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abbruzzetti, S., Crema, E., Masino, L., Vecchi, A., Viappiani, C., Small, J. R., ... & Small, E. W. (2000). Fast events in protein folding: structural volume changes accompanying the early events in the N→I transition of apomyoglobin induced by ultrafast pH jump. *Biophysical Journal*, 78(1), 405-415.
- Abriata, L. A. (2012). Analysis of copper–ligand bond lengths in X-ray structures of different types of copper sites in proteins. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 68(9), 1223-1231.
- Abriata, L. A. (2012). Utilization of NMR spectroscopy to study biological fluids and metabolic processes: Two introductory activities. *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, 40(4), 171-178.
- Abriata, L. A., & Vila, A. J. (2014). Redox-state sensing by hydrogen bonds in the CuA center of cytochrome c oxidase. *Journal of inorganic biochemistry*, 132, 18-20.
- Abriata, L. A., Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Gkazonis, P., Spyroulias, G. A., ... & Wang, S. (2008). Mechanism of CuA assembly. *Nature chemical biology*, 4(10), 599-601.
- Abriata, L. A., Ledesma, G. N., Pierattelli, R., & Vila, A. J. (2009). Electronic structure of the ground and excited states of the CuA site by NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 131(5), 1939-1946.
- Allmen, M. V., & Blatter, A. (2013). *Laser-beam interactions with materials: physical principles and applications (Vol. 2)*. Springer Science & Business Media.
- Alvarez-Paggi, D., Abriata, L. A., Murgida, D. H., & Vila, A. J. (2013). Native Cu A redox sites are largely resilient to pH variations within a physiological range. *Chemical Communications*, 49(47), 5381-5383.
- Alvarez-Paggi, D., Abriata, L. A., Murgida, D. H., & Vila, A. J. (2013). Native Cu A redox sites are largely resilient to pH variations within a physiological range. *Chemical Communications*, 49(47), 5381-5383.
- Andrés, G. O., Cabrerizo, F. M., Martínez-Junza, V., & Braslavsky, S. E. (2007). A Large Entropic Term Due to Water Rearrangement is Concomitant with the Photoproduction of Anionic Free-Base Porphyrin Triplet States in Aqueous Solutions. *Photochemistry and photobiology*, 83(3), 503-510.
- Andrés, G. O., Martínez-Junza, V., Crovetto, L., & Braslavsky, S. E. (2006). Photoinduced electron transfer from tetrasulfonated porphyrin to benzoquinone revisited. The structural volume-normalized entropy change correlates with Marcus reorganization energy. *The Journal of Physical Chemistry A*, 110(34), 10185-10190.
- Babcock, G. T., & Wikström, M. (1992). Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature*, 356(6367), 301-309.

