



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

“EFECTOS DE LA CONFORMACIÓN DEL NADH EN SU FOTOFÍSICA MOLECULAR”

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
Q. ANDREA JULETSY CADENA CAICEDO

TUTOR:
DR. JORGE PEÓN PERALTA
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX, ENERO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“A Dios por la sabiduría que me ha dado en otra etapa más de mi vida. A mis padres Luis Gabriel y María Elsa por su apoyo y amor incondicional, por ser la hermosa razón de mi vida. A mi hermano y amigo Gabriel Fernando por sus palabras de aliento en los momentos difíciles, por llenar mi vida de alegría con su existencia”

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Posgrado en Ciencias Químicas por abrirme las puertas y permitir enriquecer mis conocimientos.

Al Doctor Jorge Peón Peralta, por permitirme trabajar en su grupo de investigación, por su paciencia y apoyo a lo largo del desarrollo de mi maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por el proyecto 220392 y la beca otorgada, número de becario 596649 y Fronteras de la Ciencia 179.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT por el proyecto IN212814.

A mis compañeros de Espectroscopia Láser: Luis Gutiérrez, Mario Gutiérrez, Andrés Arroyo, Dehny Hernández, Leonardo Muñoz, Beatriz González por compartir conmigo esta etapa de mi vida. Un agradecimiento especial a Rafael López quien me acompañó constantemente en este proceso con su infinita paciencia y me transmitió sus conocimientos.

A la Dra. Nuria Esturau Escofet por sus aportes y colaboración en Resonancia Magnética Nuclear.

A los amigos y Doctores Cesar Guarín y Víctor Manuel Trejos por sus comentarios y aportes en esta tesis. Muy agradecida.

A los miembros del jurado: Dra. Alicia Negrón, Dra. Laura Domínguez, Dra. María del Carmen Ortega, Dr. Tomás Rocha y Dr. Miguel Costas por sus valiosos aportes en la revisión de este trabajo.

A mis amigos en México, personas con las que he compartido maravillosos momentos y me han brindado su valiosa amistad. Se les quiere.

RESUMEN

El dinucleótido de adenina y nicotinamida reducida (NADH) juega un papel crítico en la bioquímica celular y se utiliza con frecuencia como indicador fluorescente del estado metabólico de la célula. Una de las particularidades de esta biomolécula es que la nicotinamida reducida muestra fluorescencia. Otro aspecto particular de los cromóforos presentes en el NADH es que la adenina tiene un rendimiento cuántico de fluorescencia muy bajo y un tiempo de vida del primer estado excitado menor a los 100 femtosegundos. Desde hace algún tiempo se conoce que la excitación de la adenina en una conformación plegada del NADH inicia un proceso de transferencia de energía (TE) hacia la nicotinamida reducida, pero el mecanismo y en particular, la escala temporal de este proceso no ha sido explorado por técnicas de espectroscopia con resolución de femtosegundos. Además, no se han llevado a cabo investigaciones donde se excite directamente a la adenina y se estudien los procesos que puedan estar asociados a la dinámica de relajación en función de la conformación plegada y desplegada del NADH. Por otro lado, no existe evidencia de la cinética del proceso de TE y cómo este compite con el decaimiento ultrarrápido de la adenina, uno de los compuestos más estudiados que presenta conversión interna ultrarrápida por las intersecciones cónicas que involucran el estado electrónico basal.

El objetivo del trabajo de investigación consistió en estudiar los efectos de la conformación del NADH en su fotofísica molecular. En particular, sobre la competencia que existe entre el proceso de TE y el fenómeno de relajación ultrarrápido de la adenina a su estado basal cuando la molécula se encuentra en una conformación plegada. Además, se busca explicar la eficiencia que presenta la TE. Las mediciones se realizaron en soluciones de un amortiguador de fosfatos y metanol, las cuales favorecieron una conformación plegada y desplegada del NADH respectivamente y fueron verificadas por Resonancia Magnética Nuclear-ROESY. Por la técnica de espectroscopia estática de UV-visible y fluorescencia, se determinó una eficiencia de TE de 49% en la conformación plegada y 11% en la conformación desplegada del NADH. Por suma de frecuencias con resolución de femtosegundos, técnica central en nuestro estudio, se excitó selectivamente a la adenina (266 nm) dando seguimiento al decaimiento ultrarrápido de la adenina (≤ 100 fs) y al proceso de TE. Se observó por primera ocasión que el proceso de TE ocurre con un tiempo ≤ 100 fs

correspondiente a una constante cinética k_{TE} mayor a $1 \times 10^{13} \text{ s}^{-1}$. Además, con la excitación directa a la nicotinamida reducida (380 nm) se determinó el tiempo de decaimiento del estado electrónico excitado S_1 , observándose un valor de 383.6 ps en solución acuosa, y 330.2 ps en metanol. Estudios por anisotropía de fluorescencia demostraron que los momentos dipolares de transición (absorción y emisión) están orientados de forma paralela con excitación de 380 nm y no paralela con excitación de 266 nm con un valor β (ángulo entre los momentos dipolares de transición de absorción (adenina) y emisión (nicotinamida)) de 47.86° y 48.8° (266 nm) para las formas plegada y desplegada y 24.09° (380 nm). Por medio del modelado de Förster, fue posible concluir que debido a que el estado excitado S_1 de la adenina decae muy rápidamente, el proceso de migración excitónica (TE) es muy sensible a la distancia que pueda existir con la nicotinamida ya que existe una competencia cinética entre la TE y el decaimiento ultrarrápido. Finalmente, con base en los resultados obtenidos se demostró que es posible estudiar la dinámica molecular de las conformaciones del NADH en tiempo real, concluyendo que después de excitar a la adenina parte de su energía es transferida a la nicotinamida reducida y que el proceso debe ocurrir en un intervalo de tiempo inferior a los 100 fs para que exista competencia cinética con el proceso ultrarrápido de TE.

LISTA DE ACRÓNIMOS

NADH	Dinucleótido de adenina y nicotinamida reducida
A	Aceptor
D	Donador
TE	Transferencia de Energía
HOMO	Orbital Molecular más Alto Ocupado
LUMO	Orbital Molecular más Bajo Desocupado
2ω	Segundo armónico
3ω	Tercer armónico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
CI	Conversión Interna
UV	Radiación electromagnética ultravioleta
T	Estado triplete
S	Estado Singulete
QTAIM	Teoría Cuántica de los átomos en moléculas
τ	Tiempo de vida del estado excitado
Φ	Rendimiento cuántico
k_r	Constante de decaimiento del fluoróforo
k_{nr}	Constante de decaimiento no radiativa
S ₁	Primer singulete excitado
S ₀	Singulete basal
Å	Angstrom
μ_E	Momento dipolar del estado excitado
μ_B	Momento dipolar del estado basal
β -BBO	Beta Borato de Bario
AMP	Adenosina monofosfato
ppm	Partes por millón
u.a.	Unidades arbitrarias

RMN	Resonancia Magnética Nuclear
¹ H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear-protón
TRES	Time Resolved Emission Spectra
NOE	Nuclear Overhauser Enhancement
ROE	Rotating Frame Overhauser Enhancement
FHWM	Anchura a media altura (Full Width at Half Maximum)
τ_m	Tiempo de mezcla
λ_{exc}	Longitud de onda de excitación
λ_{emi}	Longitud de onda de emisión
k_{TE}	Constante cinética de transferencia de energía
k_{CI}	Constante cinética de conversión interna de la adenina
k_T	Constante cinética de decaimiento total de la nicotinamida
ATP	Adenosín trifosfato

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	10
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo principal.....	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
3. ANTECEDENTES	14
3.1. Fluoróforo intrínseco.....	14
3.2. Decaimiento ultrarrápido de la adenina.....	15
3.3. Conformaciones plegada y desplegada	16
4. MARCO TEÓRICO	18
4.1. Interacción radiación-materia.....	18
4.2. Naturaleza de los estados excitados	19
4.3. Relajación electrónica de los estados excitados	20
4.4. Transferencia de energía	22
4.5. Cinética de los procesos de desactivación de los estados excitados	25
4.6. Espectroscopía estática.....	26
4.6.1. Espectroscopía de absorción, emisión y excitación	26
4.6.2. Tiempos de vida del estado excitado y rendimiento cuántico de fluorescencia	27
4.6.3. Efectos del disolvente.....	28
4.7. Espectroscopía con resolución temporal	29
4.7.1. Resolución de fluorescencia por suma de frecuencias	30
4.7.2. Generación de segundo y tercer armónico	32
4.7.3. Anisotropía de fluorescencia	35
4.7.4. Convolución y ajuste de datos.....	36
4.7.5. Espectros de emisión resueltos en el tiempo	38
4.8. Resonancia Magnética Nuclear-ROESY.....	39
5. METODOLOGÍA	41
5.1. Reactivos y sustancias químicas	41
5.2. Espectroscopía estática.....	42
5.3. Espectroscopía con resolución temporal	43
5.3.1. Resolución de fluorescencia por suma de frecuencias	44
5.4. Transferencia de Energía-Förster	46

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
6.1. Resonancia Magnética Nuclear-ROESY.....	48
6.2. Espectroscopía estática.....	53
6.3. Espectroscopía con resolución temporal.....	56
6.3.1. Resolución de fluorescencia por suma de frecuencias.....	56
6.3.2. Espectros de emisión resueltos en el tiempo.....	69
6.3.3. Anisotropía de fluorescencia.....	71
6.4. Transferencia de energía- Förster.....	73
7. CONCLUSIONES	75
8. ANEXOS	78
8.1. Sistema Láser.....	78
8.1.1. Láser titanio:zafiro.....	78
8.1.2. Absorción, emisión estimulada y emisión espontánea.....	79
8.1.3. Inversión de población.....	82
8.1.4. Oscilador y amarre de modos.....	83
8.1.5. Efecto Kerr.....	84
8.1.6. Amplificación de pulsos.....	85
8.1.7. Dispersión de retardo de grupo GDD.....	86
8.1.8. Expansión y compresión temporal de pulsos.....	88
9. REFERENCIAS	90

1. INTRODUCCIÓN

Un fluoróforo es una molécula que emite fluorescencia después de ser excitada con luz donde la intensidad y la longitud de onda de la luz emitida dependerán tanto del fluoróforo como de su ambiente químico. Los fluoróforos pueden ser divididos en dos clases principales: extrínsecos e intrínsecos. Los primeros se caracterizan por ser añadidos a una muestra cuando esta no presenta la propiedad de emitir fluorescencia por sí misma, y los fluoróforos intrínsecos que se encuentran de manera natural y por si mismos presentan fluorescencia.¹

El dinucleótido de adenina y nicotinamida reducida (NADH), es una molécula biológica o coenzima que participa en el transporte de electrones. Es un ejemplo claro de un fluoróforo intrínseco. El NADH se caracteriza por ser altamente fluorescente y absorber en el ultravioleta, con longitudes de onda de absorción y emisión máximas de 340 nm y 460 nm, respectivamente.¹ Esta coenzima ha sido estudiada presentando algunas características que la hacen uno de los fluoróforos más importantes en el campo de espectroscopía de fluorescencia. Por ejemplo, el NADH, es usado como biomarcador debido a sus características fluorescentes por parte de la nicotinamida. Esta propiedad se ha empleado por ejemplo, en la detección de apoptosis temprana en las células.² Además, su estructura compuesta por dos nucleótidos adenina y nicotinamida reducida unidos entre sí por grupos pirofosfato, implica que esta molécula presente dos conformaciones: plegada y desplegada, las cuales son favorecidas a su vez por disolventes como soluciones acuosas y metanol, (Figura 1.1) respectivamente. Es posible estudiar el equilibrio entre estas formas por medio de resonancia magnética nuclear³ y espectroscopia de fluorescencia.⁴ Por otro lado, estudios realizados por Blacker⁵ comprueban un valor de tiempo de vida del estado excitado más corto para el NADH libre en comparación con un tiempo de vida largo de NADH unido a proteínas, lo anterior, debido a las variaciones que existen en el nivel de restricción conformacional del NADH en sus correspondientes sitios de unión.

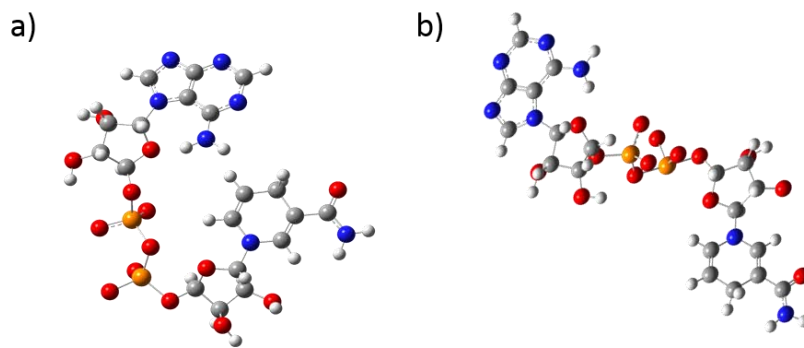


Figura 1.1. Conformaciones de la coenzima NADH. a) Plegada b) Desplegada.

El nucleótido adenina, una de las cinco bases nitrogenadas que forman parte de los ácidos nucleicos como el RNA y DNA y que también se encuentra en el NADH, tiene un rendimiento cuántico de fluorescencia extremadamente bajo, del orden de 10^{-5} . El tiempo de vida de su primer estado excitado es menor a los 100 fs debido a las intersecciones cónicas existentes entre diversos estados electrónicos, incluyendo al basal.⁶ Una intersección cónica se define como un cruce de superficies de energía potencial correspondientes a distintos estados electrónicos, como los estados S_1 y S_0 . En la adenina, la existencia de esta intersección conlleva a que exista un decaimiento ultrarrápido del estado excitado.^{6,7,8,9}

Desde el año 1957, se ha tenido la noción de que el NADH puede llegar a presentar TE por parte de la adenina a la nicotinamida reducida. Asimismo, el rendimiento de este proceso varía en función de la conformación en la que se encuentre (plegada o desplegada) el NADH.¹⁰ Estudios previos demuestran que existe dicha migración excitónica (TE),^{11,12,13} sin embargo, la descripción de este proceso no es completa, ya que solo se han realizado estudios de espectroscopia estática. Estos métodos tienen la función de registrar una señal de un promedio de eventos dinámicos que ocurren en una molécula. Es por ello que se propone estudiar el proceso de TE por una técnica de espectroscopía con resolución temporal de femtosegundos que logra monitorear este tipo de procesos en escalas de tiempos muy breves, y que permite observar la dinámica molecular en tiempo real. En particular, dentro de la espectroscopia con resolución de femtosegundos, la técnica de suma de frecuencias posee la capacidad de medir la intensidad de fluorescencia de una muestra como función del tiempo.

El estudio que se presenta en esta tesis acerca de la TE por parte de la adenina a la nicotinamida reducida se realiza con un conjunto con técnicas espectroscópicas y considera un modelado tipo Förster. Debido a que el NADH posee una banda de absorción en una longitud de onda de 260 nm y un coeficiente de absorptividad alto, se logró estudiar este proceso de forma selectiva con excitación directa y aislada de la adenina. Después, por la técnica de suma de frecuencias, empleando como fuente de excitación el tercer armónico ($\lambda_{exc} = 266$ nm) de un láser de titanio:zafiro, se detectó la emisión del estado excitado de la nicotinamida reducida excitando a la adenina, lo que refleja un alto grado de TE en la conformación plegada (solución acuosa amortiguadora de fosfatos-pH = 7.4). Como se muestra en la sección de resultados, fue posible observar de manera directa la existencia de una competencia cinética entre los procesos de TE y decaimiento ultrarrápido de la adenina. En el caso de una conformación desplegada (soluciones de metanol), se logró concluir que existe un valor mínimo de TE permitiendo que se observe directamente el decaimiento ultrarrápido del estado excitado de la adenina en los primeros femtosegundos. Finalmente, empleando como fuente de excitación el segundo armónico ($\lambda_{exc} = 380$ nm) del láser, fue posible observar la emisión directa de la nicotinamida reducida (Figura 1.2).

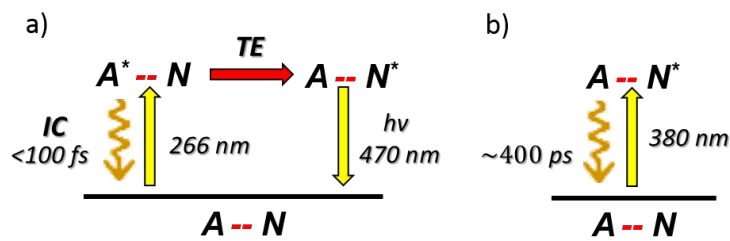


Figura 1.2. Diagrama que ilustra a) transferencia de energía b) emisión directa de la nicotinamida reducida.

En este trabajo se buscó describir la competencia cinética entre el decaimiento ultrarrápido de la adenina y la TE. Se buscará entender cómo este fenómeno a su vez causa que la adenina sea aún más sensible a la distancia que esta pueda presentar con la nicotinamida en la conformación plegada, la adenina absorberá y transferirá parte de su energía a la nicotinamida reducida. Además, se obtendrán los tiempos característicos de los procesos involucrados en el sistema como el tiempo de vida del estado excitado de la nicotinamida en estado reducido, los tiempos de relajación del disolvente, la relajación ultrarrápida de la adenina y la duración del proceso de TE.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

- Estudiar por suma de frecuencias con resolución en femtosegundos, así como por espectroscopia estática y modelado Förster, el proceso de TE en NADH, el cual sucede después de la excitación de la adenina hacia la nicotinamida. Asimismo, se estudiará cómo este proceso es afectado por la conformación plegada o desplegada que presenta el NADH.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar las propiedades fotofísicas del NADH en solución acuosa y metanol por medio de los espectros de absorción, emisión y excitación estáticos del NADH.
- Estudiar el proceso ultrarrápido de la TE de las conformaciones plegada y desplegada del NADH, así como la dinámica de relajación ultrarrápida de la adenina por medio de la técnica de suma de frecuencias.
- Determinar las constantes cinéticas de velocidad de la TE y CI.
- Calcular el rendimiento de TE por medio de espectroscopia estática de las diferentes mezclas solución amortiguadora-metanol.
- Estudiar la competencia cinética que existe entre la TE y el decaimiento ultrarrápido de la adenina.
- Estudiar la emisión directa de la nicotinamida reducida por la técnica de suma de frecuencias con generación de segundo armónico.
- Determinar la evolución espectral que presenta el NADH en disolventes como solución amortiguadora de fosfatos y metanol.
- Determinar los valores de anisotropía para las dos conformaciones y la orientación del momento dipolar de transición de absorción (adenina) con respecto al momento dipolar de transición del proceso emisivo (nicotinamida).
- Determinar el tiempo en el que transcurre el proceso de TE y los tiempos de vida de los estados excitados de la adenina y la nicotinamida reducida.
- Estudiar la TE por el modelado de Förster en función de la distancia.

3. ANTECEDENTES

El NADH es una coenzima que regula la reacción de oxidación y reducción en el metabolismo celular. Su función principal es el intercambio de electrones y protones y la producción de energía de todas las células.¹⁴ Además, se caracteriza por ser uno de los cofactores más abundantes empleados por las proteínas y las enzimas.¹⁵ Vías metabólicas como la β -oxidación (proceso catabólico de los ácidos grasos) y el ciclo de Krebs producen NADH que participa en la fosforilación oxidativa y la producción de ATP.¹⁶ El NADH se escoge como molécula de estudio debido a tres características relevantes que presenta:

- Fluorescencia por parte de la nicotinamida reducida con un rendimiento de fluorescencia de 0.02.¹⁷
- Decaimiento ultrarrápido por parte de la adenina, uno de los nucleótidos que conforman su estructura.
- Conformaciones plegada y desplegada que presenta su estructura según se indicó en la introducción.

3.1. Fluoróforo intrínseco

La fluorescencia intrínseca (autofluorescencia) del NADH por parte de la nicotinamida reducida permite que ésta sea usada como biomarcador óptico para la detección de apoptosis en fase temprana.¹⁸ El NADH se encuentra en gran cantidad en la mitocondria y está implicado en el potencial de membrana de ésta (que es un parámetro importante del estado redox de las células).¹⁹ Se ha observado que el cambio del tiempo de vida de fluorescencia del NADH está asociado con la apoptosis inducida por las Estaurosporinas (STs) mediada por la mitocondria,² debido a que este organelo actúa como el escenario integrador de una cadena de estímulos inductores para la apoptosis celular y desencadena así, una serie de cascadas de señalización que terminan con la muerte de la célula.¹⁸ Además, el tiempo de vida de fluorescencia del NADH presenta una relación con el consumo de oxígeno y el nivel de ATP durante la transformación de la energía desde la glucólisis hasta la fosforilación oxidativa.²⁰⁻²¹

El tiempo de vida fluorescencia del NADH en forma libre en disolución acuosa presenta un valor de alrededor de 0.4 ns.^{1,5,22,23} Este tiempo aumenta hasta cuatro veces su valor debido a

la unión con una proteína o una enzima en su sitio activo.^{5,1} Sin embargo, dependiendo de la proteína o enzima a la cual la coenzima está unida, el tiempo de vida de fluorescencia aumenta en menor o mayor magnitud según sea el caso. Algunos ejemplos son las enzimas aldehído deshidrogenasa y malato deshidrogenasa, las cuales al estar unidas al NADH logran que esta coenzima tenga un tiempo de vida de fluorescencia de 7 ns²⁴ ns y 0.9 ns,²⁵ respectivamente. Además, el cambio en el tiempo de vida de fluorescencia del NADH conlleva a que se logre medir las constantes de disociación, las cuales son útiles en la cinética enzimática y por ende, en los cambios en el estado redox de células vivas.^{25,26}

3.2. Decaimiento ultrarrápido de la adenina

Se ha investigado la fotofísica de la adenina, una de las bases nitrogenadas del ADN buscando comprender los fotoprocesos de este cromóforo.⁷ Se conoce que la desactivación de una molécula desde su estado electrónico excitado a su estado electrónico basal depende de la estructura química y electrónica de esta, así como del medio en el cual se encuentra.²⁷ Por medio de técnicas de espectroscopía estática se ha demostrado que el rendimiento cuántico de fluorescencia de esta base púrica en disolución acuosa es del orden de 10^{-5} lo que indica que la gran mayoría de estados electrónicos excitados decaen de forma no radiativa.²⁸ Por otro lado, técnicas de espectroscopía por resolución temporal han determinado un tiempo de vida ≤ 100 fs desde el primer estado excitado S_1 de la adenina.^{6,29}

El decaimiento ultrarrápido de la adenina se debe a un proceso de conversión interna (CI) el cual se da por la existencia de intersecciones cónicas que describen el cruce de superficies de energía potencial del estado excitado S_1 y del estado basal S_0 .⁷ Cabe mencionar que las principales características fotofísicas mencionadas anteriormente se confieren al alto grado de efectividad por parte de las intersecciones cónicas. Numerosos resultados teóricos acerca del decaimiento de la adenina describen el proceso de desactivación ultrarrápido después de una excitación UV a causa de las intersecciones cónicas,⁸ las cuales durante los últimos años han demostrado desempeñar un papel central en la mayoría de los procesos moleculares que involucran estados excitados.²⁸

3.3. Conformaciones plegada y desplegada

El NADH está compuesto por dos nucleótidos adenina y nicotinamida reducida que se encuentran unidos entre sí por medio de ribosas y grupos pirofosfatos¹⁵ como se ilustra en la Figura 3.1. Estudios de espectroscopía de fluorescencia,⁴ espectroscopía Raman,^{30,31} Resonancia Magnética Nuclear³ y cristalografía de rayos X³² han sido usados para obtener información estructural.

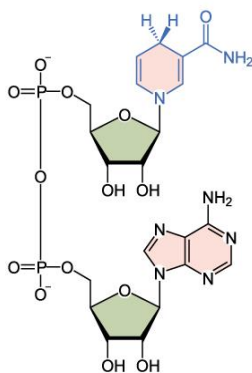


Figura 3.1. Estructura de la coenzima NADH.

Respecto a la estructura de la coenzima NADH, existen dos conformaciones en solución: una conformación plegada, en donde la nicotinamida reducida y adenina están apiladas a una distancia aproximada de 4.7 Å, y una conformación desplegada en donde los dos nucleótidos se encuentran separados a una distancia promedio de 15.5 Å.¹⁵ Normalmente, en solución estas conformaciones están en equilibrio entre sí como lo indican estudios de dinámica molecular,¹⁵ Resonancia Magnética Nuclear³ y fluorescencia.⁴ Además, algunos factores como la temperatura, el pH, la concentración de iones metálicos como Al^{3+} y la polaridad del disolvente modifican el plegamiento de la coenzima y a su vez el tiempo de vida de ésta.¹⁴

En trabajos de Resonancia Magnética Nuclear por medio del análisis en los desplazamientos químicos que sufren los protones en función de la temperatura, soluciones acuosas, metanol y urea¹³ se estudiaron los parámetros termodinámicos básicos que rigen el plegamiento de la molécula. En cuanto a la parte teórica, se han realizado diversos estudios computacionales que describen el comportamiento estructural de la coenzima. A pesar de la complejidad del sistema, se han podido realizar cálculos cuánticos en los que se ha investigado el cambio conformacional del NADH en solución y la interacción de esta molécula con cationes de

aluminio, el cual favorece la conformación plegada del NADH debido a la formación de una estructura más rígida a través de la unión del aluminio al oxígeno del grupo pirofosfato.^{14,15} Estos estudios indican que las conformaciones plegadas de esta molécula corresponden a distancias adenina-nicotinamida de alrededor de 5 Å.

Finalmente, cabe mencionar que los fotoprocesos del NADH han sido escasamente estudiados por métodos modernos de espectroscopia por resolución temporal de femtosegundos. Los experimentos de absorción transitoria realizados con resolución de picosegundos y nanosegundos por excitación de la nicotinamida reducida no exploran los detalles de los eventos del estado excitado y principalmente se centran en los fotoproductos tales como formas iónicas y radicales de NADH y electrones solvatados.^{33,17,34,35} Además, la técnica presenta poca sensibilidad.³⁶ Es por ello que en este trabajo se estudia por suma de frecuencias con resolución de femtosegundos el proceso de TE y como éste compite con el decaimiento ultrarrápido de la adenina logrando obtener resultados en tiempo real de la dinámica de la molécula.

4. MARCO TEÓRICO

Es importante conocer los fundamentos en los que se basa el estudio de los estados electrónicamente excitados, por tal razón en este capítulo se abordan algunos conceptos como la interacción radiación-materia, la evolución de un estado excitado y su posterior relajación por los diferentes mecanismos de desactivación. Por otro lado, se hace énfasis en el proceso de transferencia de energía y se revisan aspectos generales relacionados con espectroscopia estática y espectroscopia con resolución temporal, con el fin de entender la fotodinámica de la coenzima a estudiar. Además, se hace hincapié en algunos fundamentos de Resonancia Magnética Nuclear-ROESY como técnica analítica de verificación de las conformaciones que presenta la coenzima NADH.

4.1. Interacción radiación-materia

Cuando la radiación electromagnética atraviesa un sistema de partículas cargadas, como el que forman los electrones y núcleos constituyentes de los átomos y moléculas, los campos magnético y eléctrico de la radiación interactúan con las cargas provocando una perturbación dependiente del tiempo que puede inducir transiciones entre los diferentes estados cuánticos del sistema. La absorción de la luz por parte de una molécula tiene lugar solo si el fotón provee de energía suficiente para promover el sistema de un nivel a otro y si la onda electromagnética puede interactuar con el sistema. Esta interacción está definida por:

$$U_{i \rightarrow f} = \langle \Psi_f | \hat{\mu} | \Psi_i \rangle \quad \text{Ec. 4.1}$$

donde $\hat{\mu}$ es el momento dipolar eléctrico y Ψ_i y Ψ_f son las funciones de onda de los estados inicial y final, respectivamente como se describe en la ecuación.³⁷

Por otro lado, para que exista una transición desde un estado basal a un estado excitado se hace necesario cumplir entre otras condiciones el uso de la regla de selección de espín, la cual hace alusión a una transición permitida solo cuando los estados electrónicos presentan la misma multiplicidad.

