



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral

**Síntesis y caracterización de
metil- β -carbolinas. Estudios
fotofísicos en medio acuoso y
evaluación de su comportamiento
como fotosensibilizadores frente a
biomacromoléculas**

Bioquímico Federico Ariel Osvaldo Rasse Suriani

Director: Dr. Franco Martín Cabrerizo

Codirectora: Dra. Rosa Erra-Balsells

2016

El presente trabajo de Tesis se realizó en el Instituto de Investigaciones Biotecnológicas - Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH) bajo la dirección del Dr. Franco Martín Cabrerizo y la codirección de la Dra. Rosa Erra-Balsells. Se presenta a consideración de las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas, de la Universidad Nacional de La Plata a fin de acceder al Grado Académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas.

*A Guillermina,
mi familia y amigos.*

Deseo expresar mi mayor agradecimiento al Dr. Franco M. Cabrerizo y la Dra. Rosa Erra-Balsells, por dirigir este trabajo con gran dedicación y esmero, por sus enseñanzas y consejos profesionales, y por sobre todo por su generosidad e infinita paciencia.

A la vez quiero extender mis agradecimientos: A mis compañeros del laboratorio, a Mica y Gabii por brindarse y ayudarme siempre, a Paula, Lis, y Carlos por la grata compañía e infinita ayuda, y fundamentalmente por hacer del laboratorio un lugar de amigos.

A todos los compañeros y amigos del INTECH por toda la buena onda, por compartir tantos buenos momentos de trabajo como también fuera del mismo. A mis compañeros de viajes La Plata-Chascomús que hicieron de esas tres horas diarias un grato momento de charlas, mates y discusiones.

A las autoridades del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-Instituto Tecnológico Chascomús (IIB-INTECH) y a la Universidad Nacional de San Martín, por permitirme realizar mis actividades de investigación y docencia en sus instalaciones.

A las autoridades del Centro de Investigaciones en Hidratos de Carbono (CIHIDECAR) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, por haber accedido, en el inicio de mi doctorado, a realizar las actividades en esa institución. También a los compañeros del laboratorio de la Dra Erra-Balsells por su buena predisposición y ayuda en la primera etapa de mi doctorado.

A los Drs. F. Sebastián García Einschlag y Gustavo Ruiz del INIFTA (UNLP), por permitirme realizar los experimentos de fluorescencia, el análisis quimiométrico, y por sus enriquecedoras discusiones científicas. Asimismo agradecer a los integrantes de sus grupos de investigación y demás compañeros del INIFTA por ayudarme en las medidas.

Al Dr. Bernd Epe y a su grupo de investigación del Instituto de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Mainz (Alemania), por recibirme y tratarme de la mejor manera en la estadía llevada a cabo en el 2013, y por haberme permitido realizar los ensayos de fotosensibilización del ADN presentados en el capítulo 4.

Al Dr. Peter Ogilby, del Center for Oxygen Microscopy and Imaging, Universidad de Aarhus (Dinamarca), y al Dr. Pedro David-Gara del CIOp (UNLP) en donde se realizaron los estudios de oxígeno singlete.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por las becas de Postgrado Tipo I otorgada por el período 2011-2014, y por la beca de Postgrado Tipo II otorgada por el período 2014-2016, ambas para realizar el Doctorado.

A la Agencia Nacional de Promoción de la Ciencia y Tecnología (ANPCyT), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y a la Universidad de Buenos Aires (UBA), por financiar los proyectos de investigación que dieron marco al presente trabajo de tesis.

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina (MinCyt) y al Deutscher Akademischer Austausch Dienst (DAAD), por el apoyo brindado para llevar a cabo el proyecto de colaboración bilateral y permitirme realizar la estadía de investigación en el Instituto de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Mainz (Alemania).

OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo de tesis es estudiar los procesos de interacción y daño fotosensibilizado sobre bio-macromoléculas (ADN y proteínas) en los que participan una familia de alcaloides naturales denominada β -carbolinas (β Cs). Para ello, debió recurrirse, en primer lugar, a la caracterización de ciertas propiedades fotofísicas de estos alcaloides. A continuación se mencionan los objetivos particulares que trazaron el rumbo de las tareas y experiencias descriptas en esta tesis:

- ✓ **Estudiar y caracterizar las propiedades químicas y fotoquímicas de N-metil β Cs, en solución acuosa con valores de pH especialmente seleccionados.**
 - Caracterizar los estados electrónicos fundamentales y excitados con sus principales vías de desactivación y la dependencia de estos procesos con el pH.
 - Evaluar la capacidad que presentan estos derivados de generar especies reactivas de oxígeno, en particular, oxígeno singlete.

- ✓ **Analizar, cuali- y cuantitativamente, la capacidad de interacción que presentan las β Cs y sus N-metil derivados con bio-macromoléculas.**
 - Estudiar los procesos de interacción entre β Cs y albúmina de suero bovino (ASB) y ADN de doble cadena, cada una de ellas tomada como modelo representativo de macromoléculas de interés biológico (material proteico y genético, respectivamente).
 - Desarrollar técnicas y métodos analíticos que permitan comprender y/o identificar la localización (entorno) de estos alcaloides dentro de la estructura general de las macromoléculas analizadas (ASB y ADN).

- ✓ **Investigar la participación de N-metil β -carbolinas en procesos de daño u oxidaciones fotosensibilizadas con implicancia biológica.**
 - Estudiar los procesos de degradación de material genético (ADN) fotoinducida por N-metil β Cs. Analizar la influencia del pH y caracterizar los principales fotoproductos generados en los procesos de daño investigados.

CONTENIDOS Y DISEÑO DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS

Los resultados obtenidos en el marco del presente trabajo de Tesis doctoral han sido agrupados para su presentación en cuatro capítulos independientes, cada uno de los cuales cuenta con una parte introductoria donde se detallan los antecedentes bibliográficos relacionados con cada tema, una sección de resultados y discusión, una sección experimental y una última sección que incluye la bibliografía correspondiente.

En el *Capítulo 1* se detalla, a modo de introducción, toda la información relevante, accesible en literatura, que documenta la distribución de estos alcaloides en la naturaleza, junto con sus principales propiedades químicas y bioquímicas. Para finalizar esta sección, se resumen los estudios sobre la fotofísica y fotoquímica de β Cs llevados a cabo hasta el momento.

El *Capítulo 2* describe los métodos de síntesis y caracterización química de N-metil β Cs, junto con el comportamiento fotofísico de estos alcaloides en solución acuosa a pH controlado.

En el *Capítulo 3* se presentan los estudios de interacción entre las diferentes especies ácido-base del *norharmano* y sus N-metil derivados (elegidos como “ β Cs modelo”) con ASB (como representante típico de proteínas). Se detallan los resultados obtenidos por diferentes técnicas espectroscópicas (absorción UV-visible y emisión de fluorescencia en condiciones estacionarias y dinámicas) y se analizan los posibles procesos y/o mecanismos de interacción que tienen lugar.

Finalmente, en el *Capítulo 4*, se describe la interacción de la molécula de ADN con los N-metil derivados de β C, junto con la fotosensibilización de esta biomolécula, cuando es irradiada con luz UVA en presencia de dichos alcaloides. Se presenta un estudio cinético del daño producido al ADN, y también la caracterización de los principales fotoproductos formados.

ABREVIATURAS

β-carbolinas y Albumina

βC	β-Carbolina
βCs	β-Carbolinas
βCH ⁺	Forma protonada de las βCs
¹ [βCH ⁺]*	Forma protonada de las βCs en estado electrónico excitado singlete
βCN	Forma neutra de las βCs
¹ [βCN]*	Forma neutra de las βCs en estado electrónico excitado singlete
βCZ	Forma zwitteriónica de las βCs
βCQ	Forma quinónica de las βCs
d-hβC	1,2-di-Hidro β-carbolina
t-hβC	1,2,3,4-tetra-Hidro β-carbolina
nHo	<i>Nor</i> harmano
¹ [nHoH ⁺]*	<i>Nor</i> harmano protonado en estado electrónico excitado singlete
¹ [nHoN]*	<i>Nor</i> harmano neutro en estado electrónico excitado singlete
Ho	Harmano
Ha	Harmina
N-2	Nitrógeno de la posición 2 de las βCs
N-9	Nitrógeno de la posición 9 de las βCs
N-metil β-carbolina	β-carbolina con sustituyente metilo en el N-2 y/o en el N-9
N-Me-βC	N-metil β-carbolina
9-Me-βC	9-Metil β-carbolina
9-Me-nHo	9-Metil- <i>nor</i> harmano
9-Me-Ho	9-Metil-harmano
9-Me-Ha	9-Metil-harmina
2-Me-βC	Ioduro de 2-metil β-carbolina
2,9-diMe-βC	Ioduro de 2,9-dimetil β-carbolina
βC-CH ₃ ⁺	Catión metilado constituyente de 2-Me-βC y/o 2,9-diMe-βC
¹ [βC-CH ₃ ⁺]*	Catión de 2-Me-βC y/o 2,9-diMe-βC en estado electrónico excitado singlete
2-Me-nHo	2-Metil- <i>nor</i> harmanio, catión constituyente del Ioduro de 2-Metil- <i>nor</i> harmanio
2-Me-Ho	2-Metil-harmanio, catión constituyente del Ioduro de 2-Metil-harmanio
2-Me-Ha	2-Metil-harminio, catión constituyente del Ioduro de 2-Metil-harminio
2,9-diMe-nHo	2,9-diMetil- <i>nor</i> harmanio, catión constituyente del Ioduro de 2,9-diMetil- <i>nor</i> harmanio
2,9-diMe-Ho	2,9-diMetil-harmanio, catión constituyente del Ioduro de 2,9-diMetil-harmanio
2,9-diMe-Ha	2,9-diMetil-harminio, catión constituyente del Ioduro de 2,9-diMetil-harminio
ASB	Albúmina de suero bovino
[nHo.ASB]	Albúmina de suero bovino interactuando con nHo
[nHoH ⁺ .ASB]	Albúmina de suero bovino interactuando con nHo protonado
[nHoN.ASB]	Albúmina de suero bovino interactuando con nHo neutro
[2-Me-nHo.ASB]	Albúmina de suero bovino interactuando con 2-Me-nHo

[β CH ⁺ .ASB]	Albúmina de suero bovino interactuando con β CH ⁺
[β CN.ASB]	Albúmina de suero bovino interactuando con β CN
[β C-CH ₃ ⁺ .ASB]	Albúmina de suero bovino interactuando con β C-CH ₃ ⁺
[β C.ASB]	Albúmina de suero bovino interactuando con β C

Ácidos nucleicos y desoxirribonucleótidos

dNMPs	Desoxirribonucleótidos
dGMP	2'-Desoxiguanosina-5'-monofosfato
dAMP	2'-Desoxiadenosina-5'-monofosfato
dCMP	2'-Desoxicitosina-5'-monofosfato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNtt	ADN extraído de timo de ternera
ADN PM2	ADN de bacteriófago PM2

Reactivos generales

O ₂	Oxígeno molecular
N	Átomo de nitrógeno
N ₂	Nitrógeno molecular
D ₂ O	Óxido de deuterio
NaCl	Cloruro de sodio
HCl	Ácido clorhídrico
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
NaOH	Hidroxido de sodio
DMSO	Di-metil sulfóxido
MeOH	Alcohol metílico
ICH ₃	Ioduro de metilo
PNS	Ácido perinaftenona-2-sulfónico
QB	Bisulfato de quinina
DFA	9,10-Difenilantraceno
Acetato	<i>Buffer</i> constituido por ácido acético y acetato de sodio
Fosfato	<i>Buffer</i> constituido por fosfato de potasio monobásico e hidróxido de sodio
Bórax	<i>Buffer</i> constituido por tetraborato de sodio e hidróxido de sodio

Modificaciones y/o fotoproductos del ADN y dNMPs

CSC	Cortes en simple cadena
MSE	Modificaciones (o sitios) sensibles a endonucleasas
DPCs	Dimeros de pirimidina ciclo butano
T<>T	Dímeros de pirimidina (timina-timina)
Sitio AP	Sitiosapurínicos o apirimidínicos, es decir, huecos en el ADN generados por la pérdida de bases púricas o pirimidínicas
8-oxo-Gua	8-Oxo-guanosina u 8-hidroxi-7,8-dihidro 2'-guanosina 8-Oxo-desoxiguanosina u 8-hidroxi-7,8-dihidro 2'-desoxiguanosina
FapyGua	2,6-Diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina
FapyAde	4,6-Diamino-5-formamidopirimidina

Enzimas

fpg	Enzima formamidopirimidina-ADN glicosilasa
-----	--

T4 endo V	Enzima T4 endonucleasa V
Endo IV	Enzima endonucleasa IV
Endo III	Enzima endonucleasa III

Especies reactivas de oxígeno

EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
$^1\text{O}_2$	Oxígeno singlete
$\text{O}^{\cdot-}$	Radical anión superóxido
HO^{\cdot}	Radical hidroxilo
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
$[\text{O}_2]$	Concentración de oxígeno molecular

Técnicas de análisis

CCD	Cromatografía en capa delgada
RMN	Resonancia magnética nuclear
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento

Parámetros termodinámicos, cinéticos y fotoquímicos

A	Absorbancia
$\varepsilon(\lambda)$	Coefficiente de absorción molar
n	Índice de refracción
λ_{fluo}	Longitud de onda de emisión fluorescente
λ_{exc}	Longitud de onda de excitación
I_{F}	Intensidad de fluorescencia a una determinada λ , o calculada como la integral de la curva (espectro) de emisión
Φ_{F}	Rendimiento cuántico de fluorescencia
Φ_{Δ}	Rendimiento cuántico de la producción fotosensibilizada de $^1\text{O}_2$
$\Phi_{\text{H}_2\text{O}_2}$	Rendimiento cuántico de producción de H_2O_2
τ_{F}	Tiempo de vida de fluorescencia
τ_{Δ}	Tiempo de vida del $^1\text{O}_2$ (1270 nm) $^1\Delta_{\text{g}}$
$K_{\text{a}}^{\text{N-2}}$	Constante de disociación ácido-base correspondiente al equilibrio en el que participa el nitrógeno piridínico (N-2)
$K_{\text{a}}^{\text{N-9}}$	Constante de disociación ácido-base correspondiente al equilibrio en el que participa el nitrógeno indólico (N-9)
K_{G}	Constante de asociación determinada por espectroscopía de absorción UV-visible (método de Benesi-Hildebrand)
K_{SV}	Constante de asociación determinada por fluorescencia (método de Stern-Volmer)
K_{S}	Constante de asociación estática determinada por fluorescencia en estado estacionario
K_{D}	Constante de asociación dinámica determinada por fluorescencia resuelta en el tiempo
k_{q}	Constante de velocidad bimolecular de <i>quenching</i> de fluorescencia
k_{t}	Constante de velocidad de <i>quenching</i> total del $^1\text{O}_2$
k_{F}	Coefficiente de velocidad de emisión espontánea desde S_1
CI	Conversión interna
CIS	Cruce intersistemas
S_0	Estado electrónico fundamental singlete

S ₁	Primer estado electrónico excitado singlete
S ₂	Segundo estado electrónico excitado singlete
T ₁	Primer estado electrónico excitado triplete
Sens	Fotosensibilizador

CÓDIGOS Y DEFINICIONES USADAS EN ESTA TESIS

- ✓ A lo largo de toda la tesis, para nombrar cada forma ácido base de una β -carbolina en particular, se recurrirá al uso de la nomenclatura βCH^+ y βCN , para hacer referencia a la especie presente en un medio ácido y alcalino, respectivamente. Sin embargo, para hacer referencia a ambas formas, se utilizará el nombre abreviado βC .
- ✓ Cabe aclarar, además, que a lo largo de este trabajo se adoptó un código de color para representar los resultados según sea el pH del medio. En particular, los resultados obtenidos en condiciones ácidas ($\text{pH} \sim 4,0\text{--}5,0$), neutras o pH fisiológico ($7,3 < \text{pH} < 7,5$), alcalinas moderada ($9,0 < \text{pH} < 10,5$) y alcalinas fuerte ($\text{pH} > 11$), se presentan en color rojo, magenta, azul y negro, respectivamente. En aquellos casos donde se representen resultados obtenidos en más de una condición de pH se aclarará, mediante el agregado de insertos o especificaciones en la misma figura, el código empleado.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: Introducción		1
1.1	Estructura química y nomenclatura de las β -carbolinas	3
1.2	β Cs en la naturaleza	4
1.3	Acción biológica, bioquímica y/o farmacológica de β Cs	6
1.3.1	Acción antioxidante	6
1.3.2	Interacción con sistemas enzimáticos	6
1.3.3	Rol en el desarrollo y/o protección de enfermedades neurodegenerativas	8
1.3.4	Rol en el desarrollo de tumores	9
1.3.5	Acción antimicrobiana	10
1.3.6	Propiedades fotodinámicas	11
1.4	Especies ácido-base de β Cs aromáticas y sus propiedades fotoquímicas y fotofísicas en solución acuosa	11
1.4.1	Equilibrios ácido-base	12
1.4.2	Espectroscopía de absorción UV-visible	15
1.4.3	Espectroscopía de fluorescencia	17
1.4.3.1	Espectros de emisión	18
1.4.3.2	Espectros de excitación	21
1.4.3.3	Tiempos de vida de fluorescencia	22
1.4.3.4	Producción de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)	24
(a)	Producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	
(b)	Producción de oxígeno singlete (1O_2)	
1.4.3.5	Desactivación total de 1O_2 por β Cs	27
1.5	Propiedades fotodinámicas de β Cs: interacción y daño al material genético	28
1.5.1	Estudios previos de interacción de β Cs con el ADN	28
1.5.2	Estudios previos relacionados con daño al ADN fotosensibilizado por β Cs	30
1.6	REFERENCIAS	33
CAPÍTULO 2: Síntesis y caracterización química y fotoquímica de N-metil β-carbolinas. Estudios en solución acuosa		41
2.1	INTRODUCCIÓN	43
2.2	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
2.2.1	Determinación espectroscópica de las constantes de disociación ácido-base de los N-metil derivados	46
2.2.1.1	Titulación espectrofotométrica de 2-metil derivados	46
2.2.1.2	Titulación espectrofotométrica de 9-metil derivados	49
2.2.1.3	Evaluación del efecto de la fuerza iónica sobre los valores de las constantes de disociación ácido-base	51
2.2.2	Propiedades químicas, fotoquímicas y fotofísicas de N-Me- β Cs en solución acuosa	54
2.2.2.1	Espectroscopía de absorción UV-visible	54
2.2.2.2.	Estabilidad térmica de sales cuaternarias (ioduros) de piridonio del tipo 2-Me- β Cs,	59

2.2.2.3	Espectroscopía de fluorescencia	60
(a)	Espectros de emisión de fluorescencia	60
(b)	Rendimientos cuánticos de emisión fluorescente	65
(c)	Espectros de excitación de fluorescencia	66
(d)	Tiempos de vida de fluorescencia (τ_F)	72
2.2.2.4	Producción de 1O_2	78
2.3	RESUMEN Y CONCLUSIONES	81
2.4	MATERIALES, METODOS EXPERIMENTALES Y ANÁLISIS DE DATOS	83
2.4.1	Reactivos generales	83
2.4.2	Síntesis de N-metil derivados de β -carbolinas	83
2.4.2.1	Síntesis de 2-metil- β Cs (2-Me- β Cs)	84
2.4.2.2	Síntesis de 9-metil- β Cs (9-Me- β Cs)	84
2.4.2.3	Síntesis de 2,9-dimetil- β Cs (2,9-diMe- β Cs)	85
2.4.3	Caracterización de metil derivados β Cs	85
2.4.3.1	Resonancia magnética nuclear de protón (RMN- 1H)	85
2.4.3.2	Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC)	87
2.4.4	Fotoquímica y fotofísica de metil derivados β -carbolínicos	87
2.4.4.1	Preparación de soluciones	87
2.4.4.2	Espectroscopía de absorción UV-visible	87
2.4.4.3	Determinación del coeficiente de absorción molar	88
2.4.4.4	Determinación espectrofotométrica de pK_a	89
2.4.4.5	Espectroscopía de emisión fluorescente	92
2.4.4.6	Determinación de rendimientos cuánticos de fluorescencia Φ_F	93
2.4.4.7	Determinación de los tiempos de vida de fluorescencia	93
2.4.4.8	Espectroscopía de excitación fluorescente	94
2.4.4.9	Producción de oxígeno singlete	94
2.5	REFERENCIAS	97
CAPÍTULO 3: Estudio de la interacción entre β-carbolinas y albúmina de suero bovino		99
3.1	INTRODUCCIÓN	101
3.1.1	Estructura, propiedades y funciones de la albúmina de suero bovino (ASB)	101
3.1.2	Relación entre estructura, pH y propiedades fotofísicas de la ASB y sus fluoróforos intrínsecos (triptófano, tirosina y fenilalanina)	102
3.1.3	Estudios previos de interacción de β Cs con ASB	104
3.2	RESULTADOS Y DISCUSIONES	106
3.2.1	Espectros de absorción UV-visible a pH controlado	106
3.2.1.1	Espectros UV-visible del nHo y sus N-metil derivados a pH controlado	107
3.2.1.2	Espectros de absorción UV-visible de ASB a pH controlado	108
3.2.2	Espectroscopía de absorción UV-visible aplicada al estudio de la interacción entre nHo y sus N-metil derivados con ASB	109
3.2.3	Análisis quimiométrico de la interacción entre nHo y 2-Me-nHo con ASB	116
3.2.4	Estudio de interacción entre β Cs y ASB mediante técnicas de	119

3.2.4.1	emisión fluorescente, en condiciones de pH controlado Espectros de emisión y decaimientos de fluorescencia de nHo y 2-Me-nHo en soluciones de pH controlado.	119
3.2.4.2	Espectros de emisión y decaimientos de fluorescencia de ASB a pH controlado	123
3.2.4.3	Selección del método adecuado de preparación de las soluciones mezclas β C / ASB.	127
3.2.4.4	Desactivación de la fluorescencia de nHo y 2-Me-nHo por ASB: análisis cualitativo mediante estudios en condiciones de estado estacionario	128
3.2.4.5	Desactivación de la fluorescencia de nHo y 2-Me-nHo por ASB: análisis cualitativo mediante estudios con técnicas resueltas en el tiempo	134
3.2.4.6	Desactivación de la fluorescencia de nHo y 2-Me-nHo por ASB: análisis cuantitativo.	147
3.3	RESUMEN Y CONCLUSIONES	151
3.4	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS DE DATOS	152
3.4.1	Reactivos generales	152
3.4.2	Preparación de soluciones	152
3.4.3	Titulación por espectroscopía de absorción UV-visible	154
3.4.4	Espectroscopía de emisión de fluorescencia	154
3.4.5	Desactivación de fluorescencia: análisis de datos	155
3.4.6	Metodologías para el análisis de datos espectroscópicos de emisión resuelta en el tiempo	156
3.5	REFERENCIAS	157
CAPÍTULO 4: Interacción y daño al ADN fotoinducido por N-metil β-carbolinas		159
4.1	INTRODUCCIÓN	161
4.1.1	Ácido desoxirribonucleico	161
4.1.2	Mecanismos que participan en el daño al ADN por acción de la radiación UV	164
4.1.3	Daño al ADN mediante procesos fotosensibilizados	166
4.2	RESULTADOS Y DISCUSIONES	169
4.2.1	Interacción entre N-Me- β Cs y ADN	169
4.2.1.1	Estudio de interacción entre β Cs y ADNtt: análisis mediante técnicas de emisión fluorescente en estado estacionario	170
4.2.1.2	Estudio de interacción entre 9-metil β Cs y ADNtt: análisis mediante espectroscopía de absorción UV-visible	180
4.2.1.3	Estudio de interacción entre 2-metil β Cs y ADNtt: análisis mediante técnicas de emisión fluorescente resueltas en el tiempo.	185
4.2.1.4	Modelo propuesto para la interacción entre β Cs y ADN	188
4.2.2	Daño al ADN fotosensibilizado por 9-Metil- β Cs	189
4.3	RESUMEN Y CONCLUSIONES	194
4.4	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS DE DATOS	195

4.4.1	Reactivos generales	195
4.4.2	Preparación de soluciones y metodología de interacción	196
4.4.3	Espectroscopía de absorción UV-visible	196
4.4.4.	Espectroscopía de emisión de fluorescencia	197
4.4.4.1	Emisión en estado estacionario	197
4.4.4.2	Emisión resuelta en el tiempo	197
4.4.5	Análisis de datos	198
4.4.6	Estudio in vitro del daño producido al ADN, y la caracterización enzimática de los fotoproductos	198
4.4.6.1	Caracterización de fotoproductos	198
4.4.6.1.1	Sistema de irradiación	198
4.4.6.1.2	Cuantificación de modificaciones sensibles a endonucleasas	199
4.5	REFERENCIAS	200

RESUMEN Y CONCLUSIONES GENERALES		203
5.1	Caracterización de las propiedades fotofísicas de las N-Me-βCs en solución acuosa	206
5.2	Interacción de nHo y sus N-metil derivados con albúmina de suero bovino	208
5.3	Interacción y daño fotosensibilizado al ADN por N-Me-βCs	209
5.4	Consideraciones de carácter general	210
5.5	Lista de publicaciones científicas	211
5.6	Lista de comunicaciones en congresos, simposios y/o reuniones nacionales e internacionales	212

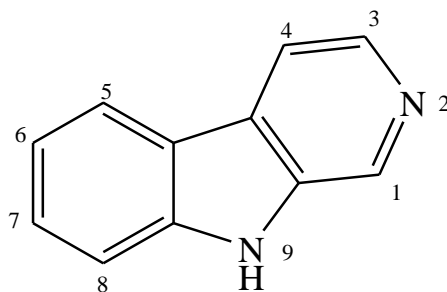
Capítulo 1



Introducción

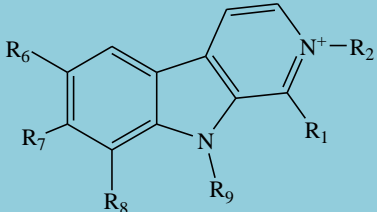
1.1. Estructura química y nomenclatura de las β -carbolinas

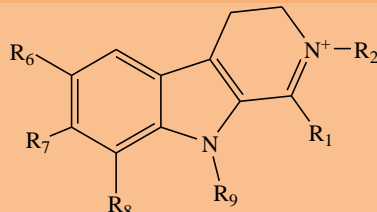
Las β -carbolinas (β Cs) constituyen un grupo de alcaloides derivados del 9*H*-pirido[3,4-*b*]indol o *nor*harmano (Esquema 1.1). En la Tabla 1.1 se presentan las estructuras de algunas de las β Cs de mayor abundancia en la naturaleza. También es posible encontrar β Cs en las cuales el anillo piridínico se encuentra parcialmente hidrogenado o reducido, siendo los más abundantes los 3,4-dihidro- y los 1,2,3,4-tetrahidro derivados.[1-23]



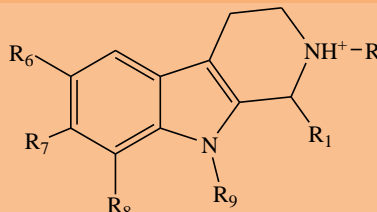
Esquema 1.1. Estructura química del 9*H*-pirido[3,4-*b*]indol o *nor*harmano.

Tabla 1.1. Estructura química general y nomenclatura de las β Cs de mayor biodistribución.

								
βCs aromáticas								
Nombre (abreviatura)	R ₁	R ₂	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉	Referencia	
<i>nor</i> Harmano (nHo)	-H	-H	-H	-H	-H	-H	[5,9]	
2-Metil- <i>nor</i> Harmanio o <i>nor</i> Melinonina F (2-Me-nHo)	-H	-CH ₃	-H	-H	-H	-H	[1]	
Harmano (Ho)	-CH ₃	-H	-H	-H	-H	-H		
2-Metil-Harmanio o Melinonina F (2-Me-Ho)	-CH ₃	-CH ₃	-H	-H	-H	-H	[1]	
Harmina (Ha)	-CH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	[2]	
Harmol (Hol)	-CH ₃	-H	-H	-OH	-H	-H		
7-Cloro-9-Metil- <i>nor</i> Harmano(o Bauerin A)	-H	-H	-H	-Cl	-H	-CH ₃	[6]	
7,8-diCloro-9-Metil- <i>nor</i> Harmano (o Bauerin B)	-H	-H	-H	-Cl	-Cl	-CH ₃	[6]	
7,8-diCloro-1-Hidroxi-9-Metil- <i>nor</i> Harmano (o Bauerin C)	-OH	-H	-H	-Cl	-Cl	-CH ₃	[6]	
6-Bromo- <i>nor</i> Harmano (o Eudistomin N)	-H	-H	-Br	-H	-H	-H	[22,23]	
8-Bromo- <i>nor</i> Harmano (o Eudistomin O)	-H	-H	-H	-H	-Br	-H	[22,23]	



3,4-Dihidro-βCs					
Nombre abreviado	R ₁	R ₂	R ₇	R ₉	Referencias
Harmalina (d-hHa)	-CH ₃	-H	-OCH ₃	-H	[2]
Harmalol	-CH ₃	-H	-OH	-H	
Nb-Metil-harmalano (Nb-Me-Hlano)	-CH ₃	-CH ₃	-H	-H	



1,2,3,4-Tetrahidro-βCs					
Nombre abreviado	R ₁	R ₂	R ₆	R ₇	Referencias
Tetrahidro-norharmano o triptolina (t-hnHo)	-H	-H	-H	-H	[3,4]
2-Metil-tetrahidro-norharmano (2-Me-t-hnHo)	-H	-CH ₃	-H	-H	[3]
6-metoxi-tetrahidro-norharmano (6-MeO-t-hnHo)	-H	-H	-OCH ₃	-H	[3]
Tetrahidro-harmano (t-hHo)	-CH ₃	-H	-H	-H	
Tetrahidro-harmina (t-hHa)	-CH ₃	-H	-H	-OCH ₃	

1.2. βCs en la naturaleza

La presencia de las βCs ha sido confirmada en una gran diversidad de grupos de organismos filogenéticamente distantes entre sí, entre ellos: *Rhizaria*, *Alveolata* y *Amoebozoa*, grupos compuestos por organismos protistas, y *Stramenopiles*,[6] que incluye organismos como diatomeas unicelulares y algas pardas pluricelulares. Otros de los grupos de organismos donde se ha confirmado su presencia son *Opisthokonta* (clado de organismos que incluye a coanozoos, hongos y animales),[7-14], *Archaeplastida* (incluye a las algas verdes, rojas y plantas terrestres),[1,2,15-17] *Urochordata* (ascidias)[18,19] y *Arthropoda* (incluye insectos, arácnidos, etc.).[5,20]

Algunas plantas ricas en βCs son utilizadas como alucinógenos. En particular, los extractos de raíces o semillas de *Peganum harmala* que contienen elevados niveles de harmina (Ha) y harmalina (3,4-dihydroharmina, d-hHa),[2] han sido y son utilizados por tribus del Amazonas en brebajes psicotrópicos religiosos y/o en medicina tradicional, como antiespasmódicos y sedantes. Por otra parte, diferentes metil-βCs, en particular los derivados metilados en posición 2 tales como *normelinonina F* y *melinonina F* (Tabla 1.1), entre otros,

fueron aislados y caracterizados de la corteza del arbusto *Strychnos usambarensis*. [1] Dichos derivados son algunos de los compuestos que se estudiaron en el presente trabajo de Tesis.

Desde el punto de vista fisiológico, se ha sugerido que las β Cs en plantas tendrían un rol activo en los mecanismos de defensa, por acción tóxica y fototóxica contra diferentes microorganismos invasores. Sin embargo, su función biológica central y las bases moleculares de dichos procesos son aún inciertas.

La formación endógena de estos alcaloides en los diferentes organismos tiene lugar mediante la reacción de condensación de Pictet-Spengler a partir de una indolamina como el aminoácido triptófano y diferentes aldehídos o α -ceto-ácidos. Estas reacciones son enzimáticamente catalizadas. [24-26] En plantas, se han descrito diferentes isoformas enzimáticas unas activas en núcleos y otras en vacuolas, capaces de generar los derivados reducidos (dihidro- o tetrahidro- β Cs). La oxidación de estos derivados que da origen a la formación de β Cs aromáticas tiene lugar químicamente y/o por acción de diferentes oxidasas. [24,25] En cambio, en bacterias se ha descrito una enzima multifuncional capaz de producir no sólo la condensación de Pictet-Spengler, sino también la descarboxilación y oxidación de tetrahidro- β Cs para generar derivados totalmente aromáticos. [26]

Asimismo se ha encontrado que la presencia de β Cs en las cutículas de escorpiones es mediada por procesos oxidativos de entrecruzamiento con proteínas (esclerotización). [20]

En humanos, la formación de β Cs endógenas está asociada con la condensación de Pictet-Spengler entre indolaminas (por ejemplo, serotonina) y acetaldehído derivado de la ingestión del alcohol. [12,27] La presencia de las β Cs aromáticas en mamíferos se debería a la oxidación de las t-h β Cs por hemo-peroxidasas. [28] Consecuentemente, estos compuestos forman parte constitutiva de órganos, tejidos y fluidos corporales (ojos, piel, plasma, plaquetas y orina). [7-11,13] Por ejemplo, se describió en orina y leche materna humana la presencia de cantidades de tetrahidro- β Cs entre 10 y 700 ng/ml. Además, experimentos realizados con lactantes, sugieren que una fracción de las t-h β Cs halladas en orina es sintetizada posiblemente por bacterias del intestino de los infantes. [8] Sin embargo, los niveles basales hallados en los distintos fluidos biológicos pueden incrementarse considerablemente dependiendo del tipo de dieta, características medioambientales y hábitos de consumo. [9,13] Así, las β Cs son incorporadas de manera exógena a través de diferentes productos alimenticios, bebidas, etc. Estos alcaloides están también presentes en humo de cigarrillo y comidas ricas en proteínas cocidas, lo que refleja su formación por pirólisis a partir del triptófano. [29,30] En estudios

recientes se reveló que las β Cs son metabolizadas oxidativamente por el sistema citocromo p450.[31]

1.3. Acción biológica, bioquímica y/o farmacológica de β Cs

A lo largo de los años, se ha sugerido la participación de las β Cs en numerosos procesos bioquímicos y farmacológicos,[32] algunos de los cuales se describen a continuación:

1.3.1. Acción antioxidante

Existe gran cantidad de trabajos que dan cuenta de las propiedades antioxidantes de las β Cs, es decir, de su capacidad para secuestrar diferentes Especies Reactivas del Oxígeno (EROs).[10,11,33] Estos revelaron que el efecto antioxidante es más pronunciado en las β Cs parcialmente hidrogenadas (β Cs reducidas) en comparación con las totalmente aromáticas (β Cs oxidadas).

Además, se conoce que diferentes derivados reducidos se acumulan en cantidades significativas en el cristalino y el humor vítreo de los ojos de personas con cataratas y, aparentemente, estos ejercerían un rol protector, desactivando diferentes EROs, e inhibiendo la formación de agregados de alto peso molecular de la proteína γ -cristalina.[10,11]

Recientemente, se encontró que diferentes β Cs oxidadas y reducidas son capaces de secuestrar radicales HO^\bullet de manera comparable, cualitativa y cuantitativamente, a la melatonina, un efectivo antioxidante y secuestrador de radicales *in vitro* e *in vivo*.[34]

En este sentido, cabe destacar también que dichos alcaloides son capaces de desactivar al oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), una especie de elevada reactividad, que juega un rol importante en procesos de estrés oxidativo.[35-37] En particular se han descripto valores para las constantes de desactivación total del $^1\text{O}_2$ (k_t) de $\sim 10^6$ - 10^7 (ver sección 1.4.3.5).[35-37]

1.3.2. Interacción con sistemas enzimáticos

Diferentes β Cs interactúan selectivamente con sistemas enzimáticos específicos y conducen a una variedad de actividades farmacológicas. Por ejemplo, harmano (Ho) y norharmano (nHo) inhiben la relajación del ADN producida por las topoisomerasas I y II,[38] y, por lo tanto aumentan el daño inducido por radiación UV o por productos químicos al bloquear la reparación del ADN mediada por estas enzimas. Además, se comprobó que los

extractos de raíz de *Peganum harmala* (ricos en Ha y d-hHa) también inhiben la actividad de la topoisomerasa I humana.[39] Algunos estudios sobre la relación estructura-actividad (*structure-activity relationship*, SAR) indican que la capacidad con que la Ha y sus 9-derivados inhiben la topoisomerasa I es mayor cuando los sustituyentes son dadores de electrones.[40]

Norharmano y harmano son inhibidores competitivos reversibles de las monoaminooxidasas (MAO), [41-44] nHo inhibe preferentemente la MAO-B, mientras que harmano inhibe la MAO-A. La potencia como inhibidores de la MAO-A se ve incrementada para Ha, 2-metil-harminio, 2,9-dimetil-harminio y d-hHa, como consecuencia de la introducción de un sustituyente metilo en posición N-2 y un grupo metoxi en la posición 7 del sistema tricíclico.[45]

También se conoce que Ha y sus derivados actúan como potentes inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), una familia de enzimas que regula el correcto desarrollo del ciclo celular. Así, Ha inhibe específicamente la actividad de CDK1, CDK2 y CDK5, y el análisis sobre la relación estructura-actividad indica que la aromaticidad del anillo tricíclico y la posición de los sustituyentes es crucial para esta función inhibitoria.[46,47]. De forma similar, 5-bromo-6-methoxy- β -carbolina y otros derivados relacionados fueron identificados como inhibidores de la quinasa I κ B.[48]

Por otro lado, estos alcaloides poseen afinidad por diferentes receptores celulares causando un amplio espectro de efectos farmacológicos y terapéuticos. Algunas β Cs interactúan con el receptor de benzodiazepinas y, como resultado, pueden reducir la ansiedad, la depresión[49-51] y proteger contra la epilepsia.[52] También se descubrieron interacciones entre harmano y el receptor de imidazol,[53,54] lo que conduce a hipotensión en ratas[55] y a una interferencia de la analgesia mediada por el receptor de opiáceos.[56] De hecho, las β Cs también ejercen efectos antialodínicos.[57] Además, reaccionan con varios sistemas de neurotransmisores, tales como el de la glicina,[58] la serotonina[59] y, especialmente, la dopamina,[60] al actuar como un buen sustrato para el transportador de dopamina.[61,62] Además, β -carbolinas N2- y N9- bivalentes (dos unidades β C unidas por espaciadores alquilenos), son capaces de inhibir fuertemente la acetilcolinesterasa, la butirilcolinesterasa y bloquear el receptor de N-metil-D-aspartato potencialmente y, por lo tanto, se podrían utilizar para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.[63]

1.3.3. Rol en el desarrollo y/o protección de enfermedades neurodegenerativas

En los últimos años se ha descrito a ciertas β Cs como neurotoxinas endógenas y exógenas responsables del desarrollo de patologías neurodegenerativas como el Parkinson.[64,65] En este sentido, se encontró que la concentración de los cationes 2,9-diMe-norharmanio y 2-Me-norharmanio (ambas β Cs catiónicas o sales cuaternarias) se encuentra incrementada en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con Parkinson idiopático.[66] Estas β Cs cuaternarias jugarían un rol importante en el desarrollo de dicha enfermedad, inhibiendo la respiración mitocondrial causando, consecuentemente, los efectos neurodegenerativos.[67]

Para otras β Cs aromáticas (norharmano y harmano) se ha descrito, también, una correlación positiva entre niveles plasmáticos elevados de estos alcaloides y el desarrollo del Parkinson.[68,69] Sin embargo, se ha sugerido que la acción se debería a la formación de las respectivas sales cuaternarias, producto del metabolismo celular.[70] En este sentido, es importante mencionar que las β Cs que presentan el nitrógeno piridínico terciario libre (sin sustitución cuaternaria), como el norharmano, son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica y llegar al cerebro. Una vez dentro, mediante la acción de ciertas metiltransferasas, estos alcaloides se convierten en los correspondientes derivados catiónicos (nitrógeno piridínico cuaternario catiónico, por unión a un sustituyente), reduciendo así la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica en sentido inverso (Figura 1.1). Esta bioacumulación daría lugar a los efectos citotóxicos y neurotóxicos que presentan los derivados catiónicos de β Cs.[71,72]

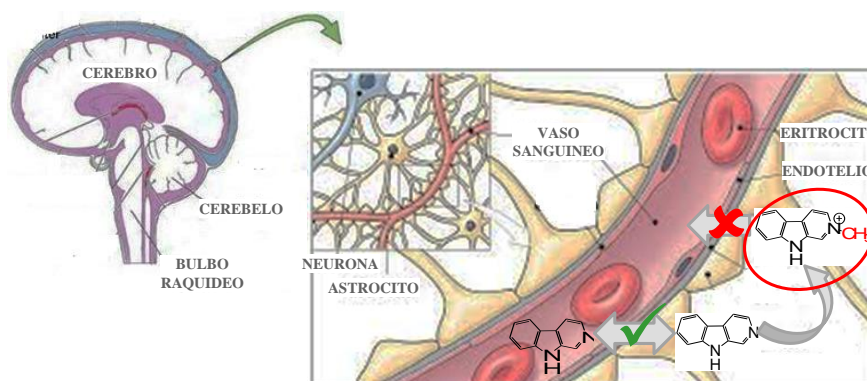


Figura 1.1. Representación de la barrera hematoencefálica, la biodisponibilidad y bioacumulación de β Cs y sus respectivas sales cuaternarias (2-metil derivados).

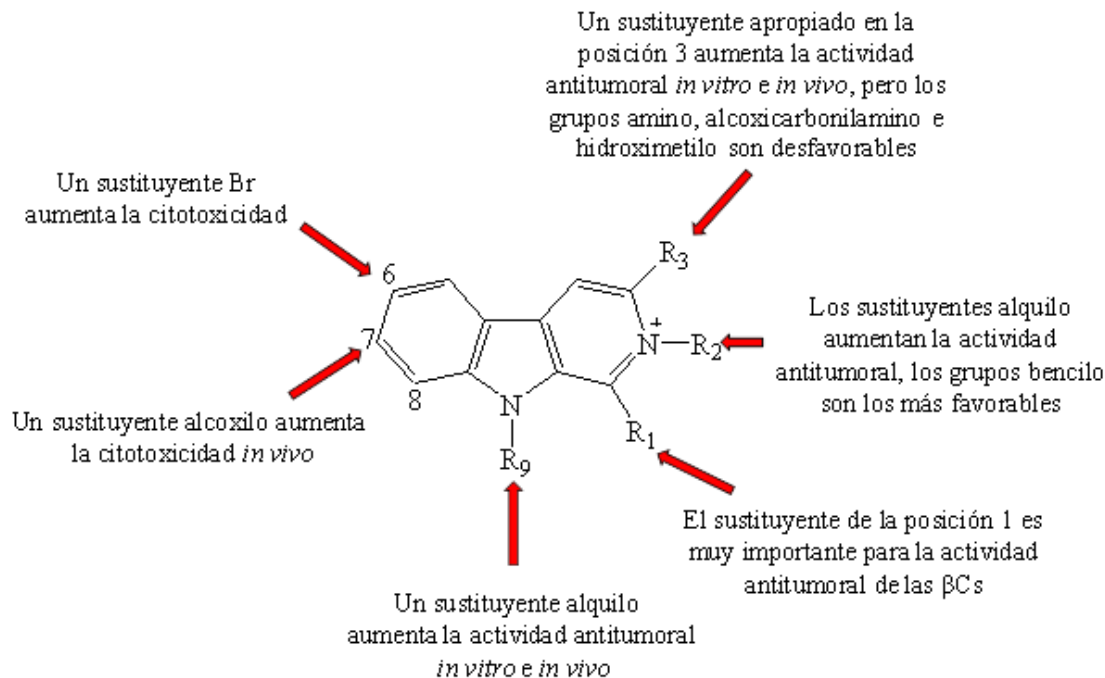
En contraste, los derivados metilados en el nitrógeno indólico (reemplazo en el NH del H indólico por un sustituyente, nitrógeno terciario) presentan propiedades protectoras,

estimuladoras y de regeneración neuronal. Recientemente se describió que el 9-Me-norharmano podría cumplir una función neuroprotectora, impidiendo varios de los mecanismos patogénicos causantes del Parkinson, razón por la cual ha sido propuesto como un potencial medicamento anti-parkinsoniano.[73]

1.3.4. Rol en el desarrollo de tumores

Algunas β Cs actuarían como agentes co-mutagénicos, participando en la formación de diversos tumores cuando se encuentran en presencia de aminas aromáticas.[74-76] Este último punto es importante debido a la continua exposición por parte del hombre tanto a β Cs como a niveles elevados de aminas aromáticas. Por lo tanto, es necesario dilucidar estos mecanismos para comprender, en detalle, el potencial genotóxico de estos alcaloides en humanos. En este contexto, el efecto adicional de la radiación solar, otro agente externo al cual el ser humano está constantemente expuesto, debe ser también analizado.

Por otro lado, se ha descrito que las β Cs y sus derivados, presentan significativas actividades anti-tumorales, exhibidas contra varias líneas de células tumorales humanas, con valores de CC_{50} (concentración que reduce el número de células viables a la mitad) del orden del micromolar o menores.[77-88] Todos estos estudios derivan en que: *(i)* la estructura de las β Cs constituye una base importante para el diseño y síntesis de drogas antitumorales; *(ii)* sustituyentes apropiados en las posiciones 1, 3 y 9 juegan un rol crucial en la actividad antitumoral; *(iii)* la citotoxicidad contra líneas tumorales se ve aumentada por la introducción de un grupo bencilo en la posición 2; *(iv)* la introducción de un sustituyente bromo en posición 6 o un alcoxilo en 7 aumentan la citotoxicidad. En este último caso, la longitud de la cadena influye tanto en la toxicidad como en la selectividad de acción sobre diferentes líneas celulares. Estos resultados se resumen en el Esquema 1.2.



Esquema 1.2. Relación estructura-actividad de los derivados de β Cs con acción antitumoral. Extraído de referencia [32].

1.3.5. Acción antimicrobiana

También se ha sugerido que ciertas β Cs representan una nueva clase de drogas antimicrobianas.[89] En particular, se demostró que harmina y harmalina tienen actividad antiviral contra virus del *Herpes simple*[90-92] y actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*,[93] *Proteus vulgaris*,[94] *Bacillus subtilis*[94] y *Staphylococcus aureus*[95] entre otras.[96] Se ha sugerido, además, que ciertas β Cs representan una nueva clase de drogas antiparasitarias. Harmano, harmina y harmalina tienen actividad, *in vitro*, contra *Leishmania infantum*. [97-102] En particular, harmalina mostró un mejor efecto antiparasitario con una muy baja acción sobre los monocitos humanos.[97] Otros dos derivados de β Cs (*N*-butil-[1-(4-metoxi)fenil-9H- β -carbolina]-3-carboxamida y *N*-butil-[1-(2-clorin)fenil-9H- β -carbolina]-3-carboxamida) mostraron actividad contra epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y contra promastigotes de *Leishmania amazonensis*. [102] Por su parte, algunas β Cs reducidas han mostrado tener actividad contra *Trypanosoma cruzi*, y dependiendo de la naturaleza del sustituyente estas drogas mostraron efectos selectivos en distintos estadios parasitarios.[103] Otros derivados, presentaron actividad antiplasmódica (*Plasmodium falciparum*) y anti *Toxocara canis*. [104]

Durante los últimos años, en nuestro laboratorio hemos demostrado que ciertas β Cs presentan una clara actividad anti-*Toxoplasma gondii*. [105-107] En particular, el efecto observado depende fuertemente de la β C ensayada. Ciertos derivados poseen la capacidad de inhibir tanto la invasión como la replicación de *T. gondii* [106] mientras que otros bloquean, eficiente y selectivamente, la replicación de dicho microorganismo. [106,107]

1.3.6. Propiedades fotodinámicas

Bajo condiciones de excitación con luz UVA o visible, algunas β Cs han demostrado ser fotoactivas, participando en diferentes procesos fotobiológicos. En plantas, las β Cs tendrían cierta participación en los mecanismos de defensa, mediados por acción fototóxica contra insectos, gusanos, bacterias, virus y otros agentes invasores. [17,75] Además, se demostró que la capacidad antimicrobiana de estas drogas se incrementa por acción de la radiación UVA (320-400 nm). [108-110]

Ciertos derivados inician procesos fotosensibilizados que causan daños a moléculas esenciales para la vida (proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Por ejemplo, bajo irradiación UVA, nHo y Ho pueden causar daño en los cromosomas de células eucariotas, [76,111] y Ha y 9-Me-Ha, son capaces de inhibir la proliferación y de inducir la formación de micronúcleos a células V79 en cultivo. [112]

1.4. Especies ácido-base de β Cs aromáticas y sus propiedades fotoquímicas y fotofísicas en solución acuosa

En solución acuosa, estos alcaloides muestran un comportamiento particular, dependiendo de si los mismos se encuentran en su estado electrónico fundamental, o en sus estados electrónicos excitados generados como consecuencia de la absorción de radiación UV-visible. Además, las distintas especies ácido-base de β Cs presentan, también, un comportamiento fotoquímico y fotofísico característico. Por ello, resulta imprescindible conocer cuál es la especie presente o predominante en cada una de las condiciones experimentales. Cabe aclarar, además, que a lo largo de este trabajo de Tesis se adoptó un código de color para representar los resultados según el pH del medio: los resultados correspondientes a pH alcalinos se presentan en color azul, mientras que los correspondientes a pH ácidos en rojo y, aquellos obtenidos a pH fisiológico, en color magenta.

1.4.1. Equilibrios ácido-base

En el estado fundamental, en todo el intervalo de pH, las β Cs aromáticas nHo, Ho y Ha pueden presentar dos equilibrios ácido-base. El primero de ellos tiene lugar en el intervalo de pH comprendido entre 2 y 10, involucra al átomo de nitrógeno perteneciente al anillo piridínico (N-piridínico, posición 2 del heterociclo, Esquema 1.3). Este equilibrio presenta valores de $pK_a^{N-2} \sim 7$, en el caso de las denominadas β Cs aromáticas, y ~ 10 para los derivados dihidrogenados o reducidos (3,4-dihidrogenados, 3,4-dihidro- β Cs o d-h β Cs, Tabla 1.1). Este aumento de basicidad se debe a que la deslocalización del par de electrones n del átomo de nitrógeno piridínico en la nube electrónica π de las β Cs reducidas es menor en comparación con las β Cs totalmente aromáticas. El segundo equilibrio ácido-base es aquel en el que participa el nitrógeno del anillo indólico (N-indólico, posición 9 del heterociclo, Esquema 1.3), que presenta valores de pK_a^{N-9} superiores a 12. Cuando el nitrógeno indólico se encuentra sustituido, como es el caso de los 9-metil derivados, el equilibrio ácido-base que involucra al nitrógeno piridínico presenta valores de pK_a^{N-2} aproximadamente una unidad inferior al observado para el compuesto sin sustituir. Esto conlleva a una disminución de su basicidad que es provocada por una mayor deslocalización del par de electrones n del átomo de nitrógeno piridínico.[113,114] Ciertamente, en solución acuosa, la carga neta del alcaloide dependerá de las condiciones de pH del medio. Del análisis de la estructura química del nHo, el cual es el esqueleto común en todas las β Cs aromáticas (constituida, simplemente, por el anillo pirido-indólico sin sustituyentes), se desprende que, según las condiciones del medio, éste podrá dar origen a tres especies diferentes en el estado electrónico fundamental: catiónica (β CH⁺), neutra (β CN) y aniónica (β C⁻) (Esquema 1.3). Sin embargo, vale aclarar que, desde el punto de vista biológico, sólo el primer equilibrio ácido-base es importante o el de mayor relevancia y, consecuentemente, las formas β CH⁺ y β CN son las que predominan en el estado electrónico fundamental. Además, y tal como veremos en los párrafos siguientes, en el estado electrónicamente excitado es posible encontrar una cuarta especie denominada forma zwitteriónica (β CH[±]).

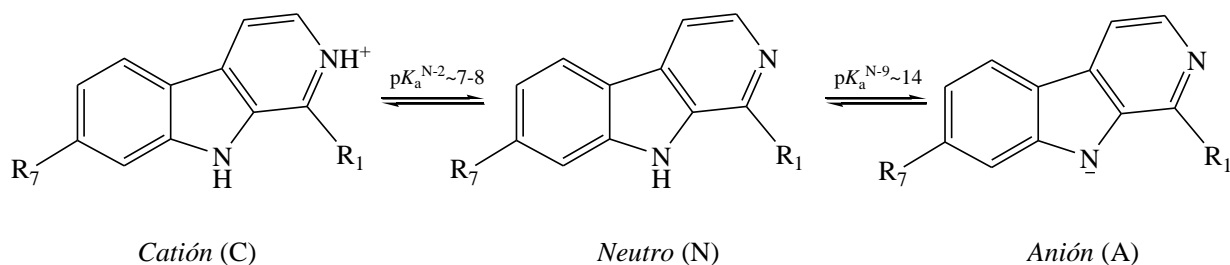
Existen numerosos trabajos que describen los equilibrios ácido-base de estos compuestos en el primer estado electrónicamente excitado (S_1). Uno de los primeros es el realizado en 1982 por Sakurovs y Ghiggino.[115] Estos autores estudiaron las diferentes especies ácido-base del nHo y su derivado catiónico 2-Me-nHo utilizando técnicas de

fluorescencia en estado estacionario y resuelto en el tiempo. Observaron que al excitar la forma neutra del nHo (βCN) en solución alcalina, se produce la emisión de la especie protonada (βCH^+ , $\lambda_{\text{fluo}} \sim 450 \text{ nm}$), concluyendo entonces que el N-piridínico en el estado excitado es una base más fuerte que el hidroxilo, ya que es capaz de abstraer un protón del agua. Al excitar sólo la especie aniónica obtuvieron la señal de emisión característica de la especie zwitteriónica ($\lambda_{\text{fluo}} \sim 510 \text{ nm}$). Este hecho sugirió que debería ocurrir una rápida protonación del anión en estado excitado para formar la especie dipolar. A partir de los valores medidos previamente para los $\text{p}K_a$ de los equilibrios ácido-base en el estado fundamental pudieron calcular, mediante el método de Förster, los correspondientes valores de $\text{p}K_a$ para los equilibrios ácido-base en el estado excitado singlete ($\text{p}K_a^*_{(S_1)}$).

En ese mismo año, 1982, Wolfbeis *et al.*[116] describieron los equilibrios ácido-base del Ho en solución acuosa. En este caso, mediante espectroscopía de absorción UV-visible detectaron tres especies en el estado electrónico fundamental y, mediante espectroscopía de emisión fluorescente, cuatro en el estado excitado incluyendo a la especie zwitteriónica ($\lambda_{\text{fluo}} \sim 520 \text{ nm}$). Nuevamente, mediante el método de Förster, pudieron calcular las constantes de equilibrio en el estado electrónico excitado.

También Balón Almeida *et al.* calcularon los correspondientes valores de $\text{p}K_a^*_{(S_1)}$ para el N-piridínico de varias βCs describiendo un incremento en ~ 6 unidades de $\text{p}K$ con respecto a los valores observados para el estado electrónico fundamental (S_0).[117,118] En trabajos más recientes, estos mismos investigadores describieron las propiedades ácido-base en solución acuosa de diferentes βCs reducidas y aromáticas.[119,120] En los espectros de absorción y en el intervalo de pH investigado, sólo observaron las especies neutras y catiónicas, mientras que detectaron también las formas zwitteriónicas en los espectros de emisión fluorescente. Pudieron determinar los valores de $\text{p}K_a$ espectrofotométricamente y $\text{p}K_a^*_{(S_1)}$ mediante cálculos recurriendo al uso del ciclo de Förster.

En general, todos los resultados obtenidos en estos trabajos previos demuestran que el $\text{p}K_a$ que involucra al N-piridínico ($\text{p}K_a^{N-2}$, Tabla 1.2) aumenta aproximadamente 6 unidades en el estado S_1 . Es decir, hay un incremento considerable de su basicidad. Contrariamente, la acidez del N-indólico aumenta ($\text{p}K_a^{N-9}$, Tabla 1.2) en el estado S_1 , ya que el valor de $\text{p}K_a^{N-9*}_{(S_1)}$ resultó ser ~ 6 unidades menor que en el estado fundamental. Es decir, en el estado excitado S_1 , la secuencia de los valores de $\text{p}K_a$ se invierte.[115,116,121-124]



Esquema 1.3. Equilibrios ácido-base presentes en el estado electrónico fundamental de las β CS aromáticas en solución acuosa, presentes en el intervalo de pH comprendido entre 1 y 14. Si $R_1 = R_2 = -H$, nHo; $R_1 = -CH_3$ y $R_7 = -H$, Ho, y $R_1 = -CH_3$ y $R_7 = -OCH_3$, Ha.

En contraste con la cantidad de publicaciones que describen los equilibrios ácido-base presentes en los estados S_0 y S_1 , existe escasa y discrepante información sobre los correspondientes valores de pK_a en el estado electrónico excitado de multiplicidad triplete ($pK_a^{*(T_1)}$). En este sentido, Romero Berto *et al.*[125] determinaron los valores de $pK_a^{*(T_1)}$ para el N-piridínico de nHo, Ho y Ha a partir de los espectros de emisión fosforescente registrados a 77 K en matriz sólida de éter etílico, isopentano, y etanol (relación 5:5:2). Los valores publicados están en el rango 12-14. Por su parte, Varela *et al.*[121] estudiaron los mismos equilibrios ácido-base mediante flash fotólisis a escala del microsegundo. Los valores de $pK_a^{*(T_1)}$ encontrados en este caso son ~ 2 unidades menores que en estado basal y ~ 8 unidades menos que los valores obtenidos para S_1 . Estos últimos autores resaltan que, a pesar de que los estados S_1 y T_1 poseen carácter $\pi-\pi^*$, las diferencias encontradas se deberían a diferencias en la distribución de carga en dichos estados.

A modo de resumen, en la Tabla 1.2 se presentan los valores informados en la literatura para los distintos equilibrios ácido-base en los diferentes estados electrónicos de las tres β CS aromáticas no sustituidas que se estudiarán en este trabajo de Tesis.

Tabla 1.2. Recopilación de los distintos valores de pK_a , $pK_a^{*(S_1)}$ y $pK_a^{*(T_1)}$ publicados para nHo, Ho y Ha, correspondientes a los equilibrios ácido-base presentes en el estado electrónico fundamental (S_0) y estados electrónicamente excitados singlete (S_1) y triplete (T_1), respectivamente.

Compuesto	pK_a^{N-2}	$pK_a^{N-2*(S_1)}$	$pK_a^{N-2*(T_1)}$	pK_a^{N-9}	$pK_a^{N-9*(S_1)}$
nHo	7,2 ^a	13,0 ^a	5,0 ^b	14,5 ^a	8,0 ^a
	7,9 ^c	14,7 ^c	12,7 ^d	14,5 ^c	8,0 ^c
Ho	7,7 ^a	12,8 ^a	4,5 ^b	14,6 ^e	8,65 ^e
	7,37 ^e	12,0 ^e	13,1 ^d		
Ha	8,0 ^a	12,9 ^a	4,4 ^b	14,5 ^a	8,8 ^a
	7,70 ^f	12,55 ^f	14,1 ^d	>14 ^f	

Referencias: ^a[124], ^b[121], ^c[115], ^d[125], ^e[116], ^f[123]

1.4.2. Espectroscopía de absorción UV-visible

En el estado electrónico fundamental las β Cs aromáticas presentan espectros de absorción de radiación UV-visible muy distintivos. Típicamente, se observan tres bandas características cuyas posiciones son fuertemente dependientes del pH del medio (Figura 1.2).[126,127] En solución acuosa a pH 10, las β Cs presentan una banda de menor energía ubicada entre 300 y 370 nm, con dos máximos de absorción característicos localizados a ~ 335 nm y ~ 350 nm, dependiendo del derivado β -carbolínico analizado (Figura 1.2, espectros representados en color azul). Esta transición ha sido interpretada como una transición π - π^* teóricamente prohibida (esto se correlaciona con el bajo valor del coeficiente de absorción molar, $\epsilon(\lambda)$, observado) pero experimentalmente permitida en solventes polares.[126,128,129] Este hecho es avalado por el corrimiento batocrómico que presenta la especie protonada (Figura 1.2, espectros representados en color rojo), el cual es característico de moléculas aromáticas heteroatómicas con alta conjugación y, consecuentemente, con bandas de absorción π - π^* de baja energía. De acuerdo con la asignación de las bandas de absorción del nHo hecha, independientemente, por Días *et al.*,[126] Aulló *et al.*[127] y Biondic y Erra-Balsells,[130,131] los dos máximos que presenta esta señal (336 y 348 nm) corresponderían a la estructura vibracional de la banda $S_0 \rightarrow S_1$. La segunda banda, ubicada en la región del espectro comprendida entre 264 nm y 300 nm ($\lambda_{\text{máx}} \sim 290$ nm) se asigna también a una transición π - π^* permitida (alto $\epsilon(\lambda)$) la cual, por proximidad energética, se encuentra parcialmente solapada con otra banda correspondiente a una transición de tipo n - π^* que, en el espectro, se observa como un hombro ubicado a $\lambda \sim 280$ nm. Por último, puede observarse la banda más energética y con mayor coeficiente de absorción molar, ubicada entre 218 y 264 nm ($\lambda_{\text{máx}} \sim 230$ nm), con un hombro a $\lambda \sim 250$ nm, correspondiente también a una transición de tipo π - π^* permitida, característica de sistemas aromáticos policonjugados.

En el caso de las especies protonadas, βCsH^+ , (Figura 1.2, espectros representados en color rojo) todas las bandas muestran un corrimiento batocrómico con respecto a las transiciones observadas en medio alcalino. En todos los casos, estas bandas de absorción han sido asignadas a transiciones π - π^* , debido a que, en esta especie, el par de electrones n del N-piridínico se encuentra comprometido formando el correspondiente orbital molecular σ . Cuando la protonación tiene lugar, este par de electrones incrementa su carácter sp^3 para formar la unión σ y así la probabilidad de interacción (solapamiento, extensión de la

conjugación) con el orbital HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) del sistema π es mayor. Entonces, la banda de menor energía se desplaza hacia el rojo. Aulló y Tomás Vert fueron los primeros en racionalizar y describir el comportamiento observado luego de la protonación de las β Cs.[127]

Es importante destacar que, en el caso de los 9-metil derivados se observa el típico corrimiento batocrómico en las tres bandas de absorción características provocado por la protonación del N-piridínico (Figuras 1.2 (b) y (d), respectivamente). Sin embargo, cuando se comparan los espectros de los 9-metil derivados (9-Me-nHo y 9-Me-Ho) con el de las correspondientes β Cs no sustituidas (nHo y Ho, respectivamente) se observa que la banda de menor energía, tanto de la especie protonada como la neutra, presenta un marcado corrimiento batocrómico (~10-15 nm) provocado por la metilación del N-indólico (efecto de hiperconjugación del grupo $-\text{CH}_3$).

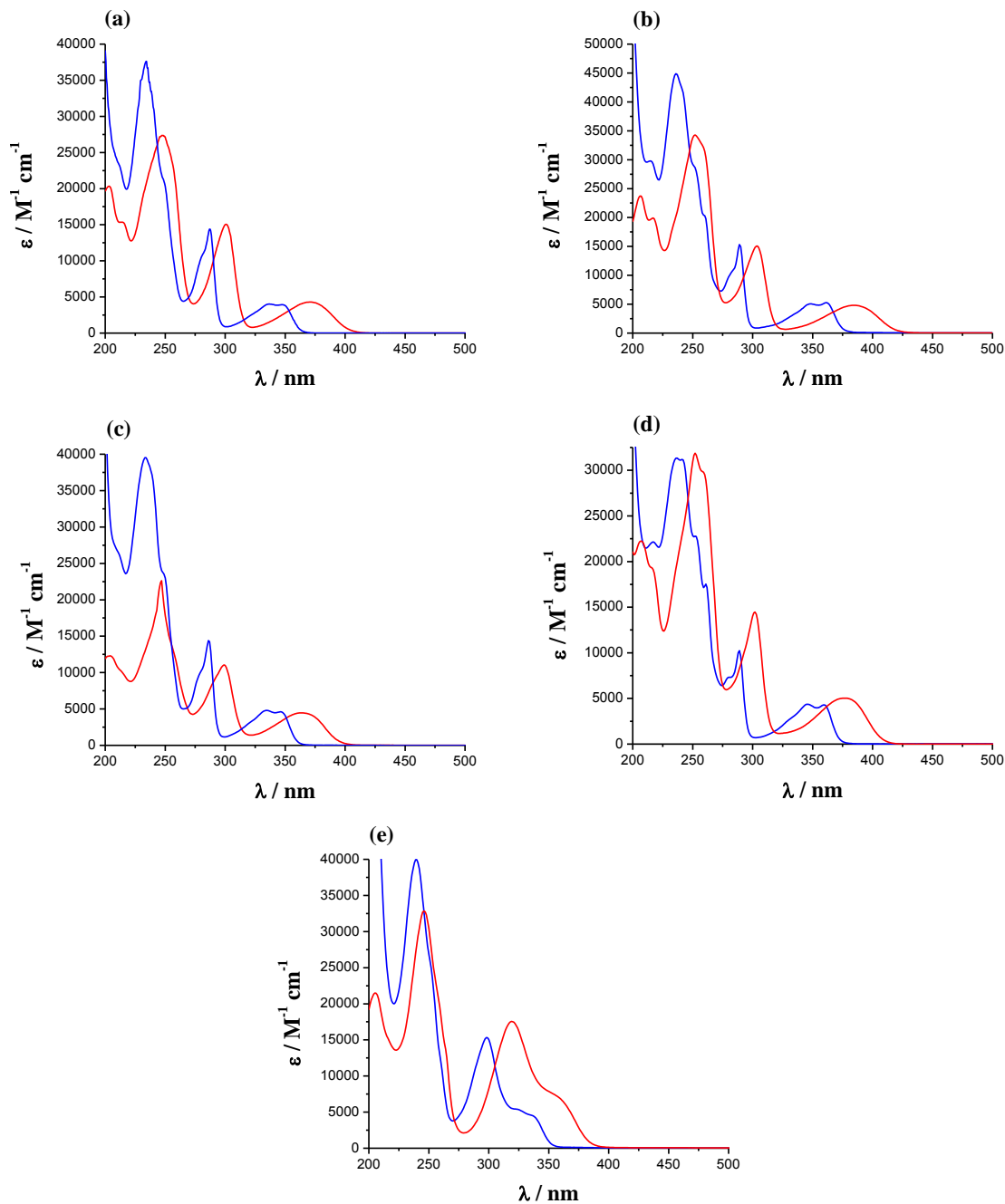


Figura 1.2. Espectros de absorción UV-visible. Las líneas en rojo corresponden a la especie protonada (pH= 4,8) y en azul a la neutra (pH= 10,0). (a) nHo, (b) 9-Me-nHo, (c) Ho, (d) 9-Me-Ho y (e) Ha. Fuente: referencia[35]

1.4.3. Espectroscopía de fluorescencia

A lo largo de los últimos 30 años, se han efectuado numerosos estudios que describen las principales características fotoquímicas y fotofísicas de las β Cs aromáticas más abundantes en la naturaleza (nHo, Ho y Ha, entre otras) en solución acuosa.[122-124,132-135] En 1985, Ghiggino *et al.* evaluaron y cuantificaron las vías de desactivación radiativa de los estados

electrónicos excitados S_1 . Estos autores propusieron el uso del nHo en H_2SO_4 1 N, como compuesto de referencia fluorométrica para la determinación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia de otras sustancias con capacidad de absorción de la radiación en la región comprendida entre 330 - 360 nm y con emisión en el rango de 380 a 650 nm.[136] Unos años más tarde, Pardo *et al.* propusieron también el uso de Ha y Ho, entre otros derivados, como referencia de fluorescencia.[135] En estos trabajos, también se determinaron los tiempos de vida de fluorescencia del nHo, Ho y Ha en solución acuosa, a pH ácido. Valores de rendimientos cuánticos (Φ_F) y tiempos de vida de fluorescencia (τ_F) de las β Cs se recopilan en la Tabla 1.3. Un detalle que es interesante destacar, es que en los estudios mencionados los autores indican que el rendimiento cuántico de fluorescencia no depende de la concentración de O_2 en la solución. Sin embargo, recientemente González *et al.* demostraron una clara dependencia de las propiedades fotofísicas de estos alcaloides con la concentración de oxígeno disuelto en el medio acuoso.[114,137] Y en estudios previos realizados en solventes orgánicos por Mesaros *et al.* se hace mención de este efecto del O_2 en la emisión fluorescente observado para el caso del nHo y del Ho.[138]

De la recopilación de estudios fotoquímicos y fotofísicos previos, desarrollados en solución acuosa, se destacan las particularidades que se describen a continuación.