- Belevich, I., Borisov, V. B., & Verkhovsky, M. I. (2007). Discovery of the true peroxy intermediate in the catalytic cycle of terminal oxidases by real-time measurement. *Journal of Biological Chemistry*, 282(39), 28514-28519.
- Bonetti, G., Vecli, A., & Viappiani, C. (1997). Reaction volume of water formation detected by time-resolved photoacoustics: photoinduced proton transfer between o-nitrobenzaldehyde and hydroxyls in water. *Chemical physics letters*, 269(3-4), 268-273.
- Borsarelli, C. D., & Braslavsky, S. E. (1997). Nature of the water structure inside the pools of reverse micelles sensed by laser-induced optoacoustic spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 101(31), 6036-6042.
- Borsarelli, C. D., & Braslavsky, S. E. (1998). Volume Changes Correlate with Enthalpy Changes during the Photoinduced Formation of the ³MLCT State of Ruthenium (II) Bipyridine Cyano Complexes in the Presence of Salts. A Case of the Entropy-Enthalpy Compensation Effect. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(32), 6231-6238.
- Borsarelli, C. D., & Braslavsky, S. E. (1999). Enthalpy, volume, and entropy changes associated with the electron transfer reaction between the ³MLCT state of Ru(Bpy)₃²⁺ and methyl viologen cation in aqueous solutions. *The Journal of Physical Chemistry A*, 103(12), 1719-1727.
- Borsarelli, C. D., Braslavsky, S. E., Sortino, S., Marconi, G., & Monti, S. (2000). Photodecarboxylation of Ketoprofen in Aqueous Solution. A Time-resolved Laser-induced Optoacoustic Study. *Photochemistry and photobiology*, 72(2), 163-171.
- Braslavsky, S. E. (1986). Photo acoustic and photothermal methods applied to the study of radiationless deactivation processes in biological systems and in substances of biological interest. *Photochemistry and Photobiology*, 43(6), 667-675.
- Braslavsky, S. E. (2003). Electron-transfer reactions studied by laser-induced optoacoustics: Learning about chromophore-medium (protein) interactions. *Pure and applied chemistry*, 75(8), 1031-1040.
- Braslavsky, S. E., & Heibel, G. E. (1992). Time-resolved photothermal and photoacoustic methods applied to photoinduced processes in solution. *Chemical reviews*, 92(6), 1381-1410.
- Callis, J. B., Parson, W. W., & Gouterman, M. (1972). Fast changes of enthalpy and volume on flash excitation of Chromatium chromatophores. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 267(2), 348-362.
- Chen, R. P. Y., Huang, J. J. T., Chen, H. L., Jan, H., Velusamy, M., Lee, C. T., ... & Chan, S. I. (2004). Measuring the refolding of β -sheets with different turn sequences on a nanosecond time scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(19), 7305-7310.
- Churio, M. S., Angermund, K. P., & Braslavsky, S. E. (1994). Molecular volume changes in cyanines. A laser-induced optoacoustic study. *Le Journal de Physique IV*, 4(C7), C7-323.

- Colombano, C. G., Braslavsky, S. E., Holzwarth, A. R., & Schaffner, K. (1990). Fluorescence quantum yields of 124-kDa phytochrome from oat upon excitation within different absorption bands. *Photochemistry and photobiology*, 52(1), 19-22.
- Cornish-Bowden, A. (2013). *Fundamentals of enzyme kinetics*. John Wiley & Sons.
- Crovetto, L., Martínez-Junza, V., & Braslavsky, S. E. (2006). Entropy changes drive the electron transfer reaction of triplet flavin mononucleotide from aromatic amino acids in cation-organized aqueous media. A laser-induced optoacoustic study. *Photochemistry and photobiology*, 82(1), 281-290.
- David Gara, P. M. (2008). *Extracción, caracterización de sustancias húmicas y su empleo en procesos fotoquímicos de interés ambiental* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- DeRosa, M. C., & Crutchley, R. J. (2002). Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 233, 351-371.
- Diebold, G. J. (1998). Theory of thin layer photoacoustic cells for determination of volume changes in solution. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(27), 5404-5408.
- Dixon, M., Hill, R., & Keilin, D. (1931). The absorption spectrum of the component c of cytochrome. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 109(760), 29-34.
- Fernández, C. O., Cricco, J. A., Slutter, C. E., Richards, J. H., Gray, H. B., & Vila, A. J. (2001). Axial ligand modulation of the electronic structures of binuclear copper sites: Analysis of paramagnetic ^1H NMR spectra of Met160Gln CuA. *Journal of the American Chemical Society*, 123(47), 11678-11685.
- Fernández, C. O., Cricco, J. A., Slutter, C. E., Richards, J. H., Gray, H. B., & Vila, A. J. (2001). Axial ligand modulation of the electronic structures of binuclear copper sites: Analysis of paramagnetic ^1H NMR spectra of Met160Gln CuA. *Journal of the American Chemical Society*, 123(47), 11678-11685.
- García-Fresnadillo, D., Georgiadou, Y., Orellana, G., Braun, A.M. and Oliveros, E. (1996), Singlet-Oxygen ($^1\Delta_g$) Production by Ruthenium(II) complexes containing polyazaheterocyclic ligands in methanol and in water. *Helvetica Chimica Acta*, **79**: 1222-1238
- Gensch, T., & Viappiani, C. (2003). Time-resolved photothermal methods: accessing time-resolved thermodynamics of photoinduced processes in chemistry and biology. *Photochemical & photobiological sciences*, 2(7), 699-721.
- Gordon, J. A., & Jencks, W. P. (1963). The relationship of structure to the effectiveness of denaturing agents for proteins. *Biochemistry*, 2(1), 47-57.
- Hill, B. C. (1991). The reaction of the electrostatic cytochrome c-cytochrome oxidase complex with oxygen. *Journal of Biological Chemistry*, 266(4), 2219-2226.
- Hill, B. C., & Greenwood, C. (1984). The reaction of fully reduced cytochrome c oxidase with oxygen studied by flow-flash spectrophotometry at room temperature.