4.2. Naturaleza de los estados excitados

El estado electrónico de una molécula está basado en las propiedades de todos los electrones en todos sus orbitales. La función de onda de un estado electrónico es una combinación de las funciones de onda de cada uno de los electrones en los orbitales de la molécula de la cual forman parte. La manera en que una molécula absorbe radiación electromagnética es por medio de un proceso mecánico cuántico, donde una molécula es transformada de su estado basal a su estado excitado. En los átomos, la absorción involucra la promoción de un electrón de una capa orbital externa hacia un orbital vacío de mayor energía. Los electrones de una molécula que inicialmente se encuentran en los orbitales moleculares de menor energía (HOMO, highest occupied molecular orbital) tienden a ubicarse en los orbitales desocupados de mayor energía (LUMO, lowest unoccupied molecular orbital). Cuando un electrón en una molécula es promovido de un orbital a otro, cambia el estado de la molécula y entonces es importante considerar los estados de esta involucrados, en lugar de considerar solamente los orbitales asociados en la promoción del electrón. Una molécula en un estado excitado tendrá una distribución electrónica y una energía diferente al estado basal que le permitirá reaccionar de forma distinta a una molécula en el estado basal (menor energía). Existe solo un estado basal para cada molécula, sin embargo, existen diversos estados excitados posibles para moléculas simples y la naturaleza exacta de los cuales depende los tipos de orbitales involucrados.³⁸

Aunque la naturaleza exacta de los estados excitados muestra una gran variabilidad dependiente de parámetros específicos para una molécula dada, se pueden considerar algunas moléculas simples para ejemplificarlos como el etileno ($\text{CH}_2 = \text{CH}_2$) donde los dos átomos de carbono están unidos por un enlace σ y un enlace tipo π . En esta molécula la absorción de un fotón de energía apropiada promueve uno de los electrones π a un orbital antienlazante tipo π^* , transición denotada como $\pi \rightarrow \pi^*$ y la excitación de un electrón del orbital enlazante π al orbital antienlazante σ^* ocurre cuando la energía del fotón es igual a la diferencia de energía entre el estado basal y el estado excitado, transición denotada como $\pi \rightarrow \sigma^*$. Por otro lado, una molécula podría también tener electrones no enlazantes localizados en heteroátomos como oxígeno y nitrógeno como lo es en el caso del formaldehído. Los

correspondientes orbitales moleculares son llamados n . La promoción de un orbital no enlazante a un orbital antienlazante es posible, y la transición asociada se denota como $n \rightarrow \pi^*$.

4.3. Relajación electrónica de los estados excitados

La luminiscencia es la emisión de luz de cualquier sustancia y ocurre desde los estados excitados electrónicamente. Dicha emisión se divide en dos categorías: fluorescencia y fosforescencia, dependiendo de la naturaleza del estado excitado. Una vez que las especies son excitadas por la absorción de un fotón, éstas se relajan al estado basal con un tiempo de vida característico, liberando un exceso de energía en forma de fotones. Los diagramas de Jablonski (Figura 4.1) se utilizan para visualizar los procesos involucrados en la relajación espontánea de una molécula que ha sido excitada por medio de la interacción con la radiación electromagnética.¹

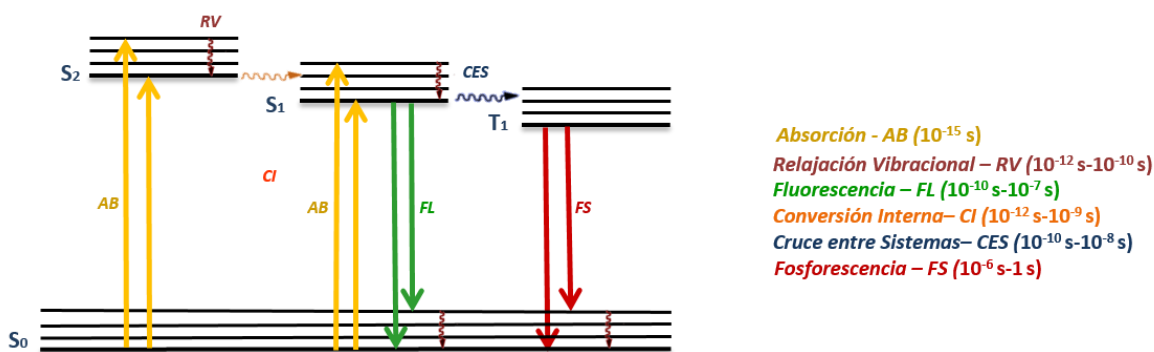


Figura 4.1. Diagrama de Jablonski. Se observan los diferentes procesos de relajación electrónica de los estados excitados con su respectivo intervalo de tiempo.

Los estados electrónicos singuletes se representan por S_0 para el estado basal, y $S_1, S_2 \dots S_n$ para los estados electrónicos singuletes excitados superiores, mientras que los estados tripletes excitados se denotan por $T_1, T_2 \dots T_n$. Por otro lado, a cada nivel de energía electrónica le corresponden varios niveles de energía vibracional. La absorción de un fotón deja a la molécula en un estado electrónico excitado y a su vez en uno de sus estados vibracionales. La molécula en su estado excitado puede relajarse o desactivarse mediante diferentes mecanismos.

Los procesos de desactivación se dividen en dos categorías: Transiciones radiativas que se caracterizan por llevar a cabo la emisión de fotones (fluorescencia y fosforescencia), y las transiciones no radiativas como conversión interna, relajación vibracional y cruce entre sistemas las cuales decaen a estados excitados de menor energía sin la emisión de un fotón. A continuación, se abordan los conceptos generales de cada uno de estos procesos de desactivación.¹

- Fluorescencia: Proceso de emisión de fotones acompañado de una transición del estado superior o excitado $S_1 \rightarrow S_0$. Este proceso se lleva a cabo desde el estado vibracional de menor energía del estado S_1 (Regla de Kasha) hasta uno de los estados vibracionales del estado basal S_0 . Una de las características de este proceso es que la energía de emisión es menor a la energía de absorción.
- Conversión Interna: Este proceso se caracteriza por ser una transición no radiativa entre dos estados electrónicos excitados isoenergéticos con la misma multiplicidad de espín $S_n \rightarrow S_{n-1}$ o $T_n \rightarrow T_{n-1}$.
- Relajación Vibracional: Tiene lugar durante las colisiones entre moléculas excitadas y las moléculas del disolvente. La relajación vibracional es un proceso en donde las moléculas en disolución se relajan hacia un estado vibracional de menor energía del estado electrónico excitado de menor energía.
- Cruce entre Sistemas: Es una transición no radiativa entre dos niveles isoenergéticos pertenecientes a estados de diferente multiplicidad de espín $S_n \rightarrow T_n$. En principio, se caracteriza por ser una transición prohibida por la regla de selección del espín, sin embargo, si el acoplamiento entre el momento magnético orbital y el momento magnético de espín (acoplamiento espín-orbita) es suficientemente grande, estas transiciones pueden ser muy eficientes.
- Fosforescencia: Es una transición radiativa desde el nivel vibracional del primer estado electrónico excitado T_1 hacia el estado electrónico basal S_0 . Cabe decir que también es una transición prohibida por espín, con una constante radiativa muy

pequeña. Sin embargo, al igual que un proceso de cruce entre sistemas, es una transición permitida debido al acoplamiento espín-orbita.

Existen otros procesos de relajación de los estados electrónicos excitados como la transferencia de energía.

4.4. Transferencia de energía

La TE se caracteriza por ser una de las herramientas más populares que estudian la dinámica molecular, además es un fenómeno electrodinámico que puede ser explicado utilizando la física clásica. Este proceso ocurre entre un donador (D) en estado excitado y un aceptor (A) en el estado basal. En el proceso fotofísico el donador excitado transfiere toda su energía de excitación al aceptor (Figura 4.2) de tal forma que el tiempo de vida del estado excitado de D disminuye.³⁹

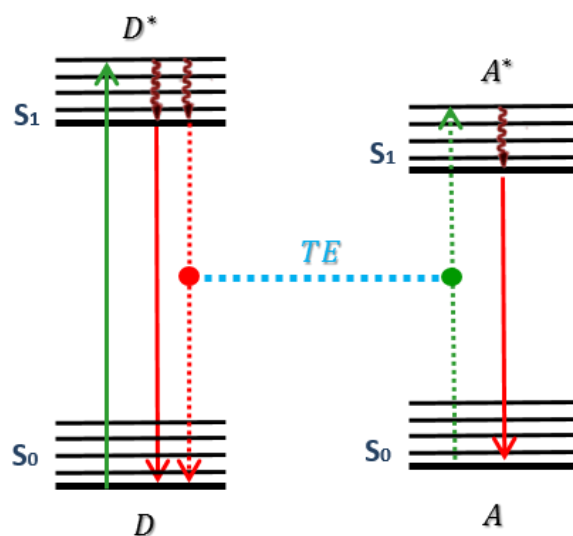


Figura 4.2. Esquema de TE entre dos moléculas. Las transiciones de absorción y emisión son representadas por las líneas sólidas verticales (verde y roja, respectivamente), la relajación vibracional se indica por una línea ondulada (café) y la TE representa por las líneas punteadas de color celeste.

Además, la TE es un proceso mecánico cuántico y requiere que el espectro de emisión de fluorescencia del D se superponga con el espectro de absorción del A. La teoría de Förster está basada en la regla de oro de Fermi, en donde la transferencia de energía de excitación se considera ser la transición entre los estados electrónicos de D y A denotados como ϕ_e^D ϕ_b^A y

ϕ_b^D ϕ_e^A (donde b y e representan el estado basal y excitado respectivamente) promovidos a través de una interacción Coulómbica de dipolo-dipolo entre D y A. Ahora bien, las hipótesis de Förster son las siguientes:

- Una aproximación dipolo-dipolo puede emplearse para el acoplamiento electrónico entre D y A.
- La relajación vibracional después de la excitación de D, tiene lugar a una escala de tiempo más rápida en comparación con la TE.
- El proceso de TE es irreversible debido al acoplamiento que existe entre las interacciones soluto-disolvente, el cual hace que una vez que se ha realizado la TE, el aceptor rápidamente se relaja vibracionalmente con lo cual se pierde la resonancia entre las transiciones del donador y el aceptor (ver línea ondulada en la columna del aceptor en la Figura 4.2).⁴⁰

Con las consideraciones anteriores, el enfoque de la regla de oro de Fermi se sigue para obtener la expresión del proceso de TE según lo que se describe a continuación. Si consideramos un sistema D-A, con D en un estado excitado, teniendo M niveles de energía vibracionales los cuales se consideran estar asociados con el estado excitado y A en el estado basal con N niveles de energía vibracionales asociados con el estado basal. La transferencia de energía en el sistema D-A es la transición entre la función de onda del estado excitado del donador $\Psi_e^D(r_D; R_D) = \phi_e^D(r_D; R_D)\chi_{De}$ teniendo una energía E_{DeM} y el estado basal del aceptor $\Psi_b^A(r_A; R_A) = \phi_b^A(r_A; R_A)\chi_{Ab}$ con una energía E_{AbN} , donde χ_{De} y χ_{Ab} representan los estados nucleares de D y A. De acuerdo a la regla de oro de Fermi la tasa de transferencia está dada por:

$$k_{TE} = \frac{2\pi}{\hbar} \sum_M \sum_N f(E_{DeM_D}) f(E_{AbN_A}) |\langle \Psi_{eM_D}^D, \Psi_{bN_A}^A | V_{DA} | \Psi_{eM_A}^A, \Psi_{bN_D}^D \rangle|^2 \times \delta(E_{DeM_D} + E_{AbN_A} - E_{AeM_A} + E_{DbN_D}) \quad \text{Ec.4.2}$$

donde (E_{DeM_D}) y $f(E_{AbN_A})$ representan la distribución térmica para los estados vibracionales iniciales de D y A, V_{DA} considera la interacción Coulómbica entre D y A y $\delta(E_{DeM_D} + E_{AbN_A} - E_{AeM_A} + E_{DbN_D})$ representa la emisión del donador.

Suponiendo que los elementos de la matriz de acoplamiento no dependen de las coordenadas (aproximación de Condon) el término $\langle \Psi_{eM_D}^D, \Psi_{bN_A}^A | V_{DA} | \Psi_{eM_A}^A, \Psi_{bN_D}^D \rangle$ se puede escribir:

$$\langle \Psi_{eM_D}^D, \Psi_{bN_A}^A | V_{DA} | \Psi_{eM_A}^A, \Psi_{bN_D}^D \rangle = J_{DA} \langle \chi_{DeM_D} | \chi_{DbN_D} \rangle \langle \chi_{AbN_A} | \chi_{AeM_A} \rangle \quad \text{Ec.4.3}$$

donde J_{DA} representa los elementos de la matriz electrónica para la interacción dipolo-dipolo denotada como:

$$J_{DA} = \kappa \{ |d_{eb}^D| |d_{eb}^A| / R^3 \} \quad \text{Ec.4.4}$$

En esta ecuación R representa la distancia entre el aceptor y el donador, κ es el factor de orientación de los momentos dipolares de transición de D y A y d es el vector de momento dipolar de transición de cada cromóforo.⁴¹ La expresión de la tasa de transferencia puede ser expresada en términos del espectro de absorción del aceptor y de emisión del donador. Para incorporar lo anteriormente dicho, es necesario escribir la función δ como:

$$\delta(E_{DeM_D} + E_{AbN_A} - E_{AeM_A} - E_{DbN_D}) = \int_{-\infty}^{\infty} \delta(E_{DeM_D} - E_{DbN_D} - E) \times \delta(E + E_{AbN_A} - E_{AeM_A}) dE \quad \text{Ec.4.5}$$

Aquí, la primera función delta representa la emisión del donador y la segunda la absorción del aceptor. Ahora, el coeficiente de la absorción dependiente de la frecuencia puede definirse como:

$$a_A(\omega) = \frac{4\pi^2\omega\eta}{3c} |d_{eb}^D|^2 \sum_{M_A, N_A} f(E_{AbN_A}) \langle \chi_{AbN_A} | \chi_{AeM_A} \rangle^2 \times \delta(E_{AbN_A} - E_{AeM_A} + \hbar\omega) \quad \text{Ec.4.6}$$

Igualmente, el espectro de emisión del donador puede ser escrito como:

$$f_D(\omega) = \frac{4\omega^3\eta^3}{3\hbar c^3} |d_{eb}^D|^2 \sum_{M_D, N_D} f(E_{DeM_D}) \langle \chi_{DeM_D} | \chi_{DbN_D} \rangle^2 \times \delta(E_{DeM_D} - E_{DbN_D} - \hbar\omega) \quad \text{Ec.4.7}$$

Sustituyendo las ecuaciones anteriores en la ecuación 4.2 y usando las ecuaciones 4.3 y 4.4, obtenemos:

$$k_{TE} = \frac{9\kappa^2 c^4}{8\pi\eta^4} \frac{1}{R^6} \int_0^{\infty} \frac{a_A(\omega) f_D(\omega) d\omega}{\omega^4} \quad \text{Ec.4.8}$$

donde η es el índice de refracción del medio que afecta a todas las interacciones electrónicas en medios condensados y c es la velocidad de la luz³⁹. De la ecuación anterior podemos definir que la tasa de TE disminuye con la sexta potencia de la distancia entre D y A, lo que explica la sensibilidad en el intervalo de 10 -100Å.

Finalmente, la teoría de Förster es ideal para interpretaciones cuantitativas y predicciones de observaciones experimentales tanto en sistemas orgánicos como inorgánicos. Sin embargo,

para describir procesos de TE que involucran transiciones prohibidas es necesario considerar la contribución de la interacción de intercambio, la cual no se incluye en este trabajo¹.

4.5. Cinética de los procesos de desactivación de los estados excitados

Un estado excitado puede tomar diferentes canales de desactivación que compiten cinéticamente. La competencia que existe entre ellos causa que se determinen el tiempo de vida de los procesos involucrados y su eficiencia por medio de las constantes cinéticas de velocidad. La velocidad que presenta una especie o molécula excitada (M^*) al regresar a su estado basal se define por la ecuación diferencial:^{41,42}

$$-\frac{d[M^*]}{dt} = k_T[M^*] \quad \text{Ec.4.9}$$

donde $[M^*]$ es la concentración de la especie en el estado excitado y k_T se refiere a las constantes cinéticas de velocidad de los procesos de desactivación involucrados en una molécula. Cabe mencionar que una molécula no presentará los mismos procesos de desactivación que otra, además que entre los procesos de desactivación, primará uno más que los demás debido al orden de magnitud de la constante de velocidad. La constante de velocidad k_T puede ser expresada como $1/\tau_T$ donde τ_T es el tiempo de vida de la molécula (tiempo promedio en el cual la molécula tarda en regresar a su estado basal), por lo tanto la ecuación 4.9 puede ser escrita como:

$$-\frac{d[M^*]}{dt} = \left(\frac{1}{\tau_T}\right)[M^*] \quad \text{Ec.4.10}$$

Con la integración de la ecuación 4.10 se obtiene el valor de la concentración de la especie $[M^*]$:

$$[M^*] = [M^*]_0 e^{-t/\tau_T} \quad \text{Ec.4.11}$$

donde $[M^*]_0$ es la concentración de la especie en el estado excitado a tiempo cero.

4.6. Espectroscopía estática

La espectroscopía estática se caracteriza por ser el método espectroscópico óptico más extensivamente usado en mediciones analíticas y en investigación científica. Se define como espectroscopía estática debido a que la señal registrada es un promedio de todos los eventos que presenta una molécula en escalas de tiempo relativamente mayores comparadas con las escalas de tiempo que se estudian en espectroscopía con resolución temporal. Con este tipo de espectroscopía se pueden obtener espectros de absorción, emisión y excitación los cuales proporcionan información acerca de la estructura, energía y dinámica de los estados electrónicamente excitados. Por ejemplo, los espectros de absorción se caracterizan por mostrar el espectro energético del fotón que fue absorbido durante el proceso y las bandas de absorción hacen alusión a las transiciones del estado basal al estado excitado. Por otro lado, los espectros de emisión son los espectros energéticos de los fotones que se emiten cuando el sistema evoluciona de un estado excitado al estado basal. Los conceptos de tiempos de vida del estado excitado, rendimientos cuánticos, efecto del disolvente y principios básicos de absorción y fluorescencia se explicarán a continuación.

4.6.1. Espectroscopía de absorción, emisión y excitación

La espectroscopía de absorción, emisión y excitación está relacionada directamente con las transiciones electrónicas y vibracionales. El espectro de absorción junto con el de emisión pueden proporcionar información acerca de diferencias o similitudes entre las superficies de energía potencial del estado basal y del estado excitado. Si las superficies son similares o se encuentran espaciadas verticalmente muy poco, las geometrías de equilibrio pueden ser similares y por lo tanto la transición $0 \rightarrow 0$ es más intensa tanto en el espectro de absorción como en el de emisión, causando que los espectros se traslapen. Los espectros de absorción y emisión bajo estas condiciones son imágenes especulares.⁴³

Por otro lado, los espectros de emisión varían ampliamente y son dependientes de la estructura química del fluoróforo y del disolvente en el cual está disuelto. Cuando una molécula tiene un espectro de excitación, la fluorescencia es independiente de la longitud de onda de excitación de acuerdo a la regla de Kasha. Esta regla explica que una vez la molécula

absorbe luz, esta se relaja rápidamente por conversión interna o relajación vibracional al primer estado vibracional de menor energía del primer singulete del estado excitado. El proceso se puede explicar de una forma más clara con los factores de Franck Condon que se caracterizan por expresar el grado que existe de traslape entre las funciones de onda vibracionales. Esto es, que entre mayor sea el traslape, la molécula se relajará más rápidamente desde el singulete excitado de mayor energía al singulete excitado de menor energía.⁴⁴

4.6.2. Tiempos de vida del estado excitado y rendimiento cuántico de fluorescencia

El tiempo de vida de fluorescencia (τ) y el rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ) son las propiedades más importantes de un fluoróforo. El rendimiento cuántico se define como el número de fotones emitidos en relación con el número de fotones absorbidos y el tiempo de vida determina el tiempo disponible del fluoróforo para interactuar o difundirse en el entorno. Los significados del tiempo de vida y del rendimiento cuántico se representan en un diagrama simplificado de Jablonski (Figura 4.3). En este diagrama no se ilustran los procesos de relajación que conducen al estado S_1 , por el contrario, se hace énfasis en los procesos de relajación al estado basal.¹

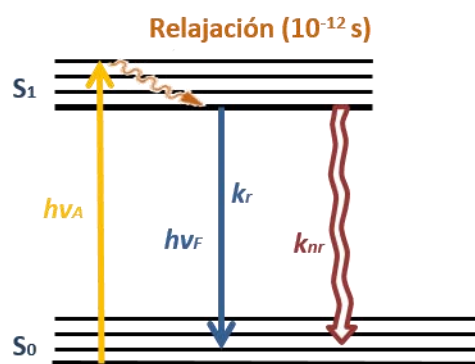


Figura 4.3. Diagrama simplificado de Jablonski que ilustra el significado de tiempo de vida y rendimiento cuántico donde k_r es la tasa emisiva o constante de decaimiento del fluoróforo y k_{nr} es la constante de decaimiento no radiativo.

Las constantes k_r y k_{nr} representan la tasa emisiva de radiación y la tasa de decaimiento no radiativa, respectivamente. Las propiedades asociadas a estas constantes disminuyen la población en el estado excitado causando que la fracción de fluoróforos que decaen por medio de la emisión de fluorescencia este dada por la ecuación 4.12:

$$\Phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad \text{Ec. 4.12}$$

El rendimiento cuántico de fluorescencia es cercano a la unidad si la tasa de decaimiento no radiativa es menor que la tasa de decaimiento radiativa, cabe decir que el rendimiento siempre será menor a la unidad debido a las pérdidas de Stokes (luz emitida de menor frecuencia que la luz absorbida en la misma transición).¹

Por otro lado, la determinación experimental del rendimiento de fluorescencia de un fluoróforo se realiza mediante una comparación con el rendimiento de un fluoróforo estándar conocido como se muestra en la ecuación 4.13:

$$\Phi = \Phi_R \frac{I}{I_R} \frac{OD_R}{OD} \frac{OD^2}{n_R^2} \quad \text{Ec. 4.13}$$

donde, I e I_R son las intensidades integradas de los espectros de emisión de la muestra y el estándar respectivamente, OD_R es la densidad óptica o absorbancia del estándar y OD es la muestra a la longitud de onda de excitación, y n el índice de refracción en el que se midió la muestra y el fluoróforo estándar. Ambos fluoróforos son medidos bajo las mismas condiciones con una absorbancia < 0.1 para evitar efectos de frente de celda, reabsorción e interacciones moleculares.¹

El tiempo de vida del estado excitado se define como el tiempo promedio en el que la molécula en disolución permanece en el estado excitado. Para un fluoróforo el tiempo de vida se define como el inverso de todas las constantes cinéticas que desactivan al estado excitado:

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} = \frac{1}{k_{Total}} \quad \text{Ec. 4.14}$$

Finalmente, las moléculas no tienen el mismo tiempo de vida o no decaen con el mismo tiempo de relajación haciendo que la emisión de fluorescencia sea un proceso aleatorio.

4.6.3. Efectos del disolvente

La polaridad y la velocidad de relajación del disolvente, los cambios conformacionales, el ambiente local, las reacciones en el estado excitado, entre otros tienen un profundo efecto en

el espectro de emisión de los fluoróforos. La emisión de los fluoróforos generalmente ocurre a longitudes de onda mayores que la absorción. Esta pérdida de energía se debe a una variedad de procesos dinámicos que ocurren después de la absorción de la luz. Cuando un fluoróforo es excitado, el exceso de energía vibracional es rápidamente cedido al disolvente (Figura 4.4). Si el fluoróforo es excitado a un estado singulete S_2 , rápidamente decae al estado S_1 en un tiempo de 10^{-12} s debido al proceso de conversión interna. Los efectos del disolvente cambian esta emisión a niveles de energía aún más bajos debido a la estabilización del estado excitado por causa de las moléculas polares del disolvente. En algunas ocasiones, el fluoróforo tiene un momento dipolar más grande en el estado excitado (μ_E) que en el estado basal (μ_B). Después de la excitación, los dipolos del disolvente pueden reorientarse o relajarse alrededor del μ_E , lo cual baja la energía del estado excitado. Si la polaridad del disolvente aumenta, este efecto se hace mayor, también resultando en la emisión a energías más bajas o mayores longitudes de onda¹.

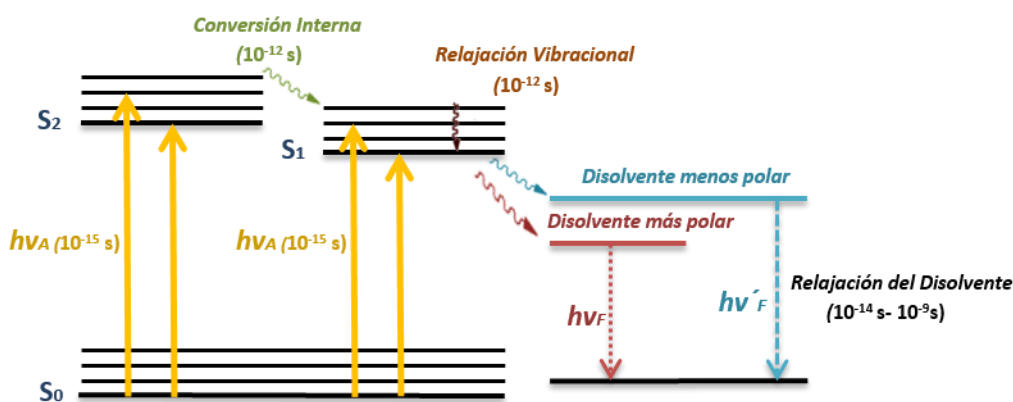


Figura 4.4. Diagrama de Jablonski para fluorescencia con relajación del disolvente.

A temperatura ambiente, la relajación del disolvente ocurre entre los 10-100 ps¹.

4.7. Espectroscopía con resolución temporal

La espectroscopía resuelta en el tiempo estudia diversos fenómenos fotofísicos y fotoquímicos que experimenta una molécula en solución después de ser irradiada con pulsos láser ultracortos en función del tiempo¹. Procesos dinámicos como la relajación electrónica y vibracional de los estados excitados de la molécula transcurren a escalas de tiempos muy

cortos que van desde los femtosegundos a los picosegundos. Una de las técnicas más ampliamente usadas en este tipo de espectroscopía es la técnica de suma de frecuencias, la cual se caracteriza por ser una técnica de inicio-prueba en donde el pulso que monitorea los fenómenos de relajación del estado excitado de la molécula presenta un retraso temporal respecto al pulso de inicio, el cual genera la excitación de la misma.

4.7.1. Resolución de fluorescencia por suma de frecuencias

Como se mencionó anteriormente, por medio de la resolución por suma de frecuencias es posible estudiar la dinámica de relajación electrónica y vibracional que presentan los estados excitados de las moléculas en tiempo real. Esta técnica se caracteriza por emplear pulsos ultracortos (100 fs) que aumentan la resolución temporal a una escala de femtosegundos y es una técnica espectroscópica denotada como método de inicio-prueba.^{1,36} Este método consiste en dividir en dos pulsos (inicio y prueba) el haz que proviene del amplificador.