1.4.3.1. Espectros de emisión

En los espectros corregidos y normalizados correspondientes a las formas protonadas (pH 4,8) y neutras (pH 10,0) del nHo, 9-Me-nHo, Ho, 9-Me-Ho, y Ha (Figura 1.3), se observa que la emisión fluorescente obtenida en medio ácido muestran una única banda de emisión centrada en ~420 - 460 nm. Por su parte, los espectros de emisión registrados en medio alcalino muestran la presencia de dos bandas de emisión, donde la banda de mayor intensidad posee un máximo a la misma longitud de onda que la banda obtenida en medio ácido. En consecuencia, ésta emisión centrada en ~420 - 460 nm correspondería a la emisión de la respectiva forma protonada ($^1[\beta CH^+]$ *). Por otra parte, la banda de menor intensidad, con máximo a ~360 - 390 nm, es asignada a la banda de emisión típica de las β Cs neutras ($^1[\beta CN]$ *). Esta asignación se hace en base al conocimiento de la fotoquímica de las β Cs en solventes orgánicos, donde en solvente no polares y no próticos la señal centrada en ~380 nm es la única señal observada, y que corresponde a la emisión de la forma neutra desde su estado electrónico excitado al fundamental ($^1[\beta CN]$ * \rightarrow $^0[\beta CN]$).[122,139]

Estos resultados son consistentes con el aumento de basicidad que experimenta el N-piridínico de las β Cs en el estado excitado, mencionado en la sección 1.4.1. Por ello, aún a pH 10, la forma neutra de la β C en su estado excitado, experimenta una rápida protonación por intercambio de protones con el solvente durante el tiempo de vida del estado S_1 . Entonces, la especie emisora predominante es la forma protonada de la β C en su estado excitado ($^1[\beta\text{CH}^+]$) y no la forma neutra en su estado excitado ($^1[\beta\text{CN}]$). [113-115,121,122,137] En la Tabla 1.3 se detallan los principales parámetros fotofísicos relacionados con la desactivación fluorescente de cada uno de los compuestos indicados en la Figura 1.3.

Como ya se mencionó, en trabajos realizados por González *et al.* se demostró una clara dependencia de la desactivación de los estados excitados de las β Cs con la concentración de O_2 disuelto en solución. [114,137] Los datos publicados muestran que, para nHo, 9-Me-nHo, Ho, 9-Me-Ho y Ha, un aumento en la $[\text{O}_2]$, produce una disminución de sus Φ_F . Esta disminución fue cuantificada por gráficas de Stern-Volmer en estado estacionario, dando valores de constantes ($K_{SV} = k_q \tau_F^0$) para todos los casos de $\sim 1,4 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$ (excepto para la Ha, el cual es un orden de magnitud menor). Esto representa un valor para la constante bimolecular de *quenching* (k_q) de $\sim 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, lo cual es consistente con la desactivación de los estados S_1 limitados por difusión, fenómeno que está de acuerdo con la desactivación de la fluorescencia producida por O_2 . [140] (ver τ_F en la sección 1.4.3.3). Como se mencionó, la Ha mostró valores de K_{SV} considerablemente menores. Sin embargo, teniendo en cuenta el τ_F de la Ha informado en la literatura ($6,6 \pm 0,2 \text{ ns}$), se obtiene una constante de desactivación $k_q \sim 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, la cual es similar a las obtenidas para el resto de las β Cs estudiadas. Es importante notar que el coeficiente de difusión del O_2 en solución acuosa, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, es $\sim 2,5$ veces menor que en un solvente hidrocarbonado. Entonces, aunque las constantes de velocidad típicas asociadas con la desactivación del estado S_1 por O_2 en solventes hidrocarbonados tienen un valor aproximado de $2\text{-}3 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, el valor de k_q obtenido para la desactivación de la fluorescencia de las β Cs en agua es razonable y ciertamente se corresponde con un proceso limitado por difusión.

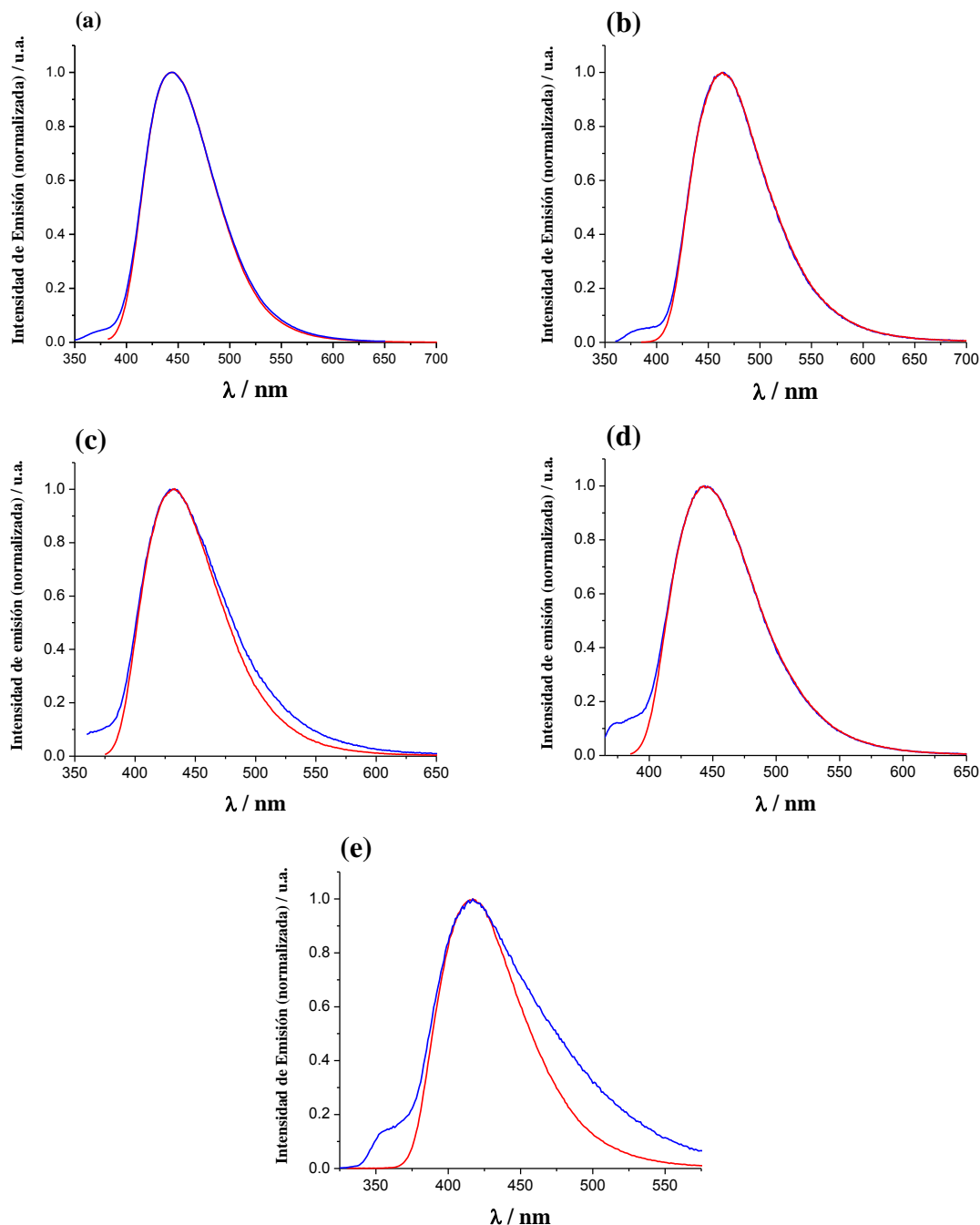


Figura 1.3. Espectros de emisión fluorescente normalizados. Las líneas en rojo corresponden a la especie protonada ($\text{pH} = 4,8$) y en azul a la neutra ($\text{pH} = 10,0$). (a) nHo, (b) 9-Me-nHo, (c) Ho, (d) 9-Me-Ho y (e) Ha. Fuente: referencia[35].

Es importante destacar aquí un aspecto que es relevante para las discusiones que se presentarán en las secciones y/o capítulos siguientes. Las formas protonadas (βCH^+) presentan valores de Φ_F mayores a los de sus respectivas formas neutras (βCN). Entonces, teniendo en cuenta que el área bajo la curva de la banda de emisión correspondiente a la especie neutra es insignificante con respecto al área bajo la curva correspondiente a la emisión de la especie

protonada, la comparación de los Φ_F obtenidos para la forma protonada y neutra de cada βC , presenta buena correlación con la fracción de la especie neutra en el estado excitado S_1 ($[^1\beta CN]^*$) que se protona, por intercambio de un H^+ con el solvente, para dar lugar a la formación de la especie $[^1\beta CH^+]^*$. Así, por ejemplo para el caso del nHo, el Φ_F producto de la excitación de la especie neutra (nHoN) representa ~30 % del valor obtenido en el caso de la excitación de la especie protonada (nHoH⁺). Teniendo en cuenta que a pH 10,0 la especie emisora es $[^1nHoH^+]^*$, estos resultados indican que sólo una fracción menor al 30 % del estado S_1 de nHoN (es decir, $[^1nHoN]^*$) se protona para dar $[^1nHoH^+]^*$. El resto, podría desactivarse mediante, al menos, tres vías competitivas: **(i)** vía cruce intersistemas desde S_1 a T_1 , **(ii)** vía radiativa (fluorescencia, λ_{fluo} ~380 nm) y/o **(iii)** por conversión interna desde S_1 a S_0 (emisión rápida de calor al medio).[137]

1.4.3.2. Espectros de excitación

Es sabido que la intensidad de fluorescencia (I_F) de una solución diluida de un cierto soluto es proporcional a su $\varepsilon(\lambda)$, Φ_F , e intensidad de la lámpara, a cierta longitud de onda. En particular, si la intensidad de la lámpara se mantiene constante (en el rango de longitudes de onda de excitación (λ_{exc})) y sólo si Φ_F de dicho soluto es independiente de λ_{exc} , entonces I_F será proporcional al $\varepsilon(\lambda)$. [141] Consecuentemente, el espectro de excitación resultará una réplica del espectro de absorción. En estos términos, y teniendo en cuenta la superposición existente entre los espectros de absorción y excitación del nHo (en ambas condiciones de pH), González *al et.* concluyeron que el Φ_F es independiente de la λ_{exc} . Asimismo, a partir de los espectros de excitación y emisión en medio alcalino, demostraron que a pesar de ser la forma neutra de las βCs quienes absorben la radiación incidente es, sin embargo, la forma protonada la principal especie emisora ($[^1\beta CH^+]^*$). [137] Este hecho está en consonancia con lo sugerido en las secciones previas. En la Figura 1.4 se presentan los espectros de excitación de fluorescencia de ambas especies ácido-base de tres βCs aromáticas particulares (nHo, Ho, Ha) y dos 9-metil derivados (9-Me-nHo y 9-Me-Ho), conjuntamente a sus correspondientes espectros de absorción.

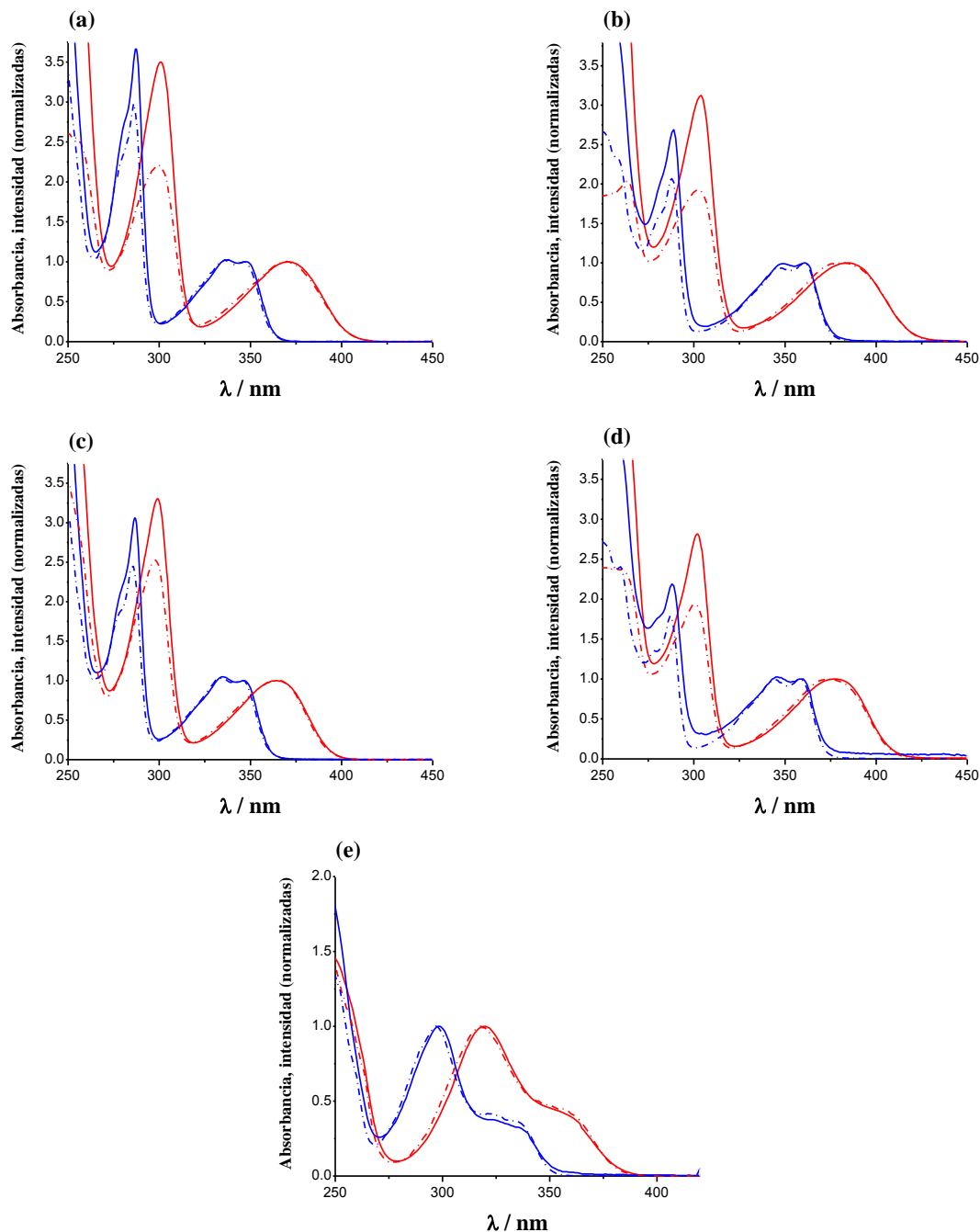


Figura 1.4. Espectros normalizados de absorción UV-visible (líneas continuas) y de excitación de fluorescencia (líneas punteadas). En cada caso se usó como longitud de onda de análisis los respectivos valores de $\lambda_{\text{fluo}}^{\text{máx}}$ de emisión de cada alcaloide listados en la Tabla 1.3. Las líneas en rojo corresponden a las especies protonadas (pH = 4,8) y en azul a las neutras (pH = 10,0). (a) nHo, (b) 9-Me-nHo, (c) Ho, (d) 9-Me-Ho y (e) Ha.

1.4.3.3. Tiempos de vida de fluorescencia

Existen numerosos trabajos donde se ha informado valores de los tiempos de vida de fluorescencia (τ_F) de β Cs,[37,113-115,122,136,137,142-145] los cuales han sido determinados en diferentes condiciones experimentales (solvente, pH, $[\text{O}_2]$, etc.). Sakurovs y Ghiggino,

publicaron uno de los primeros trabajos en donde se determinaron los decaimientos de fluorescencia del nHo en solución acuosa ($2 < \text{pH} < 10$), observando que el mismo sigue un comportamiento de primer orden, es decir muestra decaimientos mono-exponenciales, con $\tau_F = 22,0 \pm 0,1$ ns ($\lambda_{\text{fluo}} = 450$ nm). También, González *et al.* obtuvieron valores de τ_F para el nHo, de $21,8 \pm 0,3$ y $20,9 \pm 0,3$ ns ($\lambda_{\text{fluo}} = 450$ nm) a pH 4,8 y 10,0, respectivamente (ver Figura 1.5).[137] Este hecho reafirma nuevamente que, independientemente del pH de la solución, la principal especie emisora es $[^1\text{nHoH}^+]$. En concordancia con lo expuesto hasta el momento, el 9-Me-nHo presenta el mismo comportamiento del estado emisor, es decir, que a pH 4,8 y 10,0 se observan similares τ_F (23,1 y 22,9 ns, respectivamente) correspondientes al $[^1\text{9-Me-nHoH}^+]$. [114] Este comportamiento también se evidencia en las demás βCs presentadas en este capítulo. En la Tabla 1.3 se reúnen los valores de τ_F en solución acuosa para cada especie ácido-base publicado en literatura.

Asimismo, González *et al.* también investigaron la dependencia del τ_F del nHo con la $[\text{O}_2]$ disuelto a pH ácido.[137] Los datos obtenidos, al aumentar la $[\text{O}_2]$, dan valores de constantes de Stern-Volmer (K_{sv}) de $1,3 \pm 0,1 \text{ M}^{-1}$, lo cual es completamente consistente con los resultados que obtuvieron en los experimentos en estado estacionario (ver sección 1.4.3.1). Esto confirma, que el fenómeno de desactivación de los estados S_1 está limitado por difusión, lo que está de acuerdo con la desactivación de la fluorescencia producida por O_2 .

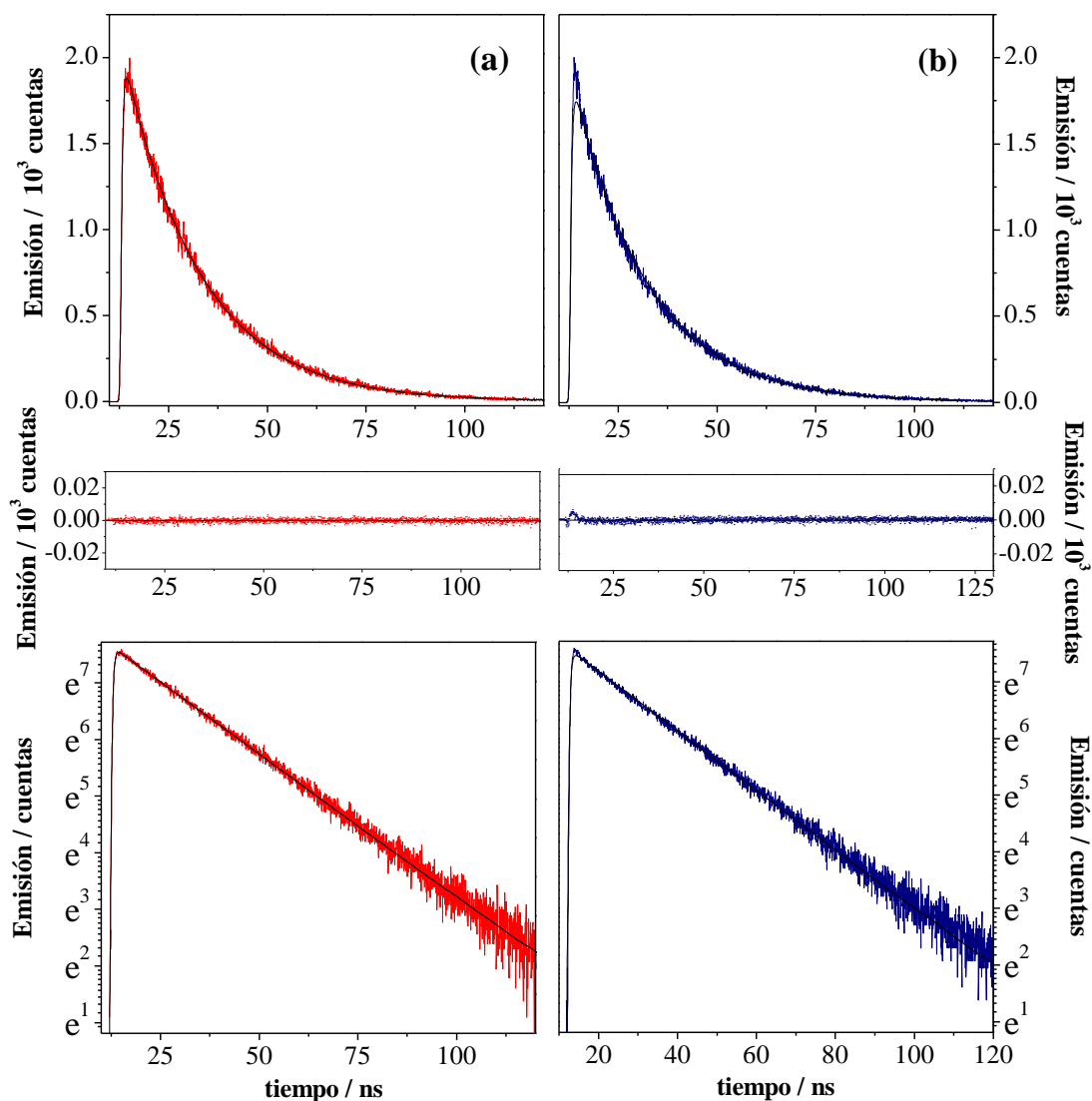


Figura 1.5. Variación de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo. Trazo experimental obtenida excitando a 341 nm y registrando la emisión a 450 nm, residuos y decaimiento en escala logarítmica. (a) pH 4,8 y (b) pH 10,0. La línea negra representa el ajuste no lineal. Extraído de referencia [35]

1.4.3.4. Producción de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)

(a) Producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Los valores reportados en literatura para los rendimientos cuánticos de formación de H_2O_2 ($\Phi_{H_2O_2}$) en solución acuosa, indican que en general, las β Cs producen dicha especie reactiva con baja eficiencia, ya que sus respectivos $\Phi_{H_2O_2}$ son menores a 10^{-3} . [114,137] (ver Tabla 1.3). Asimismo, en el caso del nHo, ha sido comprobado que el peróxido de hidrógeno se forma a partir de la desproporción del $O_2^{\cdot-}$ generado durante la irradiación de dicha β C con luz UVA. [137]

(b) Producción de oxígeno singlete (1O_2)

En investigaciones previas, se ha propuesto que las β Cs son excelentes productoras de 1O_2 actuando como fotosensibilizadores.[146,147] Sin embargo, hasta la fecha, la información accesible en la literatura y de carácter cuantitativo relacionada con dicha propiedad (Φ_Δ) es escasa.

Becker *et al.* cuantificaron la eficiencia de producción de 1O_2 (Φ_Δ) fotosensibilizada por nHo, Ho y Ha, en solventes orgánicos no próticos. En estas condiciones experimentales se observaron valores de Φ_Δ comprendidos en el rango 0,31-0,40.[147] Por su parte, Egorov *et al.* realizaron estudios en soluciones acuosas, informando valores de Φ_Δ considerablemente inferiores.[148] El valor publicado en una primera instancia fue $\Phi_\Delta \sim 0,03$,[148,149] el cual fue posteriormente corregido por los mismos autores a $\Phi_\Delta = 0,08$. [150] Cabe destacar que estos experimentos fueron realizados a pH 7, condición en la cual están presentes ambas especies ácido-base de esta β C.

Recientemente, en trabajos llevados a cabo en solución acuosa por González *et al.* se profundizó el estudio cuantitativo de la generación de 1O_2 por β Cs en función del pD y la $[O_2]$ en solución acuosa. En términos generales, estos resultados revelaron que si bien ambas formas ácido-base de las β Cs son capaces de producir 1O_2 , lo hacen con una eficiencia relativamente baja ($\Phi_\Delta \sim 0,08 - 0,10$).[37,114,137,151] Cabe aclarar que, en el caso particular de Ho, se observaron valores de Φ_Δ similares al valor corregido reportado por Egorov *et al.*[150]

Es importante señalar que, por un lado, los valores de Φ_Δ son totalmente coherentes con los valores de Φ_F que se registraron a la misma concentración de oxígeno, es decir, la suma de Φ_Δ y Φ_F no excede de 1,0. Por otro lado, una disminución en Φ_F observada con el aumento en la concentración de oxígeno, no se ve acompañada de un aumento adecuado en Φ_Δ . Por lo que, el incremento en la $[O_2]$ favorece la desactivación de S_1 hacia el estado fundamental mediante procesos de conversión interna ($S_1 \rightarrow S_0$) y no, tal como ocurre para casi la totalidad de los compuestos orgánicos, donde un aumento en la eficiencia de cruzamiento intersistemas ($S_1 \rightarrow T_1$) se ve favorecido por un aumento en la $[O_2]$ y, consecuentemente, a un incremento en Φ_Δ . Entonces las β Cs representarían una familia de compuestos que muestran un comportamiento excepcional en relación a las reglas clásicas establecidas.[114,151]

Tabla 1.3. Recopilación de valores de distintas propiedades fotoquímicas y fotofísicas de nHo, Ho, Ha y sus respectivos 9-metil-derivados previamente publicados. Entre paréntesis se indica la especie ácido-base predominante en cada pH de trabajo: C y N indican las formas catiónicas (βCH^+) y neutras (βCN), respectivamente.

Compuesto	$\text{p}K_a^{\text{N-2}}$	$\text{p}K_a^{\text{N-9}}$	pH	$\lambda_{\text{abs}} / \text{nm}^{\text{a}}$	$\epsilon(\lambda) \times 10^3 / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1 \text{a}}$	$\lambda_{\text{em}} / \text{nm}^{\text{b}}$	$\Phi_{\text{F}}^{\text{c}}$	$\tau / \text{ns}^{\text{c}}$	Φ_{Δ}^{d}	$\Phi_{\text{H}_2\text{O}_2}^{\text{e}}$
nHo	7,2 ^f	14,5 ^f	4 (C)	371	4,30 ± 0,01	448	0,70 ± 0,05	21,8	0,10 ± 0,01	0,46 10 ⁻³
			10 (N)	337 y 348	4,01 y 3,89 ± 0,01	~ 375 y 448	0,21 ± 0,05	20,9	0,08 ± 0,01	0,12 10 ⁻³
9-Metil-nHo	nd ^g	---	4 (C)	384	4,84 ± 0,01	458	0,75 ± 0,05	23,1	0,10 ± 0,01	0,38 10 ⁻³
			10 (N)	349 y 362	5,06 y 5,25 ± 0,01	~ 385 y 458	0,68 ± 0,05	2,1 y 22,9	0,08 ± 0,01	0,57 10 ⁻³
Ho	7,4 ^h	14,6 ^h	4 (C)	365	4,45 ± 0,01	431	0,85 ± 0,05	21,2 ⁱ	0,09 ± 0,01	0,37 10 ⁻³
			10 (N)	335 y 348	4,80 y 4,50 ± 0,01	~ 369 y 431	0,47 ± 0,05	0,6 y 20,1 ⁱ	0,10 ± 0,01	0,14 10 ⁻³
9-Metil-Ho	nd ^g	---	4 (C)	377	5,03 ± 0,01	444	0,93 ± 0,05	24,5	0,09 ± 0,01	0,30 10 ⁻³
			10 (N)	346 y 360	4,36 y 4,25 ± 0,01	~ 374 y 444	0,68 ± 0,05	2,5 y 23,8	0,10 ± 0,01	0,47 10 ⁻³
Ha	8,0 ^f	14,5 ^f	4 (C)	350	7,86 ± 0,01	417	0,49 ± 0,05	7,1 ^j	0,22 ± 0,01	0,84 10 ⁻³
			10 (N)	325 y 336	5,35 y 4,68 ± 0,01	~ 356 y 417	0,38 ± 0,05	0,4 y 7,0 ^j	0,13 ± 0,01	0,37 10 ⁻³

$\text{p}K_a^{\text{N-2}}$ (N-piridínico). $\text{p}K_a^{\text{N-9}}$ (N-indólico). ^a Máximos de absorción de la banda de menor energía. ^b Máximos de emisión. ^c solución acuosa equilibrada en aire. ^d solución de D₂O equilibrada en aire. ^e Rendimientos cuánticos de producción de H₂O₂ (especie detectada por un método enzimático). ^g ~6-7. Todos los valores obtenidos de la referencia [35], excepto los indicados: ^f Ref. [124]; ^h Ref. [116] ⁱ Ref.[145] ^j Ref.[184].

Cabe aclarar que, en general, la mayoría de las β Cs poseen baja eficiencia de producción fotoinducida de EROs. Por lo tanto, a la luz de los resultados aquí expuestos, la hipótesis que sugiere como rol fotobiológico central de estos alcaloides el de su participación en los mecanismos de defensa fotoinducidos contra agentes invasores (vía la producción de EROs) parecería ser muy poco probable. Sin embargo, una función alternativa que vale la pena explorar podría estar relacionada con su participación en procesos de señalización intracelular mediada por EROs.

1.4.3.5. Desactivación total de $^1\text{O}_2$ por β Cs

La eficiencia de desactivación del $^1\text{O}_2$ por parte de un determinado compuesto está relacionada con su capacidad antioxidante. En este sentido, los valores obtenidos para las β Cs en solución acuosa no son despreciables. Las constantes de desactivación total del $^1\text{O}_2$ (k_t) reportadas para nHo, Ho y Ha son del orden de $\sim 10^6$ y $\sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para las formas protonadas y neutras, respectivamente (Figura 1.6 y Tabla 1.4).[35] Esta diferencia de un orden de magnitud entre las distintas formas ácido-base, también fue revelada por métodos de cálculo QSPR (*Quantitative Structure Property Relationship*).[36] Además, el análisis de ciertos derivados clorados de la Ha reveló que estos, en su forma ácida, presentan un valor de k_t un orden de magnitud mayor que la Ha.[37]

En relación a otros compuestos ampliamente aceptados como excelentes antioxidantes, tales como el β -caroteno, cuyo k_t en solución es del orden $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$,[152] las β Cs serían antioxidantes mucho más débiles. No obstante, los valores obtenidos en solución pueden distar mucho de aquellos obtenidos en condiciones intracelulares. Por ejemplo, un trabajo recientemente publicado revela que el β -caroteno no altera el tiempo de vida del $^1\text{O}_2$ intracelular y por lo tanto, no puede ejercer su protección antioxidante a través de una reacción directa con dicha especie reactiva.[153]

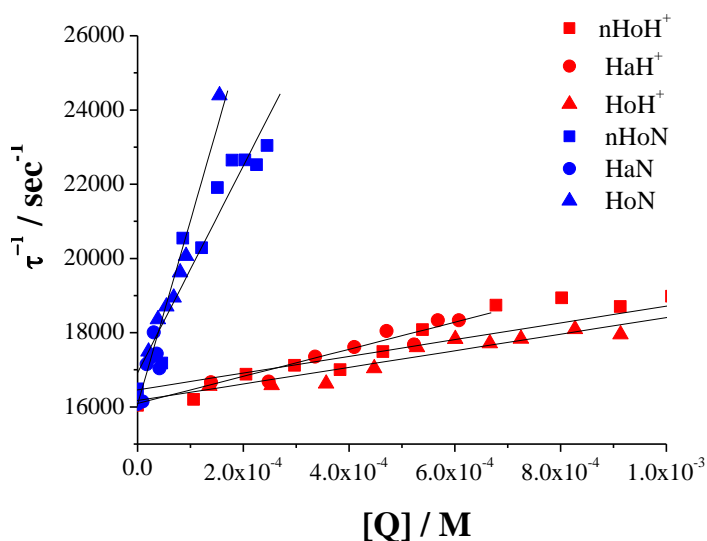


Figura 1.6. Desactivación del oxígeno singlete por β Cs, donde $[Q]$ representa la concentración de cada β C estudiada, actuando como agente desactivador del oxígeno singlete (o, en inglés, *quencher*). Fuente: referencia[35].

Tabla 1.4. Resumen de los valores de las constantes bimoleculares de desactivación total del $^1\text{O}_2$ (k_t) publicadas para seis derivados particulares de β Cs.

Compuesto	$k_t / \text{M}^{-1} \text{s}^{-1} (\pm 0,5)$	
	pH 4,4	pH 10,0
Ho ^a	$3,1 \times 10^6$	$2,8 \times 10^7$
nHo ^a	$2,2 \times 10^6$	$5,0 \times 10^7$
Ha ^a	$3,6 \times 10^6$	$3,5 \times 10^7$
6-Cl-Ha ^b	$1,4 \times 10^7$	$\sim 10^8 - 10^9$
8-Cl-Ha ^b	$4,3 \times 10^7$	$\sim 10^8 - 10^9$
6,8-diCl-Ha ^b	$1,6 \times 10^7$	$\sim 10^8 - 10^9$

^a Referencia[35], ^b referencia [37].

1.5. Propiedades fotodinámicas de β Cs: interacción y daño al material genético

1.5.1. Estudios previos de interacción de β Cs con el ADN

Teniendo en cuenta el tamaño relativamente pequeño, la planaridad, la aromaticidad y los grupos funcionales que presentan las β Cs, estos alcaloides cumplirían con los requerimientos teóricos necesarios para unirse al ADN. Durante las décadas pasadas se han realizado diversos estudios de la interacción entre las β Cs y dicha biomolécula,[40,154-156] los cuales se detallan a continuación:

✓ En uno de los primeros trabajos publicados (1984), Feigon *et al.*[156] describieron a los piridoindoles como drogas que se intercalan en el ADN. En ese estudio, llevado a cabo usando técnicas de RMN, los autores demostraron que la velocidad de disociación del complejo formado es relativamente alta.

- ✓ Taira *et al.*[155] también sugirieron que seis β Cs (nHo, Ho, Hol, Ha, d-hHol y d-hHa) son capaces de intercalarse en el ADN. Estos autores demostraron que la magnitud de esta intercalación es fuertemente dependiente de la naturaleza del sustituyente y de la planaridad de cada β C, siendo el nHo el alcaloide que presenta menor capacidad de intercalación. Cabe destacar que este estudio fue realizado en solución acuosa a pH 6 y 7,6, donde las β Cs son capaces de presentar en solución ambas especies ácido-base de cada una de las β Cs estudiadas.
- ✓ García-Zubiri *et al.*[154] investigaron la interacción entre 3-(N-metilcarboxamido)-9H pirido[3,4b]indol (β CMAM) y ADN de doble y simple cadena. En todos los casos, se observó una estequiometría de complejación 1:1 (β CMAM: biomolécula). En este trabajo se postula que la complejación entre el ADN doble cadena y esta β C podría tener lugar a través de la base guanina. Se cree que las uniones puente de hidrógeno entre el grupo amida de la β CMAM y el ADN facilitarían la asociación. Además, en este caso, la intercalación parecería no ser la única forma de interacción. Es importante destacar que todos estos estudios han sido llevados a cabo bajo las mismas condiciones de pH, cercanas al pH fisiológico, condición en la cual sólo la forma neutra de la β CMAM está presente en solución.
- ✓ En año 2005, Cao *et al.*[40] estudiaron la capacidad de unión con el ADN de los componentes de la familia de la Ha y sus derivados 9-sustituídos. En este trabajo, se hizo evidente que la presencia de los sustituyentes alquilo cortos en la posición 9 aumenta la capacidad de intercalación en el ADN de manera significativa, mientras que la del grupo bencilo genera el efecto opuesto.
- ✓ Nafisi *et al.*[157] estudiaron la interacción de las β Cs nHo, Ho, Ha, d-hHol y triptolina (t-hnHo), con el ADN utilizando espectroscopía infrarroja con transformadas de Fourier (FTIR). Los resultados demostraron que existen ambos tipos de interacciones: vía unión a un surco y vía intercalación en la hélice.
- ✓ En un trabajo reciente, Shankaraiah *et al.*[158] sintetizaron nuevos conjugados β C-chalcona y evaluaron su capacidad de unión al ADN mediante métodos fluorimétricos, viscosimétricos y computacionales (*molecular docking*). Los resultados demostraron una interacción con el ADN muy significativa junto a una llamativa estabilización de dicha biomolécula.
- ✓ Al estudiar el efecto del pH en la unión de diferentes β Cs a ADN plasmídico (pGEM-11z), Gonzalez *et al.* encontraron que las formas protonadas (β CH⁺) poseen mayor interacción con el ADN que las neutras (β CN) debido a la presencia de fuerzas de

atracción coulombicas. De acuerdo a los valores obtenidos para las constantes de desactivación dinámicas (K_D) y estáticas (K_S), los autores hallaron que la interacción β C-plásmido tiene una contribución mayoritaria o puramente estática, según el pH de trabajo. En términos de los valores de K_S obtenidos a pH ácido, la fuerza de las interacciones sigue el orden: $n\text{HoH}^+ \sim \text{HoH}^+ < \text{HaH}^+ \sim \text{N-Me-nHoH}^+ \sim \text{N-Me-HoH}^+$. Estos resultados se presentan en la Figura 1.7 y en la Tabla 1.5.[159]

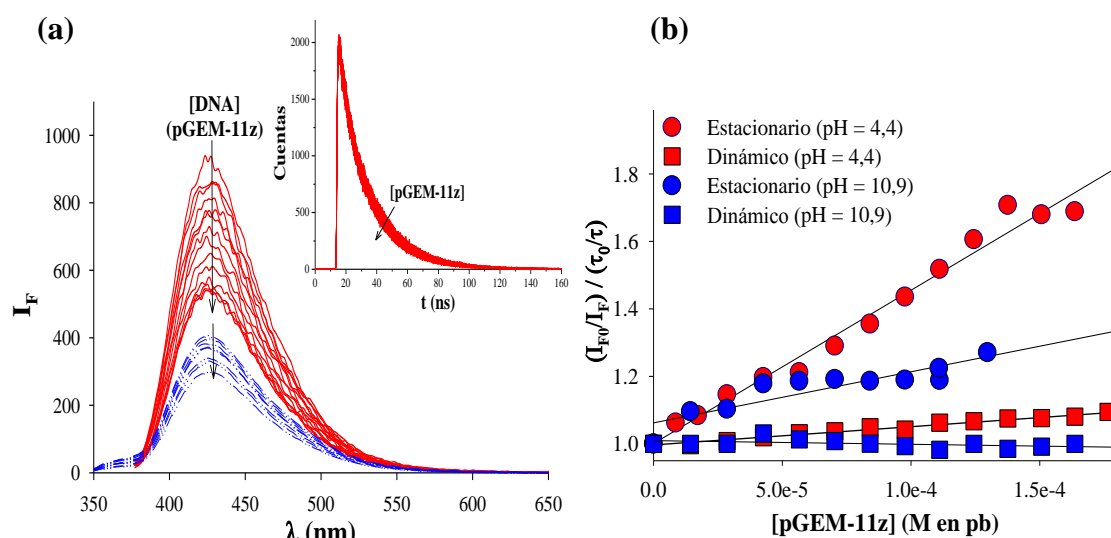


Figura 1.7. (a) Desactivación de la emisión de fluorescencia de harmano por plásmido pGEM-11z, en soluciones acuosas. Experimentos realizados a pH 4,4 (en rojo) y pH 10,9 (en azul). Las flechas indican el aumento en la concentración de ADN. Inserto: desactivación dinámica observada en condiciones ácidas. (b) Gráficos de Stern–Volmer. Fuente: referencia[35].

Tabla 1.5. Resumen de los valores de constantes de desactivación dinámica y estática (K_D y K_S , respectivamente) publicados en la literatura* para la interacción de cinco β Cs con plásmido pGEM-11z.

Compuesto	$K_S / 10^3 \text{ M}^{-1}$		$K_D / 10^3 \text{ M}^{-1}$	
	pH 4,4	pH 10,9	pH 4,4	pH 10,9
Ho	3,9	2,3	$0,54 \pm 0,02$	0
nHo	4,2	1,4	$0,52 \pm 0,02$	0
Ha	12,3	4,7	$0,33 \pm 0,03$	0
N-Me-nHo	7,6	6,5	$0,25 \pm 0,05$	0
N-Me-Ho	13,2	12,7	$0,90 \pm 0,04$	0

* Fuente: referencia[35].

1.5.2. Estudios previos relacionados con daño al ADN fotosensibilizado por β Cs

Debido a las propiedades ópticas de las β Cs (absorción en la región del UVA y/o visible) y también al comportamiento fotoquímico y fotofísico que poseen estos alcaloides, a lo largo de la última década se ha investigado su capacidad de actuar como fotosensibilizadores adecuados para el ADN y sus componentes. Los estudios previos, registrados en la literatura, relacionados con este tema se resumen a continuación:

- ✓ Se conoce que nHo es capaz de interactuar e inducir daño fotosensibilizado a componentes del ADN (dGMP[160] y dAMP[161]), dando como resultado, entre otros fotoproductos 8-oxo-dGMP y 8-oxo-dAMP, ambos marcadores de daño oxidativo.
- ✓ Toshima *et al.* sintetizaron híbridos glicoconjugados, β C-carbohidratos, los que fueron usados como agentes fotoactivos que clivan el ADN bajo la acción de la luz.[162] El mecanismo propuesto por estos autores involucra la intercalación de los mismos en el ADN. Además proponen que, los enlaces C=N conjugados en la molécula de β C podrían generar un estado fotoexcitado luego de la absorción de la radiación, el cual sería capaz de clivar el ADN por transferencia de electrones, abstracción de hidrogeno y/o generación de oxígeno singlete.
- ✓ Cao *et al.* evaluaron la capacidad de la Ha y sus derivados 9-sustituidos de inducir daños (ruptura del enlace fosfodiéster que, denominaremos indistintamente como clivaje o corte de simple cadena) en el ADN bajo irradiación. Los resultados obtenidos mostraron que existe una dependencia del daño fotoinducido al ADN con la naturaleza y posición de los sustituyentes. Aquellos compuestos con sustituyentes que ceden electrones poseen una mayor capacidad de fotoclivaje, mientras que los sustituyentes atractores de electrones disminuyen esta propiedad [163].
- ✓ García-Zubiri *et al.*[164] investigaron el fotoclivaje de la molécula de ADN por la β CMAM, incubando las muestras por 12 horas a 25 °C en presencia de luz. Como resultado final observaron la ausencia de cortes en las cadenas de ADN.
- ✓ Asimismo, Gonzalez *et al.* pusieron de manifiesto la capacidad que presentan ciertas β Cs para actuar como agentes fotosensibilizadores del ADN[159,165] y sus componentes.[161] En dichos trabajos, se demostró que la magnitud del daño producido en el ADN plasmídico luego de la irradiación fotosensibilizada es mayor a pH ácido que a pH alcalino. Es decir, las formas protonadas (β CH⁺), son mejores fotosensibilizadores del ADN que las correspondientes formas neutras (β CN). Esta tendencia fue explicada teniendo en cuenta que, independientemente de la condición de pH, los principales procesos fotofísicos y fotoquímicos ocurren desde el primer estado electrónico excitado singlete de las formas protonadas ($[^1\beta$ CH⁺]*).[114,137] El hecho de que la magnitud del daño fotoinducido sea menor en medio alcalino, concuerda con que en esta condición de pH sólo la fracción de la especie $[^1\beta$ CN]* que se protona, es capaz de dar lugar al proceso fotosensibilizado.

A su vez, los estudios cinéticos en presencia de secuestradores de EROs demostraron que dichas especies reactivas no participan en el mecanismo de daño, y que

por tanto, el corte en una simple cadena (CSC) del ADN se produce por un mecanismo Tipo I (transferencia de electrones) a partir de la especie [$^1\beta\text{CH}^+$]*.

Además, al estudiar la potencia relativa de un grupo de βCs como fotosensibilizadores de ADN plasmídico, los autores obtuvieron la siguiente tendencia: $n\text{Ho} \sim \text{Ho} < 9\text{-Me-nHo} \sim 9\text{-Me-Ho} < \text{Ha}$. Adjudicaron el orden observado a tres factores, a su vez modulados por el pH del medio: **(i)** las diferentes propiedades fotofísicas de cada compuesto, **(ii)** las diferencias en las capacidad de interacción-unión de cada βC al ADN y **(iii)** la presencia de vías fotoquímicas adicionales tales como, foto-oxidaciones de bases y/o formación de dímeros de timidina inducidas, selectivamente, por el fotosensibilizador. En virtud de este último punto, el análisis de los fotoproductos obtenidos en el ADN demostró la presencia de modificaciones oxidativas en las bases, sitios de pérdidas de bases y cortes en simple cadena. Solamente en el caso en que la Ha se utilizó como fotosensibilizador, se detectaron dímeros de timina. Los autores argumentan que dicha βC es la única de las estudiadas que cumple con las condiciones energéticas necesarias, desde el punto de vista termodinámico, para inducir este tipo de lesión. Es decir, la energía del estado triplete excitado de la HaH^+ es lo suficientemente alta como para inducir (vía transferencia de energía al estado triplete de las bases de timinas que conforman el ADN) la formación de dímeros de timina ($\text{T} \leftrightarrow \text{T}$).

✓ En una publicación reciente, Vignoni *et al.* [112], compararon el perfil de daño del ADN fotosensibilizado por ciertas βCs , en condiciones intra y extracelulares. Los resultados obtenidos demostraron que el daño al ADN celular fue 5 veces menor al producido sobre ADN extracelular debido al *quenching* eficiente de la βC fotoexcitada con componentes celulares (proteínas, etc). Además, el perfil de daño encontrado fue diferente: se hallaron modificaciones oxidativas de purinas y sitios apurínicos/apirimidínicos en ambas condiciones, pero los cortes en simple cadena y dímeros de timina sólo en las irradiaciones realizadas con “ADN desnudo”. En el caso de daño al ADN intracelular, la ausencia de CSC fue explicada como consecuencia de su reparación rápida ($t_{1/2}$ menor que 5 minutos) que tiene lugar antes de que pueda hacerse el análisis, mientras que la ausencia de los dímeros de timina fue explicada por la desactivación intracelular de las βCs en su estado S_1 o T_1 , y por lo tanto, menor rendimiento cuántico de estado triplete (estado del cual ocurre exclusivamente la transferencia de energía que lleva a la formación de los dichos dímeros). Además, la interacción βC -ADN que determina la eficiencia de la transferencia de energía triplete-triplete, debe ser más débil en las células que para el ADN extracelular.

El mismo trabajo describe, además, que Ha y 9-Me-Ha son capaces de inhibir la proliferación de células V79 en cultivo y de inducir la formación de micronúcleos bajo irradiación con luz UVA.

La información presentada en los párrafos anteriores se condensa en la siguiente figura:

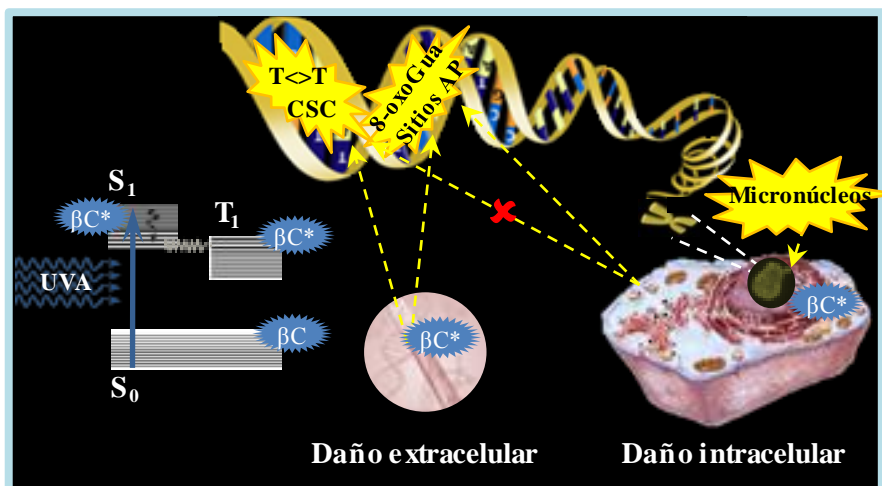


Figura 1.8. Las βC en estado excitado (βC^*) fotosensibilizan al ADN y se obtienen diferentes fotoproductos según las condiciones experimentales. En la irradiación del ADN extracelular (o “ADN desnudo”), se generan mayormente modificaciones oxidativas tales como 8-oxo-guanosina (8-oxo-Gua), sitiosapurínicos/apirimidínicos o de pérdidas de bases (sitios AP) y cortes en simple cadena (CSC). Algunas βC son capaces de formar, además, dímeros de timina ($T \leftrightarrow T$). En condiciones intracelulares, no se observa la formación de CSC y $T \leftrightarrow T$. Fuente: referencia.[112]

1.6. Referencias

1. Caprasse M, Coune C, Angenot L. Isolement et structure de trois bases anhydronium du *Strychnos usambarensis* du Rwanda. *Journal de Pharmacie de Belgique* 1983;38:135-139
2. Hemmateenejad B, Abbaspour A, Maghami H, Miri R, Panjehshahin MR. Partial least squares-based multivariate spectral calibration method for simultaneous determination of beta-carboline derivatives in *Peganum harmala* seed extracts. *Analytica chimica acta* 2006;575:290-299
3. Barker SA, Harrison REW, Monti JA, Brown GB, Christian ST. Identification and quantification of 1, 2, 3, 4-tetrahydro- β -carboline, 2-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro- β -carboline, and 6-methoxy-1, 2, 3, 4-tetrahydro- β -carboline as in vivo constituents of rat brain and adrenal gland. *Biochemical pharmacology* 1981;30:9-17
4. Honecker H, Coper H, Fährndrich C, Rommelspacher H. Identification of tetrahydronorharmane (tetrahydro- β -carboline) in human blood platelets. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 1980;18:133-136
5. Siderhurst MS, James DM, Rithner CD, Dick DL, Bjostad LB. Isolation and characterization of norharmane from *Reticulitermes* termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of economic entomology* 2005;98:1669-1678
6. Larsen LK, Moore RE, Patterson GML. β -Carbolines from the blue-green alga *Dichothrix baueriana*. *Journal of Natural Products* 1994;57:419-421
7. Torreilles J, Guerin MC, Previero A. [Simple compounds with high pharmacologic potential: beta-carbolines. Origins, syntheses, biological properties]. *Biochimie* 1985;67:929-947
8. Adachi J, Mizoi Y, Naito T, et al. Identification of tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid in foodstuffs, human urine and human milk. *J Nutr* 1991;121:646-652
9. Breyer-Pfaff U, Wiatr G, Stevens I, et al. Elevated norharman plasma levels in alcoholic patients and controls resulting from tobacco smoking. *Life Sci* 1996;58:1425-1432
10. Manabe S, Yuan J, Takahashi T, Urban RC, Jr. Age-related accumulation of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline-3- carboxylic acid in human lens. *Exp Eye Res* 1996;63:179-186
11. Pari K, Sundari CS, Chandani S, Balasubramanian D. β -carbolines that accumulate in human tissues may serve a protective role against oxidative stress. *J Biol Chem* 2000;275:2455-2462
12. Fekkes D, Tuiten A, Bom I, Pepplinkhuizen L. Tryptophan: a precursor for the endogenous synthesis of norharman in man. *Neurosci Lett* 2001;303:145-148
13. Spijkerman R, van den Eijnden R, van de Mheen D, Bongers I, Fekkes D. The impact of smoking and drinking on plasma levels of norharman. *Eur Neuropsychopharmacol* 2002;12:61-71

14. Pfau W, Skog K. Exposure to β -carbolines norharman and harman. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;802:115-126
15. Kam T-S, Sim K-M. Alkaloids from *Kopsia griffithii*. *Phytochemistry* 1998;47:145-147
16. Kam T-S, Sim K-M, Koyano T, Komiyama K. Leishmanicidal alkaloids from *Kopsia griffithii*. *Phytochemistry* 1999;50:75-79
17. Downum KR. Light-activated plant defence. *New Phytologist* 1992;122:401-420
18. Rashid MA, Gustafson KR, Boyd MR. New Cytotoxic N-Methylated β -Carboline Alkaloids from the Marine Ascidian *Eudistoma gilboverde*. *Journal of Natural Products* 2001;64:1454-1456
19. Kearns PS, Coll JC, Rideout JA. A β -Carboline Dimer from an Ascidian, *Didemnum* sp. *Journal of Natural Products* 1995;58:1075-1076
20. Stachel SJ, Stockwell SA, Van Vranken DL. The fluorescence of scorpions and cataractogenesis. *Chemistry & biology* 1999;6:531-539
21. Fattorusso E, Tagliatela-Scafati O. *Modern alkaloids: structure, isolation, synthesis, and biology*: John Wiley & Sons; 2008
22. Rinehart Jr KL, Kobayashi J, Harbour GC, et al. Eudistomins A-Q, beta-carbolines from the antiviral Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*. *Journal of the American Chemical Society* 1987;109:3378-3387
23. Kobayashi J, Harbour GC, Gilmore J, Rinehart Jr KL. Eudistomins A, D, G, H, I, J, M, N, O, P, and Q, bromo, hydroxy, pyrrolyl and iminoazepino. beta-carbolines from the antiviral Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*. *Journal of the American Chemical Society* 1984;106:1526-1528
24. Stöckigt J, Antonchick AP, Wu F, Waldmann H. The Pictet-Spengler reaction in nature and in organic chemistry. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50:8538-8564
25. Maresh JJ, Giddings L-A, Friedrich A, et al. Strictosidine synthase: mechanism of a Pictet-Spengler catalyzing enzyme. *Journal of the American Chemical Society* 2008;130:710-723
26. Mori T, Hoshino S, Sahashi S, et al. Structural Basis for β -Carboline Alkaloid Production by the Microbial Homodimeric Enzyme McbB. *Chemistry & biology*, 2015, 22:898-906
27. Cox ED, Cook JM. The Pictet-Spengler condensation: a new direction for an old reaction. *Chemical reviews* 1995;95:1797-1842
28. Herraiz T, Galisteo J. Naturally-occurring tetrahydro- β -carboline alkaloids derived from tryptophan are oxidized to bioactive β -carboline alkaloids by heme peroxidases. *Biochemical and biophysical research communications*, 2014, 451:42-47
29. Gross GA, Turesky RJ, Fay LB, et al. Heterocyclic aromatic amine formation in grilled bacon, beef and fish and in grill scrapings. *Carcinogenesis* 1993;14:2313-2318
30. Totsuka Y, Ushiyama H, Ishihara J, et al. Quantification of the co-mutagenic β -carbolines, norharman and harman, in cigarette smoke condensates and cooked foods. *Cancer letters* 1999;143:139-143
31. Herraiz T, Guillén H, Arán VJ. Oxidative metabolism of the bioactive and naturally occurring β -carboline alkaloids, norharman and harman, by human cytochrome P450 enzymes. *Chemical research in toxicology* 2008;21:2172-2180
32. Cao R, Peng W, Wang Z, Xu A. β -Carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions. *Current medicinal chemistry* 2007;14:479-500
33. Moura DJ, Richter MF, Boeira JM, Henriques JAP, Saffi J. Antioxidant properties of β -carboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities. *Mutagenesis* 2007;22:293-302
34. Herraiz T, Galisteo J. Hydroxyl radical reactions and the radical scavenging activity of β -carboline alkaloids. *Food chemistry*, 2015, 172:640-649
35. Gonzalez MM. Piridoindoles naturales (β -carbolineas) y sintéticos como fotosensibilizadores en procesos de interés biológico. Estudio de su fotoquímica en solución acuosa. Tesis Doctoral 2012
36. Mercader AG, Duchowicz PR, Fernández FM, et al. Predictive modeling of the total deactivation rate constant of singlet oxygen by heterocyclic compounds. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 2009;28:12-19
37. Rasse-Suriani FA, Paula Denofrio M, Yanuk JG, et al. Chemical and photochemical properties of chloroharmine derivatives in aqueous solutions. *Phys Chem Chem Phys*, 2016, 18:886-900
38. Funayama Y, Nishio K, Wakabayashi K, et al. Effects of β - and γ -carboline derivatives on DNA topoisomerase activities. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1996;349:183-191
39. Sobhani AM, Ebrahimi S-A, Mahmoudian M. An In vitro evaluation of human DNA topoisomerase I inhibition by *Peganum harmala* L. seeds extract and its β -Carboline alkaloids. *J Pharm Pharm Sci* 2002;5:19-23
40. Cao R, Peng W, Chen H, et al. DNA binding properties of 9-substituted harmine derivatives. *Biochemical and biophysical research communications* 2005;338:1557-1563
41. Herraiz T, Chaparro C. Human monoamine oxidase enzyme inhibition by coffee and β -carbolines norharman and harman isolated from coffee. *Life sciences* 2006;78:795-802
42. May T, Rommelspacher H, Pawlik M. [3 H] Harman binding experiments. I: a reversible and selective radioligand for monoamine oxidase subtype A in the CNS of the rat. *Journal of neurochemistry* 1991;56:490-499
43. Rommelspacher H, May T, Salewski B. Harman (1-methyl- β -carboline) is a natural inhibitor of monoamine oxidase type A in rats. *European journal of pharmacology* 1994;252:51-59
44. Rommelspacher H, Meier-Henco M, Smolka M, Kloft C. The levels of norharman are high enough after smoking to affect monoamineoxidase B in platelets. *European journal of pharmacology* 2002;441:115-125
45. Kim H, Sablin SO, Ramsay RR. Inhibition of monoamine oxidase A by β -carboline derivatives. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1997;337:137-142
46. Song Y, Wang J, Teng SF, et al. β -Carbolines as specific inhibitors of cyclin-Dependent kinases. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2002;12:1129-1132

47. Song Y, Kesuma D, Wang J, et al. Specific inhibition of cyclin-dependent kinases and cell proliferation by harmine. *Biochemical and biophysical research communications* 2004;317:128-132
48. Castro AC, Dang LC, Soucy F, et al. Novel IKK inhibitors: β -carbolines. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2003;13:2419-2422
49. Stephens DN, Schneider HH, Kehr W, et al. Modulation of anxiety by β -carbolines and other benzodiazepine receptor ligands: relationship of pharmacological to biochemical measures of efficacy. *Brain research bulletin* 1987;19:309-318
50. Aricioglu F, Altunbas H. Harmane Induces Anxiolysis and Antidepressant-Like Effects in Rats. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003;1009:196-201
51. Farzin D, Mansouri N. Antidepressant-like effect of harmane and other β -carbolines in the mouse forced swim test. *European Neuropsychopharmacology* 2006;16:324-328
52. Aricioglu F, Yillar O, Korcegez E, Berkman K. Effect of harmane on the convulsive threshold in epilepsy models in mice. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003;1009:190-195
53. Husbands SM, Glennon RA, Gorgerat S, et al. β -carboline binding to imidazoline receptors. *Drug and alcohol dependence* 2001;64:203-208
54. Robinson ESJ, Anderson NJ, Crosby J, Nutt DJ, Hudson AL. Endogenous β -Carbolines as Clonidine-Displacing Substances. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003;1009:157-166
55. Musgrave IF, Badoer E. Harmane produces hypotension following microinjection into the RVLM: possible role of I1-imidazoline receptors. *British journal of pharmacology* 2000;129:1057-1059
56. Sánchez-Blázquez P, Boronat MA, Olmos G, García Sevilla JA, Garzón J. Activation of I2-imidazoline receptors enhances supraspinal morphine analgesia in mice: a model to detect agonist and antagonist activities at these receptors. *British journal of pharmacology* 2000;130:146-152
57. Aricioglu F, Korcegez E, Ozyalcin S. Effect of harmane on mononeuropathic pain in rats. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003;1009:180-184
58. Chen X, Cromer BA, Lynch JW. Molecular determinants of β -carboline inhibition of the glycine receptor. *Journal of neurochemistry* 2009;110:1685-1694
59. Touiki K, Rat P, Molimard R, Chait A, de Beaurepaire R. Harmane inhibits serotonergic dorsal raphe neurons in the rat. *Psychopharmacology* 2005;182:562-569
60. Yang YJ, Lee JJ, Jin CM, Lim SC, Lee MK. Effects of harman and norharman on dopamine biosynthesis and L-DOPA-induced cytotoxicity in PC12 cells. *European journal of pharmacology* 2008;587:57-64
61. Wernicke C, Schott Y, Enzensperger C, et al. Cytotoxicity of β -carbolines in dopamine transporter expressing cells: Structure-activity relationships. *Biochemical pharmacology* 2007;74:1065-1077
62. Storch A, Hwang YI, Gearhart DA, et al. Dopamine transporter-mediated cytotoxicity of β -carbolinium derivatives related to Parkinson's disease: relationship to transporter-dependent uptake. *Journal of neurochemistry* 2004;89:685-694
63. Rook Y, Schmidtke K-U, Gaube F, et al. Bivalent β -carbolines as potential multitarget anti-Alzheimer agents. *Journal of medicinal chemistry*;53:3611-3617
64. Hans G, Malgrange B, Lallemand F, et al. β -carbolines induce apoptosis in cultured cerebellar granule neurons via the mitochondrial pathway. *Neuropharmacology* 2005;48:105-117
65. Collins MA, Neafsey EJ, Matsubara K, Cobuzzi RJ, Rollema H. Indole-N-methylated β -carbolinium ions as potential brain-bioactivated neurotoxins. *Brain research* 1992;570:154-160
66. Matsubara K, Kobayashi S, Kobayashi Y, et al. beta-Carbolinium cations, endogenous MPP plus analogs, in the lumbar cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *Neurology* 1995;45:2240-2245
67. Albores R, Neafsey EJ, Drucker G, Fields JZ, Collins MA. Mitochondrial respiratory inhibition by N-methylated beta-carboline derivatives structurally resembling N-methyl-4-phenylpyridine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1990;87:9368-9372
68. Kuhn W, Müller TH, Große H, Rommelspacher H. Elevated levels of harman and norharman in cerebrospinal fluid of parkinsonian patients. *Journal of neural transmission* 1996;103:1435-1440
69. Kuhn W, Müller T, Grosse H, Dierks T, Rommelspacher H. Plasma levels of the β -carbolines harman and norharman in Parkinson's disease. *Acta neurologica scandinavica* 1995;92:451-454
70. Matsubara K, Aoyama K, Suno M, Awaya T. N-methylation underlying Parkinson's disease. *Neurotoxicology and teratology* 2002;24:593-598
71. Pavlovic S, Schulze G, Wernicke C, et al. 2, 9-Dimethyl- β -carbolinium, a neurotoxin occurring in human brain, is a potent inducer of apoptosis as 1-methyl-4-phenylpyridinium. *Neuroscience* 2006;139:1525-1537
72. Collins MA, Neafsey EJ. in *Neurotoxic Factors in Parkinson's Disease and Related Disorders*. Ed A Storch and M A Collins, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York 2000:115-129
73. Polanski W, Reichmann H, Gille G. Stimulation, protection and regeneration of dopaminergic neurons by 9-methyl- β -carboline: a new anti-Parkinson drug? *Expert review of neurotherapeutics*, 2011, 11:845-860
74. Totsuka Y, Takamura-Enya T, Nishigaki R, Sugimura T, Wakabayashi K. Mutagens formed from β -carbolines with aromatic amines. *Journal of chromatography B* 2004;802:135-141
75. de Meester C. Genotoxic potential of β -carbolines: a review. *Mutat Res* 1995;339:139-153
76. Chang CC, Castellazzi M, Glover TW, Trosko JE. Effects of harman and norharman on spontaneous and ultraviolet light-induced mutagenesis in cultured Chinese hamster cells. *Cancer Res* 1978;38:4527-4533
77. Ishida J, Wang H-K, Bastow KF, Hu C-Q, Lee K-H. Antitumor agents 201. 1 Cytotoxicity of harmine and β -carboline analogs. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 1999;9:3319-3324
78. Cao R, Chen Q, Hou X, et al. Synthesis, acute toxicities, and antitumor effects of novel 9-substituted β -carboline derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2004;12:4613-4623
79. Xiao S, Lin W, Wang C, Yang M. Synthesis and biological evaluation of DNA targeting flexible side-chain substituted β -carboline derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2001;11:437-441

80. Jiang W-Q, Charlet-Fagnère C, Sapi J, et al. Cytotoxic Bis-3,4-dihydro- β -carbolines and Bis- β -carbolines. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 2002;17:369-374
81. Boursereau Y, Coldham I. Synthesis and biological studies of 1-amino β -carbolines. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2004;14:5841-5844
82. Shen Y-C, Chen C-Y, Hsieh P-W, et al. The Preparation and Evaluation of 1-Substituted 1,2,3,4-Tetrahydro- and 3,4-Dihydro-BETA-carboline Derivatives as Potential Antitumor Agents. *Chemical and pharmaceutical bulletin* 2005;53:32-36
83. Al-Allaf TAK, Rashan LJ. Synthesis and cytotoxic evaluation of the first trans-palladium (II) complex with naturally occurring alkaloid harmine. *European journal of medicinal chemistry* 1998;33:817-820
84. Al-Allaf TAK, Ayoub MT, Rashan LJ. Synthesis and characterization of novel biologically active platinum (II) and palladium (II) complexes of some β -carboline alkaloids. *Journal of inorganic biochemistry* 1990;38:47-56
85. Guan H, Chen H, Peng W, et al. Design of β -carboline derivatives as DNA-targeting antitumor agents. *European journal of medicinal chemistry* 2006;41:1167-1179
86. Zhao M, Bi L, Wang W, et al. Synthesis and cytotoxic activities of β -carboline amino acid ester conjugates. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2006;14:6998-7010
87. Cao R, Chen H, Peng W, et al. Design, synthesis and in vitro and in vivo antitumor activities of novel β -carboline derivatives. *European journal of medicinal chemistry* 2005;40:991-1001
88. Cao R, Fan W, Guo L, et al. Synthesis and structure-activity relationships of harmine derivatives as potential antitumor agents. *European journal of medicinal chemistry*, 2013, 60:135-143
89. Li Y, Zuo GY. Advances in studies on antimicrobial activities of alkaloids. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2010, 41:1006-1014
90. Formagio ASN, Santos PR, Zanolli K, et al. Synthesis and antiviral activity of β -carboline derivatives bearing a substituted carbonylhydrazide at C-3 against poliovirus and herpes simplex virus (HSV-1). *European journal of medicinal chemistry* 2009;44:4695-4701
91. Gonzalez MM, Cabrerizo FM, Vizoso-Pinto MG. Actividad antiviral de nuevos derivados de β -carbolinas contra virus Herpes simplex (VHS) Jornadas de Jóvenes Investigadores UNT 2012
92. Gonzalez MM, Baiker A, Erra-Balsells R, et al. Monitoreo masivo y caracterización de la actividad antiviral de nuevos derivados de β -carbolinas sintéticos. XXXIII Reunión Científica Anual de la SAV, Buenos Aires, Argentina 2013
93. Arshad N, Zitterl-Eglseer K, Hasnain S, Hess M. Effect of Peganum harmala or its β -carboline alkaloids on certain antibiotic resistant strains of bacteria and protozoa from poultry. *Phytotherapy Research* 2008;22:1533-1538
94. Nenaah G. Antibacterial and antifungal activities of (beta)-carboline alkaloids of Peganum harmala (L) seeds and their combination effects. *Fitoterapia*, 2010, 81:779-782
95. Shin HJ, Lee H-S, Lee D-S. The synergistic antibacterial activity of 1-acetyl-beta-carboline and beta-lactams against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Journal of microbiology and biotechnology*; 2010, 20:501-505
96. Saify ZS, Farhad J, Mushtaq N, et al. Antibacterial activity of 1-methyl-7-methoxy-beta-carboline and its phenacyl and coumarine analogues. *Pak J Pharm Sci* 2005;18:39-41
97. Di Giorgio C, Delmas F, Ollivier E, et al. In vitro activity of the β -carboline alkaloids harmine, harmine, and harmaline toward parasites of the species Leishmania infantum. *Experimental parasitology* 2004;106:67-74
98. Mishra BB, Singh RK, Srivastava A, Tripathi VJ, Tiwari VK. Fighting against leishmaniasis: search of alkaloids as future true potential anti-leishmanial agents. *Mini reviews in medicinal chemistry* 2009;9:107-123
99. Lala S, Pramanick S, Mukhopadhyay S, Bandyopadhyay S, Basu MK. Harmine: evaluation of its antileishmanial properties in various vesicular delivery systems. *Journal of Drug Targeting* 2004;12:165-175
100. Gellis A, Dumètre Al, Hutter Sb, et al. Preparation and antiprotozoal evaluation of promising β -carboline alkaloids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*; 2012, 66:339-347
101. McKenna DJ. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges. *Pharmacology & therapeutics* 2004;102:111-129
102. Tonin LTDs, Panice MR, Nakamura CV, et al. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of novel N-alkyl-(1-phenylsubstituted- β -carboline)-3-carboxamides. *Biomedicine & Pharmacotherapy*;64:386-389
103. Valdez RH, Tonin LTDs, Ueda-Nakamura Tn, et al. Biological activity of 1, 2, 3, 4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamides against Trypanosoma cruzi. *Acta tropica* 2009;110:7-14
104. Satou T, Horiuchi A, Akao N, et al. Toxocara canis: Search for a potential drug amongst β -carboline alkaloids- in vitro and mouse studies. *Experimental parasitology* 2005;110:134-139
105. Alomar ML, Rasse-Suriani FAO, Ganuza A, et al. In vitro evaluation of β -carboline alkaloids as potential anti-Toxoplasma agents. *BMC research notes*;6:193
106. Alomar ML, Rasse-Suriani FAO, M. CF, Angel SO. Evaluación de la capacidad antiparasitaria de nuevos derivados de β -carbolinas en Toxoplasma gondii. Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología y Enfermedades Parasitarias, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina 2012
107. Alomar ML. Análisis de nuevas drogas contra la toxoplasmosis y caracterización de un nuevo blanco terapeutico.. Tesis Doctoral 2013
108. Yañuk JG, Coceres V, Rasse-Suriani FAO, Angel SO, Cabrerizo FM. Análisis comparativo del efecto de la radiación UV-C, UV-A y visible en la atenuación de taquizoítos de Toxoplasma gondii. XI Encuentro Latinoamericano de Fotoquímica y Fotobiología (XI ELAFOT) 2012
109. Hudson JB, Graham EA, Towers GH. Antiviral effect of harmine, a photoactive beta-carboline alkaloid. *Photochem Photobiol* 1986;43:21-26
110. Hudson JB, Graham EA, Fong R, Hudson LL, Towers GH. Further studies on the antiviral activity of harmine, a photoactive beta-carboline alkaloid. *Photochem Photobiol* 1986;44:483-487