Evidence for new pathways of electron transfer. *Biochemical Journal*, 218(3), 913-921.

Jabben, M., Braslavsky, S. E., & Schaffner, K. (1983). Laser-induced optoacoustic spectroscopy (OAS) of phytochrome in-vitro. *Le Journal de Physique Colloques*, 44(C6), C6-389.

Kumar, A., Sun, S. S., & Lees, A. J. (2009). Photophysics and photochemistry of organometallic rhenium diimine complexes. *Photophysics of Organometallics*, 37-71.

Kumar, A., Sun, S. S., & Lees, A. J. (2009). Photophysics and photochemistry of organometallic rhenium diimine complexes. *Photophysics of Organometallics*, 37-71.

Kurian, E., Prendergast, F. G., & Small, J. R. (1997). Photoacoustic analysis of proteins: volumetric signals and fluorescence quantum yields. *Biophysical journal*, 73(1), 466-476.

Ledesma, G. N., Murgida, D. H., Ly, H. K., Wackerbarth, H., Ulstrup, J., Costa-Filho, A. J., & Vila, A. J. (2007). The met axial ligand determines the redox potential in CuA sites. *Journal of the American Chemical Society*, 129(39), 11884-11885.

Lenci, F., Angelini, N., Ghetti, F., Sgarbossa, A., Losi, A., Vecli, A., ... & Cubeddu, R. (1995). Spectroscopic and photoacoustic studies of hypericin embedded in liposomes as a photoreceptor model. *Photochemistry and photobiology*, 62(1), 199-204.

Logunov, S. L., & El-Sayed, M. A. (1997). Redetermination of the quantum yield of photoisomerization and energy content in the K-intermediate of bacteriorhodopsin photocycle and its mutants by the photoacoustic technique. *The Journal of Physical Chemistry B*, 101(33), 6629-6633.

Losi, A., & Viappiani, C. (1998). Reaction volume and rate constants for the excited-state proton transfer in aqueous solutions of naphthols. *Chemical physics letters*, 289(5-6), 500-506.

Losi, A., Bedotti, R., & Viappiani, C. (1995). Time-resolved photoacoustics determination of intersystem crossing and singlet oxygen photosensitization quantum yields for 4, 5', 8-trimethylpsoralen. *The Journal of Physical Chemistry*, 99(43), 16162-16167.

Losi, A., Viappiani, C., & Crippa, P. R. (1994). The interaction of melanin with 8-methoxypsoralen: effect on radiative and nonradiative transitions. A fluorescence and pulsed photoacoustic study. *Photochemistry and photobiology*, 59, 596-602.

Louie, M. W., Fong, T. T. H., & Lo, K. K. W. (2011). Luminescent rhenium (I) polypyridine fluoros complexes as novel trifunctional biological probes. *Inorganic Chemistry*, 50(19), 9465-9471.

Maisuls, I., Cabrerizo, F. M., David-Gara, P. M., Epe, B., & Ruiz, G. T. (2018). DNA Oxidation Photoinduced by Norharmane Rhenium (I) Polypyridyl Complexes: Effect of the Bidentate N, N'-Ligands on the Damage Profile. *Chemistry—A European Journal*, 24(49), 12902-12911.

Malkin, S., Churio, M. S., Shochat, S., & Braslavsky, S. E. (1994). Photochemical energy storage and volume changes in the microsecond time range in bacterial

photosynthesis—a laser induced optoacoustic study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 23(1), 79-85.