El pulso de inicio recorre un camino diferente al pulso de prueba y es el encargado de excitar la muestra; el pulso de prueba presenta un retraso temporal respecto al pulso de inicio, este retraso puede ser expresado por:

$$\Delta t = \frac{\Delta x}{c} \quad \text{Ec.4.15}$$

donde Δx es la diferencia de distancia que existe entre los dos pulsos y Δt es dependiente de la señal del detector. La grabación de la señal para diferentes retrasos permite monitorear la dinámica de relajación de la molécula. En la Figura 4.5 se ilustra el arreglo óptico para la técnica de resolución de fluorescencia por suma de frecuencias, este consiste en la división de los dos pulsos, cada uno con un camino óptico totalmente diferente. El pulso de inicio en el presente trabajo tiene una longitud de onda de 380 nm (excitación de la nicotinamida) o 266 nm (excitación de la adenina). Este pulso excita la muestra, la fluorescencia es colectada y enfocada por un par de espejos parabólicos denotados como EP₁ y EP₂ al cristal de β -BBO, un elemento óptico no lineal, uniaxial negativo que permite el ajuste de fases. El pulso de prueba es enfocado en la misma región de este, donde se satisface la condición de ajuste de fases y se genera la suma de frecuencias que es proporcional a la intensidad de emisión en el

momento que llega el pulso de prueba. El decaimiento resuelto en el tiempo es obtenido midiendo la intensidad de la señal de suma de frecuencias que es registrada a su vez por dos detectores fotoeléctricos: un fotomultiplicador que registra intensidades bajas y por un fotodiodo que registra intensidades altas. La señal de este tipo de detectores está pulsada, por lo tanto es necesario combinar estos detectores con un osciloscopio para monitorear la evolución temporal de la señal. Finalmente, las señales modeladas provenientes de la combinación del detector-osciloscopio son muy débiles, por lo que es necesario recurrir a un detector lock-in para su posterior amplificación.

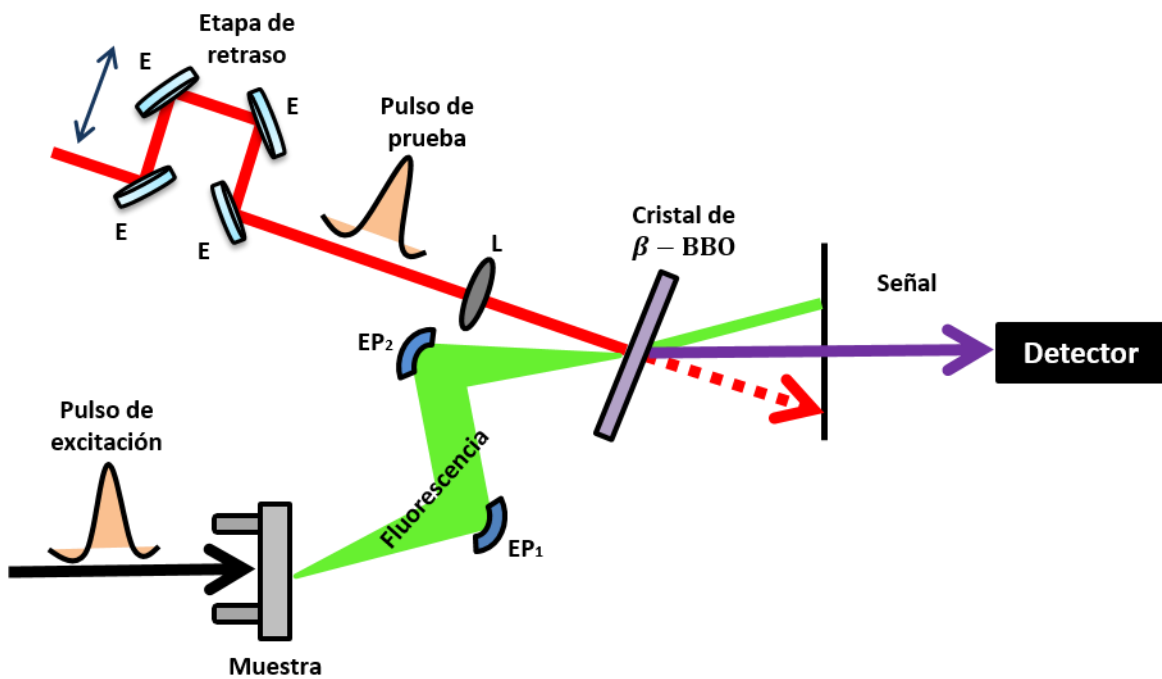


Figura 4.5. Esquema de suma de frecuencias donde se observan la señal resultante en color violeta, el pulso de prueba en color rojo y la fluorescencia en color verde. EP₁ y EP₂: espejos parabólicos, E: espejos, L: lente.

Ahora bien, en el cristal de óptica no lineal de β -BBO tanto el pulso de prueba como la fluorescencia deben ingresar con la polarización en el eje ordinario del cristal birrefringente, y la señal de suma de frecuencias será irradiada con una polarización perpendicular a esta dirección. Por lo tanto, la resultante de la suma de frecuencias está dada por:

$$\omega_{SF} = \omega_P + \omega_F \quad \text{Ec.4.16}$$

donde ω_P es la frecuencia del pulso de prueba y ω_F es la frecuencia de fluorescencia que se quiere detectar. Por otro lado, la condición de ajuste de fases está dada por la suma de los

vectores de onda de fluorescencia \vec{k}_F y del pulso de prueba \vec{k}_P como se muestra en la ecuación 4.17:

$$\vec{k}_{SF} = \vec{k}_P + \vec{k}_F \quad \text{Ec.4.17}$$

En la Figura 4.6 se muestra un esquema de condición de ajuste de fases o suma de frecuencias en un cristal de β -BBO, que explica de forma ilustrativa lo anteriormente escrito.

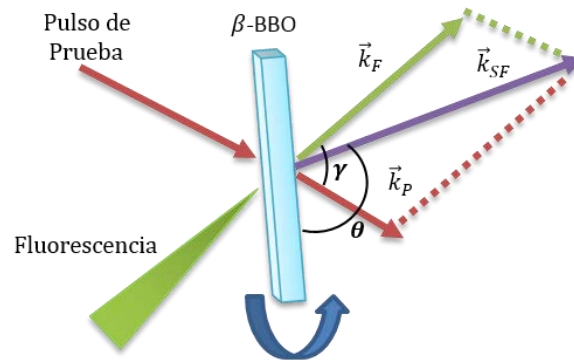


Figura 4.6. Esquema de suma de frecuencias en un cristal de β -BBO. El ángulo θ representa el ángulo de ajuste de fases y γ representa el ángulo entre el pulso de prueba y fluorescencia.

Debido a que la intensidad del pulso de prueba es constante, la señal que se obtiene de la suma de frecuencias dependerá de la intensidad de emisión detectada al tiempo en que el pulso de prueba llega al cristal. Esta señal es proporcional a la población del estado que es responsable de la emisión de luz. En este trabajo, estos estados son el primer singulete excitado de la adenina y el primer singulete excitado de la nicotinamida.

4.7.2. Generación de segundo y tercer armónico

Las intensidades de la luz por lo general son débiles o moderadas con una radiación convencional de varios W/m^2 . Esta puede interactuar con la materia ya sea por reflexión, refracción, dispersión o absorción, con poca o ninguna modificación en la frecuencia. Una gran variedad de fenómenos pueden ocurrir cuando la luz intensa interactúa con la materia, dando lugar a la creación de nuevos haces de diferentes longitudes de onda (óptica no lineal).

Las interacciones no lineales en cristales permiten la generación del segundo y tercer armónico, así como armónicos más altos. Esto indica por ejemplo, que cuando la radiación

intensa de frecuencia ω se centra en un cristal, dos componentes se generan: la radiación de la frecuencia incidente ω y la radiación equivalente a dos veces la frecuencia incidente (2ω), denotado segundo armónico. Por otro lado, la generación del segundo armónico junto con la radiación intensa de frecuencia ω centrada en un cristal, generan el tercer armónico (3ω).

Un campo eléctrico débil E provoca en un material una inducción eléctrica D donde:

$$\mathbf{D} = \mathbf{E} + 4\pi\mathbf{P} \quad \text{Ec.4.18}$$

que depende de la polarización del medio como se observa en la ecuación 4.18. Por ello, para una pequeña cantidad de luz la polarización inducida en el material depende linealmente de la intensidad del campo eléctrico E :

$$P(E) = \chi^{(1)}E \quad \text{Ec.4.19}$$

donde $\chi^{(1)}$ se denomina susceptibilidad eléctrica de primer orden y representa la respuesta lineal utilizada en óptica no lineal. Ahora bien, cuando la intensidad del campo eléctrico E aumenta, la polarización del medio ya no es linealmente dependiente de E y puede ser expandido en series de Taylor:

$$P(E) = \varepsilon_0[\chi^{(1)}E + \chi^{(2)}E^2 + \chi^{(3)}E^3 + \dots] \quad \text{Ec.4.20}$$

donde cada término depende de la susceptibilidad del orden n-ésimo y se caracteriza por ser una cantidad compleja que contiene toda la información sobre las propiedades ópticas del material dieléctrico como el índice de refracción y el coeficiente de absorción.

Si se desarrolla el caso sencillo de una onda incidente monocromática y linealmente polarizada $E = E_0 \cos \omega t$. La polarización inducida hasta el tercer orden se escribe:

$$P(t) = \varepsilon_0[\chi^{(1)}E_0 \cos \omega t + \chi^{(2)}E_0^2 \cos^2 \omega t + \chi^{(3)}E_0^3 \cos^3 \omega t + \dots] \quad \text{Ec.4.21}$$

En la ecuación 4.21 pueden identificarse los términos asociados a los distintos fenómenos no lineales por ejemplo, la generación del segundo armónico corresponde a la oscilación de 2ω donde se pone en manifiesto que su intensidad será proporcional al cuadrado de la onda incidente. Se pueden separar por tanto, las contribuciones a $P(t)$ oscilando a las frecuencias de 0 , ω , 2ω y 3ω de la siguiente forma:

$$P^{(0)} = \frac{\varepsilon_0}{2} \chi^{(2)} E^2 \quad \text{Ec.4.22}$$

$$P^{(\omega)}(t) = \varepsilon_0 \left[\chi^{(1)} E_0 + \frac{3}{2} \chi^{(3)} E_0^3 \right] \cos \omega t \quad \text{Ec.4.23}$$

$$P^{(2\omega)}(t) = \frac{\varepsilon_0}{2} \chi^{(2)} E^2 \cos 2\omega t \quad \text{Ec.4.24}$$

$$P^{(3\omega)}(t) = \frac{\varepsilon_0}{4} \chi^{(3)} E^3 \cos 3\omega t \quad \text{Ec.4.25}$$

El término $P^{(0)}$ representa una contribución estacionaria que implica la aparición de un potencial eléctrico constante proporcional a la susceptibilidad del segundo orden. Se trata de un proceso de rectificación óptica, por lo que ante la excitación del campo oscilante a frecuencia ω , el material responde con una perturbación estacionaria. Los términos $P^{(2\omega)}$ y $P^{(3\omega)}$ corresponden a la generación del segundo y tercer armónico respectivamente, de la luz incidente. La intensidad de ambos armónicos es proporcional al cuadrado y al cubo, respectivamente, de la intensidad incidente.

El término $P^{(\omega)}$ incluye la respuesta lineal $P_L^{(\omega)} = \varepsilon_0 \chi^{(1)} E_0 \cos \omega t$, junto con el término no lineal $P_{NL}^{(\omega)}$ que modifica la respuesta a la frecuencia de excitación y se traduce en cambios del índice de refracción.⁴⁵

La generación del segundo armónico viene controlada por lo que se conoce como ajuste de fases. La onda incidente caracterizada por tener una frecuencia ω_1 y un vector \mathbf{k}_1 generan una onda de polarización no lineal a una frecuencia $2\omega_1$ y un vector $2\mathbf{k}_1$. Esta polarización induce a la generación del segundo armónico de frecuencia $\omega_2 = 2\omega_1$ y vector \mathbf{k}_2 que no es igual a $2\mathbf{k}_1$. Esto indica que la fase de la onda de polarización ($2\mathbf{k}_1$) es generalmente diferente de la fase de onda generada del segundo armónico (\mathbf{k}_2). La condición de ajuste de fases se cumple solo cuando:

$$2\mathbf{k}_1 = \mathbf{k}_2(2\omega_1) = \mathbf{k}_1(\omega_1) + \mathbf{k}_1(\omega_1) \quad \text{Ec.4.26}$$

Y puede ser escrita de forma general como:

$$\mathbf{k}_3(\omega_3) = \mathbf{k}_1(\omega_1) + \mathbf{k}_2(\omega_2) \quad \text{Ec.4.27}$$

La generación de segundo armónico es un caso especial de la interacción de tres ondas. Dos ondas incidentes de frecuencia ω_1 y ω_2 que interaccionan en un cristal no lineal y generan la suma de $\omega_3 = \omega_1 + \omega_2$ o la diferencia $\omega_3 = \omega_1 - \omega_2$. Finalmente, la generación del tercer armónico se obtiene con la generación del segundo armónico, seguido de la suma de frecuencias del haz fundamental y el segundo armónico.³⁶

4.7.3. Anisotropía de fluorescencia

Las medidas de anisotropía se basan en el principio de excitación fotoselectiva de fluoróforos por luz polarizada. Si abordamos la excitación con luz polarizada en las moléculas, la emisión de muchas de éstas también está polarizada. El grado de polarización de la emisión se describe en términos de la anisotropía (r). El origen de este fenómeno se basa en la existencia de momentos de transición para la absorción y emisión, los cuales se encuentran a lo largo de direcciones específicas en la estructura del fluoróforo. En solución homogénea, los fluoróforos que se encuentran en un estado basal están orientados al azar. Cuando se exponen a la luz polarizada, aquellos fluoróforos que tienen sus momentos de transición de absorción orientados a lo largo del vector eléctrico de la luz incidente, son excitados, de ahí el estado excitado está parcialmente orientado.

La emisión puede llegar a despolarizarse mediante una serie de procesos dependiendo de la molécula que se esté estudiando. Todos los cromóforos tienen momentos de transición que ocurren a lo largo de un eje molecular. La difusión rotacional cambia la dirección de los momentos de transición y es una causa común de la despolarización. Las mediciones de anisotropía revelan el desplazamiento angular del fluoróforo que se produce entre la absorción y la posterior emisión de un fotón. Este desplazamiento depende de la velocidad y el grado de difusión rotacional durante el tiempo de vida del estado excitado. Además, puede llegar a brindar información acerca del tamaño, la forma y la flexibilidad de la molécula.^{1,46}

Para la mayoría de los experimentos de esta tesis, el sistema molecular es excitado con luz polarizada verticalmente. El vector de la luz de excitación está orientado de forma paralela al eje vertical o al eje z . La intensidad de la emisión se mide a través de un polarizador.

Cuando el polarizador de emisión está orientado en paralelo (\parallel) a la dirección de la excitación polarizada, la intensidad observada se llama I_{\parallel} . Asimismo, cuando la polarización es perpendicular (\perp) a la excitación, la intensidad se llama I_{\perp} . Estos valores de intensidad son usados para calcular el valor de anisotropía:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad \text{Ec.4.28}$$

La anisotropía se caracteriza por ser una propiedad adimensional que no depende de la intensidad total de la muestra que se está analizando. Esto se debe a que la diferencia ($I_{\parallel} - I_{\perp}$) está normalizada por la intensidad total ($I_{\parallel} + 2I_{\perp}$). Para la mayoría de los fluoróforos los valores de anisotropía son inferiores a 0.4, y en general tienden a variar con el cambio en la longitud de onda de excitación. Esto es explicado por el ángulo β formado por los momentos dipolares de transición de absorción y emisión el cual puede ser obtenido de la ecuación 4.29. La ecuación expresa la anisotropía fundamental de un fluoróforo en ausencia de cualquier movimiento de difusión rotacional.

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \right) \quad \text{Ec.4.29}$$

Finalmente, en algunas moléculas el componente paralelo presenta un decaimiento inicial más rápido en comparación con el componente perpendicular debido a la rotación del momento de transición del fluoróforo fuera de la orientación vertical.^{1,46}

4.7.4. Convolución y ajuste de datos

Después de obtener los datos experimentales por la técnica de suma de frecuencias, es necesario conocer los tiempos de vida que presentan cada uno de los procesos de relajación de la molécula. En este caso, conocer el tiempo que presenta el proceso de TE, el decaimiento de la adenina y por ende el decaimiento de la nicotinamida, así como la relajación del disolvente. Para ello hay que tener en cuenta, que la señal que se obtiene por la técnica de suma de frecuencias es el resultado de una convolución de tres funciones (Figura 4.7): la función gaussiana de la intensidad del pulso de prueba I_p , la función gaussiana de la intensidad del pulso de inicio I_i y la función de decaimiento exponencial de fluorescencia que se detecta por medio de la técnica. Por lo tanto, la integral que define la convolución de estas tres funciones esta expresada como se muestra:

4.7.5. Espectros de emisión resueltos en el tiempo

Los espectros de emisión resueltos en el tiempo (TRES, por sus siglas en inglés: Time-Resolved Emission Spectra) se emplean para dar seguimiento a los efectos inducidos a causa del disolvente y para observar la evolución temporal que presentan los estados excitados de una molécula con el cambio de longitudes de onda. La forma de obtener los espectros de emisión resueltos en el tiempo es indirecta. El procedimiento comienza con la medición de los decaimientos resueltos en el tiempo en una serie de longitudes de onda a través del espectro de emisión $I(\lambda, t)$ que presenta la molécula a estudiar. Los decaimientos son dependientes de la longitud de onda. Para el cálculo de TRES, los decaimientos son analizados en términos de un modelo multiexponencial:

$$I(\lambda, t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i(\lambda) e^{-\frac{t}{\tau_{i(\lambda)}}} \quad \text{Ec.4.32}$$

donde $I(\lambda, t)$ son los decaimientos de intensidad correspondientes a cada longitud de onda, $\alpha_i(\lambda)$ son los factores pre-exponenciales, $\tau_{i(\lambda)}$ son los tiempos de decaimiento con $\sum \alpha_i(\lambda) = 1$. Los tiempos de decaimiento pueden ser dependientes o independientes de cada longitud de onda. Se normaliza un nuevo conjunto de decaimientos para que la intensidad a cada longitud de onda sea igual a la del espectro estático de emisión a esa longitud de onda. Si suponemos que $F(\lambda)$ es el espectro estático de emisión, se calcula la función $H(\lambda)$ usando:

$$H(\lambda) = \frac{F(\lambda)}{\int_0^{\infty} I(\lambda, t) dt} \quad \text{Ec.4.33}$$

El cual para un análisis multiexponencial tiene la forma:

$$H(\lambda) = \frac{F(\lambda)}{\sum \alpha_i(\lambda) \tau_{i(\lambda)}} \quad \text{Ec.4.34}$$

En estas ecuaciones el término $H(\lambda)$ es un factor que cuando se multiplica por la intensidad integrada en el tiempo a la misma longitud de onda, es igual a la intensidad del espectro estático de emisión a esa longitud de onda. Entonces, las funciones de intensidad normalizadas, que son usadas para calcular TRES, están dadas por:

$$I'(\lambda, t) = H(\lambda) I(\lambda, t) = \sum_i \alpha'_i(\lambda) e^{-\frac{t}{\tau_{i(\lambda)}}} \quad \text{Ec.4.35}$$

Donde $\alpha'_i(\lambda) = H(\lambda)\alpha_i(\lambda)$. Los valores de $I^{(\lambda,t)}$ se pueden utilizar para calcular la intensidad de cualquier longitud de onda y tiempo por lo que permite el cálculo de TRES. La ventaja de este proceso es que los valores de $I^{(\lambda,t)}$ son las funciones de respuesta corregidas para las distorsiones que se presentan a causa de la convolución por parte de la función de respuesta del equipo. Para concluir esta parte, la dependencia en tiempo de los desplazamientos espectrales y la forma de TRES se utilizan para determinar la naturaleza de los procesos de relajación.¹

4.8. Resonancia Magnética Nuclear-ROESY

La tesis involucra estudios del NADH en conformaciones plegada y desplegada. Para confirmar la existencia de una población de moléculas plegadas en las soluciones acuosas, se realizaron observaciones por RMN-ROESY en dichas muestras. En esta sección se describe brevemente el fundamento de estos experimentos. Cuando uno de dos espines, denotados como I y S, interactúa con el dipolo magnético del otro tiene lugar un fenómeno de interacción dipolo-dipolo denominado relajación cruzada, por el que se transfiere magnetización a través del espacio de un espín al otro. Por lo tanto, la intensidad de la señal del espín I debe cambiar cuando se perturba el estado de equilibrio del espín vecino. La perturbación puede realizarse mediante saturación o inversión con pulsos de radiofrecuencia. El cambio de interacción que resulta de esta interacción dipolar se denomina efecto nuclear Overhauser (NOE-por sus siglas en inglés Nuclear Overhauser Enhancement).

Cuando la magnetización de los espines está confinada en el plano xy del sistema de coordenadas, que rota con la velocidad del movimiento de precesión de los núcleos (denotado como sistemas de coordenadas giratorio, rotating frame), mediante la aplicación de un pulso largo y de potencia intermedia (pulso de confinamientos, spin-lock), la relajación dipolar conduce al denominado efecto Overhauser nuclear en el sistema rotatorio (ROE-Rotating frame Overhauser Enhancement). El experimento tiene la ventaja de que el ROE siempre es positivo independientemente del tamaño de la molécula y de la frecuencia del equipo. Por lo cual se usa normalmente para detectar interacciones dipolares entre protones que pertenecen a moléculas de tamaño intermedio, para las que los NOEs son muy pequeños.⁴⁷

Existe ROESY monodimensional (1D) y bidimensional (2D). En el 1D se usa un pulso selectivo (90° o 270°) que afecta al espín al que se le quiere medir un efecto NOE como se muestra en la figura 4.8a y usando un pulso $\pi/2$ no selectivo y agregando un tiempo de evolución Δ se da la 2D (Figura 4.8b).

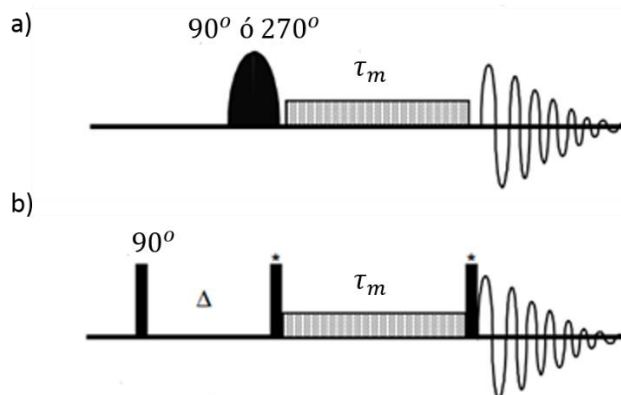


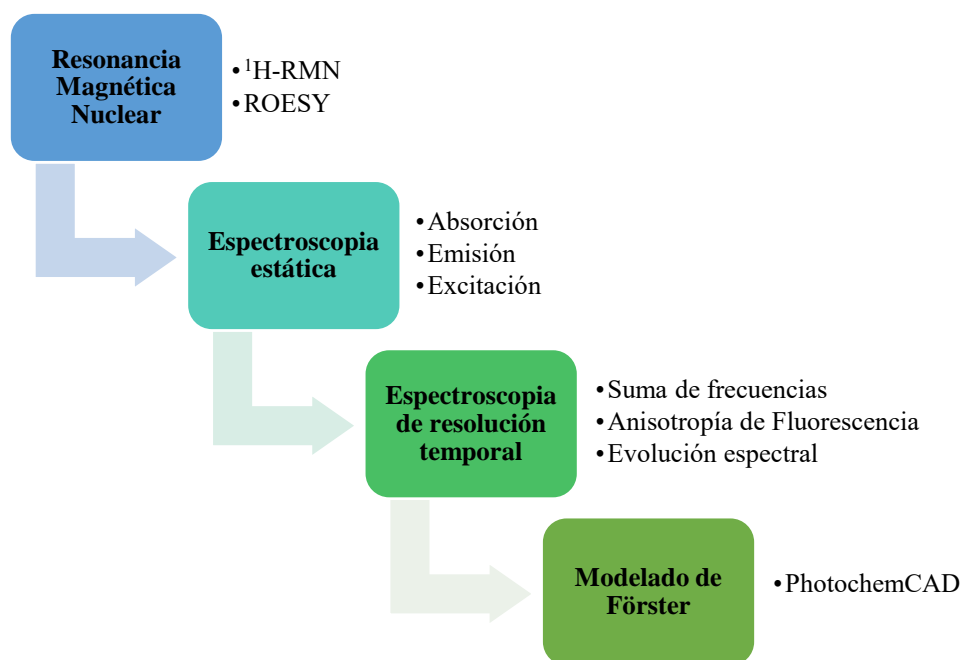
Figura 4.8. Secuencia de pulsos a) ROESY en 1D b) ROESY en 2D.

En la Figura 4.8a, el primer período está relacionado al tiempo de perturbación donde el sistema de espines se saca del equilibrio mediante una secuencia de pulsos. El segundo período (tiempo de mezcla- τ_m), representa el tiempo en el cual se perturba al sistema con diferentes campos para lograr resaltar ciertas interacciones entre los diferentes sistemas de espín de la muestra. El último período es el tiempo de detección en donde se detecta la señal emitida por parte de la muestra. La secuencia de pulsos de ROESY 2D (Figura 4.8b) presenta un periodo más que corresponde a un tiempo de evolución donde se deja evolucionar los sistemas de espín de la muestra bajo sus propias interacciones por un tiempo variable del experimento.^{48,49}

5. METODOLOGÍA

En este capítulo se alude a los diferentes detalles que se tuvo en cuenta a la hora de realizar la parte experimental del trabajo de investigación. Se describen las metodologías usadas para obtener los espectros de absorción, excitación y emisión que hacen parte de la espectroscopia estática, además, se incluye el esquema desarrollado de segundo y tercer armónico en la técnica de suma de frecuencias. Finalmente, se explican las condiciones en las que se obtuvieron los espectros ROESY por resonancia magnética nuclear.

A continuación, se representa de forma simplificada la metodología que se llevó a cabo en este trabajo de investigación:



5.1. Reactivos y sustancias químicas

El NADH se adquirió de Sigma Aldrich con una pureza $>99\%$ por tal razón no hubo necesidad de recrystalizar. El metanol se adquirió de igual forma en Sigma Aldrich con calidad HPLC. Para la preparación de la solución amortiguadora (pH=7.4) se trabajó con reactivos altamente puros, estos reactivos fueron fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) y fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4), reactivos de igual forma adquiridos en Sigma Aldrich. Por otro lado se utilizó agua

Milli-Q tipo I (agua ultrapura libre de iones). Todas estas sustancias fueron altamente puras para evitar cualquier tipo de contaminación que pudiera alterar el estudio a la hora de realizar la parte experimental. Finalmente, las muestras fueron preparadas al momento de hacer la medición, al igual que las mezclas amortiguador:metanol.