111. Mori T, Nakagawa A, Kobayashi N, et al. 3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1) sensitizes mammalian cells to UV radiation by causing the S-phase arrest, not by inhibiting the repair of DNA damage as observed in *Escherichia coli*. *J Radiat Res* 1998;39:21-33
112. Vignoni M, Erra-Balsells R, Epe B, Cabrerizo FM. Intra- and extra-cellular DNA damage by harmine and 9-methyl-harmine. *J Photochem Photobiol B*; 2014, 132:66-71
113. Vignoni M, Rasse-Suriani FA, Butzbach K, et al. Mechanisms of DNA damage by photoexcited 9-methyl-beta-carbolines. *Org Biomol Chem*; 2013, 11:5300-5309
114. Gonzalez MM, Arnbjerg J, Denofrio MP, et al. One- and two-photon excitation of beta-carbolines in aqueous solution: pH-dependent spectroscopy, photochemistry, and photophysics. *J Phys Chem A* 2009;113:6648-6656
115. Sakurovs R, Ghiggino KP. Excited state proton transfer in β -carboline. *Journal of Photochemistry* 1982;18:1-8
116. Wolfbeis OS, Furlinger E, Wintersteiger R. Solvent- and pH-dependence of the absorption and fluorescence spectra of harman: Detection of three ground state and four excited state species. *Monatshefte fur Chemie/Chemical Monthly* 1982;113:509-517
117. Balon M, Munoz MA, Hidalgo J, Carmona MC, Sanchez M. Fluorescence characteristics of β -carboline alkaloids in highly concentrated hydroxide solutions. *Journal of Photochemistry* 1987;36:193-204
118. Hidalgo J, Carmona C, Balon M, Munoz MA. Fluorescence of harmol, harmalol and 2-hydroxycarbazole in concentrated hydroxide solutions. *Pharm Weekbl Sci* 1990;12:142-144
119. Baln M, Hidalgo J, Guardado P, Muñoz MA, Carmona C. Acid-base and spectral properties of beta-carbolines. Part 1. Tetrahydro-beta-carbolines. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* 1993:91-97
120. Baln M, Hidalgo J, Guardado P, Muñoz MA, Carmona C. Acid-base and spectral properties of beta-carbolines. Part 2. Dehydro and fully aromatic beta-carbolines. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* 1993:99-104
121. Varela AP, Burrows HD, Douglas P, da Graa Miguel M. Triplet state studies of β -carbolines. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2001;146:29-36
122. Draxler S, Lippitsch ME. Excited-state acid-base kinetics and equilibria in norharman. *The Journal of Physical Chemistry* 1993;97:11493-11496
123. Wolfbeis OS, Furlinger E. The pH-Dependence of the Absorption and Fluorescence Spectra of Harmine and Harmol: Drastic Differences in the Tautomeric Equilibria of Ground and First Excited Singlet State. *Zeitschrift fur Physikalische Chemie* 1982;129:171-183
124. Vert FT, Sanchez IZ, Torrent AO. Acidity constants of β -carbolines in the ground and excited singlet states. *Journal of Photochemistry* 1983;23:355-368
125. Berto JR, Sanchez IZ, Reverte JMA, Vert FT, Torrent AO. Fluorescence and phosphorescence of aromatic beta-carbolines on dispersed solid phase at 77 K and room temperatures. *Journal of Photochemistry* 1985;29:405-413
126. Dias A, Varela AP, Miguel MdG, Macanita AL, Becker RS. β -Carboline photosensitizers. 1. Photophysics, kinetics and excited-state equilibria in organic solvents, and theoretical calculations. *The Journal of Physical Chemistry* 1992;96:10290-10296
127. Aull JM, Vert FT. Estudio terico del espectro electrónico de β -carbolicinas aromáticas. *An Quim* 1979;75:6
128. Reyman D, Vinas MH, Poyato JML, Pardo A. Proton transfer dynamics of norharman in organic solvents. *The Journal of Physical Chemistry A* 1997;101:768-775
129. Varela AP, Miguel MdG, Macanita AL, Burrows HD, Becker RS. β -Carboline Photosensitizers. 3. Studies on Ground and Excited State Partitioning in AOT/Water/Cyclohexane Microemulsions. *The Journal of Physical Chemistry* 1995;99:16093-16100
130. Biondic MC, Erra-Balsells R. Photochemical reaction of full-aromatic \hat{P} -carbolines in halomethanes 2. CHCl_3 : Electronic spectra and kinetics. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 1994;77:149-159
131. Biondic MC, Erra-Balsells R. Photochemical reaction of harmaline. Part 1. Electronic spectra. *J Chem Soc, Perkin Trans 2* 1992:1049-1058
132. Tapia MJ, Reyman D, Vinas MH, Arroyo A, Poyato JML. An experimental and theoretical approach to the acid-base and photophysical properties of 3-substituted β -carbolines in aqueous solutions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2003;156:1-7
133. Carmona C, Galán M, Angulo G, et al. Ground and singlet excited state hydrogen bonding interactions of betacarbolines. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2000;2:5076-5083
134. Carmona C, Baln M, Galán M, et al. Kinetic study of hydrogen bonded exciplex formation of N9-methyl harmane. *The Journal of Physical Chemistry A* 2001;105:10334-10338
135. Pardo A, Reyman D, Poyato JML, Medina F. Some β -carboline derivatives as fluorescence standards. *Journal of luminescence* 1992;51:269-274
136. Ghiggino KP, Skilton PF, Thistlethwaite PJ. β -Carboline as a fluorescence standard. *Journal of Photochemistry* 1985;31:113-121
137. Gonzalez MM, Salum ML, Gholipour Y, Cabrerizo FM, Erra-Balsells R. Photochemistry of norharmane in aqueous solution. *Photochem Photobiol Sci* 2009;8:1139-1149
138. Mesaros M, Tarzi OI, Erra-Balsells R, Bilmes GM. The photophysics of some UV-MALDI matrices studied by using spectroscopic, photoacoustic and luminescence techniques. *Chemical physics letters* 2006;426:334-340
139. Biondic MC, Erra-Balsells R. Photochemical behaviour of β -carbolines. Part 4.1 acid-base equilibria in the ground and excited states in organic media. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* 1997:1323-1328
140. Montaldi MCA, Prodi L, Gandolfi MT. *Handbook of photochemistry*, 3rd ed. CRC Taylor & Francis Group 2006; cap 6
141. Parker CA. *Photoluminescence of Solutions*. Elsevier Publishing Company 1968; Amsterdam

142. Pardo A, Reyman D, Poyato JML, Martin E, Camacho JJ. Experimental and theoretical radiative lifetimes for some β -carboline derivatives. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 1988;45:207-214
143. Mousa SA, Douglas P, Burrows HD, Fonseca SM. Fluorescence quenching of protonated beta-carbolines in water and microemulsions: evidence for heavy-atom and electron-transfer mechanisms. *Photochem Photobiol Sci*; 2013, 12:1606-1614
144. Pardo A, Reyman D, Martin E, et al. Quantum yield and fluorescence lifetime measurements of neutral and cationic species for six β -carboline derivatives. *Journal of luminescence* 1988;42:163-168
145. Reyman D, Vinas MH, Tardajos G, Mazario E. The Impact of Dihydrogen Phosphate Anions on the Excited-State Proton Transfer of Harmane. Effect of β -Cyclodextrin on These Photoreactions. *The Journal of Physical Chemistry A*; 2012, 116:207-214
146. Berenbaum MR, Lee K. Toxicity of nonhost phototoxins to parsnip webworms (Lepidoptera: Oecophoridae). *Chemoecology* 1990;1:81-85
147. Becker RS, Ferreirar LFV, Elisei F, Machado I, Latterini L. Comprehensive Photochemistry and Photophysics of Land-and Marine-based β -carbolines Employing Time-resolved Emission and Flash Transient Spectroscopy. *Photochemistry and photobiology* 2005;81:1195-1204
148. Egorov S, Babizhaev MA, Krasnovskii Jr AA, Shvedova AA. [Photosensitized generation of singlet molecular oxygen by endogenous substances of the eye lens]. *Biofizika* 1986;32:169-171
149. Wilkinson F, Helman WP, Ross AB. Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *Journal of physical and chemical reference data* 1993;22:113-262
150. Egorov SY, Krasnovsky Jr AA. Laser-induced luminescence of singlet molecular oxygen: generation by drugs and pigments of biological importance. In, Moscow-DL tentative: International Society for Optics and Photonics; 1991:611-621
151. Cabrerizo FM, Arnbjerg J, Denofrio MP, Erra-Balsells R, Ogilby PR. Fluorescence quenching by oxygen: "Debunking" a classic rule. *ChemPhysChem*; 2010, 11:796-798
152. Wilkinson F, Helman WP, Ross AB. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *Journal of physical and chemical reference data* 1995;24:663-677
153. Bosio GN, Breitenbach T, Parisi J, et al. Antioxidant β -carotene does not quench singlet oxygen in mammalian cells. *Journal of the American Chemical Society*; 2013, 135:272-279
154. García Zubiri IX, Burrows HD, Sergio Seixas de Melo J, et al. Effects of the Interaction Between β -Carboline-3-carboxylic acid N-Methylamide and Polynucleotides on Singlet Oxygen Quantum Yield and DNA Oxidative Damage. *Photochemistry and photobiology* 2007;83:1455-1464
155. Taira ZK, S.; Dohara C, Ishida S, Matsumoto M, Sakiya Y. Intercalation of six β -carboline derivatives into DNA. *Jpn J Tox Env Health* 1997;43:83-91
156. Feigon J, Denny WA, Leupin W, Kearns DR. Interactions of antitumor drugs with natural DNA: proton NMR study of binding mode and kinetics. *Journal of medicinal chemistry* 1984;27:450-465
157. Nafisi S, Bonsaii M, Maali P, Khalilzadeh MA, Manouchehri F. β -Carboline alkaloids bind DNA. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*; 2010, 100:84-91
158. Shankaraiah N, Siraj KP, Nekkanti S, et al. DNA-binding affinity and anticancer activity of β -carboline-chalcone conjugates as potential DNA intercalators: molecular modelling and synthesis. *Bioorganic chemistry*;59:130-139
159. Gonzalez MM, Vignoni M, Pellon-Maison M, et al. Photosensitization of DNA by β -carbolines: kinetic analysis and photoproduct characterization. *Org Biomol Chem*; 2012, 10:1807-1819
160. Gonzalez MM, Rasse Suriani FAO, Roldán S, Erra-Balsells R, Cabrerizo FM. Norharmine, a naturally occurring photosensitizer: photooxidation of 2'-deoxyguanosine-5'-monophosphate. I Sao Paulo Advanced School on Redox Processes in Biomedicine and VII Meeting of South American Group of the SFRBM 2011;San Pedro, Brasil,
161. Gonzalez MM, Rasse-Suriani FA, Franca CA, et al. Photosensitized electron transfer within a self-assembled norharmine-2'-deoxyadenosine 5'-monophosphate (dAMP) complex. *Org Biomol Chem*; 2012, 10:9359-9372
162. Toshima K, Okuno Y, Nakajima Y, Matsumura S. β -Carboline-Carbohydrate hybrids: molecular design, chemical synthesis and evaluation of novel DNA photocleavers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2002;12:671-673
163. Cao R, Peng W, Chen H, et al. DNA binding properties of 9-substituted harmine derivatives. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:1557-1563
164. García-Zubiri IX, Burrows HD, Sérgio Seixas De Melo J, et al. Effects of the interaction between β -carboline-3-carboxylic acid N-methylamide and polynucleotides on singlet oxygen quantum yield and DNA oxidative damage. *Photochemistry and Photobiology* 2007;83:1455-1464
165. Gonzalez MM, Pellon-Maison M, Ales-Gandolfo MA, et al. Photosensitized cleavage of plasmidic DNA by norharmine, a naturally occurring beta-carboline. *Org Biomol Chem*; 2010, 8:2543-2552
166. Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological Defense Mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *The Journal of Clinical Investigation* 1973;52:741-744
167. Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical and Biomedical Aspects of Oxidative Modification* 2001;29:345-350
168. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of Cell Biology* 2011;194:7-15
169. Gonzalez MM, Arnbjerg J, Paula Denofrio M, et al. One- and two-photon excitation of β -carbolines in aqueous solution: pH-dependent spectroscopy, photochemistry, and photophysics. *Journal of Physical Chemistry A* 2009;113:6648-6656

170. Gonzalez MM, Salum ML, Gholipour Y, Cabrerizo FM, Erra-Balsells R. Photochemistry of norharmane in aqueous solution. *Photochemical & Photobiological Sciences* 2009;8:1139-1149
171. Cabrerizo FM, Arnbjerg J, Denofrio MP, Erra-Balsells R, Ogilby PR. Fluorescence quenching by oxygen: "Debunking" a classic rule. *ChemPhysChem* 2010;11:796-798
172. Vignoni M, Erra-Balsells R, Epe B, Cabrerizo FM. Intra- and extra-cellular DNA damage by harmine and 9-methyl-harmine. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2014;132:66-71
173. Martí C, Jürgens O, Cuenca O, Casals M, Nonell S. Aromatic ketones as standards for singlet molecular oxygen O₂(¹Δ_g) photosensitization. Time-resolved photoacoustic and near-IR emission studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 1996;97:11-18
174. Braslavsky SE, Kuhn HJ. Provisional List of Actinometers. IUPAC ed, IUPAC, Mülheim and der Ruhr 1987
175. Frederiksen PK, Jorgensen M, Ogilby PR. Two-photon photosensitized production of singlet oxygen. *J Am Chem Soc* 2001;123:1215-1221
176. Keszthelyi T, Weldon D, Andersen TN, et al. Radiative Transitions of Singlet Oxygen: New Tools, New Techniques and New Interpretations. *Photochemistry and Photobiology* 1999;70:531-539
177. Salomaa P, Schaleger LL, Long FA. Solvent Deuterium Isotope Effects on Acid-Base Equilibria. *Journal of the American Chemical Society* 1964;86:1-7
178. Martinez LA, Martinez CG, Klopotek BB, et al. Nonradiative and radiative deactivation of singlet molecular oxygen (O₂(¹Δ_g)) in micellar media and microemulsions. *J Photochem Photobiol B* 2000;58:94-107
179. Valduga G, Nonell S, Reddi E, Jori G, Braslavsky SE. The production of singlet molecular oxygen by zinc(II) phthalocyanine in ethanol and in unilamellar vesicles. Chemical quenching and phosphorescence studies. *Photochem Photobiol* 1988;48:1-5
180. R. V. Bensasson ESL, T. G. Trescott, 1983, Ed. Pergamon Press.
181. Nelson DL, Cox MM. Lehninger. Principles of Biochemistry. Omega, 3^o Ed 2001
182. Braslavsky SE. Glossary of terms used in photochemistry, (IUPAC Recommendations 2006). *Pure and Applied Chemistry* 2007;79:293-465
183. Scaiano JC. CRC handbook of organic photochemistry: CRC press; 1989
184. Dias A, Varela AP, da Graça Miguel M, et al. β-carbolines. 2. Rate constants of proton transfer from multiexponential decays in the lowest singlet excited state of harmine in water as a function of pH. *The Journal of Physical Chemistry* 1996;100:17970-17977.

Capítulo 2

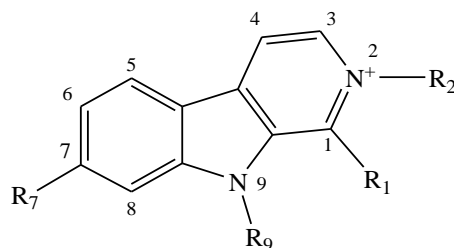
*Síntesis y caracterización química y fotoquímica de N-metil
 β -carbolinas. Estudios en solución acuosa*

2.1. Introducción

En el capítulo anterior se presentó la información actualmente disponible en la literatura relacionada con las propiedades fisicoquímicas y fotoquímicas, en solución acuosa, de un grupo reducido de βCs y derivados metilados. En el marco de los objetivos generales y de los intereses particulares de esta Tesis, la información disponible es aún escasa o nula, principalmente, en el caso de los derivados catiónicos metilados en la posición N-2 (cationes cuaternarios de tipo amonio).

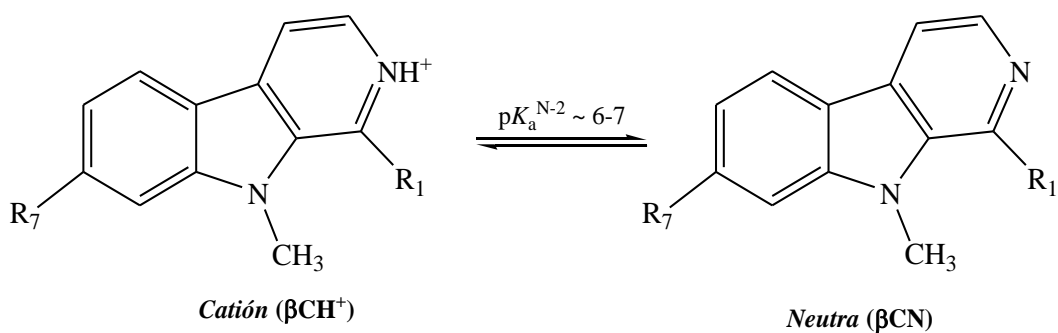
En este contexto, se comenzó con la síntesis y caracterización sistemática química y fotofísica de varios derivados metilados de βCs. En particular, se sintetizaron y caracterizaron N-metil derivados de nHo, Ho y Ha, sustituidos en las posiciones 2 y/o 9 (N-2 y/o N-9) (Esquema 2.1). Los procedimientos y etapas de síntesis y purificación seguidas se describen detalladamente en la sección 2.4.2. Cada compuesto obtenido fue caracterizado mediante espectroscopía de absorción UV-visible, de emisión fluorescente, RMN-¹H y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

En solución acuosa, la carga neta del alcaloide depende, principalmente, de la naturaleza química y posición de los sustituyentes y del pH del medio. En particular, las βCs naturales aromáticas nHo, Ho y Ha presentan dos grupos ionizables que se ponen en evidencia en el rango de pH comprendido entre 2 y 14 (Capítulo 1). Sin embargo, y tal como se desprende de su estructura química, los derivados que se estudiarán en este capítulo presentan el bloqueo de uno o ambos grupos nitrogenados ionizables debido a la formación del o de los enlaces N-CH₃ (Esquema 2.1). Así, aquellos derivados sustituidos en la posición 9 (N-9) solo presentan un único equilibrio ácido-base que involucra el nitrógeno piridínico (N-2) (Esquema 2.2), mientras que los derivados metilados en la posición 2 (N-2) presentan un único grupo funcional ionizable correspondiente al nitrógeno indólico (N-9) (Esquema 2.3). En este último caso, cabe aclarar que la especie zwitteriónica (βCZ) presenta un equilibrio tautomérico con su correspondiente base anhidra o forma quinónica (βCQ).[1] Ciertamente, la especie tautomérica predominante dependerá fuertemente de la polaridad del solvente. Así, en solventes altamente polares como el agua, dicho equilibrio tautomérico está fuertemente desplazado hacia la especie βCZ (Esquema 2.3). Tal como es de esperar, los derivados 2,9-di-metil sustituidos no presentan grupos ionizables en el intervalo completo de pH anteriormente indicado.

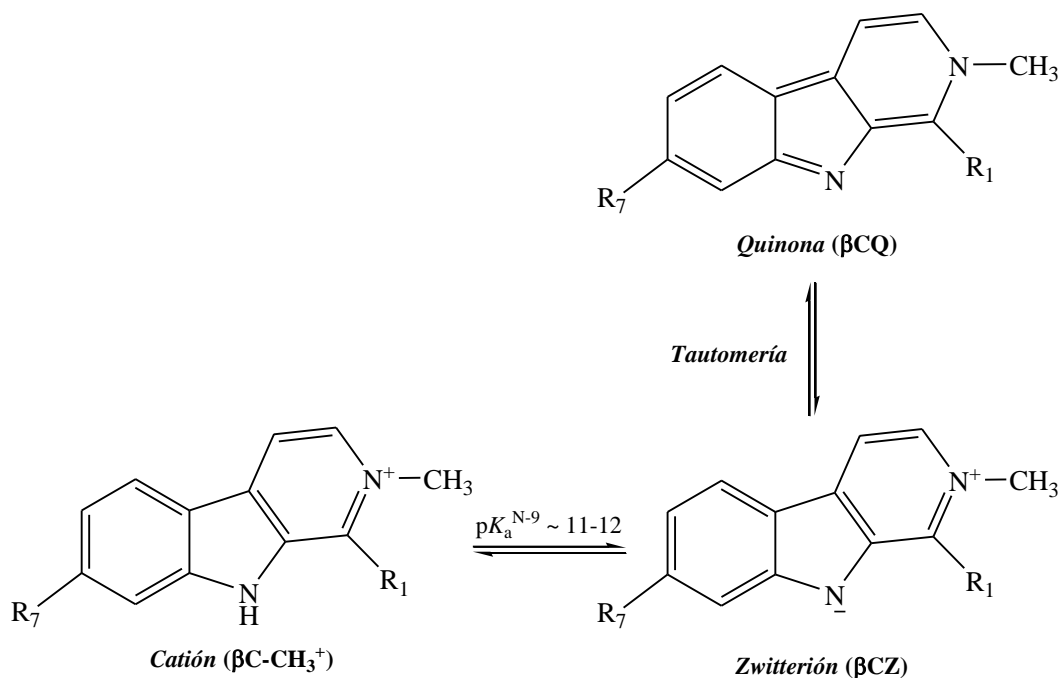


Nombre (abreviatura)	R ₁	R ₂	R ₇	R ₉
<i>nor</i> Harmano (nHo)	-H	-H	-H	-H
2-Metil- <i>nor</i> Harmanio (catión) Ioduro de 2-Metil- <i>nor</i> Harmanio (2-Me-nHo)	-H	-CH ₃	-H	-H
9-Metil- <i>nor</i> Harmano (9-Me-nHo)	-H	-H	-H	-CH ₃
2,9-diMetil- <i>nor</i> Harmanio (catión) Ioduro de 2,9-diMetil- <i>nor</i> Harmanio (2,9-diMe-nHo)	-H	-CH ₃	-H	-CH ₃
Harmano (Ho)	-CH ₃	-H	-H	-H
2-Metil-Harmanio (catión) Ioduro de 2-Metil-Harmanio (2-Me-Ho)	-CH ₃	-CH ₃	-H	-H
9-Metil-Harmano (9-Me-Ho)	-CH ₃	-H	-H	-CH ₃
2,9-diMetil-Harmanio (catión) Ioduro de 2,9-diMetil-Harmanio (2,9-diMe-Ho)	-CH ₃	-CH ₃	-H	-CH ₃
Harmina (Ha)	-CH ₃	-H	-OCH ₃	-H
2-Metil-Harminio (catión) Ioduro de 2-Metil-Harminio (2-Me-Ha)	-CH ₃	-CH ₃	-OCH ₃	-H
9-Metil-Harmina (9-Me-Ha)	-CH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₃
2,9-diMetil-Harminio (catión) Ioduro de 2,9-diMetil-Harminio (9-Me-Ha)	-CH ₃	-CH ₃	-OCH ₃	-CH ₃

Esquema 2.1. Estructura química de las βCs empleadas a lo largo de este trabajo de Tesis.



Esquema 2.2. Estructura química y equilibrio ácido-base en solución acuosa de los derivados sustituidos en el nitrógeno 9 (N-9).



Esquema 2.3. Estructura química y equilibrio ácido-base en solución acuosa de los derivados sustituidos en el nitrógeno 2 (N-2).

Como se mencionó en el capítulo anterior, cada especie ácido-base posee una distribución electrónica particular, lo que le confiere propiedades fisicoquímicas y fotoquímicas verdaderamente distintivas. Por ello, resulta imprescindible conocer cuál o cuáles son las especies que se encuentran presentes, mayoritariamente, en cada una de las condiciones experimentales.

En este capítulo se describen los resultados de la caracterización química, fotoquímica y fotofísica de seis derivados catiónicos del tipo piridonio (amonio cuaternario) de β Cs: 2-Me-nHo, 2,9-diMe-nHo, 2-Me-Ho, 2,9-diMe-Ho, 2-Me-Ha y 2,9-diMe-Ha (Esquema 2.1). En particular, se presentan los espectros de absorción UV-visible de las distintas especies ácido-base presentes en solución acuosa en el rango de pH comprendido entre 2 y 14. Se presentan los resultados de titulaciones espectrofotométricas realizadas, conjuntamente con los valores de las correspondientes constantes de disociación ácida (K_a). Se evalúa la estabilidad térmica en solución de los compuestos mencionados, en función del pH de la solución. Se presentan, además, los espectros de excitación y emisión fluorescente, determinando los correspondientes rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F). Los estudios dinámicos de fluorescencia complementan la caracterización fotofísica, brindando información sobre los tiempos de vida (τ_F) de los estados electrónicos excitados de multiplicidad singlete. Se cuantifica la eficiencia

de producción fotosensibilizada de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) por parte de los derivados sintetizados. Asimismo, se evalúa la dependencia de estos parámetros con el pH del medio.

Con fines comparativos, se incluyen además los resultados obtenidos tanto para las βCs no sustituidas nHo, Ho y Ha como para los respectivos 9-metil derivados descritos en el Capítulo 1. Además, en el caso de los derivados catiónicos en los que existan valores de referencia ya publicados en la literatura, los mismos serán comparados con los valores obtenidos en el presente trabajo de Tesis.

2.2. Resultados y discusiones

2.2.1. Determinación espectroscópica de las constantes de disociación ácido-base de los N-metil derivados

2.2.1.1. Titulación espectrofotométrica de 2-metil derivados

En la Figura 2.1 se muestra el comportamiento diferencial que presenta este tipo de derivados en relación a lo observado para las correspondientes βCs aromáticas no sustituidas (Capítulo 1, Esquema 1.3). En el rango de pH comprendido entre 2 y 9, no se observan los desplazamientos típicos de las bandas de absorción en función del pH descrito en el Capítulo 1. Dicho desplazamiento, debido a la desprotonación del nitrógeno piridínico (N-2), en el caso de los nuevos derivados de síntesis no puede ocurrir, porque dicha posición está bloqueada por la presencia del grupo metilo. Sin embargo, al incrementar la basicidad del medio comienza a observarse el desplazamiento típico de las bandas correspondiente a la desprotonación del nitrógeno indólico (N-9) (Figura 2.1). Del análisis de las curvas de titulación espectrofotométricas se obtienen los correspondientes valores de las respectivas constantes de disociación ácida (K_a) (Tabla 2.1). Los resultados obtenidos indican que:

- (i) Los valores de K_a obtenidos en este trabajo de Tesis son iguales, dentro del error experimental, a los descritos previamente en la literatura para compuestos similares.[1-3]
- (ii) La presencia del grupo metilo en la posición N-2 induce un incremento en la acidez del NH-indólico (disminución en el valor de pK_a^{N-9}) de los 2-metil derivados en comparación con las correspondientes βCs aromáticas no sustituidas (pK_a^{N-9} 2-Me-βCs < pK_a^{N-9} βCs).
- (iii) Aunque de forma moderada, en la serie de 2-metil derivados se observa la tendencia pK_a^{N-9} 2-Me-Ha > pK_a^{N-9} 2-Me-Ho > pK_a^{N-9} 2-Me-nHo (11,7, 11,5 y 10,9, respectivamente). Brevemente, a medida que se incrementa el número de sustituyentes con mayor carácter donador

de electrones en el anillo aromático (-H, -CH₃ y -OCH₃ en 2-Me-nHo, 2-Me-Ho y 2-Me-Ha, respectivamente) se reduce el carácter ácido del NH-indólico, como consecuencia de una menor estabilización y/o deslocalización de la carga negativa correspondiente a la base conjugada (especie zwitteriónica, β CZ) que se genera como producto de la reacción de disociación ácido-base (Esquema 2.3).

(iv) La influencia que ejercen los sustituyentes sobre las diferentes propiedades fisicoquímicas de este tipo de alcaloides depende de su estructura y de su posición relativa en el anillo pirido-indólico, unidad estructural común en todas las estructuras.

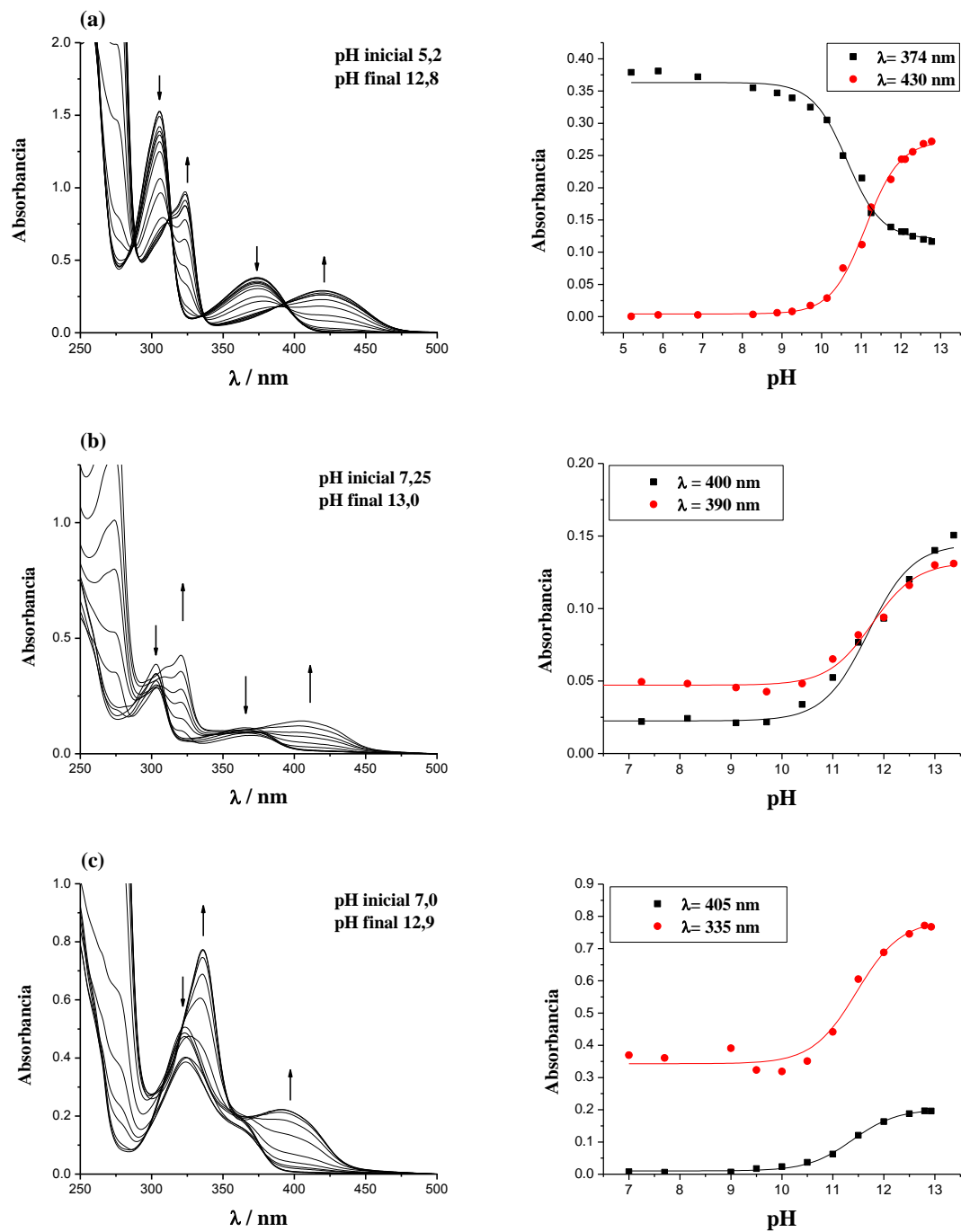


Figura 2.1. Evolución de los espectros de absorción UV-visible de 2-Me- β Cs en solución acuosa, en función del pH. Las flechas indican el sentido en el que aumenta el pH. A la derecha se muestran las curvas de titulación obtenidas a dos longitudes de onda diferentes. Las líneas representa el ajuste realizado con la ecuación 2.4.3. (a) 2-Me-nHo (80 μ M), (b) 2-Me-Ho (35 μ M) y (c) 2-Me-Ha (34 μ M).

2.2.1.2. Titulación espectrofotométrica de 9-metil derivados

Como se describió en el Capítulo 1, cuando el N-indólico (N-9) se encuentra sustituido, como es el caso de los 9-metil derivados, en el rango de pH comprendido entre 2 y 14, se observan los desplazamientos típicos de las bandas de absorción UV-visible en función del pH. Dichos desplazamientos corresponden al equilibrio de ionización del N-piridínico (N-2) (Esquema 2.2). Con fines comparativos y con la intención de caracterizar estos derivados preparados, se procedió a cuantificar espectrofotométricamente dichos equilibrios de ionización, tal cual se presenta en la Figura 2.2. Del análisis de las curvas de titulación espectrofotométricas se obtienen los valores correspondientes a las respectivas constantes de disociación ácida (K_a) (Tabla 2.1). Los resultados obtenidos indican que:

(i) La presencia del grupo metilo en posición N-9 induce un incremento en la acidez del NH-piridínico (disminución en el valor de pK_a^{N-2}) de los 9-metil derivados en comparación con las correspondientes βC aromáticas no sustituidas (pK_a^{N-2} 9-Me-βCs < pK_a^{N-2} βCs).

(ii) La serie de 9-metil derivados estudiados muestra la siguiente tendencia moderada: pK_a^{N-2} 9-Me-Ha > pK_a^{N-2} 9-Me-Ho > pK_a^{N-2} 9-Me-nHo (7,1, 6,6 y 6,3, respectivamente). Es decir que a medida que se incrementa el número de sustituyentes con mayor carácter donador de electrones en el anillo aromático (-H, -CH₃ y -OCH₃ en 9-Me-nHo, 9-Me-Ho y 9-Me-Ha, respectivamente), se reduce el carácter ácido del grupo NH-piridínico.

(iii) Estos resultados evidencian, una vez más, la influencia del tipo y la posición del sustituyente en las propiedades fisicoquímicas del anillo pirido-indólico.

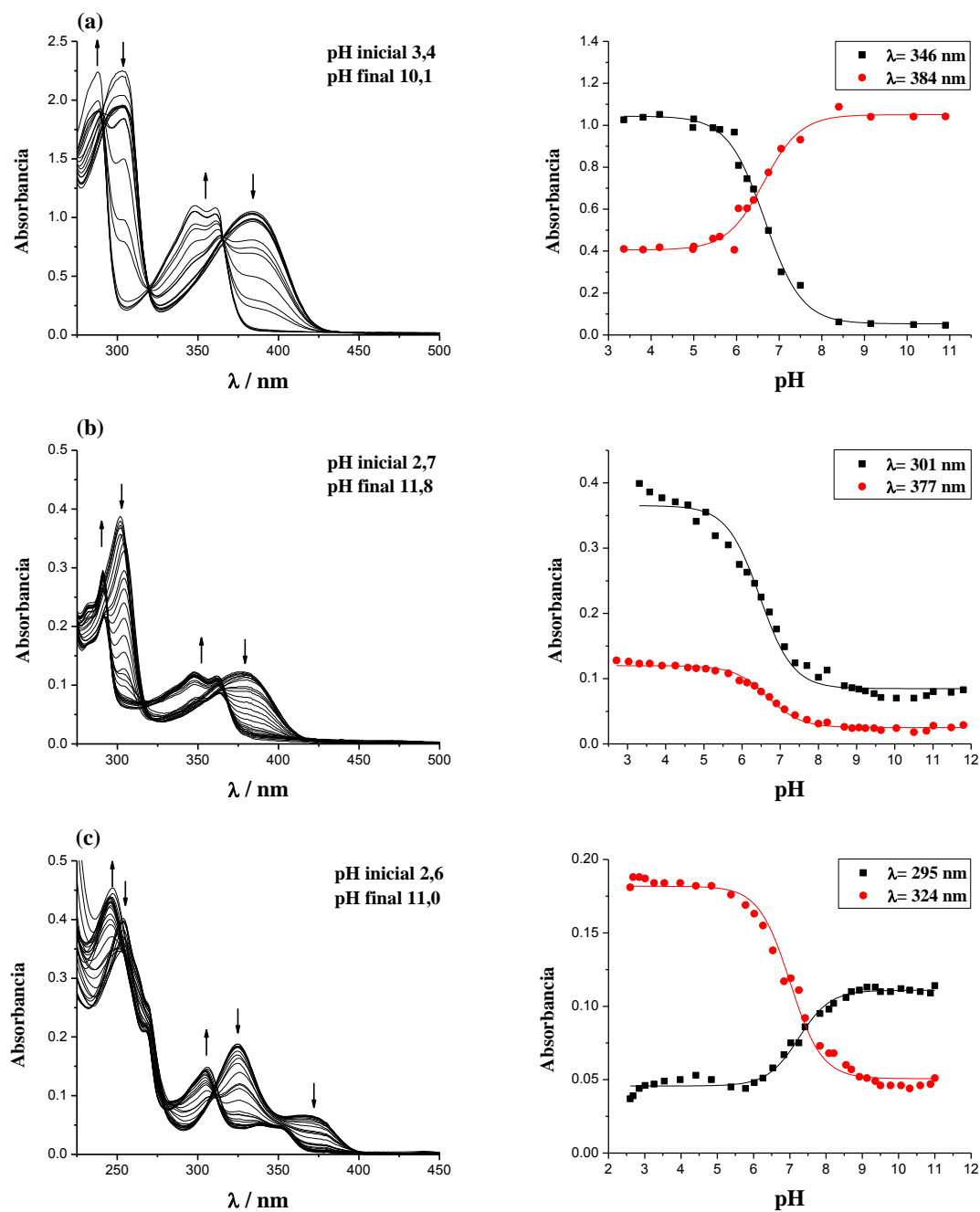


Figura 2.2. Evolución de los espectros de absorción UV-visible de 9-Me- β Cs en función del pH. Las flechas indican el sentido en el que aumenta el pH. A la derecha se muestran las curvas de titulación obtenidas a dos longitudes de onda diferentes. Las líneas representan el ajuste realizado con la ecuación 2.4.3. (a) 9-Me-nHo (250 μ M), (b) 9-Me-Ho (25 μ M) y (c) 9-Me-Ha (10 μ M).

Tabla 2.1. Valores de las constantes de disociación ácido-base de N-Me- β Cs.

Entrada	Compuesto	$\langle pK_a^{N-2} \rangle$	$\langle pK_a^{N-9} \rangle$
1	nHo	7,2 ^a	14,5 ^a
		7,9 ^b	14,5 ^b
2	2-Me-nHo ^c	---	10,9 \pm 0,2
		---	10,9 ⁱ
3	2-Me-nHo ^d	---	11,5 \pm 0,1
4	2-Me-nHo ^e	---	11,5 \pm 0,1
5	9-Me-nHo	6,3 \pm 0,3	---
6	2, 9-diMe-nHo	---	---
7	Ho	7,7 ^a	---
		7,37 ⁱ	14,6 ⁱ
8	2-Me-Ho	---	11,5 \pm 0,1
		---	11,20 ^j
9	9-Me-Ho	6,6 \pm 0,2	---
10	2, 9-diMe-Ho	---	---
11	Ha	7,5 ^g	---
		8,0 ^a	14,5 ^a
		7,7 ^h	> 14 ^h
12	2-Me-Ha	---	11,7 \pm 0,1
		---	11,5 ^k
13	9-Me-Ha	7,1 \pm 0,1	---
14	2, 9-diMe-Ha	---	---

^a Ref. [3], ^b Ref. [4], ^{c,d,y,e} Fuerza iónica (FI) 0,05, 0,55 y 1,05, respectivamente. Valores calculados a partir de la concentración total de NaCl, de β C y de HO⁻ presentes al final de la titulación. ^f Ref. [5]. ^g Ref. [6]. ^h Ref. [7]. ⁱ Ref. [1]. ^j Ref. [2]. ^k Ref. [3].

2.2.1.3. Evaluación del efecto de la fuerza iónica sobre los valores de las constantes de disociación ácido-base

Es sabido que una fuerte variación en la fuerza iónica de las soluciones puede afectar los equilibrios ácido-base de diferentes compuestos. Tal como se describirá en los capítulos siguientes, los ensayos de interacción y daño de macromoléculas fotoinducidos por N-Me- β Cs (Capítulos 3 y 4), fueron realizados empleando soluciones *buffers* para controlar el pH del medio. Por lo tanto, se vuelve relevante definir u optimizar dichas condiciones experimentales (pH, fuerza iónica, naturaleza química de las especies presentes, etc.), y, en particular, conocer el efecto de la fuerza iónica sobre los equilibrios mencionados en la sección previa.

En este contexto, se resolvió efectuar titulaciones espectrofotométricas del 2-Me-nHo, como ejemplo representativo, en tres soluciones diferentes cada una con un valor de fuerza iónica (FI) de 0,05, 0,55 y 1,05, respectivamente. Tal como se describe en la sección 2.4.4.4 la fuerza iónica de cada solución se ajustó empleando diferentes concentraciones de NaCl.

En la Figura 2.3 se presentan los espectros de absorción junto con las respectivas curvas de titulación espectrofotométricas. En todos los casos se observó el mismo patrón de cambio espectral, conservando la posición de máximos, mínimos y puntos isobésticos. Además, mediante el ajuste no lineal de las curvas de titulación, empleando la ecuación 2.4.3, se obtuvieron las correspondientes constantes de disociación ácida (K_a). Estos valores se presentan en forma de pK_a en la Tabla 2.1 (entradas 2 a 4).

Ciertamente, los valores obtenidos para las condiciones de FI 0,55 y 1,05 son ligeramente superiores al valor observado en la titulación de las soluciones libres de NaCl (FI = 0,05) (diferencia experimental observada, ΔpK_a , ~0,6). Sin embargo, también es claro que no se observa una tendencia o una correlación directa entre los valores de pK_a y FI. En este contexto, cabe mencionar que en ninguno de los casos es posible obtener datos confiables en condiciones de pH superiores a 13, que permitan extender la meseta de la curva de titulación. Esto se debe a la inestabilidad que presentan las soluciones altamente alcalinas, muy probablemente debido a la precipitación de la especie ácido-base (zwitterión) presente en condiciones alcalinas extremas (ver sección 2.2.2.2). Por lo tanto, la leve diferencia experimental observada (ΔpK_a ~0,6) podría asociarse a errores experimentales tanto en las determinaciones como en los ajustes matemáticos no-lineales de los datos experimentales obtenidos.

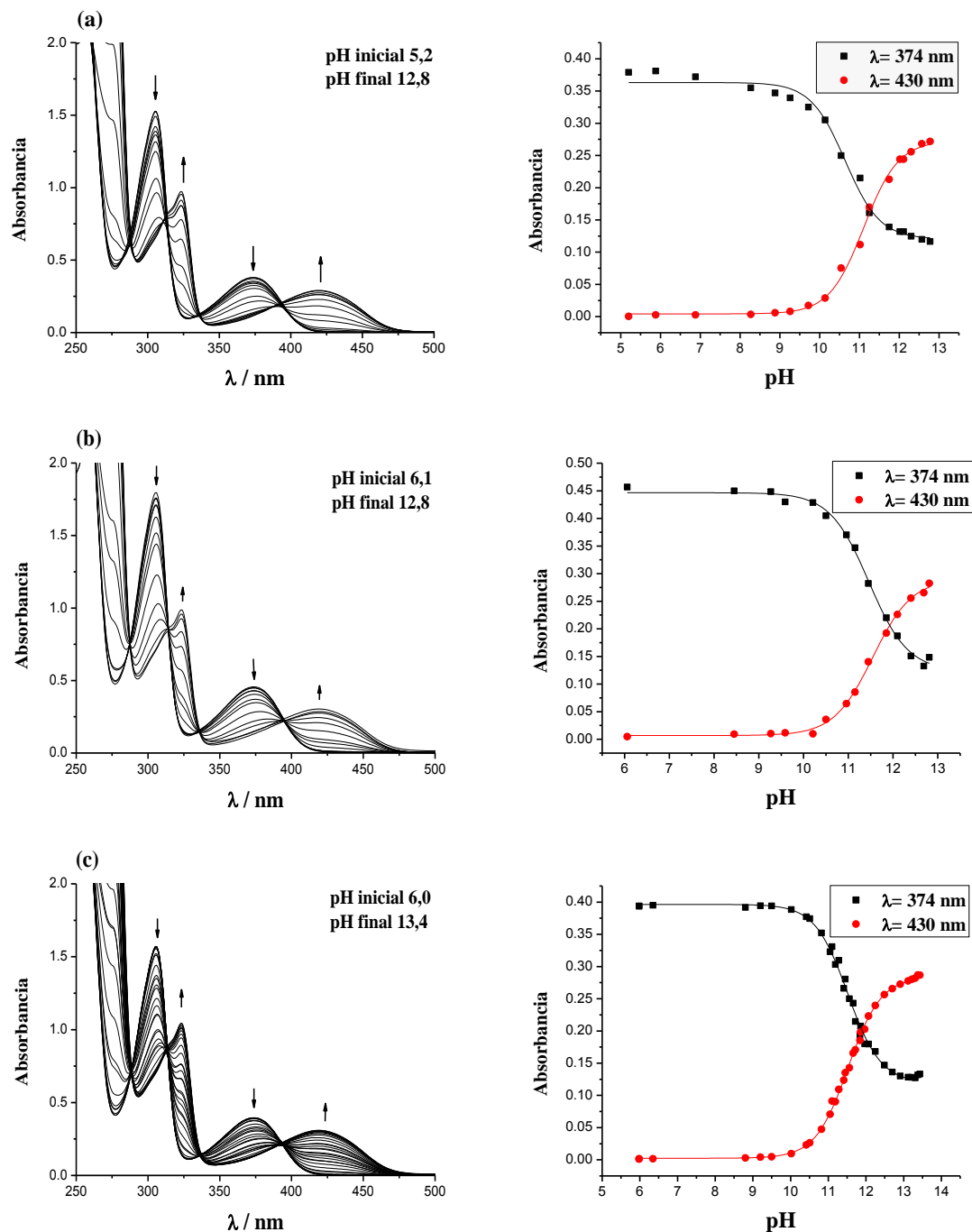


Figura 2.3. Evolución del espectro de absorción UV-visible de 2-Me-nHo ($100 \mu\text{M}$ en agua) en función del pH y la concentración de NaCl. Las flechas indican el aumento del pH. A la derecha se muestran, a modo representativo, solamente las curvas de titulación espectrofotométrica obtenidas a dos longitudes de onda diferentes empleando la ecuación 2.4.3. (a), (b) y (c) Concentración de NaCl 0, 0,5 y 1,0 M, respectivamente.

2.2.2. Propiedades químicas, fotoquímicas y fotofísicas de N-Me-βCs en solución acuosa

2.2.2.1. Espectroscopía de absorción UV-visible

En las Figuras 2.4 a 2.6 se muestran los espectros de absorción UV-visible de distintas especies ácido-base presentes en solución acuosa en el rango de pH comprendido entre 2 y 9,5 de las diferentes N-Me-βCs investigadas. Puede apreciarse que las βCs cuaternarias (2-Me-βCs y 2,9-diMe-βCs), presentan las tres bandas características de las βCs aromáticas (Figuras 2.4 a 2.6, gráficos (b) y (d), respectivamente). En particular, este comportamiento es similar al observado para las especies protonadas de los derivados no-sustituídos en la posición N-2 (Figuras 2.4 a 2.6, gráficos (a) y (c), respectivamente).

En soluciones a pH 4,0, el par de electrones n del N-2 se encuentra comprometido formando parte del correspondiente orbital molecular σ ya sea con el protón (en el caso de las βCs aromáticas no-sustituídas y de los 9-metil derivados) o con el grupo metilo (en el caso de las βCs catiónicas cuaternarias). Consecuentemente, y tal como se discutió en el Capítulo 1, todas las bandas de absorción observadas corresponden a transiciones π - π^* . Este hecho conduce, además, a un incremento en la probabilidad de solapamiento de orbitales y/o a la extensión de la conjugación del sistema π . Esto explica el desplazamiento batocrómico observado en los espectros de absorción de βCH^+ y 2-Me-βC ($\beta\text{C-CH}_3^+$).

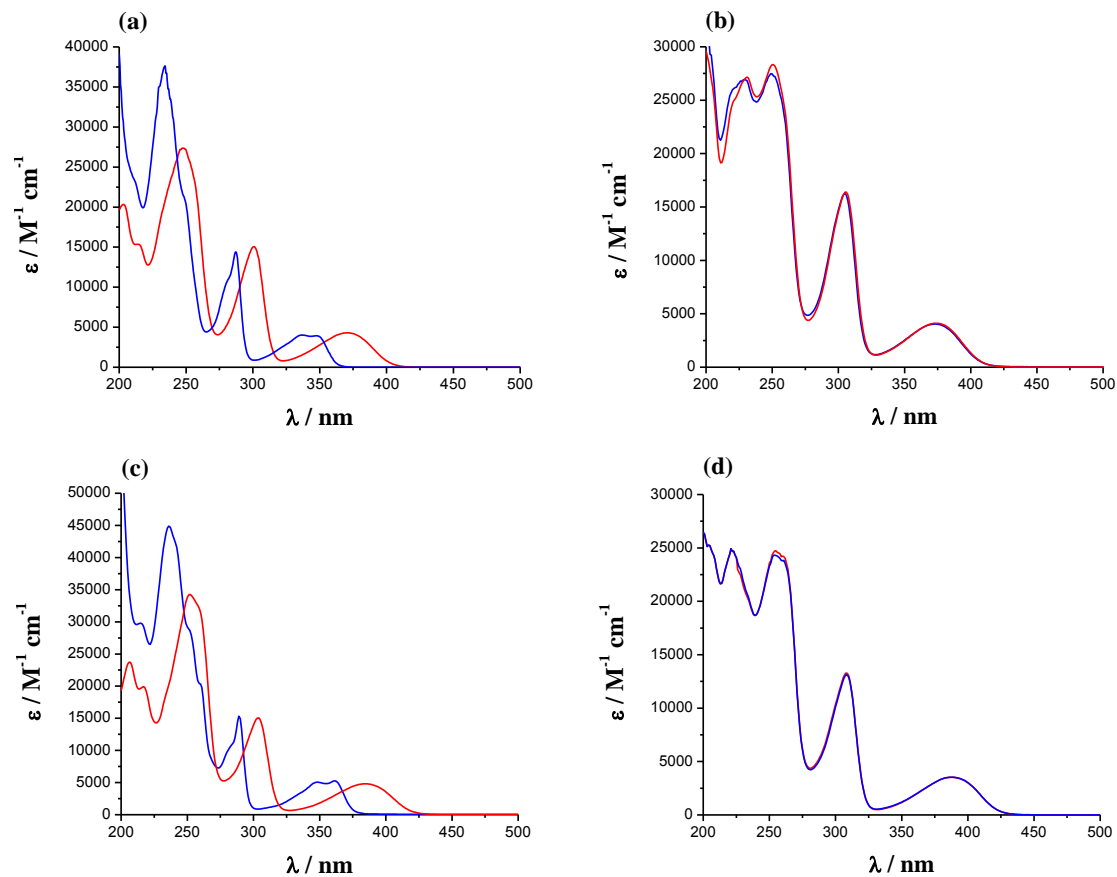


Figura 2.4. Espectros de absorción UV-visible. Líneas en rojo, solución acuosa a pH 4,0 y en azul a pH 9,5. (a) nHo, (b) 2-Me-nHo, (c) 9-Me-nHo y (d) 2,9-diMe-nHo.

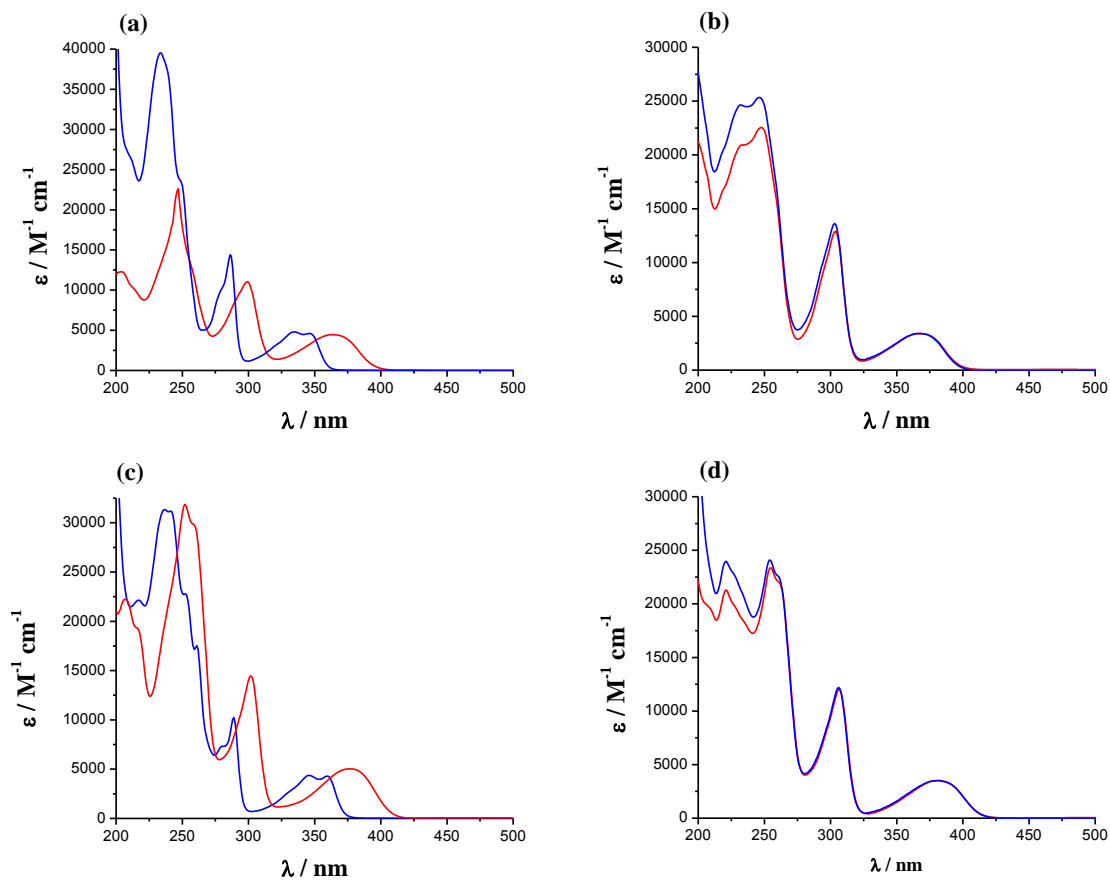


Figura 2.5. Espectros de absorción UV-visible. Líneas en rojo, solución acuosa a pH 4,0 y en azul a pH 9,5. **(a)** Ho, **(b)** 2-Me-Ho, **(c)** 9-Me-Ho y **(d)** 2,9-diMe-Ho.

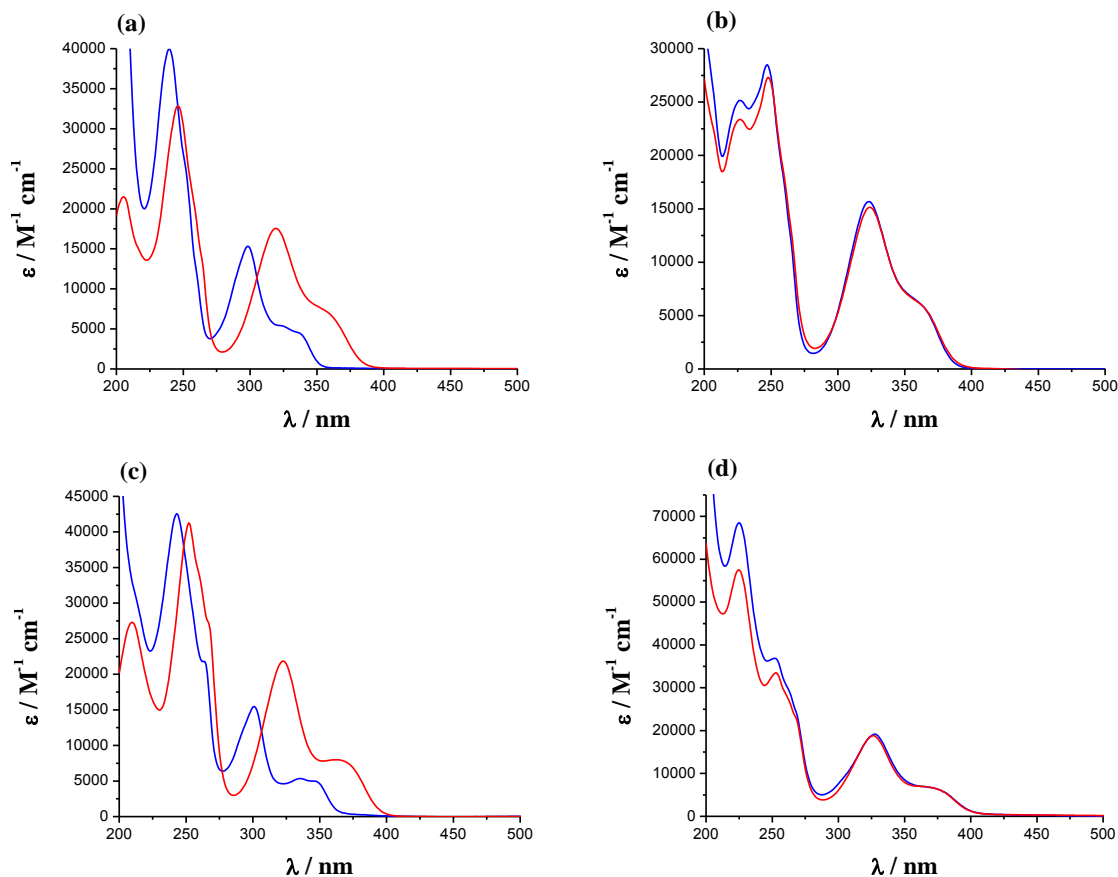


Figura 2.6. Espectros de absorción UV-visible. Líneas en rojo, solución acuosa a pH 4,0 y en azul a pH 9,5. (a) Ha, (b) 2-Me-Ha, (c) 9-Me-Ha y (d) 2,9-diMe-Ha.

Además, cabe destacar que la metilación en los diferentes átomos de nitrógeno del anillo pirido-indólico de las β Cs induce un claro desplazamiento batocrómico en todas las bandas de absorción con respecto a lo observado para las formas protonadas de las respectivas β Cs aromáticas no-sustituidos en las posiciones N-2 y N-9 (Figura 2.7). En particular, se destaca que este efecto es más evidente cuando el grupo metilo se encuentra en posición N-9 comparado con la sustitución en posición N-2, provocando un corrimiento del espectro de ~ 15 nm y ~ 5 nm, respectivamente. Claramente la adición de los dos grupos metilo en el anillo β -carbolínico provoca que el desplazamiento sea aún mayor (~ 20 nm), como consecuencia del efecto donador de electrones aditivo de ambos grupos metilo.

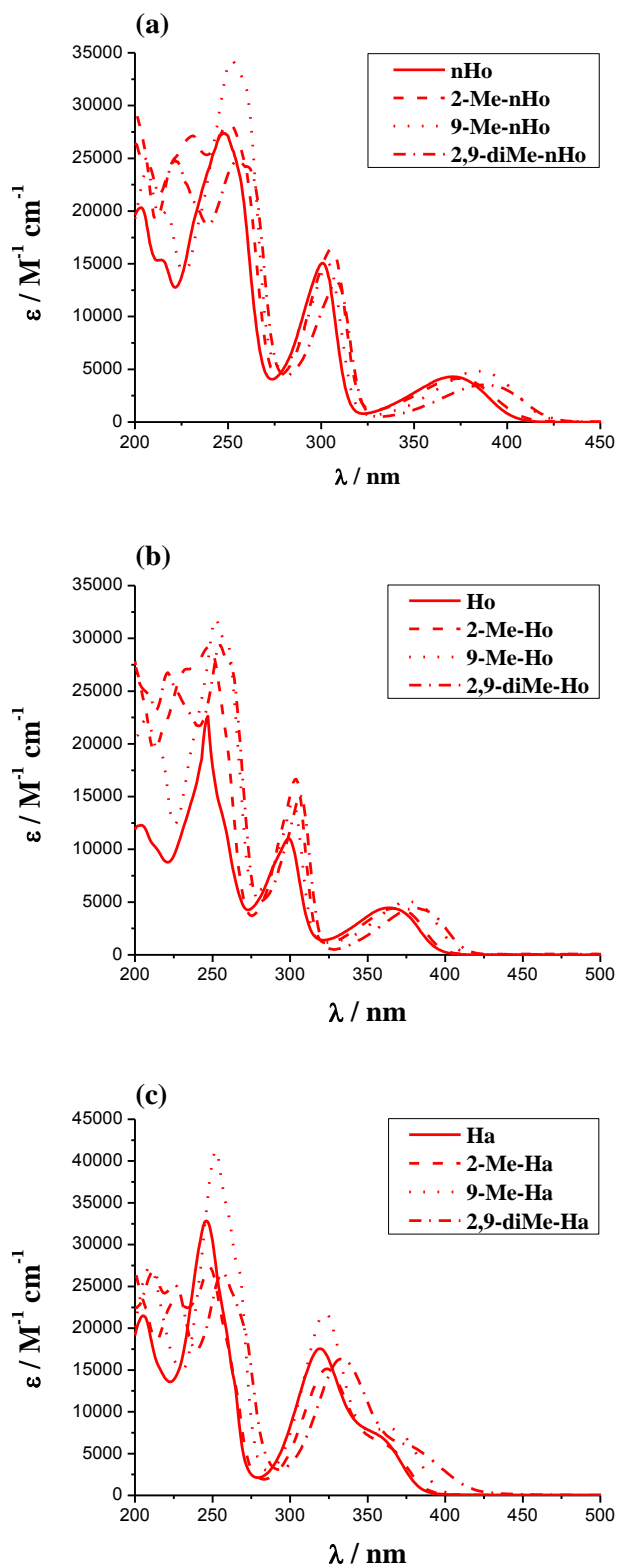


Figura 2.7. Espectros de absorción UV-visible de los *N*-metil derivados de (a) nHo, (b) Ho y (c) Ha en solución acuosa a pH 3,5-4,8.

2.2.2.2. Estabilidad térmica de sales cuaternarias (ioduros) de piridonio del tipo 2-Me- β CS

Se estudió la estabilidad térmica de soluciones acuosas de los derivados catiónicos del nHo (2-Me-nHo y 2,9-diMe-nHo), empleando para el monitoreo la técnica de espectroscopía de absorción UV-visible. Los resultados presentados en la Figura 2.8 indican que ambos compuestos investigados se mantuvieron estables luego de ser almacenados por más de 60 días en solución acuosa ($2 < \text{pH} < 9$ o 10) y en oscuridad. Por el contrario, las soluciones alcalinas ($\text{pH} > 9$) del 2-Me-nHo, mantenidas en oscuridad mostraron reacción química reversible (Figura 2.8 (b)). En particular el 2-Me-nHo presenta el equilibrio ácido-base que da como resultado la formación de una especie zwitteriónica, como consecuencia de la disociación del protón del NH-indólico ($\text{p}K_a^{\text{N-9}} \sim 11$, Esquema 2.3.) Este equilibrio ácido-base reversible, se muestra en la Figura 2.8 (b), mediante los espectros de absorción UV-visibles iniciales y “finales o de regreso” de soluciones de 2-Me-nHo que fueron acidificadas después del tratamiento alcalino ($\text{pH} > 10,0$). De acuerdo a los espectros se observa que posteriormente al tratamiento en etapas (i) alcalino - (ii) ácido, se obtiene el mismo espectro de absorción que el de una solución recién preparada a pH ácido. Esto indicaría una completa reversión del equilibrio ácido-base sin reacción química irreversible.

En comparación, el derivado 2,9-diMe-nHo permanece inalterado almacenado tanto en medio ácido como alcalino. Este hecho está en consonancia con la ausencia de equilibrios ácido-base de los derivados 2,9-di-metilados, por lo que en el rango de pH en estudio solo es posible tener presente una única especie que mantiene su estructura y, consecuentemente, sus propiedades químicas.

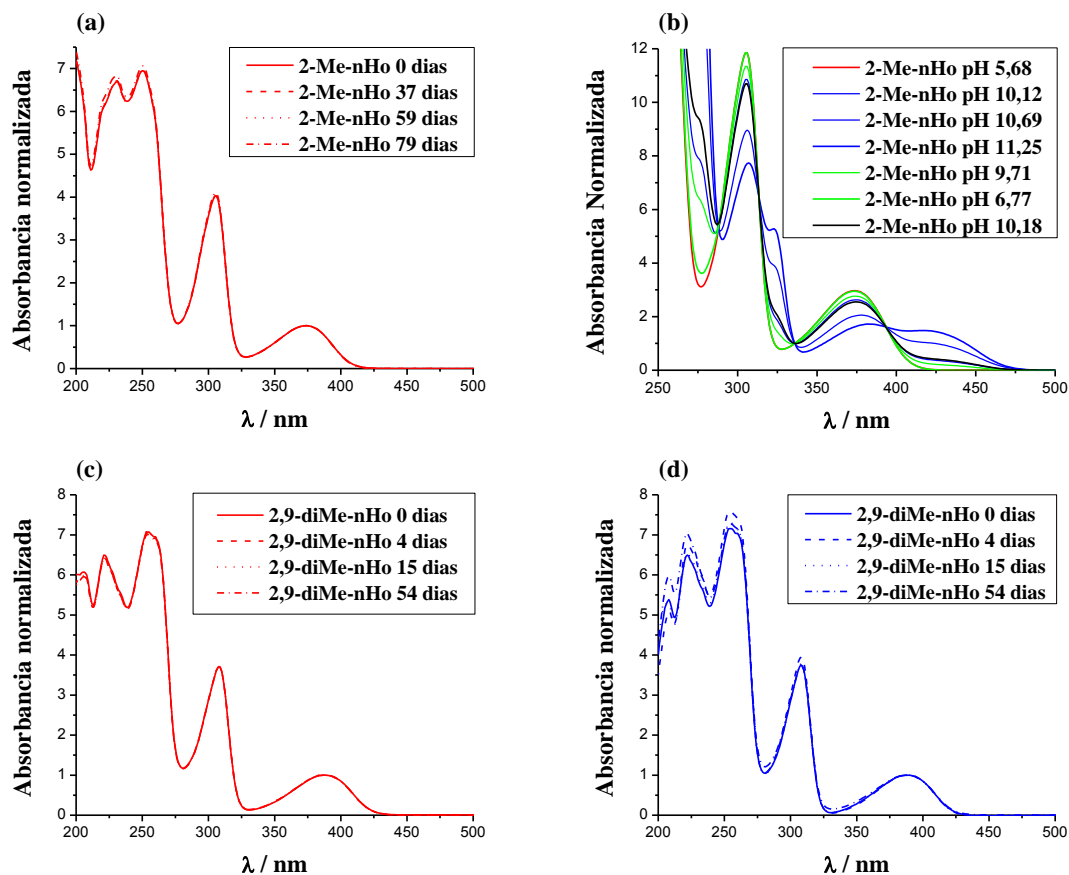


Figura 2.8. Espectros de absorción UV-visible de soluciones acuosas de 2-Me- y 2,9-diMe- β Cs almacenadas en oscuridad por más de 60 días, bajo diferentes condiciones de pH. (a) Soluciones ácidas (pH 4) de 2-Me-nHo almacenadas durante diferentes intervalos de tiempo, (b) 2-Me-nHo inicialmente en solución acuosa ácida (rojo), la cual fue alcalinizada (azul, pH ~11,2) y posteriormente acidificada (verde, hasta pH ~6,8). Espectro final a pH ~10,2 (negro, vuelto a alcalinizar). (c) y (d) Soluciones de 2,9-diMe-nHo ácida (pH 4) y alcalina (pH 10), almacenadas diferentes intervalos de tiempo.

2.2.2.3. Espectroscopía de fluorescencia

(a) Espectros de emisión de fluorescencia

En las Figura 2.9 a 2.11 se presentan los espectros de emisión de fluorescencia corregidos y normalizados para los tres grupos de *N*-metil derivados (*N*-Me-nHo, *N*-Me-Ho y *N*-Me-Ha), registrados en solución acuosa, en el rango de pH comprendido entre 4 y 9 o 10. Brevemente, los tres grupos de compuestos muestran el mismo comportamiento general. En todo el rango de pH estudiado todos los derivados metilados en la posición *N*-2 (tanto los derivados mono- como los di-metilados) presentan una única banda de emisión, intensa, centrada en ~430-460 nm (Figuras 2.9-2.11 (b) y (d) y Tabla 2.2). Esta banda corresponde a la

emisión desde el estado excitado singlete de la especie catiónica (β C metilada en el N-2), ya que ésta es la única especie presente en solución en este rango de pH (Capítulo 1).