Martí, C., Jürgens, O., Cuenca, O., Casals, M., & Nonell, S. (1996). Aromatic ketones as standards for singlet molecular oxygen O₂ (1Δg) photosensitization. Time-resolved photoacoustic and near-IR emission studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 97(1-2), 11-18.

Martínez Saavedra, H. H. (2015). *Fotofísica de compuestos de coordinación e interacción con proteínas pequeñas* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

Martínez Saavedra, H. H., Ragone, F., Ruiz, G. T., Gara, P. M. D., & Wolcan, E. (2014). Solvent Dependent Switching of 3MLLCT and 1IL Luminescent States in [CIRe (CO) 3 (Bathocuproinedisulfonate)] 2–: Spectroscopic and Computational Study. *The Journal of Physical Chemistry A*, 118(41), 9661-9674.

Martínez-Junza, V., Rizzi, A. C., Alagaratnam, S., Bell, T. D., Canters, G. W., & Braslavsky, S. E. (2009). Flavodoxin Relaxes in Microseconds Upon Excitation of the Flavin Chromophore: Detection of a UV–Visible Silent Intermediate by Laser Photocalorimetry. *Photochemistry and photobiology*, 85(1), 107-110.

Mauk, A. G. (1999). Biological electron-transfer reactions. *Essays in biochemistry*, 34, 101-124.

Melton, L. A., Ni, T., & Lu, Q. (1989). Photoacoustic calorimetry: a new cell design and improved analysis algorithms. *Review of scientific instruments*, 60(10), 3217-3223.

Mohan, C. (2003). *Buffers. A guide for the preparation and use of buffers in biological systems*, 20-21.

Morgada, M. N., Abriata, L. A., Zitare, U., Alvarez-Paggi, D., Murgida, D. H., & Vila, A. J. (2014). Control of the Electronic Ground State on an Electron-Transfer Copper Site by Second-Sphere Perturbations. *Angewandte Chemie*, 126(24), 6302-6306.

Muresanu, L., Pristovsek, P., L hr, F., Maneg, O., Mukrasch, M. D., R terjans, H., ... & L cke, C. (2006). The Electron Transfer Complex between Cytochrome c552 and the CuA Domain of the *Thermus thermophilus* ba3 Oxidase: A COMBINED NMR AND COMPUTATIONAL APPROACH. *Journal of Biological Chemistry*, 281(20), 14503-14513.

Murgida, D. H., Balsells, R. E., Crippa, P. R., & Viappiani, C. (1998). Type I photosensitized reactions of oxopurines. Kinetics and thermodynamics of the reaction with triplet benzophenone by time-resolved photoacoustic spectroscopy. *Chemical physics letters*, 294(6), 538-544.

Natali, M., Campagna, S., & Scandola, F. (2014). Photoinduced electron transfer across molecular bridges: electron-and hole-transfer superexchange pathways. *Chemical Society Reviews*, 43(12), 4005-4018.

Nemethy, G., Peer, W. J., & Scheraga, H. A. (1981). Effect of protein-solvent interactions on protein conformation. *Annual review of biophysics and bioengineering*, 10(1), 459-497.