Las muestras de NADH en metanol como en solución amortiguadora fueron preparadas al momento de hacer la medición por el equipo de Resonancia Magnética Nuclear. Se empleó un equipo Bruker, Avance III HD, de 700 MHz, equipado con criosonda TCI 700 H-C/ N-D de 5 mm y un muestreador automático sample Jet. Las muestras fueron preparadas en tubos de 5 mm, se tomaron aproximadamente 0.7 ml de una solución de NADH de concentración 10 mM en amortiguador de fosfatos y metanol deuterado.

Los datos de ^1H -RMN tanto en amortiguador como metanol fueron colectados con una secuencia de pulsos de zg30 (excitación de la muestra con un pulso de 30° y reducción del retardo), a una temperatura de 298 K y con un tiempo de adquisición de 23232 s y 16 scans.

Por otro lado, los datos de RMN-ROESY del NADH en amortiguador deuterado fueron colectados con una secuencia de pulsos selrogp (ROESY selectivo con gradientes) a una temperatura de 298 Kelvin, con un tiempo de adquisición de 2499 s y 2304 scans. Los datos de RMN del NADH en metanol deuterado conservaron la misma secuencia de pulsos y se midieron a la misma temperatura, solo que en esta solución el tiempo de adquisición fue de 2324 s y el número de scans de 2048. Todos los espectros ROESY se adquirieron con un tiempo de mezcla- τ_m de 400 ms. Finalmente, los datos se analizaron en el programa MestReNova 8.1 y se apodizaron con funciones exponenciales de 1.5 KHz.

5.2. Espectroscopía estática

Los espectros de absorción, se obtuvieron en el espectrofotómetro Cary-50 (Varian) del Instituto de Química-UNAM, en una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Las absorbancias obtenidas estuvieron en un valor menor a 0.1 y la temperatura a la cual se llevó a cabo la medición fue de 20 ± 1 °C (temperatura ambiente).

Los espectros de emisión y excitación se adquirieron en el fluorímetro Cary Eclipse (Varian), de igual forma se tomaron con una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico y a una temperatura ambiente de 20 ± 1 °C. Estos espectros se tomaron de las soluciones preparadas con un valor de absorbancia inferior a 0.1 mencionadas anteriormente, para evitar problemáticas como reabsorción y frente de celda que conllevan a datos erróneos.

5.3. Espectroscopía con resolución temporal

Por medio del oscilador de titanio:zafiro (NJA-5 Clark Marx Corporation, Coherent Inc) el cual es alimentado por un láser de diodos neodimio:vanadato (Verdi V-5, Coherent Inc) de 5W de potencia y 527 nm, se obtuvieron pulsos ultracortos con polarización horizontal por medio del amarre de modos. Pulsos con propiedades de 150 fs de duración, frecuencia de repetición de 100 MHz, energía por pulso de 3 nJ y una longitud de onda de 800 nm (Figura 5.1).

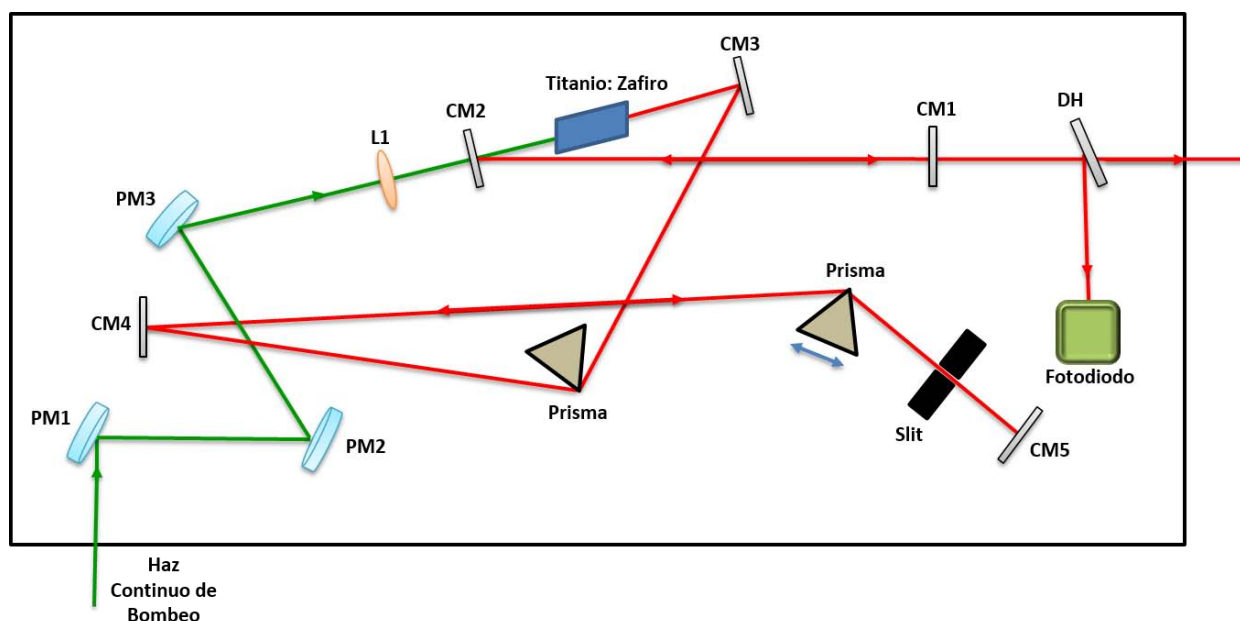


Figura 5.1. Esquema del oscilador de titanio:zafiro utilizado en el trabajo de investigación. PM: espejos que dirigen el haz de bombeo, L: lente, CM: espejos de la cavidad, DH: divisor de haz.

Después, para incrementar la intensidad de los pulsos, estos pasaron por un aislador de Faraday compuesto por un periscopio, un plato de retardo y un rotor de Faraday donde se conservó la polarización horizontal y se dirigió al expansor en donde el pulso se alargó temporalmente con

un tiempo de duración de 250 ps. Antes de entrar al amplificador, el pulso pasó por un periscopio el cual cambio la polarización a vertical. En el amplificador, el pulso ganó potencia con la ayuda de dos celdas pockels que permitieron que este realizara varias vueltas pasando por el cristal de titanio:zafiro alimentado por otro láser de diodos neodimio:YAG (ORC-100, Clark MRX) de 5W de potencia y 532 nm. Finalmente, para llegar al compresor, el pulso pasó primero por un telescopio de Galileo y después por un periscopio el cual cambio la polarización de vertical a horizontal. En el compresor, se restableció la duración del pulso por medio de un juego de espejos en v y una rejilla de difracción. Al final, este salió del amplificador regenerativo con una frecuencia de repetición de 1KHz, una duración de 150 fs y 800 nm de longitud de onda (Figura 5.2)

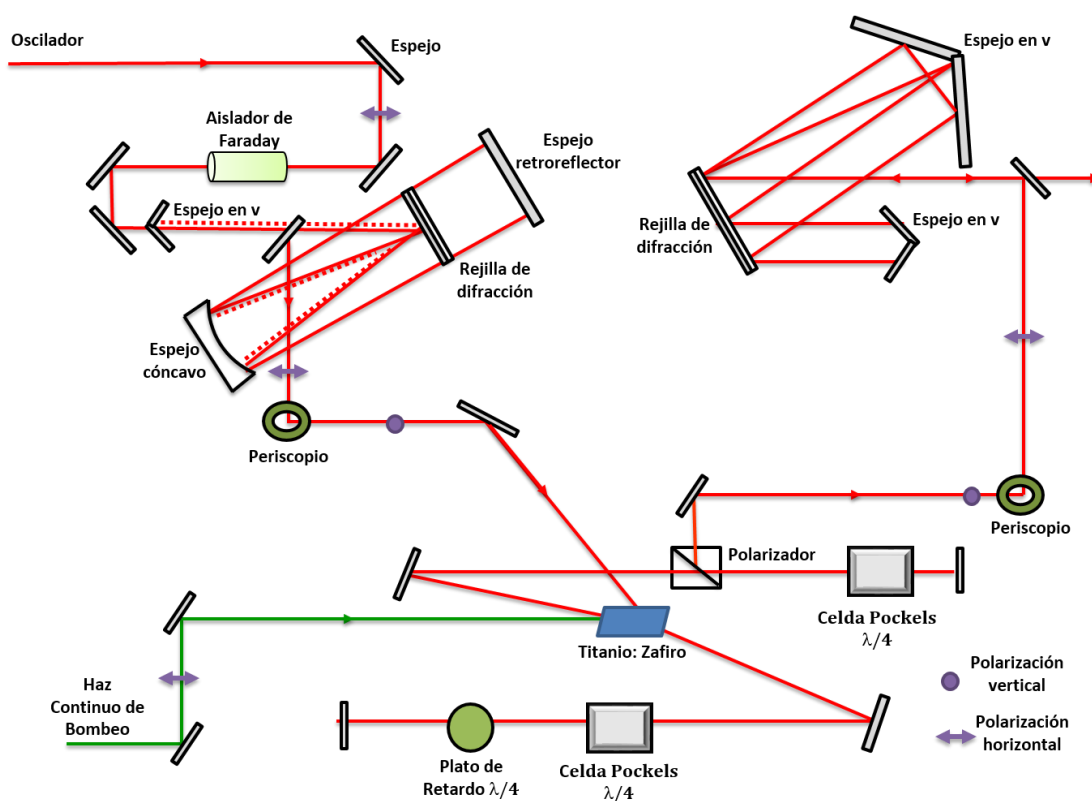


Figura 5.2. Esquema del amplificador: expansor, amplificador y compresor.

5.3.1. Resolución de fluorescencia por suma de frecuencias

Después de obtener las condiciones para llevar a cabo la técnica por suma de frecuencias, el haz proveniente del amplificador regenerativo y con una polarización horizontal se separó por medio

de dos divisores de haz, el primero llevó al haz (fundamental-800 nm) a una platina de retraso en donde se transformó de un retraso espacial a un retraso temporal (color rojo). El segundo haz, el cual paso por un segundo divisor de haz generó un segundo armónico (color azul) por medio de un cristal de β -BBO, pasando antes por un filtro de densidad, el cual controla la intensidad de la luz. El tercer armónico (color violeta) se generó gracias a la otra fracción proveniente del segundo divisor de haz, la cual junto con el segundo armónico generado y con la misma distancia recorrida en caminos ópticos llegaron al segundo cristal de β -BBO. Para compensar la dispersión temporal que sufre el pulso al pasar por los diferentes elementos ópticos, el tercer armónico se dirigió a un arreglo de prismas, allí se imprimió GDD⁻ (Anexo 8.1.7), logrando que se reestablecieran las propiedades temporales del pulso. Debido a que el haz va con una polarización horizontal, fue llevado a un plato de retardo para cambiar su polarización a vertical. Antes de este cambio de polarización, paso por una hélice óptica o chopper que tiene como función ser un modulador óptico con una frecuencia de repetición de 1/3 KHz. Por otro lado, el haz fundamental, antes de llegar al cristal de suma de frecuencias, también cambió su polarización a vertical debido a otro plato de retardo.

Tanto el haz de segundo armónico como el de tercero fueron enfocados a una celda de cuarzo en donde se encontraba fluyendo de forma continua la muestra de NADH en metanol o amortiguador. La fluorescencia que se generó en la celda, se recolectó y enfocó por dos espejos parabólicos. La señal a su vez pasó por un filtro, el cual eliminó las contaminaciones del pulso de inicio y se enfocó al cristal de suma de frecuencias. La señal resultante o la suma de frecuencias de la fluorescencia generada por la muestra y el haz fundamental se dirigieron finalmente a un monocromador doble. Después se transformó a una señal eléctrica y se amplificó por medio de un fotomultiplicador y un amplificador lock-in, respectivamente. Con la suma de frecuencias transformada en señal, se obtuvo cada uno de los decaimientos correspondientes a la dinámica molecular de las conformaciones del NADH. La Figura 5.3 ilustra el esquema completo de la técnica de suma de frecuencias.

- Longitud de onda de absorción del aceptor: 340 nm, máximo de absorción de la nicotinamida en el NADH.

Teniendo fijos estos valores, se variaron otros como: la distancia entre los dos nucleótidos, expresada en armstrong (\AA), el tiempo de vida del donador expresado en fs y el factor de orientación (κ), un parámetro que depende de la orientación de los momentos dipolares de transición del donador y el aceptor. Finalmente, con los parámetros establecidos para el cálculo, se determinó la eficiencia del proceso de TE.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se consideran los diferentes resultados obtenidos en el estudio de la fotofísica molecular del NADH en sus conformaciones plegada y desplegada. Por Resonancia Magnética Nuclear-ROESY se confirma el plegamiento de la molécula. A partir de los espectros de excitación de espectroscopía estática se logra tener una noción de la TE tanto en la conformación plegada como la desplegada. Por espectroscopía temporal se establecen los tiempos de vida de fluorescencia del NADH tanto en solución amortiguadora como en metanol, además se observa en tiempo real la TE que existe en la conformación plegada y el decaimiento ultrarrápido del estado excitado de la adenina. Finalmente, mediante el modelado de Förster y los demás resultados obtenidos se da respuesta a qué tan sensible es la adenina con la distancia.

6.1. Resonancia Magnética Nuclear-ROESY

Los espectros de ^1H -RMN (Figuras 6.1 y 6.2) muestran claramente las señales características generadas por los protones de las soluciones de NADH en solución amortiguadora y metanol respectivamente, para la interpretación de las correlaciones existentes por ROESY.

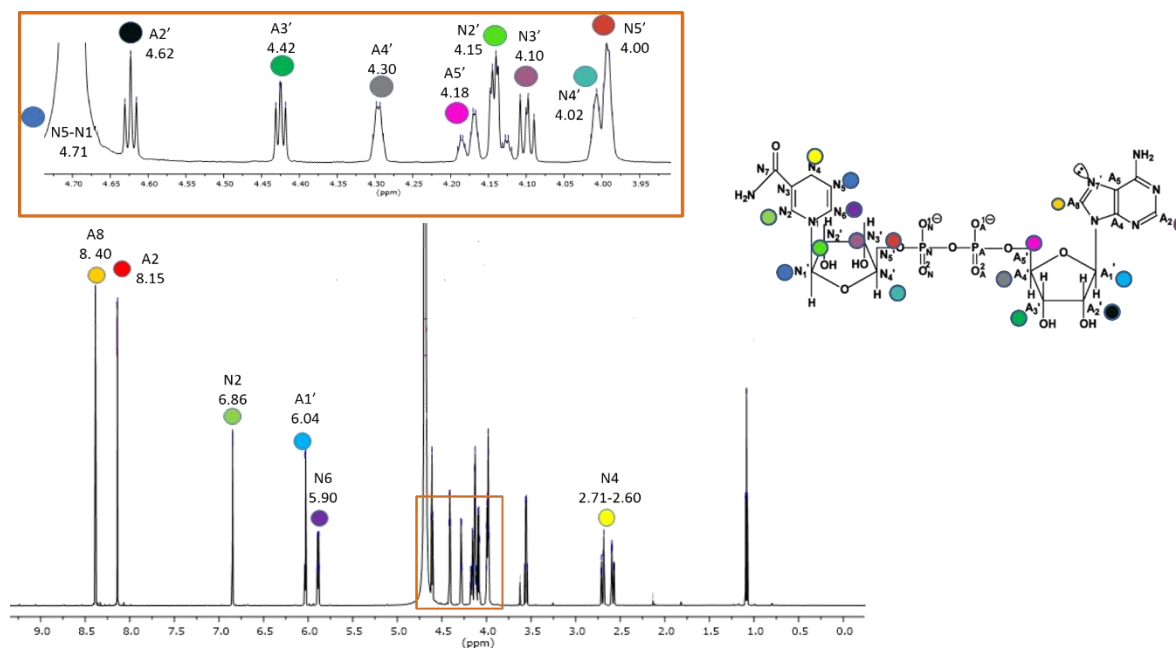


Figura 6.1. Espectro de ^1H -RMN del NADH en solución amortiguadora (700 MHz).

Podemos apreciar las diferentes señales para cada uno de los protones correspondientes de los nucleótidos de adenina y nicotinamida reducida. Observamos que las señales de los protones de A₈ y A₂ se encuentran a campos bajos (8.0-8.7 ppm), por otro lado, las señales correspondientes a los protones de las ribosas están en un intervalo entre 4.0-7.0 ppm. La señal correspondiente a los protones de N₄ presenta una particularidad, y es que se observa un sistema AB debido a que se presenta una constante de acoplamiento pequeña, además, se hace alusión a una inequivalencia por parte de los protones unidos al carbono denotado como N₄ debido al apilamiento de la molécula, ya que uno se orienta hacia la dirección de la adenina por anisotropía magnética o apantallamiento paramagnético (aumenta el campo que crea un desplazamiento a campo bajo) y el otro está orientado en sentido opuesto a este, como se observa, se caracteriza por presentar señales con intensidades altas y en sus extremos intensidades bajas denotadas como señales satélite.³

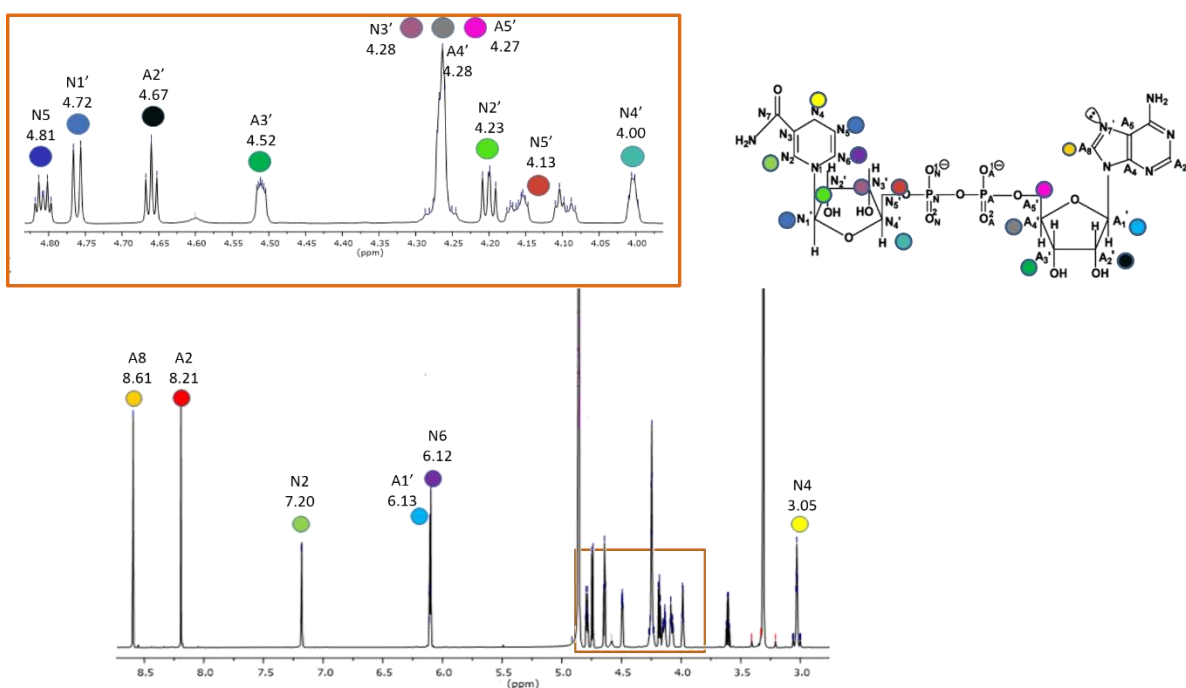


Figura 6.2. Espectro de ¹H-RMN del NADH en metanol (700 MHz).

La Figura 6.2 muestra las señales correspondientes a los protones del NADH cuando se encuentra en metanol, las señales de los protones de A₈ y A₂ se mantienen a campos bajos. Por otro lado, las señales de los protones correspondientes a las ribosas se encuentran entre 4.0-7.0 ppm. Con metanol, las señales de todos los protones tienden a desplazarse muy poco a campos más bajos. Debido a la conformación desplegada de la coenzima en metanol, la

señal de N₄ se desplaza a 3.0 ppm y los protones son equivalentes obteniendo una sola señal con sus satélites como se observa en el espectro.

Teniendo clara la señalización de cada uno de los protones del NADH en metanol y buffer, se obtienen los espectros de ROESY como se ilustra en la Figuras 6.3 y 6.4

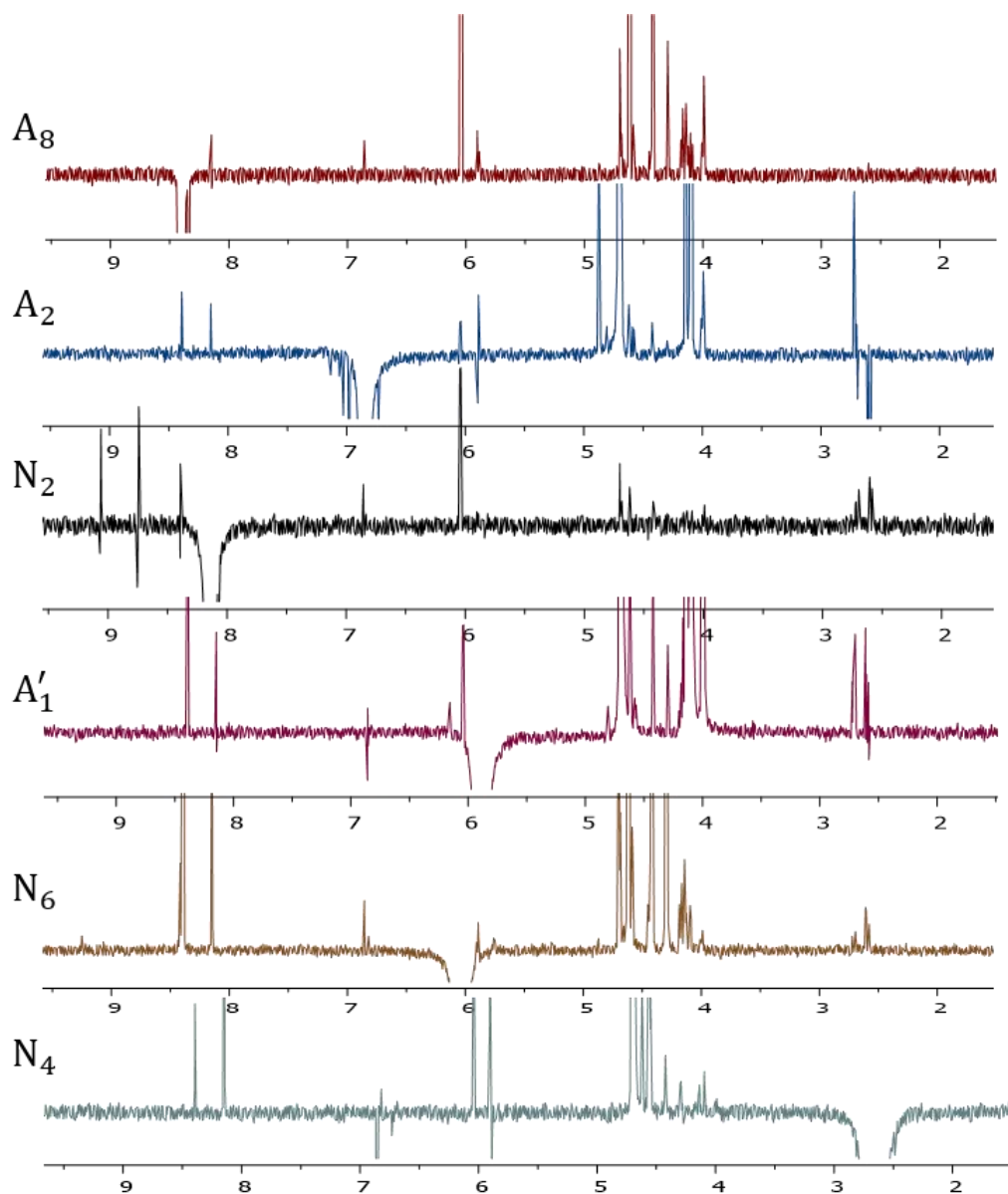


Figura 6.3. Espectros ROESY del NADH en solución amortiguadora (700 MHz).

En la Figura 6.3 se observan los diferentes espectros ROESY del NADH en amortiguador. En ellos se ilustra la irradiación de algunos de los protones característicos de los nucleótidos adenina y nicotinamida y del protón de la ribosa unida a la adenina. A continuación se

muestran las correlaciones de cada uno de ellos donde A_x , N_x , N'_x y A'_x denotan los protones unidos a los carbonos del NADH:

- $A_8 \rightarrow A_2, N_2, A'_1, N_6, A'_2, A'_3, A'_5, N'_2, N'_3, N'_4, N'_5$
- $A_2 \rightarrow N_2, N'_1, A'_1, N_5, N_4, N'_3, N'_4, N'_5$
- $N_2 \rightarrow A_8, A_2, A'_3, N_5, N_4, N'_2, N'_3, N'_4, N'_5$
- $A'_1 \rightarrow A_8, A_2, N_6, N_4, N'_2, N'_3, N'_4, N'_5, N'_1, A'_2, A'_3, A'_5, A'_4$
- $N_6 \rightarrow A_8, A_2, A'_1, N_4, N'_3, N'_4, N'_5, N'_2, A'_2, A'_3, A'_5$
- $N_4 \rightarrow A_8, A_2, A'_1, N'_2, N'_3, N'_4, N'_5, N'_1, A'_2, A'_3, A'_5, N_5$

Al irradiar protones de la adenina A_8 y A_2 se observan correlaciones con los protones correspondientes a la nicotinamida reducida como N_2 y N_4 , además de observarse correlaciones con los protones de la ribosa unida a la nicotinamida. De igual manera sucede cuando se irradian los protones característicos de la nicotinamida reducida como N_2 , N_6 y N_4 en donde también se observan correlaciones con los protones A_8 y A_2 y con los protones asociados a la ribosa unida a la adenina. Al irradiarse se observó que el protón de la ribosa A'_1 también se encuentra correlacionado con protones tanto de la adenina como de la nicotinamida reducida. Estos resultados confirman una conformación plegada cuando el NADH se encuentra en solución amortiguadora, ya que una característica fundamental de la técnica ROESY es detectar correlaciones entre protones cercanos al protón irradiado ($< 5.0 \text{ \AA}$)^{50,51}

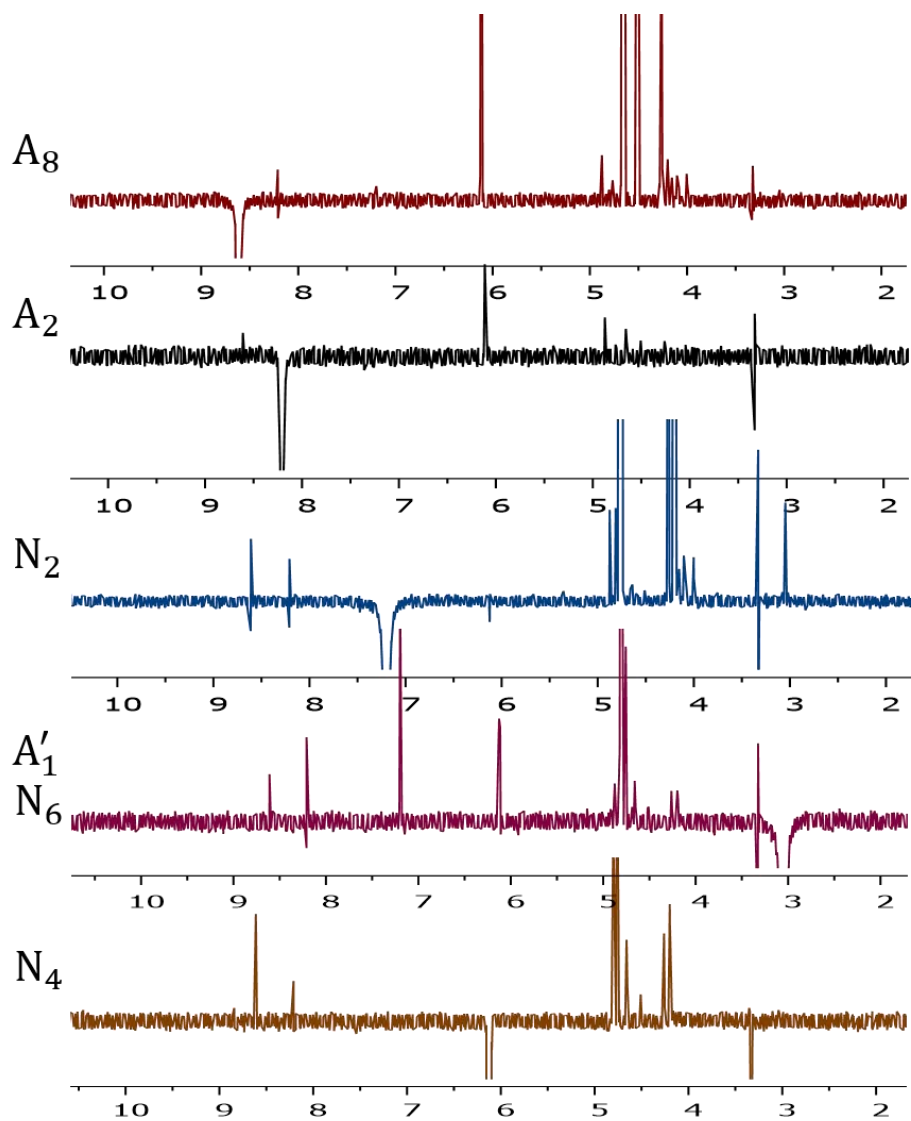


Figura 6.4. Espectros ROESY del NADH en metanol (700 MHz).