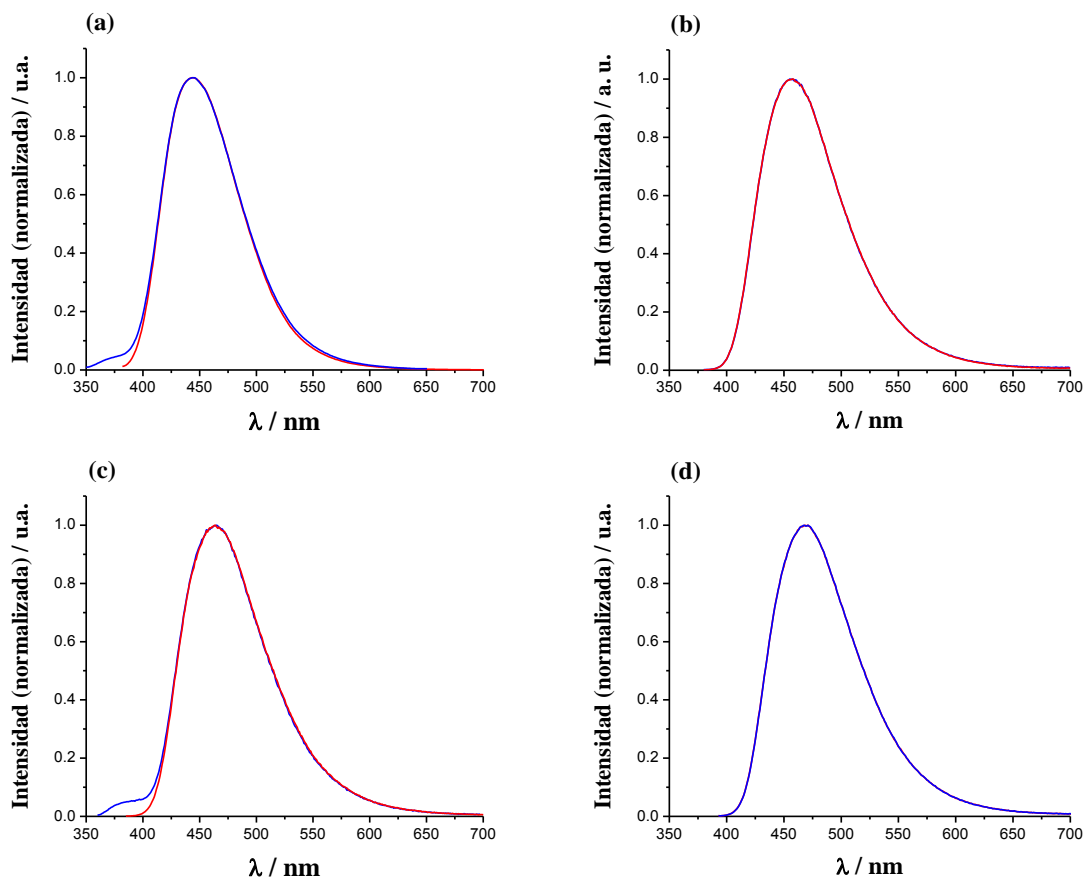


Figura 2.9. Espectros de emisión de fluorescencia corregidos y normalizados en solución acuosa. Las líneas en rojo, solución acuosa a pH= 4,0 y en azul a pH= 9,5. (a) nHo, λ_{exc} 371 y 348 nm, respectivamente, (b) 2-Me-nHo, λ_{exc} 374 nm, (c) 9-Me-nHo, λ_{exc} 384 y 362 nm, respectivamente y (d) 2,9-diMe-nHo, λ_{exc} 388 nm.

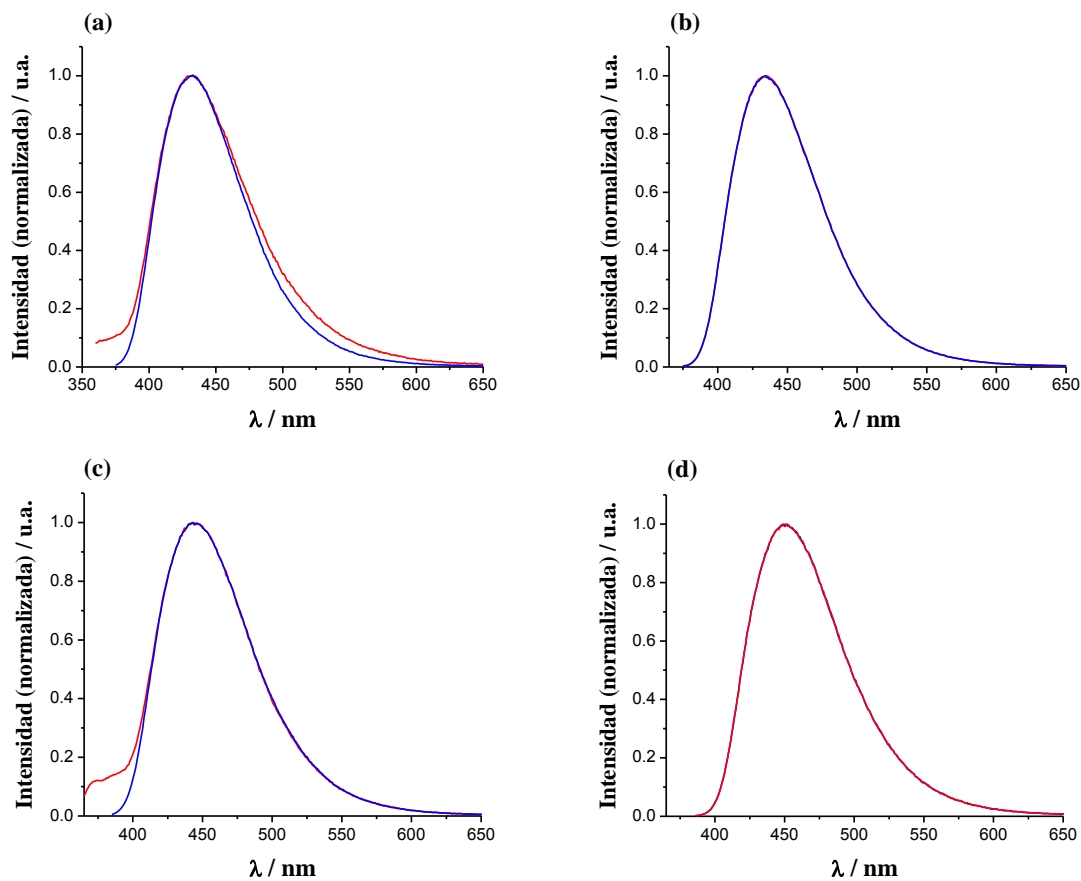


Figura 2.10. Espectros de emisión de fluorescencia corregidos y normalizados en solución acuosa. Las líneas en rojo, solución acuosa a pH= 4,0 y en azul a pH= 9,5. **(a)** Ho, λ_{exc} 365 y 348 nm, respectivamente, **(b)** 2-Me-Ho, λ_{exc} 368 nm, **(c)** 9-Me-Ho, λ_{exc} 377 y 360 nm, respectivamente y **(d)** 2,9-diMe-Ho, λ_{exc} 380 nm.

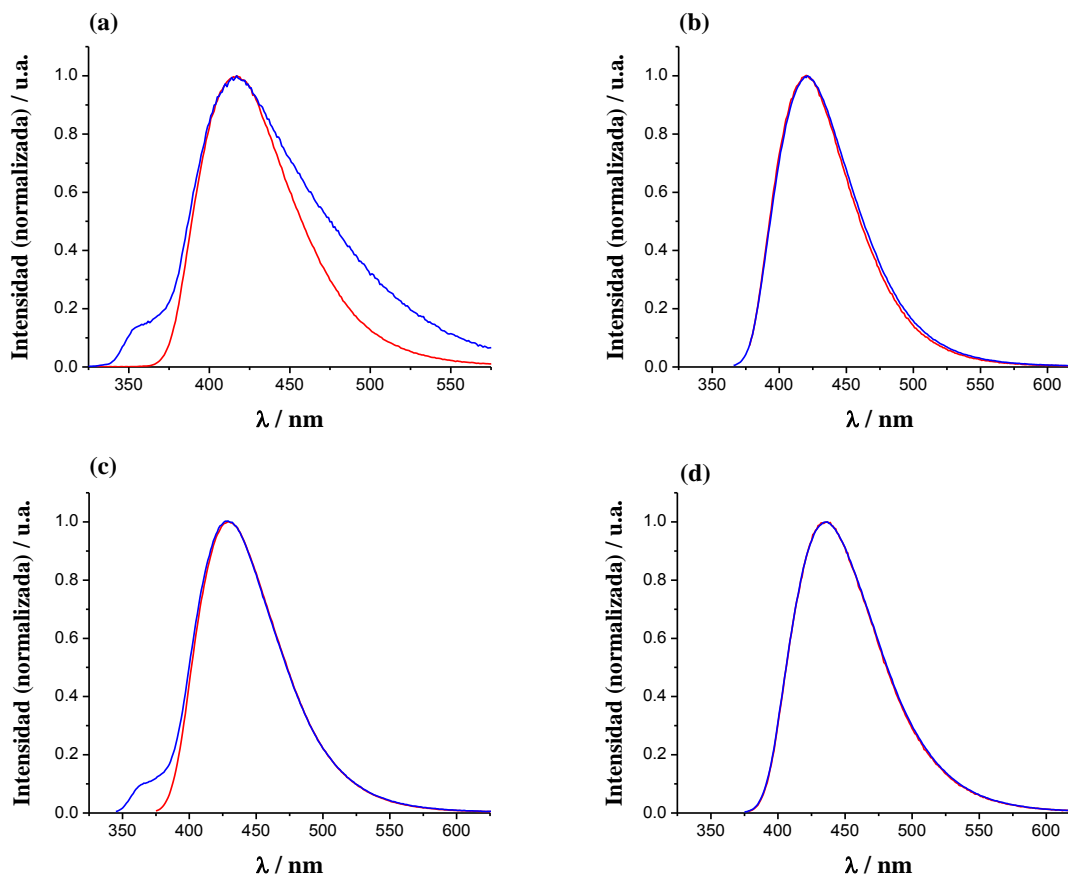


Figura 2.11. Espectros de emisión de fluorescencia corregidos y normalizados en solución acuosa. Las líneas en rojo, solución acuosa a pH= 4,0 y en azul a pH= 9,5. (a) Ha, λ_{exc} 350 y 336 nm, respectivamente, (b) 2-Me-Ha, λ_{exc} 360 nm, (c) 9-Me-Ha, λ_{exc} 363 y 347 nm, respectivamente y (d) 2,9-diMe-Ha, λ_{exc} 368 nm.

Con el fin de facilitar la comparación, en estas figuras se muestran los espectros de emisión normalizados de ambas especies ácido-base de las β Cs aromáticas no sustituidas y de las 9-Me- β Cs (Figuras 2.9 – 2.11, (a) y (c), respectivamente, y Tabla 2.2) ya presentados y descritos, detalladamente, en el Capítulo 1. Como se mencionó anteriormente, en condiciones ácidas, todas las β Cs aromáticas sin sustitución en el N-2 presentan un espectro de emisión característico con una única banda de emisión centrada en ~430-460 nm, la cual fue asignada a la emisión de la especie protonada (β CH⁺). Por su parte, en medios alcalinos, además de observarse la misma banda de emisión intensa centrada en ~430-460 nm, se observa una banda de emisión adicional, de intensidad débil, centrada en ~360-390 nm, la cual fue asignada a la emisión de la especie neutra de las β -carbolinas (¹[β CN]*).[3] Estos resultados son consistentes con que, tras la excitación electrónica, aumenta considerablemente la basicidad del nitrógeno piridínico de las β Cs, tal como se sugirió previamente.[8] Por lo tanto, aún en agua a pH 10,0, la especie ¹[β CN]* se protona rápidamente por intercambio de protones con el solvente. Consecuentemente, la especie protonada ¹[β CH⁺]* es la especie que predomina en el

estado S_1 . Sin embargo, la presencia de la banda de emisión a ~360-390 nm muestra que, aunque en una pequeña proporción, $^1[\beta\text{CN}]^*$ también está presente en solución a este pH.

La interacción con el solvente descrito en el párrafo anterior se pone de manifiesto al analizar la dependencia de los espectros de emisión de βCs con la naturaleza química del solvente. En particular, se registraron los espectros de emisión de 9-Me-nHo en H_2O y D_2O acidificadas. Los resultados presentados en la Figura. 2.12 (b) muestran un claro efecto isotópico, en donde la intensidad de emisión de $^1[\beta\text{CN}]^*$ (~380 nm), con relación a la intensidad de la emisión de $^1[\beta\text{CH}^+]^*$ (~450 nm), es mayor en el solvente deuterado. Consecuentemente, la concentración en estado estacionario de $^1[\beta\text{CN}]^*$ es mayor en D_2O que en H_2O . Cabe destacar que, aunque este fenómeno se observó para los tres 9-metil derivados estudiados, el efecto es más notable en los casos de 9-Me-nHo y 9-Me-Ho que para 9-Me-Ha. Esto podría ser consecuencia del mayor tiempo de vida de fluorescencia de los dos primeros derivados β -carbolínicos (~23-25 ns)[8] en comparación con el de la 9-Me-Ha (9,1 ns) (Tablas 2.3 a 2.5).

También es importante señalar que la intensidad de fluorescencia observada tras la excitación de las βCs neutras en el experimento a pH 10,0 es ligeramente menor que la de las respectivas especies protonadas en el experimento a pH 4,0. Esto se evidencia en la Figura 2.12 (a) donde, a modo de ejemplo se representan los espectros observados para el 9-Me-nHo. Este hecho, junto con la pequeña diferencia observada en los respectivos valores de Φ_F (Tabla 2.2) representa un indicio claro que, en medio alcalino, sólo una fracción de $^1[\beta\text{CN}]^*$ generado por excitación electrónica de la especie neutra de las βCs se protona para producir $^1[\beta\text{CH}^+]^*$. Esto será relevante a la hora de interpretar los mecanismos de interacción que se presentan en los capítulos siguientes.

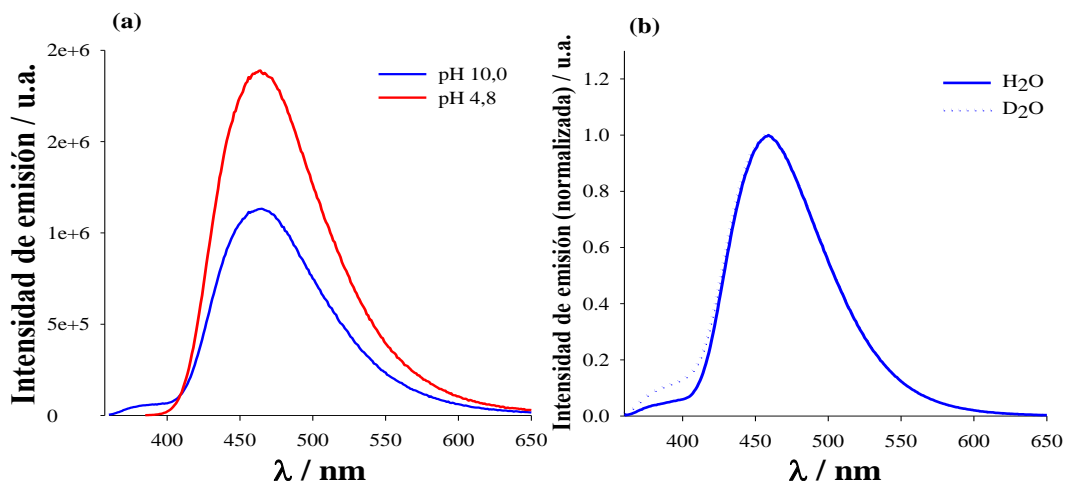


Figura 2.12. (a) Espectros de emisión de fluorescencia de 9-Me-nHo protonado (línea continua) y neutro (línea punteada), (b) espectros de emisión de fluorescencia normalizado de la forma neutra de 9-Me-nHo registrados en solución H₂O (línea continua) y D₂O (línea punteada).

(b) Rendimientos cuánticos de emisión fluorescente

A partir de la integración de los espectros de emisión y comparando esta señal con la de una referencia adecuada (ver sección 2.4.4.6) se determinaron los correspondientes rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) de todos los compuestos sintetizados (Tabla 2.2). En términos generales, se observa la siguiente tendencia para los valores de Φ_F : $\Phi_F^{9\text{-Me-}\beta\text{CH}^+} \sim \Phi_F^{2,9\text{-diMe-}\beta\text{C}} > \Phi_F^{\beta\text{CH}^+} \sim \Phi_F^{2\text{-Me-}\beta\text{C}}$, a partir de la cual se puede realizar una serie de generalizaciones:

- (i) En todo el rango de pH analizado ($4 < \text{pH} < 9$) los 2-metil derivados catiónicos (mono- y di-sustituídos) muestran valores de Φ_F relativamente elevados, similares a los de las correspondientes formas protonadas de las β Cs aromáticas no-sustituídas e independientes del pH del medio.
- (ii) Los derivados 2-Me- β Cs y 2,9-diMe- β Cs muestran valores de Φ_F similares a los obtenidos para las especies protonadas de las correspondientes β Cs y 9-Me- β Cs respectivamente. Por lo que, la introducción de un grupo metilo en la posición N-9 del anillo pirido-indólico incrementa ($\sim 5\text{-}10\%$) el rendimiento cuántico de fluorescencia, mientras que el efecto de la metilación en la posición N-2 es moderado o nulo, con respecto de la modificación de la eficiencia de desactivación radiativa.

Tabla 2.2. Resumen de los valores de longitud de onda máxima de emisión fluorescente (λ_{fluo}) y de los correspondientes rendimientos cuánticos de emisión (Φ_{F}) de los compuestos estudiados.

Compuesto	pH	$\lambda_{\text{fluo}} / \text{nm}$	$\Phi_{\text{F}}^{\text{a}}$
nHo ^b	4 (C)	448	0,70 ± 0,05
	10 (N)	~ 375, 448	0,21 ± 0,05
2-Me-nHo	4 - 9 (C)	454	0,67 ± 0,02
9-Me-nHo ^b	4 (C)	458	0,75 ± 0,05
	10 (N)	~ 385 y 458	0,68 ± 0,05
2,9-diMe-nHo	(C)	462	0,74 ± 0,01
Ho ^b	4 (C)	431	0,85 ± 0,05
	10 (N)	~ 369 y 431	0,47 ± 0,05
2-Me-Ho	4 - 9 (C)	436	0,95 ± 0,02
9-Me-Ho ^b	4 (C)	444	0,93 ± 0,05
	10 (N)	~ 374 y 444	0,68 ± 0,05
2,9-diMe-Ho	(C)	451	0,94 ± 0,02
Ha ^b	4 (C)	417	0,49 ± 0,05
	10 (N)	~ 356 y 417	0,38 ± 0,05
2-Me-Ha	4 - 9 (C)	422	0,47 ± 0,02
	1 (C)	430 ^c	0,45 ± 0,03 ^c
9-Me-Ha	4 (C)	430	0,43 ± 0,04
	10 (N)	~ 365 y 430	0,35 ± 0,03
2,9-diMe-Ha	4 - 9 (C)	434	0,45 ± 0,02

^a Rendimientos cuánticos de emisión fluorescente determinados en soluciones acuosas equilibradas con aire. En todos los casos, Φ_{F} representa el promedio de los valores obtenidos excitando (λ_{exc}) a lo largo de la banda de absorción de menor energía. ^b Ref. [8] ^c Ref. [9]

(c) Espectros de excitación de fluorescencia

En la Figuras 2.13 a 2.15 se muestran los espectros de excitación de los tres grupos de *N*-Me- β CS investigados, registrados en condiciones de pH comprendidas entre 4 y 9. Con fines comparativos, se presentan los espectros de excitación junto con los respectivos espectros de absorción UV-visible, ambos normalizados a la longitud de onda del máximo de absorción de la banda de menor energía. Se puede observar que para todos los casos, incluidas las sales cuaternarias de piridonio, ambos espectros coinciden dentro del error experimental. Asimismo se puede concluir que las I_{F} son proporcionales a sus $\epsilon(\lambda)$, y, consecuentemente, los Φ_{F} de dichos compuestos son independientes de la λ_{exc} . Por lo tanto, se confirma que las mismas especies catiónicas que absorben la radiación son las responsables de la emisión. Este hecho está en consonancia con lo sugerido en las secciones previas donde se mostró que, en el rango de pH en estudio, es el catión β -carbolínico quien absorbe y emite radiación.

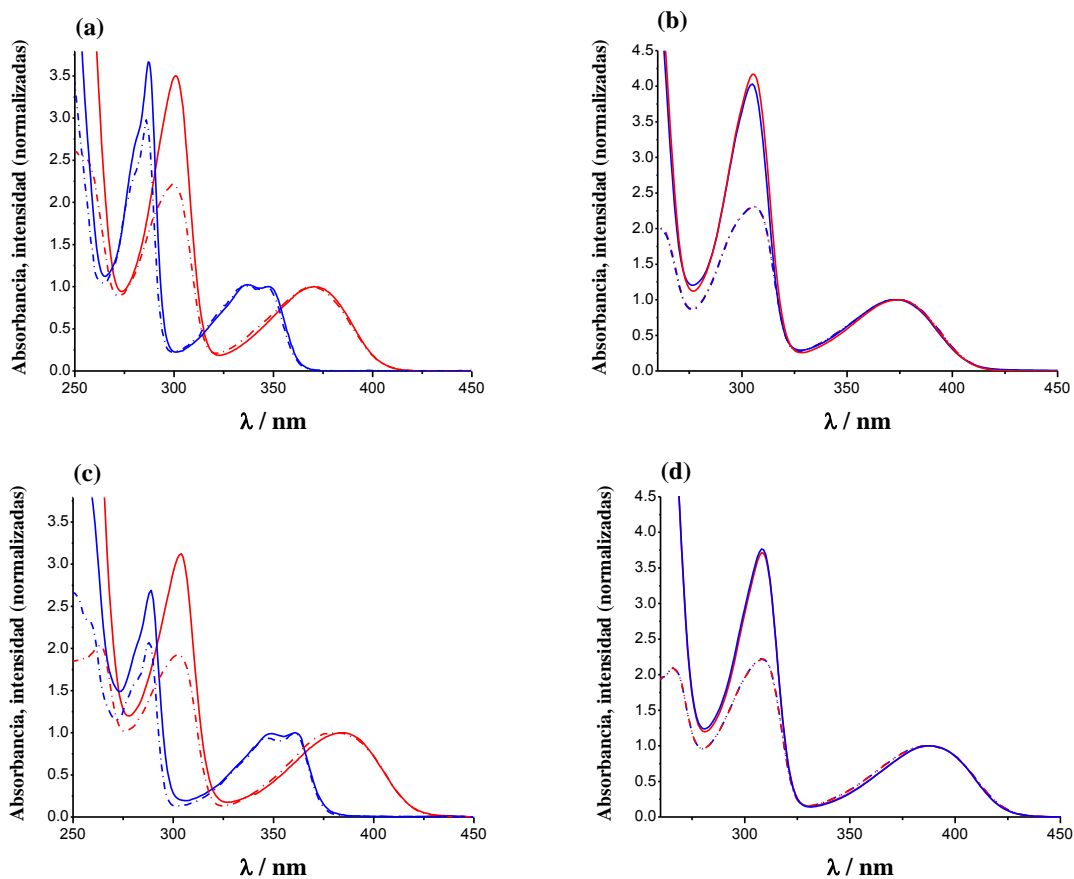


Figura 2.13. Espectros normalizados de absorción UV-visible (líneas continuas) y de excitación de fluorescencia (líneas discontinuas, λ_{fluo} : máximo de emisión correspondiente, ver Tabla 2.2). Líneas en rojo, solución acuosa a pH 4,0 y en azul pH 9,5. (a) nHo, (b) 2-Me-nHo, (c) 9-Me-nHo y (d) 2,9-diMe-nHo.

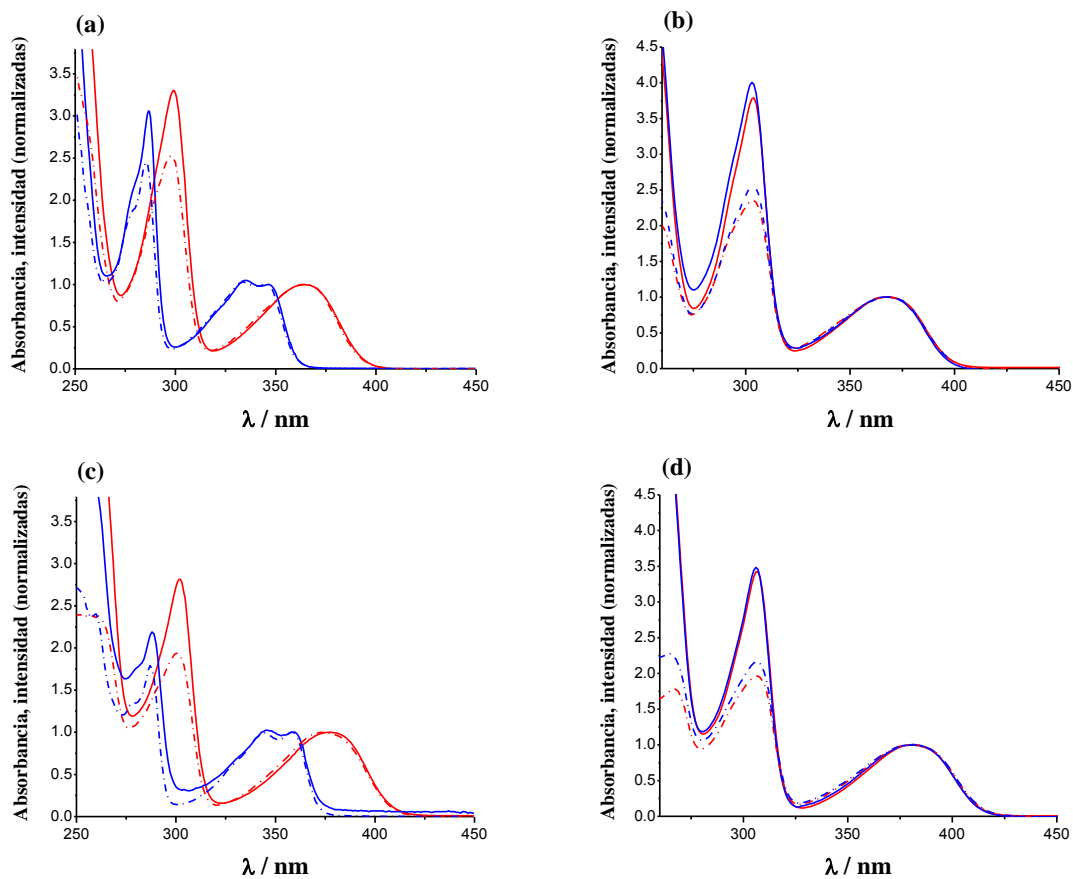


Figura 2.14. Espectros normalizados de absorción UV-visible (líneas continuas) y de excitación de fluorescencia (líneas discontinuas, λ_{fluo} : máximo de emisión correspondiente, ver Tabla 2.2). Líneas en rojo, solución acuosa a pH 4,0 y en azul pH 9,5. **(a)** Ho, **(b)** 2-Me-Ho, **(c)** 9-Me-Ho y **(d)** 2,9-diMe-Ho.

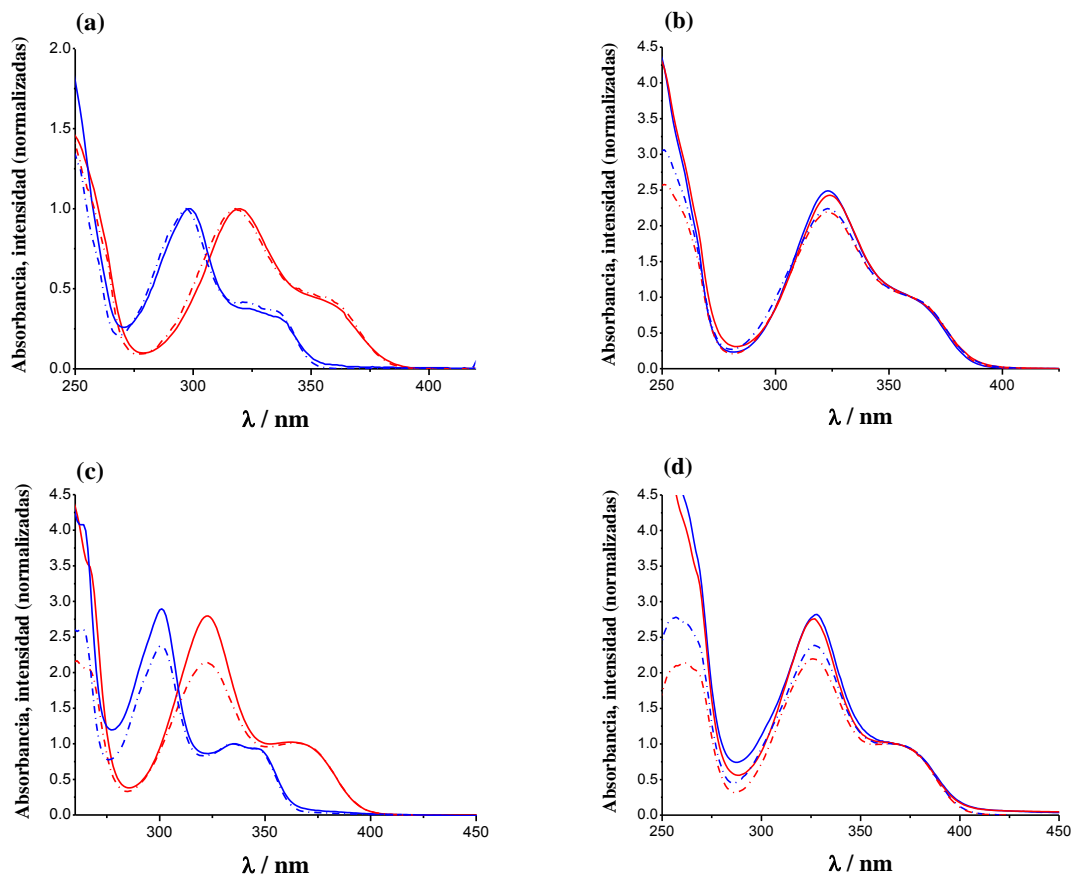


Figura 2.15. Espectros normalizados de absorción UV-visible (líneas continuas) y de excitación de fluorescencia (líneas discontinuas, λ_{fluo} : máximo de emisión correspondiente, ver Tabla 2.2). Líneas en rojo, solución acuosa a pH 4,0 y en azul pH 9,5. (a) Ha, (b) 2-Me-Ha, (c) 9-Me-Ha y (d) 2,9-diMe-Ha.

Tal como se mencionó en las secciones anteriores, los 2-metil derivados presentan un equilibrio ácido-base que se pone de manifiesto cuando se encuentran en soluciones fuertemente alcalinas ($\text{p}K_{\text{a}}^{\text{N-9}} \sim 11$, ver sección 2.2.1.3). Así, la disociación del protón unido al N-9 da lugar a la formación de la especie ácido-base zwitteriónica denominada, genéricamente, βCZ (Esquema 2.3). Esta especie, debido a su propia distribución electrónica, presenta propiedades espectroscópicas características que se reflejan, por ejemplo, en su espectro de absorción UV-visible (sección 2.2.1.1). Con el objeto de avanzar en la caracterización espectroscópica de la especie βCZ , se registraron los espectros de excitación y emisión fluorescente de la especie zwitteriónica correspondiente a cada uno de los tres 2-metil derivados estudiados en esta Tesis. Con fines comparativos, en cada caso se presentan los correspondientes espectros de absorción UV-visible (Figura 2.16). Típicamente, estas especies zwitteriónicas presentan una única banda de emisión, que muestra un fuerte desplazamiento batocrómico en relación a la emisión de las correspondientes especies catiónicas ($\beta\text{C-CH}_3^+$).

Cabe aclarar que estas especies, presentes únicamente en condiciones de alcalinidad extrema, escapan a los objetivos particulares propuestos en este trabajo, donde se pretende evaluar el comportamiento fotofísico de un grupo particular de N-Me- β Cs y su capacidad de interacción e inducción de daño fotosensibilizado a biomacromoléculas en condiciones de pH fisiológicas (pH 7,4). Por tal motivo, el estudio y caracterización de este tipo de especies será abordado de manera parcial presentándose, no obstante, toda la información que sea relevante para comprender aquellos sistemas de mayor complejidad que se describen en los sucesivos capítulos.

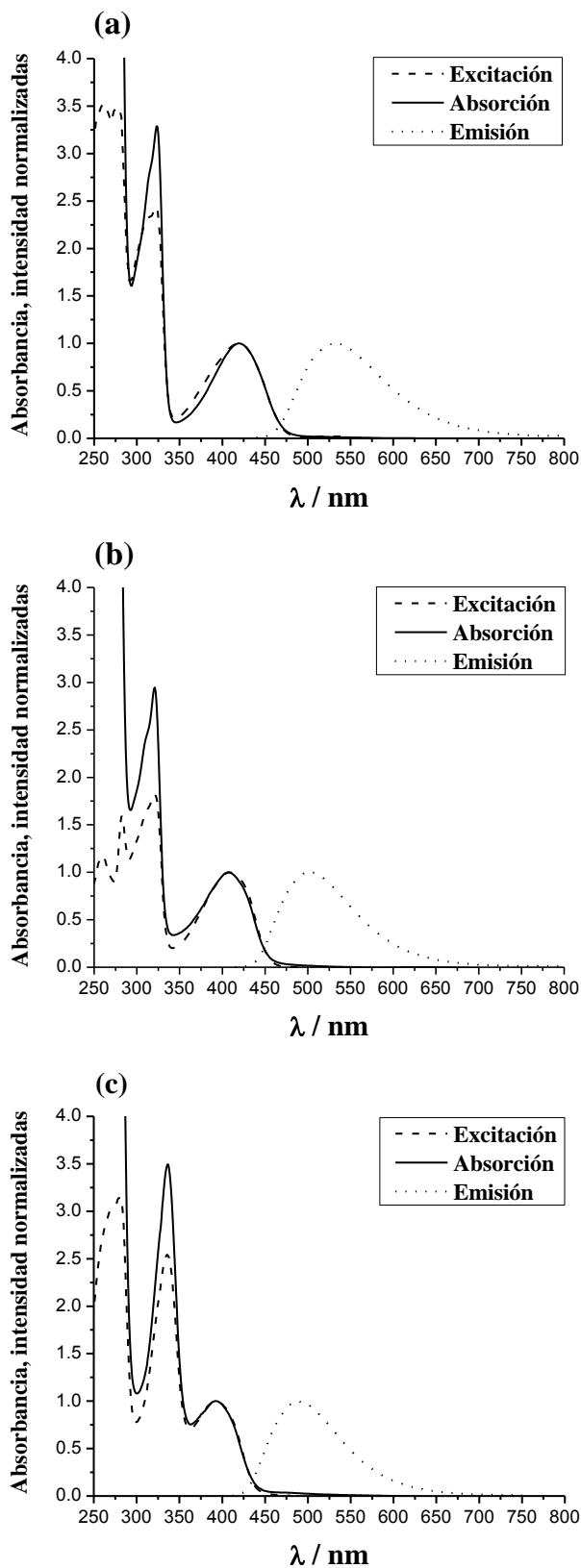


Figura 2.16. Espectros normalizados de absorción UV-visible, emisión y excitación de fluorescencia de soluciones alcalinas (pH 13) de **(a)** 2-Me-nHo ($\lambda_{\text{exc}} = 430$ nm, $\lambda_{\text{fluo}} = 550$ nm), **(b)** 2-Me-Ho ($\lambda_{\text{exc}} = 407$ nm, $\lambda_{\text{fluo}} = 497$ nm) y **(c)** 2-Me-Ha ($\lambda_{\text{exc}} = 395$ nm, $\lambda_{\text{fluo}} = 490$ nm).

(d) Tiempos de vida de fluorescencia (τ_F)

Hasta la fecha, solo existen unos pocos estudios en los que se describen las propiedades dinámicas de los 2-metil derivados de β Cs. En particular, Sakurovs *et al.* analizaron los decaimientos de la emisión fluorescente de 2-Me-nHo, en solución acuosa en función del pH. Estos autores informan un valor de τ_F de $22,9 \pm 0,2$ ns en toda condición de pH inferior a 10.[4] Por su parte, Pardo *et al.*[9] efectuaron un estudio similar a partir de la base anhidra ó forma quinónica (β CQ) neutra de la 2-Me-Ha en solución acuosa. En estas condiciones de trabajo se observó la presencia de una única especie emisora, que fue asignada a la especie β CZ (ver sección 2.1 y Esquema 2.3), con un valor de τ_F de $6,5 \pm 0,2$. Sin embargo, hasta la fecha, no existe información relacionada con las demás sales cuaternarias de interés en esta Tesis (2-Me-Ho, 2,9-diMe-nHo, 2,9-diMe-Ho, y 2,9-diMe-Ha).

En este contexto, se realizaron estudios sistemáticos para determinar los tiempos de vida de fluorescencia de las especies emisoras presentes en nuestras condiciones experimentales (soluciones acuosas, de pH < 9, equilibradas con aire a temperatura ambiente) (ver sección 2.4.4.7).

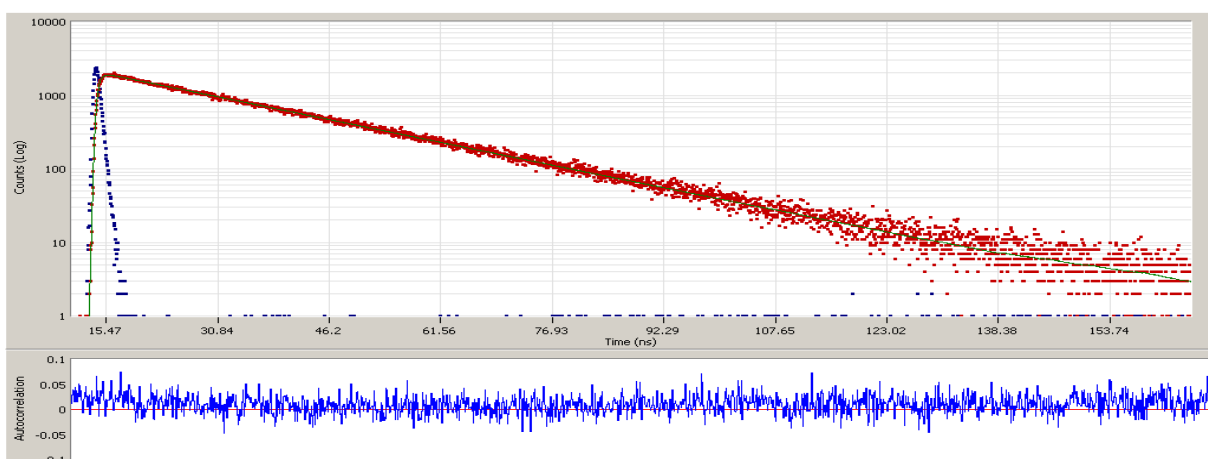
Se presentan a continuación los resultados obtenidos para todos los compuestos en las diferentes condiciones de ensayo. En las Figuras 2.17 a 2.19 se muestran los decaimientos de fluorescencia obtenidos en las condiciones indicadas. Se incluye, con fines comparativos, los decaimientos observados para los derivados no-sustituídos como así también para los 9-metil derivados. En las Tablas 2.3 a 2.5 se listan los valores de τ_F obtenidos para cada compuesto y la condición ensayada (pH, λ_{exc} y λ_{fluo}) en cada caso particular. Los resultados obtenidos indican que:

- (i) Los decaimientos observados para los derivados catiónicos cuaternarios son de primer orden, con ajustes mono-exponenciales que arrojan valores de τ_F relativamente elevados (> 20 ns). Estas observaciones son consistentes con lo mencionado en las secciones anteriores, donde la especie catiónica β C-CH₃⁺ en solución, es quien absorbe la radiación incidente y, desde su estado excitado S₁, emite fluorescencia.
- (ii) En los casos en que el N-indólico (N-9) está unido a un grupo metilo (grupo donador de electrones por hiperconjugación) se produce un aumento en el tiempo de vida de fluorescencia, mientras que la metilación en la posición N-2 no modifica sustancialmente el valor de τ_F comparándolo con el valor de τ_F del correspondiente alcaloide sin metilar. A su vez

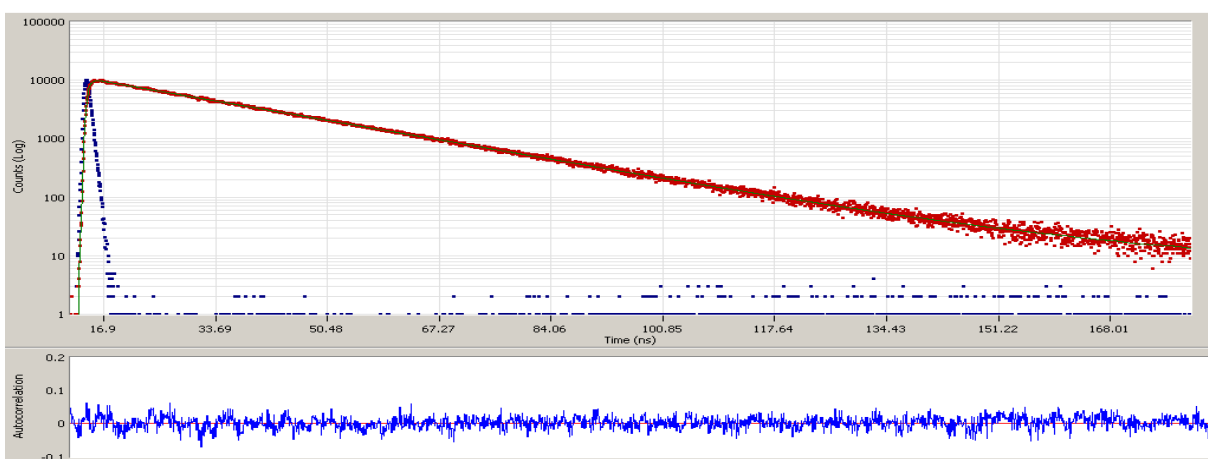
la di-metilación provoca un aumento de $\sim 10\%$ en el τ_F , lo cual va acompañado del ya mencionado aumento de su Φ_F .

(iii) En aquellos casos donde se cuenta con información de literatura (2-Me-nHo y 2-Me-Ha), es importante destacar que los valores obtenidos en este trabajo de tesis para las correspondientes sales cuaternarias (ioduros) de piridonio del tipo 2-Me- β Cs, son iguales, dentro del error experimental a los valores de literatura registrados a partir de las bases anhidras neutras y/o de sales cuaternarias, en ausencia de yoduro como contraión. Consecuentemente, el ion yoduro presente en la solución que analizamos no jugaría un rol relevante en la desactivación del estado S_1 de las sales estudiadas en esta Tesis.

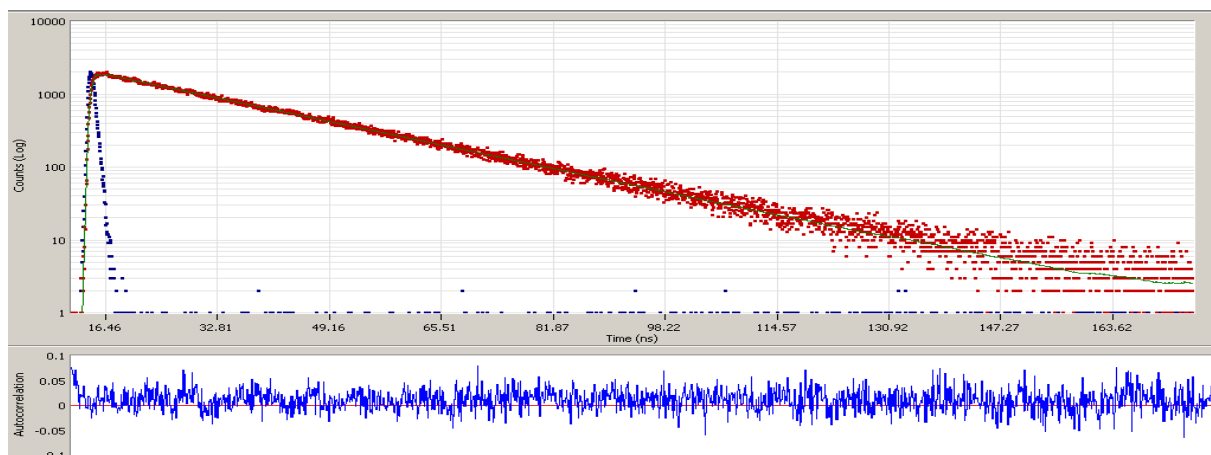
(a)



(b)



(c)



(d)

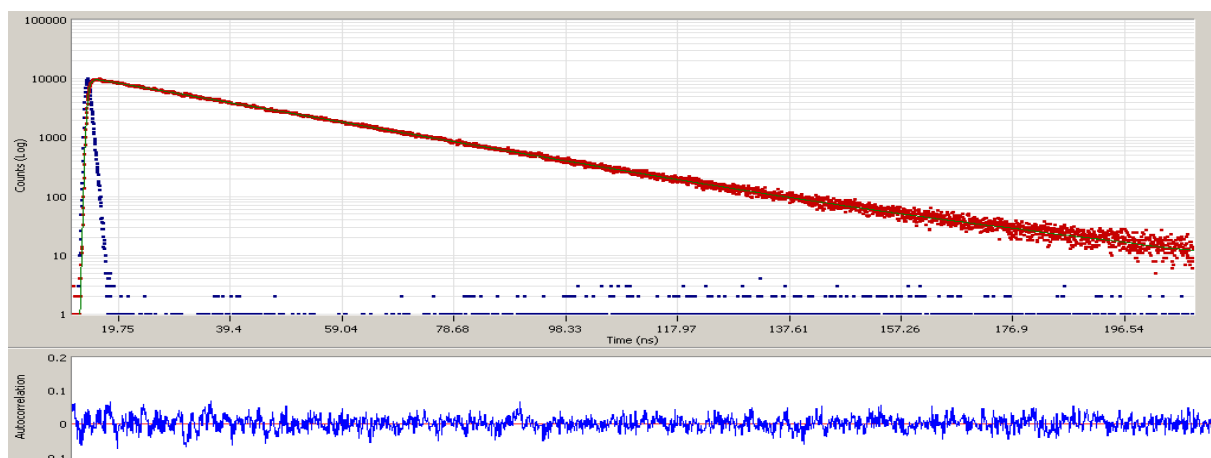
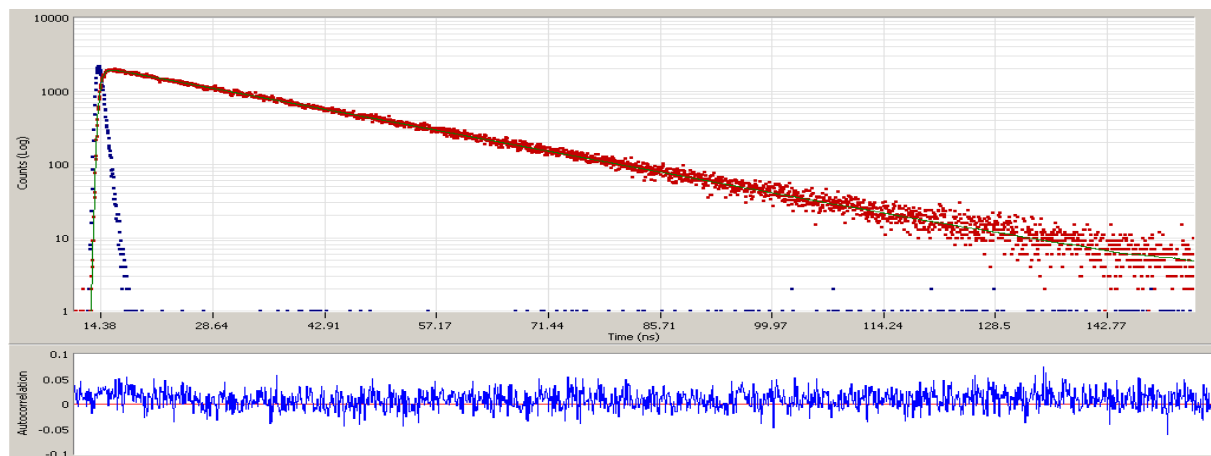
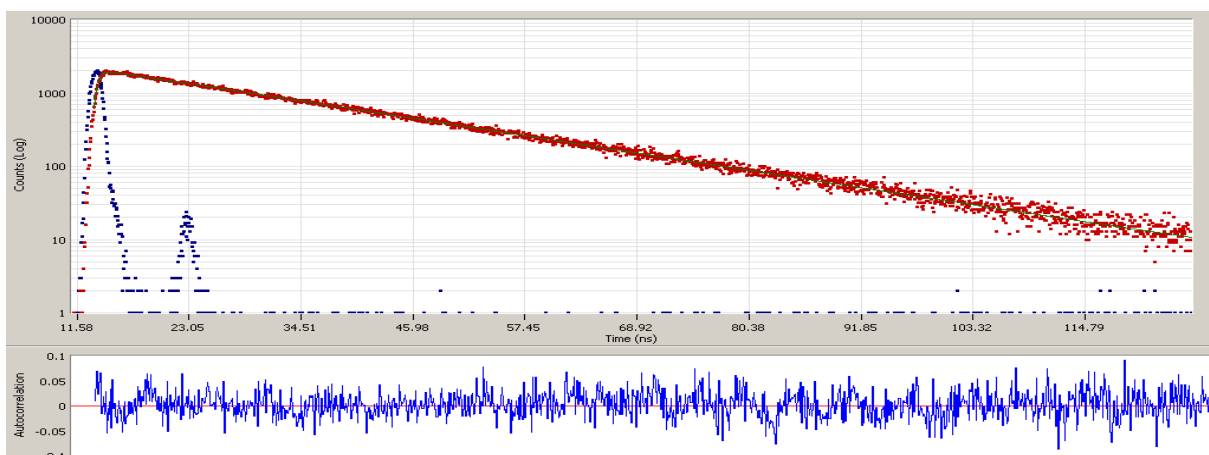


Figura 2.17. Variación de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo en solución acuosa. (a) nHo (pH 4,0, $\lambda_{\text{fluo}} = 450$ nm), (b) 2-Me-nHo (pH 7,6, $\lambda_{\text{fluo}} = 454$ nm), (c) 9-Me-nHo (pH 4,0, $\lambda_{\text{fluo}} = 458$ nm) y (d) 2,9-diMe-nHo (pH 3,2, $\lambda_{\text{fluo}} = 462$ nm). Decaimientos en escala logarítmica (en rojo) obtenidas excitando con $\lambda_{\text{exc}} = 341$ nm. Línea en verde representa el ajuste mono-exponencial. En el panel inferior de cada decaimiento se presenta la autocorrelación del ajuste correspondiente. Experimentos realizados utilizando el espectrofluorómetro II (sección 2.4.4.7).

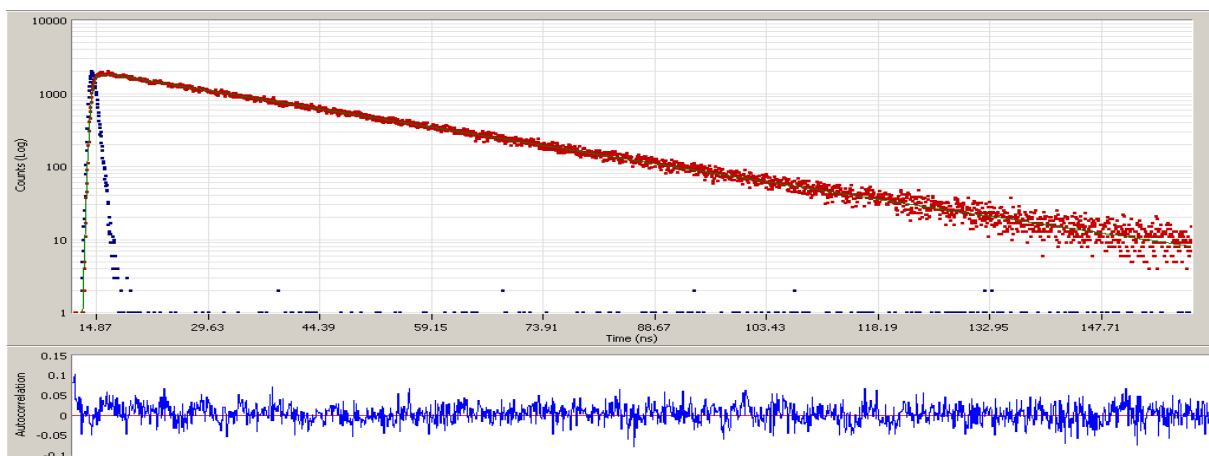
(a)



(b)



(c)



(d)

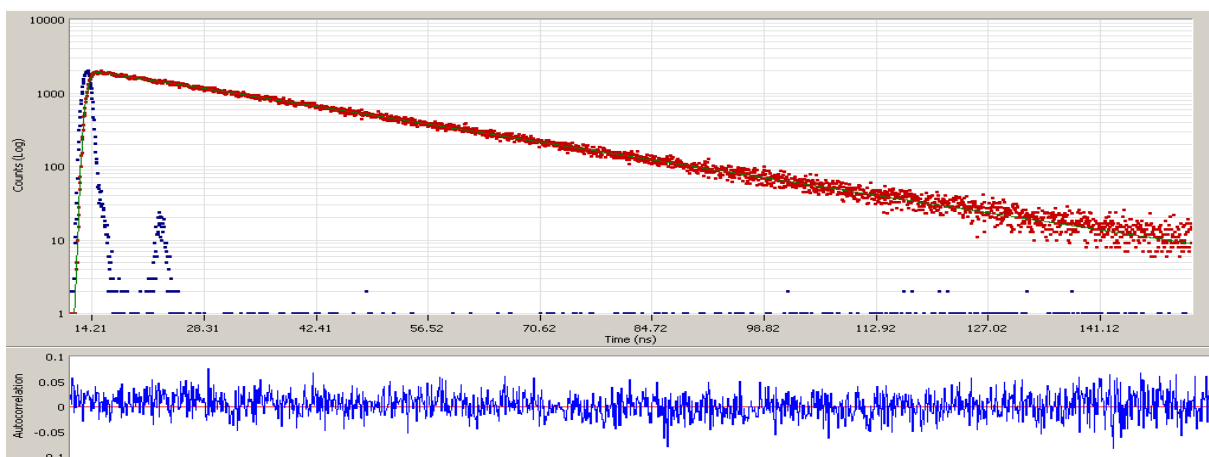
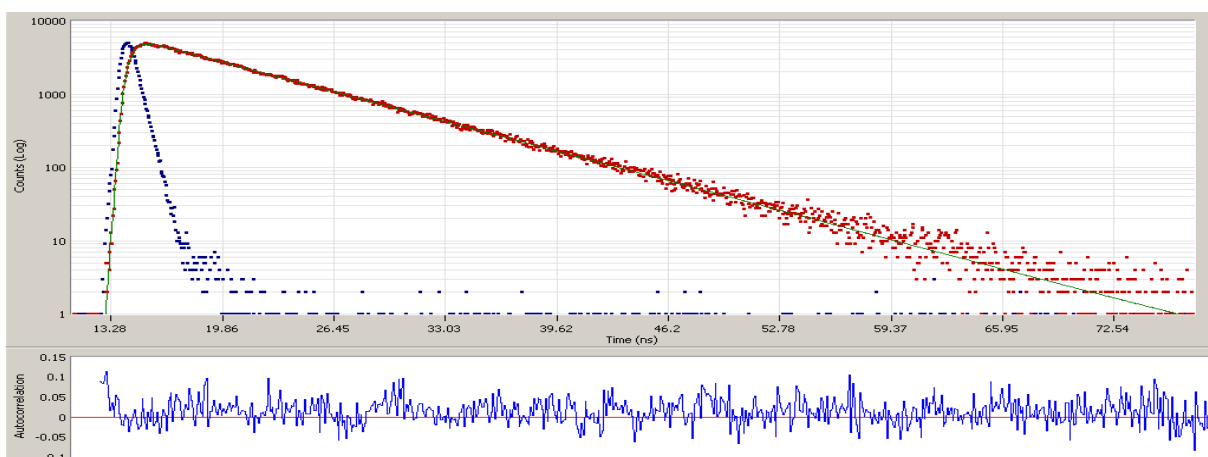
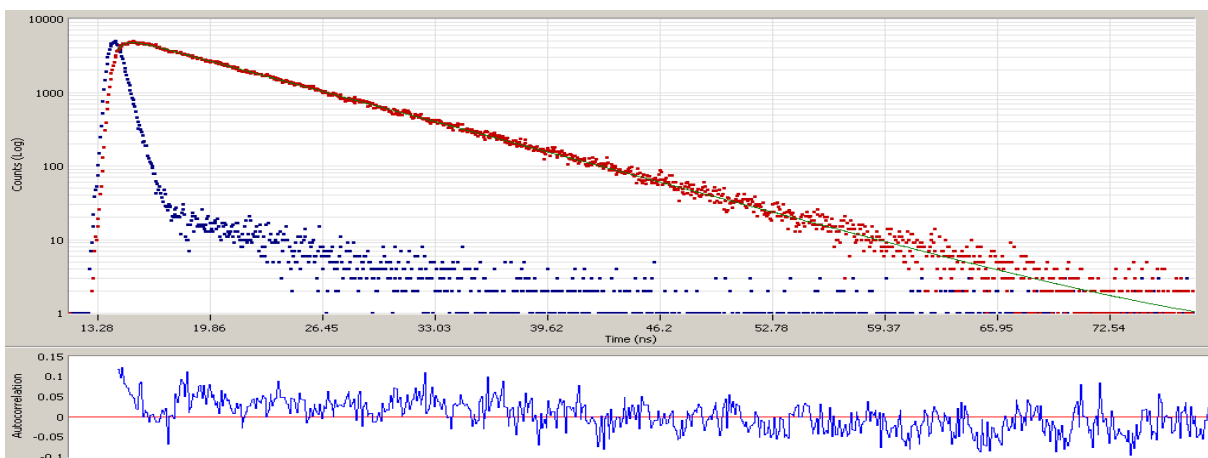


Figura 2.18. Variación de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo en solución acuosa. (a) Ho (pH 4,0, $\lambda_{exc} = 341$ nm, $\lambda_{fluo} = 431$ nm), (b) 2-Me-Ho (pH 4,0, $\lambda_{exc} = 388$ nm, $\lambda_{fluo} = 436$ nm), (c) 9-Me-Ho (pH 4,8, $\lambda_{exc} = 341$ nm, $\lambda_{fluo} = 444$ nm) y (d) 2,9-diMe-Ho (pH 4,3, $\lambda_{exc} = 388$ nm, $\lambda_{fluo} = 451$ nm). Decaimientos en escala logarítmica (en rojo) obtenidas excitando a $\lambda_{exc} = 341$ o 388 nm. Línea en verde representa el ajuste mono-exponencial. En el panel inferior de cada decaimiento se presenta la autocorrelación del ajuste correspondiente. Experimentos realizados utilizando el espectrofluorómetro II (sección 2.4.4.7).

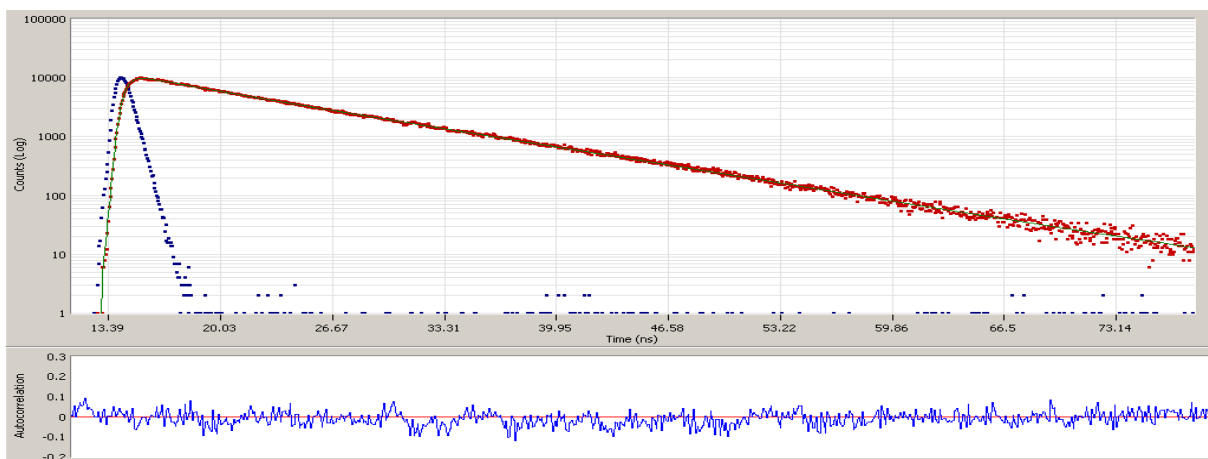
(a)



(b)



(c)



(d)

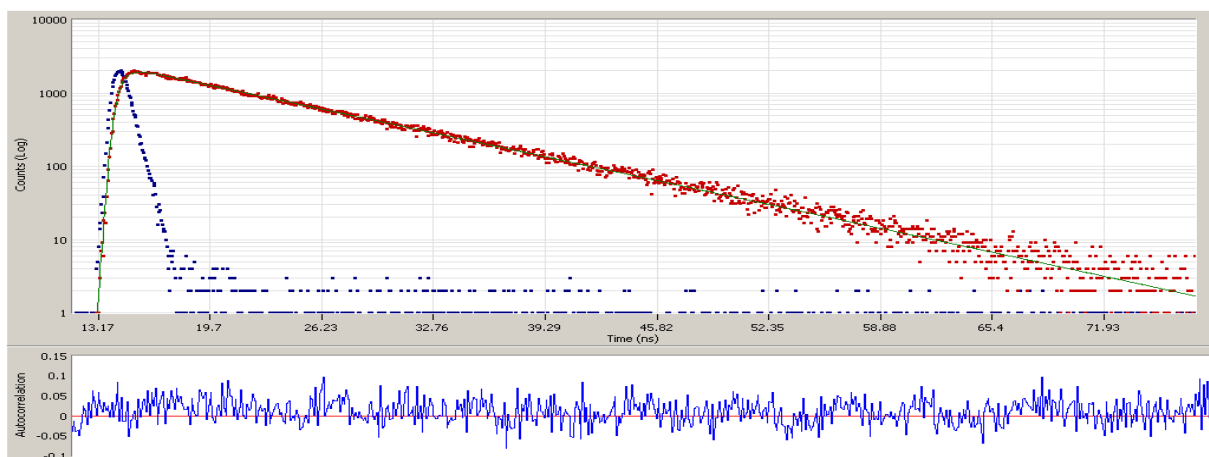


Figura 2.19. Variación de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo en solución acuosa. (a) Ha (pH 4,0, $\lambda_{\text{fluo}} = 415$ nm), (b) 2-Me-Ha (pH 4,1, $\lambda_{\text{fluo}} = 422$ nm), (c) 9-Me-Ha (a pH 4,0, $\lambda_{\text{fluo}} = 430$ nm) y (d) 2,9-diMe-Ha (pH 4,0, $\lambda_{\text{fluo}} = 430$ nm). Decaimientos en escala logarítmica (en rojo) obtenidas excitando a $\lambda_{\text{exc}} 341$ nm. Línea en verde representa el ajuste mono-exponencial. En el panel inferior de cada decaimiento se presenta la autocorrealción del ajuste correspondiente. Experimentos realizados utilizando el espectrofluorómetro II (sección 2.4.4.7).

Tabla 2.3. Valores promedio de tiempos de vida de fluorescencia (τ_F) de N-Me-nHo en solución acuosa (equilibradas en aire) obtenidos por ajuste no-lineal de medidas independientes. Con fines comparativos se incluyen los datos obtenidos de literatura para nHo y 9-Me-nHo.

Compuesto	pH	$\lambda_{\text{fluo}} / \text{nm}$	$\lambda_{\text{exc}} / \text{nm}$	$\langle \tau_F \rangle / \text{ns}$
nHo ^a	4,8	450	341	21,8
	1,0	460	355	21,2 ^b
	3,6	450		22,0 \pm 0,1 ^c
	10,0	450	341	20,9
2-Me-nHo	4,0	454	341	22,0 \pm 0,1
	2,0	455		22,9 \pm 0,2 ^c
	4,0	454	388	22,3 \pm 0,1
	7,6	454	341	22,2 \pm 0,1
9-Me-nHo ^a	4,0	458	341	23,1 \pm 0,3
	10,0	458	341	22,9 \pm 0,3
	10,0	385	341	2,1 \pm 0,2
2,9-diMe-nHo	4,0	462	341	25,65 \pm 0,05
	4,0	462	388	26,3 \pm 0,1
	7,6	462	341	25,75 \pm 0,05
	9,5	462	341	25,75 \pm 0,05
	9,5	462	388	26,0 \pm 0,2

^a Ref. [6]. ^b Ref. [9]. ^c Ref. [4].

Tabla 2.4. Valores promedio de tiempos de vida de fluorescencia (τ_F) de N-Me-Ho en solución acuosa (equilibradas en aire) obtenidos por ajuste no-lineal de medidas independientes. Con fines comparativos se incluyen los datos obtenidos de literatura para Ho y 9-Me-Ho.

Compuesto	pH	$\lambda_{\text{fluo}} / \text{nm}$	$\lambda_{\text{exc}} / \text{nm}$	$\langle \tau_F \rangle / \text{ns}$
Ho	4,0	431	341	$20,5 \pm 0,5^a$
	1,0	430, 460 y 490	337 y 355	$21,2^b$
	10,0	431	341	$20,1^b$
	10,0	369	341	$0,6^b$
2-Me-Ho	4,0	440	388	$20,95 \pm 0,05$
9-Me-Ho	4,8	444	341	$24,5^c$
	10,0	444	341	$23,8^c$
	10,0	374	341	$2,5^c$
2,9-diMe-Ho	4,3	450	388	$25,15 \pm 0,05$

^a Ref. [9]. ^b Ref. [10]. ^c Ref. [8].

Tabla 2.5. Valores promedio de tiempos de vida de fluorescencia (τ_F) de N-Me-Ha en solución acuosa (equilibradas en aire) obtenidos por ajuste no-lineal de medidas independientes. Con fines comparativos se incluyen los datos obtenidos de literatura para Ha.

Compuesto	pH	$\lambda_{\text{fluo}} / \text{nm}$	$\lambda_{\text{exc}} / \text{nm}$	$\langle \tau_F \rangle / \text{ns}$
Ha	4,0	416	341	$7,05 \pm 0,05$
	1,0	370, 400 y 450	337	$7,1^a$
		410, 430 y 450	337 y 355	$6,6 \pm 0,2^b$
	10,0	415	341	$6,95 \pm 0,05$
2-Me-Ha	10,0	358	341	$0,44 \pm 0,02$
	4,1	422	341	$7,0 \pm 0,1$
	1,0	410, 430 y 450	337 y 355	$6,5 \pm 0,2^b$
9-Me-Ha	4,0	430	341	$9,1 \pm 0,2$
	10,0	430	341	$9,1 \pm 0,1$
	10,0	365	341	$0,4 \pm 0,2$
2,9-diMe-Ha	4,0	430	341	$8,75 \pm 0,05$

^a Ref. [11]. ^b Ref. [9].

2.2.2.4. Producción de 1O_2

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) son un grupo de especies químicas altamente reactivas frente a compuestos orgánicos dentro del cual se encuentran, entre otras, el oxígeno singlete (1O_2), el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (HO^{\cdot}) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estas especies pueden generarse en procesos térmicos, fotoquímicos y/o enzimáticos[12,13] tal como se observa en diversos sistemas biológicos. Su rol biológico más difundido y ampliamente aceptado, es el de ser parte activa en el sistema inmunológico de respuesta celular contra la invasión microbiana del hospedador. Sin embargo, evidencia reciente indica que ciertas EROs juegan un papel clave como mensajeros en la transducción de señales celulares y en el ciclo celular.[13,14] Consecuentemente, investigar y cuantificar la

producción de EROs por biocompuestos como por ejemplo alcaloides naturales como las βCs, es de gran relevancia.

Se determinaron, mediante técnicas resueltas en el tiempo (sección 2.4.4.9), los rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete (Φ_{Δ}) de los 2-metil y 2,9-dimetil derivados de nHo, Ho y Ha. Las determinaciones se realizaron en soluciones de D₂O equilibradas en aire y en condiciones de pD 7,7. Se definió esta condición de trabajo ya que, en el rango de pH de interés ($4 < \text{pH} < 9$), las βCs sustituidas en la posición N-2 no presentan equilibrios ácido-base. Como sensibilizador de referencia se utilizó el ácido perinaftenona-2-sulfónico (PNS) ($\Phi_{\Delta} = 0,97 \pm 0,06$ en D₂O [15]).

En la Figura 2.21 se muestran, a modo de ejemplo, los decaimientos obtenidos para 2-Me-nHo y 2,9-diMe-nHo, junto con las determinaciones cuantitativas obtenidas para cada derivado estudiado. Los valores de Φ_{Δ} obtenidos para cada compuesto se listan en la Tabla 2.6 y los mismos se comparan con los valores descriptos en la literatura para los 9-metil derivados y las correspondientes βCs no sustituidas. Ciertamente, todos los derivados catiónicos de βCs investigados muestran una eficiencia de producción de oxígeno singlete relativamente baja ($0,08 < \Phi_{\Delta} < 0,16$). Además, dentro del error experimental, los valores detectados para estos derivados son iguales a los descriptos en la literatura para otros compuestos pertenecientes a esta familia de alcaloides (Tabla 2.6).[6,8] Este fenómeno podría sugerir que la función biológica de estos alcaloides podría estar asociada no a mecanismos de defensa fotoinducidos (vía EROs) como ha sido sugerido, sino quizás a mecanismos de señalización intracelular. Ciertamente, estos aspectos merecen ser explorados con mayor profundidad.