- Norris, C. L., & Peters, K. S. (1993). A photoacoustic calorimetry study of horse carboxymyoglobin on the 10-nanosecond time scale. *Biophysical journal*, 65(4), 1660.
- Ogilby, P. R., & Foote, C. S. (1982). Chemistry of singlet oxygen. 36. Singlet molecular oxygen (1. DELTA. g) luminescence in solution following pulsed laser excitation. Solvent deuterium isotope effects on the lifetime of singlet oxygen. *Journal of the American Chemical Society*, 104(7), 2069-2070.
- Pan, L. P., Hibdon, S., Liu, R. Q., Durham, B., & Millett, F. (1993). Intracomplex electron transfer between ruthenium-cytochrome c derivatives and cytochrome c oxidase. *Biochemistry*, 32(33), 8492-8498.
- Peters, K. S. (1994). Time-resolved photoacoustic calorimetry: from carbenes to proteins. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 33(3), 294-302.
- Peters, K. S., & Snyder, G. J. (1988). Time-resolved photoacoustic calorimetry: probing the energetics and dynamics of fast chemical and biochemical reactions. *Science*, 241(4869), 1053-1057.
- Petroselli, G., Erra-Balsells, R., David Gara, P., & Bilmes, G. M. (2012). Photoacoustic and luminescence characterization of nitrogen heterocyclic aromatic UV-MALDI matrices in solution. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 11(6), 1062-1068.
- Puchenkov, O. V. (1995). Photoacoustic diagnostics of fast photochemical and photobiological processes. Analysis of inverse problem solution. *Biophysical chemistry*, 56(3), 241-261.
- Puchenkov, O. V. (1995). Photoacoustic diagnostics of fast photochemical and photobiological processes. Analysis of inverse problem solution. *Biophysical chemistry*, 56(3), 241-261.
- Puchenkov, O. V., & Malkin, S. (1996). Photoacoustic cell for dynamic measurements with nanosecond time resolution. *Review of scientific instruments*, 67(3), 672-680.
- Puchenkov, O. V., Kopf, Z., & Malkin, S. (1995). Photoacoustic diagnostics of laser-induced processes in reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1231(2), 197-212.
- Ragone, F., Gara, P. D., Einschlag, F. S. G., Lappin, A. G., Ferraudi, G. J., Wolcan, E., & Ruiz, G. T. (2018). Photophysics, photochemistry and thermally-induced redox reactions of a (Pterin) rhenium (I) complex. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 358, 147-156.
- Ragone, F., Saavedra, H. H. M., Gara, P. M. D., Ruiz, G. T., & Wolcan, E. (2013). Photosensitized generation of singlet oxygen from Re (I) complexes: a photophysical study using LIOAS and luminescence techniques. *The Journal of Physical Chemistry A*, 117(21), 4428-4435.
- Ramirez, B. E., Malmström, B. G., Winkler, J. R., & Gray, H. B. (1995). The currents of life: the terminal electron-transfer complex of respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(26), 11949.
- Rasse-Suriani, F. A., García-Einschlag, F. S., Rafti, M., Schmidt De Leon, T., David Gara, P. M., Erra-Balsells, R., & Cabrerizo, F. M. (2018). Photophysical and

Photochemical Properties of Naturally Occurring normelinonine F and Melinonine F Alkaloids and Structurally Related N (2)-and/or N (9)-methyl- β -carboline Derivatives. *Photochemistry and Photobiology*, 94(1), 36-51.

Richter, O. M., & Ludwig, B. (2003). Cytochrome c oxidase—structure, function, and physiology of a redox-driven molecular machine. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, 47-74.

Rizzi, A. C., Van Gestel, M., Liddell, P. A., Palacios, R. E., Moore, G. F., Kodis, G., ... & Braslavsky, S. E. (2008). Entropic changes control the charge separation process in triads mimicking photosynthetic charge separation. *The Journal of Physical Chemistry A*, 112(18), 4215-4223.

Rusak, D. A., Castle, B. C., Smith, B. W., & Winefordner, J. D. (1997). Fundamentals and applications of laser-induced breakdown spectroscopy. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 27(4), 257-290.

Saavedra, H. H. M., Ragone, F., Franca, C. A., Ruiz, G. T., Gara, P. M. D., & Wolcan, E. (2016). Solvent effects on the photophysical properties of Bu₄N [(4, 4'-bpy) Re (CO)₃ (bpy-5, 5'-diCOO)] complex. A combined experimental and computational study. *Journal of Organometallic Chemistry*, 817, 26-35.

Saavedra, H. H. M., Ragone, F., Franca, C. A., Ruiz, G. T., Gara, P. M. D., & Wolcan, E. (2016). Solvent effects on the photophysical properties of Bu₄N [(4, 4'-bpy) Re (CO)₃ (bpy-5, 5'-diCOO)] complex. A combined experimental and computational study. *Journal of Organometallic Chemistry*, 817, 26-35.

Saen-Oon, S., Lucas, M. F., & Guallar, V. (2013). Electron transfer in proteins: theory, applications and future perspectives. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15(37), 15271-15285.

Schlageter, B., Pörting, S., Strassburger, J., Moreno-Bondi, M. C., Braslavsky, S. E., Oliveros, E., & Braun, A. M. (1997). Development of an optoacoustic sensor module for pH and/or CO₂ determination in aqueous solutions. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 39(1-3), 443-447.