Al igual que en la Figura 6.3, en la Figura 6.4 se observan los diferentes espectros ROESY del NADH en metanol. A continuación se muestran las correlaciones de cada uno de ellos:

- $A_8 \rightarrow A_2, A'_1, A'_2, A'_3, A'_5, A'_4$
- $A_2 \rightarrow A_8, A'_1, A'_2, A'_3, A'_5, A'_4$
- $N_2 \rightarrow N_5, N_4, N'_3, N'_4, N'_5, N'_2, N'_1$
- A'_1 y $N_6 \rightarrow A_8, A_2, A'_1, N_5, N'_3, N'_2, N'_1, A'_2, A'_3, A'_5, A'_4$
- $N_4 \rightarrow N_2, N_6, A'_1, N'_1, N_5, N'_3, N'_2$

Al irradiar los protones de A_8 y A_2 en metanol solo se observan las correlaciones con los protones de la ribosa a la cual la adenina está unida, de igual forma sucede con los protones de la nicotinamida reducida N_2 y N_4 que presentan correlaciones con los respectivos protones de la ribosa unida a ésta. En cuanto a las señales de A'_1 y N_6 se observan correlaciones para ambos casos ya que se irradiaron los dos protones simultáneamente debido a la cercanía que presentan sus señales.

Al igual que con los resultados obtenidos por ROESY en solución amortiguadora, estos resultados confirman que la coenzima se encuentra en una conformación desplegada cuando está en metanol, lo cual lo demuestran las correlaciones obtenidas con los protones de su mismo lado, las cuales indican correlaciones de la adenina y nicotinamida con sus respectivas ribosas.

6.2. Espectroscopía estática

Los espectros de absorción, emisión y excitación del NADH en metanol y amortiguador se observan en la Figura 6.5. Los espectros de emisión de fluorescencia y excitación se midieron con una longitud de onda de excitación de 330 nm y una longitud de onda de emisión de 550 nm, respectivamente.

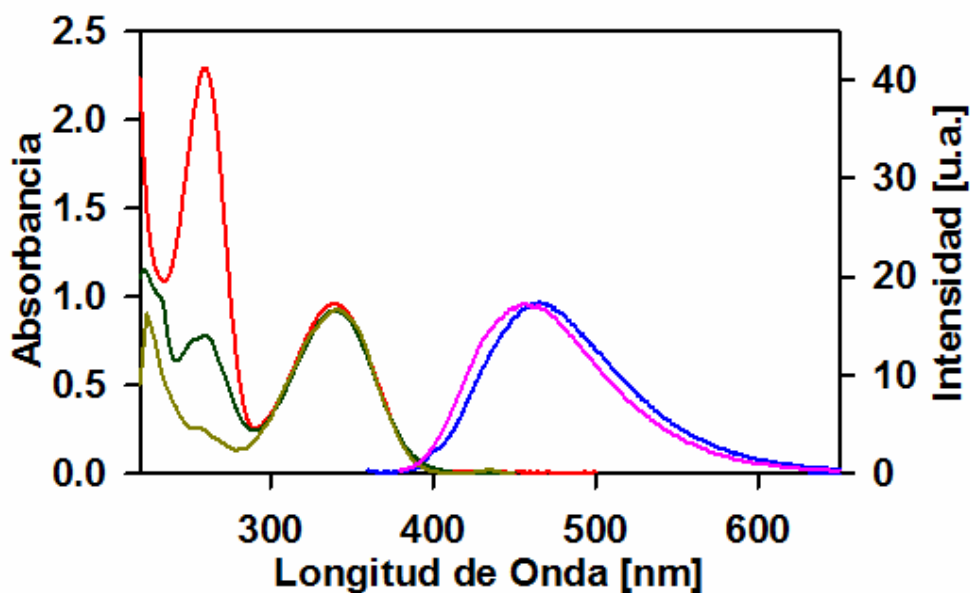


Figura. 6.5. Espectro de Absorción del NADH (rojo), espectro de emisión del NADH en amortiguador – pH =7.4 (azul), en metanol (rosa), espectro de excitación del NADH en amortiguador (verde) en Metanol (verde Oliva).

En la figura se observa que el espectro de absorción presenta una estructura definida con dos bandas de absorción de máximos de 260 nm y 340 nm, las cuales corresponden a la adenina y nicotinamida reducida, respectivamente. Tanto el espectro de NADH en solución amortiguadora como metanol presenta el mismo comportamiento. El espectro de emisión del NADH en metanol presenta un máximo de 456 nm a diferencia del espectro de emisión del NADH en solución amortiguadora (466 nm) que tiene un corrimiento batocrómico en su máximo debido a la polaridad del disolvente. Por otro lado, la primera banda de los espectros de excitación permiten dar un indicio de la existencia de TE por parte de la adenina a la nicotinamida reducida al compararla con la banda de absorción relacionada a la adenina.

A partir de la relación correspondiente al máximo de las bandas de absorción y excitación a una longitud de 260 y 340 nm se determina el rendimiento de TE tanto para NADH en metanol como el NADH en solución amortiguadora. El rendimiento está dado por la ecuación 5.1 donde Exc_{260} y Exc_{340} denotan la intensidad del pico a esas longitudes de onda y Abs_{260} y Abs_{340} las absorbancias:³³

$$TE = \frac{Exc_{260}Abs_{340}}{Exc_{340}Abs_{260}} \quad \text{Ec.5.1}$$

Con la relación de las intensidades y absorbancias correspondientes a las longitudes de onda anteriormente mencionadas obtenemos un rendimiento de TE para NADH en solución amortiguadora de 0.48 y un rendimiento de TE para NADH en metanol de 0.10, equivalente a un 48% y 10% de transferencia de energía en una conformación plegada y desplegada, respectivamente. También se determinaron los rendimientos cuánticos de fluorescencia por medio de la ecuación 4.10 en donde teniendo como referencia a la cumarina 102 para la medición de fluorescencia en la región de 400-600 nm, se obtienen valores de 0.025 ± 0.005 y 0.018 ± 0.004 para el NADH en amortiguador y metanol. Lo anterior indica que el NADH en solución amortiguadora emitirá 7 fotones más de los 1000, en comparación con el NADH en metanol debido a que la TE que se caracteriza por ser un proceso no radiativo influyente en el rendimiento cuántico de fluorescencia.

Para examinar qué tanto influye el metanol en la conformación y por ende la TE del NADH, en la Figura 6.6 se observan los espectros de excitación para diferentes mezclas de agua (solución amortiguadora): metanol.

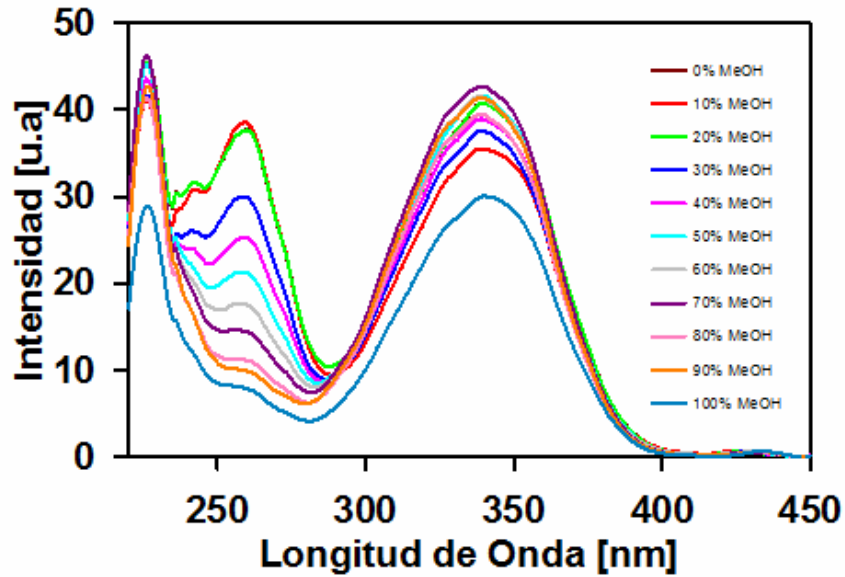
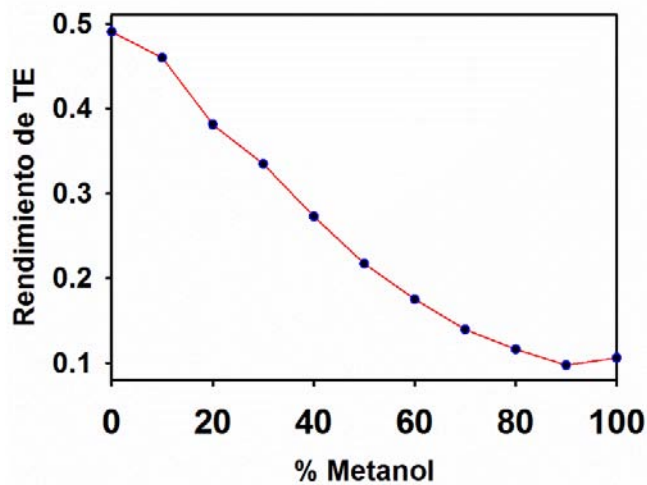


Figura. 6.6. Espectros de excitación de diferentes mezclas solución amortiguadora:metanol ($\lambda_{emi} = 500 \text{ nm}$).

Como observamos en la Figura 6.6, la intensidad relativa de la banda de excitación de la adenina disminuye a medida que el porcentaje de metanol aumenta, desplazando el equilibrio a la conformación desplegada del NADH y por ende a una menor TE. La relación del rendimiento del proceso de TE como función del porcentaje de metanol en la solución se ilustra de en la Gráfica 6.1:



Gráfica 6.1. Relación del rendimiento de TE en función del porcentaje de metano en el disolvente.

La Gráfica 6.1 ilustra de mejor manera como disminuye la TE a medida que es adicionada a la disolución una concentración determinada de metanol, teniendo un intervalo de rendimiento de TE desde 0 hasta 100% de metanol.

Finalmente, en la Figura 6.7 se observa el espectro de absorción y emisión del AMP (Adenosina monofosfato) compuesto por la adenina unida a una ribosa y un grupo pirofosfato.

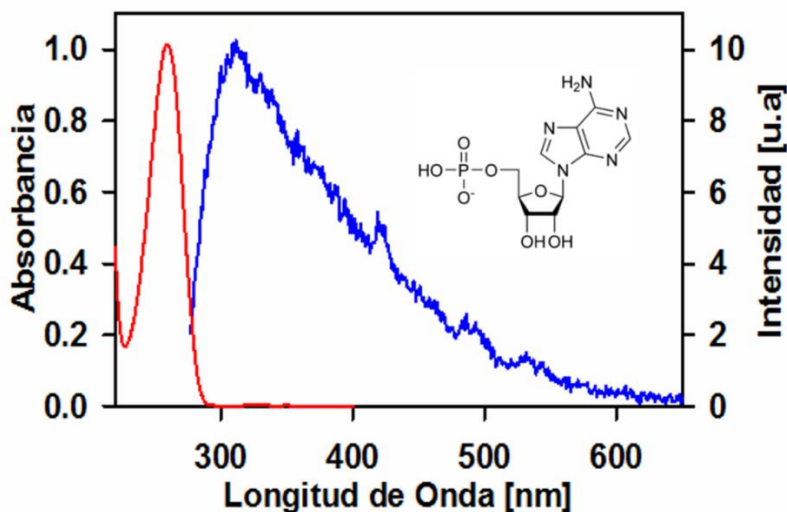


Figura. 6.7. Espectro de absorción del AMP (rojo) y espectro de emisión- $\lambda_{exc} = 250$ nm (azul).

En la Figura 6.7 el espectro de absorción presenta una banda característica de la adenina a una longitud de 260 nm. Por otro lado, excitando a 250 nm se observa la emisión del estado excitado S_1 de la adenina que abarca un intervalo amplio de los 300 a los 620 nm. Al igual que el NADH, se determinó el rendimiento cuántico de fluorescencia del AMP, obteniendo un valor de 6.8×10^{-5} , rendimiento cuántico muy bajo y similar al publicado por Gustavsson y colaboradores.⁶

6.3. Espectroscopía con resolución temporal

6.3.1. Resolución de fluorescencia por suma de frecuencias

Una vez demostrada la existencia de transferencia de energía que existe en el NADH por medio de espectroscopía estática, se llevaron a cabo determinaciones por la técnica de suma de frecuencias de los tiempos de vida de los estados excitados de los nucleótidos involucrados en la transferencia de energía y la escala de tiempo en la que ocurre este fenómeno.

En la Figura 6.8 se observan los resultados obtenidos tanto para el NADH plegado como para el NADH desplegado. Las curvas de decaimiento fueron adquiridas en soluciones amortiguadora de fosfatos con un pH = 7.4 y por otro lado, en metanol. Se utiliza la condición del ángulo mágico (54.7°) para evitar los efectos de difusión rotacional en los decaimientos de emisión de fluorescencia, se excitó con una longitud de onda de 266 nm el NADH en un intervalo de longitudes de onda de emisión de 440 nm- 600 nm a tiempos cortos (-3 → 15 ps) y tiempos largos (-10 → 200 ps). Además, las figuras presentan una línea continua que ajusta los datos experimentales. Dichos ajustes corresponden a funciones multiexponenciales convolucionadas con la función de respuesta.

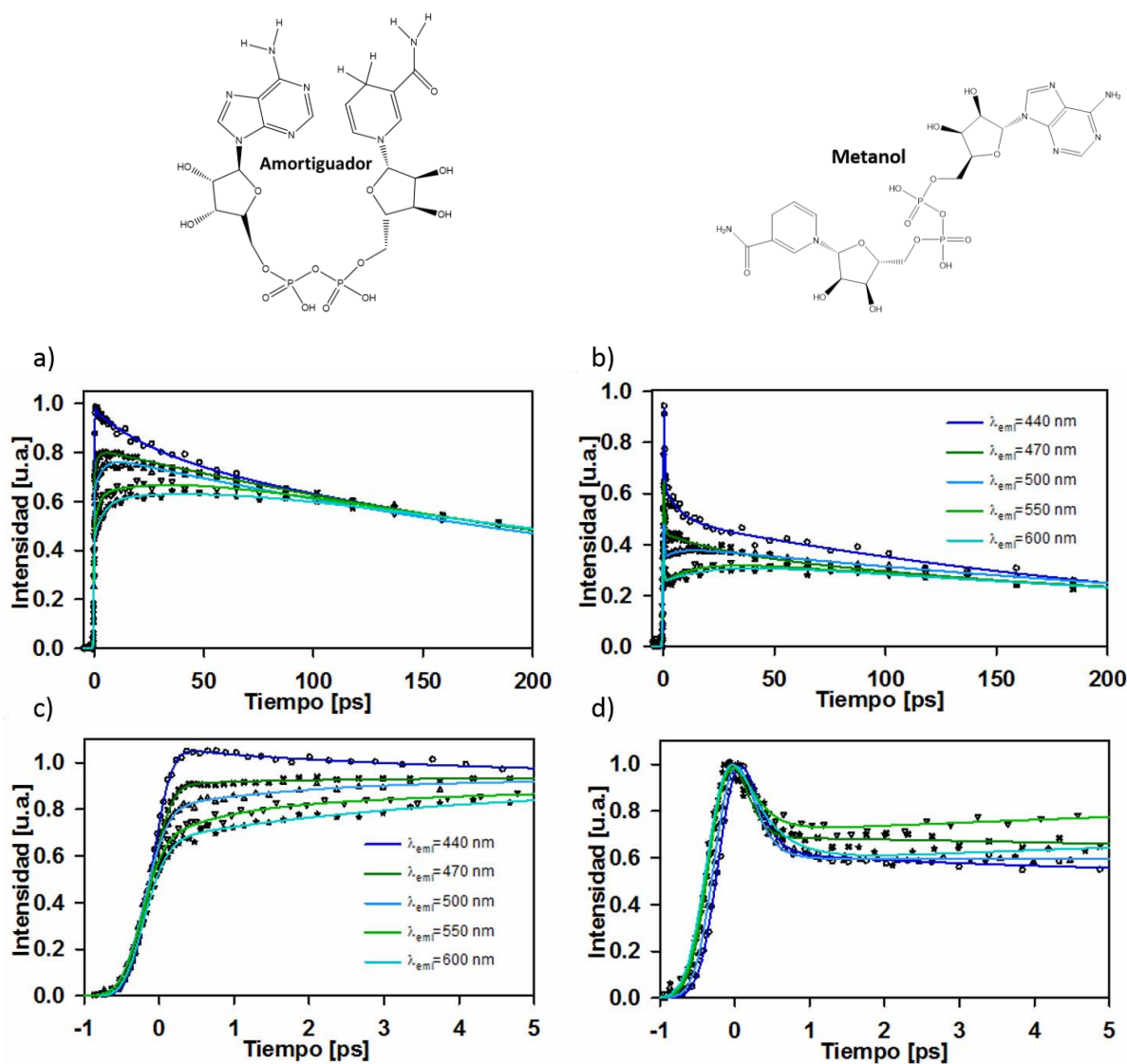


Figura 6.8. Determinaciones por suma de frecuencias del NADH excitando con 266 nm y $\lambda_{emi} = 440, 470, 500, 550$ y 600 nm. a) solución amortiguadora a tiempos largos b) metanol a tiempos largos c) solución amortiguadora a tiempos cortos d) metanol a tiempos cortos.

Estos resultados muestran que la emisión de fluorescencia decae en múltiples escalas de tiempo en el intervalo de femtosegundos a picosegundos debido al tamaño de la molécula y a los múltiples grados de libertad vibracional. Las señales de emisión de fluorescencia ($\lambda_{emi} = 440$ nm, $\lambda_{emi} = 470$ nm, $\lambda_{emi} = 500$ nm, $\lambda_{emi} = 550$ y $\lambda_{emi} = 600$ nm) son ajustadas a una función triexponencial convolucionada con la función de respuesta del instrumento. En la Tabla 6.1 se resumen los tiempos de vida y los factores preexponenciales de los diferentes decaimientos.

Tabla 6.1. Parámetros obtenidos por los ajustes triexponenciales para los diferentes decaimientos de emisión de fluorescencia del NADH en solución amortiguadora y metanol. ($\lambda_{exc} = 266$ nm).

Solución Amortiguadora				Metanol		
λ_{emi} (nm)	α_1 (%)	α_2 (%)	α_3 (%)	α_1 (%)	α_2 (%)	α_3 (%)
440	35	11	54	73	6	21
470	(-)34	(-)6	60	62	4	34
500	(-)40	(-)10	50	55	(-)6	39
550	(-)13	(-)17	70	55	(-)12	33
600	(-)12	(-)20	68	46	(-)15	39
λ_{emi} (nm)	τ_1 (ps)	τ_2 (ps)	τ_3 (ps)	τ_1 (ps)	τ_2 (ps)	τ_3 (ps)
440	≤ 0.1	27.8 ± 3.5	383.6 ± 4.9	≤ 0.1	9.1 ± 1.6	325.4 ± 11.0
470	≤ 0.1	1.9 ± 0.2	383.6 ± 1.9	≤ 0.1	12.9 ± 4.9	325.4 ± 7.3
500	≤ 0.1	3.9 ± 0.5	383.6 ± 4.5	≤ 0.1	21.3 ± 5.2	325.4 ± 7.3
550	2.1 ± 0.3	42.4 ± 5.6	383.6 ± 3.7	≤ 0.1	27.8 ± 1.5	325.4 ± 3.7
600	4.5 ± 0.3	64.9 ± 0.6	383.6 ± 1.9	≤ 0.1	43.6 ± 8.3	325.4 ± 11.0

En la Tabla 6.1 se resumen los resultados del análisis triexponencial. En solución amortiguadora, en las tres primeras longitudes de onda el valor de τ_1 es ≤ 100 fs, este valor es del orden de la función de respuesta del equipo (IRF ~ 100 fs) por lo tanto se aproxima el valor a su límite superior. Como observamos en las longitudes de onda de 440 a 500 nm, este

tiempo de vida ultrarrápido corresponde al valor de la TE por parte de la adenina, mientras que los valores de las longitudes de onda de 550 y 600 nm se refieren a procesos de relajación vibracional, procesos más lentos que sufre la molécula después de la excitación.¹ La contribución en el decaimiento total está en un intervalo de 30% - 40% para las tres primeras longitudes de onda, mientras que para las longitudes de 550 nm y 600 nm se tiene un 13% y 12% respectivamente. Por otro lado, el componente τ_2 oscila con valores de 1.9 ± 0.2 ps a 64.9 ± 0.6 ps. La contribución del decaimiento total en todas las longitudes de emisión oscila con valores entre 6% y 20%. Este tiempo de vida (τ_2) está relacionado con el tiempo de relajación del disolvente. En el análisis global se mantiene constante el tiempo de decaimiento largo (τ_3) tiempo de vida que corresponde a la nicotinamida reducida (200 - 400 ps)^{1,5,22,23} para obtener de esta forma el mismo valor global en todas las emisiones de fluorescencia correspondiente a cada longitud de onda. La mayor contribución en el decaimiento total la presenta el tiempo de vida relacionado a la nicotinamida. El NADH en solución amortiguadora presenta dos tiempos de acumulación (coeficientes negativos excepto en la longitud de onda de emisión de 440 nm) debido al aumento de la intensidad de emisión de fluorescencia de la nicotinamida reducida como resultado del proceso de TE por parte de estado singulete excitado S_1 de la adenina.

Por otro lado, en las soluciones de NADH en metanol, el tiempo corto (τ_1) es asignado al proceso de relajación ultrarrápido de la adenina con un valor ≤ 100 fs debido a las intersecciones cónicas que presenta por el cruce de las superficies de energía potencial correspondientes a sus estados S_0 y S_1 . Las contribuciones que presenta este tiempo de vida para las diferentes longitudes de onda de emisión es mayor en comparación con las que presentan los tiempos de vida τ_2 y τ_3 . Al igual que en solución amortiguadora, τ_2 está relacionado con la relajación del disolvente que tiene valores que oscilan entre 9.1 ± 1.6 ps y 43.6 ± 8.3 ps y aumenta con la longitud de onda de emisión. La contribución en el decaimiento total es muy pequeña como se observa en la Tabla 6.1. Finalmente, τ_3 equivale a 325.4 ps y es menor que aquel determinado para la nicotinamida reducida en solución amortiguadora (383.6 ps).

Así como evaluamos, por espectroscopía estática, qué tanto influye el metanol en el proceso de TE, en la Figura 6.9 se observan las curvas de decaimiento obtenidas en condiciones de

ángulo mágico y a una longitud de onda de emisión de 470 nm en mezclas de solución amortiguadora-metanol.

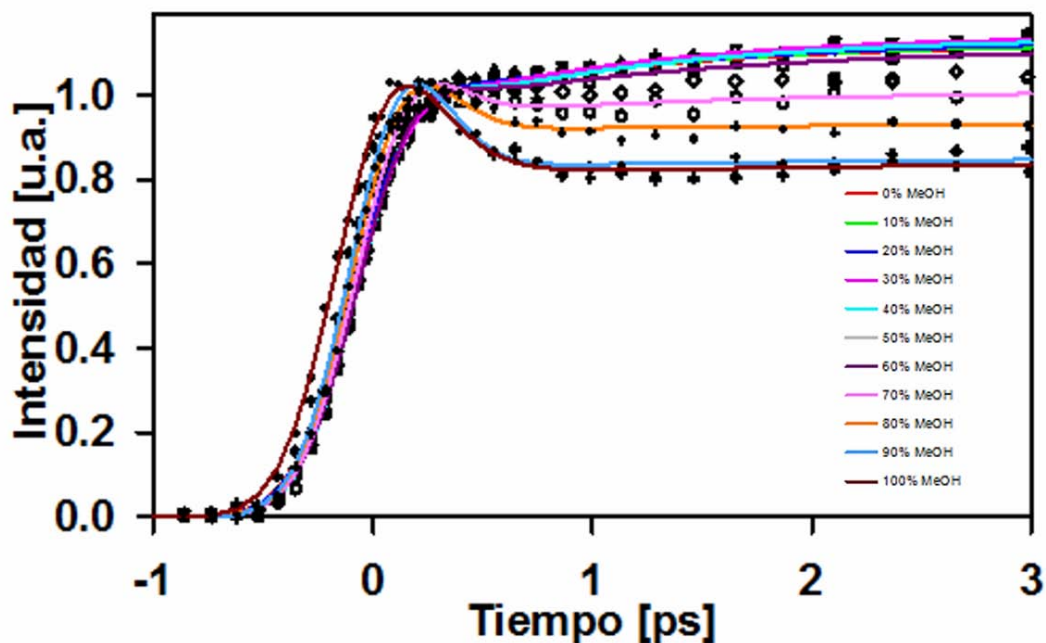


Figura 6.9. Decaimientos por suma de frecuencias del NADH de diferentes mezclas solución amortiguadora:metanol excitando con 266nm a $\lambda_{emi}=470$ nm.

En la Figura 6.9 observamos que las curvas de decaimiento asociadas a los porcentajes de metanol de 0 a 60% presentan una acumulación del estado emisivo por parte de la adenina debido al plegamiento de la molécula. Como se ha discutido previamente, el metanol favorece una conformación desplegada, es por ello que en concentraciones más altas de metanol (70 - 100%) se observa el decaimiento ultrarrápido característico del estado excitado S_1 de la adenina. En la Tabla 6.2 se muestran los tiempos de vida y los factores preexponenciales de los diferentes decaimientos de las mezclas de solución amortiguadora:metanol:

Tabla 6.2. Parámetros obtenidos por los ajustes triexponenciales para los diferentes decaimientos de emisión de fluorescencia del NADH en diferentes mezclas solución amortiguadora:metanol. ($\lambda_{exc}=266$ nm).