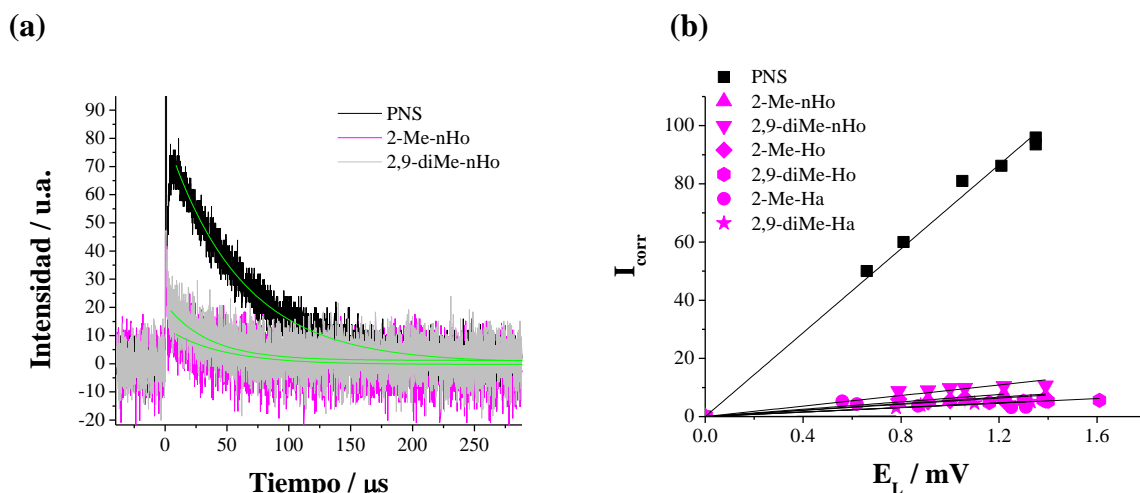


Figura 2.21. (a) Ejemplo representativo de los decaimientos de fosforescencia del 1O_2 (a 1270 nm) generado por excitación de soluciones en D_2O de βC (2-Me-nHo (magenta) y 2,9-diMe-nHo (gris)) y la referencia PNS (negro). (b) Intensidad de la señal de emisión de 1O_2 , corregida por la absorción, extrapolada a cero en función de la energía del láser ($\lambda_{exc} = 355$ nm).

Tabla 2.6. Resumen de los valores de rendimientos cuánticos de producción de oxígeno singlete determinados para los *N*-metil derivados de nHo, Ho y Ha. Con fines comparativos, se incluyen en la tabla los valores obtenidos para los derivados no sustituidos.

Compuesto	pD	Φ_A
nHo ^a	4 (βCH ⁺)	0,10 ± 0,01
	10 (βCN)	0,08 ± 0,01
2-metil-nHo	7,7 (βC-CH3 ⁺)	0,11 ± 0,03
9-metil-nHo ^a	4 (βCH ⁺)	0,10 ± 0,01
	10 (βCN)	0,08 ± 0,01
2,9-dimetil-nHo	7,7 (βC-CH3 ⁺)	0,16 ± 0,03
Ho ^a	4 (βCH ⁺)	0,09 ± 0,01
	10 (βCN)	0,10 ± 0,01
2-metil-Ho	7,7 (βC-CH3 ⁺)	0,10 ± 0,03
9-metil-Ho ^a	4 (βCH ⁺)	0,09 ± 0,01
	10 (βCN)	0,10 ± 0,01
2,9-dimetil-Ho	7,7 (βC-CH3 ⁺)	0,15 ± 0,03
Ha ^a	4 (βCH ⁺)	0,22 ± 0,01
	10 (βCN)	0,13 ± 0,01
2-metil-Ha	7,7 (βC-CH3 ⁺)	0,08 ± 0,03
9-metil-Ha	4 (βCH ⁺)	0,16 ± 0,02
	10 (βCN)	0,15 ± 0,03
2,9-dimetil-Ha	7,7 (βC-CH3 ⁺)	0,16 ± 0,03

^a Valores obtenidos de la referencia.[6,8]

2.3. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Los valores obtenidos para los principales parámetros fisicoquímicos y fotofísicos de los N-metil derivados de nHo, Ho y Ha se listan en la Tabla 2.7. En términos generales, los resultados obtenidos en este capítulo ponen en evidencia, una vez más, que las propiedades fisicoquímicas del anillo pirido-indólico dependen del tipo y la posición de los sustituyentes. Brevemente, todos los derivados catiónicos (es decir, aquellas β Cs sustituidas en N-2) muestran un comportamiento similar al de la forma protonada de su análogo no sustituido correspondiente. Ciertamente, la presencia de los grupos metilos induce variaciones en alguna o todas sus propiedades (pK_a , desplazamientos en los espectros de absorción y emisión, entre otras). Sin embargo, la fuerza con que se manifiestan estas variaciones depende fuertemente de la posición en la cual se encuentra localizado el sustituyente (N-2 o N-9). En particular, los efectos más relevantes se observan cuando la sustitución es en posición N-9.

Tabla 2.7. Recopilación de valores de distintas propiedades fotoquímicas y fotofísicas de nHo, Ho, Ha y sus respectivos N-metil-derivados obtenidos en este trabajo de Tesis. Entre paréntesis se indica la especie ácido-base predominante en cada pH de trabajo.

Compuesto	pK_a (S_o)	pH	λ_{abs} / nm^a	$\epsilon(\lambda) / 10^3 M^{-1} cm^{-1}^a$	λ_{fluor} / nm^b	Φ_F^c	τ / ns^c	Φ_A^d
nHo ^e	^(N-2) 7,2 ^f ^(N-9) 14,5 ^g	4 (βCH^+)	371	4,30 ± 0,01	448	0,70 ± 0,05	21,8	0,10 ± 0,01
		10 (βCN)	337 y 348	4,01 y 3,89 ± 0,01	~375, 448	0,21 ± 0,05	20,9	0,08 ± 0,01
2-metil-nHo	^(N-9) 10,9 ^g	4 ($\beta C-CH_3^+$)	374	4,18 ± 0,59	454	0,67 ± 0,02	22,2	0,11 ± 0,02
		9 ($\beta C-CH_3^+$)	374	4,18 ± 0,59	454	0,67 ± 0,02	22,2	
9-metil-nHo ^e	^(N-2) 6,3 ^f	4 (βCH^+)	384	4,84 ± 0,01	458	0,75 ± 0,05	23,1	0,10 ± 0,01
		10 (βCN)	349 y 362	5,06 y 5,25 ± 0,01	~385 y 458	0,68 ± 0,05	2,1 y 22,9	0,08 ± 0,01
2,9-dimetil-nHo	---	4 ($\beta C-CH_3^+$)	388	3,8 ± 0,1	462	0,74 ± 0,01	25,9	0,16 ± 0,02
		9 ($\beta C-CH_3^+$)	388	3,8 ± 0,1	462	0,74 ± 0,01	25,9	
Ho ^e	^(N-2) 7,4 ^f ^(N-9) 14,6 ^g	4 (βCH^+)	365	4,45 ± 0,01	431	0,85 ± 0,05	21,2 ^h	0,09 ± 0,01
		10 (βCN)	335 y 348	4,80 y 4,50 ± 0,01	~369, 431	0,47 ± 0,05	0,6 y 20,1 ^h	0,10 ± 0,01
2-metil-Ho	^(N-9) 11,20 ^g	4 ($\beta C-CH_3^+$)	368	4,0 ± 0,5	436	0,95 ± 0,02	21,0	0,10 ± 0,02
		9 ($\beta C-CH_3^+$)	368	4,0 ± 0,5	436	0,95 ± 0,02	21,0	
9-metil-Ho ^e	^(N-2) 6,6 ^f	4 (βCH^+)	377	5,03 ± 0,01	444	0,93 ± 0,05	24,5	0,09 ± 0,01
		10 (βCN)	346 y 360	4,36 y 4,25 ± 0,01	~374, 444	0,68 ± 0,05	2,5 y 23,8	0,10 ± 0,01
2,9-dimetil-Ho	---	4 ($\beta C-CH_3^+$)	380	4,1 ± 0,5	451	0,94 ± 0,02	25,2	0,15 ± 0,02
		9 ($\beta C-CH_3^+$)	380	4,1 ± 0,5	451	0,94 ± 0,02	25,2	
Ha ^e	^(N-2) 8,0 ^f ^(N-9) 14,5 ^g	4 (βCH^+)	350	7,86 ± 0,01	417	0,49 ± 0,05	7,0	0,22 ± 0,01
		10 (βCN)	325 y 336	5,35 y 4,68 ± 0,01	~356, 417	0,38 ± 0,05	0,4 y 7,0	0,13 ± 0,01
2-metil-Ha	^(N-9) 11,50 ^g	4 ($\beta C-CH_3^+$)	360	6,3 ± 0,5	422	0,47 ± 0,02	7,0 ⁱ	0,08 ± 0,02
		9 ($\beta C-CH_3^+$)	360	6,3 ± 0,5	422	0,47 ± 0,02	7,0	
9-metil-Ha	^(N-2) 7,1 ^f	4 (βCH^+)	363	6,83 ± 0,01	430	0,43 ± 0,04	9,1	0,16 ± 0,02
		10 (βCN)	336 y 347	5,24 y 4,92 ± 0,01	~365, 430	0,35 ± 0,03	0,4 y 9,1	0,15 ± 0,03
2,9-dimetil-Ha	---	4 ($\beta C-CH_3^+$)	368	6,8 ± 0,3	434	0,45 ± 0,02	8,7	0,16 ± 0,02
		9 ($\beta C-CH_3^+$)	368	6,8 ± 0,3	434	0,45 ± 0,02	8,7	

^a Máximos banda de menor energía. ^b Máximos de emisión. ^c Solución acuosa equilibrada en aire. ^d Solución de D₂O equilibrada en aire. ^e Ref. [6]. ^f pK_a^{N-2} del nitrógeno piridínico (N-2). ^g pK_a^{N-9} del nitrógeno indólico (N-9). ^h Ref. [10]. ⁱ Los valores obtenidos en este trabajo de tesis coinciden, dentro del error experimental con los valores previamente publicados en la literatura por Pardo *et al.* Ref. [9]

2.4. MATERIALES, MÉTODOS EXPERIMENTALES Y ANÁLISIS DE DATOS

2.4.1. Reactivos generales

(a) β-Carbolinas

*nor*Harmano, harmano y harmina fueron provistas por *Sigma-Aldrich*, con una pureza superior al 98 %, por lo cual se utilizaron sin posterior purificación.

(b) Reactivos generales empleados en las reacciones de síntesis y caracterización de metil derivados

Metanol, acetato de etilo y hexano (grado HPLC). Di-metil sulfóxido (DMSO) grado p.a. (PM 78,13 - Densidad 1,098 g/l) (Anedra Research AG S.A.), Ioduro de metilo (ICH₃, PM 141,94 - Densidad 2,26 kg/l) (Sigma-Aldrich), e hidróxido de sodio (granallas, Merck).

La preparación de las soluciones para resonancia magnética nuclear (RNM-¹H) se realizó con di-metil sulfóxido hexadeuterado (DMSO-d₆) (Sigma-Aldrich).

(c) Otros reactivos y solventes utilizados

HCl, H₂SO₄, e NaOH, (Merck), isopropanol y éter etílico (grado HPLC), D₂O (> 99,9 %) (Euriso-top o Aldrich), NaOD (> 99 %) (CEA o Aldrich), y DCI (99,5 %) (Aldrich). Placas de cromatografía analítica de capa delgada (CCD) Sílica gel 60 F₂₅₄ Merck. 9,10-difenilantraceno (9,10-DFA) (Sigma-Aldrich). Quinina bisulfato (Sigma). Ácido perinaftenona-2-sulfónico (PNS).[15]

Se utilizó agua calidad milliQ para la preparación de todas las soluciones acuosas (resistividad ~10 MΩ cm⁻¹) (Milli Q Reagent Water System).

2.4.2. Síntesis de N-metil derivados de β-carbolinas

La puesta a punto de los protocolos de síntesis se llevó a cabo en el laboratorio de la Dra. Erra-Balsells (Departamento de Química Orgánica, FCEN, UBA). Se desarrollaron y emplearon diferentes metodologías de síntesis para obtener selectivamente los 2, 9, y 2,9 N-metil derivados de βCs (Esquema 2.1), los cuales se aislaron, purificaron y caracterizaron mediante RMN-¹H y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

En general, para la síntesis de los N-metil derivados de βCs, se valió de la capacidad que posee el par de electrones *n* libres del nitrógeno piridínico, o del par de electrones del nitrógeno indólico que dispone el heterociclo al desprotonarse (cuando el pH

$> pK_a^{N-9}$), para reaccionar con un buen electrófilo como lo es el grupo metilo del ICH_3 , y producir mediante un mecanismo tipo sustitución nucleofílica, la unión $N-CH_3$.

2.4.2.1. Síntesis de 2-metil-βCs (2-Me-βCs)

Para la síntesis de los derivados metilados en posición N-2 de las βCs, se aprovechó el carácter nucleofílico del par de electrones n libres del N-piridínico para reaccionar con el grupo metilo del ICH_3 , y mediante un mecanismo de tipo sustitución nucleofílica, producir el catión tipo amonio (β-carbolínio) cuaternario ($\beta C-CH_3^+$), que posteriormente precipita como compuesto salino (ioduro) por baja solubilidad en el medio de reacción no acuoso, permitiendo así su separación y purificación por filtración, lavados y recristalización.

Brevemente el procedimiento consiste en agregar en un balón de reacción el compuesto de partida (nHo, Ho o Ha) y solubilizarlo por agitación a temperatura ambiente en metanol anhidro. A continuación, se añade un exceso de ICH_3 (relación molar 50:1, $ICH_3:\beta C$) y se mantiene el balón en la oscuridad durante 24 horas, a la espera de la precipitación de los cristales producto de la reacción.

La reacción se monitorea por cromatografía de capa delgada (CCD, Sílica gel 60 F_{254}), empleándose patrones para el monitoreo y evaluación del progreso de la reacción. Se emplea como fase móvil mezclas variables de solventes de diferentes polaridades (acetato de etilo y metanol). Una vez completada la reacción se observa en el balón la presencia de cristales típicos del producto de reacción (2-Me-βCs). Este compuesto analizado por CCD no presenta ni el R_f (relación frontal) ni la emisión fluorescente característica de la βC de partida, y si muestra en todos los casos un producto fluorescente que se mantiene retenido en el punto de siembra de la placa de CCD ($R_f = 0$). Este compuesto fluorescente permanece retenido en la fase estacionaria debido a que se trata de un compuesto salino no soluble en los solventes usados para el desarrollo del cromatograma CCD. Posteriormente, los cristales se filtran y se lavan 5 veces con metanol frío. Se recristalizan en metanol, obteniéndose cristales amarillos claros en forma de agujas de las sales (ioduros) de piridonio cuaternarias β-carbolínicas. Rendimiento general aproximado del 75-80%.

2.4.2.2. Síntesis de 9-metil-βCs (9-Me-βCs)

Para la síntesis de los derivados metilados en el nitrógeno indólico de β-carbolinas, se recurrió a un medio de reacción polar aprótico y fuertemente alcalino (pH mayor al pK_a^{N-9} de cada compuesto de partida), para así lograr tener desprotonado al nitrógeno

indólico de la βC de partida. La forma aniónica de la βC es capaz de reaccionar mediante una sustitución nucleofílica con el ICH₃.

Se disuelve NaOH en DMSO anhidro y se agrega el compuesto de partida (nHo, Ho o Ha). Se agita hasta observar aclaramiento de la mezcla a temperatura ambiente. Luego se añade ICH₃ (relación molar 1:1, ICH₃:βC) y se agita mientras se calienta a reflujo (~90°C) durante aproximadamente 2 hs, manteniendo el reactor en la oscuridad. El progreso de la reacción se controla mediante CCD. Una vez completada la reacción se deja enfriar y se añade H₂O (relación v/v 1:1, DMSO:H₂O). Posteriormente la mezcla acuosa se extrae con hexano en ampolla de decantación (x3); las fases orgánicas se recogen, se secan y filtran, y luego se evapora el solvente a presión reducida. Finalmente se obtienen cristales blancos en forma de pequeñas agujas productos de la síntesis de 9-Me-βCs. Rendimiento general aproximado del 80%.

2.4.2.3. Síntesis de 2,9-dimetil-βCs (2,9-diMe-βCs)

Para la obtención de los derivados 2,9-diMe-βCs el método de síntesis utilizado es el mismo al empleado para las 2-Me-βCs, pero empleando como material de partida los correspondientes 9-metil derivados de βCs previamente sintetizados. Rendimiento general aproximado del 60 %.

2.4.3. Caracterización de metil derivados βCs

2.4.3.1. Resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H)

Los datos obtenidos de los espectros de RMN proveen valiosísima información sobre la estructura de la molécula estudiada. Los espectros RMN fueron registrados a 298 K con un espectrómetro *Bruker AM-500 MHz*. Como solvente se utilizó di-metil sulfóxido hexadeuterado (DMSO-d₆) y soluciones de concentración aprox. de 20 mg/ml. Los corrimientos químicos fueron referidos al (CH₃)₂SO en DMSO-d₆ (δ = 2,50 ppm).

Los corrimientos químicos (δ / ppm) correspondientes a cada derivado de síntesis (Esquema 2.1) se listan a continuación:

2-Me-nHo: δ_H RMN-¹H (200 MHz, DMSO-d₆): 11, 62 (1H, s, H-N9), 9,36 (1H, s, H-1), 8,82 (1H, d, H-3), 8,65 (1H, d, H-4), 8,52 (1H, d, H-8), 7,84- 7,82 (2H, m, H-7 y H-5), 7,48 (1H, m, H-6), 4,50 (3H, s, CH₃).

9-Me-nHo: δ_H (500 MHz, DMSO- d_6): 9,85 (1H, s, H-1), 9,20 (1H, d, H-3), 9,09 (1H, dd, H-5), 8,95 (1H, dd, H-4), 8,52 (1H, d, H-7), 8,45 (1H, m, H-8), 8,11 (1H, t, H-6), 3,98 (3H, d, CH₃).

2,9-diMe-nHo: δ_H (200 MHz, DMSO- d_6): 9,66 (1H, s, H-1), 8,85 (1H, d, H-3), 8,69 (1H, dd, H-4), 8,55 (1H, dd, H-8), 7,95 (1H, d, H-7), 7,55 (1H, dd, H-6), 6,80 (1H, t, H-5), 4,51 (3H, s, CH₃), 4,11 (3H, s, CH₃).

2-Me-Ho: δ_H (200 MHz, DMSO- d_6): 12,81 (1H, s, H-N9), 8,64 (2H, dd, H-3 y H-8), 8,47 (1H, d, H-4), 7,80 (2H, dd, H-5 y H-7), 7,46 (1H, m, H-6), 4,37 (3H, s, CH₃-N2), 3,08 (3H, s, CH₃).

9-Me-Ho: δ_H (200 MHz, DMSO- d_6): 8,24 (2H, dd, H-3 y H-8), 8,04 (1H, d, H-4), 7,60 (2H, dd, H-5 y H-7), 7,28 (1H, m, H-6), 4,21 (3H, s, CH₃-N9), 3,10 (3H, s, CH₃).

2,9-diMe-Ho: δ_H (200 MHz, DMSO- d_6): 8,69 (2H, d, H-3 y H-8), 8,49 (1H, m, H-4), 7,89 (2H, m, H-5 y H-7), 7,49 (1H, m, H-6), 4,40 (3H, s, CH₃-N2), 4,30 (3H, s, CH₃-N9), 3,25 (3H, s, CH₃).

2-Me-Ha: δ_H (200 MHz, DMSO- d_6): 12,65 (1H, s, H-N9), 8,52 (2H, dd, H-3 y H-4), 8,33 (1H, d, H-5), 7,11 (1H, dd, H-8), 7,05 (1H, dd, H-6), 4,32 (3H, s, CH₃-N2), 3,96 (3H, s, OCH₃), 3,03 (3H, s, CH₃).

9-Me-Ha: δ_H RMN-¹H (200 MHz, DMSO- d_6): 8,11 (2H, dd, H-3 y H-4), 7,86 (1H, dd, H-5), 7,20 (1H, d, H-8), 6,86 (1H, dd, H-6), 4,13 (3H, s, CH₃-N9), 3,92 (3H, s, OCH₃), 3,01 (3H, s, CH₃).

2,9-diMe-Ha: δ_H (200 MHz, DMSO- d_6): 8,62 (1H, d, H-3), 8,50 (1H, d, H-4), 8,35 (1H, d, H-5), 7,42 (1H, d, H-8), 7,09 (1H, dd, H-6), 4,34 (3H, s, CH₃-N2), 4,27 (3H, s, CH₃-N9), 3,99 (3H, s, OCH₃), 3,22 (3H, s, CH₃).

2.4.3.2. Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC)

Se empleó un equipo *Waters 1525* provisto de dos bombas y un detector de fluorescencia *Waters 2475* (multi- λ). Como fase estacionaria se utilizó una columna de fase reversa (C-18), *Grace SmartTM RP 18* (250 x 4,6 mm, 5 μ m), y como fase móvil, una mezcla 50/50 (v/v) de solución acuosa de ácido fórmico (0,08% (v/v), pH 3,2) y MeOH, a un flujo isocrático de 1 ml min⁻¹.

2.4.4. Fotoquímica y fotofísica de metil derivados β -carbolínicos

2.4.4.1. Preparación de soluciones

Las soluciones de β Cs se prepararon equilibradas en aire disolviendo el sólido correspondiente en agua libre de iones metálicos (agua milliQ). Cuando fue necesario aumentar la solubilidad se valió del agregado de pequeños volúmenes de HCl diluido. Como se mencionó anteriormente, en medio ácido, estos alcaloides presentan el N piridínico (N-2) protonado, lo que hace que su disolución esté más favorecida que en medio neutro o alcalino. Posteriormente, se llevaron a volumen final mediante el uso de matraces y se almacenaron en frascos color caramelo para evitar la exposición a la luz.

Ciertas condiciones experimentales tales como pH y concentración inicial de las soluciones, fueron dependientes del experimento en el cual serían empleadas. Todas las concentraciones de β Cs en solución fueron determinadas por espectrofotometría de absorción UV-visible, excepto las utilizadas en la determinación de los coeficientes de absorptividad molar donde se empleó gravimetría. Las concentraciones de ácido y álcali utilizadas para llevar a valores seleccionados de pH variaron entre 0,05 y 2,0 M. Las medidas de pH se realizaron en un pH-metro *ALTRONIX[®] TPX-III*, el cual se calibró utilizando soluciones amortiguadoras (*buffers*) comerciales de pH 4,00, 7,00 y 10,00.

2.4.4.2. Espectroscopía de absorción UV-visible

Se registraron en un espectrofotómetro *Perkin-Elmer λ 25*, de doble haz, el cual permite obtener espectros en el intervalo de λ comprendido entre 200 y 900 nm y está provisto de un programa adecuado para registrar, almacenar y analizar espectros. Se utilizaron celdas de cuarzo, *Quartz suprasil*, (*Hellma*), de diferentes caminos ópticos según la absorbancia de la muestra a analizar.

2.4.4.3. Determinación del coeficiente de absorción molar

Para determinar cuantitativamente la concentración de una solución midiendo la cantidad de luz que ésta transmite, se necesita una relación matemática entre la concentración de la solución y su transmisión de luz. Dicha relación está dada por la ley de Lambert-Beer (ecuación 2.4.1).[16]

Esta ley es una modificación de la deducida por Lambert que se aplica a la transmisión de luz monocromática por sólidos homogéneos, y que, adaptada a soluciones, puede expresarse con la siguiente ecuación:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) l C \quad (2.4.1)$$

donde $A(\lambda)$ es la absorbancia de la solución a una longitud de onda dada, l el camino atravesado por la radiación, C la concentración de la sustancia estudiada y $\varepsilon(\lambda)$ el coeficiente de absorción molar a la misma longitud de onda, el cual es una constante característica de la sustancia absorbente a la longitud de onda utilizada. $\varepsilon(\lambda)$ se expresa preferentemente en $M^{-1}cm^{-1}$, sin embargo, alternativamente se puede utilizar con unidades de cm^2mol^{-1} indicando que este coeficiente es una sección transversal molar para absorción.[17] Cuanto mayor es el mismo, mayor es la atenuación de la intensidad del haz transmitida por la solución.

Para determinar los valores de los coeficientes de absorción molar ($\varepsilon(\lambda)$) de los compuestos estudiados se procedió de la siguiente manera:

- (i) Se pesó una cierta cantidad de sólido en una balanza analítica electrónica. La masa pesada fue mayor a 1 mg para minimizar el error en la pesada.
- (ii) Se disolvió la solución en agua y se llevó a volumen en un matraz.
- (iii) Utilizando HCl y/o NaOH se fijó el pH. El volumen agregado de álcali o ácido se consideró para calcular la nueva concentración de la solución.
- (iv) Se tomó un espectro de absorción de la sustancia en una celda de camino óptico conocido. En todos los casos se eligieron condiciones tales que la absorbancia medida estuviera comprendida entre 0,1 y 1, intervalo de valores para el cual los errores en la determinación de la absorbancia son menores.
- (v) Con el valor de la absorbancia a la longitud de onda de interés, el camino óptico (l) y la concentración (C calculada por pesada), se calculó el $\varepsilon(\lambda)$ de cada compuesto a un determinado pH y longitud de onda empleando la ecuación 2.4.1 (ley de Lambert-Beer).

2.4.4.4. Determinación espectrofotométrica de pK_a

Entre los numerosos métodos analíticos diseñados para el estudio de los equilibrios ácido-base y la determinación de sus respectivas constantes de disociación ácida (K_a), se destaca la titulación espectrofotométrica. Esta técnica se basa, en el análisis de la variación del espectro de absorción de una solución de la sustancia en estudio cuando se modifica el pH de la misma, sin cambiar su concentración.[18,19] A continuación se describen las consideraciones generales, junto a la deducción de la ecuación empleada en la titulación espectrofotométrica llevada a cabo.

Un equilibrio ácido-base puede representarse mediante la siguiente reacción:



donde HA representa a la forma ácida y A^- a la forma alcalina; y K_a es la constante de equilibrio de esta reacción o constante de disociación ácida.

Sobre consideraciones sencillas basadas en el equilibrio entre dos formas ácido-base de una sustancia, puede deducirse una ecuación que vincula la absorbancia de la solución, a determinada longitud de onda, con el pH:

$$A_T = C_{\text{total}} \times (10^{-\text{pH}} \varepsilon(\lambda)_{\text{HA}} + K_a \varepsilon(\lambda)_{\text{A}^-}) / (10^{-\text{pH}} + K_a) \quad (2.4.3)$$

donde A_T es la absorbancia de la solución a una longitud de onda determinada; $\varepsilon(\lambda)_{\text{HA}}$ y $\varepsilon(\lambda)_{\text{A}^-}$ son los coeficientes de absorción molar, a dicha longitud de onda, de las formas ácida y alcalina respectivamente; y K_a es la constante de disociación ácida del compuesto (HA).

La ecuación 2.4.3 permite plantear la absorbancia total de la solución (A_T), a una determinada longitud de onda, como una función del pH. Se llega a dicha ecuación considerando que las únicas especies que absorben luz en la región del espectro analizada son las formas ácida y alcalina de la molécula cuya K_a se quiere averiguar. Por lo que pueden plantearse las siguientes ecuaciones:

$$A_{\text{HA}} = \varepsilon(\lambda)_{\text{HA}} \cdot [\text{HA}] \quad (2.4.4)$$

$$A_{\text{A}^-} = \varepsilon(\lambda)_{\text{A}^-} \cdot [\text{A}^-] \quad (2.4.5)$$

$$A_T = A_{\text{HA}} + A_{\text{A}^-} = \varepsilon(\lambda)_{\text{HA}} \cdot [\text{HA}] + \varepsilon(\lambda)_{\text{A}^-} \cdot [\text{A}^-] \quad (2.4.6)$$

donde A_{HA} y A_{A^-} son las absorbancias de las formas ácida y alcalina respectivamente, $\varepsilon(\lambda)_{HA}$ y $\varepsilon(\lambda)_{A^-}$ son, como ya se mencionó, los coeficientes de absorción molar de las formas ácida y alcalina a una longitud de onda determinada, respectivamente y, por último, $[HA]$ y $[A^-]$ son las correspondientes concentraciones molares.

La constante de disociación ácida de equilibrio representado en la ecuación (2.4.2) viene dada por la siguiente expresión:

$$K_a = [H^+] \cdot [A^-] / [HA] \quad (2.4.7)$$

Además se define la concentración total o analítica (C_{total}) como la sumatoria de las concentraciones de las dos formas ácido-base:

$$C_{total} = [HA] + [A^-] \quad (2.4.8)$$

despejando $[HA]$ de (2.4.8) y reemplazándolo en (2.4.6) se obtiene:

$$A_T = \varepsilon(\lambda)_{HA} \cdot (C_{total} - [A^-]) + \varepsilon(\lambda)_{A^-} \cdot [A^-] \quad (2.4.9)$$

despejando $[HA]$ de (2.4.8), reemplazándolo en (2.4.7) y luego despejando $[A^-]$ se obtiene una expresión que relaciona $[A^-]$ y C_{total} .

$$[A^-] = C_{total} \cdot K_a / (K_a + [H^+]) \quad (2.4.10)$$

reemplazando esta expresión (2.4.10) en (2.4.9) se obtiene:

$$A_T = \varepsilon(\lambda)_{HA} \cdot (C_{total} - C_{total} \cdot K_a / (K_a + [H^+])) + \varepsilon(\lambda)_{A^-} \cdot C_{total} \cdot K_a / (K_a + [H^+]) \quad (2.4.11)$$

reordenando los términos y reemplazando $[H^+]$ por 10^{-pH} se obtiene finalmente la ecuación (2.4.3).

En el presente trabajo de tesis, los valores de pK_a de los derivados metilados β Cs estudiados fueron determinados mediante la técnica de titulación espectrofotométrica, por lo que a continuación se describen los detalles experimentales empleados. Asimismo dicho procedimiento se modificó para el estudio de la variación del pK_a^{N-9} del 2-Me-nHo en función de la fuerza iónica de la solución, empleando diferentes concentraciones de NaCl para tal fin.

Se prepararon soluciones de concentración conocida (solución madre), pesando cantidades adecuadas de la β C en estudio y luego disolviéndola en soluciones acuosas de

HCl diluido (pH ~5 - 6). Esto se realiza para favorecer la disolución, debido a que en medio ácido, todas las βCs en estudio se encuentran en su forma catiónica, y por ende su solubilidad es mayor que en soluciones neutras y alcalinas. La concentración de la solución madre se ajustó de manera tal que las absorbancias de las soluciones finales fueran adecuadas para realizar las medidas en el espectrofotómetro empleado. Típicamente, se prepararon soluciones de concentración final entre 35 - 100 μM, las cuales presentan valores de absorbancia comprendidos en el intervalo deseado (0,2 - 0,5), dependiendo de la naturaleza del compuesto estudiado. Para el estudio del pK_a^{N-9} del 2-Me-nHo en función de la concentración de NaCl, a la solución madre previamente se le disolvió la cantidad necesaria de NaCl para obtener al final la concentración deseada del mismo.

La solución madre (con o sin NaCl dependiendo del ensayo) se dividió en alícuotas. Una de las alícuotas se la dejó a pH ~5 y a la otra se la llevó a pH ~14 mediante el agregado de pequeños volúmenes de solución acuosa concentrada de NaOH. En todos los casos este agregado se realizó empleando micropipetas, siendo los volúmenes adicionados menores al 0,5 % del volumen total del sistema. Teniendo en cuenta esta condición, puede considerarse que el aumento del volumen, al fijar el pH de la solución, es despreciable y, por ende, la concentración no varía respecto a la solución madre.

Luego se realizó una mezcla de ambas soluciones en proporciones definidas, para ir ajustando el pH a un valor deseado, este valor se registró por medio de un de pH-metro. Una vez alcanzado el pH deseado se tomó el espectro de absorción de la solución. Repitiendo este procedimiento, mezclando las soluciones en proporciones diferentes, se prepararon sucesivas alícuotas de pH diferentes, y a cada una de ellas se le registró el espectro de absorción. De esta manera, mediante la mezcla de las soluciones madres de distinto pH en distintas proporciones, se logra modificar el pH de la solución en un amplio intervalo, sin modificar la concentración de la sustancia cuya K_a se quiere determinar.

En todos los casos, se empleó como blanco una solución de agua (milli Q) y se grabaron los espectros obtenidos entre 200 y 500 nm. Para todas las medidas, se emplearon celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Posteriormente, se graficaron los espectros de absorción obtenidos. Se analizaron los puntos isobésticos con el fin de evaluar la cantidad de formas ácido-base presentes en el intervalo de pH estudiado. También se determinaron las zonas del espectro que presentaron los mayores cambios en la absorbancia de las soluciones al variar el pH. Se realizaron gráficos de absorbancia en función del pH a distintas longitudes de onda, las cuales se escogieron dentro de las zonas de mayor cambio

de absorbancia. Sobre la base de estos resultados experimentales, se realizó para cada longitud de onda analizada el ajuste no lineal empleando la ecuación 2.4.3 y el programa *OriginPro*, (versión 8.0) obteniéndose valores promedios de K_a con su correspondiente desviación estándar.

2.4.4.5. Espectroscopía de emisión fluorescente

Se utilizaron dos equipos diferentes:

Equipo I: *Fluoromax4 (HORIBA Jobin Yvon)*. Medidas de estado estacionario (espectros de emisión, espectros de excitación). Consta de una lámpara de Xenón pulsada, un monocromador de excitación que focaliza el haz sobre la cubeta, un monocromador de emisión, como detector un fotomultiplicador *R928* y un programa de adquisición de datos *FluorEssence™* basado en el sistema operativo *Windows*.

Equipo II: *FluoroLog-3 Time Correlated Single Photon Counting, FL3 TCSPC-SP, (Horiba Jobin Yvon)*. Medidas de estado estacionario y también medidas resueltas en el tiempo (determinación de tiempos de vida de estados excitados). Para realizar los espectros de emisión en estado estacionario utiliza una lámpara estacionaria de alta presión de Xenón (450 W), un monocromador de excitación, un monocromador de emisión *iHR320*, un fotomultiplicador *R928P* como detector y el programa de adquisición de datos *FluorEssence™*.

Debido a que la sensibilidad del detector y la eficiencia de los monocromadores varían con la longitud de onda, los espectros de emisión obtenidos deben corregirse por lo que se denomina “respuesta del instrumento”. Esta corrección se realiza dividiendo la señal de emisión de la muestra por la respuesta del instrumento. Ambos equipos poseen programas adecuados para la corrección de las señales.

En todos los experimentos realizados con estos equipos, se utilizaron celdas para fluorescencia de cuarzo (*Hellma*) de 1 cm x 1 cm o 1 cm x 0,4 cm, según las necesidades de la medida. Las medidas se realizaron a temperatura ambiente. Los espectros fueron registrados excitando la banda de menor energía de las β Cs. Asimismo, a modo de control, se registraron los espectros de absorción UV-visible de las soluciones antes y después de las correspondientes medidas de fluorescencia. Cabe aclarar que en ningún caso se observó cambio alguno, por lo que se concluye que no se produce reacción fotoquímica detectable, con esta técnica, durante la ejecución de estas medidas.

2.4.4.6. Determinación de rendimientos cuánticos de fluorescencia Φ_F

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia de todos los analitos fueron obtenidos en solución acuosa, en dos rangos de pH (4,0 - 5,0 y 9,0 - 10,0), en atmósfera de aire. Las longitudes de onda de excitación correspondieron, en cada caso, a la banda de menor energía. En el caso del nHo se utilizaron como referencias el 9,10-difenilantraceno (9,10-DFA) en ciclohexano ($\Phi_F = 0,95$)[20] y quinina bisulfato en H₂O-H₂SO₄ 0,1 M ($\Phi_F = 0,57$).[21] Los rendimientos cuánticos de las demás βCs fueron determinados utilizando nHo en solución acuosa de HCl diluido (pH ~4) como referencia ($\Phi_F = 0,70$).[9,22]

Para el cálculo del parámetro Φ_F , se registraron en iguales condiciones los espectros de emisión corregidos de la sustancia utilizada como referencia y del analito en estudio, los que se correlacionan mediante la ecuación 2.4.13:[23,24]

$$\Phi_{F,m} = [(A_r I_{F,m} n_m^2) / (A_m I_{F,r} n_r^2)] \Phi_{F,r} \quad (2.4.13)$$

Donde los subíndices r y m se refieren a la referencia y a la muestra, respectivamente, Φ_F es el rendimiento cuántico de fluorescencia, A es la absorbancia a la longitud de onda de excitación, I_F es la intensidad de fluorescencia, medida como el área debajo del espectro de fluorescencia corregido, y n es el índice de refracción del solvente. Esta última corrección minimiza el efecto de cambio de intensidad de la luz debido a la refracción y reflexiones internas de la celda.

Las absorbancias de las muestras y referencias fueron igualadas a la longitud de onda de excitación, a valores menores que 0,1, para evitar los efectos de filtro interno y permitiendo, además, despreciar las diferencias en los valores de los índices de refracción del solvente puro y la solución.

2.4.4.7. Determinación de los tiempos de vida de fluorescencia

En esta técnica, se excita la muestra con un pulso de luz muy corto de λ apropiada y se registra el decaimiento de la fluorescencia en función del tiempo. El pulso de luz produce un cierto número de moléculas en estado singlete excitado (M*). La velocidad con que decrece M* puede describirse con la ecuación 2.4.14:

$$M_t^* = M_0^* \exp(-k_F t) \quad (2.4.14)$$

donde k_F es el coeficiente de velocidad de emisión espontánea, y es la sumatoria de todas las vías de decaimiento del estado excitado singlete. M_t^* y M_0^* son el número de moléculas en estado excitado a un tiempo t y 0 , respectivamente. Por tanto, la intensidad de fluorescencia, que es proporcional al número de moléculas en el estado excitado, decaerá exponencialmente.

El τ_F se define como el tiempo requerido para que la intensidad de fluorescencia alcance $1/e$ de su valor inicial. Es decir:

$$k_F = 1 / \tau_F \quad (2.4.15)$$

La fuente de excitación utilizada en este tipo de determinación consistió en dos nano-LED de máximo de emisión 341 nm y 388 nm, longitudes de onda que incluyen a las bandas de menor energía de ambas formas ácido-base de las β Cs y la de sus derivados metilados. El equipo empleado para estas medidas fue en **II**, donde los fotones emitidos, después de su pasaje por el monocromador *iHR320*, fueron detectados por un detector TBX-04 conectado a una fuente de alimentación TBX-PS y contados por un módulo *FluoroHub-B* controlado por el programa *DataStation*. En todos los experimentos realizados, la ventana de tiempo seleccionada fue de 0-200 ns. Los decaimientos de fluorescencia fueron monitoreados a los máximos de emisión de cada compuesto a analizar. Los datos fueron deconvolucionados de la señal de la fuente de excitación, obtenida por excitación de una suspensión de Ludox, utilizando el software DAS6, provisto por *Horiba Jobin Yvon*.

2.4.4.8. Espectroscopía de excitación fluorescente

Se registraron espectros de excitación empleando el equipo **I** previamente descrito. En este caso, el equipo consta de un fotodiodo de referencia que corrige la señal.

2.4.4.9. Producción de oxígeno singlete

En este capítulo, se ha estudiado la producción de 1O_2 por parte de las N-metil- β Cs, mediante el empleo de técnicas cinéticas resueltas en el tiempo. En el caso de la 9-Me- β Cs las medidas se llevaron a cabo en el *Center for Oxygen Microscopy and Imaging, Aarhus University*, Dinamarca, en colaboración con el Dr. P. R. Ogilby (Equipo III). Asimismo, las medidas realizadas para los N-metil derivados catiónicos, fueron en colaboración con el

Dr. P. M. David-Gara en el Centro de Investigaciones Ópticas (CIOp – CONICET – CIC, Equipo IV). Los equipos se detallan a continuación:

Equipo III: Consta de un láser Nd:YAG (*Quanta-Ray GCR 230*), que opera a 10 Hz, cuyo haz de salida fundamental (1064 nm) se triplica para generar un haz de salida correspondiente al tercer armónico del mismo (a 355 nm). La duración del pulso generado es de aproximadamente 5 ns. Se utiliza un prisma *Pellin-Broca* para separar el haz fundamental, el segundo y el tercer armónico entre sí. La energía del láser requerida para cada experimento se obtiene reduciendo la intensidad total del haz de salida empleando filtros de densidad neutra o cambiando la energía de la lámpara de flash usada para bombear el láser. Finalmente, la intensidad de energía es determinada utilizando un medidor de energía digital *FieldMax-TO (Coherent)*. [8]

La señal fosforescente del $^1\text{O}_2$ emitida desde la muestra se registró con un detector de Germanio enfriado con nitrógeno líquido (*North Coast EO-817P*) posicionado a 90° respecto del haz del láser incidente en la solución. La eficiencia de colección de la señal fue incrementada por acción de un espejo parabólico colocado detrás de la celda de cuarzo que contenía las muestras. La señal emergente del detector se hizo pasar a través de un filtro *Si-filter (CVI optics)* con el objeto de remover la luz visible, y de un filtro de banda (1270 nm *bandpass filter*, de 50 nm de ancho de banda) para aislar la señal de emisión fosforescente del $^1\text{O}_2$.

Equipo IV: Consta de un láser Nd:YAG (*Surelite II continuun*), que opera a diferentes frecuencias y cuya duración del pulso es de aproximadamente 7 ns. El haz de salida fundamental de 1064 nm se triplica y selecciona mediante un prisma *Pellin-Broca* para generar un haz de salida correspondiente al tercer armónico del mismo (355 nm). La energía del láser requerida para cada experimento se obtiene reduciendo la intensidad total del haz de salida empleando filtros de densidad neutra. Finalmente, la intensidad de energía es determinada utilizando un medidor de energía digital. La señal fosforescente del $^1\text{O}_2$ emitida desde la muestra se registro a 90° respecto al haz del laser incidente. Previamente antes de ser detectada paso través de un filtro de metal de silicio recubierto de 5 mm de espesor anti-reflectante (que permite el pasaje de longitudes de onda $> 1,1 \mu\text{m}$) y un filtro de interferencia (de 50 nm de ancho de banda a 1270 nm) y por un preamplificador de baja impedancia. Posteriormente se detecto la señal por un fotodiodo de Germanio (*Applied Detector Corporation*), posee un tiempo de resolución 1 μs . Las

señales se adquirieron como el promedio de 64 pulsos, con un osciloscopio digital 500 MHz *Agilent Infiniium* y se transfirieron a una computadora para su posterior análisis.

En los estudios de producción de $^1\text{O}_2$, se utilizó D_2O en lugar de H_2O como solvente. Las concentraciones se calcularon midiendo la absorbancia de las soluciones y empleando los correspondientes valores de $\varepsilon(\lambda)$. Previamente, se controló que los espectros de absorción y los correspondientes valores de $\varepsilon(\lambda)$ fueran iguales en ambos solventes.

El pD ($-\log [\text{D}^+]$) fue medido con el mismo pH-metro que el usado para las soluciones en H_2O . Se procuró que el electrodo estuviera bien seco, para evitar la introducción de H_2O en las soluciones. Los valores de pD se calcularon aplicando la siguiente corrección a cada medida:[25]

$$\text{pD} = \text{pH} + 0,4$$

donde pH es el valor leído en el pH-metro. El pD fue ajustado mediante el agregado de pequeños volúmenes de soluciones relativamente concentradas de NaOD y DCl en D_2O .

Las soluciones de N-Me-βCs en D_2O se irradiaron con los láseres de ns descritos anteriormente y se monitoreó la intensidad de fosforescencia del $^1\text{O}_2$ a 1270 nm en función del tiempo. La longitud de onda de excitación fue, en ambos equipos, de 355 nm. La elección de D_2O como solvente, en lugar de H_2O , se debe a que en D_2O el $^1\text{O}_2$ presenta un tiempo de vida (τ_Δ) considerablemente mayor al observado en H_2O ($\tau_\Delta = 65 \mu\text{s}$ y $3,6 \mu\text{s}$, respectivamente). Este fenómeno se debe a que, en el caso del solvente deuterado, las frecuencias vibracionales son menores, lo que conduce a una menor desactivación térmica del $^1\text{O}_2$ y, consecuentemente, a una mayor sensibilidad y resolución del método.[26]

Para el cálculo de los respectivos Φ_Δ se empleó un método comparativo. Brevemente, se graficó la intensidad de la señal del $^1\text{O}_2$ extrapolada a cero (factor pre-exponencial A), corregida por la fracción de luz absorbida y el tiempo de vida del $^1\text{O}_2$, en función de la energía del láser para la muestra y para una referencia, cuyo valor de Φ_Δ es conocido. A modo de ejemplo, se pueden ver en la Figura 2.21 los correspondientes datos experimentales obtenidos para el 2-Me-nHo, 2,9-diMe-nHo y la referencia. La relación entre ambas pendientes es proporcional a la relación de rendimientos cuánticos, como lo indica la ecuación (2.4.16), por lo que de allí se puede calcular el Φ_Δ de la muestra desconocida.[27], [28]

$$\frac{\Phi_{\Delta}^{\text{Sens}}}{\Phi_{\Delta}^{\text{Ref}}} = \frac{A^{\text{Sens}}}{\tau_{\Delta}^{\text{Sens}} (1-10^{-A^{\text{Sens}}})} \frac{\tau_{\Delta}^{\text{Ref}} (1-10^{-A^{\text{Ref}}})}{A^{\text{Ref}}} \quad (2.4.16)$$

donde el superíndice Sens se refiere al sensibilizador en estudio y el superíndice Ref se refiere a la referencia, A y τ_{Δ} son factor pre-exponencial y el tiempo de vida de $^1\text{O}_2$, respectivamente, obtenidos de la señal de emisión a 1270 nm, $\Phi_{\Delta}^{\text{Ref}}$ es el rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2$ de la referencia. El factor $[(1 - 10^{-A^{\text{Ref}}}) / (1 - 10^{-A^{\text{Sens}}})]$, se origina por la diferente cantidad de fotones absorbidos por la muestra y por la referencia, y resultó ser muy similar a uno, debido a que se trabajó con valores de absorbancia similares para ambos.

En los experimentos descriptos en este trabajo de tesis se usó, como compuesto de referencia, el ácido perinaftenona-2-sulfónico, PNS, que tiene un $\Phi_{\Delta} = 0,97 \pm 0,06$.^[15] Todas las señales de fosforescencia registradas mostraron una cinética de decaimiento mono-exponencial.

Durante las determinaciones de Φ_{Δ} pueden, en principio, tener lugar interferencias en el infrarrojo cercano debidas a la emisión fluorescente. Las βCs poseen espectros de emisión fluorescente relativamente anchos con una cola que se extiende hasta ~ 680 nm, (ver sección 2.2.2.3) y también estos alcaloides presentan fosforescencia. Para descartar este tipo de interferencias se realizaron experimentos de control con soluciones de βCs previamente saturadas en N₂. En estas condiciones, debido a la ausencia de O₂ disuelto en el medio, en caso de detectarse emisión en la región infrarroja, la misma será asignada a la sustancia en estudio. Estos controles se realizaron en las mismas condiciones de trabajo en las que se llevaron a cabo las medidas de Φ_{Δ} para las βCs. Cabe aclarar que, para ninguna de todas las βCs ensayadas se detectó luminiscencia a 1270 nm en atmosfera de N₂.

2.5. Referencias

1. Spenser ID. 704. The structure of N β-alkyl-β-carboline anhydro-bases. Journal of the Chemical Society (Resumed) 1956:3659-3663
2. Balón M, Hidalgo J, Guardado P, Muñoz MA, Carmona C. Acid-base and spectral properties of beta-carbolines. Part 2. Dehydro and fully aromatic beta-carbolines. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2 1993:99-104
3. Vert FT, Sanchez IZ, Torrent AO. Acidity constants of β-carbolines in the ground and excited singlet states. Journal of Photochemistry 1983;23:355-368
4. Sakurovs R, Ghiggino KP. Excited state proton transfer in β-carboline. Journal of Photochemistry 1982;18:1-8
5. Wolfbeis OS, Furlinger E, Wintersteiger R. Solvent- and pH-dependence of the absorption and fluorescence spectra of harman: Detection of three ground state and four excited state species. Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly 1982;113:509-517
6. Gonzalez MM. Piridoindoles naturales (β-carbolinas) y sintéticos como fotosensibilizadores en procesos de interés biológico. Estudio de su fotoquímica en solución acuosa. Tesis Doctoral 2012

7. Wolfbeis OS, Furlinger E. The pH-Dependence of the Absorption and Fluorescence Spectra of Harmine and Harmol: Drastic Differences in the Tautomeric Equilibria of Ground and First Excited Singlet State. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 1982;129:171-183
8. Gonzalez MM, Arnbjerg J, Denofrio MP, et al. One- and two-photon excitation of beta-carbolines in aqueous solution: pH-dependent spectroscopy, photochemistry, and photophysics. *The Journal of Physical Chemistry A* 2009;113:6648-6656
9. Pardo A, Reyman D, Poyato JML, Medina F. Some β-carboline derivatives as fluorescence standards. *Journal of luminescence* 1992;51:269-274
10. Reyman D, Vinas MH, Tardajos G, Mazario E. The Impact of Dihydrogen Phosphate Anions on the Excited-State Proton Transfer of Harmane. Effect of β-Cyclodextrin on These Photoreactions. *The Journal of Physical Chemistry A* 2012;116:207-214
11. Dias A, Varela AP, da Graça Miguel M, et al. β-carbolines. 2. Rate constants of proton transfer from multiexponential decays in the lowest singlet excited state of harmine in water as a function of pH. *The Journal of Physical Chemistry* 1996;100:17970-17977.
12. Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological Defense Mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *The Journal of Clinical Investigation* 1973;52:741-744
13. Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical and Biomedical Aspects of Oxidative Modification* 2001;29:345-350
14. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of Cell Biology* 2011;194:7-15
15. Martí C, Jürgens O, Cuenca O, Casals M, Nonell S. Aromatic ketones as standards for singlet molecular oxygen O₂(¹Δ_{g) photosensitization. Time-resolved photoacoustic and near-IR emission studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 1996;97:11-18}
16. Turro NJ. *Modern Molecular Photochemistry*. The Benjaming/Cummings Publishing Co, Inc 1978
17. Braslavsky SE. Glossary of terms used in photochemistry, (IUPAC Recommendations 2006). *Pure and Applied Chemistry* 2007;79:293-465
18. Skoog DA, Leary JJ. *Análisis Instrumental*. Mc Graw Hill 1997;4 ed
19. Ewing GW. *Instrumentales de Análisis Químico*. Mc Graw Hill 1978
20. Mardelli M, Olmsted J. Calorimetric determination of the 9,10-diphenyl-anthracene fluorescence quantum yield. *Journal of Photochemistry* 1977;7:277-285
21. Eastman JW. Quantitative spectrofluorimetry-the fluorescence quantum yield of quinine sulfate. *Photochem Photobiol* 1967;6:55-72
22. Gonzalez MM, Salum ML, Gholipour Y, Cabrerizo FM, Erra-Balsells R. Photochemistry of norharmine in aqueous solution. *Photochem Photobiol Sci* 2009;8:1139-1149
23. Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer 2006
24. Braslavsky SE, Kuhn HJ. Provisional List of Actinometers. IUPAC ed, IUPAC, Mülheim and der Ruhr 1987
25. Salomaa P, Schaleger LL, Long FA. Solvent Deuterium Isotope Effects on Acid-Base Equilibria. *Journal of the American Chemical Society* 1964;86:1-7
26. Martinez LA, Martinez CG, Klopotek BB, et al. Nonradiative and radiative deactivation of singlet molecular oxygen (O₂(¹Δ_{g)) in micellar media and microemulsions. *J Photochem Photobiol B* 2000;58:94-107}
27. Valduga G, Nonell S, Reddi E, Jori G, Braslavsky SE. The production of singlet molecular oxygen by zinc(II) phthalocyanine in ethanol and in unilamellar vesicles. Chemical quenching and phosphorescence studies. *Photochem Photobiol* 1988;48:1-5
28. R. V. Bensasson ESL, T. G. Trescott, 1983, Ed. Pergamon Press.

Capítulo 3



Estudio de la interacción entre β -carbolinas y albúmina de suero bovino

3.1. Introducción

Tal como se describió en el Capítulo 1, las β Cs son capaces de inhibir diferentes tipos de enzimas. Sin embargo, el modo de interacción en la mayoría de los casos es aún una incógnita. Para lograr una caracterización inequívoca, es necesario recurrir al estudio de espectroscopía de rayos X sobre el cristal de los sistemas enzima / ligando. Sin embargo, la obtención de dichos monocristales no es algo sencillo y fácil de lograr con todos los sistemas. En este contexto, el desarrollo de métodos espectroscópicos simples, basados en el uso de cromóforos / fluoróforos sensibles al entorno en el cual están confinados, se vuelve relevante.

Con el objetivo de comprender los procesos fisicoquímicos involucrados en la interacción de β Cs con proteínas se realizaron estudios de interacción con la albúmina de suero bovino (ASB) seleccionada como modelo proteico

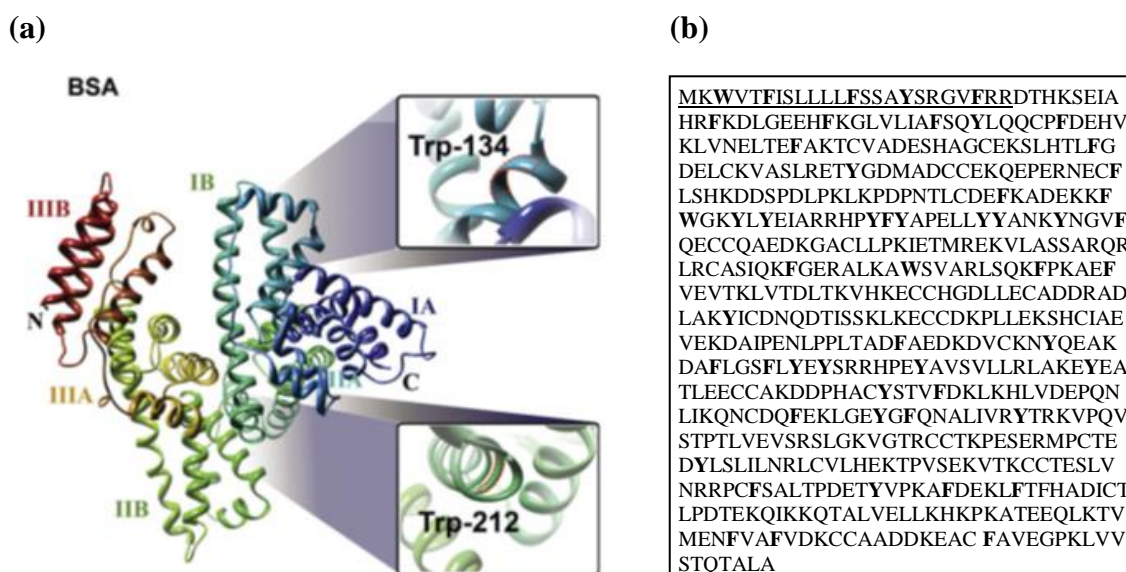
3.1.1. Estructura, propiedades y funciones de la albúmina de suero bovino (ASB)

La albúmina de suero bovino o ASB (comúnmente conocida por sus siglas en inglés, BSA), es una proteína globular extensa, extraída del suero bovino. Tiene una composición elemental (elemento; número de átomos del elemento): C: 2932, H: 4614, N: 780, O: 898 y S: 39. Muestra una masa monoisotópica de 66389,86 Da y una masa promedio de 66432,96 Da. Su punto isoeléctrico (pI) es 4,70. En su estructura primaria, ASB (Figura 3.1) está constituida por 583 amino ácidos y, a través de la formación de 17 puentes disulfuro determina, en su estructura secundaria y terciaria, diferentes subdominios.[1-3] Está formada por tres dominios, denominados I, II y III, cada uno de ellos divididos en dos sub-dominios (A y B). Tal como se desprende de la Figura 3.1 (b), ASB presenta en su estructura dos residuos triptofano (Trp o W), Trp-134 y Trp-212, que son los principales responsables de las características de la fluorescencia intrínseca de ASB. Cada residuo Trp está localizado en un dominio específico: Trp-134 está localizado en el dominio I, en un entorno hidrofílico cercano a la superficie proteica. Trp-212 pertenece al dominio II y está rodeado por uno entorno hidrofóbico, ubicado en el interior de la proteína.[1]

Su principal función biológica está asociada al transporte de diferentes tipos de sustancias y metabolitos. ASB es capaz de adsorber-interactuar-transportar especies moleculares aniónicas, catiónicas y neutras tales como ácidos grasos y otros tipos de

lípidos, sales, etc.[4] ASB también jugaría un rol central en otros procesos biológicos claves tales como la oxidación lipídica,[5] y la regulación del pH y la presión osmótica sanguínea.[6]

ASB presenta diferentes propiedades fisicoquímicas tales como una elevada estabilidad y solubilidad en soluciones acuosas y una gran versatilidad, ya mencionada, en su capacidad de unión-interacción. Además, presenta una alta similitud con la proteína albúmina de suero humano (~80 % de homología). Todas estas características hacen que ASB sea un excelente modelo proteico para el trabajo fotobiológico - biofísico *in vitro*.



Esquema 3.1. (a) Estructura cristalina de ASB y detalle de sus principales dominios y sitios. Figura extraída de Ref. [8]. (b) Estructura primaria de ASB: secuencia aminoacídica. Composición de residuos fluorescentes: W o Trp = triptofano (2), Y o Tyr = tirosina (20), F o Phen = fenilalanina (26). Subrayado, se señala la secuencia del péptido señal, que luego es escindido para dar la proteína madura.

3.1.2. Relación entre estructura, pH y propiedades fotofísicas de la ASB y sus fluoróforos intrínsecos (triptofano, tirosina y fenilalanina)

La organización estructural y compactación de la estructura terciaria de la ASB varía en función del pH, observándose también modificaciones en la estructura secundaria.[9-13] Se han identificado cinco isómeros conformacionales de ASB en diferentes rangos de pH, a los que se nombró como, la forma E (extendida; pH < 3), la forma F (ligera de la sigla en inglés Fast, pH 3 - 5), la forma N (nativa; pH 5 - 7), la forma B (básica Basic; pH 7 - 8,5) y la forma A (envejecida del inglés Aged; pH > 8,5). Además, se ha sugerido que las formas conformacionales de las albúminas séricas están conservadas en varias especies, lo que implica que la isomerización dependiente de pH podría jugar un

rol fisiológico importante. Su relevancia fisiológica estaría ligada a la unión y liberación de sustratos dependiente de pH, dado que se ha medido niveles de pH bajos en la superficie de la membrana de varios tejidos.[14]

La fluorescencia intrínseca de una proteína se origina debido a la presencia de los aminoácidos aromáticos[15-17] triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe) (Figura 3.1). El grupo indólico de los triptofanos es la especie dominante en términos de absorción en el UV y emisión de las proteínas. La Tyr posee un rendimiento cuántico de fluorescencia similar al Trp (Tabla 3.1), pero su espectro de emisión es más angosto. En las proteínas nativas, la emisión de fluorescencia de la Tyr es frecuentemente desactivada por interacción con la cadena proteica o por transferencia de energía al Trp. Por el contrario, en el estado desnaturalizado de las proteínas, la emisión de Tyr aumenta. El pK_a de la Tyr disminuye luego de la excitación, por lo que su ionización puede ocurrir en el estado excitado. La emisión intrínseca debida a la Phe sólo se observa en proteínas que no presenten residuos de Tyr ni Trp, hecho que se da con extremada baja frecuencia.

La emisión del Trp es muy sensible a su entorno, y es usualmente empleado como testigo de los cambios conformacionales en las proteínas. El máximo de emisión de las proteínas refleja la exposición promedio de sus residuos de triptófano a la fase acuosa. Los tiempos de vida de fluorescencia de los residuos de triptófano van de 1 a 6 ns, y son altamente sensibles a la presencia de diferentes agentes desactivadores, tales como grupos disulfuro cercanos, grupos deficientes en electrones, $-NH_3^+$, $-CO_2H$, residuos de histidina protonadas, entre otros. La presencia de múltiples residuos de triptófano en las proteínas, cada uno en un entorno diferente, es una de las razones del decaimiento de la intensidad de fluorescencia multi-exponencial de las proteínas. Otra de las razones, recientemente sugeridas está relacionada con la presencia de, al menos, dos especies emisoras del triptofano, aún en soluciones acuosas. En este entorno homogéneo y libre de proteína, el Trp muestra un doble decaimiento, como consecuencia de la existencia de un tautómero y/o una nueva especie emisora generada desde el estado excitado del Trp.[18]

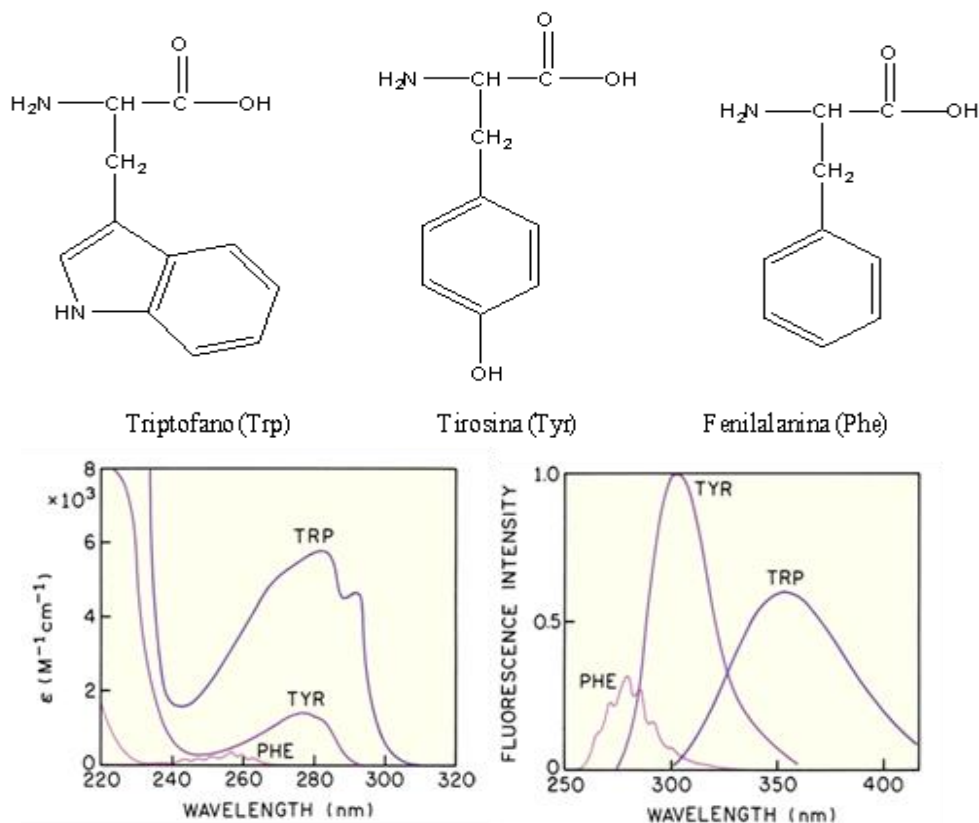


Figura 3.1. Espectros de absorción UV-visible y de emisión fluorescente de las soluciones *buffers* de Trp, Tyr y Phe a pH 7,0. Extraído de referencia [19].

Tabla 3.1. Resumen de las principales propiedades fotofísicas de los aminoácidos Trp, Tyr y Phen.*

Aminoácido	λ_{exc} / nm	λ_{fluo} / nm	Φ_F	τ / ns	Abundancia (%)	Sensibilidad al entorno
Fenilalanina	260	282	0,02	6,8	3,5	NO
Tirosina	275	304	0,14	3,6	3,5	NO
Triptofano	295	353	0,13	3,1 (promedio)	1,1	SÍ

* Datos extraído de referencia [19].

3.1.3. Estudios previos de interacción de β Cs con ASB

Hasta la fecha, la información contenida en la literatura acerca de las interacciones que gobiernan la unión de β Cs con ASB es escasa y, en ciertos aspectos, contradictoria:

(i) Por un lado, Chattopadhyay *et al.* llevaron a cabo estudios fotofísicos sobre la interacción del nHo con las albúminas de suero humano (ASH) y bovino (ASB).[20,21] Los autores describen una fuerte unión entre el fotosensibilizador biológico y las dos proteínas séricas, con valores de constantes de unión de $1,25 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, y $1,33 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, respectivamente. Esta interacción produce una notable modificación del comportamiento fotofísico dependiente de la polaridad del entorno del nHo al unirse a las proteínas. Asimismo observaron por anisotropía de fluorescencia del nHo una marcada restricción del

movimiento al producirse la unión con las proteínas séricas. Además sugieren que la unión del nHo aumenta la estabilidad conformacional de las mencionadas albúminas.

(ii) Por su parte, Nafisi *et al.*[22] estudiaron la interacción de Ho, Ha, harmalina, harmalol y *t*-h-norharmano con ASB, mediante técnicas de espectroscopía infrarroja (FTIR) y absorción UV-visible. Al igual que en el caso de Chattopadhyay *et al.*, estos estudios se realizaron en *buffer* fosfato de pH 7,2. Los autores describen la presencia de diferentes tipos de interacciones entre estos alcaloides y ASB (interacciones van der Waals y formación de puentes de hidrógeno). Obtienen, además, valores moderados para las constantes de asociación, K , ($\sim 10^3 - 10^4 \text{ M}^{-1}$), dependientes de la estructura molecular de los compuestos: $K^{\text{Ha}} > K^{\text{t-h-nHo}} > K^{\text{harmalina}} > K^{\text{Ho}} > K^{\text{harmalol}}$. En relación a la estructura proteica, los autores manifiestan observar una dependencia estructural con la concentración del alcaloide. En particular, a bajas concentraciones de βCs ($< 0,05 \text{ mM}$) no observan cambios conformacionales en la biomolécula, mientras con concentraciones un orden de magnitud superior, observan una disminución en las estructuras de α -hélice y hoja- β , indicando una desestabilización parcial de su estructura secundaria.

(iii) En el año 2012, Hemmateenejad *et al.*[23] estudiaron la interacción del harmalol con la proteína de suero humana combinando técnicas espectroscópicas de fluorescencia y modelado molecular, logrando determinar parámetros de la interacción basándose en el *quenching* de la emisión proteica por agregado de la βC ($K = 6,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). En este caso particular, los autores también sugieren que fuerzas de interacción hidrofóbicas y la formación de puentes de hidrógeno jugarían un rol central.

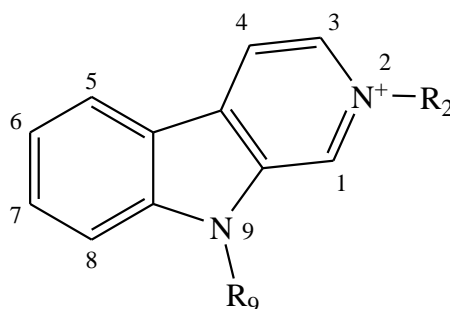
Sin embargo, aún quedan interrogantes por resolver: (i) Por un lado, no se sabe ciertamente cuál o cuáles son los sitios proteicos con los que interaccionan estos alcaloides. (ii) Es aún incierta la contribución de cada especie ácido-base de las βCs al proceso de interacción con las proteínas. Cabe recordar que en todos los casos mencionados en los párrafos precedentes, los estudios fueron realizados en condiciones de pH fisiológico (7,2 - 7,4) donde, en el caso de las βCs no sustituidas en N-2, coexisten en solución las especies βCH^+ y βCN . (iii) Tampoco se conoce aún si los fenómenos fotofísicos descritos están dominados por contribuciones estáticas, dinámicas o una mezcla de ambas.

En este contexto, el estudio sistemático de la interacción de ASB con alcaloides pertenecientes a la familia de las βCs y su dependencia con el pH representa una alternativa clara que puede contribuir a responder algunos de los interrogantes antes mencionados. Más aún, por sus propiedades fotofísicas intrínsecas, el uso de los derivados

metilados en la posición N-2 será clave para la comprensión de los mecanismos de interacción.

3.2. Resultados y discusiones

Se estudió la dependencia con el pH de la interacción entre β Cs y sus N-metil derivados con la proteína modelo de transporte ASB. Dada la complejidad de los sistemas y la riqueza de la información que potencialmente pueden brindar los mismos, se seleccionó la familia del *nor*harmano y sus N-metil derivados (Esquema 3.2) como compuestos y/o fotosensibilizadores modelos para desarrollar estos estudios. Para los fines propuestos en este capítulo, se emplearon conjuntamente técnicas espectroscópicas (absorción UV-visible y de emisión fluorescente) y de cálculo numérico avanzado que permiten interpretar cuali- y cuantitativamente la naturaleza de las interacciones observadas.



Entrada	Nombre (abreviatura)	R ₂	R ₉
1	<i>nor</i> Harmano (nHo)	H	H
2	Ioduro de 2-Metil- <i>nor</i> Harmanio (2-Me-nHo)	CH ₃	H
3	9-Metil- <i>nor</i> Harmano (9-Me-nHo)	H	CH ₃
4	Ioduro de 2, 9-Dimetil- <i>nor</i> Harmanio (2,9-diMe-nHo)	CH ₃	CH ₃

Esquema 3.2. Estructura química de las β Cs empleadas en este capítulo.

3.2.1. Espectros de absorción UV-visible a pH controlado

El agregado de concentraciones crecientes de ASB en las soluciones acuosas de β Cs induce fuertes variaciones en el pH de las mismas. Por lo tanto, es necesario recurrir al uso de soluciones reguladoras (*buffers*) que permitan compensar estos efectos estableciendo, a la vez, condiciones de trabajo específicas y controladas que permitan definir cuál/es es/son la/s especie/s ácido-base de cada β C que está/n presente/s en cada condición de ensayo (Capítulo 2). Por otro lado, si bien no se observaron variaciones en las

constantes de disociación ácido-base de β Cs (Capítulo 2, sección 2.2.1.3) con la variación de la fuerza iónica de las soluciones, es sabido que los equilibrios químicos, en particular los de asociación-disociación intermolecular, pueden presentar una relación de dependencia con este parámetro experimental. Consecuentemente, para poder realizar análisis comparativos de los resultados obtenidos en diferentes condiciones experimentales, es necesario, además, recurrir al uso de soluciones con igual o similar fuerza iónica.