Schmidt, R., Tanielian, C., Dunsbach, R., & Wolff, C. (1994). Phenalenone, a universal reference compound for the determination of quantum yields of singlet oxygen O₂ (¹ Δ _g) sensitization. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 79(1-2), 11-17.

Schulenberg, P. J., & Braslavsky, S. E. (1997). *Biological Supramolecular Systems. Life and Earth Sciences*, 3, 57.

Schulenberg, P. J., Rohr, M., Gärtner, W., & Braslavsky, S. E. (1994). Photoinduced volume changes associated with the early transformations of bacteriorhodopsin: a laser-induced optoacoustic spectroscopy study. *Biophysical journal*, 66(3), 838-843.

Scurlock, R. D., Nonell, S., Braslavsky, S. E., & Ogilby, P. R. (1995). Effect of solvent on the radiative decay of singlet molecular oxygen (¹ Δ _g). *The Journal of Physical Chemistry*, 99(11), 3521-3526.

- Slutter, C. E., Sanders, D., Wittung, P., Malmström, B. G., Aasa, R., Richards, J. H., ... & Fee, J. A. (1996). Water-soluble, recombinant CuA-domain of the cytochrome ba₃ subunit II from *Thermus thermophilus*. *Biochemistry*, 35(11), 3387-3395.
- Small, J. R. (1992). [24] Deconvolution analysis for pulsed-laser photoacoustic. In *Methods in enzymology* (Vol. 210, pp. 505-521). Academic Press.
- Small, J. R., Libertini, L. J., & Small, E. W. (1992). Analysis of photoacoustic waveforms using the nonlinear least squares method. *Biophysical chemistry*, 42(1), 29-48.
- Solarz, R. W., & Paisner, J. A. (2017). *Laser spectroscopy and its applications*. Routledge.
- Song, K., Lee, Y. I., & Sneddon, J. (1997). Applications of laser-induced breakdown spectrometry. *Applied Spectroscopy Reviews*, 32(3), 183-235.
- Sun, S. S., & Lees, A. J. (2002). Transition metal based supramolecular systems: synthesis, photophysics, photochemistry and their potential applications as luminescent anion chemosensors. *Coordination chemistry reviews*, 230(1-2), 171-192.
- Tognoni, E., Palleschi, V., Corsi, M., & Cristoforetti, G. (2002). Quantitative micro-analysis by laser-induced breakdown spectroscopy: a review of the experimental approaches. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 57(7), 1115-1130.
- Viappiani, C., Abbruzzetti, S., Small, J. R., Libertini, L. J., & Small, E. W. (1998). An experimental methodology for measuring volume changes in proton transfer reactions in aqueous solutions. *Biophysical chemistry*, 73(1-2), 13-22.
- Voliani, V., Bizzarri, R., Nifosi, R., Abbruzzetti, S., Grandi, E., Viappiani, C., & Beltram, F. (2008). Cis- trans photoisomerization of fluorescent-protein chromophores. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(34), 10714-10722.
- Wang, X. Y., Del Guerso, A., & Schmechl, R. H. (2004). Photophysical behavior of transition metal complexes having interacting ligand localized and metal-to-ligand charge transfer states. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 5(1), 55-77.
- Weast, R. C., Astle, M. J., & Beyer, W. H. *Handbook of Chemistry and Physics* 67th edition 1986–1987.
- Zaballa, M. E., Abriata, L. A., Donaire, A., & Vila, A. J. (2012). Flexibility of the metal-binding region in apo-cupredoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(24), 9254-9259.
- Zaballa, M. E., Ziegler, L., Kosman, D. J., & Vila, A. J. (2010). NMR study of the exchange coupling in the trinuclear cluster of the multicopper oxidase Fet3p. *Journal of the American Chemical Society*, 132(32), 11191-11196.
- Zhang, D., & Mauzerall, D. (1996). Volume and enthalpy changes in the early steps of bacteriorhodopsin photocycle studied by time-resolved photoacoustics. *Biophysical journal*, 71(1), 381-388.