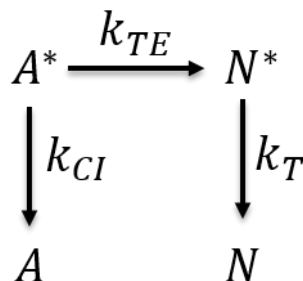
Solución amortiguadora: Metanol							
MeOH (%)	α_1 (%)	α_2 (%)	α_3 (%)	MeOH (%)	α_1 (%)	α_2 (%)	α_3 (%)
0	(-)34	(-)6	60	60	65	(-)3	32
10	53	(-)7	40	70	74	(-)2	24
20	48	(-)7	45	80	80	(-)1	19
30	52	(-)8	40	90	87	(-)1	12
40	62	(-)6	32	100	66	(-)2	32
50	58	(-)6	36				

MeOH (%)	τ_1 (ps)	τ_2 (ps)	τ_3 (ps)	MeOH (%)	τ_1 (ps)	τ_2 (ps)	τ_3 (ps)
0	≤ 0.1	1.9 ± 0.2	383.6 ± 1.9	60	≤ 0.1	3.1 ± 0.5	340.0 ± 18.0
10	≤ 0.1	1.1 ± 0.3	369.9 ± 31.9	70	≤ 0.1	1.9 ± 0.1	337.0 ± 51.6
20	≤ 0.1	1.4 ± 0.4	346.0 ± 36.0	80	≤ 0.1	1.9 ± 0.4	350.0 ± 81.9
30	≤ 0.1	1.2 ± 0.3	339.1 ± 28.6	90	≤ 0.1	5.7 ± 0.6	339.8 ± 75.8
40	≤ 0.1	1.2 ± 0.2	350.0 ± 30.5	100	≤ 0.1	2.8 ± 0.3	325.4 ± 14.7
50	≤ 0.1	1.5 ± 0.5	345.2 ± 42.6				

Los resultados del análisis triexponencial se resumen en la Tabla 6.2. τ_1 con un valor ≤ 100 fs tiene una contribución en el decaimiento total entre 64% y 87% para todas las mezclas de solución amortiguadora:metanol. Este valor corresponde a la duración del proceso de TE en los porcentajes de 0 a 60% de metanol, y al decaimiento ultrarrápido del estado excitado de la adenina en 70 -100%. Los tiempos de vida relacionados con la relajación vibracional del disolvente (τ_2) presentan amplitudes o contribuciones muy bajas (1 - 8%) y τ_3 corresponde al tiempo de decaimiento de la nicotinamida reducida con valores de 383.6 ps para un 0% de metanol (plegada) y 325.4 ps para un 100% de metanol (desplegada).

Como observamos al realizar los ajustes de los decaimientos exponenciales del tercer armónico, se obtienen los tiempos relacionados a los procesos involucrados en nuestro sistema, conversión interna por parte del estado excitado S_1 de la adenina, TE y conversión interna del estado excitado S_1 de la nicotinamida. Para lograr determinar estos tiempos es necesario recurrir a un modelo cinético propuesto como se ilustra en el Esquema 6.1. El modelo comprende la excitación del estado fundamental de la adenina a 266 nm, la TE a la nicotinamida reducida y el decaimiento con constantes de velocidad k ultrarrápidas permitiendo que exista una competencia entre ambos procesos. El modelo cinético consiste en que la especie excitada A^* (adenina) decae de forma ultrarrápida a su estado fundamental A con una constante de velocidad k_{CI} y, por otro lado, transfiere energía a la especie N^* (nicotinamida) con una constante k_{TE} , y a su vez la especie N^* decae a su estado fundamental con una constante de velocidad total denotada como k_T .

Esquema 6.1. Esquema cinético sobre la fotofísica molecular del NADH



Ahora bien, teniendo en cuenta el Esquema 6.1, se determinan las concentraciones de cada una de las especies involucradas. A $t=0$, las concentraciones iniciales de las cuatro especies son:

$$[A^*] = [A^*]_0 \quad \text{Ec. 6.1}$$

$$[N^*] = [A] = [N] = 0 \quad \text{Ec. 6.2}$$

Teniendo en cuenta estas condiciones, las ecuaciones diferenciales para la especie A^* , N^* , A , y N están denotadas por:

$$\frac{d[A^*]}{dt} = -k_{TE}[A^*] - k_{CI}[A^*] \quad \text{Ec. 6.3}$$

$$\frac{d[N^*]}{dt} = k_{TE}[A^*] - k_T[N^*] \quad \text{Ec. 6.4}$$

$$\frac{d[A]}{dt} = k_{CI}[A^*] \quad \text{Ec. 6.5}$$

$$\frac{d[N]}{dt} = k_T[N^*] \quad \text{Ec. 6.6}$$

La concentración de $[A^*]$ se obtiene por medio de la integración de la ecuación diferencial 6.3 como:

$$[A^*] = [A^*]_0 e^{-(k_{TE}+k_{CI})t} \quad \text{Ec. 6.7}$$

A continuación la concentración de $[A]$ se obtiene sustituyendo la ecuación 6.5 en la fórmula 6.7 e integrando:

$$[A] = \frac{k_{CI}}{k_{TE}+k_{CI}} [A^*]_0 (1 - e^{-(k_{TE}+k_{CI})t}) \quad \text{Ec. 6.8}$$

La concentración de $[N^*]$ también se obtiene sustituyendo la ecuación 6.7 en la expresión 6.4 e integrando, dando como resultado:

$$[N^*] = \frac{k_{TE}[A^*]_0}{k_{TE}+k_{CI}-k_T} \{e^{-k_T t} - e^{-(k_{TE}+k_{CI})t}\} \quad \text{Ec. 6.9}$$

N puede ser excitada directamente a causa de la excitación de A (266 nm), por lo tanto la ecuación 6.9 se deduce de la siguiente forma:

$$[N^*] = \left\{ \frac{k_{TE}[A^*]_0}{k_{TE}+k_{CI}-k_T} [N^*]_0 \right\} e^{-k_T t} - \frac{k_{TE}[A^*]_0}{k_{TE}+k_{CI}-k_T} e^{-(k_{TE}+k_{CI})t} \quad \text{Ec. 6.10}$$

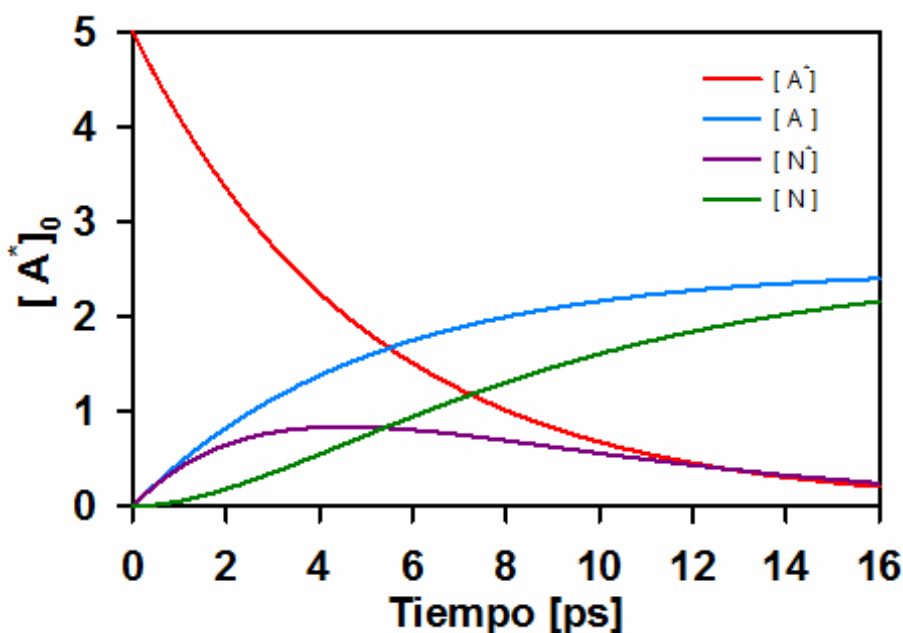
La concentración $[N]$ se obtiene sustituyendo la ecuación 6.6 en la expresión 6.10 e integrando:

$$[N] = \left\{ -\frac{k_T \left(\frac{k_{TE}[A^*]_0}{k_{TE}+k_{CI}-k_T} [N^*]_0 \right)}{k_T} \right\} e^{-k_T t} + \left\{ \frac{k_T \left(\frac{k_{TE}[A^*]_0}{k_{TE}+k_{CI}-k_T} \right)}{k_{TE}+k_{CI}} \right\} e^{-(k_{TE}+k_{CI})t} + cte \quad \text{Ec. 6.11}$$

$$\text{donde } cte = \left\{ \frac{k_T \left(\frac{k_{TE}[A^*]_0}{k_{TE}+k_{CI}-k_T} [N^*]_0 \right)}{k_T} \right\} - \left\{ \frac{k_T \left(\frac{k_{TE}[A^*]_0}{k_{TE}+k_{CI}-k_T} \right)}{k_{TE}+k_{CI}} \right\}$$

Después de que se obtiene la solución del modelo cinético, se determinan las constantes de velocidad para cada uno de los procesos involucrados teniendo en cuenta los tiempos obtenidos en los ajustes biexponenciales para una longitud de onda de 266 nm. La constante

de velocidad correspondiente al proceso de TE (k_{TE}) es de $1 \times 10^{13} \text{ s}^{-1}$ al igual que la constante de velocidad del decaimiento ultrarrápido de la adenina (k_{CI}) con el mismo valor. Con los valores de las constantes cinéticas obtenidos concluimos que existe una competencia cinética de estos dos procesos, además de observar que son procesos ultrarrápidos. Por otro lado, k_T con un valor de $2.4 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ corresponde a la constante de velocidad del decaimiento total de la nicotinamida. Finalmente, en la Gráfica 6.2 se muestra la concentración de cada uno de las especies que componen el sistema cinético del Esquema 6.1.



Gráfica 6.2. Concentración de $[A^*]$, $[A]$, $[N]$ y $[N^*]$ como función del tiempo de acuerdo al sistema de ecuaciones diferenciales (6.3)-(6.6).

En la Gráfica 6.2 observamos el comportamiento de cada una de las especies involucradas en el modelo cinético. La especie A^* presenta un decaimiento rápido, la especie N^* presenta un incremento debido a la TE por parte de la adenina y finalmente decae y las especies A y N se incrementan y se mantienen constantes. Los perfiles dependen fuertemente de las constantes de velocidad.

Manteniendo la longitud de excitación de 266 nm, se evalúa el comportamiento del NADH con longitudes de onda de emisión de 310 nm, 330 nm, 350 nm y 370 nm. Este procedimiento se realiza para NADH en solución amortiguadora y metanol, a condiciones de ángulo mágico, tiempos cortos (-3 → 5 ps) y ajustes monoexponenciales. Las curvas de decaimiento se

observan en las Figuras 6.10 y 6.11, la línea continua ajusta los datos experimentales obtenidos por la técnica de suma de frecuencias (círculos).

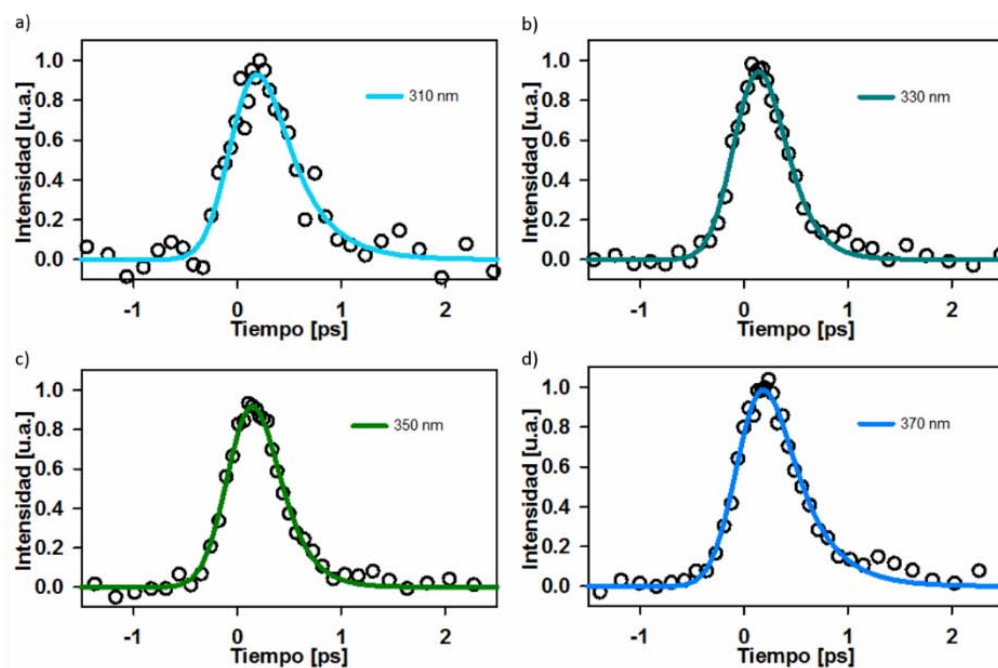


Figura 6.10. Decaimientos por suma de frecuencias del NADH en solución amortiguadora excitando a 266 nm. a) $\lambda_{emi} = 310$ nm b) $\lambda_{emi} = 330$ nm c) $\lambda_{emi} = 350$ nm and d) $\lambda_{emi} = 370$ nm.

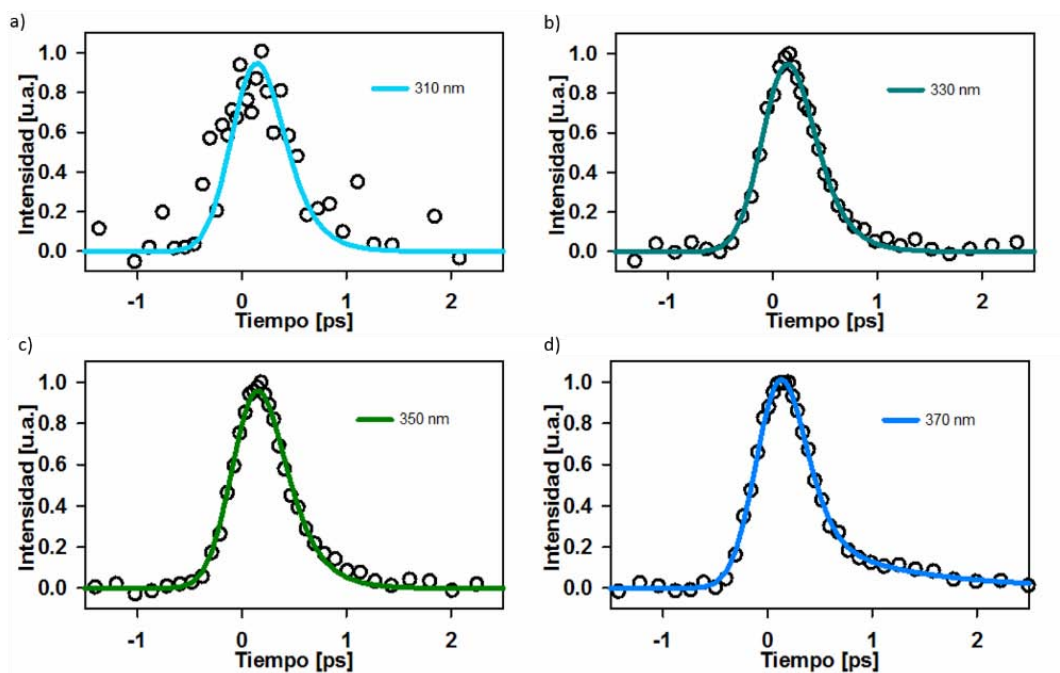


Figura 6.11. Decaimientos por suma de frecuencias del NADH en metanol excitando a 266 nm. a) $\lambda_{emi} = 310$ nm b) $\lambda_{emi} = 330$ nm c) $\lambda_{emi} = 350$ nm and d) $\lambda_{emi} = 370$ nm.

A partir de las gráficas observamos un decaimiento ultrarrápido para cada una de las longitudes de onda, este comportamiento se debe a que a estas longitudes de onda de emisión se favorece la emisión directa de la adenina. En solución amortiguadora, los valores que se obtienen para el tiempo de vida son de 325 ± 50 fs ($\lambda_{emi} = 310$ nm), 194 ± 20 fs ($\lambda_{emi} = 330$ nm), 204 ± 20 fs ($\lambda_{emi} = 350$ nm) y 317 ± 50 fs ($\lambda_{emi} = 370$ nm), valores que corresponden a una emisión de fluorescencia muy corta. A pesar de que la molécula se encuentra en su conformación plegada en solución amortiguadora, la emisión del estado excitado S_1 de la adenina se observa aisladamente en esta región espectral debido a las longitudes de emisión como se había mencionado anteriormente.

La Figura 6.11 muestra que el NADH en metanol al igual que en solución amortiguadora presenta valores de tiempo de vida en el orden de femtosegundos, en metanol, se reportan valores de tiempo de vida de la adenina de 446 ± 80 fs ($\lambda_{emi} = 310$ nm), 200 ± 20 fs ($\lambda_{emi} = 330$ nm), 223 ± 20 fs ($\lambda_{emi} = 350$ nm). Comparando estos resultados con NADH en solución amortiguadora, se observa un pequeño aumento en el tiempo de vida en cada una de las longitudes de onda de emisión. A una longitud de onda de emisión de 370 nm, el NADH en metanol presenta un ajuste biexponencial debido a que se obtienen dos tiempos de vida, uno largo de 927 ± 10 fs correspondiente a la relajación vibracional y el tiempo de la emisión de la adenina con un valor de 137 ± 10 fs.

Una vez establecidos los tiempos de vida presentes en el proceso de excitación del NADH con una longitud de 266 nm, se obtienen resultados para el NADH plegado y desplegado excitando a una longitud de onda de 380 nm. Al igual que en la Figura 6.8, en la Figura 6.12 se ilustran las diferentes curvas de decaimiento detectadas por la técnica de suma de frecuencias con la condición de ángulo mágico. Se emplean intervalos de longitudes de onda de emisión de 440 nm a 600 nm a tiempos largos (-10 \rightarrow 200 ps):

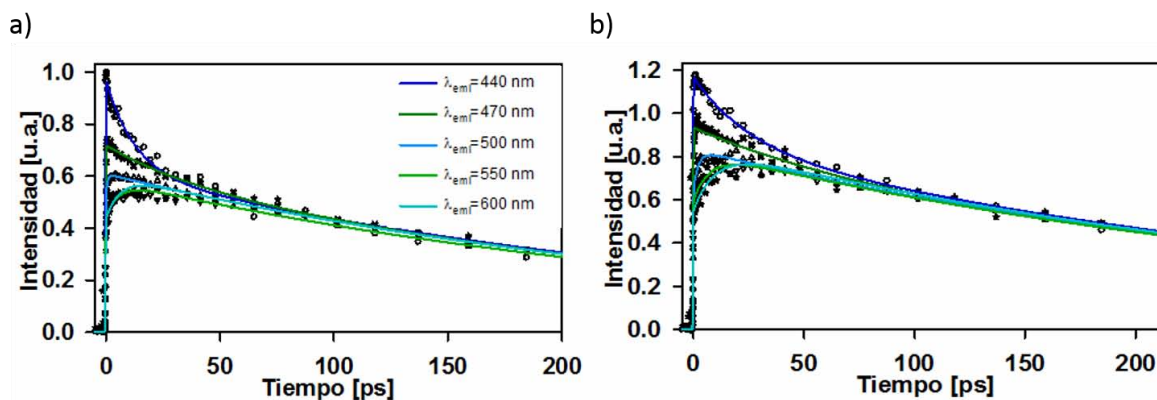
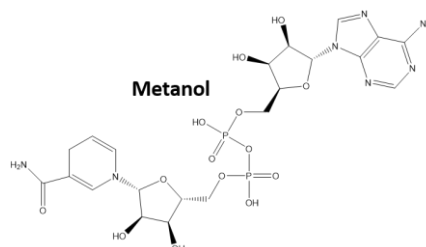
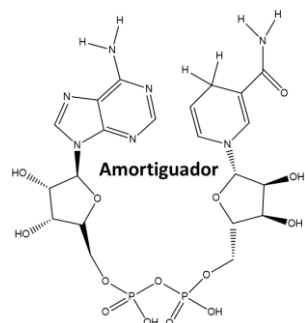


Figura 6.12. Decaimientos por suma de frecuencias del NADH excitando a 380nm a $\lambda_{emi} = 310$ nm 440, 470, 500, 550 y 600 nm. a) solución amortiguadora b) metanol a tiempos largos.

Las curvas de decaimiento muestran la emisión directa del estado excitado S_1 de la nicotinamida reducida. En este caso sólo se excita a la nicotinamida, por lo tanto no hay TE por parte de la adenina. Este comportamiento se observa para el NADH en solución amortiguadora y metanol. Las señales de emisión de fluorescencia ($\lambda_{emi} = 440$ nm, $\lambda_{emi} = 470$ nm, $\lambda_{emi} = 500$ nm, $\lambda_{emi} = 550$ nm y $\lambda_{emi} = 600$ nm) son ajustadas a una función biexponencial convolucionada con la función de respuesta del instrumento. En la Tabla 6.3 se resumen los tiempos de vida y los factores preexponenciales de estos tiempos.

Tabla 6.3. Parámetros obtenidos por los ajustes biexponenciales para los diferentes decaimientos de emisión de fluorescencia del NADH en solución amortiguadora y metanol ($\lambda_{exc}=380$ nm).

Solución Amortiguadora			Metanol	
λ_{emi} (nm)	α_1 (%)	α_2 (%)	α_1 (%)	α_2 (%)
440	44	56	27	73
470	32	68	12	88
500	(-)26	74	(-)18	82
550	(-)21	79	(-)24	76
600	(-)19	81	(-)27	73

λ_{emi} (nm)	τ_1 (ps)	τ_2 (ps)	τ_1 (ps)	τ_2 (ps)
440	19.2 ± 0.01	383.6 ± 9.4	24.7 ± 2.4	330.2 ± 5.8
470	69.9 ± 0.1	383.6 ± 5.6	55.1 ± 22.2	330.2 ± 5.8
500	0.2 ± 0.03	383.6 ± 11.2	2.2 ± 0.3	330.2 ± 5.7
550	2.1 ± 0.01	383.6 ± 5.6	7.3 ± 1.0	330.2 ± 7.2
600	4.2 ± 0.05	383.6 ± 1.5	9.6 ± 0.6	330.2 ± 4.3

En la Tabla 6.3 se resumen de igual forma los resultados del análisis biexponencial. En solución amortiguadora y metanol los valores de τ_1 y τ_2 corresponden al tiempo de vida de la nicotinamida reducida y al tiempo de relajación del disolvente, respectivamente. Observamos que el tiempo de vida de la nicotinamida reducida en solución acuosa corresponde con el valor mencionado en la literatura, ya que tiene un valor de 383.6 ps.^{1,5,22,23} En cuanto al valor de la nicotinamida reducida en metanol, se observa un valor semejante a aquel obtenido por la excitación del NADH a una longitud de 266 nm. Tanto para el NADH en solución amortiguadora como metanol, el tiempo de vida de la nicotinamida reducida se mantiene constante para todas las longitudes de onda de emisión.

Por otro lado, en las contribuciones del decaimiento total, observamos que el componente largo (τ_2) presenta una mayor contribución respecto al tiempo de relajación del disolvente

para ambos casos con valores que oscilan entre 56 y 88%. Además, se presenta un tiempo de acumulación para las longitudes de emisión de 500 a 600 nm en NADH en solución amortiguadora y metanol, el cual representa un aumento en la emisión del estado excitado electrónico S_1 de la nicotinamida reducida.

6.3.2. Espectros de emisión resueltos en el tiempo

Se calculan los espectros de emisión con resolución temporal (“Time Resolved Emission Spectra”, TRES) donde se estudia la evolución espectral durante los primeros picosegundos después de la excitación de la muestra. Para ello, se tiene en cuenta un escalamiento con los diferentes decaimientos correspondientes a las longitudes de onda y el espectro de emisión estático. Los espectros de emisión con resolución temporal tanto para el NADH en solución amortiguadora como para el NADH en metanol se muestran en la Figuras 6.13 y 6.14 para una longitud de excitación de 266 nm.

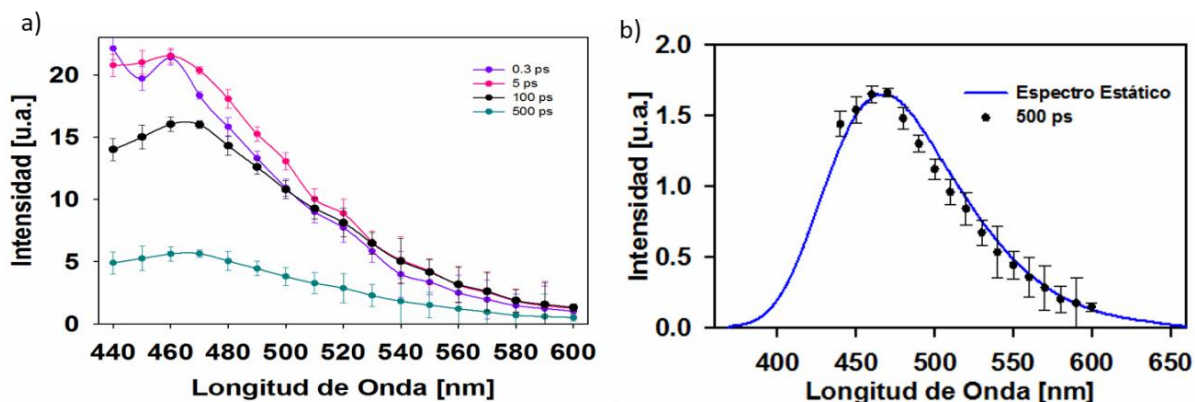


Figura 6.13. Espectros de emisión con resolución temporal a) NADH en solución amortiguadora b) comparación del espectro estático de emisión con el espectro resuelto en tiempo de 500 ps- $\lambda_{exc} = 266$ nm.

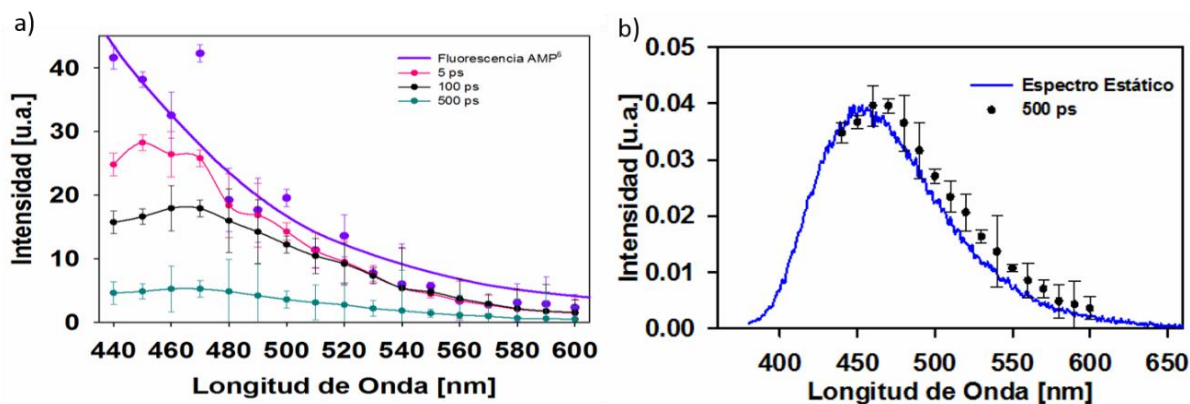


Figura 6.14. Espectros de emisión con resolución temporal a) NADH en metanol b) comparación del espectro estático de emisión con el espectro resuelto en tiempo de 500 ps- $\lambda_{exc} = 266$ nm.