Por tal motivo, los estudios de interacción de las β Cs con la proteína ASB se llevaron a cabo en soluciones acuosas, bajo condiciones de pH (soluciones *buffers*) y fuerza iónica controladas. En particular, los ensayos efectuados en condiciones ácidas ($4,0 < \text{pH} < 5,0$) se realizaron en *buffer* $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ - $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ (ácido acético-acetato de sodio). Para los ensayos en condiciones de pH fisiológico (7,4) se recurrió al uso del *buffer* KH_2PO_4 - NaOH . Por último, los ensayos realizados en condiciones alcalinas ($9,0 < \text{pH} < 10,0$) se hicieron en *buffer* $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ - NaOH . En la sección 3.4.2 se detalla la preparación y fuerza iónica de estos *buffers* que, de ahora en adelante, serán denominados como “acetato”, “fosfato” y “bórax”. Para la elección de las distintas soluciones reguladoras se tuvo en cuenta, además, las características espectroscópicas (absorción UV-visible) de cada uno, de modo de evitar posibles interferencias en la región del espectro electromagnético de interés desde el punto de vista analítico ($\lambda > 300 \text{ nm}$).

Vale aclarar que a lo largo de este capítulo se continúa usando el código de color establecido previamente para representar los resultados obtenidos en medio ácido (rojo) y alcalino (azul). Asimismo, el color magenta representa los resultados obtenidos en condiciones de pH fisiológico.

3.2.1.1. Espectros UV-visible del nHo y sus N-metil derivados a pH controlado

En una primera instancia se procedió a evaluar las características espectroscópicas de los compuestos bajo estudio en las diferentes soluciones *buffers*. En la Figura 3.1 se presentan los espectros de absorción UV-visible de los cuatro compuestos heterocíclicos estudiados. A modo de referencia se presentan conjuntamente los espectros de cada compuesto estudiado, pero registrados en solución acuosa (agua calidad mQ) en las distintas condiciones de pH (Capítulo 2). Tal como era de esperar, los espectros de absorción registrados en esta sección son idénticos a los registrados en soluciones acuosas que no incluyen *buffers*.

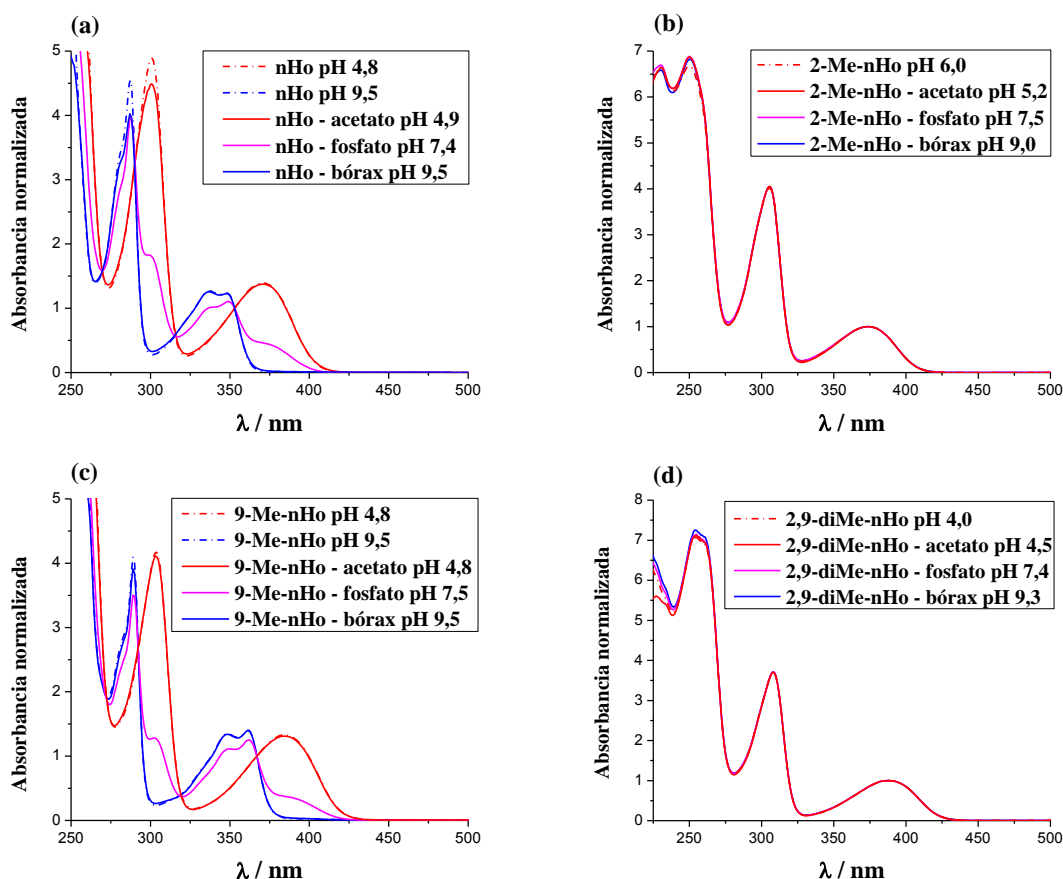


Figura 3.1. Espectros de absorción UV-visible normalizados de soluciones acuosas con *buffers* (líneas continuas) y agua mQ (líneas punteadas) de nHo y sus N-metil derivados, registrados en diferentes condiciones de pH. (a) nHo, (b) 2-Me-nHo, (c) 9-Me-nHo y (d) 2,9-diMe-nHo.

3.2.1.2. Espectros de absorción UV-visible de ASB a pH controlado

Al igual que en la sección anterior, los estudios espectroscópicos de absorción UV-visible se extendieron a la proteína ASB reproduciendo las mismas condiciones experimentales que luego se usaron en los estudios de interacción β Cs / ASB. Este análisis inicial es relevante dada la complejidad del sistema de interacción β Cs / ASB / *buffer*. De esta manera se obtienen los espectros individuales de cada uno de los componentes presentes en las mezclas (sistemas) en cuestión, los que son utilizados, posteriormente, en el análisis cuali- y cuantitativo efectuado.

En la Figura 3.2 se presentan los espectros de absorción UV-visible normalizados de la ASB en los diferentes *buffers*, así como también en solución acuosa. De la misma, se aprecia que, desde el punto de vista espectroscópico, la proteína no experimenta modificaciones severas, detectables por esta técnica.

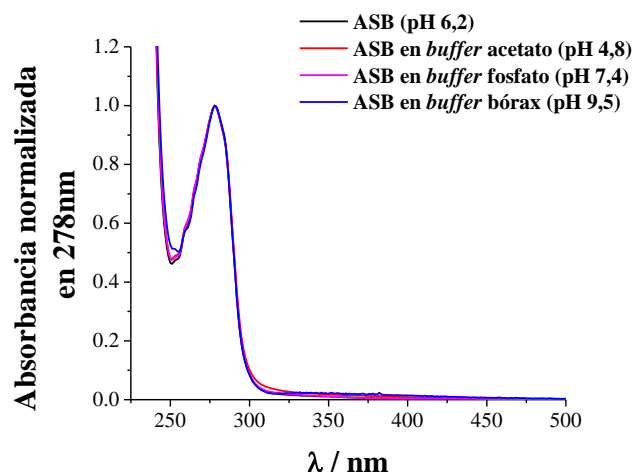


Figura 3.2. Espectros normalizados de absorción UV-visible de la ASB en solución acuosa y en buffers.

3.2.2. Espectroscopía de absorción UV-visible aplicada al estudio de la interacción entre nHo y sus N-metil derivados con ASB

Se registraron espectros de absorción UV-visible de los cuatro compuestos de interés (nHo, 2-Me-nHo, 9-Me-nHo y 2,9-diMe-nHo) en presencia de cantidades crecientes de ASB, en las tres condiciones de pH propuestas (Figuras 3.3 y 3.4) En todos los casos se observaron cambios espectrales a medida que aumenta la concentración de ASB en solución. Cabe destacar que los significativos cambios espectrales registrados para longitudes de onda mayores a 350 nm, región en la que la ASB presenta una absorción despreciable en relación a la β C, indican que existe una interacción intermolecular concreta entre los correspondientes estados electrónicos basales de cada una de las especies ácido-base de las β Cs estudiadas con ASB.

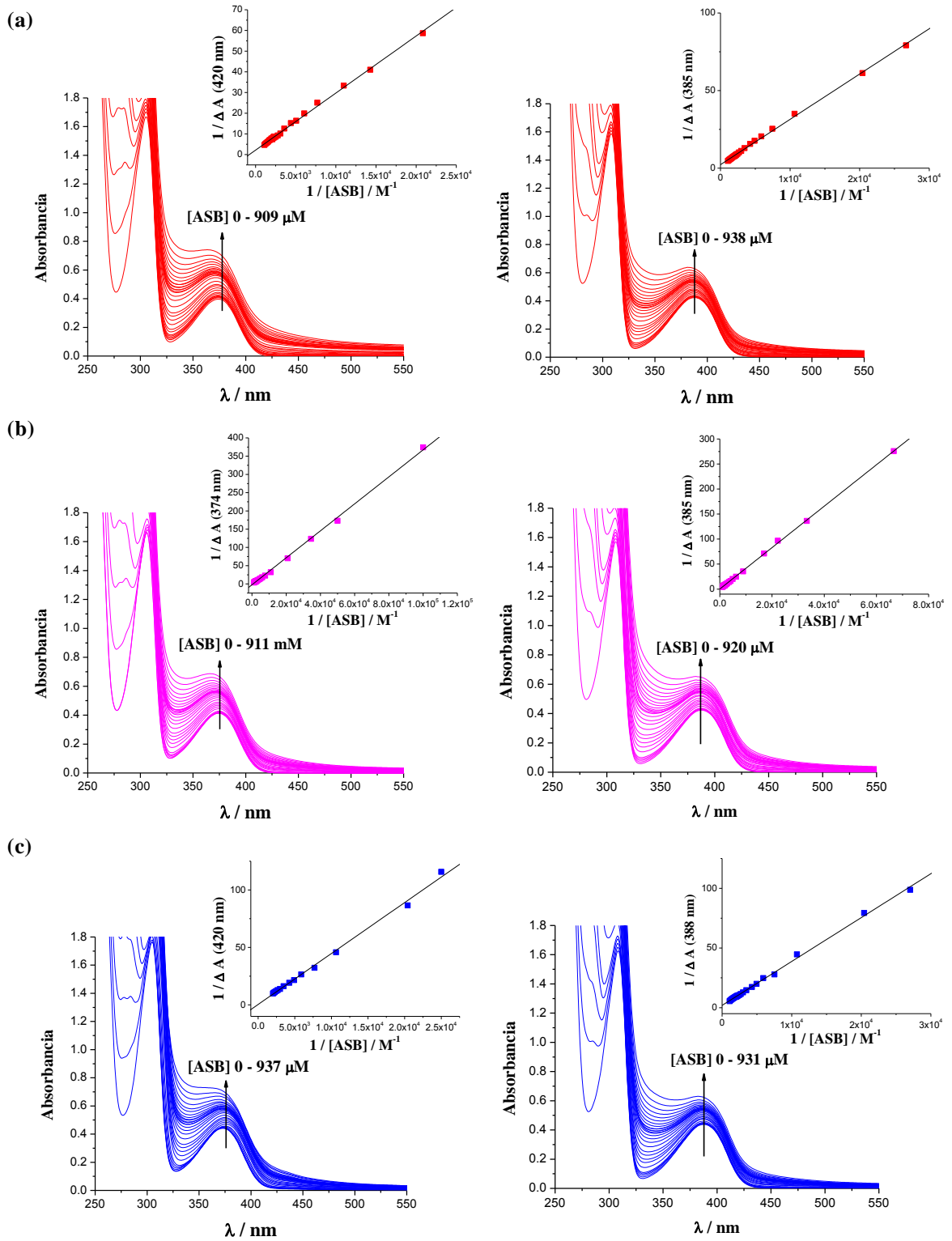


Figura 3.3. La columna izquierda y la derecha muestran los espectros de absorción UV-visible de 2-Me-nHo (102 μ M) y 2,9-diMe-nHo (105 μ M), respectivamente, en presencia de diferentes concentraciones iniciales de ASB (relación molar final β C: ASB 1: ~9). Las flechas señalan los cambios observados mientras se incrementa la concentración de ASB. *Insertos:* se representa la grafica de Benesi-Hildebrand obtenida una longitud de onda representativa. Los espectros se registraron bajo tres condiciones de pH diferentes: (a) 4,9, (b) 7,4 y (c) 9,5.

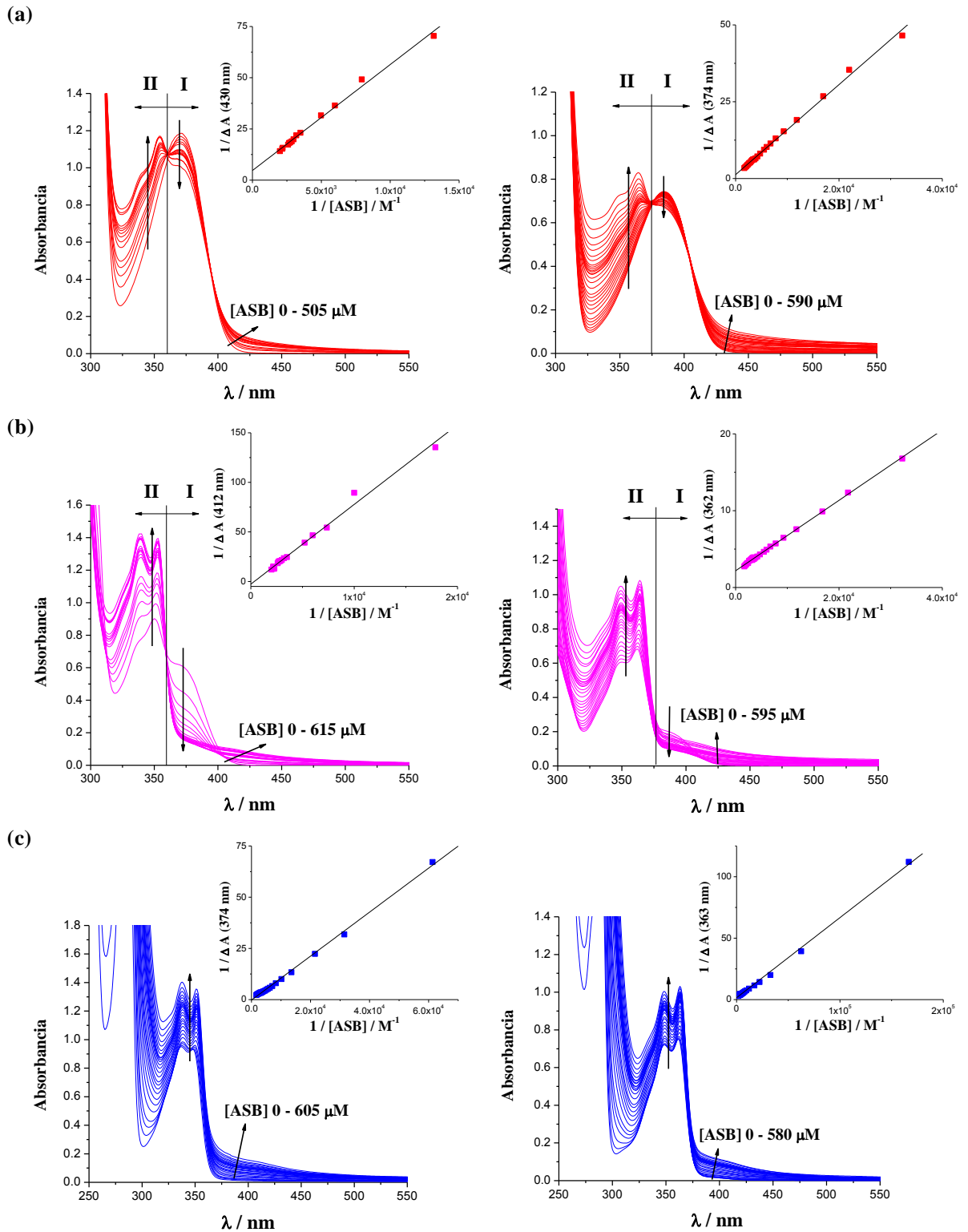


Figura 3.4. La columna izquierda y la derecha muestran los espectros de absorción UV-visible de nHo (282 μ M en (a) y 235 μ M en (b) y (c) y 9-Me-nHo (182, 192 y 210 μ M en (a), (b) y (c), respectivamente), respectivamente, en presencia de diferentes concentraciones iniciales de ASB (relación molar final β C: ASB de 1: \sim 2 y 1: \sim 3, respectivamente). Las flechas señalan los cambios observados al incrementarse la concentración de ASB. *Insertos:* se representa la grafica de Benesi-Hildebrand obtenida una longitud de onda representativa. Los espectros se registraron bajo tres condiciones de pH diferentes: (a) 4,9, (b) 7,4, y (c) 9,5.

En estas figuras se pueden observar dos perfiles espectroscópicos diferentes, dependiendo de la estructura química de la β C ensayada:

(a) Por un lado, aquellas β Cs metiladas en el nitrógeno piridínico (2-Me-nHo y 2,9-diMe-nHo; β Cs catiónicas) muestran el mismo comportamiento, en todo el rango de pH investigado. Es decir, se observa un incremento en la absorbancia de la solución a medida que aumenta la concentración de ASB. Al mismo tiempo, se observa un pequeño desplazamiento hipsocrómico (~ 5 nm) de la banda de absorción de menor energía (centrada en $\sim 375 - 385$ nm) correspondiente a las especies β C-CH₃⁺ (Figura 3.3). Este hecho ciertamente indica que el catión β C-CH₃⁺ está interaccionando con ASB, probablemente a través de interacciones coulombicas entre el catión β C con los sitios polares de la propia proteína (Esquema 3.3).

(b) Por otro lado, el perfil espectral observado para los dos compuestos que no presentan metilación en el N-2 (nHo y 9-Me-nHo) muestra ciertas particularidades que dan cuenta de la presencia de, al menos, un tipo de interacción y/o proceso fisicoquímico adicional y/o diferencial (Figura 3.4). Brevemente, en aquellas condiciones de pH en las que la especie protonada de cada β C está presente en solución (pH 4,9 y 7,4) se observa que, al incrementar la concentración de ASB, disminuye (o desaparece) la banda de menor energía de la especie protonada de las β Cs (β CH⁺), centrada en $\sim 370 - 380$ nm. Al mismo tiempo, se observa la formación (o incremento en su intensidad en el caso de los experimentos realizados a pH 4,9 y 7,4) de una banda de absorción centrada en $\sim 350 - 360$ nm (Figuras 3.4 (a) y (b)). Esta nueva banda de absorción presenta características muy similares (en su forma y posición) a las observadas para la banda de menor energía de la especie neutra de las β Cs (β CN).

Además, la disminución y el incremento de la intensidad de las bandas de absorción descrita en el párrafo anterior, corresponde a procesos que ciertamente están acoplados, tal como lo sugiere la presencia de los puntos isobésticos a 360 y 375 nm, según sea nHo o 9-Me-nHo, respectivamente.

Cabe mencionar aquí que los puntos isobésticos mencionados en el párrafo precedente serán usados, de ahora en adelante, como punto de referencia para definir dos zonas de particular interés de acuerdo a los cambios espectrales observados. Arbitrariamente, esas regiones espectrales las definimos como zonas I y II. Así, en la zona I del espectro, centrada a $\sim 370 - 380$ nm, la absorbancia total de la solución será asignada, principalmente, a la especie protonada β CH⁺ como tal o formando parte del complejo

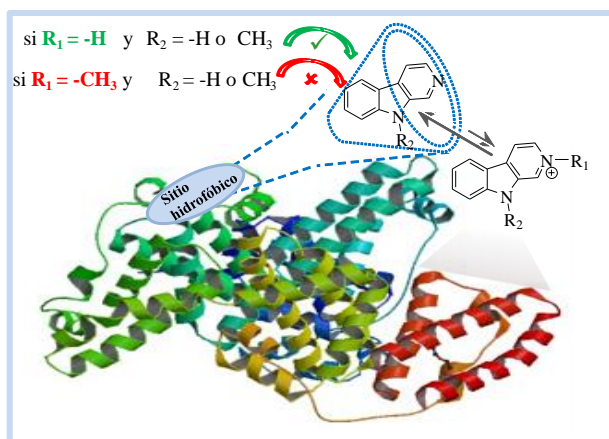
[$\beta\text{CH}^+\text{.ASB}$]. Por su parte, la especie neutra βCN como tal o interactuando con ASB ($[\beta\text{CN.ASB}]$) será la responsable mayoritaria de la absorción observada en la zona II, centrada a $\sim 340 - 360$ nm. Esta nueva terminología o definición brindará la posibilidad de describir con mayor simpleza los resultados y análisis efectuados a lo largo del capítulo.

Basados en los resultados observados para $\beta\text{C-CH}_3^+$ (inciso (a)), cabe esperar que en condiciones de pH donde la especie βCH^+ esté presente (pH 4,9 y 7,4) el sistema también presente un tipo de interacción que dé lugar a la formación de [$\beta\text{CH}^+\text{.ASB}$]. Sin embargo, los resultados presentados en las Figuras 3.4 (a) y (b) sugieren que el agregado de la proteína ASB ofrece un entorno de características tales que, independientemente del pH dominante en el seno de la solución (inclusive en condiciones de $\text{pH} < 5$, donde las βC s están presentes en la solución de partida en más de un 99% como βCH^+), se ve favorecida la formación de la especie βCN por sobre la especie βCH^+ . En otros términos, el agregado de la proteína induce el desplazamiento del equilibrio ácido-base intrínseco de las βC no sustituidas en el nitrógeno piridínico (N-2). Así, la presencia de ASB favorece la desprotonación del nitrógeno piridínico (N-2) y, en consecuencia, se puede proponer que los cambios espectrales observados se deben, principalmente, a la acumulación relativa de la especie βCN en un entorno diferente al del seno de la solución ($[\beta\text{CN.ASB}]$). En base a las características propias de ASB, ese entorno mencionado ciertamente podría o debería ser cualquiera de los sitios hidrofóbicos o hidrofóbicos-básicos (cadenas de los aminoácidos de carácter básico con capacidad para tomar el protón de la βCH^+) que contiene la combinación de su estructura primaria-secundaria y terciaria (Esquema 3.3). Este concepto se abordará más adelante, de manera más detallada.

En los experimentos realizados en medio alcalino (pH 9,5), tal como era de esperar, sólo se observa la presencia de una única banda de absorción (centrada en $\sim 340 - 360$ nm), correspondiente a βCN , cuya intensidad presenta una correlación directa con la concentración de ASB (Figura 3.4 (c)). Al mismo tiempo, el agregado de proteína induce un desplazamiento batocrómico muy leve (~ 5 nm) en dicha banda de absorción, lo que pone de manifiesto la interacción molecular existente entre βCN y ASB, dando lugar así a la formación de [$\beta\text{CN.ASB}$].

Es importante destacar que, en todos los casos analizados, comienzan a manifestarse interacciones adicionales luego del agregado de concentraciones de proteína considerablemente elevadas (relación molar, $r^\circ = [\text{ASB}]_0/[\beta\text{C}]_0 > 5$). Este fenómeno se evidencia con la pérdida de los puntos isobésticos encontrados en los espectros de

absorción UV-visible registrados en las condiciones iniciales de mezcla (a bajas concentraciones de ASB). Muy probablemente, las interacciones de tipo proteína-proteína sean las que, en estas condiciones de elevada concentración proteica, estén jugando un rol adicional. Este fenómeno debería ser investigado en profundidad. Sin embargo, el estudio de estos procesos y/o interacción escapa a los objetivos centrales de esta Tesis.



Esquema 3.3. Representación de los diferentes modos de interacción planteados para las especies β Cs y ASB en sus estados electrónicos fundamentales.

Las constantes de asociación (K_G) propias de cada sistema se estimaron mediante el método de análisis de Benesi-Hildebrand (sección 3.4.3, ecuación 3.1). En todos los casos, los datos experimentales mostraron una buena correlación lineal al aplicar dicha ecuación. En las Figuras 3.3 y 3.4 se muestran, en forma de insertos, gráficos representativos de los ajustes mencionados. Por otra parte, en la Tabla 3.2 se listan los correspondientes valores de K_G obtenidos en cada caso. Estos valores representan el promedio de las constantes calculadas en el rango espectral comprendido entre 340 nm y 440 nm.

El análisis cuantitativo de los datos obtenidos en esta sección revela algunos puntos claves relacionados con los valores de K_G calculados:

(i) Para cada sistema en particular, conformado por una β C y una cierta condición de pH, los valores de K_G calculados fueron idénticos, dentro del error experimental, en todo el rango del espectro de absorción UV-visible analizado. Estos resultados eran, en cierta medida, esperables en el caso de las β Cs sustituidas en N-2 ya que la especie catiónica (β C- CH_3^+) es la única especie ácido-base que se encuentra presente en solución. Consecuentemente, es de esperar la formación de un único tipo de complejo [β CH⁺.ASB]. Sin embargo, y tal como se describió en la sección anterior, los sistemas formados por los derivados que presentan el N-2 del anillo β -carbolínico no sustituido (nHo y 9-Me-nHo)

sugieren la presencia de, al menos, dos tipos de complejos diferentes ($[\beta\text{CN}.\text{ASB}]$ y $[\beta\text{CH}^+.\text{ASB}]$) que absorben, en mayor o menor medida, en toda la región del espectro UV-visible analizado. Así, el comportamiento observado sugiere que, en este tipo de sistemas, el método de análisis empleado estima una constante de interacción global entre las dos especies ácido-base de nHo o 9-Me-nHo con ASB.

(ii) Ninguno de los cuatro compuestos estudiados muestra una dependencia clara de K_G con el pH del medio ni con la naturaleza química de la βC . Desde el punto de vista de la proteína, la ausencia de cualquier efecto de pH descrita en los puntos (a) y (b) sobre los equilibrios de interacción entre βCs y ASB sugiere que los cambios conformacionales que pueda experimentar la proteína (en su entorno y/o sitios de unión) no modifican, de manera significativa, su capacidad de unión con moléculas pequeñas. Por otra parte, cabe aclarar que es de esperar que ASB no experimente cambios en la carga neta dado que su punto isoeléctrico (PI) en agua a 278 K es de 4,7.[7] Consecuentemente, la carga neta que presentará ASB en las condiciones de pH estudiadas será negativa lo que favorece las interacciones de tipo coulombicas entre ASB y βCH^+ o $\beta\text{C-CH}_3^+$ así como también la generación de βCN por cesión del protón por parte de las primeras.

(iii) Tampoco se observa una dependencia clara de K_G con la naturaleza química de la βC . Este hecho se puede interpretar en base al gran tamaño relativo que presenta ASB con respecto a las moléculas de bajo peso molecular representadas por las βCs ; consecuentemente, ASB no reconocería las modificaciones tanto en tamaño como en carga de cada una de las moléculas de βCs estudiadas. Sin embargo, es importante tener en cuenta que, por un lado, K_G representa una constante de interacción global que no permite discriminar entre diferentes tipos de interacción, si es que las mismas tienen lugar de forma simultánea para un mismo sistema. Por otro lado, si las variaciones en las afinidades reales de cada tipo de βC con ASB son relativamente pequeñas, el gran error experimental asociado al método de análisis de Benesi-Hildebrand impediría su detección.

Tabla 3.2. Constantes de interacción $\beta\text{C} / \text{ASB}$ estimadas para cada una de las condiciones descritas en el texto. K_G representa la constante de unión calculada mediante la ecuación 3.1.

Compuesto	$K_G / \text{M}^{-1} 10^3$		
	pH 4,8	pH 7,4	pH 9,5
nHo	1,2 ± 0,8	1,5 ± 0,8	1,3 ± 0,8
2-Me-nHo	1,9 ± 0,7	1,4 ± 0,6	1,0 ± 0,3
9-Me-nHo	1,7 ± 0,6	2,2 ± 0,9	2,2 ± 0,9
2,9-diMe-nHo	1,0 ± 0,4	0,4 ± 0,2	1,2 ± 0,4

3.2.3. Análisis quimiométrico de la interacción entre nHo y 2-Me-nHo con ASB

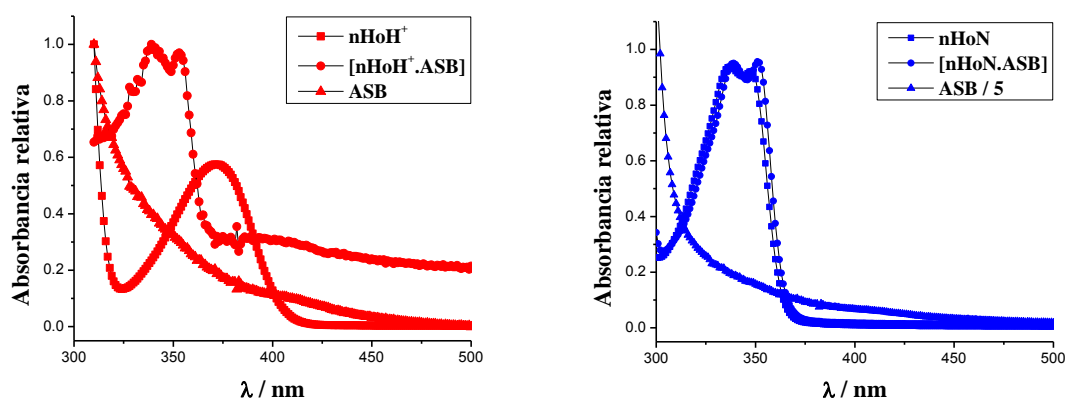
Con el objeto de analizar la totalidad de la información espectroscópica contenida en la región de longitudes de onda de interés, las matrices de absorbancias (\mathbf{A}), construidas con los espectros registrados para diferentes concentraciones de ASB, fueron analizadas empleando técnicas de resolución multivariada. Mediante el uso de métodos matriciales frecuentemente empleados para la deconvolución de curvas se pudieron obtener tanto espectros de absorción de los componentes individuales como perfiles de concentración, asociados a los ensayos realizados con nHo (a pH 4,9 y 9,5) y con 2-Me-nHo (a pH 4,9) (sección 3.2.2). El proceso de deconvolución consistió en la aplicación secuencial de los siguientes algoritmos: (i) descomposición en valores singulares (SVD, *Singular Value Decomposition*) para la determinación del número de componentes independientes, (ii) análisis evolutivo de factores (EFA, *Evolving Factor Analysis*) para la estimación inicial de los perfiles de concentración, y (iii) cuadrados mínimos alternantes con restricciones (ALS, *Alternating Least Squares*) para la obtención de las matrices de espectros (\mathbf{S}^T) y de perfiles de concentración (\mathbf{C}) que satisfagan tanto la condición $\mathbf{A} = \mathbf{C} \cdot \mathbf{S}^T$ como las restricciones físicas asociadas a los equilibrios de asociación.

En la Figura 3.5 (a) se presentan los espectros de absorción relativa obtenidos a partir del tratamiento matemático de las matrices espectrales correspondientes a los ensayos realizados en la interacción del norharmano con ASB a pH 4,9 y 9,5 (columnas izquierda y derecha, respectivamente). Se observa que a pH 9,5 el espectro deconvolucionado del [nHoN.ASB] presenta un ligero corrimiento batocrómico de $\sim 2 - 5$ nm al interactuar con la ASB, con respecto a nHoN. En la Figura 3.5 (b) (pH 9,5) se observa como aumenta la concentración relativa de [nHoN.ASB] ($[[\text{nHoN.ASB}]]_R$) a medida que aumenta la concentración inicial de ASB ($[\text{ABS}]_0$). Cuando la $[\text{ABS}]_0$ alcanza un valor de 250 μM , la concentración relativa del nHoN no asociado ($[\text{nHoN}]_R$) es casi nula, y $[[\text{nHoN.ASB}]]_R$ es máxima. Por lo tanto, como inicialmente se empleó una concentración aproximada 250 μM de nHoN, se puede decir que para relaciones superiores a 1 a 1 ($\beta\text{C: ASB}$) no encontramos nHoN, como tal, en el seno de la solución.

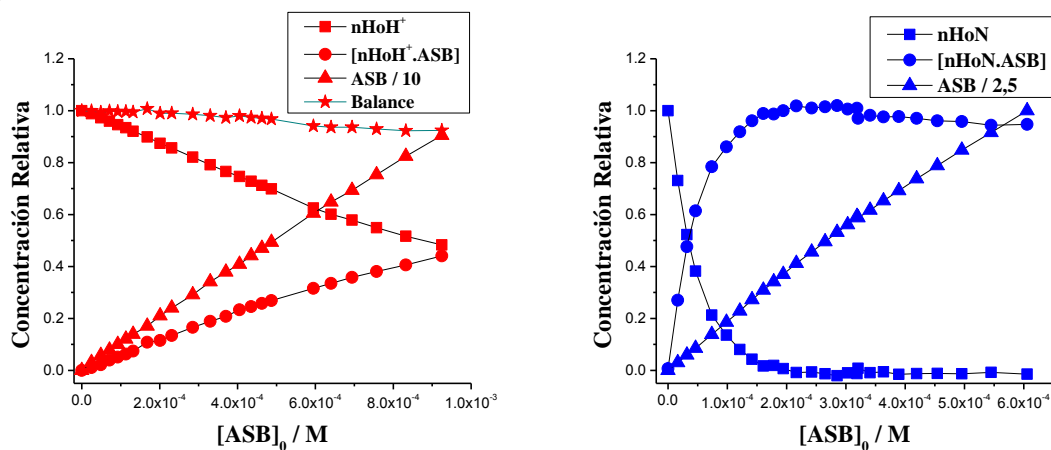
En cambio, a pH 4,5 el nHoH⁺ muestra un patrón de interacción con la ASB claramente diferente al observado a pH 9,5 (Figura 3.5 (a)). En este caso se observa como el análisis quimiométrico ha permitido deconvolucionar la contribución de, al menos, una especie que presenta un espectro de absorción muy similar al [nHoN.ASB] a pH 9,5

(Figura 3.5 (c)). Esto está de acuerdo con lo observado y planteado en la sección 3.2.2. La evolución de la concentración relativa a pH 4,5 de $n\text{HoH}^+$, ASB y $[\text{nHoH}^+.\text{ASB}]$ muestra que a medida que se incrementa la concentración inicial de ASB, aumenta la concentración de $[\text{nHoH}^+.\text{ASB}]$ y, consecuentemente, la $[\text{nHoH}^+]_R$ disminuye sin llegar a desaparecer esta especie protonada aun a concentraciones de ASB ~ 1 mM (Figura 3.5 (b), columna izquierda). Este hecho esta correlacionado la presencia de un modo de interacción adicional, probablemente, debido a interacciones electrostáticas entre $n\text{HoH}^+$ y ASB, tal como se sugirió en la sección 3.2.2. Esta hipótesis es apoyada por las observaciones realizadas a partir de los ensayos de interacción entre 2-Me-nHo y ASB (ver más adelante).

(a)



(b)



(c)

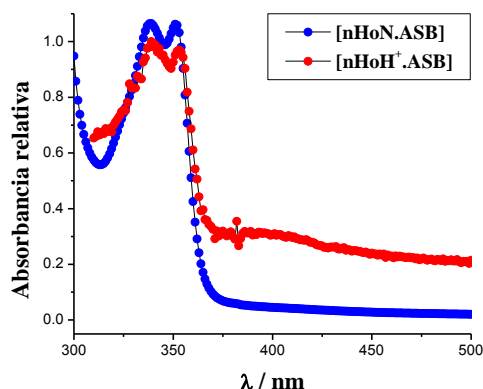


Figura 3.5. (a) Espectros de absorción UV-visible obtenidos por deconvolución de los espectros registrados para el sistema nHo / ASB en condiciones de pH 4,9 y 9,5 (columna izquierda y derecha, respectivamente). (b) Evolución de la concentración relativa de cada especie deconvolucionada en (a). (c) Comparación entre los espectros de absorción obtenidos para la especie [nHoN.ASB] deconvolucionados a partir de los espectros registrados a pH 4,9 y 9,5.

En la Figura 3.6 se presenta el análisis quimiométrico de los resultados obtenidos por espectrometría de absorción UV-visible, a partir del estudio de la interacción realizado para el sistema 2-Me-nHo / ASB a pH 4,9. En este caso particular la deconvolución de los espectros muestra la presencia de, al menos, tres especies en solución. Dos de ellas fueron asignadas a los reactivos participantes de la reacción (2-Me-nHo y ASB), mientras que la tercera especie fue asignada al producto de la interacción electrostática de 2-Me-nHo interactuando con ASB, [2-Me-nHo.ASB], (Figura 3.6 (a)).

El análisis de la evolución de las concentraciones relativas de estas tres especies (Figura 3.6 (b)) muestra que, al aumentar la concentración de ASB, disminuye la concentración relativa de 2-Me-nHo y, consecuentemente, aumenta la concentración de [2-Me-nHo.ASB]. Además, aún a la máxima concentración ensayada, se observa la presencia de señal residual asignada a los correspondientes reactivos 2-Me-nHo y ASB. Sin embargo, es importante aclarar aquí que, dada la gran similitud espectral entre el reactivo 2-Me-nHo y el complejo de interacción formado [2-Me-nHo.ASB], las deconvoluciones obtenidas pueden presentar una baja resolución matemática para las especies mencionadas. Consecuentemente, la fracción de la especie [2-Me-nHo.ASB] podría ser mayor y, por consiguiente, la concentración de la especie 2-Me-nHo remanente ser menor.

Del mismo modo, el análisis presentado en el párrafo precedente puede extenderse a los resultados obtenidos para las β C no sustituidas (nHo y 9-Me-nHo) descritos en la sección anterior. Consecuentemente, es lógico esperar que en condiciones de pH donde la

especie βCH^+ esté presente (pH 4,9 y 7,4) el sistema también presente un tipo de interacción similar [$\beta\text{CH}^+ \cdot \text{ASB}$].

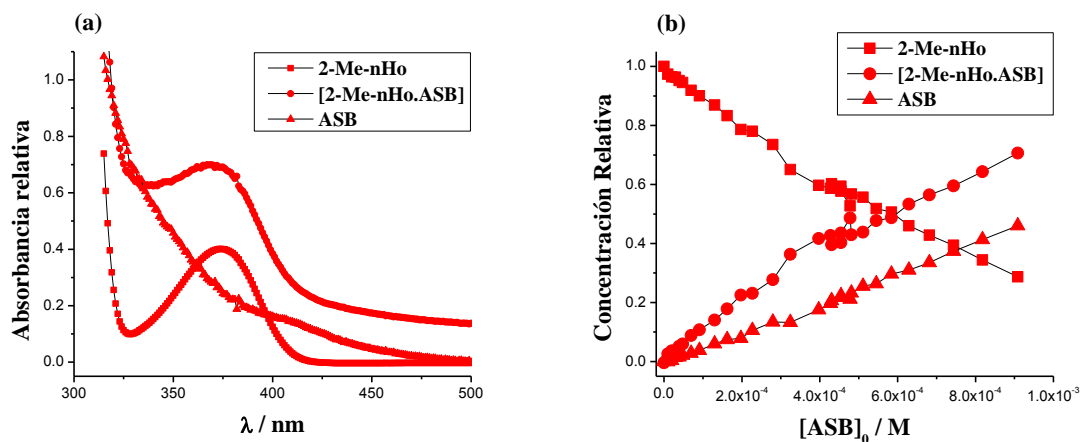


Figura 3.6. (a) Espectros de absorción UV-visible obtenidos por deconvolución de los espectros registrados para el sistema 2-Me-nHo / ASB en condiciones de pH 4,9. (b) Evolución de la concentración relativa de cada especie deconvolucionada en (a).

3.2.4. Estudio de interacción entre β Cs y ASB mediante técnicas de emisión fluorescente, en condiciones de pH controlado

La interacción entre β Cs y ASB se estudió, además, mediante técnicas de luminiscencia molecular (emisión fluorescente) de estado estacionario y resueltas en el tiempo. En base al comportamiento general descrito en la sección anterior, se seleccionaron las especies nHo y 2-Me-nHo como cromóforos representativos de cada subgrupo de compuestos (con N-2 libre y metilado, respectivamente). Se estudió la dependencia de la emisión fluorescente de estas dos β Cs con la concentración de la proteína ASB, evaluando también el efecto del pH del medio. Este tipo de análisis, no sólo es útil para corroborar-corriger los valores de constantes de interacción entre los estados electrónicos basales de las β Cs y ASB determinados anteriormente, sino también, brinda información adicional sobre la interacción entre el primer estado excitado singlete (S_1) del cromofóro y la proteína en su estado electrónico basal.

3.2.4.1 Espectros de emisión y decaimientos de fluorescencia de nHo y 2-Me-nHo en soluciones de pH controlado.

En el Capítulo 2 se describieron las principales características espectroscópicas de estos compuestos en soluciones acuosas. Sin embargo, el agregado de las diferentes sales puede influir en este tipo de propiedades, tal como lo demostraron Reyman *et al.*, y Sakurovs *et al.*, para los casos concretos del agregado de fosfatos[24,25] y acetatos.[25]

Consecuentemente, como medida previa a las determinaciones de interacción con ASB propiamente dicha, se procedió a evaluar las características o propiedades emisoras (fluorescencia) de los compuestos estudiados en presencia de en las diferentes sales usadas en nuestros experimentos para la regulación del pH (*buffers* acetato, fosfato y bórax). Se registraron los respectivos espectros de emisión y los correspondientes decaimientos de la emisión fluorescente en cada condición experimental: pH y tipo de solución *buffer* usada para nHo (Figuras 3.7 a 3.9) y 2-Me-nHo (Figuras 3.10 a 3.12). Con fines comparativos, se incluyen los espectros y decaimientos correspondientes obtenidos en soluciones acuosas con pH controlado (Capítulo 2).

Típicamente, en las tres condiciones de pH ensayadas, ambos compuestos muestran el mismo comportamiento general: *(i)* la interacción de β C con los *buffers* no induce la formación de nuevas especies emisoras con respecto a lo observado en agua. Brevemente, en condiciones ácidas solo se observa la emisión de la especie protonada del compuesto ensayado (βCH^+), con su banda de emisión típica centrada en ~ 450 nm, y los correspondientes decaimientos muestran la presencia de una única especie emisora a lo largo de toda la banda de emisión. Por su parte, los espectros registrados a pH 7,4 y 9,5, donde la especie βCN del nHo está presente en las soluciones, muestran la presencia de las dos especies emisoras típicas $^1[\beta\text{CN}]^*$ y $^1[\beta\text{CH}^+]^*$ con bandas centradas en ~ 380 y 450 nm, respectivamente. Los decaimientos ($\lambda_{\text{fluo}} = 380$ nm) muestran un comportamiento bi-exponencial, evidenciando la presencia de solo dos especies emisoras. *(ii)* En todos los casos, las sales agregadas (*buffers* acetato, fosfato y bórax) inducen una clara desactivación de los estados excitados S_1 de las β Cs ($^1[\beta\text{CN}]^*$ y $^1[\beta\text{CH}^+]^*$) que se manifiesta en una marcada reducción de los Φ_F y τ_F observados en las soluciones *buffers*, con respecto a los valores observados en agua (ver insertos en cada figura). Esta desactivación dinámica involucra, muy probablemente, procesos de transferencia protónica entre las β Cs (desde su estado S_1) y las especies constitutivas de los *buffers* ($\text{CH}_3\text{COOH} / \text{CH}_3\text{COO}^-$, $\text{HPO}_4^{-2} / \text{H}_2\text{PO}_4^-$ o $\text{H}_3\text{BO}_3 / \text{B}_4\text{O}_7^{-2}$) tal como se sugirió previamente en la literatura.[24,26]

Cabe aclarar que, si bien este comportamiento cualitativo ya fue descrito para los casos de fosfato y acetato, desde el punto de vista cuantitativo, los resultados presentados en esta sección son totalmente novedosos para los tres casos estudiados (*buffers* acetato, fosfato y bórax).

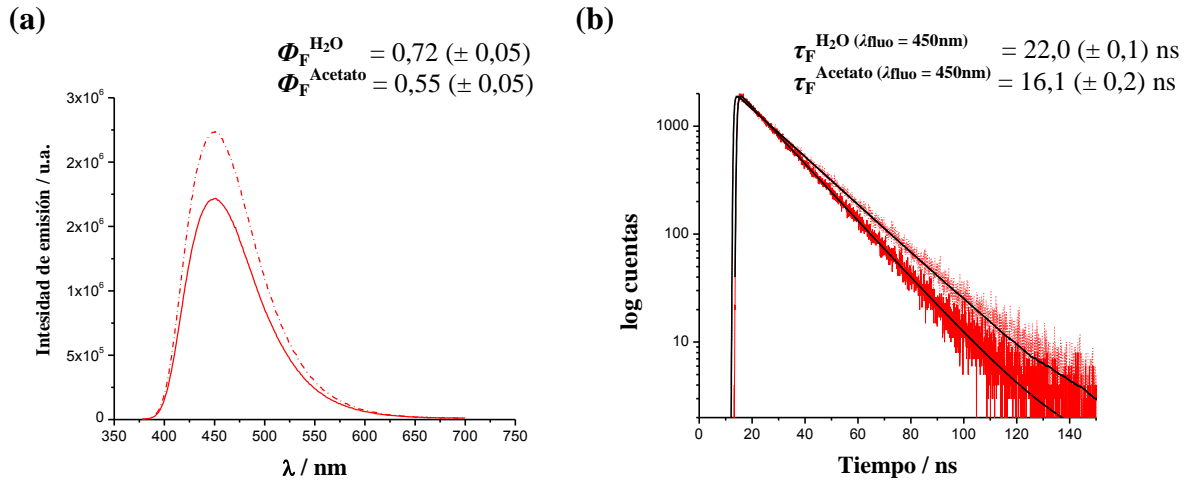


Figura 3.7 (a) Espectros de emisión de fluorescencia de nHo en solución acuosa pH 4,9 (línea punteada) y en *buffer* acetato pH 4,9 (línea continua), λ_{exc} 371 nm. (b) Decaimiento de fluorescencia de nHo en solución acuosa pH 4,9 (línea punteada) y en *buffer* acetato pH 4,9 (línea continua). $\lambda_{\text{exc}} = 341$ nm y $\lambda_{\text{fluo}} = 450$ nm. Las curvas negras representan los correspondientes ajustes mono-exponenciales.

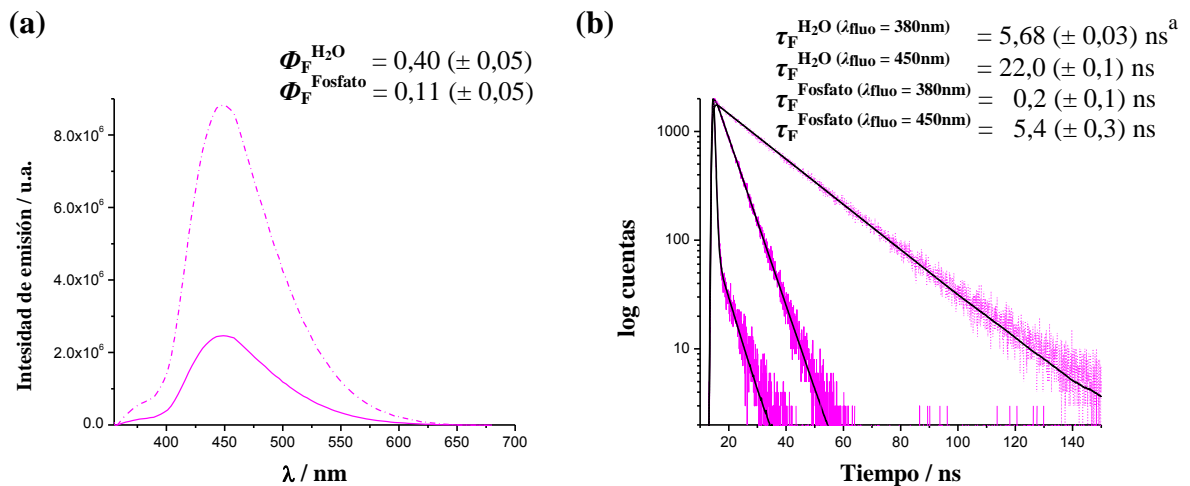


Figura 3.8 (a) Espectros de emisión de fluorescencia de nHo en solución acuosa pH 7,4 (línea punteada) y en *buffer* fosfato pH 7,4 (línea continua), λ_{exc} 349 nm. (b) Decaimiento de fluorescencia de nHo en solución acuosa pH 7,4 (línea punteada) y en *buffer* fosfato pH 7,4 (línea continua). $\lambda_{\text{exc}} = 341$ nm y $\lambda_{\text{fluo}} = 380$ y 450 nm. Las curvas negras representan los correspondientes ajustes mono- y bi-exponenciales para las señales registradas $\lambda_{\text{fluo}} = 450$ y 380 nm, respectivamente. ^a Dato extraído de referencia [27].

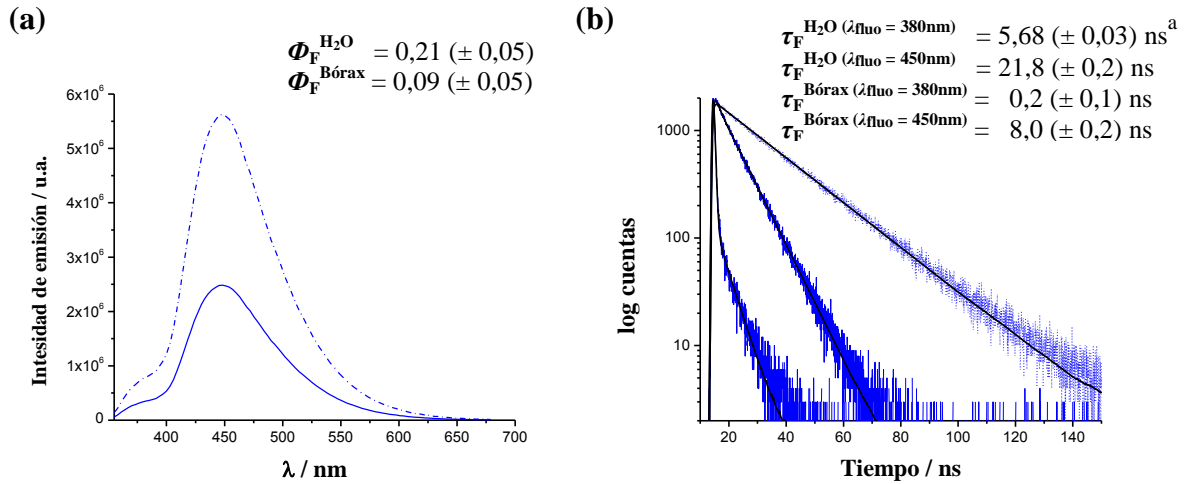


Figura 3.9 (a) Espectros de emisión de fluorescencia de nHo en solución acuosa pH 9,5 (línea punteada) y en *buffer* bórax pH 9,5 (línea continua), λ_{exc} 349 nm. (b) Decaimiento de fluorescencia de nHo en solución acuosa pH 9,5 (línea punteada) y en *buffer* bórax pH 9,5 (línea continua). $\lambda_{\text{exc}} = 341$ nm y $\lambda_{\text{fluo}} = 380$ y 450 nm. Las curvas negras representan los correspondientes ajustes mono- y bi-exponenciales para las señales registradas $\lambda_{\text{fluo}} = 450$ y 380 nm, respectivamente. ^a Dato extraído de referencia [27].

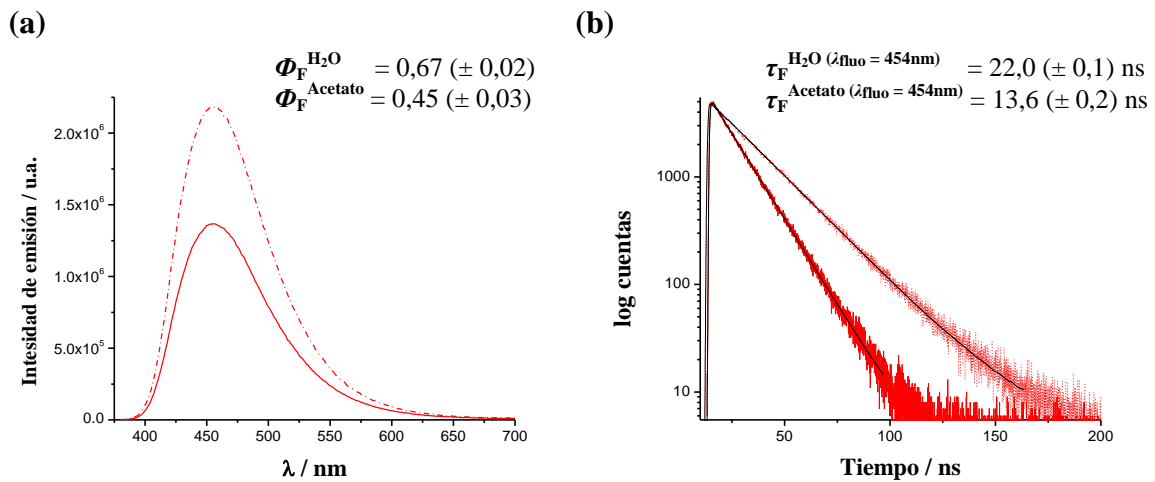


Figura 3.10 (a) Espectros de emisión de fluorescencia de 2-Me-nHo en solución acuosa pH 4,9 (línea punteada) y en *buffer* acetato pH 4,9 (línea continua), λ_{exc} 374 nm. (b) Decaimiento de fluorescencia de 2-Me-nHo en solución acuosa pH 4,9 (línea punteada) y en *buffer* acetato pH 4,9 (línea continua). $\lambda_{\text{exc}} = 341$ nm y $\lambda_{\text{fluo}} = 454$ nm. Las curvas negras representan los correspondientes ajustes mono-exponenciales.

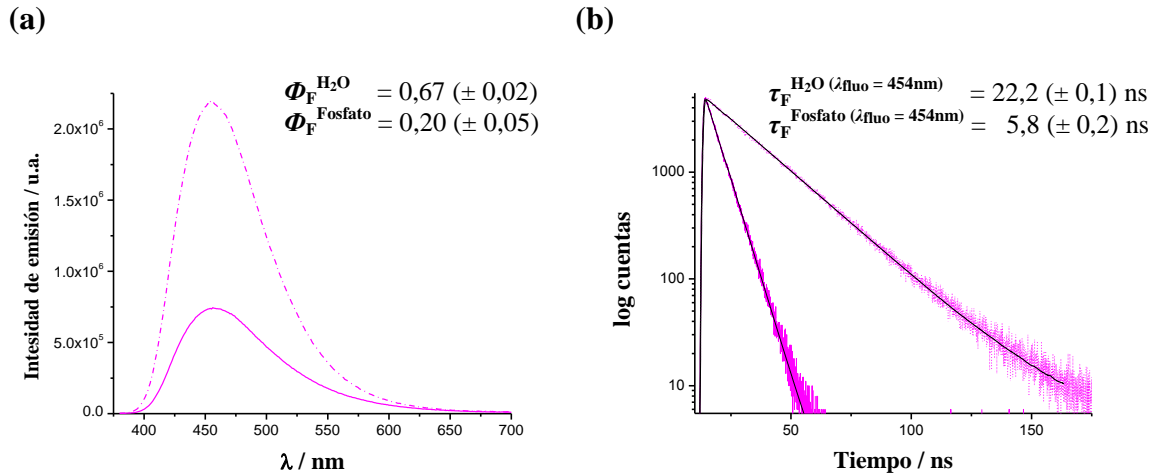


Figura 3.11 (a) Espectros de emisión de fluorescencia de 2-Me-nHo en solución acuosa pH 7,4 (línea punteada) y en *buffer* fosfato pH 7,4 (línea continua), λ_{exc} 374 nm. (b) Decaimiento de fluorescencia de 2-Me-nHo en solución acuosa pH 7,4 (línea punteada) y en *buffer* fosfato pH 7,4 (línea continua). $\lambda_{\text{exc}} = 388$ nm y $\lambda_{\text{fluo}} = 454$ nm. Las curvas negras representan los correspondientes ajustes mono-exponenciales.

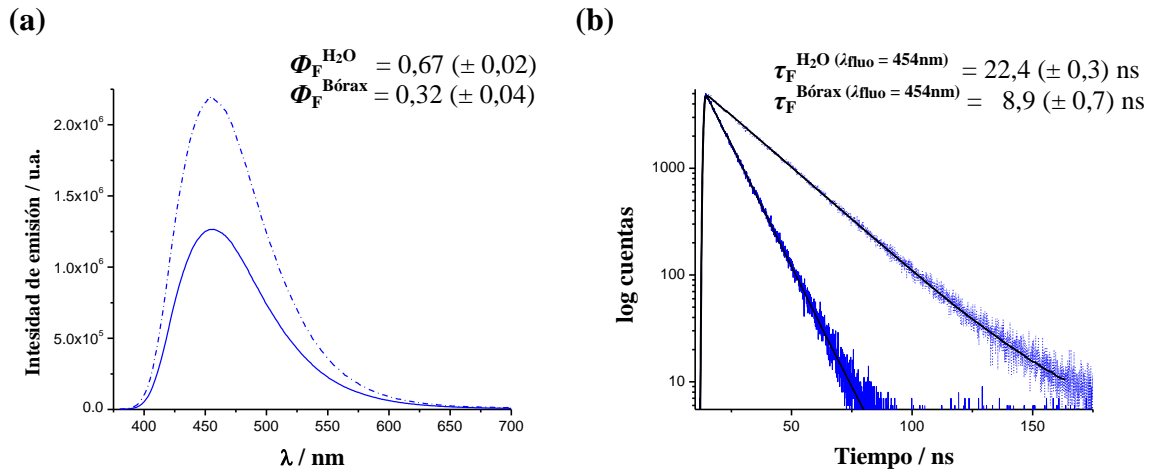


Figura 3.12 (a) Espectros de emisión de fluorescencia de 2-Me-nHo en solución acuosa pH 9,5 (línea punteada) y en *buffer* bórax pH 9,5 (línea continua), λ_{exc} 374 nm. (b) Decaimiento de fluorescencia de 2-Me-nHo en solución acuosa pH 9,5 (línea punteada) y en *buffer* bórax pH 9,5 (línea continua). $\lambda_{\text{exc}} = 388$ nm y $\lambda_{\text{fluo}} = 454$ nm. Las curvas negras representan los correspondientes ajustes mono-exponenciales.

3.2.4.2 Espectros de emisión y decaimientos de fluorescencia de ASB a pH controlado

La región del espectro electromagnético activa, en términos de rangos de excitación y emisión, que se utilizará para llevar a cabo los estudios de interacción entre β Cs y ASB ($\lambda > 340$ nm) presenta una distancia razonable respecto a la región del espectro donde la proteína presenta su mayor absorción (200-300 nm). Sin embargo, dadas las características de fluorescencia intrínseca de ASB y teniendo en cuenta, además, que en ciertos ensayos la concentración de ASB agregada al medio será lo suficientemente elevada como para absorber parte de la radiación de análisis incidente, se vuelve necesario evaluar la

fluorescencia intrínseca de ASB en las condiciones experimentales empleadas en este trabajo de Tesis.

Las Figuras 3.13 - 3.15 muestran los resultados obtenidos tanto en los estudios en estado estacionario como en los resueltos en el tiempo, para soluciones de ASB en presencia de *buffers* acetato, fosfato y bórax, respectivamente. En todos los casos se ve el mismo comportamiento general, donde los espectros muestran la presencia de una banda de emisión que se vuelve más evidente conforme aumente la concentración de ASB. Ciertamente, esta emisión global observada podría deberse a los diferentes cromóforos que constituyen la proteína. Sin embargo, por sus características espectroscópicas (sección 3.1.2), es de esperar que la mayor contribución se deba a la presencia del aminoácido triptófano (Trp).

Además, las soluciones fueron analizadas mediante la técnica de luminiscencia molecular resuelta en el tiempo. En particular, se registraron los decaimientos de fluorescencia de ASB (Figuras 3.13 (b), 3.14 (b) y 3.15 (b)) en las tres condiciones de pH seleccionadas. Los resultados obtenidos muestran, en todos los casos, la presencia de más de una especie emisora. Matemáticamente, todos los decaimientos se describen, de manera más adecuada, mediante ajustes tri-exponenciales. Esto indica la presencia de al menos tres procesos o especies (o grupos de especies) emisoras, cada una con un tiempo de vida (τ) de $\sim 0,2$, ~ 2 y ~ 8 ns, a los que denominaremos τ_1 , τ_2 y τ_3 , respectivamente.

Si bien presenta cierta dificultad asignar de manera inequívoca cuales son los cromóforos intrínsecos de la proteína responsables de las emisiones detectadas, ciertamente los distintos triptófanos localizados en entornos diferenciales juegan un rol central (sección 3.1.2). Este fenómeno ha sido explicado en términos de conformaciones diferenciales que puede adoptar el Trp localizado en el entorno proteico. Sin embargo, trabajos recientes indican que Trp en solución muestra también un doble decaimiento, como consecuencia de la existencia de un tautómero y/o una nueva especie emisora generada desde el estado excitado del Trp.[18]

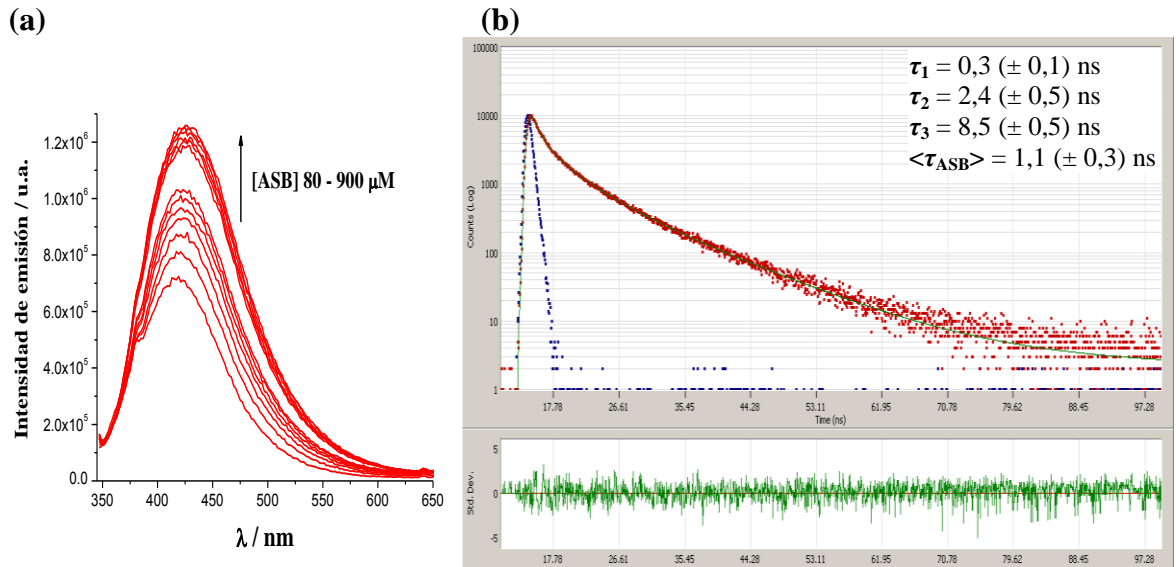


Figura 3.13. ASB en *buffer* acetato (0,1M). (a) Espectros de emisión ($\lambda_{\text{exc}} = 337 \text{ nm}$) y (b) decaimientos ($\lambda_{\text{exc}} = 341 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{fluo}} = 425 \text{ nm}$). Las curvas azul, roja y verde representan el *prompt*, el decaimiento y el ajuste tri-exponencial. Debajo la desviación estándar entre los datos experimentales y el ajuste tri-exponencial.

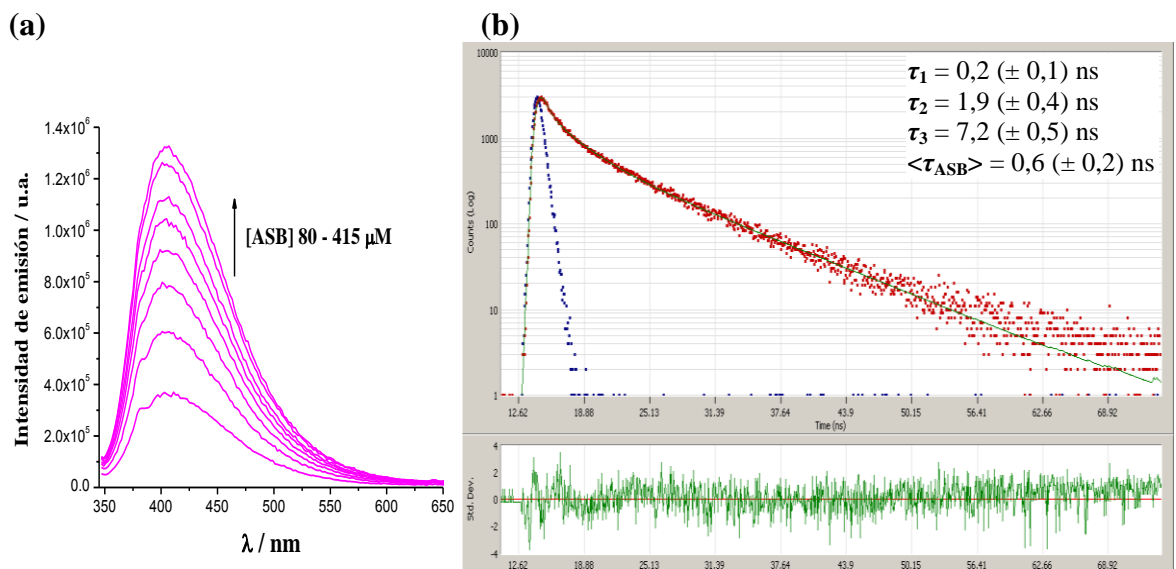


Figura 3.14. ASB en *buffer* fosfato (0,05M). (a) Espectros de emisión ($\lambda_{\text{exc}} = 337 \text{ nm}$) y (b) decaimientos ($\lambda_{\text{exc}} = 341 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{fluo}} = 405 \text{ nm}$). Las curvas azul, roja y verde representan el *prompt*, el decaimiento y el ajuste tri-exponencial. Debajo la desviación estándar entre los datos experimentales y el ajuste tri-exponencial.

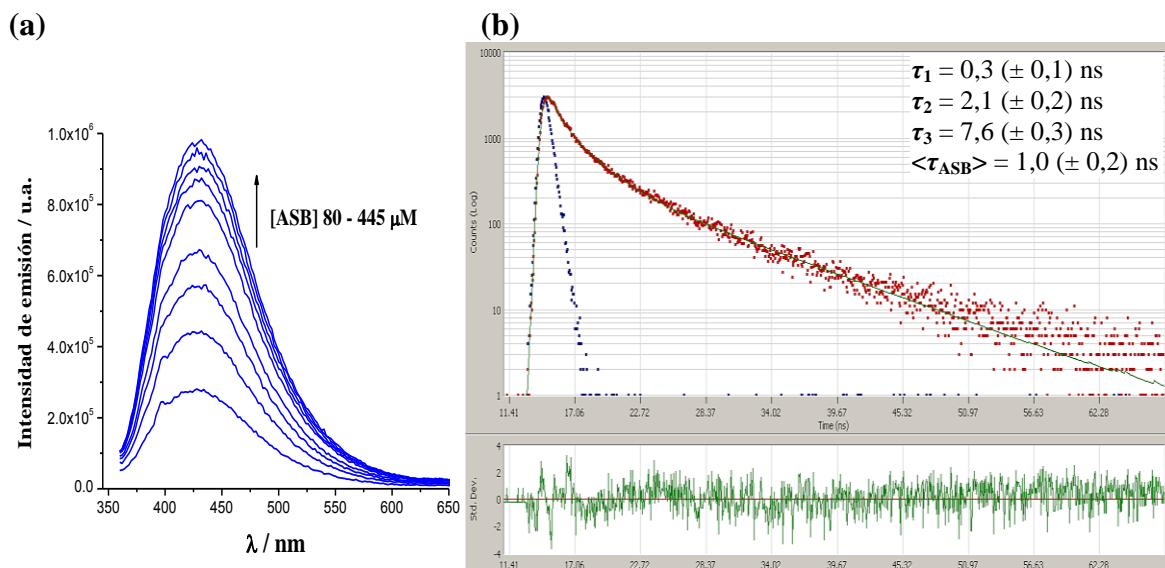


Figura 3.15. ASB en *buffer* bórax (0,0125M). (a) Espectros de emisión ($\lambda_{\text{exc}} = 349$ nm) y (b) decaimientos ($\lambda_{\text{exc}} = 341$ nm; $\lambda_{\text{fluo}} = 427$ nm). Las curvas azul, roja y verde representan el *prompt*, el decaimiento y el ajuste tri-exponencial. Debajo la desviación estándar entre los datos experimentales y el ajuste tri-exponencial.

Sin dudas, la información presentada en los párrafos precedentes será de utilidad para el análisis de los datos obtenidos para los sistemas $\beta\text{C} / \text{ASB}$, dado que permitirá eliminar o descontar las contribuciones realizadas por la fluorescencia intrínseca de ASB y así obtener información propia de las interacciones intermoleculares en estudio. Así mismo, resulta de interés introducir, en esta instancia, un nuevo parámetro que integre los tres eventos dinámicos observados. Es así que se define para la ASB el tiempo de vida promedio, $\langle \tau_{\text{ASB}} \rangle$, ponderado por la contribución total de cada uno de los decaimientos (Ecuación 3.6). Estos valores, detallados en los correspondientes insertos de la Figuras 3.13 (b), 3.14 (b) y 3.15 (b) permitirán simplificar los cálculos y deconvoluciones de las señales o decaimientos observados en los estudios de interacción $\beta\text{C} / \text{ASB}$.

3.2.4.3. Selección del método adecuado de preparación de las soluciones mezclas β C / ASB.

En primer lugar, se realizó un experimento control con el objetivo de seleccionar un procedimiento adecuado de preparación de las mezclas β C / ASB, de manera de reducir al mínimo los potenciales errores en las determinaciones de las constantes. Para tal fin, se prepararon soluciones en *buffer* de nHo y 2-Me-nHo. Como ejemplo representativo se usó el *buffer* acetato (pH 4,9). Luego se evaluó, por fluorescencia en estado estacionario, el efecto del agregado de cantidades crecientes de ASB. Este agregado de proteína se realizó siguiendo dos procedimientos de mezclado diferentes:

- (a) Método mezcla I (**Mz I**) diseñado para reducir los errores en las determinaciones debidos a los cambios relativos en la concentración del fluoróforo como consecuencia de los potenciales errores de dilución. Se preparó un volumen inicial de solución de β C en *buffer* (solución A). Esta solución se fracciona en dos partes. Sobre una de ellas se disuelve la máxima concentración de ASB que se quiere analizar, obteniendo así la que denominaremos solución B (β C + ASB). Las determinaciones fluorométricas se hacen luego partiendo de la solución A y agregando volúmenes crecientes de solución B, y de la misma manera partiendo de la solución B con el agregados sucesivos de solución A.
- (b) El método mezcla II (**Mz II**) involucra la preparación de soluciones independientes, cada una de ellas en el *buffer* correspondiente, con el alcaloide a estudiar (β Cs) a concentración constante y con concentraciones crecientes de ASB.

Los resultados se presentan en las Figuras 3.16 y 3.17, donde puede apreciarse que para cada β C evaluada, ambos métodos de mezcla dieron los mismos resultados, dentro del error experimental, tanto desde el punto de vista cualitativo (Figuras 3.16 y 3.17 (a) y (b)) como cuantitativo (Figuras 3.16 y 3.17 (c)). Esto nos permitió optar por Mz-I como metodología de trabajo y definir así una forma operativa más sencilla y precisa desde el punto de vista experimental.

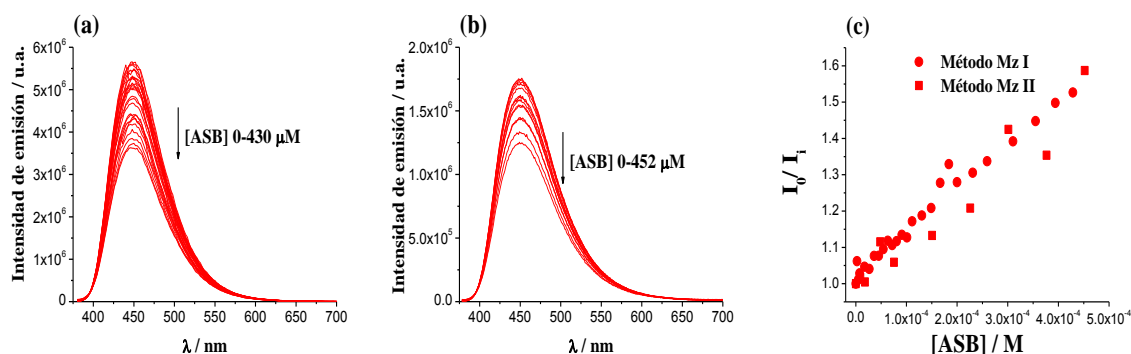


Figura 3.16. Espectros de emisión de nHo en *buffer* acetato (0,1M, pH 4,9) registrados en función de cantidades crecientes de ASB, usando los métodos de mezcla (a) Mz-I y (b) Mz-II. (c) Representación de tipo Stern-Volmer de los datos obtenidos en (a) y (b).

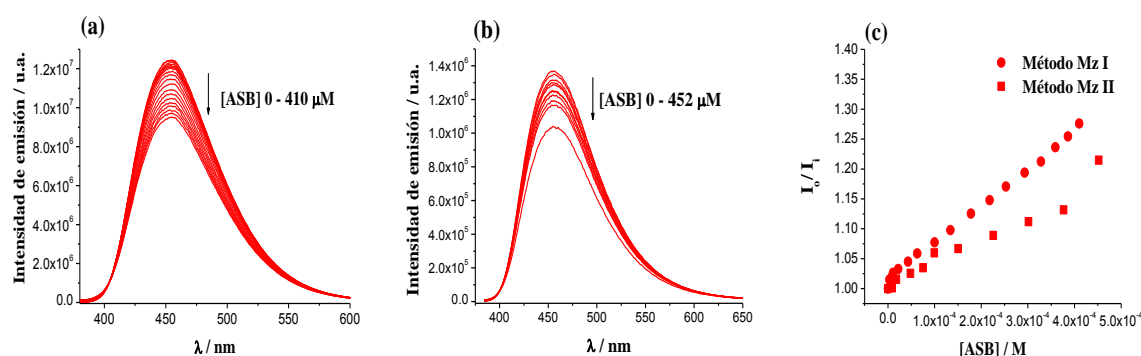


Figura 3.17. Espectros de emisión de 2-Me-nHo en *buffer* acetato (0,1M, pH 4,9) registrados en función de cantidades crecientes de ASB, usando los métodos de mezcla (a) Mz-I y (b) Mz-II. (c) Representación de tipo Stern-Volmer de los datos obtenidos en (a) y (b).

3.2.4.4. Desactivación de la fluorescencia de nHo y 2-Me-nHo por ASB: análisis cualitativo mediante estudios en condiciones de estado estacionario

Para llevar adelante el estudio de la interacción, propiamente dicho, se registraron los espectros de fluorescencia de nHo y 2-Me-nHo en presencia de cantidades crecientes de ASB, utilizando el método de mezcla Mz-I (Figuras 3.18 y 3.19, respectivamente). Desde el punto de vista cualitativo, estos datos concuerdan con los resultados obtenidos por espectroscopia de absorción UV-visible (sección 3.2.2). A continuación se detallan los principales comportamientos generales observados:

(a) En las tres condiciones de pH estudiadas, los espectros de emisión corregidos por la absorción propia de la proteína (Ecuación 3.2, sección 3.4.4) muestran cambios en su forma e intensidad como consecuencia del incremento en la concentración de ASB. Sin descartar la existencia de los procesos de interacción entre β Cs y ASB desde sus estados S_0 (sección 3.2.2), el hecho aquí descrito pone de manifiesto la presencia de interacción/es entre los correspondientes estados electrónicos excitados S_1 de cada una de las especies ácido-base de las β Cs estudiadas con ASB.

(b) Se observan dos perfiles espectroscópicos diferenciales, dependiendo de la estructura química de la β C ensayada:

(i) 2-Me-nHo, forma catiónica que no presenta grupos ionizables en el rango de pH analizado, muestra un comportamiento espectroscópico dependiente de las condiciones del medio. En soluciones *buffers* de acetato y bórax, el incremento en la concentración de ASB induce una disminución en la intensidad de la única banda de emisión detectada, centrada en ~ 450 nm, correspondiente al $^1[\beta\text{C-CH}_3^+]$ * (Figuras 3.19 (a) y (c)). Por el contrario, los ensayos realizados en solución *buffer* fosfato, muestran el comportamiento inverso: el incremento en la [ASB] induce un aumento en la intensidad total de emisión de la banda analizada (Figura 3.19 (b)).

El comportamiento descrito en el párrafo anterior es, aunque no exclusivo, propio de un tipo de interacción entre el fluoróforo y el *quencher* que da lugar a la formación de un complejo emisor (ver sección 3.2.4.5). Por lo tanto, en los casos en los que el complejo formado presente un rendimiento cuántico de emisión fluorescente (Φ_F) menor al del reactivo fluoróforo, el comportamiento global de interacción dará lugar al perfil descrito para las soluciones en *buffers* acetato y bórax. Por el contrario, si el complejo formado presenta un Φ_F mayor al del fluoróforo reactivo, en el solvente inicial, entonces tendrá lugar el comportamiento observado en *buffer* fosfato.

Basados en la hipótesis o modelo de interacción sugerido en la sección 3.2.2 que propone la localización de las β Cs catiónicas en el sitio hidrofílico de la proteína (Esquema 3.3), este sitio puede brindar un entorno de características tales que el fluoróforo emita pero, lógicamente, con una eficiencia (Φ_F) diferente a la de esta misma especie en el seno de la solución (varia el grado de movilidad del fluoróforo considerablemente). En este punto, teniendo en mente los resultados presentados en las Figuras 3.10 a 3.12, donde se establece que el ión fosfato es la especie que induce la mayor desactivación del 2-Me-nHo en solución, comparado con las sales acetato y bórax, se puede estimar que el valor de Φ_F en el entorno proteico esperado deber estar comprendido entre $0,20 < \Phi_F < 0,32$.

En todas las condiciones de pH, la posición del máximo de emisión permanece inalterada a lo largo de todo el rango de concentraciones de ASB analizado, y tampoco se observa la formación de bandas emisoras adicionales (Figura 3.19). Estos hechos son coherentes con la emisión de 2-Me-nHo en un entorno polar con menor concentración relativa de *quencher* (acetato, fosfato y/o bórax).

(ii) El perfil espectral observado para nHo es fuertemente dependiente del pH del medio y de la longitud de onda de excitación (zona I o II definidas en la sección 3.2.2). Brevemente, en aquellas condiciones de pH en las cuales la especie nHoH^+ está presente en el medio (pH 4,8 y 7,4), la excitación de la mezcla $\beta\text{C} / \text{ASB}$ en la zona I del espectro da lugar a la aparición de una única banda de emisión centrada en ~ 450 nm, típica de la especie $^1[\text{nHoH}^+]$ *, cuya intensidad se vuelve menor al incrementar la concentración de ASB (Figura 3.18 (a)). La observación de esta única banda de emisión es, en cierta forma, predecible dado que nHoH^+ es la única especie presente en las soluciones capaz de absorber la radiación incidente en esa región del espectro electromagnético (zona I).

Por el contrario, cuando la longitud de onda de excitación seleccionada pertenece a la zona II, donde ambas especies ácido-base de nHo están presentes como consecuencia de la alcalinidad del medio (pH 7,4 o 9,5) o inducido por el incremento en la concentración de ASB (Figura 3.4), se detectan dos bandas emisoras: la primera centrada en ~ 380 nm, cuya intensidad presenta una relación de proporcionalidad directa con la concentración de ASB y otra banda, centrada en ~ 450 nm, con una relación de proporcionalidad inversa en relación a la [ASB] (Figura 3.18 (b) y (c)). Consecuentemente, el agregado de ASB induce la formación de la especie emisora a ~ 380 nm y el consumo o desaparición de la especie que emite en ~ 450 nm. Tal como se describió en el Capítulo 2, las especies responsables de dicha emisión son $^1[\text{nHoN}]$ * y $^1[\text{nHoH}^+]$ *, respectivamente.

Es clave volver a destacar que el fenómeno descrito en el párrafo anterior se observa aún en condiciones ácidas de pH, tal como se muestra en los insertos de la Figura 3.18 (a). Estos resultados confirman la hipótesis planteada en la sección 3.2.2 que sugiere que, independientemente del pH del medio, ASB induce la formación de nHoN, como consecuencia del desplazamiento del equilibrio ácido-base característico de las βC s no sustituidas en N-2, al ofrecer un entorno (sitio hidrofóbico básico) diferente al del seno de la solución.

(c) En los párrafos anteriores se indicó que, en los experimentos realizados con nHo en medio ácido, la emisión en ~ 380 nm debida a la especie $^1[\text{nHoN}]$ * solo se observa cuando la mezcla $\text{nHoH}^+ / \text{ASB}$ es excitada en la zona II del espectro (región donde absorbe la especie nHoN que se forma como consecuencia del agregado de ASB). Este hecho indica que esta especie emisora, $^1[\text{nHoN}]$ *, detectada en los espectros en la región ~ 380 nm, no se estaría generando a partir de la especie $^1[\text{nHoH}^+]$ * libre en solución, como consecuencia de participar en procesos transferencia de protones con ASB. Por el contrario, la especie

$^1[\text{nHoN}]^*$ se formaría desde el estado electrónico fundamental de la especie nHoN en un entorno aprótico (hidrofóbico o con carácter básico).

(d) Más aún, el hecho de que en estas soluciones acuosas en presencia de ASB se observe la banda de emisión en ~ 380 nm (cuando se excita en la zona II del espectro en todo el rango de pH analizado), indica que al interactuar con ASB el entorno de la molécula de nHoN debe ser hidrofóbico. De lo contrario, debería observarse la rápida protonación de la especie $^1[\text{nHoN}]^*$ (formada luego de la absorción de la radiación por parte de nHoN) típico de estos compuestos en soluciones acuosas.[28]

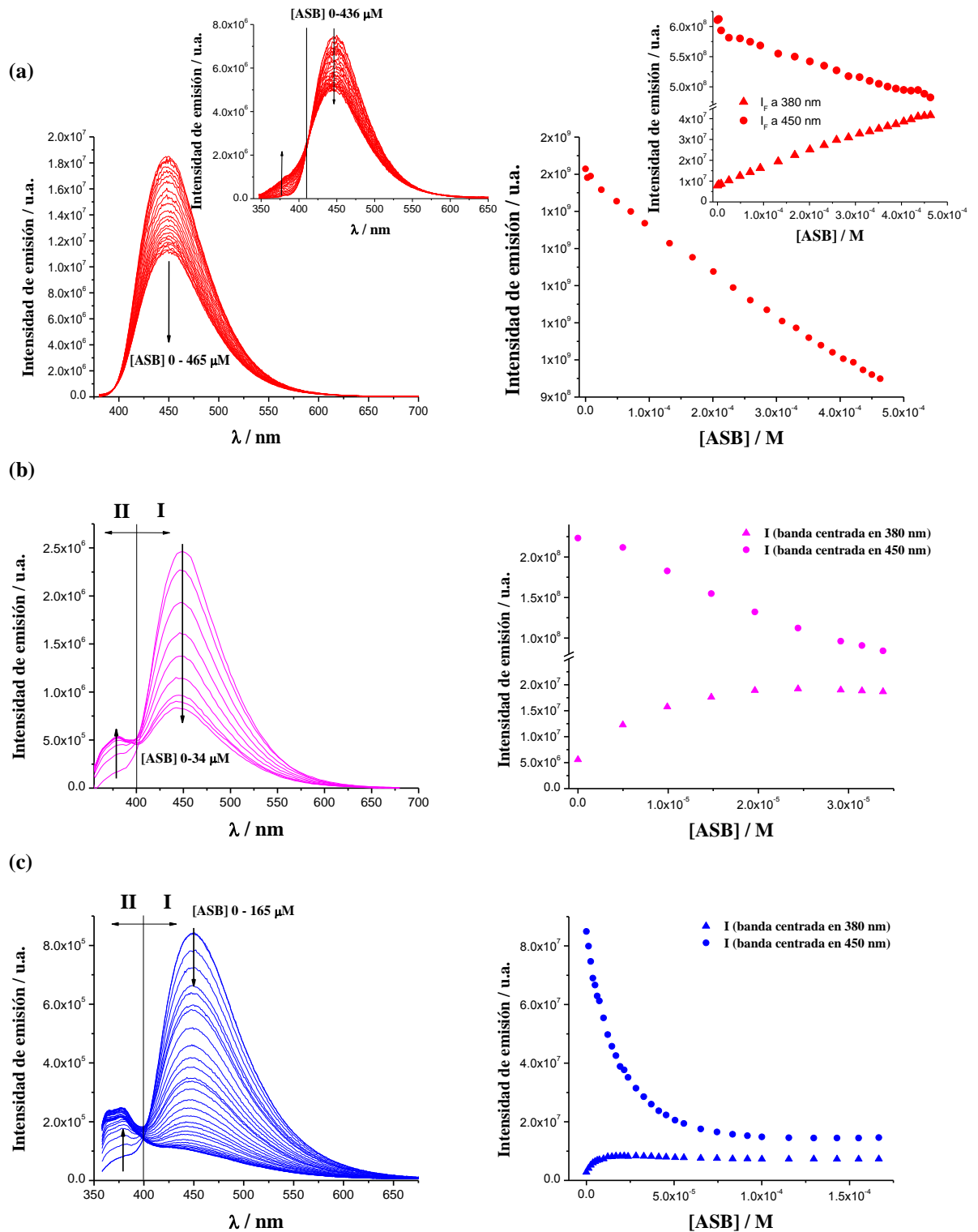


Figura 3.18. Columna izquierda: Espectros de emisión de fluorescencia de nHo (25 μ M) en presencia de cantidades crecientes de ASB, obtenidos en las diferentes condiciones de pH: (a) buffer acetato pH 4,9, $\lambda_{exc} = 370$ nm. Inserto: buffer acetato pH 4,8, $\lambda_{exc} = 337$ nm), (b) buffer fosfato pH 7,4; $\lambda_{exc} = 349$ nm y (c) buffer bórax pH 9,5; $\lambda_{exc} = 349$ nm. Las concentraciones límites de ASB (M) se indican en cada gráfico. Columna derecha: Variación de la intensidad de fluorescencia del nHo en función de la [ASB].

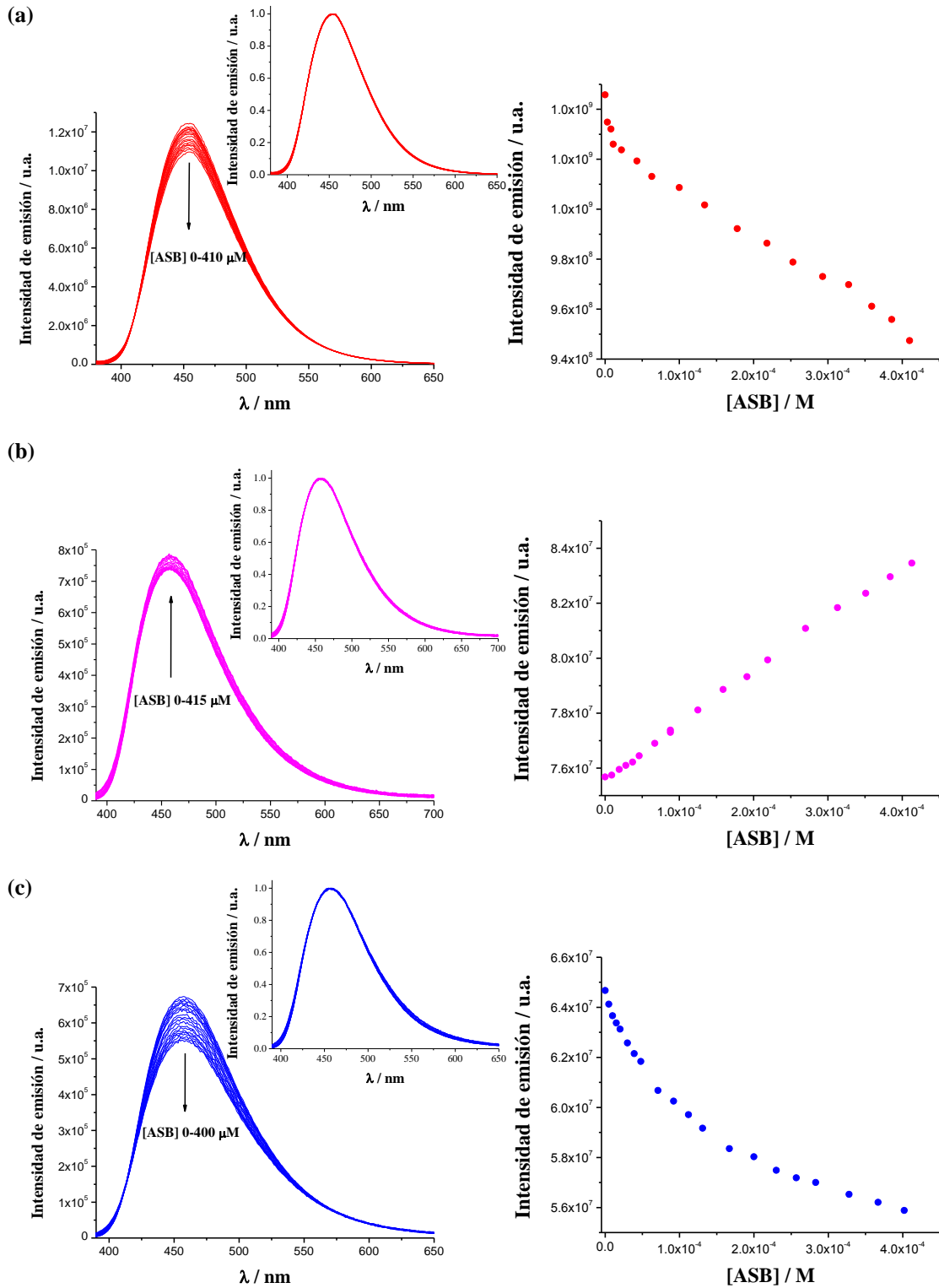


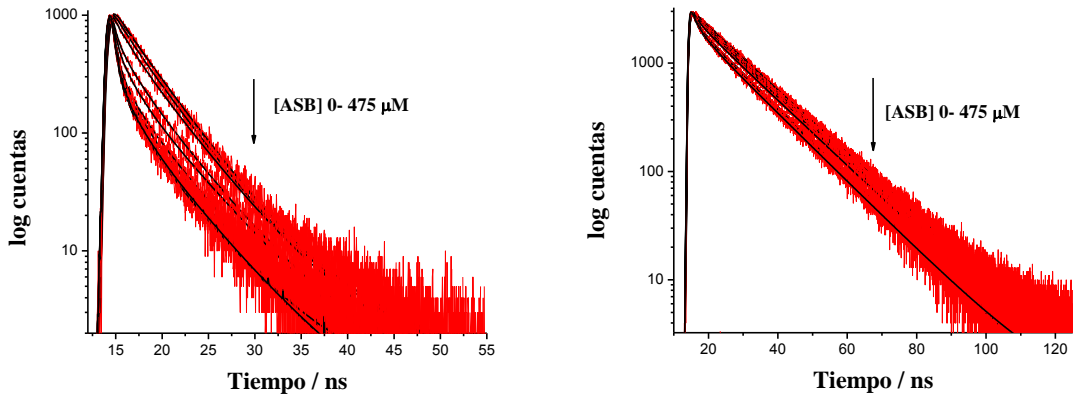
Figura 3.19. Columna izquierda: Espectros de emisión de fluorescencia de soluciones de 2-Me-nHo (25 μ M, $\lambda_{exc} = 374$ nm) en presencia de cantidades crecientes de ASB, obtenidos en las diferentes condiciones de pH: (a) *buffer* acetato pH 4,8, (b) *buffer* fosfato pH 7,4 y (c) *buffer* bórax 9,5. Las concentraciones límites de ASB (M) se indican en cada gráfico. *Insertos:* Espectros de emisión normalizados. *Columna derecha:* Variación de la intensidad de fluorescencia del nHo en función de la [ASB].

3.2.4.5. Desactivación de la fluorescencia de nHo y 2-Me-nHo por ASB: análisis cualitativo mediante estudios con técnicas resueltas en el tiempo.

De manera complementaria, se realizaron estudios empleando técnicas de fluorescencia resueltas en el tiempo, medido a través de la técnica TCSPC (sección 3.4.4). Típicamente, se registraron los decaimientos de fluorescencia de nHo y 2-Me-nHo en presencia de cantidades crecientes de ASB (Figuras 3.20 – 3.22 y 3.23 – 3.25, respectivamente). Las mezclas se realizaron adoptando el método Mz-I. En todos los casos, los decaimientos se obtuvieron excitando las soluciones con un nano-LED (341 nm) y registrando la emisión en cada uno de los máximos de emisión descritos en 3.2.4.1.

Cabe aclarar que, dada la complejidad de los decaimientos y, en muchos casos, debido a la muy baja contribución relativa de algunas de las especies observadas, fue necesario recurrir al ajuste matemático de los decaimientos fijando, como condición de ajuste, un valor definido para la contribución debida a la fluorescencia intrínseca de ASB estimada en la sección 3.2.4.2 ($\langle\tau_{\text{ASB}}\rangle \approx 1$ ns, Figuras 3.13 a 3.15).

(a)



(b)

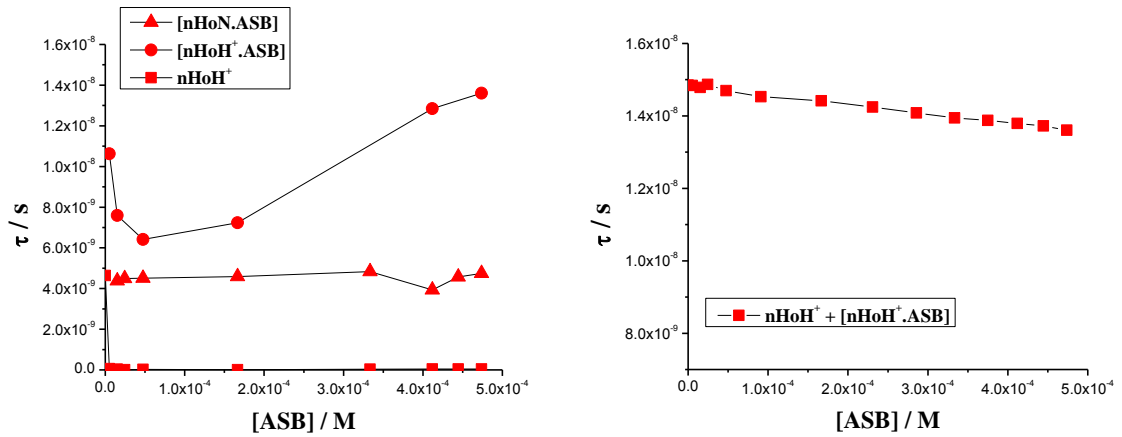


Figura 3.20. (a) Decaimientos de la emisión fluorescente y sus respectivos ajustes tetra-exponenciales en función del tiempo de soluciones de nHo (30 μ M) en presencia de ASB en *buffer* acetato de pH 4,9 ($\lambda_{exc} = 341$ nm). En la columna izquierda y derecha se muestran los resultados registrados $\lambda_{fluo} = 380$ y 450 nm, respectivamente. Las concentraciones límites de ASB (M) se indican en cada gráfico. (b) Variación de los tiempos de vida de fluorescencia del nHo vs. [ASB] observados en (a).

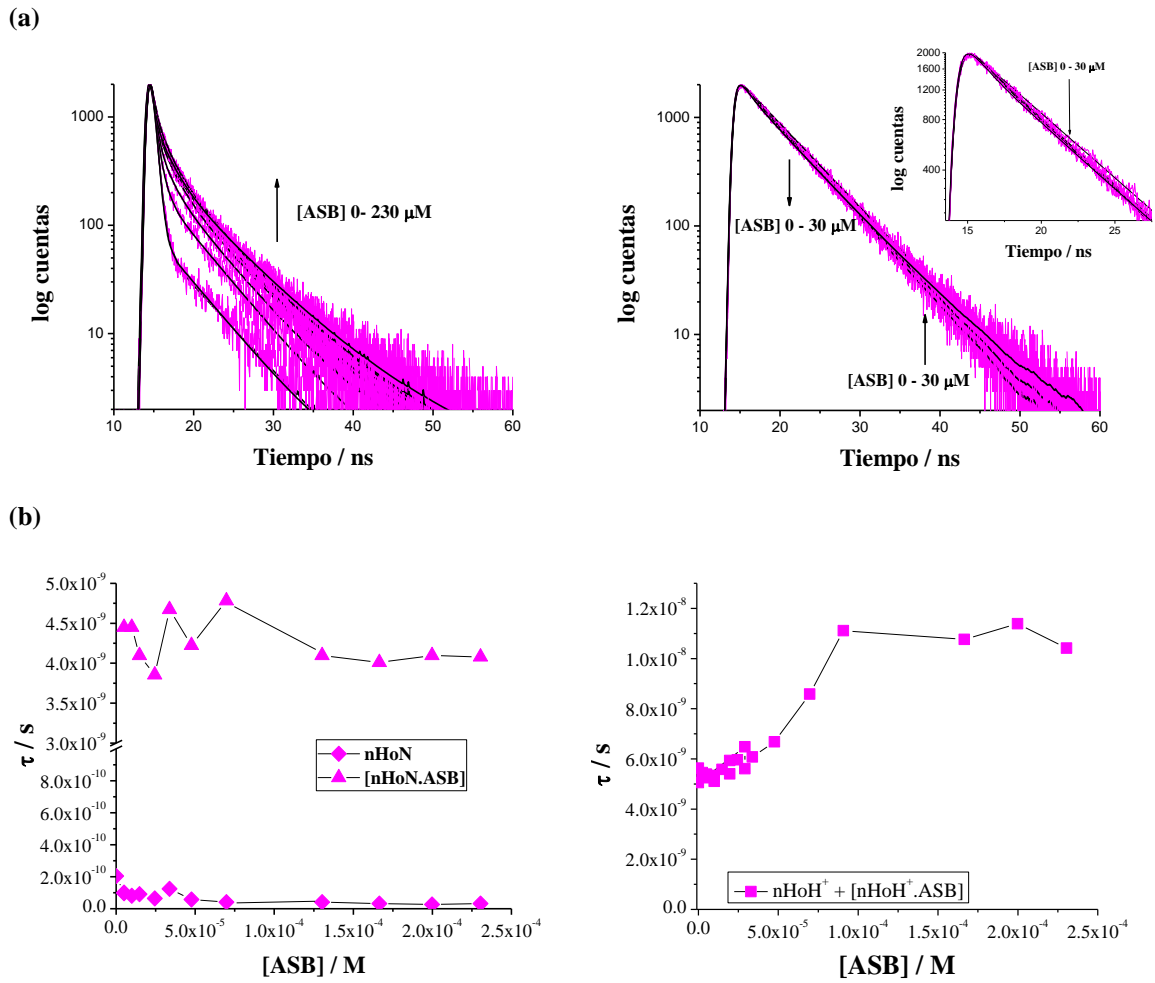
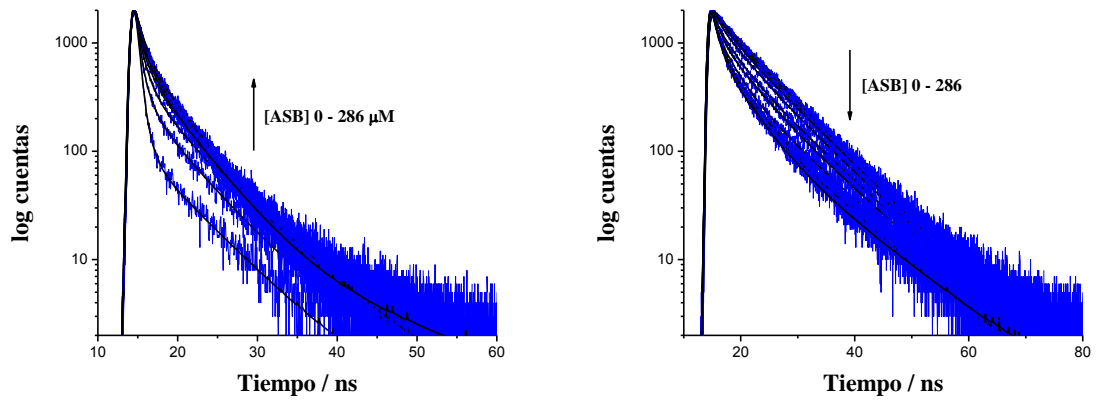


Figura 3.21. (a) Decaimientos de la emisión fluorescente y sus respectivos ajustes tetra-exponenciales en función del tiempo de soluciones de nHo (30 μ M) en presencia de ASB en *buffer* fosfato de pH 7,4 ($\lambda_{exc} = 341$ nm). En la columna izquierda y derecha se muestran los resultados registrados $\lambda_{fluo} = 380$ y 450 nm, respectivamente. Las concentraciones límites de ASB (M) se indican en cada gráfico. (b) Variación de los tiempos de vida de fluorescencia del nHo vs. [ASB] observados en (a).

(a)



(b)

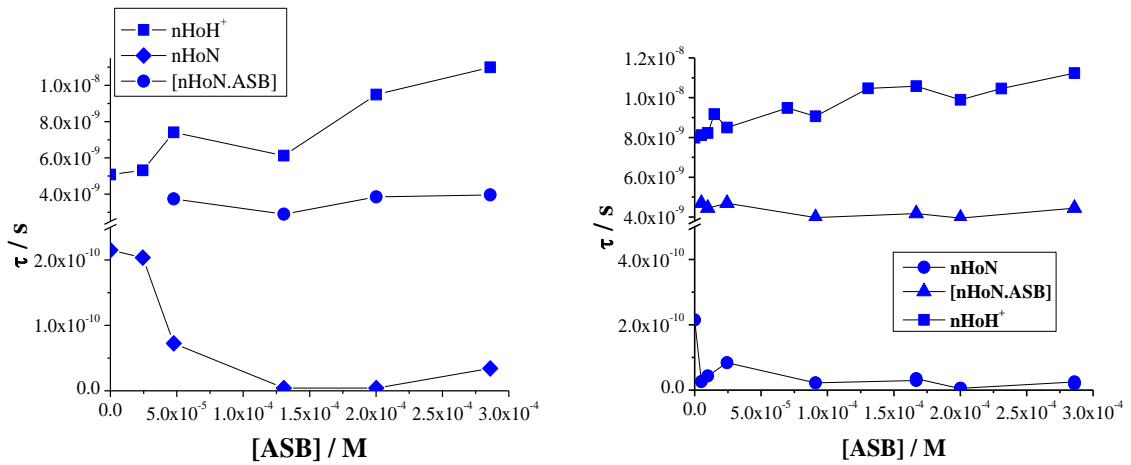


Figura 3.22. (a) Decaimientos de la emisión fluorescente y sus respectivos ajustes tetra-exponenciales en función del tiempo de soluciones de nHo ($30 \mu\text{M}$) en presencia de ASB en *buffer* bórax de pH 9,5 ($\lambda_{\text{exc}} = 341 \text{ nm}$). En la columna izquierda y derecha se muestran los resultados registrados $\lambda_{\text{fluo}} = 380$ y 450 nm , respectivamente. Las concentraciones límites de ASB (M) se indican en cada gráfico. (b) Variación de los tiempos de vida de fluorescencia del nHo vs. [ASB] observados en (a).

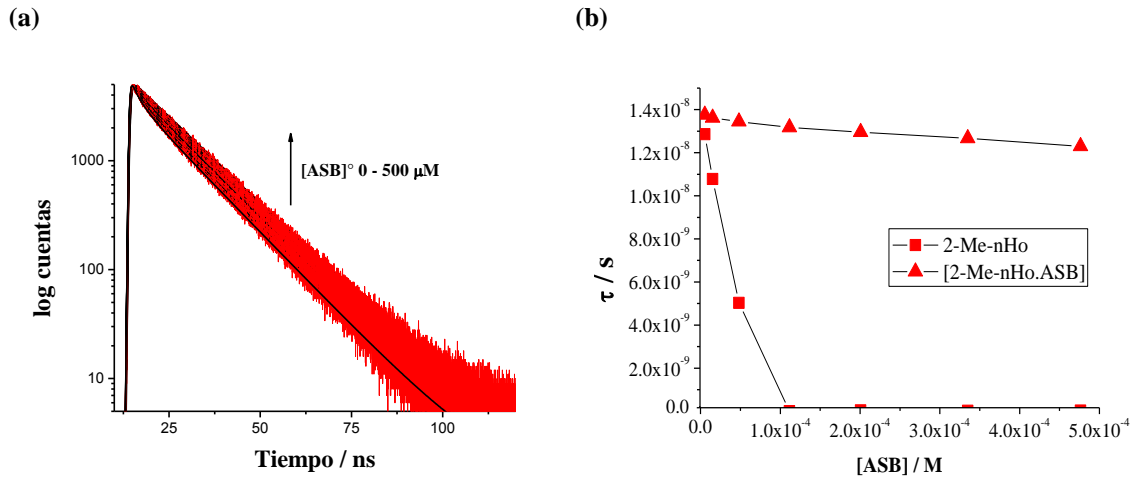


Figura 3.23. (a) Decaimientos de la emisión fluorescente y sus respectivos ajustes tri-exponenciales en función del tiempo de soluciones de 2-Me-nHo (25 μM) en presencia de ASB en *buffer* acetato de pH 4,8 ($\lambda_{\text{exc}} = 341 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{fluo}} = 454 \text{ nm}$). Las concentraciones límites de ASB (M) se indican en cada gráfico. (b) Variación de los tiempos de vida de fluorescencia del 2-Me-nHo vs. [ASB] observados en (a).

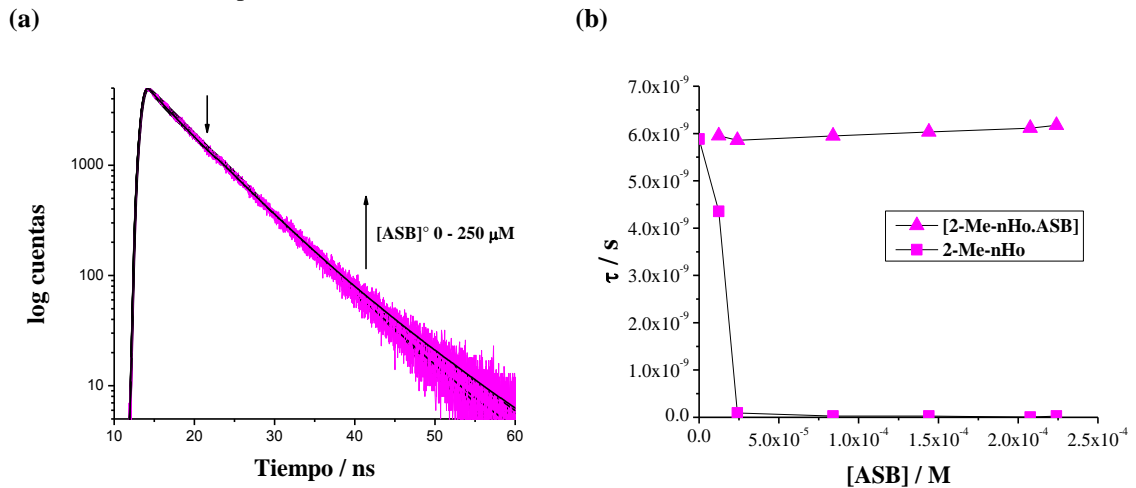


Figura 3.24. (a) Decaimientos de la emisión fluorescente y sus respectivos ajustes tri-exponenciales en función del tiempo de soluciones de 2-Me-nHo (25 μM) en presencia de ASB en *buffer* fosfato de pH 7,4 ($\lambda_{\text{exc}} = 341 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{fluo}} = 454 \text{ nm}$). Las concentraciones límites de ASB (M) se indican en cada gráfico. (b) Variación de los tiempos de vida de fluorescencia del 2-Me-nHo vs. [ASB] observados en (a).

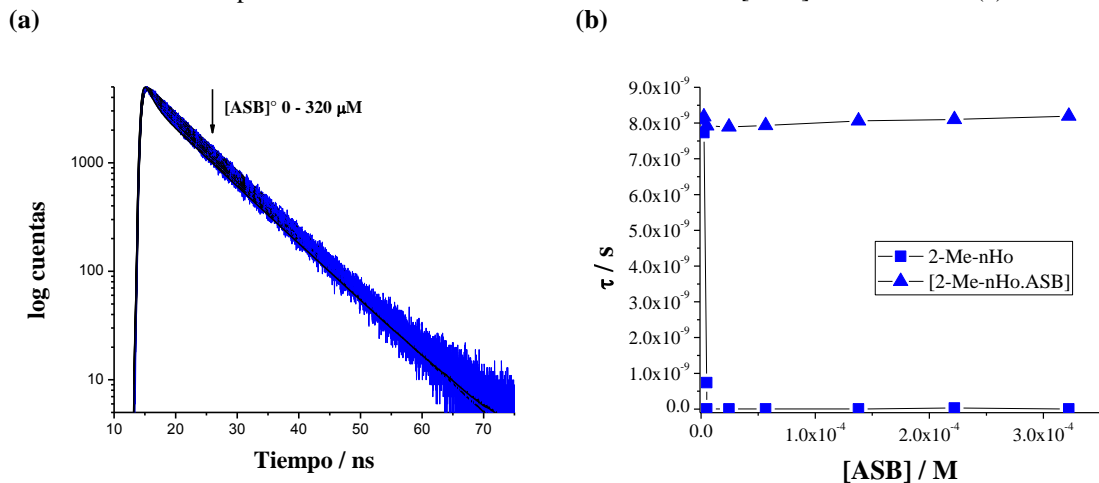


Figura 3.25. (a) Decaimientos de la emisión fluorescente y sus respectivos ajustes tri-exponenciales en función del tiempo de soluciones de 2-Me-nHo (25 μM) en presencia de ASB en *buffer* bórax de pH 9,5 ($\lambda_{\text{exc}} = 341 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{fluo}} = 450 \text{ nm}$). Las concentraciones límites de ASB (M) se indican en cada gráfico. (b) Variación de los tiempos de vida de fluorescencia del 2-Me-nHo vs. [ASB] observados en (a).

En términos generales, el comportamiento dinámico una vez más, muestra para cada β C ensayada un comportamiento cuali- y cuantitativo diferente:

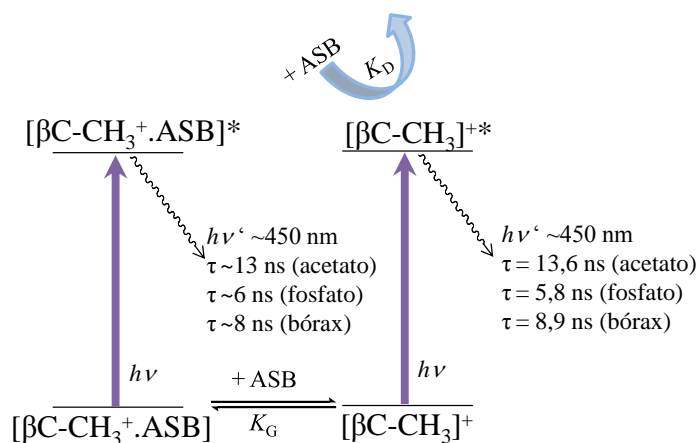
(a) En todas las condiciones experimentales, 2-Me-nHo mostró en su condición inicial ($[ASB] = 0 \mu\text{M}$) decaimientos mono-exponenciales tal como se mostró en las Figuras 3.10 a 3.12. Sin embargo, el agregado de cantidades crecientes de ASB dio lugar a decaimientos que fueron ajustados adecuadamente a través de ecuaciones tri-exponenciales. Por lo tanto, además del decaimiento intrínseco de ASB, se observan dos especies emisoras adicionales. En base a los resultados presentados en las secciones 3.2.2 y 3.2.3, donde se indica la formación de un complejo en estado fundamental, las dos especies emisoras detectadas se asignan al complejo emisor $[2\text{-Me-nHo.ASB}]$ y al 2-Me-nHo. Teniendo en cuenta que, en los espectros de emisión solo se detectó una única banda centrada en $\sim 450 \text{ nm}$ (Figura 3.19), se concluye que ambas especies emisoras detectadas con las técnicas dinámicas tendrían máximos de emisión centrados en $\sim 450 \text{ nm}$. Esto es coherente con el comportamiento espectroscópico observado para el sistema 2-Me-nHo / ASB en las Figuras 3.3 y 3.19.

Los valores de τ observados para cada especie presentan un comportamiento diferente con respecto a la concentración de ASB. Concretamente, el $\tau_{[2\text{-Me-nHo.ASB}]}$ es independiente de la $[ASB]$, conservando un mismo valor en todo el rango de concentración evaluado, hecho que da cuenta de una contribución fuertemente estática a la interacción de β C con la proteína. Esta observación es coherente con la suposición realizada anteriormente que sugiere la localización del fluoróforo, β C, en un sitio o bolsillo proteico específico, que le proporcione un micro-entorno invariante o aislado, en relación a un *quencher* externo (presente en la solución y cuya concentración se varia) de alto peso molecular, representado por ASB. Sin embargo, el valor de $\tau_{[2\text{-Me-nHo.ASB}]}$ si depende del pH del medio o del *buffer* presente ($\sim 13 \text{ ns}$, $\sim 6 \text{ ns}$ y $\sim 8 \text{ ns}$, a pH 4,9, 7,4 y 9,5, respectivamente). Consecuentemente, β C está censando las condiciones del medio. Por lo tanto, el sitio de localización de β C debe, además, un sitio polar e hidrofílico conformado por residuos que presenten diferente grado de ionización, dependiendo del pH del entorno. Por el contrario, la especie 2-Me-nHo libre mostró una desactivación dinámica muy efectiva de $\tau_{2\text{-Me-nHo}}$ fuertemente dependiente de la $[ASB]$ (sección 3.2.4.6).

Cabe aclarar que la proporción relativa de estas especies es fuertemente dependiente de la concentración de ASB. A bajas concentraciones de ASB ($[ASB] < 10 \mu\text{M}$) la especie predominante es 2-Me-nHo, y rápidamente se invierte esta relación a partir

de valores de $[ASB] > 30\text{-}50 \mu\text{M}$, donde la especie dominante es $[2\text{-Me-nHo.ASB}]$. Esto se pone de manifiesto con los datos representados en las Figuras 3.23 (b), 3.24 (b) y 3.25 (b), obtenidos a partir de un ajuste tri-exponencial de los datos. Así, aunque con mayor error estadístico debido al tipo de ajuste definido, además de la componente propia de la fluorescencia intrínseca de ASB, se obtiene un segundo tiempo de vida que integra la contribución de 2-Me-nHo y de $[2\text{-Me-nHo.ASB}]$. Este $\tau_{2\text{-Me-nHo} + [2\text{-Me-nHo.ASB}]}$ se representa con triángulos obtenidos a partir de los ajustes tri-exponenciales ($\tau_{[2\text{-Me-nHo.ASB}]}$).

Los resultados aquí descriptos permiten proponer el siguiente esquema (Esquema 3.4) que resume los procesos fotofísicos que tienen lugar debido a la interacción de 2-Me-nHo, desde S_0 y S_1 , con ASB:



Esquema 3.4. Procesos fisicoquímicos involucrados en el sistema 2-Me-nHo / ASB, en todo el rango de pH analizado ($4,8 < \text{pH} < 9,5$).

(b) Por su parte, nHo mostró un comportamiento claramente distintivo con respecto al descrito en (a) para 2-Me-nHo. En todas las condiciones de pH y λ_{fluo} (380 nm y 450 nm) analizadas se observaron decaimientos múltiples que se ajustaron, satisfactoriamente, a través de funciones tri- o tetra-exponenciales (Figura 3.20 – 3.22), dependiendo de las condiciones experimentales (pH y $[ASB]$). Este hecho indica la presencia de varias especies emisoras que, como se describirá a continuación, fueron asignadas a las siguientes especies químicas: ASB (debido a su fluorescencia intrínseca), βCH^+ libre en solución o interactuando con la proteína ($[\beta\text{CH}^+.\text{ASB}]$), βCN libre en solución o interactuando con la proteína ($[\beta\text{CN.ASB}]$), según corresponda. Para comprender en detalle las distintas especies involucradas y los diferentes procesos en los que participarían, es necesario realizar un análisis detallado para cada condición (ver debajo).

Cabe recordar que, en el intervalo de pH comprendido entre 2 y 13, nHo presenta un equilibrio ácido-base con un $\text{p}K_a$ de 7,2. Por lo tanto, el pH del medio definirá, al menos

en las condiciones iniciales del experimento, las especies ácido-base de nHo presentes en la solución. Por otra parte, y tal como se describió en el apartado (a) de esta sección y en la sección 3.2.2, el agregado de ASB induce la formación de las especies $[\beta\text{CH}^+\text{.ASB}]$ y $[\beta\text{CN.ASB}]$, cuyas concentraciones relativas dependerán de la $[\text{ASB}]$.

A continuación se presenta el análisis detallado de los decaimientos observados en cada una de las 3 condiciones de pH definidas (4,9, 7,4 y 9,5), definiendo para cada caso, además, una condición de baja concentración de ASB y otra de alta concentración:

(i) Experimentos a pH 4,9:

Antes de comenzar el análisis vale recordar que, en estas condiciones de pH y previamente al agregado de ASB, la especie protonada, nHoH^+ , es la especie ácido-base del nHo que predomina en solución ($> 99,9\%$). Sin embargo, el agregado de ASB induce la formación de una especie con una marcada absorción en la denominada zona II del espectro, que fue oportunamente asignada a la especie $[\text{nHoN.ASB}]$. Esta especie es, además, una especie emisora, tal como lo demuestran los espectros de emisión registrados en la Figura 3.18 (a). Consecuentemente, dado que los decaimientos fueron obtenidos excitando las muestras en la zona II del espectro ($\lambda_{\text{exc}} = 341\text{ nm}$), las especies que realizarán su contribución a los decaimientos son nHoH^+ , $[\text{nHoH}^+\text{.ASB}]$ y/o $[\text{nHoN.ASB}]$. La magnitud relativa de cada contribución será dependiente de las condiciones de análisis ($\lambda_{\text{fluo}} = 380\text{ nm}$ o 450 nm). Brevemente, a 380 nm , la especie $[\text{nHoN.ASB}]$ hará su mayor contribución, aunque en algunos casos, a pesar de su muy baja emisión fluorescente en esta región del espectro, se pudieron detectar las especies catiónicas nHoH^+ y/o $[\text{nHoH}^+\text{.ASB}]$. Por el contrario, en los decaimientos registrados a 450 nm , serán las especies catiónicas quienes contribuyan de manera mayoritaria a la señal detectada, con una débil contribución de la especie $[\text{nHoN.ASB}]$.

Los decaimientos registrados en $\lambda_{\text{fluo}} \sim 380\text{ nm}$ fueron ajustados, de manera adecuada, mediante una ecuación tetra-exponencial. De esta forma, además, del componente correspondiente a ASB, se detectó la presencia de tres especies adicionales que mostraron contribuciones relativas variables según la $[\text{ASB}]$. La especie con mayor contribución observada a bajas $[\text{ASB}]$ ($< 10\ \mu\text{M}$) fue asignada a la especie nHoH^+ , ya que mostró un valor inicial de τ_{nHoH^+} de $\sim 16\text{ ns}$, coincidente con el valor indicado para esta especie en *buffer* acetato. Esta especie es dinámicamente desactivada a medida que aumenta la $[\text{ASB}]$ (sección 3.2.4.6). Por el contrario, la contribución de las dos componentes restantes se hizo más evidente a mayores $[\text{ASB}]$. Entre ellas, la componente

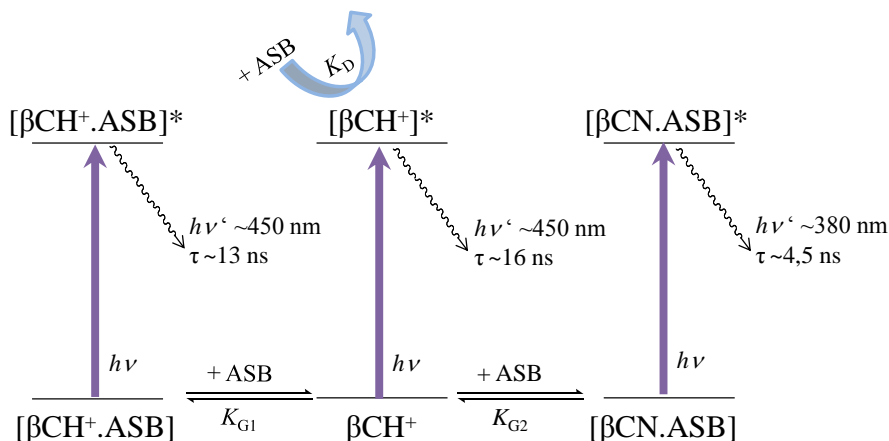
de mayor contribución mostró un valor de τ de $\sim 4,5$ ns, mientras que la otra presentó un valor cercano a 13 ns. Dentro del error experimental, los valores de τ registrados en ambos casos fueron invariantes con respecto a la [ASB]. Este último hecho es coherente con la hipótesis de localización en entornos definidos de los fluoróforos: [nHoN.ASB] en el sitio hidrofóbico y [nHoH⁺.ASB] en un sitio polar de la proteína.

Cabe destacar que el valor de τ observado para la componente minoritaria (~ 13 ns) es igual, dentro del error experimental, al valor de τ detectado para la especie [2-Me-nHo.ASB] que, en el mismo *buffer* analizado, presentó un valor de $\tau_{[2\text{-Me-nHo.ASB}]}$ ~ 13 ns (Figura 3.20 (b)). Consecuentemente, es lógico asignar esta componente observada en el sistema nHo / ASB a pH 4,9 a la especie debida a la interacción [nHoH⁺.ASB]. Por su parte, la componente con mayor contribución al decaimiento total, con $\tau \sim 4,5$ ns, fue asignada al complejo de interacción [nHoN.ASB], quien muestra una mayor emisión en la longitud de onda de análisis (380 nm).

Los decaimientos registrados a λ_{fluo} 450 nm también mostraron un ajuste más adecuado a través de una ecuación tetra-exponencial, confirmando la presencia de tres especies emisoras, además de ASB, sugeridas en el párrafo anterior. Sin embargo, los valores de τ obtenidos a partir de dicho ajuste carecen de sentido físico para algunas de las especies asignadas. Muy probablemente, esto se deba a la gran similitud que presentan nHoH⁺ y [nHoH⁺.ASB] desde el punto de vista espectroscópico (presentan su máximo emisión alrededor de los 450 nm) y fotofísico (ambas muestran valores de τ muy similares, ~ 16 ns y ~ 13 ns, respectivamente) que impide resolver, matemáticamente, las contribuciones a los decaimientos aportadas por las especies catiónicas. Dada la complejidad del sistema, la similitud en los τ de nHoH⁺ y [nHoH⁺.ASB], y la baja contribución a la emisión total aportada por la especie [nHoN.ASB] en esta región del espectro, debió recurrirse al ajuste tri-exponencial fijando como condición inicial los valores de $\langle \tau_{\text{ASB}} \rangle$ y $\tau_{[\text{nHoN.ASB}]}$. En este último caso se usó el valor de 4,5 ns, obtenido en el análisis a 380 nm, donde esta especie tiene una contribución predominante. Los datos, presentados en la Figura 3.20 (b) (columna derecha), muestran una disminución en el valor global de τ (asignado a nHoH⁺ + [nHoH⁺.ASB]). Inicialmente, se observa una fuerte contribución de nHoH⁺ ya que el valor de τ global observado inicialmente es similar al tiempo de vida característico de esta especie (τ_{nHoH^+}) registrado en solución *buffer* acetato de ~ 16 ns (Figura 3.7). A medida que se incrementa la concentración de ASB, la contribución de [nHoH⁺.ASB] se hace dominante, alcanzando un τ final de ~ 13 ns. Lo que

indica una contribución total de esta última especie al decaimiento total, en estas condiciones.

El Esquema 3.5 resume los procesos foto-físicos que, en base a la información presentada hasta aquí, tienen lugar debido a la interacción de nHo (tanto en su estado S_0 como en S_1) con ASB. Tal como puede apreciarse, los procesos que involucran a las especies catiónicas son coincidentes con los procesos propuestos para el caso de 2-Me-nHo discutido anteriormente. En este caso, las β Cs que no presenten sustitución en la posición N-2, dan lugar a la presencia de procesos adicionales que involucran la desprotonación, con la consecuente interacción de la especie neutra de la β C (β CN) y ASB. Cabe recordar que, en condiciones de pH ácido, la especie neutra libre en solución no existe como tal y, por lo tanto, su formación solo es inducida por la presencia de ASB, generando lo que hemos denominado como $[\beta$ CN.ASB].



Esquema 3.5. Procesos fisicoquímicos involucrados en el sistema nHo / ASB, en condiciones de pH 4,8.

(ii) Experimentos a pH 7,4:

Es importante recordar que, en estas condiciones de pH, ambas formas ácido-base de nHo (nHoH^+ y nHoN) coexisten en solución, previamente al agregado de ASB. Consecuentemente, dado que los decaimientos fueron obtenidos excitando las muestras en la zona II del espectro ($\lambda_{\text{exc}} = 341 \text{ nm}$), ambas especies realizarán su contribución a los decaimientos. Tal como se indicó anteriormente, el carácter de esta contribución dependerá de las condiciones de análisis ($\lambda_{\text{fluo}} = 380$ o 450 nm). En este caso, a 380 nm , las especies nHoN y/o $[\text{nHoN}.\text{ASB}]$ harán su mayor contribución, aunque en algunos casos, a pesar de su muy baja emisión fluorescente en esta región del espectro, también podrán detectarse las especies catiónicas. Por el contrario, en los decaimientos registrados a 450 nm , serán las especies catiónicas (nHoH^+ y/o $[\text{nHoH}^+.\text{ASB}]$) quienes contribuyan de manera mayoritaria a la señal detectada.

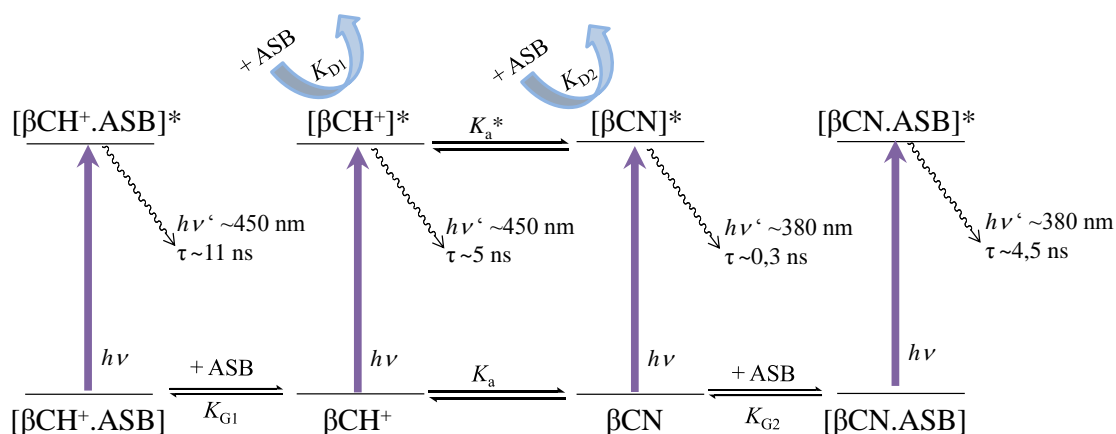
Tal como es de esperar, debido a las condiciones iniciales de pH, los decaimientos registrados a 380 nm mostraron la presencia de una emisión inicial correspondiente a especie nHoN libre, que mostro un τ_{nHoN} inicial de $\sim 0,2$ ns propio de esta especie en solución *buffer* fosfato (Figura 3.8). nHoN mostró una desactivación dinámica muy eficiente con el incremento en la [ASB]. Además la presencia de ASB dio lugar a la formación de una segunda componente emisora, con un valor de $\tau \sim 4,3$ ns. En base a los resultados obtenidos en los experimentos en medio ácido, esta componente se asignó a la especie [nHoN.ASB]. Cabe aclarar aquí, que el valor de $\tau_{[\text{nHoN.ASB}]}$ obtenido a pH 7,4 es igual, dentro del error experimental al observado en los experimentos realizados a pH 4,9 ($\sim 4,5$ ns). Este hecho está de acuerdo con que la especie emisora está localizada en un entorno aislado o independiente del medio o seno de la solución (sitio hidrofóbico). Además, se observa, con una contribución significativamente menor, una componente adicional con $\tau \sim 15$ ns, que corresponden a las especies nHoH⁺ y/o [nHoH⁺.ASB] (ver párrafo siguiente).

Al igual que a pH 4,9, los decaimientos registrados con λ_{fluo} a 450 nm fueron de tipo tetra-exponencial. Sin embargo, para obtener ajustes lógicos desde el punto de vista fisicoquímico, debió recurrirse al uso de ecuaciones tri-exponenciales fijando, como condición inicial, los valores de $\langle \tau_{\text{ASB}} \rangle$ y $\tau_{[\text{nHoN.ASB}]}$ (obtenido en el análisis a 380 nm). Se resolvió fijar $\tau_{[\text{nHoN.ASB}]}$ dada su muy baja contribución a la emisión total observada a 450 nm, hecho que introduce dificultades en la resolución matemática de los ajustes. Estos resultados, presentados en la Figura 3.21 (b) (columna derecha), muestran una dependencia clara del valor global de τ (asignado a nHoH⁺ + [nHoH⁺.ASB]) con la [ASB]. Dada la similitud entre estas dos especies mencionada, no fue posible desacoplar la contribución de cada una de ellas. Independientemente de esto, se observa una tendencia similar a la descrita en los experimentos a pH 4,9. Es decir, el sistema evoluciona desde una condición donde las especies están completamente libres, hacia una condición donde están completamente ligadas a la proteína. En este caso, se observa que, a medida que aumenta la [ASB], el sistema evoluciona desde un valor de τ global ($\tau_{\text{nHoH}^+ + [\text{nHoH}^+.\text{ASB}]}$) de ~ 5 ns hacia un valor de ~ 11 ns.

El valor detectado al inicio del ensayo ([ASB] = 0 μM) coincide con τ_{nHoH^+} determinado para la especie nHoH⁺ en soluciones de *buffers* fosfato (Figura 3.8), con lo cual, la primera de las componentes se puede asignar a la especie nHoH⁺. Por su parte, en las máximas concentraciones de ASB analizadas, τ alcanza un valor similar al detectado

para la especie catiónica $n\text{HoH}^+$ unida a la proteína $[\text{nHoH}^+.\text{ASB}]$ a pH 4,9 (~ 13 ns). Consecuentemente, la componente de ~ 11 ns puede asignarse al complejo de interacción $[\text{nHoH}^+.\text{ASB}]$ formado a pH 7,4. Esta pequeña diferencia observada con el pH es, además, coherente con la hipótesis que indica que $[\text{nHoH}^+.\text{ASB}]$ está localizado en un sitio hidrofílico, capaz de censar pequeños cambios en las condiciones del medio.

Todas las especies y procesos detectados en esta condición de pH se resumen en el Esquema 3.6:



Esquema 3.6. Procesos fisicoquímicos involucrados en el sistema nHo / ASB, en condiciones de pH 7,4.

(iii) Experimentos a pH 9,5:

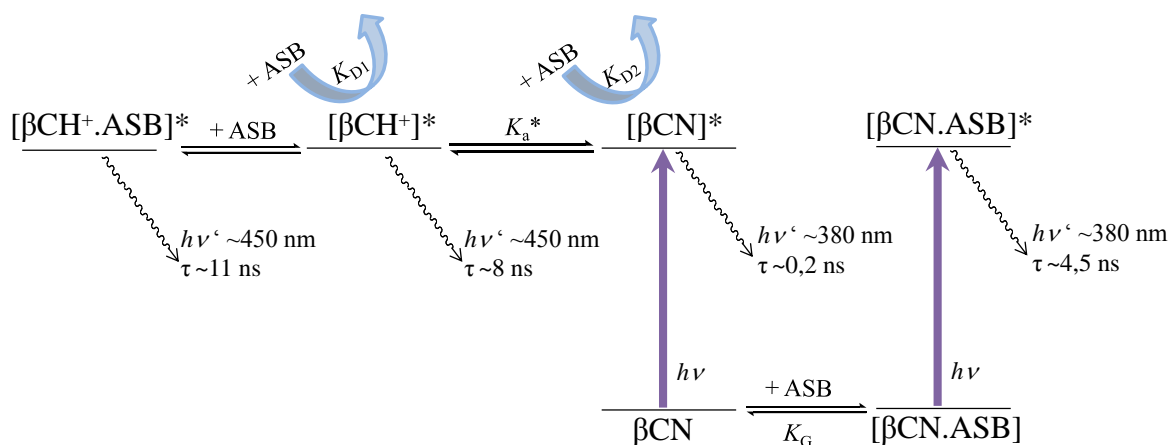
En las condiciones previas al agregado de ASB, la especie neutra ($n\text{HoN}$) es la especie ácido-base del $n\text{Ho}$ que predomina ($> 99,9\%$) en solución, en el estado electrónico fundamental. Sin embargo, cabe recordar que en soluciones acuosas, bajo excitación electrónica, una fracción importante de moléculas de $n\text{HoN}$ en su estado S_1 se protona rápidamente, por intercambio protónico con el medio (solvente), para dar lugar a la formación de $^1[\text{nHoH}^+]$ (Capítulo 1). Consecuentemente, debido a esta propiedad intrínseca de las βCs , aún en condiciones alcalinas (pH 9,5), coexisten ambas especies excitadas $^1[\text{nHoN}]^*$ y $^1[\text{nHoH}^+]$. Estas especies, tienen sus máximos de emisión centrados en ~ 380 nm y 450 nm, respectivamente.

El comportamiento dinámico de $n\text{HoN}$ en solución *buffer* bórax, analizado a 380 nm, muestra decaimientos bi-exponenciales con tiempos de vida de fluorescencia, τ , de $\sim 0,2$ y 8 ns, para $^1[\text{nHoN}]^*$ y $^1[\text{nHoH}^+]$, respectivamente. El agregado de ASB induce la formación de nuevas especies emisoras, tal como lo demuestra su comportamiento multi-exponencial (Figura 3.22 (b)). En particular, los decaimientos ajustan adecuadamente con funciones tetra-exponenciales, dos de ellas con una contribución relativa mayoritaria. En

base a los estudios de absorción UV-visible se determinó que, en el estado fundamental, nHoN forma el complejo de interacción [nHoN.ASB]. Consecuentemente, las componentes de emisión observadas en los decaimientos fueron asignadas a [nHoN.ASB] (~ 4 ns). A bajas concentraciones de ASB ($< 30 \mu\text{M}$), se observa una especie con un τ inicial de $\sim 0,25$ ns, propia de nHoN, la cual se desactiva dinámicamente de manera efectiva (sección 3.2.4.6). Por último, se detecta una tercera especie que, a 380 nm, contribuye de manera muy poco significativa pero que muestra un comportamiento dependiente de la [ASB]. Esta componente fue asignada a la especie nHoH^+ (ver párrafo siguiente).

Los decaimientos registrados a 450 nm también mostraron un comportamiento tetra-exponencial, con una componente de emisión mayoritaria que presentó un τ inicial de ~ 8 ns y su valor fue aumentando con el agregado de ASB, convergiendo en un τ final de ~ 11 ns. En base al comportamiento descrito en las condiciones anteriores para nHo y 2-Me-nHo, esta especie se pudo asignar una desactivación dinámica de nHoH^+ para dar [nHoH⁺.ASB]. Asimismo, aunque en menor contribución relativa, se observaron las componentes previamente asignadas a nHoN y [nHoN.ASB].

Todas las especies y procesos detectados en esta condición de pH se resumen en el Esquema 3.7:



Esquema 3.7. Procesos fisicoquímicos involucrados en el sistema nHo / ASB, en condiciones de pH 9,5.

3.2.4.6. Desactivación de la fluorescencia de nHo y 2-Me-nHo por ASB: análisis cuantitativo.

Los datos presentados en las dos secciones precedentes fueron analizados cuantitativamente (ver secciones 3.2.4.4 - 3.2.4.5). En particular, se realizaron las representaciones típicas de Stern-Volmer tanto para los datos obtenidos en los experimentos de fluorescencia en estado estacionario, como para aquellos obtenidos en los ensayos dinámicos. A continuación se detallan las principales observaciones realizadas:

(a) Las Figuras 3.26 y 3.27 (columna izquierda) muestran las correspondientes representaciones de Stern-Volmer I_0/I vs [ASB] para los sistemas nHo / ASB y 2-Me-nHo / ASB, respectivamente. Los diferentes valores de K_{SV} se listan en las Tablas 3.3 y 3.4. Los resultados obtenidos muestran un comportamiento no lineal para los dos compuestos estudiados, en todas las condiciones de pH ensayadas. Tal como se sugirió anteriormente, este comportamiento concuerda con el perfil que presentan los sistemas con múltiples especies emisoras. En general, aunque se hace más evidente para el caso de 2-Me-nHo, a bajas [ASB] se observa una primera pendiente pronunciada con una $K_{SV} \sim 10^3 \text{ M}^{-1}$. Al superar la concentración crítica dada por la estequiometría 1 a 1 con respecto a βC , se observa otra zona lineal que muestra una pendiente marcadamente inferior a la anterior ($\sim 10^2 \text{ M}^{-1}$). En base a los modelos planteados en las secciones previas, es lógico interpretar cada región de la curva como representativa de diferentes procesos: **(i)** a bajas [ASB] predominaría la interacción entre las especies libres 2-Me-nHo y ASB mientras que, por el contrario, **(ii)** en condiciones de elevadas [ASB] la curva representaría, de manera integral, los procesos en los que participa la βC en el entorno proteico (especie [2-Me-nHo.ASB]).