En la Figura 6.13a se ilustra la relajación del NADH en solución amortiguadora, a tiempos cortos observamos espectros estructurados, los cuales hacen referencia a un estado localmente excitado con características vibroelectrónicas que se pierden con la relajación de la molécula. Además, en la Figura 6.13b vemos la similitud que existe del espectro de emisión estático del NADH con el espectro resuelto en el tiempo correspondiente a 500 ps. La evolución del espectro de emisión de NADH en metanol (Figura 6.14a y 6.14b) tiene el mismo comportamiento. Podemos observar la fluorescencia del AMP a tiempos cortos.

Los espectros resueltos en el tiempo con longitud de excitación a 380 nm también se ilustran en las Figuras 6.15 y 6.16. En las gráficas tanto para el NADH en solución amortiguadora como metanol se observa la relajación de la nicotinamida reducida. A tiempos cortos se ilustra el estado localmente excitado de este nucleótido representado por la estructura que presentan los espectros resueltos en tiempo. Finalmente, existe una similitud del espectro de emisión estático junto con el espectro resuelto en el tiempo de 500 ps en ambos casos.

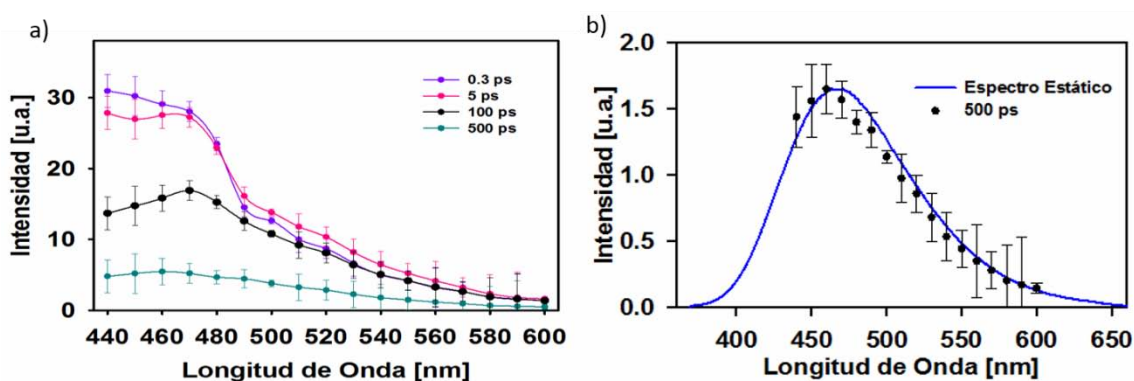


Figura 6.15. Espectros de emisión con resolución temporal a) NADH en solución amortiguadora b) comparación del espectro estático de emisión con el espectro resuelto en tiempo de 500 ps- $\lambda_{exc} = 380$ nm.

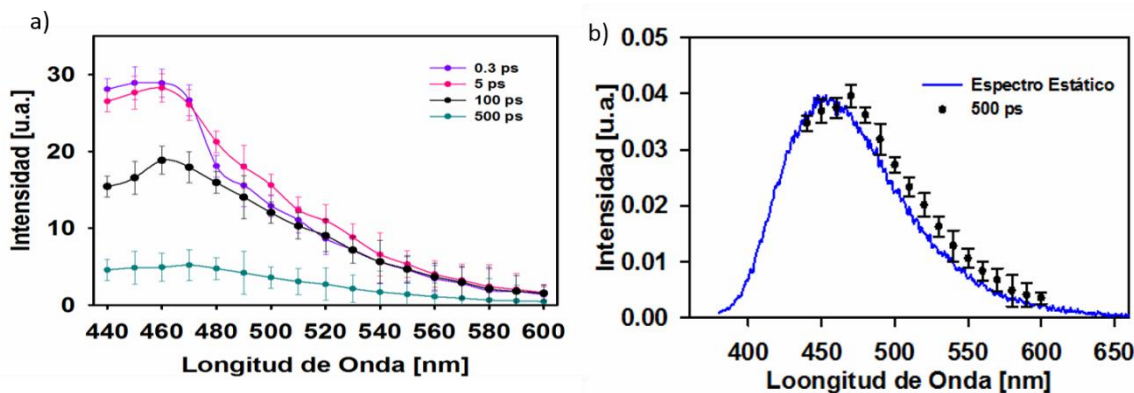


Figura 6.16. Espectros de emisión con resolución temporal a) NADH en metanol b) comparación del espectro estático de emisión con el espectro resuelto en tiempo de 500 ps- $\lambda_{exc} = 380$ nm.

6.3.3. Anisotropía de fluorescencia

Para estudiar la evolución de femtosegundos de la orientación relativa de la excitación y los momentos dipolares de transición de emisión durante la transferencia de energía y la relajación, se mide la anisotropía de fluorescencia del NADH en solución amortiguadora y metanol después de excitar a 266 nm las muestras en estudio. La anisotropía en función del tiempo se calcula según la ecuación 4.26. Ésta se evalúa a partir de los datos tomados por la técnica de suma de frecuencias con condición de excitación y detección en paralelo y perpendicular, y está denotada por los triángulos en la Figura 6.17.

La Figura 6.17 muestra los decaimientos correspondientes a las componentes paralela y perpendicular en donde la primera decae más rápido debido a la rotación del momento de transición dipolar del fluoróforo fuera de la orientación vertical. En la gráfica se observa que para NADH en solución amortiguadora la anisotropía cerca de $t=0$ tiene un valor aproximadamente de 0.07 debido a que el vector del momento dipolar de transición asociado con la absorción de la adenina no es paralelo al vector del momento dipolar de transición asociado con la emisión de la nicotinamida. En cuanto al valor de anisotropía del NADH en metanol cerca de $t=0$ se tiene un valor de 0.06 (valor semejante al NADH en solución amortiguadora) debido a la orientación preferencial que puede tomar la molécula en la conformación desplegada que influye en los vectores del momento dipolar de transición causando que estos no estén de forma paralela.

Con base al ángulo β formado entre los momentos dipolares de absorción y emisión a $t=0$, se obtienen valores de 47.86° y 48.83° para amortiguador y metanol respectivamente. Además, el tiempo de decaimiento de la anisotropía en amortiguador es de 7.3 ± 0.2 ps y en el metanol es de 8.5 ± 0.3 ps, tiempos asociados con la difusión o relajación rotacional de la molécula.

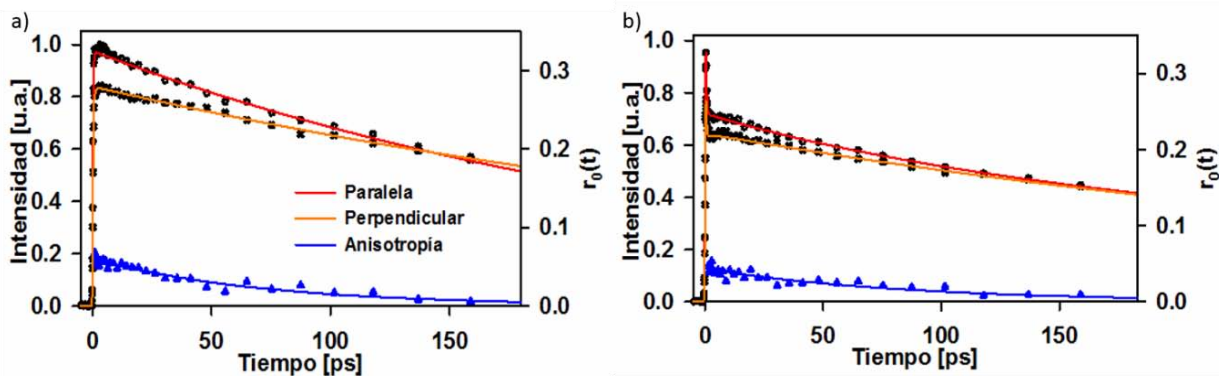


Figura 6.17. Mediciones de fluorescencia del NADH por la técnica de suma de frecuencias adquiridas con excitación-detección paralela (roja) perpendicular (naranja). La línea azul muestra los valores de anisotropía calculados a partir de las dos trazas paralela y perpendicular. a) solución amortiguadora b) metanol $\lambda_{exc} = 266$ nm and $\lambda_{emi} = 470$ nm.

Al igual que con excitación de 266 nm, se determina la anisotropía en función del tiempo con una longitud de excitación de 380 nm. La Figura 6.18 muestra los decaimientos de las componentes paralela y perpendicular, junto con la anisotropía para las soluciones de NADH en solución amortiguadora y metanol.

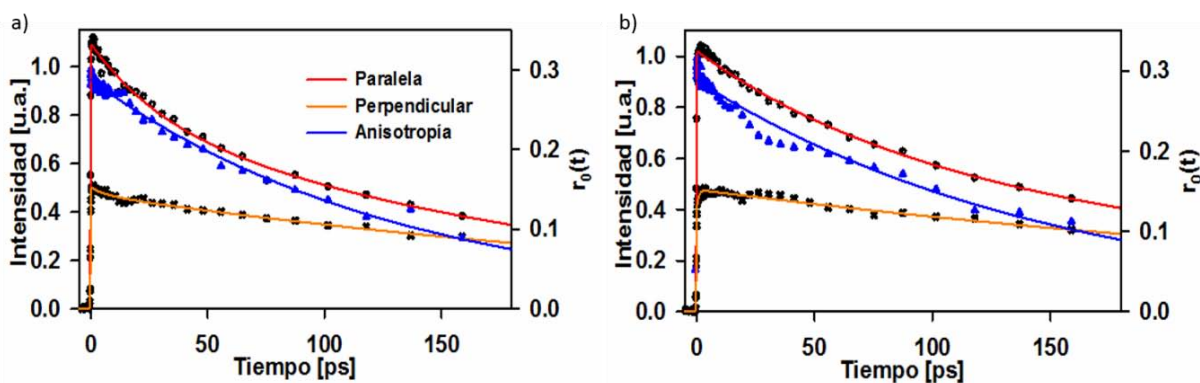


Figura 6.18. Mediciones de fluorescencia del NADH por la técnica de suma de frecuencias adquiridas con excitación-detección paralela (roja) perpendicular (naranja). La línea azul muestra los valores de anisotropía calculados a partir de las dos trazas paralela y perpendicular. a) solución amortiguador b) metanol $\lambda_{exc} = 380$ nm and $\lambda_{emi} = 470$ nm.

La anisotropía cerca de $t=0$ tiene un valor de 0.3 en ambas soluciones. Este valor hace referencia a que el momento dipolar de transición del estado de emisión de la nicotinamida reducida está orientado en la misma dirección que el estado originalmente formado. En otras palabras, el estado de la nicotinamida que se detecta es el mismo al cual se excita con una longitud de 380 nm. El ángulo β para este valor de anisotropía es de 24.09° . Además, los tiempos asociados con la relajación o difusión rotacional de la molécula son 133.4 ± 2.2 ps en solución amortiguadora y 153.4 ± 2.7 ps en metanol, tiempos más largos en comparación con los obtenidos con una longitud de excitación de 266 nm.

6.4. Transferencia de energía- Förster

En los cálculos de eficiencia de TE proporcionados por el programa photochemCAD se obtiene la relación de la distancia con la TE cómo se ilustra en la Figura 6.19.

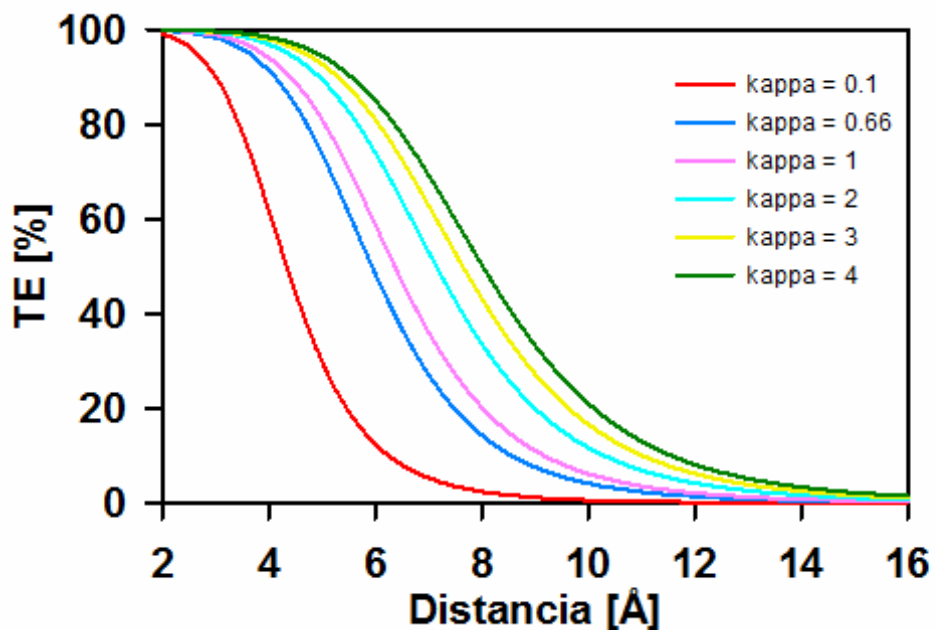


Figura 6.19. TE del NADH (Dependiente de la distancia y el factor de orientación).

En la Figura 6.19 observamos que la TE entre los dos nucleótidos, adenina y nicotinamida está fuertemente relacionada con la distancia a la que estos se encuentren y también con la orientación que tengan sus momentos dipolares de transición (factor de orientación). Por lo tanto, a un factor de orientación más alto y una distancia menor, existe un valor de transferencia más alto. Si tomamos los valores obtenidos por medio de espectroscopia estática relacionados a la eficiencia o rendimiento de TE teniendo en cuenta un factor de orientación fijo de $0.66=2/3$ (factor apropiado para momentos dipolares de transición aleatorios entre el donador y el aceptor)^{1,39} obtenemos distancias como las que se ilustran en la Tabla 6.4.

Tabla 6.4. Distancia entre los nucleótidos adenina y nicotinamida en relación con el factor de orientación, el rendimiento de transferencia de energía y el porcentaje de metanol.

% Metanol	%TE	Distancia Promedio (Å)
0	48	6.1
20	39	6.5
40	28	7.2
60	17	8.0
80	11	8.7
100	10	9.1

Concluimos que el metanol realmente sí favorece la conformación desplegada de la coenzima como observamos en la Tabla 6.4 al tener una distancia de 9.1Å con un 100% de metanol (una distancia mayor entre los nucleótidos) en comparación con una distancia de 6.1Å en 100% de amortiguador de fosfatos. Por otro lado, reconfirmamos la dependencia de la distancia para que exista una mayor eficiencia en la TE tal y como lo predice Förster. Y, en cuanto a nuestros estudios logramos concluir que la adenina debido a su decaimiento ultrarrápido y a su competencia con el proceso de TE, esta es más sensible a la distancia que presenta con la nicotinamida reducida.

7. CONCLUSIONES

- A partir de la técnica de espectroscopia estática se logró tener mediciones directas del proceso de TE por medio de los espectros de excitación obtenidos para las diferentes mezclas de solución amortiguadora:metanol. Con relación a las intensidades de los espectros de excitación y las absorbancias correspondientes a los espectros de absorción se obtienen valores de una eficiencia de TE de 48% y 10% para NADH en su conformación plegada y desplegada.
- Mediante la técnica de resolución de fluorescencia por suma de frecuencias con una longitud de excitación de 266 nm y 380 nm se obtienen los tiempos característicos de los procesos involucrados en la dinámica de relajación del NADH en una conformación plegada y desplegada.
- Para una longitud de excitación de 266 nm y en solución de metanol se determina un tiempo de vida muy corto para la adenina ≤ 100 fs a causa de las intersecciones cónicas que presenta por el cruce de las superficies de energía potencial correspondientes a sus estados S_0 y S_1 . En metanol se favorece una conformación desplegada y por ende una mayor distancia entre los nucleótidos lo que permite que esta alcance a relajarse y la TE sea menos eficiente a la nicotinamida.
- Se obtiene la duración del proceso de TE con un valor ≤ 100 fs cuando el NADH está en su conformación plegada (metanol) y excitando a la adenina con una longitud de onda de excitación de 266 nm.
- Se logra afirmar que el proceso de TE es capaz de competir cinéticamente con otros procesos debido a la mayor contribución que este presenta en el decaimiento total, datos reportados en la Tabla 6.1.

- Con los estudios publicados y el análisis cinético se establece que existe una competencia cinética entre el decaimiento ultrarrápido de la adenina y el proceso de TE, con constantes cinéticas ultrarrápidas de valor $1 \times 10^{13} \text{ s}^{-1}$.
- Se observa la excitación y emisión directa del estado electrónico excitado S_1 de la nicotinamida obteniendo valores de tiempo de vida en el orden de los picosegundos de 383.6 ps para NADH en buffer, y 330.2 ps para NADH en metanol.
- Mediante anisotropía de fluorescencia se demuestra que para una conformación plegada y una longitud de excitación de 266 nm, se obtiene un valor bajo de 0.07 el cual confirma que el vector del momento dipolar de transición asociado con la absorción de la adenina no es paralelo al vector del momento dipolar de transición asociado con la emisión de la nicotinamida, demostrando que existe TE, ya que un nucleótido es el que absorbe y el otro es el que emite.
- El estudio de la espectroscopia de emisión resuelta en el tiempo demuestra la relajación de la molécula con respecto al tiempo, y para ambos casos ya sea con excitación a 266 nm y 380 nm a tiempos tempranos se observan las características vibroelectrónicas del estado localmente excitado de la adenina y la nicotinamida.
- Por medio de la teoría de Förster se obtienen las distancias entre los dos nucleótidos asociadas a los valores de eficiencia de TE calculados por espectroscopia estática para las diferentes mezclas. Se obtiene una distancia entre los nucleótidos de 9.1Å de NADH desplegado en comparación con 6.1Å de NADH plegado.
- Disolventes como metanol y amortiguador de fosfatos favorecen una conformación desplegada y plegada, respectivamente. Esto se puede observar en los resultados obtenidos por Resonancia Magnética Nuclear- ROESY, en donde por medio de la correlaciones interprotón se logra obtener evidencia acerca de una conformación plegada o desplegada.

- Finalmente, con los resultados de espectroscopia por resolución de femtosegundos, espectroscopia estática y el modelado de Förster se logra reafirmar que la distancia entre los nucleótidos adenina y nicotinamida influye de forma significativa en el proceso de TE. Por ende, cuando la molécula está en su conformación plegada, la adenina absorbe y transfiere parte de su energía a la nicotinamida debido a la cercanía a la cual se encuentran los fragmentos. Pero debido a la competencia cinética que existe entre la TE y el decaimiento ultrarrápido de la adenina en el NADH, la adenina es más sensible a la distancia a la que se encuentre con la nicotinamida.

8. ANEXOS

8.1. Sistema Láser

El láser se caracteriza por ser el componente principal en espectroscopía de resolución temporal ya que tiene como función medir los eventos ultrarrápidos que le ocurren a una molécula cuando se encuentra en el estado excitado. La amplificación y la naturaleza propia de la emisión estimulada, que proporciona fotones idénticos a los que la estimulan, son las razones fundamentales de las propiedades de la luz láser: coherencia, direccionalidad y monocromaticidad.⁴⁹

Un láser se compone de tres elementos esenciales (Figura 8.1): un medio activo el cual amplifica la luz por medio de emisión estimulada, una fuente de bombeo que excita al medio activo para generar la inversión de población, y una cavidad óptica que se compone de dos espejos, cada uno con un alto grado de reflectividad en donde la luz viaja de extremo a extremo con una frecuencia específica cierto número de veces para su respectiva amplificación. En resumen, la cavidad es el componente de mayor relevancia gracias a su función de producir un mecanismo de retroalimentación de fotones generados en el medio de amplificación.⁵²

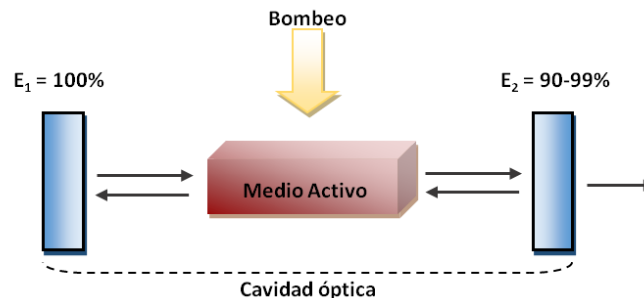


Figura 8.1. Componentes básicos de un láser. E_1 y E_2 : espejos que conforman la cavidad óptica con su respectiva reflectancia.

8.1.1. Láser titanio:zafiro

La generación de pulsos de femtosegundos se ha logrado en cavidades en donde el medio activo, es un cristal de titanio:zafiro, el ión Ti^{3+} incluido en un cristal de zafiro (Al_2O_3) forman

el medio activo del láser de titanio:zafiro ($\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$). Este láser se caracteriza por tener un rango de sintonizabilidad amplio comparado con los láseres conocidos hoy en día, con longitudes de onda posibles entre 670-1100 nm y por tener un rendimiento cuántico de hasta el 80% a temperatura ambiente. Su pico de absorción se encuentra cerca de los 500 nm debido a las transiciones vibracionales permitidas $d-d$ del ión Ti^{3+} en un ambiente octaédrico provisto por átomos de oxígeno de la red hospedadora, mientras que su pico de emisión se encuentra alrededor de 790 nm^{36,53,54,55} como se muestra en la Figura 8.2. Por otro lado presenta una alta conductividad térmica, una buena inercia química (poca tendencia a reaccionar químicamente con otra especie) y una gran rigidez mecánica, lo cual lo hace un buen material capaz de soportar grandes potencias al bombearlo.

Normalmente este cristal puede ser bombeado por láseres de onda continua (cw) como el láser de Argón. De régimen pulsado como el Nd:YAG (acrónimo de las siglas en inglés “Neodymium-doped yttrium aluminium garnet” y Nd:YLF (acrónimo de las siglas en inglés “Neodymium-doped yttrium lithium fluoride), duplicados en frecuencia (con emisión de radiación de longitud de onda de aproximadamente de 532 nm).

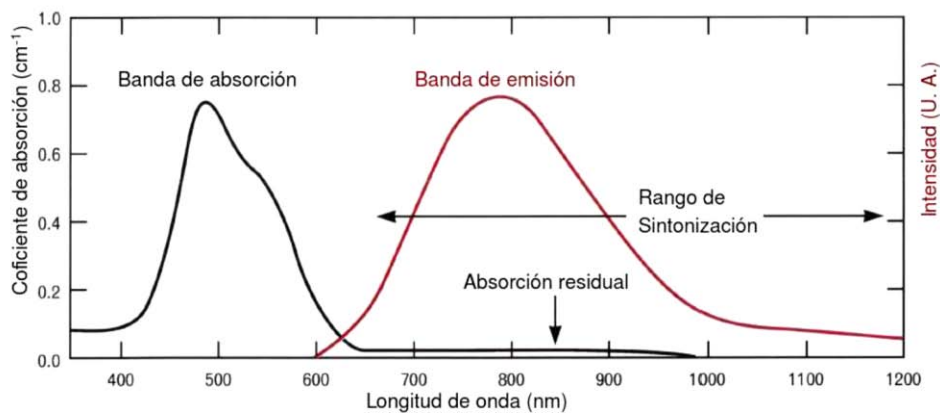


Figura 8.2. Espectro de emisión y absorción del $\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$.⁵⁵

8.1.2. Absorción, emisión estimulada y emisión espontánea

Cuando un sistema se encuentra inicialmente en su estado basal o estado 1 y se aplica un campo electromagnético, existe la probabilidad de que el átomo sufra una transición del estado fundamental al estado excitado conociéndose este proceso como fenómeno de

absorción (Figura 8.3a). Por otro lado, un electrón en un nivel de energía superior es capaz de decaer al estado fundamental por sí solo emitiendo un fotón en el proceso (emisión espontánea- Figura 8.3b). A continuación discutimos lo que ocurre cuando un átomo excitado se encuentra en presencia de un campo electromagnético. Un fotón interaccionando con un átomo inicialmente excitado puede provocar que éste pase a su estado fundamental emitiendo un nuevo fotón que se suma al que provocó la transición. Este proceso, denominado emisión estimulada (Figura 8.3c), se caracteriza además porque el fotón emitido por el átomo tiene propiedades idénticas al fotón inicial.^{56,53}

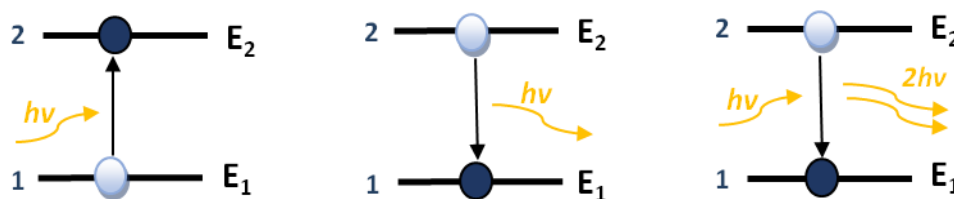


Figura 8.3. Esquema de un sistema de dos niveles que muestra el fenómeno de a) absorción b) emisión espontánea c) emisión estimulada.

Existe una diferencia entre los dos procesos de emisión. En el caso de la emisión espontánea, el fotón emitido no presenta una fase definida y el proceso de emisión ocurre en cualquier dirección. Por el contrario, en la emisión estimulada, el segundo fotón que se emite tiene la misma energía, la misma dirección y fase que el fotón incidente.

- Coeficientes de Einstein

La relación que existe entre los coeficientes de emisión y absorción descrita por la ley de Kirchoff proviene de una relación fundamental a nivel microscópico y tiende a expresarse a través de relaciones entre los coeficientes de Einstein.

Cabe decir que las relaciones entre los coeficientes de Einstein se basan en un sistema cuántico idealizado compuesto por dos niveles de energía: un nivel inferior 1, de energía E_1 , peso estadístico g_1 y población n_1 ; y un nivel superior 2, de energía E_2 , peso estadístico g_2 y población n_2 . Las transiciones entre los niveles se dan por procesos de absorción, emisión espontánea y emisión estimulada de un fotón de energía $h\nu = E_2 - E_1$ (Figura 8.4).

El valor E_2 presenta una indeterminación descrita por una función $\phi(\nu)$ la cual representa la probabilidad de emitir o absorber un fotón con una energía cercana a $\nu_0 = \Delta E/h$. La función está centrada en ν_0 y el ancho de la misma está dado por el principio de indeterminación $\Delta E \Delta t \geq \hbar$, siendo Δt el tiempo de decaimiento desde el nivel 2.

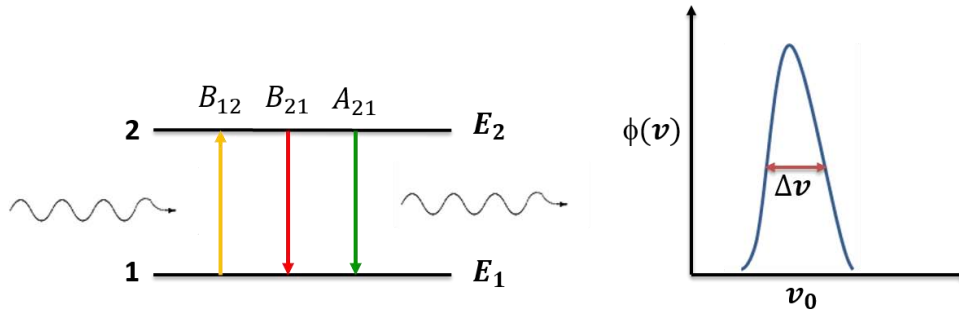


Figura 8.4. Izquierda:esquema que representa las transiciones entre los estados 1 y 2. Absorción de un fotón (coeficiente B_{12}), emisión estimulada (coeficiente B_{21}) y emisión espontánea (coeficiente A_{21}) Derecha:función de probabilidad de que el sistema absorba o emita un fotón.

La emisión espontánea, se describe por el coeficiente de emisión A_{21} , mide la probabilidad de transición por unidad de tiempo (s^{-1}), la absorción por lo tanto influye en el flujo incidente de radiación dado por J_ν y la probabilidad de transición por absorción queda en términos del coeficiente de Einstein B_{12} como $B_{12}\bar{J}$ donde:

$$\bar{J} = \int_0^\infty J_\nu \phi(\nu) d\nu \quad \text{Ec.8.1}$$

la cual representa el flujo de radiación y la respuesta del sistema.

En cuanto a la emisión estimulada la cual también depende del flujo incidente de radiación, pero de manera análoga al proceso de absorción, el coeficiente de Einstein queda expresado de la misma forma $B_{21}\bar{J}$.

Ahora bien, se dice que existe un equilibrio estadístico, si el número de transiciones de $1 \rightarrow 2$ es igual a las transiciones de $2 \rightarrow 1$, es decir:

$$n_1 B_{12} \bar{J} = n_2 B_{21} \bar{J} + n_2 A_{21} \quad \Rightarrow \quad \bar{J} = \frac{A_{21}/B_{21}}{n_1 B_{12}/n_2 B_{21} - 1} \quad \text{Ec.8.2}$$

Siendo esta una relación fundamental entre las poblaciones de los niveles y la intensidad de radiación. Además, si se tiene el equilibrio termodinámico, las poblaciones de los niveles se pueden relacionar a través de la ley de Boltzmann como se muestra:

$$n_1/n_2 = (g_1/g_2)e^{-(E_1-E_2)/kT} \quad \text{Ec.8.3}$$

Donde,

$$\bar{J} = \frac{A_{21}/B_{21}}{(g_1B_{12}/g_2B_{21})e^{hv/kT}-1} \quad \text{Ec.8.4}$$

Identificando la ecuación anterior con la ley de Kirchoff, $J_V = B_V$, se obtienen las relaciones entre los coeficientes de Einstein:

$$g_1B_{12} = g_2B_{21}, \quad A_{21} = \frac{2hv}{c^2} B_{21} \quad \text{Ec. 8.5}$$

Finalmente, estos coeficientes se caracterizan por ser propiedades inherentes a los sistemas cuanticos, independientes de las poblaciones de los niveles de energía, que relacionan tanto los procesos de emisión como absorción. Por otro lado, la primera relación nos indica que la probabilidad de emisión espontánea es igual a la probabilidad de absorción y la segunda relación indica que si un material no presenta emisión estimulada tampoco habrá lugar para que se dé el fenómeno de emisión espontánea.^{36,53}

8.1.3. Inversión de población

Para que se efectúe una acción por parte del láser se necesita que el medio activo alcance la inversión de población lo que conlleva a que el proceso de emisión predomine sobre el proceso de absorción. Esto quiere decir que el número de transiciones de absorción en el medio activo sea menor que el número de transiciones de emisión. La inversión de población se logra con un nivel de tres o cuatro, en este caso estudiaremos el sistema de cuatro niveles el cual es característico del titanio:zafiro y del Nd:YAG, medios activos que componen los láseres del grupo de investigación.^{36,53}

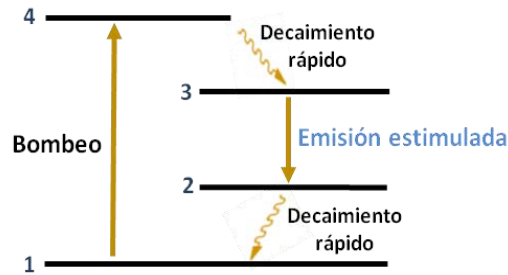


Figura 8.5. Esquema ilustrativo de cuatro niveles donde se representa el decaimiento rápido entre los niveles 4→3 y 2→1 y la emisión estimulada entre los niveles 3 y 2.

Un haz de bombeo con suficiente energía y operando de modo continuo asegura que se pueble eficientemente el nivel 4 (estado excitado) tal como se muestra en la Figura 8.5 el cual por medio de transiciones no radiativas decae muy rápidamente al nivel 3, a continuación el nivel 3, decae por emisión espontánea de fotones al nivel 2, y mientras tanto en este proceso algunos de los fotones emitidos quedan atrapados entre estos dos niveles de tal forma que al pasar varias veces por el medio activo se genera una cascada de emisiones estimuladas y por lo tanto la emisión láser. Para terminar el ciclo existe un segundo decaimiento rápido hacia el estado fundamental o nivel 1 permitiendo mantener la condición de inversión de población en donde $n_3 > n_2$. Cabe decir, que este ciclo se lleva a cabo las veces necesarias para que ocurra el proceso de amplificación.

8.1.4. Oscilador y amarre de modos

El oscilador de titanio:zafiro permite generar pulsos ultracortos y uno de ellos es el método por amarre de modos, el cual se caracteriza por generar una interferencia constructiva de los modos longitudinales que coexisten dentro de la cavidad óptica.

Sabemos que las ondas electromagnéticas estacionarias que ocupan la cavidad son amplificadas al ser devueltas al medio activo una y otra vez por los espejos. Pero al reflejarse en ellos, estas ondas además interfieren entre sí y solamente sobreviven aquellas para las que el campo eléctrico se anula en los espejos. Esta condición límite se satisface únicamente cuando en el interior de la cavidad encaja un número entero de semilongitudes de onda, tal como se muestra en la Figura 8.6 y en la ecuación 8.6.

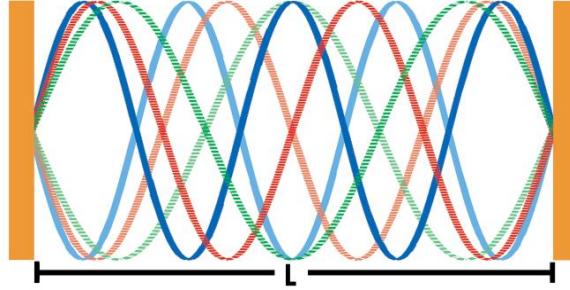


Figura 8.6. Ondas electromagnéticas estacionarias entre los espejos de la cavidad óptica.

$$L = n \frac{\lambda}{2} \quad \text{Ec. 8.6}$$

En la ecuación 8.6, n es un número entero denotado como modo longitudinal, L es la longitud de la cavidad óptica y λ la longitud de onda de emisión. Los modos longitudinales oscilan de forma independiente en un láser porque sus fases son aleatorias $\Delta\varphi = f(t)$, pero si estas se ajustan a una magnitud constante, se acoplan una gran cantidad de modos longitudinales que forman un tren de pulsos los cuales tienen una periodicidad que está definida como $T = 2L/c$. La duración de un pulso depende del ancho de banda del medio de ganancia y del número de modos longitudinales, por lo tanto a mayor ancho de banda del espectro de emisión del medio activo, mayor cantidad de modos longitudinales acoplados y por lo tanto menor duración.³⁷

8.1.5. Efecto Kerr

Para que se genere un amarre de modos dentro de la cavidad es necesario que se dé origen al efecto Kerr, el cual implica que el índice de refracción del medio (n) depende de la intensidad de la luz (I) de acuerdo con la ecuación:

$$n = n_0 + n_2 I \quad \text{Ec.8.7}$$

donde, n_0 es el índice de refracción lineal del medio y n_2 es el coeficiente no lineal del índice de refracción del orden de 10^{-15} . Si la intensidad corresponde a un valor muy pequeño este término se desprecia, pero si es un valor grande, el índice tiene un valor significativo en el sistema y se da el autoenfoco de Kerr. La Figura 8.7 muestra de forma ilustrativa como un índice de refracción representando como un perfil gaussiano atraviesa un medio Kerr, el cual causa una reducción en el ancho del perfil de intensidad debido al mayor índice de refracción que se presenta en el eje de propagación en comparación con los extremos.³⁶



Figura 8.7. Evolución del perfil de intensidad gaussiano.

8.1.6. Amplificación de pulsos

Anteriormente se explicó detalladamente la formación de los pulsos láseres ultracortos. En esta sección se hace especial énfasis en la amplificación de pulsos debido a que los pulsos obtenidos del oscilador de titanio:zafiro no tienen la energía suficiente para excitar la muestra a analizar. La intensidad de los pulsos emitidos desde el oscilador se puede incrementar mediante amplificadores, uno de ellos es el de pulsos dispersos el cual consta de un expansor temporal, que incrementa la duración del pulso en un tiempo de femtosegundos a picosegundos, de un amplificador que con la ayuda de celdas Pockels y el medio de ganancia, el pulso gana potencia y de un compresor temporal que reestablece las propiedades del pulso como se ilustra en la Figura 8.8.³⁶

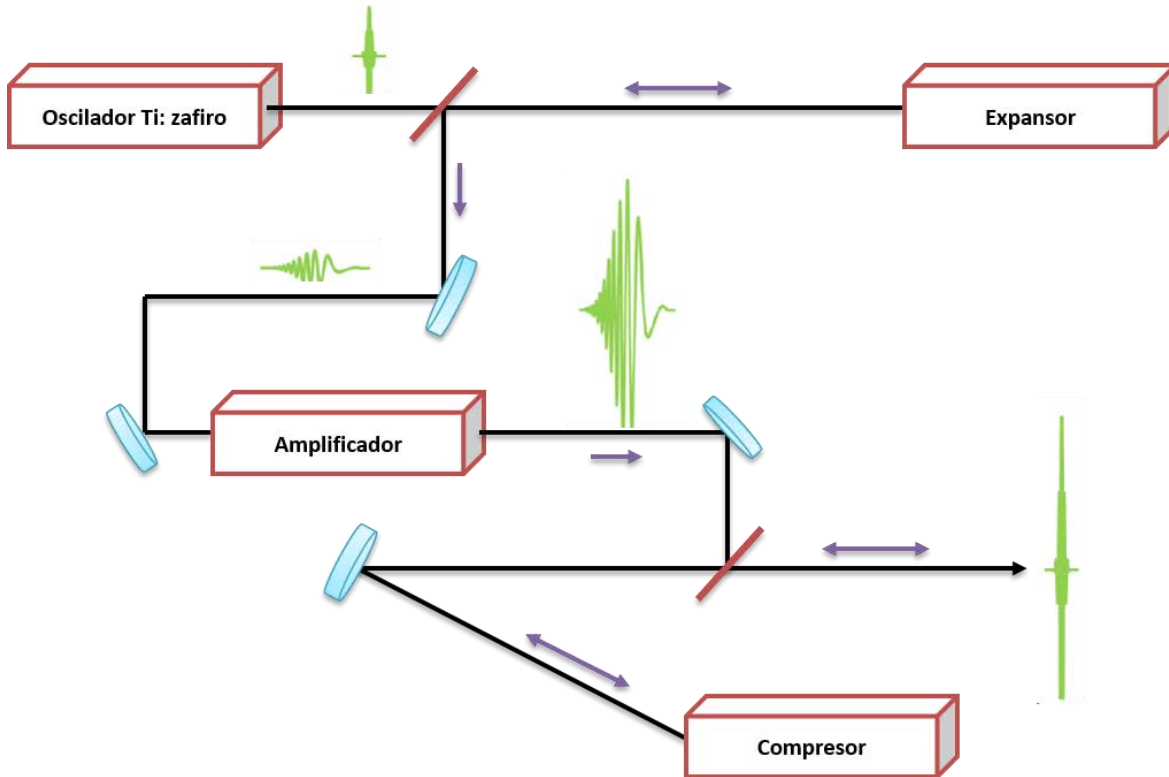


Figura 8.8. Esquema del amplificador regenerativo compuesto por expansor, amplificador y compresor.

Es necesario hablar de los procesos de dispersión de retardo de grupo que se presentan antes de abordar con cada una de las etapas en el proceso.^{36,57}

8.1.7. Dispersión de retardo de grupo GDD

El fenómeno denominado dispersión, se define como la variación del índice de refracción de un material respecto a la longitud de onda. En los láseres de femtosegundos, las propiedades de dispersión del medio de ganancia y los elementos ópticos de la cavidad óptica conllevan a que se afecte la duración del pulso. El campo eléctrico de un pulso está dado por:

$$E(t) = \int_{-\infty}^{\infty} E(\omega) \exp[i(\omega t + \varphi(\omega))] d\omega \quad \text{Ec.8.8}$$

Donde ω es la frecuencia angular y φ es la fase. Cabe decir, que la $\varphi(\omega)$ es la fase de cada componente espectral y se puede expresar en términos de una expansión de Taylor alrededor de una frecuencia central ω_0 como se muestra a continuación:

$$\varphi(\omega) = \varphi(\omega_0) + \varphi'(\omega_0)(\omega - \omega_0) + \frac{\varphi''(\omega_0)}{2}(\omega - \omega_0)^2 + \dots \quad \text{Ec.8.9}$$

El primer término en la ecuación contribuye al desplazamiento de la fase, el segundo término describe el tiempo de retraso de la propagación del pulso a través de un medio. Si sustituimos la ecuación 8.9 en 8.8 se obtiene:

$$E(t) = \exp(i\omega_0 t + \varphi(\omega_0)) \int_{-\infty}^{\infty} E(\omega) \exp i \Delta\omega \left\{ t + \varphi'(\omega_0) \frac{\varphi''(\omega_0)}{2} \Delta\omega \right\} d\omega \quad \text{Ec.8.10}$$

donde ω_0 es la frecuencia angular central, φ es la fase, t es el tiempo y $\Delta\omega$ es un valor constante. Esta ecuación corresponde al producto de dos factores, en donde el primero de ellos define la fase de onda de acarreo gracias a $\varphi(\omega_0)$ y el segundo factor se aproxima a una gaussiana. Si el segundo factor es considerado hasta $\varphi'(\omega_0)$ el cual se denomina retraso de grupo τ_g , entonces se dice que el pulso está limitado por transformación que quiere decir que la forma temporal de pulso no cambia.

El componente τ_g redefine el origen temporal del pulso y se define como el tiempo que transcurre antes de que aparezca la señal. Por ejemplo, si el pulso recorre una distancia L , entonces se habla de la velocidad de grupo v_g la cual se define como L/τ_g donde τ_g es el tiempo requerido para que la componente espectral del pulso viaje con una velocidad de grupo v_g a través de un medio de longitud L .^{36,57}

Si en la ecuación 8.10 se considera que el segundo factor va hasta el término $\varphi''(\omega_0)$, en este caso el pulso ya no se encuentra limitado por transformación. Por lo tanto, el término $\varphi''(\omega_0)$ describe el segundo orden de dispersión y afecta la forma temporal del pulso, además se le conoce como dispersión de retraso de grupo (GDD, por sus siglas en inglés Group Delay Dispersion). Si consideramos que un pulso presenta componentes espectrales de mayor y menor frecuencia, una dispersión de retraso de grupo GDD^+ ocurre cuando un componente de mayor frecuencia recorre una distancia mayor que una componente de menor frecuencia

cuando atraviesa un elemento óptico. Por el contrario, si la componente de menor frecuencia recorre una distancia más pequeña se obtiene un retraso de grupo GDD^- .

8.1.8. Expansión y compresión temporal de pulsos

Un pulso puede expandirse o comprimirse temporalmente con el uso de rejillas de difracción o prismas. La expansión temporal de los pulsos se caracteriza porque se induce una dispersión de retraso positiva GDD^+ gracias al arreglo óptico compuesto por un par de rejillas de difracción que se encuentra de forma antiparalela y un telescopio en medio de estas. Los pulsos que entran al expansor conservan la misma frecuencia de repetición y la misma energía, pero la duración del pulso cambia debido a su retraso temporal. La dispersión de retardo de grupo en el expansor está dada y puede ser cuantificada experimentalmente en el arreglo óptico, por medio de la ecuación:

$$GDD = \frac{8\pi^2 c}{\omega_0 d^2 \cos^2 \beta} (2f - 2s) \quad \text{Ec.8.11}$$

donde ω_0 es la frecuencia angular central del pulso, c es la velocidad de la luz, d es el período de la rejilla en metros, β es el ángulo de difracción para la longitud de onda central, f la distancia focal del telescopio y s es la distancia entre los lentes y las rejillas de difracción.

Es posible recuperar la duración temporal del pulso ocasionada por el expansor por medio de un arreglo óptico del compresor. En este caso las rejillas de difracción que se encuentran en una disposición paralela hacen posible que las componentes espectrales de menor frecuencia recorran menos distancia e implique una compresión del pulso y se genere un GDD^- como se había mencionado antes. La dispersión de retardo de grupo del compresor está dada por la siguiente ecuación:

$$GDD = \frac{-8\pi^2 c}{\omega_0^3 d^2} \times \frac{1}{\left\{1 - \left[\text{sen}\alpha - \frac{\lambda_0}{d}\right]^2\right\}^{3/2}} \times L_g \quad \text{Ec.8.12}$$

donde ω_0 es la frecuencia angular central del pulso, c es la velocidad de la luz, d es el período de la rejilla, α es el ángulo de incidencia del pulso respecto a la normal de las rejillas, L_g es la distancia entre las rejillas y λ_0 es la longitud de onda central de pulso láser.^{36,53,57}

9. REFERENCIAS

1. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, New York, USA, 3rd edn. (2006).
2. Yu, J.-S., Guo, H.-W., Wang, C.-H., Wei, Y.-H. & Wang, H.-W. Increase of reduced nicotinamide adenine dinucleotide fluorescence lifetime precedes mitochondrial dysfunction in staurosporine-induced apoptosis of HeLa cells. *J. Biomed. Opt.* **16**, 036008–036008 (2011).
3. Tropp, J. & Redfield, A. G. Proton Magnetic Resonance of NADH in Water-Methanol Mixtures. Conformational Change and Behavior of Exchangeable Proton Resonances as a Function of Temperature. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 534–538 (1980).
4. Hull, R. V., Conger, P. S. & Hoobler, R. J. Conformation of NADH studied by fluorescence excitation transfer spectroscopy. *Biophys. Chem.* **90**, 9–16 (2001).
5. Blacker, T. S. & Duchen, M. R. Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence. *Free Radic. Biol. Med.* **100**, 53–65 (2016).
6. Gustavsson, T., Sharonov, A., Onidas, D. & Markovitsi, D. Adenine, deoxyadenosine and deoxyadenosine 5'-monophosphate studied by femtosecond fluorescence upconversion spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **356**, 49–54 (2002).
7. Pecourt, J. M. L., Peon, J. & Kohler, B. DNA excited-state dynamics: Ultrafast internal conversion and vibrational cooling in a series of nucleosides. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 10370–10378 (2001).
8. Hassan, W. M. I. *et al.* Ultrafast radiationless transition pathways through conical intersections in photo-excited 9H-adenine. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 5317–5328 (2010).
9. Cohen, B., Hare, P. M. & Kohler, B. Ultrafast Excited-State Dynamics of Adenine and Monomethylated Adenines in Solution: Implications for the Nonradiative Decay Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 13594–13601 (2003).

10. Weber, G. Intramolecular Transfer of Electronic Energy in Dihydro Diphosphopyridine Nucleotide. *Nature* **180**, 1409–1409 (1957).
11. Freed, S., Neyfakhl, E. A. & Tumerman, L. . Influence of solvents on the intramolecular energy transfer in NADH and NADPH. *Biochim. Biophys* **143**, 432–434 (1977).
12. Scott, T. G., Spencer, R. D., Leonard, N. J. & Weber, G. Emission Properties of NADH. Studies of Fluorescence Lifetimes and Quantum Efficiencies of NADH, AcPyADH, and Simplified Synthetic Models. *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 687–695 (1970).
13. Velick, S.F., Light and life, in: W.D. McElroy, B. G. & (Eds.). Spectra and Structure in Enzyme Complexes of Pyridine and Flavin Nucleotides. *Johns Hopkins, Balt.* **24**, 55–62 (1971).
14. Yang, X., Bi, S., Yang, L., Zhu, Y. & Wang, X. Multi-NMR and fluorescence spectra study the effects of aluminum(III) on coenzyme NADH in aqueous solutions. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **59**, 2561–2569 (2003).
15. Formoso, E., Mujika, J. I., Grabowski, S. J. & Lopez, X. Aluminum and its effect in the equilibrium between folded/unfolded conformation of NADH. *J. Inorg. Biochem.* **152**, 139–146 (2015).
16. Best, C. H., Taylor, N. B. & West, J. B. *Bases fisiológicas de la práctica médica.* (Panamericana, 1986).
17. Boldridge, D. W., Morton, T. H. & Scott, G. W. Formation kinetics and quantum yield of photon-induced electron ejection from NADH in aqueous solution. *Chem. Phys. Lett.* **108**, 461–465 (1984).
18. Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770–6 (2000).
19. Mathews, C. K., Van Holde, K. E., Ahern, K. G. & de Buitrago, J. M. G. *Bioquímica.* (Pearson Educación, 2002).
20. Guo, H.-W. *et al.* Correlation of NADH fluorescence lifetime and oxidative phosphorylation metabolism in the osteogenic differentiation of human mesenchymal

- stem cell. *J. Biomed. Opt.* **20**, 17004 (2015).
21. Chance, B. Pyridine nucleotide as an indicator of the oxygen requirements for energy-linked functions of mitochondria. *Circ. Res.* **38**, 1–31 (1976).
 22. Wu, Y., Zheng, W. & Qu, J. Y. Sensing cell metabolism by time-resolved autofluorescence. *Opt. Lett.* **31**, 3122 (2006).
 23. Schneckenburger, H. Fluorescence decay kinetics and imaging of NAD(P)H and flavins as metabolic indicators. *Opt. Eng.* **31**, 1447 (1992).
 24. Gonnella, T. P., Keating, J. M., Kjemhus, J. A., Picklo, M. J. & Biggane, J. P. Fluorescence lifetime analysis and effect of magnesium ions on binding of NADH to human aldehyde dehydrogenase 1. *Chem. Biol. Interact.* **202**, 85–90 (2013).
 25. Lakowicz, J. R., Szmajcinski, H., Nowaczyk, K. & Johnson, M. L. Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 1271–5 (1992).
 26. Jameson, D. M., Thomas, V. & Zhou, D. Time-resolved fluorescence studies on NADH bound to mitochondrial malate dehydrogenase. *Biochim. Biophys.* **994**, 187–190 (1989).
 27. Serrano-Andres, L., Merchán, M. & Borin, A. C. Adenine and 2-aminopurine: Paradigms of modern theoretical photochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 8691–8696 (2006).
 28. Middleton, C. T. *et al.* DNA Excited-State Dynamics: From Single Bases to the Double Helix. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **60**, 217–239 (2009).
 29. Villabona-Monsalve, J. P., Noria, R., Matsika, S. & Peón, J. On the accessibility to conical intersections in purines: Hypoxanthine and its singly protonated and deprotonated forms. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 7820–7829 (2012).
 30. Schlessinger, J., Steinberg, I. Z. & Levitz, A. A comparative study of NAD⁺ binding sites in circular polarization offluorescence. *J. Mol. Biol.* **91**, 523–528 (1975).
 31. Yue, K. T. *et al.* Raman Spectroscopy of Oxidized and Reduced Nicotinamide

- Adenine Dinucleotides. *Biochemistry* **25**, 4941–4947 (1986).
32. Reddy, B. S., Saenger, W., Mühlegger, K. & Weimann, G. Crystal and Molecular Structure of the Lithium Salt of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Dihydrate (NAD⁺, DPN⁺, Cozymase, Codehydrase I). *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 907–914 (1981).
 33. Heiner, Z., Roland, T., Leonard, J., Haacke, S. & Groma, G. I. Kinetics of Light-Induced Intramolecular Energy Transfer in Different Conformational States of NADH. *J. Phys. Chem. B* **121**, 8037–8045 (2017).
 34. Lindqvist, L., Czochralska, B. & Grigorov, I. Determination of the mechanism of photo-ionization of NADH in aqueous solution on laser excitation at 355 nm. *Chem. Phys. Lett.* **119**, 494–498 (1985).
 35. Foggi, P., Bussotti, L. & Neuwahl, F. V. R. Photophysical and photochemical applications of femtosecond time-resolved transient absorption spectroscopy. *Int. J. Photoenergy* **3**, (2001).
 36. Abramczyk, H. *Introduction to Laser Spectroscopy*. (Elsevier Science, 2005).
 37. Rodríguez, A. R. & Román, J. Z. *Espectroscopía*. (Pearson Educación, 2004).
 38. Valeur, B. *Analytical Atomic Spectrometry with Flames and Plasmas Handbook of Analytical Techniques Single-Molecule Detection in Solution . Methods and Applications. Methods* **8**, (2001).
 39. Saini, S., Singh, H. & Bagchi, B. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) in chemistry and biology: Non-Förster distance dependence of the FRET rate. *J. Chem. Sci.* **118**, 23–35 (2006).
 40. Scholes, G. D. Long-Range Resonance Energy Transfer in Molecular Systems. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **54**, 57–87 (2003).
 41. Klessinger, M. & Michl, J. *Excited states and photochemistry of organic molecules*. (VCH, 1995).
 42. Mortimer, M., Taylor, P. G., University, T. O., Clark, G. & Smart, L. E. *Chemical Kinetics and Mechanism*. (Royal Society of Chemistry, 2007).

43. Cowan, D. O. & Drisko, R. L. *Elements of organic photochemistry*. (Plenum Press, 1976).
44. Turro, N. J. *Modern Molecular Photochemistry*. (University Science Books, 1991).
45. Cabrera, J. M., López, F. J. & López, F. A. *Optica electromagnética*. (Addison-Wesley, 1998).
46. Valeur, B. & Berberan-Santos, M. N. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. (Wiley, 2013).
47. Bax, A. & Davis, D. G. Practical aspects of two-dimensional transverse NOE spectroscopy. *J. Magn. Reson.* **63**, 207–213 (1985).
48. Bothner-By, A. A., Stephens, R. L., Lee, J. M., Warren, C. D. & Jeanloz, R. W. Structure Determination of a Tetrasaccharide: Transient Nuclear Overhauser Effects in the Rotating Frame. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 811–813 (1984).
49. Slichter, C. P. *Principles of Magnetic Resonance*. (Springer Berlin Heidelberg, 2013).
50. Chini, M. G. *et al.* Quantitative NMR-derived interproton distances combined with quantum mechanical calculations of ¹³C chemical shifts in the stereochemical determination of conicasterol F, a nuclear receptor ligand from *Theonella swinhoei*. *J. Org. Chem.* **77**, 1489–1496 (2012).
51. Butts, C. P. *et al.* Interproton distance determinations by NOE – surprising accuracy and precision in a rigid organic molecule. *Org. Biomol. Chem* **9**, 177–184 (2011).
52. Demtröder, W. *Laser Spectroscopy: Vol. 1 Basic Principles Vol. 2 Experimental Techniques*. (Springer Berlin Heidelberg, 2008).
53. Svelto, O. *Principles of Lasers*. (Plenum Press, 1976).
54. Siegman, A. E. *Lasers*. (University Science Books, 1986).
55. Sarukura, N. Titanium sapphire laser. *Rev. Laser Eng.* **21**, 73–76 (1993).
56. Csele, M. *Fundamentals of Light Sources and Lasers*. (Wiley, 2011).
57. Rullière, C. *Femtosecond Laser Pulses: Principles and Experiments*. (Springer Berlin

Heidelberg, 2013).