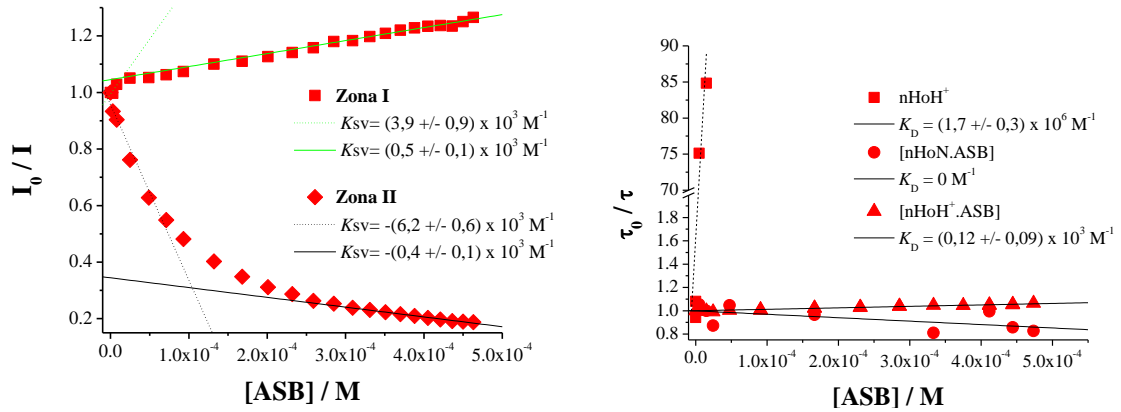
(b) La hipótesis mencionada en el párrafo anterior es, también, avalada por la información obtenida a partir de las representaciones de Stern-Volmer de los resultados obtenidos por las técnicas dinámicas: **(i)** A bajas [ASB] las representaciones gráficas τ_0/τ vs [ASB] obtenidas para las especies dominantes en solución (nHoH⁺, nHoN o 2-Me-nHo, según sea el compuesto y la condición de pH estudiada) muestra una clara desactivación dinámica, propia de la interacción de las βCs , desde sus correspondientes estados S_1 , con ASB. **(ii)** Por el contrario, la representación gráfica de los datos obtenidos para las especies emisoras localizadas en el entorno proteico ([nHoH⁺.ASB], [nHoN.ASB] o [2-Me-nHo.ASB], según corresponda) muestran valores de K_D extremadamente bajos o nulos, confirmando la

hipótesis que indica que estas especies ligadas muestran una fuerte interacción intermolecular con ASB puramente estática.

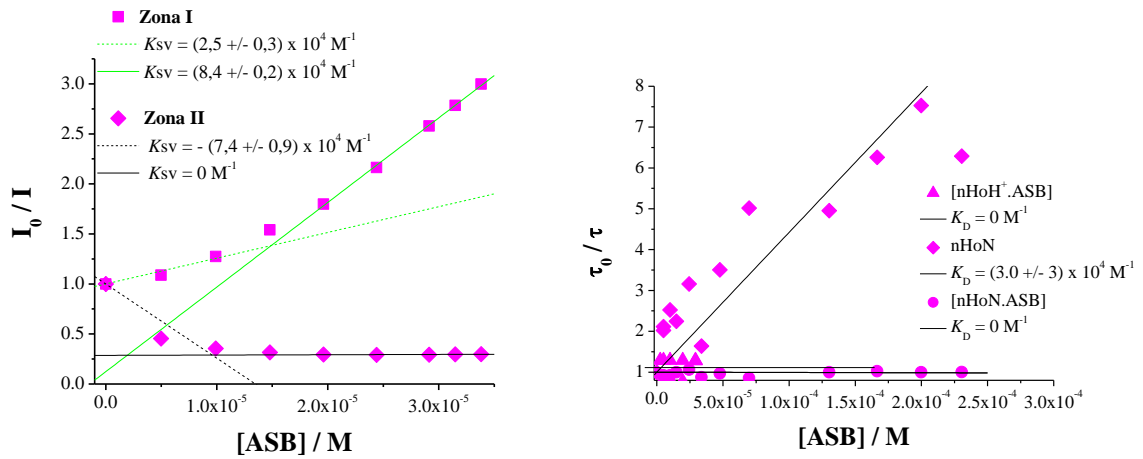
Un punto importante que vale la pena aclarar está relacionado con los procesos que tienen lugar en condiciones de baja [ASB]. Tal como lo indica la evidencia presentada hasta aquí, los procesos fotofísicos centrales que deben jugar un rol relevante en estas condiciones experimentales involucran la desactivación dinámica de las especies libres (nHoH⁺, nHoN o 2-Me-nHo, según sea el compuesto y la condición de pH estudiada). Consecuentemente, es de esperar que la pendiente inicial ($K_{SV}^{baja [ASB]}$) observada en los gráficos de Stern-Volmer de los datos colectados en los experimentos en estado estacionario sean coincidentes con el valor de la correspondiente pendiente obtenida en los ensayos dinámicos (K_D) para las especies libres. Sin embargo, esto se cumple solo en algunos casos. Brevemente, para la mayoría de las especies y condiciones analizadas, los valores de K_D son muy superiores a los valores de las correspondientes $K_{SV}^{baja [ASB]}$.

Esta aparente inconsistencia puede ser explicada en base a los resultados dinámicos. Cabe recordar que los valores de τ estimados para las especies libres están sujetos a un gran error experimental: **(i)** por un lado, son valores extremadamente bajos ($\sim 10^{-10}$ - 10^{-11} s) los cuales están muy próximos al límite de detección del equipo usado; **(ii)** por otro lado, estos τ fueron deconvolucionados a partir de decaimientos multi-exponenciales que, con el agregado de ASB, su contribución relativa se hace cada vez menos relevante.

(a)



(b)



(c)

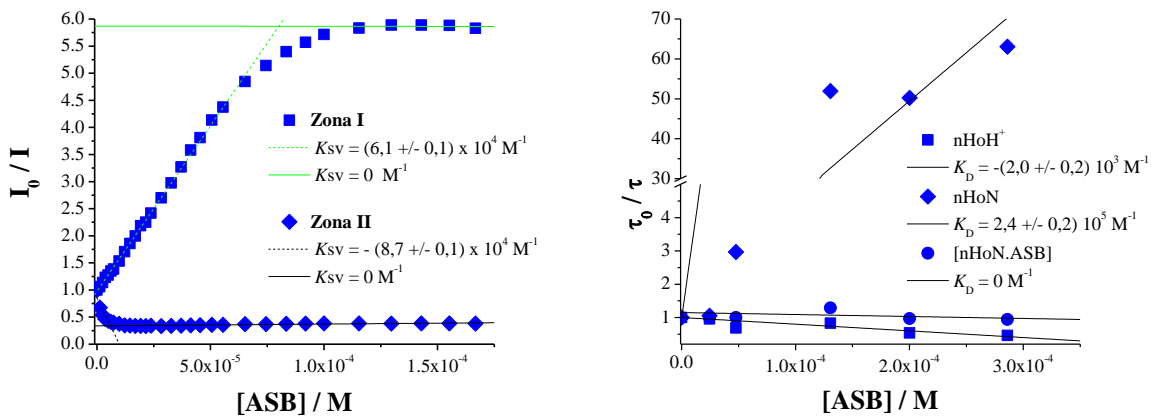


Figura 3.26. Gráficas de Stern-Volmer. Valores de I_F^0/I_F (columna izquierda) y τ_F^0/τ_F (columna derecha) vs $[ASB]$ a pH (a) 4,8, (b) 7,4 y (c) 9,5. En todos los casos se usó $[nHo] = 30 \mu M$.

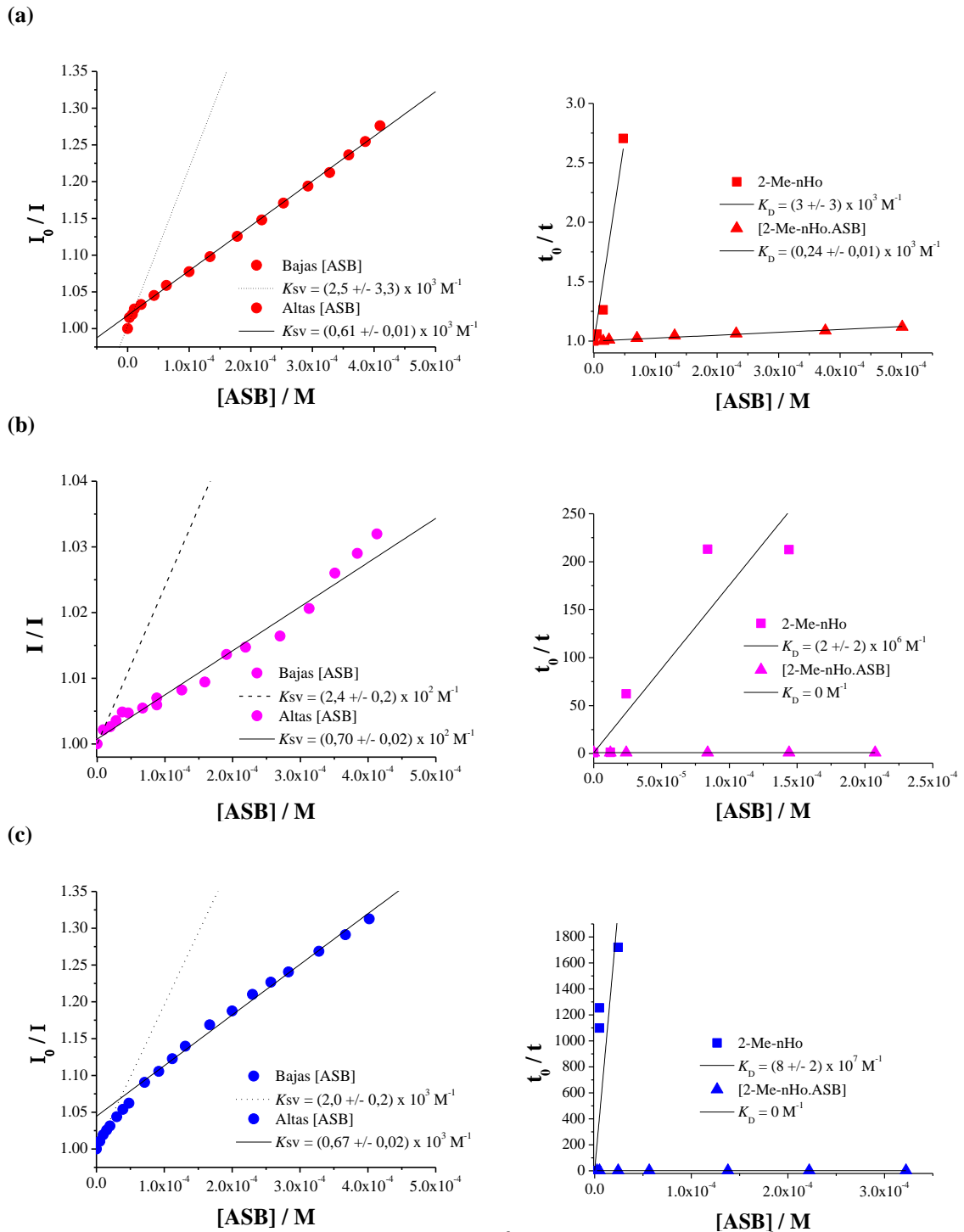


Figura 3.27. Gráficas de Stern-Volmer. Valores de I_F^0/I_F (columna izquierda) y τ_F^0/τ_F (columna derecha) vs $[ASB]$ a pH (a) *buffer* acetato pH 4,8, (b) *buffer* fosfato pH 7,4 y (c) *buffer* bórax pH 9,5. En todos los casos se usó $[2\text{-Me-nHo}] = 25 \mu\text{M}$.

Tabla 3.3. Constantes de interacción nHo / ASB estimadas para cada una de las condiciones descritas en el texto. K_{SV} y K_D corresponden a las pendientes de las representaciones de Stern-Volmer realizadas a partir de los datos registrados en condiciones estacionarias y resueltas en el tiempo, respectivamente.

Condición	nHo		
	pH 4,8	pH 7,4	pH 9,5
$K_{SV}^{(bajas [ASB])} / M^{-1}$	Zona I: $(0,4 \pm 0,1) \times 10^3$ Zona II: $(6,2 \pm 0,6) \times 10^3$	Zona I: $(2,5 \pm 0,3) \times 10^4$ Zona II: $(7,4 \pm 0,9) \times 10^4$	Zona I: $(6,1 \pm 0,1) \times 10^4$ Zona II: $(8,7 \pm 0,1) \times 10^4$
$K_{SV}^{(altas [ASB])} / M^{-1}$	Zona I: $(0,5 \pm 0,1) \times 10^3$ Zona II: $(3,9 \pm 0,9) \times 10^3$	Zona I: $(8,4 \pm 0,2) \times 10^4$ Zona II: 0	Zona I: 0 Zona II: 0
$K_D^{nHoH^+} / M^{-1}$	$\sim 10^{6a}$	---	$-(2,0 \pm 0,2) \times 10^{3a}$
K_D^{nHoN} / M^{-1}	---	$(3 \pm 3) \times 10^{4b}$	$\sim 10^{5b}$
$K_D^{[nHoH^+.ASB]} / M^{-1}$	$(0,12 \pm 0,01) \times 10^{3a}$	0 ^a	---
$K_D^{[nHoN.ASB]} / M^{-1}$	0 ^b	0 ^b	0 ^b

^a $\lambda_{fluo} = 450$ nm. ^b $\lambda_{fluo} = 380$ nm

Tabla 3.4. Constantes de interacción 2-Me-nHo / ASB estimadas para cada una de las condiciones descritas en el texto. K_{SV} y K_D corresponden a las pendientes de las representaciones de Stern-Volmer realizadas a partir de los datos registrados en condiciones estacionarias y resueltas en el tiempo, respectivamente.

Condición	2-Me-nHo		
	pH 4,8	pH 7,4	pH 9,5
$K_{SV}^{(bajas [ASB])} / M^{-1}$	$(2,5 \pm 0,3) \times 10^{3a}$	$(0,24 \pm 0,02) \times 10^{3a}$	$(2,0 \pm 0,2) \times 10^{3a}$
$K_{SV}^{(altas [ASB])} / M^{-1}$	$(0,61 \pm 0,01) \times 10^{3a}$	$(0,07 \pm 0,02) \times 10^{3a}$	$(0,67 \pm 0,02) \times 10^{3a}$
$K_D^{2-Me-nHo} / M^{-1}$	$(3 \pm 3) \times 10^{3b}$	$\sim 10^{6b}$	$\sim 10^{7b}$
$K_D^{[2-Me-nHo.ASB]} / M^{-1}$	$(0,24 \pm 0,01) \times 10^{3b}$	0 ^b	0 ^b

^a $\lambda_{exc} = 370$ nm. ^b $\lambda_{exc} = 341$ nm y $\lambda_{fluo} = 454$ nm.

3.3. Resumen y Conclusiones

Las β Cs muestran una interacción particular con ASB, fuertemente dependiente del pH y de la estructura química del alcaloide. Pueden interaccionar con diferentes sitios/dominios proteicos, cada uno de los cuales le confiere a la molécula de β C interactuante un entorno característico. En base al comportamiento diferencial, en términos fotofísicos, que presentan estos alcaloides, los entornos mencionados pueden ser censados y/o revelados espectroscópicamente.

Los resultados expuestos en este capítulo representan un aporte inicial, que sin dudas, ayudará a comprender los procesos fisicoquímicos involucrados en su interacción con ASB sino que además, proporcionan herramientas útiles para el estudio de nuevas proteínas permitiendo caracterizar los entornos o dominios propios que modulan sus funciones proteicas.

3.4. Metodología experimental y análisis de datos

3.4.1. Reactivos generales

(a) β -Carbolinas

*nor*Harmano provisto por *Sigma-Aldrich*, con una pureza superior al 98 %, por lo cual se utilizó sin posterior purificación. N-metil derivados empleados: 2-Me-nHo, 9-Me-nHo y 2,9-diMe-nHo, sintetizados y caracterizados previamente para este trabajo (ver Capítulo 2, secciones 2.4.2 y 2.4.3)

(b) Reactivos generales empleados

Albumina de suero bovino (ASB, libre de ácidos grasos, Sigma), HCl, NaOH (Merck), $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (Sigma), KH_2PO_4 (Biopack), y acetato de sodio, ácido acético (Sigma-Aldrich).

3.4.2. Preparación de soluciones

Para la preparación de las soluciones *buffers*, inicialmente se prepararon soluciones *stock* de cada uno de los componentes, mediante el uso de técnicas analíticas generales. Luego se mezclaron estas soluciones *stock*, según el *buffer* y pH final desado, en las proporciones indicadas en la siguiente tabla. Para los *buffers* fosfato y bórax, luego de mezclar las soluciones *stock* se llevó a volumen final con agua calidad miliQ (Milli Q Reagent Water System). Asimismo en la Tabla 3.5 se detallan las distintas fuerzas iónicas calculadas que poseen cada uno de los *buffers* en los rangos de pH en que fueron empleados. Posteriormente, los *buffer* 2X fueron diluidos a la mitad en el proceso de preparación de las soluciones empleadas para los ensayos de interacción y también en la caracterización fotofísica del βC y ASB.

Para la preparación de las soluciones de ASB usadas a lo largo de este capítulo se procedió a pesar una determinada masa ASB en balanza analítica, que luego se disolvió en soluciones *buffers*, *buffer* / βC o H_2O , según el tipo de ensayo a realizar. Para obtener la concentración final de la proteína en solución se empleó espectroscopia UV-visible, usando un valor de $\epsilon(278 \text{ nm})$ de $(4,36 \pm 0,22) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, el cual fue obtenido como promedio de por lo menos una docena de medidas realizadas en solución acuosa. Para dicho cálculo se utilizó un valor de PM de 66430.[7] El valor de $\epsilon(\lambda)$ obtenido en esta Tesis está en acuerdo con los valores previamente publicados.[29]

Tabla 3.5. Características principales e información mas relevante sobre la preparación de las diferentes soluciones *buffers* utilizadas.

<i>Buffer</i>	pH	Sol. stock	[Sol. stock] / M	Vol. agregado / ml	Vol. Final / ml	[<i>buffer</i> 2X] / M	FI (<i>buffer</i> 1X)
Acetato	4,0	Ácido Acético	0,2	847,0	1000,0	0,2	0,035
		Acetato de Sodio	0,2	153,0			
	4,5	Ácido Acético	0,2	590,9	1000,0	0,2	0,041
		Acetato de Sodio	0,2	409,1			
	5,0	Ácido Acético	0,2	357,0	1000,0	0,2	0,146
		Acetato de Sodio	0,2	643,0			
Fosfato	7,3	KH ₂ PO ₄	0,2	100,0	200,0	0,1	0,126
		NaOH	0,2	76,0			
	7,4	KH ₂ PO ₄	0,2	100,0	200,0	0,1	0,130
		NaOH	0,2	80,1			
	7,5	KH ₂ PO ₄	0,2	100,0	200,0	0,1	0,134
		NaOH	0,2	83,7			
Bórax	9,0	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	0,05	100,0	200,0	0,025	0,067
		HCl	0,2	9,2			
	9,5	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	0,05	100,0	200,0	0,025	0,036
		NaOH	0,2	17,6			
	10,0	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	0,05	100,0	200,0	0,025	0,020
		NaOH	0,2	36,6			

Asimismo para las soluciones de β Cs en *buffers*, inicialmente se preparon disolviendo una determinada masa del solido correspondiente en agua milliQ a pH ~4 (se usó HCl para acidificar el medio), con el fin de lograr una mayor solubilidad (sección 2.4.4.1) y, generalmente, a una concentración dos veces más concentrada (2X) que la requerida para cada ensayo. Una vez obtenida la solución *stock* de β C en agua, se procedio a mezclar en la proporción adecuada con el *buffer* 2X de trabajo (Tabla 3.5). En los caso donde la concentración de la solución *stock* de β C es mayor a dos veces a la deseada (frecuentemente en los ensayos de emisión de fluorescencia), se calculo previamente el volumen de agua que debió agregarse para obtener finalmente la mezcla β C / *buffer* (ambas con la concentración final deseada). Finalmente todas las concentraciones de β Cs en solución fueron determinadas por espectrofotometría de absorción UV-visible, y determinados sus pH finales mediante un pH-metro ALTRONIX® TPX-III, el cual previamente se calibró utilizando soluciones amortiguadoras (*buffers*) comerciales de pH 4,00, 7,00 y 10,00.

Como se indico en la sección 3.2.4.3 para los ensayos de interaccion se propusieron dos metodologías de mezclado (Mz I y Mz II), y con las cuales se obtienen el mismo resultado experimental.

3.4.3. Titulación por espectroscopía de absorción UV-visible

La interacción del nHo y sus N-metil derivados con la ASB se estudió por espectroscopía de absorción UV-visible. En particular, se registraron los espectros de absorción de soluciones de β Cs en presencia de cantidades crecientes de ASB. Las determinaciones se realizaron usando un espectrofotómetro *Perkin-Elmer* λ 25 (Capítulo 2, sección 2.4.4.2), en celdas de cuarzo de 1 cm x 1 cm de camino óptico y en condiciones de temperatura ambiente. Las constantes de asociación (K_G) fueron estimadas utilizando la ecuación de Benesi-Hildebrand (Ecuación 3.1):[30]

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{(\varepsilon(\lambda)_{[\beta C.ASB]} - \varepsilon(\lambda)_{\beta C}) [\beta C]_0} + \frac{1}{K_G (\varepsilon(\lambda)_{[\beta C.ASB]} - \varepsilon(\lambda)_{\beta C}) [\beta C]_0} * \frac{1}{[ASB]_0} \quad (3.1)$$

donde $\varepsilon(\lambda)_{[\beta C.ASB]}$ y $\varepsilon(\lambda)_{\beta C}$ son los coeficientes de absorción molar del complejo formado por β C y ASB ($[\beta C.ASB]$) y de la β C libre, respectivamente, a la longitud de onda de titulación; ΔA es el cambio en la absorbancia a una concentración de proteína agregada $[ASB]_0$, relativo a la absorbancia de la β C totalmente libre ($[ASB]_0 = 0$ M) a esa misma longitud de onda. Cabe destacar que los valores de K_G presentados en este capítulo, son resultado de un promedio de valores de constantes obtenidas para, al menos, 10 longitudes de onda diferentes.

El límite de $[ASB]_0$ usado en este tipo de estudios es determinado en base a la relación de absorbancias que presentan la β C ensayada y la ASB, considerando solo las $[ASB]$ que cumplieren con la siguiente condición: $A(\lambda)^{ASB} \leq 10 \times A(\lambda)^{\beta C}$. Asimismo el límite inferior de concentraciones usadas se definió en base a la resolución que presenta el equipo, es decir, solo se evaluaron ΔA que tuvieron un valor mayor al de la resolución espectral.

3.4.4. Espectroscopía de emisión de fluorescencia

En particular, se registraron los espectros de absorción de soluciones de β Cs en presencia de cantidades crecientes de ASB. Las determinaciones se realizaron empleando los equipos detallados en la sección 2.4.4.5 del Capítulo anterior, en celdas de cuarzo de 1 cm x 1 cm de camino óptico y en condiciones de temperatura ambiente. Las intensidades de emisión (I_F) se corrigieron teniendo en cuenta la luz absorbida por el ligando (ASB) en las longitudes de onda de excitación (340 nm - 370 nm) y emisión (380 nm - 450 nm) de

acuerdo a la ecuación:[31,32]

$$I_{F(\text{corr})} = I_{F(\text{obs})} \times 10^{(A_{\text{exc}} + A_{\text{flu}}) / 2} \quad (3.2)$$

donde $I_{F(\text{corr})}$ y $I_{F(\text{obs})}$ representan la intensidad de fluorescencia corregida y observada, respectivamente. A_{exc} y A_{flu} corresponden a la absorbancia que presenta el ligando (ASB) a la longitud de onda de excitación y emisión, respectivamente.

3.4.5. Desactivación de fluorescencia: análisis de datos

Se entiende por desactivación de fluorescencia a todos los procesos que provocan una disminución de la intensidad de fluorescencia de una sustancia dada. Este fenómeno puede ser el resultado de una variedad de interacciones moleculares: reacciones de los estados excitados, rearreglos moleculares, transferencia de energía, formación de complejos y colisiones, entre otras.[33]

El proceso de desactivación que requiere contacto molecular puede ser: (i) *colisional o dinámico*, cuando el entorno interfiere en el comportamiento del estado excitado de una molécula luego de su formación, ya sea por transferencia de energía o de electrones, (ii) *estático*, cuando el entorno impide la formación del estado excitado.[34] Para ambos tipos de desactivación se requiere que exista el contacto molecular entre la molécula que emite fluorescencia y la que produce su desactivación.

(i) *Desactivación dinámica o por colisiones*. Dado un proceso de este tipo, puede calcularse la constante de velocidad del proceso de desactivación a partir de la siguiente ecuación:

$$I_F^0 / I_F = \tau_F^0 / \tau_F = 1 + K_{SV} [Q] = 1 + k_q \tau_F^0 [Q] \quad (3.3)$$

donde I_F^0 e I_F son las intensidades de emisión fluorescente corregidas, τ_F^0 y τ_F son los tiempos de vida de fluorescencia en ausencia y presencia del agente desactivador, respectivamente, K_{SV} es la constante de Stern-Volmer, $[Q]$ es la concentración del desactivador, k_q es la constante bimolecular de desactivación y τ_F^0 es el tiempo de vida de fluorescencia de la especie emisora en ausencia del desactivador. Por tanto, si I_F^0/I_F vs. $[Q]$, y τ_F^0/τ_F vs. $[Q]$ son lineales y poseen la misma pendiente, puede ser asumida la existencia de un proceso puramente dinámico.

Además, una gráfica de Stern-Volmer lineal generalmente indica la presencia de un solo fluoróforo o especie emisora. Por el contrario, si ésta no es lineal puede suponerse la presencia de más de una población de fluoróforos.

(ii) *Desactivación estática.* Es producto de la formación de complejos no fluorescentes entre el fluoróforo y el desactivador en sus estados electrónicos fundamentales. En un proceso puramente estático, también se obtiene una relación lineal entre I_F^0/I_F y $[Q]$. En este caso, K_{SV} es igual a la constante de equilibrio correspondiente a la formación del complejo, es decir:

$$I_F^0 / I_F = 1 + K_{SV} [Q] \quad (3.4)$$

$$K_{SV} = K_S = [MQ] / ([M] [Q]) \quad (3.5)$$

Por lo tanto, la medida de τ_F para diferentes concentraciones de desactivador es necesaria para diferenciar entre el proceso dinámico y el estático, ya que en este último caso, $\tau_F^0/\tau_F = 1$.

En aquellos casos en que existan ambos tipos de procesos (dinámico y estático), se observa una relación cuadrática entre I_F^0/I_F y $[Q]$. Este comportamiento se representa matemáticamente con la siguiente ecuación:

$$I_F^0 / I_F = (1 + K_D[Q]) (1 + K_S[Q]) \quad (3.6)$$

donde K_D y K_S son los valores de K_{SV} para el desactivador dinámico y estático, respectivamente. Es decir, K_D es igual a $k_q\tau_F^0$ y K_S es la constante de equilibrio para la formación del complejo fluoróforo / desactivador.

3.4.6. Metodología de análisis de datos espectroscópicos de emisión resuelta en el tiempo

Los decaimientos se analizaron con el programa DAS-6 (*Horiba Jobin Yvon*), el cual cuenta con una función de ajuste de múltiple exponenciales. Todos los ajustes realizados con este programa se evaluaron por el criterio del χ^2 (cercano a la unidad) y la inspección visual de los residuos y autocorrelación del ajuste en función de los datos experimentales. El promedio de los tiempos de vida de fluorescencia ($\langle\tau\rangle$) obtenidos para de los ajustes tri-exponenciales llevados a cabo en el análisis del decaimiento fluorescente de ASB, en cada uno de los *buffers* usados, se calculó a partir de los tiempos de vida (τ_1 , τ_2 , y τ_3) y los factores pre-exponenciales normalizados (a_1 , a_2 y a_3) arrojados por el ajuste correspondiente mediante la siguiente relación:

$$\langle \tau \rangle = a_1\tau_1 + a_2\tau_2 + a_3\tau_3 \quad (3.6)$$

Los valores de los tiempos de vida promedio calculados para ASB en cada condición de pH, se emplearon para fijar su contribución en los ajustes multi-exponenciales de los decaimientos observados en los estudios de interacción βC / ASB.

3.5. Referencias

1. Peters T. Serum albumin. *Adv Protein Chem* 1985;37
2. Spahr PF, Edsall JT. Amino acid composition of human and bovine serum mercaptalbumins. *Journal of Biological Chemistry* 1964;239:850-854
3. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4F5S>.
4. Kinsella JE, Whitehead DM. Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties. *Adv Food Nutr Res* 1989;33:343-438
5. Smith RG, Gauthier DA, Dennis DT, Turpin DH. Malate-and pyruvate-dependent fatty acid synthesis in leucoplasts from developing castor endosperm. *Plant Physiology* 1992;98:1233-1238
6. Figge J, Rossing TH, Fencel V. The role of serum proteins in acid-base equilibria. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 1991;117:453-467
7. Hirayama K, Akashi S, Furuya M, Fukuhara KI. Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and Frit-FAB LC/MS. *Biochemical and biophysical research communications* 1990;173:639-646
8. Abdi K, Nafisi S, Manouchehri F, Bonsaii M, Khalaj A. Interaction of 5-Fluorouracil and its derivatives with bovine serum albumin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2012;107:20-26
9. Era S, Sogami M. 1H-NMR and CD studies on the structural transition of serum albumin in the acidic region-The N→F transition. *The Journal of peptide research* 1998;52:431-442
10. Li Y, Lee J, Lal J, An L, Huang Q. Effects of pH on the interactions and conformation of bovine serum albumin: comparison between chemical force microscopy and small-angle neutron scattering. *The Journal of Physical Chemistry B* 2008;112:3797-3806
11. El Kadi N, Taulier N, Le Huerou JY, et al. Unfolding and refolding of bovine serum albumin at acid pH: ultrasound and structural studies. *Biophysical journal* 2006;91:3397-3404
12. Kun R, Szekeres M, Dékány I. Isothermal titration calorimetric studies of the pH induced conformational changes of bovine serum albumin. *Journal of thermal analysis and calorimetry* 2009;96:1009-1017
13. Qing H, Yanlin H, Fenlin S, Zuyi T. Effects of pH and metal ions on the conformation of bovine serum albumin in aqueous solution An attenuated total reflection (ATR) FTIR spectroscopic study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 1996;52:1795-1800
14. Wilting J, Kremer JM, Ijzerman AP, Schulman SG. The kinetics of the binding of warfarin to human serum albumin as studied by stopped-flow spectrophotometry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1982;706:96-104
15. Demchenko AP. *Ultraviolet spectroscopy of proteins*. Springer-Verlag, New York 1981
16. Longworth JW. *Luminescence of polypeptides and proteins*. In *Excited states of proteins and nucleic acids*, Ed RF Steiner, I Welnyrb, Plenum, New York 1971:319-484
17. Permyakov EA. *Luminescent spectroscopy of proteins*. CRC Press, London 1993
18. Albani JR. New insights in the interpretation of tryptophan fluorescence. *Journal of fluorescence* 2007;17:406-417
19. Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer 2006
20. Mallick A, Chattopadhyay N. Photophysics in motionally constrained bioenvironment: interactions of norharmane with bovine serum albumin. *Photochemistry and photobiology* 2005;81:419-424
21. Chakrabarty A, Mallick A, Haldar B, Das P, Chattopadhyay N. Binding interaction of a biological photosensitizer with serum albumins: a biophysical study. *Biomacromolecules* 2007;8:920-927
22. Nafisi S, Panahyab A, Sadeghi GB. Interactions between β-carboline alkaloids and bovine serum albumin: investigation by spectroscopic approach. *Journal of Luminescence* 2012;132:2361-2366
23. Hemmateenejad B, Shamsipur M, Samari F, et al. Combined fluorescence spectroscopy and molecular modeling studies on the interaction between harmalol and human serum albumin *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2012;67:201-208
24. Reyman D, Vinas MH, Tardajos G, Mazario E. The Impact of Dihydrogen Phosphate Anions on the Excited-State Proton Transfer of Harmane. Effect of β-Cyclodextrin on These Photoreactions. *The Journal of Physical Chemistry A* 2012;116:207-214
25. Sakurovs R, Ghiggino KP. Estimation of excited state pK from rates of proton transfer. *Journal of Photochemistry* 1985;30:133-140

26. Gonzalez MM, Denofrio MP, Einschlag FSG, et al. Determining the molecular basis for the pH-dependent interaction between 2'-deoxynucleotides and 9 H-pyrido [3, 4-b] indole in its ground and electronic excited states. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2014;16:16547-16562
27. Sakurovs R, Ghiggino KP. Excited state proton transfer in β -carboline. *Journal of Photochemistry* 1982;18:1-8
28. Gonzalez MM, Salum ML, Gholipour Y, Cabrerizo FM, Erra-Balsells R. Photochemistry of norharmane in aqueous solution. *Photochem Photobiol Sci* 2009;8:1139-1149
29. Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein science. Protein Science* 1995;4:2411-2423
30. Benesi HA, Hildebrand JH. A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons. *Journal of the American Chemical Society* 1949;71:2703-2707
31. Van de Weert M, Stella L. Fluorescence quenching and ligand binding: a critical discussion of a popular methodology. *Journal of Molecular Structure* 2011;998: 144-150.
32. Alarcón E, Aspée A, Abuín EB, Lissi EA. Evaluation of solute binding to proteins and intra-protein distances from steady state fluorescence measurements. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2012;106:1-17.
33. Gonzalez MM. Piridoindoles naturales (β -carbolinas) y sintéticos como fotosensibilizadores en procesos de interés biológico. Estudio de su fotoquímica en solución acuosa. Tesis Doctoral 2012
34. Braslavsky SE. Glossary of terms used in photochemistry, 3rd edition (IUPAC Recommendations 2006). *Pure Appl Chem* 2007;79:293-465

Capítulo 4

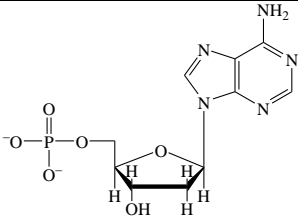
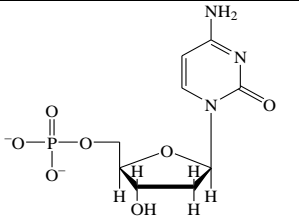
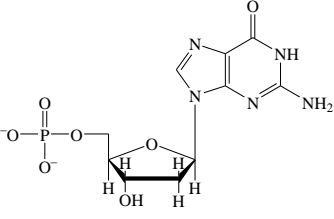
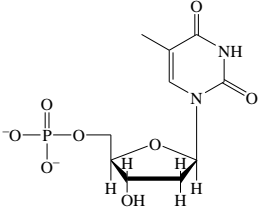
Interacción y daño al ADN fotoinducido por N-metil β -carbolinas

4.1. Introducción

4.1.1. Ácido desoxirribonucleico

Químicamente, el ácido desoxirribonucleico (ADN) es un polímero formado por nucleótidos, los que son generados por la unión covalente de un nucleósido a un grupo fosfato. A su vez, cada nucleósido está compuesto por una aldopentosa, la 2'-desoxirribosa, unida a una base purínica o pirimidínica.

En un desoxirribonucleótido el átomo de carbono ubicado en la posición 1', C(1'), de la desoxirribosa se enlaza con el N(1) de las pirimidinas o con el N(9) de las purinas, formando un enlace *N*-glicosídico β . El signo prima (') se utiliza para diferenciar las posiciones en el azúcar de las posiciones en las bases. En los nucleótidos naturales, la unión éster con el fosfato ocurre con el grupo hidroxilo del C(5') del azúcar. En el Esquema 4.1 se detallan las estructuras químicas de todos nucleótidos constituyentes del ADN, junto con sus nomenclaturas abreviadas.

Desoxirribonucleótidos con bases purínicas	Desoxirribonucleótidos con bases pirimidínicas
 <p>2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato (dAMP)</p>	 <p>2'-desoxicitosina-5'-monofosfato (dCMP)</p>
 <p>2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato (dGMP)</p>	 <p>2'-desoxitimidina-5'-monofosfato (dTMP)</p>

Esquema 4.1. Estructura química de los desoxirribonucleótidos presentes en el ADN.

En 1953 Watson y Crick postularon un modelo de estructura tridimensional de la molécula de ADN (ácido desoxinucleico), basándose en los estudios de rayos X de Wilkins y Franklin.[1] Éste consiste en dos cadenas de ADN helicoidales con giro hacia la derecha, alrededor del mismo eje. Cada cadena está formada por sucesivos nucleótidos unidos covalentemente mediante “puentes” fosfato, en los que el grupo fosfato en posición 5' del azúcar de un nucleótido se une al hidroxilo en posición 3' del monosacárido del nucleótido siguiente, creando así un enlace fosfodiéster. La cadena lineal de ADN tiene una polaridad

específica, por lo tanto pueden caracterizarse por su polaridad los extremos 5' y 3'. Las dos cadenas de una doble hélice, se unen en forma antiparalela, es decir, con polaridad contraria.

En la doble hélice, el esqueleto hidrofílico de desoxirribosas y grupos fosfato alternantes se encuentra hacia el exterior, en contacto con el agua circundante. Las bases purínicas y pirimidínicas de ambas hebras se encuentran apiladas dentro de la doble hélice, con sus estructuras de anillos hidrofóbicos casi planares, muy próximos entre sí, y perpendiculares al eje longitudinal de la hélice. Ambas cadenas se unen entre sí por puentes de hidrógeno que se establecen entre pares de bases. Estas últimas se unen entre sí de una sola forma: G (guanina) se une con C (citosina) (G-C), mientras que A (adenina) lo hace con T (timina) (A-T). Estas uniones comparten tres y dos puentes de hidrógeno, respectivamente. El apareamiento de bases crea un surco mayor y uno menor en la superficie de la doble cadena.

La estructura descrita anteriormente, correspondiente al modelo de Watson-Crick, es también llamada *forma B* del ADN y representa la conformación más estable en condiciones fisiológicas. Este arreglo, con giro a derecha, posee un diámetro de 2 nm y 10 pares de bases por vuelta, lo que equivale a 3,4 Å de aumento de la hélice, en longitud. Además, la conformación del enlace glicosídico es *anti*, como en los nucleótidos libres en solución. Sin embargo, debido a la posible rotación libre de algunos enlaces, pueden existir otras conformaciones, llamadas *forma A* y *forma Z*. La primera se ve favorecida en medios libres de agua. Posee también giro a la derecha, conformación *anti* de sus enlaces glicosídicos y 11 pares de bases por vuelta (que representan 2,6 Å de la longitud de la hélice). En este caso, las bases no se encuentran perpendiculares al eje longitudinal de la hélice, sino que poseen una inclinación (desviación) de 20°. Por último, la *forma Z* consiste en una doble hélice con giro hacia la izquierda. Posee 12 pares de bases por vuelta y enlaces glicosídicos en conformación *anti* para las pirimidinas y *syn* para las purinas (Figura 4.1).

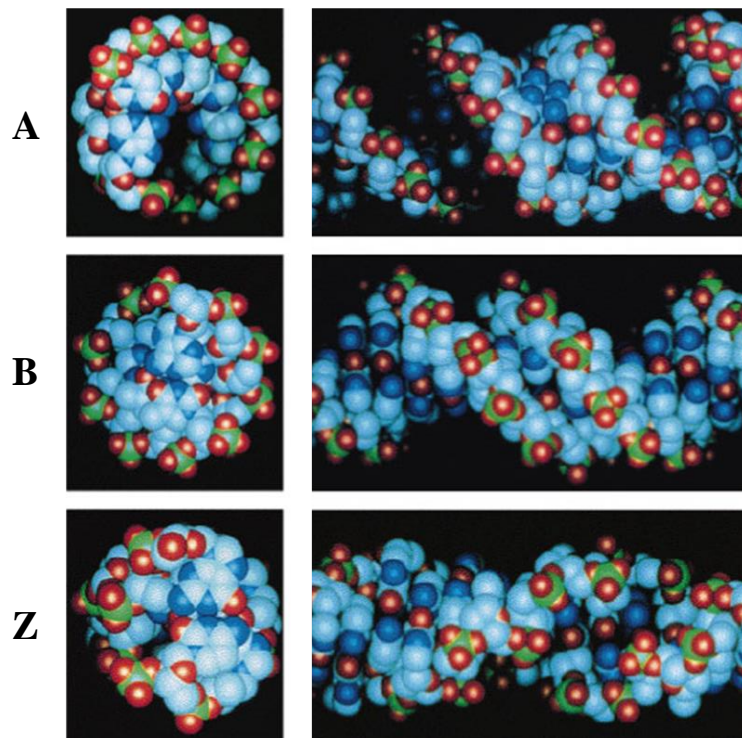


Figura 4.1. Formas A, B y Z del ADN. Imágenes tomadas de la referencia. [2].

Es incierta la existencia de la conformación A en condiciones intracelulares, pero la forma Z existe en algunos tramos cortos del ADN de procariotas y eucariotas. Ésta puede jugar un rol en la regulación de la expresión de ciertos genes o en la recombinación genética.[3]

Las variaciones en la estructura del ADN de doble cadena en función del pH también han sido ampliamente estudiadas mediante espectroscopía de absorción UV-visible [3] y Raman.[4,5] El análisis realizado a pH ácido (utilizando ADN de timo de ternero) demuestra que en condiciones de pH comprendidas entre 5,5 y 4,1 comienza la protonación de los residuos de C y A y, por debajo de pH 3, comienza a protonarse la G. A pH 2,8 la estructura B se pierde totalmente. Por otra parte, en el intervalo de pH 7-11 no existen cambios significativos en la estructura tridimensional del ADN a pesar que los residuos G y T se desprotonan. En condiciones de alcalinidad extrema, pH 11-12, existe una alta probabilidad de que la estructura siga siendo, en su mayoría, de tipo B.[4,5]

En el presente trabajo de tesis, los experimentos de interacción se llevaron a cabo con ADN lineal de doble cadena, proveniente de timo de ternero (*Calf-Thymus DNA*) y los de fotosensibilización se realizaron con ADN del bacteriófago PM2. Éste último consiste en moléculas circulares de ADN de doble cadena que pueden existir en dos formas

topológicas: relajada (*Rel*) o superenrollada (*Se*). Cuando la estructura está relajada, el ADN posee la conformación B. Sin embargo, estas moléculas generalmente se encuentran en su estado *Se*. En este último caso, la estructura B se pierde y se obtiene una nueva conformación, con un ligero aumento en el número de pares de bases por vuelta. La Figura 4.2 ilustra imágenes de micrografía electrónica de diferentes estructuras plasmídicas con distinto grado de superenrollamiento.

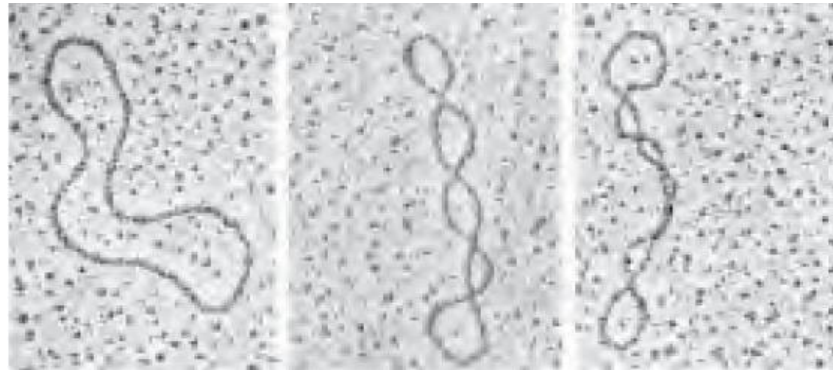


Figura 4.2. ADN circular de doble cadena en su forma relajada y superenrollada. El grado de superenrollamiento aumenta de izquierda a derecha. Imágenes extraídas de la referencia [3].

4.1.2. Mecanismos que participan en el daño al ADN por acción de la radiación UV

Numerosos estudios han sido realizados con el objeto de determinar los efectos derivados del daño al ADN en función de la longitud de onda (λ) de la radiación incidente. Algunos de ellos, llevados a cabo utilizando animales de laboratorio, muestran que la luz UVB es más efectiva en producir cáncer de piel que la UVA.[6] Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la radiación UVA también presenta un cierto carácter mutagénico y/o carcinogénico.[7]

A continuación se describe, brevemente, un ejemplo que avala lo expuesto en el párrafo anterior. En la Figura 4.3 se muestran los denominados espectros de acción. Estos son curvas de diferentes respuestas celulares inducidas por la radiación incidente en función de λ . En este estudio en particular, para evaluar el efecto producido por las distintas λ sobre el ADN, se analizó la capacidad de inducir mutaciones, producir muerte celular, producir cortes en el ADN y también entrecruzamiento (o *crosslinking*) de ADN con proteínas en células humanas P3.[6] Con fines comparativos, en la misma figura se incluyó el espectro del ADN.

Claramente puede apreciarse que, en la región comprendida entre 200 y 320 nm (región UVC y UVB), los espectros de acción muestran su máxima respuesta comparada

con otras λ , tanto para letalidad, mutagenicidad y *crosslinking*, como para la ruptura del ADN. Más aún, los máximos de los espectros de acción se corresponden bastante bien con el máximo del espectro de absorción del ADN. Sin embargo, λ mayores a 320 nm (radiación UVA y visible) produjeron las mismas respuestas, aunque con menor eficiencia. Es decir que, en esta región del espectro electromagnético a pesar de que el ADN no es capaz de absorber radiación, aún así se observan signos de daño o alteraciones. Estas diferencias entre los espectros de acción y de absorción del ADN se observa con mayor claridad para los casos de inducción de mutaciones (mutagenicidad), *crosslinking* de ADN a proteínas y cortes sobre ADN. Incluso, tanto para mutagenicidad como para ruptura del ADN se observan máximos secundarios en la región UVA. Este hecho se observó en otros estudios similares realizados sobre otros sistemas biológicos.[7]

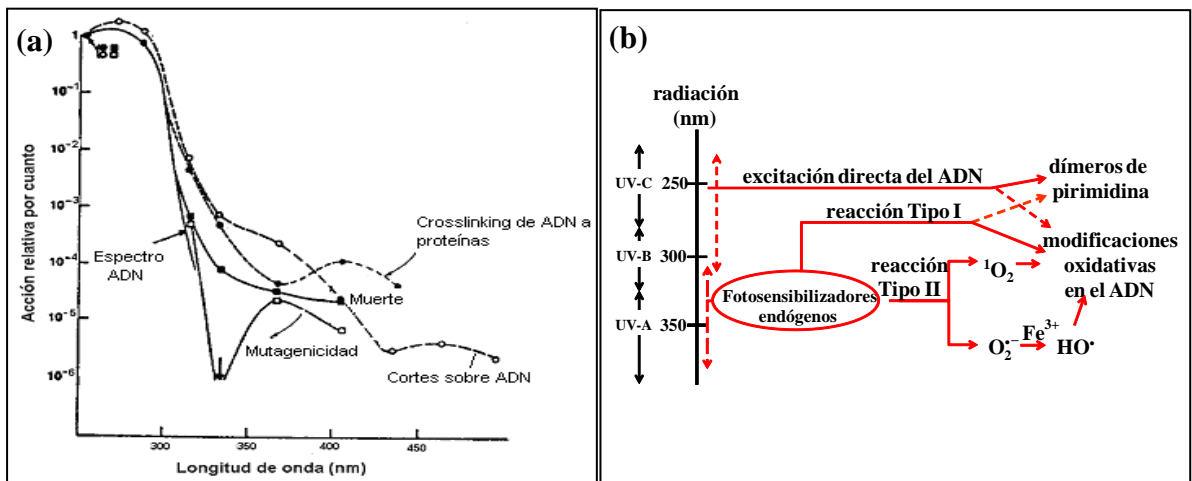


Figura 4.3. (a) Espectros de acción donde se monitorea letalidad, mutagenicidad y otros efectos de la radiación sobre células. Con fines comparativos todos los espectros se normalizaron a 254 nm y se agregó el espectro de absorción del ADN. Figura adaptada de la referencia [6]. (b) Esquema que representa los diferentes mecanismos de daño inducidos por la acción de la radiación.

Por consiguiente, del análisis de estos resultados se deduce que existen dos tipos de mecanismos por los cuales el ADN puede ser dañado. Por un lado, la absorción de radiación por las bases nucleicas genera estados excitados que vuelven reactiva a la molécula de ADN, lo que produce su modificación o alteración química. A este tipo de proceso se lo denomina genéricamente *daño directo*. Por otro lado, la absorción de la radiación incidente por parte de otro cromóforo generará especies químicas que reaccionan con el ADN, modificándolo. En este caso se está en presencia de un proceso fotosensibilizado y se habla de *daño indirecto* al ADN. Tanto la radiación UVB como la UVC pueden ser absorbidas directamente por el ADN y producir, por lo tanto, daño

directo. Por su parte, la radiación UVA y visible actúan a través de mecanismos indirectos o fotosensibilizados.

En el marco de este trabajo de Tesis cobra importancia mencionar los aspectos centrales relacionados con el daño indirecto o fotosensibilizado.

4.1.3. Daño al ADN mediante procesos fotosensibilizados

Se denomina fotosensibilización a todo proceso por el cual una especie química sin absorber radiación sufre una alteración fotoquímica o fotofísica como resultado de la absorción de la radiación electromagnética por otra especie química a la que se denomina ***fotosensibilizador***. [8,9] Los procesos implicados son variados y muchas veces un sensibilizador actúa, simultáneamente, a través de más de un mecanismo.

Las moléculas excitadas son generalmente de tipo radicalario. Por lo tanto, las membranas plasmáticas que contienen lípidos insaturados son los blancos de ataque preferenciales, sobre todo por parte de compuestos con baja hidrofiliidad. La molécula de ADN es, cuantitativamente, un blanco menor, en la mayoría de los casos. Sin embargo, su fotosensibilización lleva a mutaciones. Entonces, la reacción de los fotosensibilizadores excitados y el ADN tiene gran relevancia, aún en casos en los cuales la fototoxicidad es predominantemente mediada por otras biomoléculas. La relación entre fotogenotoxicidad (reacción causada en el ADN) y fototoxicidad (la cual puede resultar de reacciones con otros blancos celulares), puede diferir dependiendo de la naturaleza del compuesto fotorreactivo (su hidrofiliidad, su afinidad hacia el ADN por medio de uniones no covalente) y su reactividad fotoquímica. Sin embargo, la genotoxicidad nunca está completamente ausente debido a que, en general, la reactividad de los fotosensibilizadores excitados y otros compuestos fotorreactivos es lo suficientemente alta como para poder reaccionar con el ADN y debido, además, a que las EROs y otros productos primarios formados por fotosensibilización pueden llevar a modificaciones de esta biomolécula en reacciones secundarias.

El daño indirecto al ADN inducido por fotosensibilizadores y otras sustancias fotorreactivas puede ser el resultado de diferentes mecanismos y producir varios tipos de fotoproductos. Estos mecanismos pueden clasificarse en:

- (a) *Reacciones directas de los fotosensibilizadores excitados con la molécula de ADN.*
- (b) *Reacciones mediadas por EROs.*

(c) Reacciones que involucran otros intermediarios secundarios, por ejemplo, descomposición de productos de las moléculas excitadas o productos de la peroxidación de lípidos.

Estos tres tipos de reacciones pueden, a su vez, subdividirse tal como se indica en la siguiente tabla:

Tabla 4.1. Mecanismos de daños inducidos al ADN por compuestos fotorreactivos.

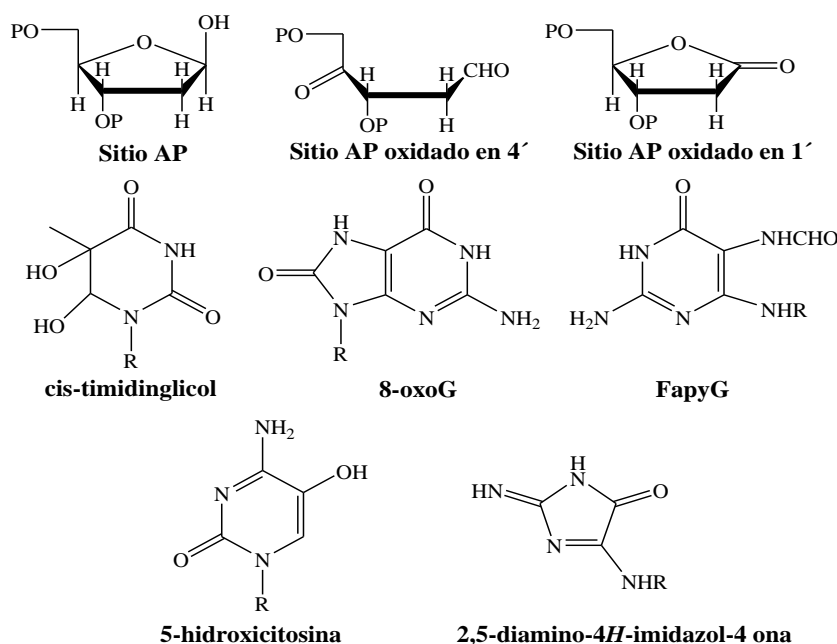
Tipos de daño	Mecanismo	Agentes (ejemplos)	Modificaciones en el ADN
(a) Daño directo producido por el fotosensibilizador	(a.1) Unión covalente	Psoraleno	Fotoaductos
	(a.2) Transferencia de energía	Acetofenona	Dímeros de pirimidina
	(a.3) Transferencia de electrones	Fotosensibilizadores Tipo I	Oxidación de bases
(b) Daño mediado por EROs	(b.1) Vía radical HO [•]	Agentes generadores de EROs extracelulares	CSC [†] , sitios con pérdidas de bases, oxidación de bases
	(b.2) Vía ¹ O ₂	Porfirinas	Oxidación de guanina
(c) Daño mediado por otros productos secundarios distintos de las EROs	(c.1) Vía descomposición de productos	Clorofenotiazinas	Aductos, CSC [†] , sitios con pérdidas de bases, oxidación de bases
	(c.2) Vía productos de peroxidación lipídica		

[†] CSC: cortes en simple cadena

En el Esquema 4.2 se presentan las estructuras de los compuestos resultantes de las modificaciones generadas por fotosensibilización que más comúnmente se encuentran en el ADN lesionado o dañado. Algunas modificaciones, como la formación de dímeros de pirimidina, son específicamente generadas por un solo tipo de mecanismo de reacción. En particular, los dímeros de pirimidina ciclo butano (DPCs) se pueden formar por la llamada transferencia de energía triplete-triplete desde los fotosensibilizadores a las bases pirimidínicas.[10,11] Este último proceso se lleva a cabo sólo si la energía triplete de los fotosensibilizadores es mayor que 267 kJ mol⁻¹. [12] Otro tipo de lesiones, altamente frecuentes, son las oxidaciones y pérdidas de bases y/o CSC. Estas lesiones son producidas, en mayor o menor medida, en todos los tipos de daño fotosensibilizados y se pueden formar después de una reacción directa del estado excitado de los fotosensibilizadores con el ADN (reacción de tipo I), o por la transferencia de energía y/o de electrones al oxígeno molecular (reacción tipo II), [13] generando oxígeno singlete o anión superóxido como productos primarios. Estos luego pueden (directa o indirectamente) oxidar las bases nitrogenadas del ADN. Sin embargo, la relación en que estas lesiones son

generadas, llamada “espectro de daño”, es a menudo una huella digital del mecanismo de daño.

Las consecuencias del daño inducido por fotosensibilizadores y compuestos fotoactivos, en particular, la citotoxicidad, la inducción de mutaciones y la iniciación de carcinogénesis, obviamente depende del espectro de modificaciones inducido en el ADN.



Esquema 4.2. Estructuras de los fotoproductos mayormente encontrados en el ADN dañado. AP: sitio apurínico o apirimidínico (pérdida de base).

Sin ninguna duda, los estudios previos presentados en el Capítulo 1 brindan información importante para los intereses particulares de esta tesis, tanto sobre la interacción como sobre la fotosensibilización del ADN por β Cs. En particular los estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación muestran que el tipo y magnitud de daño inducido al ADN depende no solo de la naturaleza química del alcaloide ensayado, sino también de las condiciones del medio.

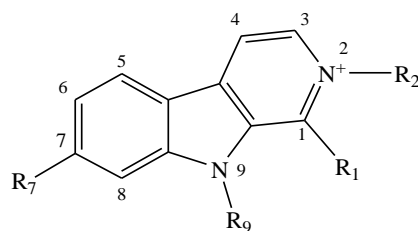
Consecuentemente, es relevante investigar los procesos de interacción y fotosensibilización en los que potencialmente podrían participar las *N*-Me- β Cs (sustitución en N-2 y/o N-9). Así, en este capítulo se plantea abordar diferentes aristas de los aspectos antes mencionados, entre ellas: *(i)* Determinar cuali- y cuantitativamente la capacidad de unión y el daño al ADN fotoinducido por los *N*-metil derivados aquí estudiados y sus especie ácido-base más relevantes desde el punto de vista fisiológico. Y *(ii)* caracterizar el espectro de daño al ADN, expresado en términos de los diferentes fotoproductos generados. En particular, se realizaron ensayos con ADN de doble cadena.

4.2. Resultados y discusiones

4.2.1. Interacción entre N-Me- β Cs y ADN

Se estudió la interacción entre β Cs y sus N-metil derivados (Esquema 4.3) con ADN de timo de ternera (ADNtt) como modelo de material genético. Se utilizó este tipo de material genético en particular dado que el mismo es ampliamente usado en la literatura para este tipo de trabajos. De esta forma, los resultados obtenidos se pueden estandarizar y/o comparar con el efecto o la magnitud de las interacciones observadas para otros compuestos relacionados.

En particular, los estudios de interacción presentados en esta sección se realizaron bajo condiciones de pH controlados. Para los fines propuestos en este capítulo, se emplearon técnicas espectroscópicas de absorción UV-visible y de emisión fluorescente, que permiten interpretar cuali- y cuantitativamente la naturaleza de las interacciones observadas.



Nombre (abreviatura)	R ₁	R ₂	R ₇	R ₉
<i>nor</i> Harmano (nHo)	-H	-H	-H	-H
2-Metil- <i>nor</i> Harmanio (catión) Ioduro de 2-Metil- <i>nor</i> Harmanio (2-Me-nHo)	-H	-CH ₃	-H	-H
9-Metil- <i>nor</i> Harmano (9-Me-nHo)	-H	-H	-H	-CH ₃
2,9-diMetil- <i>nor</i> Harmanio (catión) Ioduro de 2,9-diMetil- <i>nor</i> Harmanio (2,9-diMe-nHo)	-H	-CH ₃	-H	-CH ₃
Harmano (Ho)	-CH ₃	-H	-H	-H
2-Metil-Harmanio (catión) Ioduro de 2-Metil-Harmanio (2-Me-Ho)	-CH ₃	-CH ₃	-H	-H
9-Metil-Harmano (9-Me-Ho)	-CH ₃	-H	-H	-CH ₃
2,9-diMetil-Harmanio (catión) Ioduro de 2,9-diMetil-Harmanio (2,9-diMe-Ho)	-CH ₃	-CH ₃	-H	-CH ₃
Harmina (Ha)	-CH ₃	-H	-OCH ₃	-H
2-Metil-Harminio (catión) Ioduro de 2-Metil-Harminio (2-Me-Ha)	-CH ₃	-CH ₃	-OCH ₃	-H
9-Metil-Harmina (9-Me-Ha)	-CH ₃	-H	-OCH ₃	-CH ₃
2,9-diMetil-Harminio (catión) Ioduro de 2,9-diMetil-Harminio (9-Me-Ha)	-CH ₃	-CH ₃	-OCH ₃	-CH ₃

Esquema 4.3. Estructura química de las β Cs empleadas en este capítulo.

4.2.1.1. Estudio de interacción entre β Cs y ADNtt: análisis mediante técnicas de emisión fluorescente en estado estacionario.

Se registraron los espectros de emisión fluorescente de las N-Me- β Cs listadas en el Esquema 4.3. En el caso de los derivados sustituidos en N-9 se realizaron ensayos en 3 condiciones de pH diferentes: 4,8, 7,4 y 10,0, recurriendo al uso de soluciones *buffers* acetato, fosfato y bórax, respectivamente. De esta manera, se pudo evaluar la capacidad de interacción de las correspondientes especies protonadas (9-Me- β CH⁺) y neutras (9-Me- β CN), conjuntamente con el proceso de interacción que tiene lugar en condiciones fisiológicas. Sin embargo, en el caso de los derivados sustituidos en N-2 los ensayos se realizaron en condiciones fisiológicas de pH (7,4) dado que estas β Cs solo presentan una única especie ácido-base en el rango de pH de interés (2-Me- β Cs, Capítulo 2).

Como primer paso, y con el objeto de descartar cualquier posible efecto en la interacción global de las β Cs catiónicas con el ADN, debido a posibles modificaciones estructurales en la biomolécula, se realizó el estudio de interacción en 3 condiciones de pH diferentes (4,8, 7,4 y 10,0), tomando como modelo los derivados 2-Me-nHo (Figura 4.4) y 2,9-diMe-nHo (Figura 4.5). Estos resultados indican que, tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo (ver representaciones de Stern-Volmer), no hay variaciones significativas en el tipo y magnitud de la interacción entre las β Cs catiónicas y la molécula de ADN con el pH del medio, en el intervalo acotado de análisis ($4,8 < \text{pH} < 9,5$).

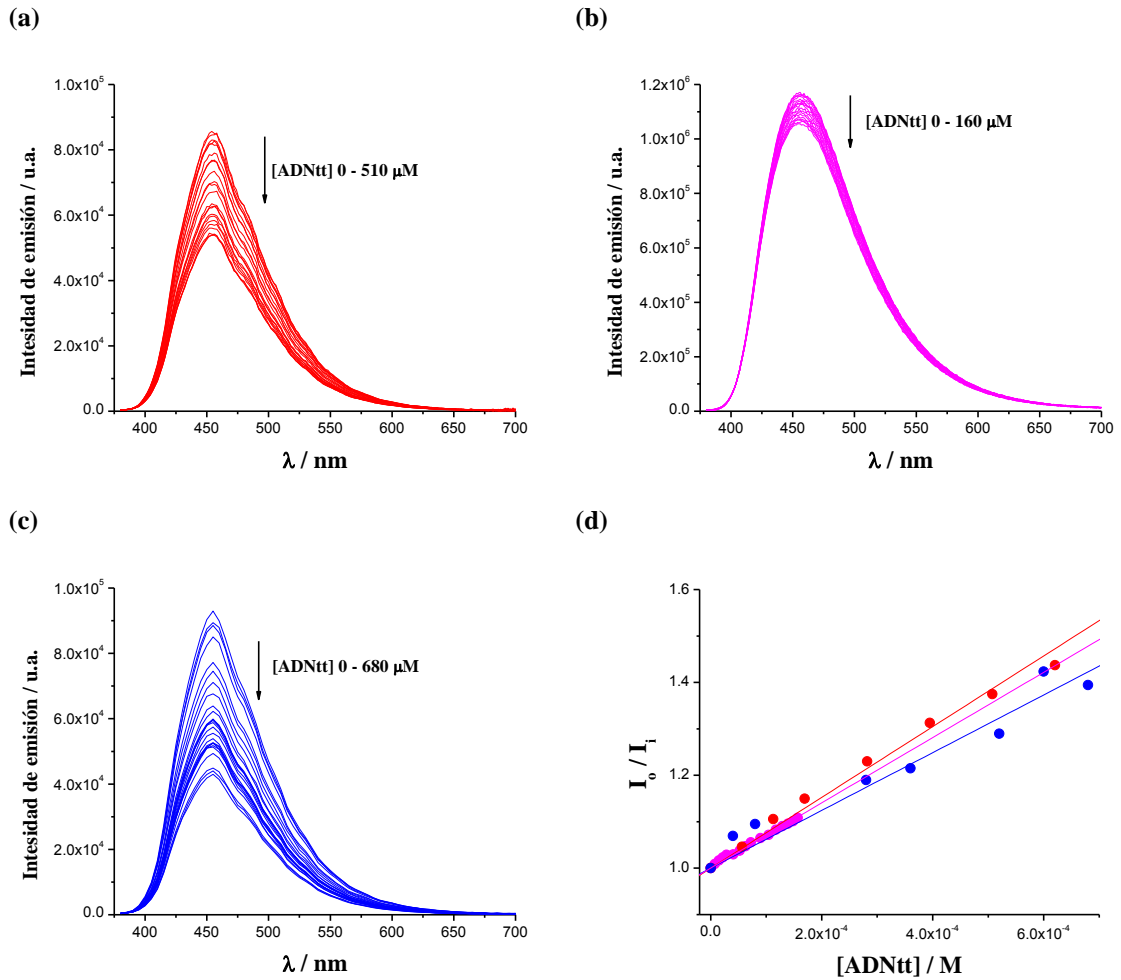
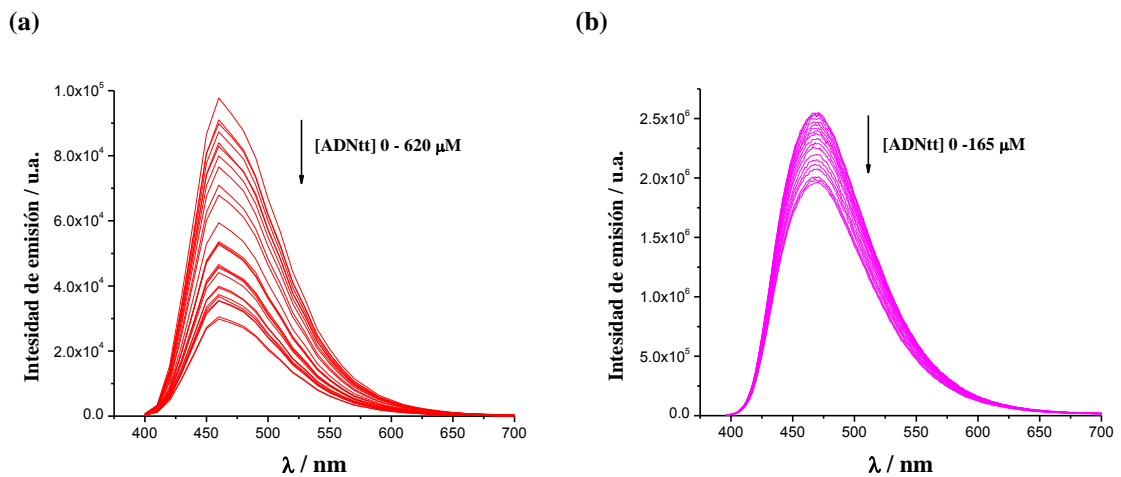


Figura 4.4. Espectros de emisión de fluorescencia de 2-Me-nHo (20 μ M, $\lambda_{exc} = 374$ nm) en presencia de cantidades crecientes de ADNtt (las concentraciones límites se indican en cada gráfico) en soluciones acuosas de *buffer*: (a) acetato pH 4,8, (b) fosfato pH 7,4 y (c) bórax pH 9,5. (d) Representación grafica de Stern-Volmer correspondientes a los resultados obtenidos en cada condición de pH.



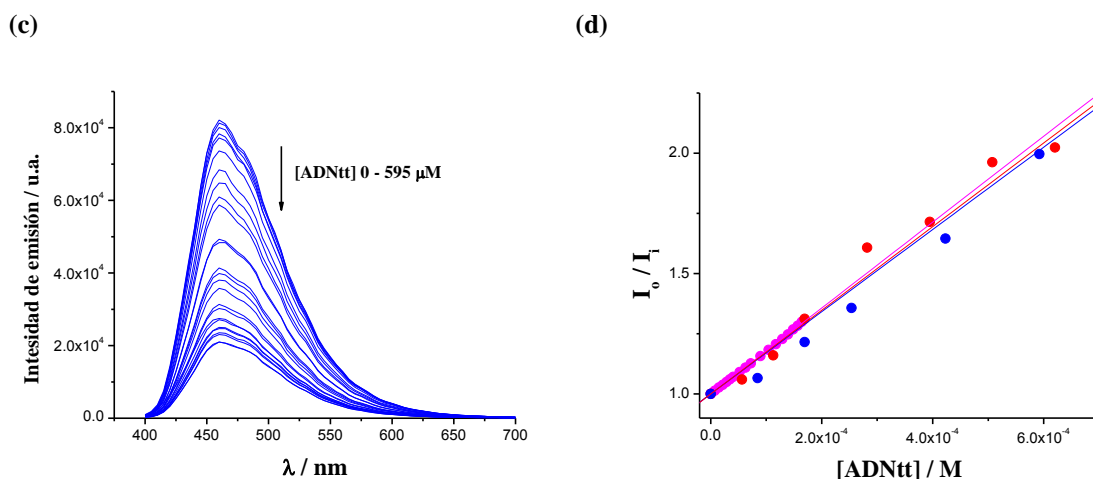


Figura 4.5. Espectros de emisión de fluorescencia de 2,9-diMe-nHo (20 μ M, $\lambda_{exc} = 388$ nm) en presencia de cantidades crecientes de ADNtt (las concentraciones límites se indican en cada gráfico) en soluciones acuosas de *buffer*: (a) acetato pH 4,8, (b) fosfato pH 7,4 y (c) bórax pH 9,5. (d) Representación grafica de Stern-Volmer correspondientes a los resultados obtenidos en cada condición de pH.

En relación a la interacción propiamente dicha, se registraron los espectros de emisión fluorescente de las *N*-Me- β Cs listadas en el Esquema 4.3. En las Figuras 4.6 y 4.7 se presentan los resultados obtenidos para los derivados catiónicos 2-Me- β Cs y 2,9-diMe- β Cs, respectivamente, todos registrados en condiciones de pH 7,4. Brevemente:

(i) En todos los casos se observó una clara interacción entre los alcaloides y el ADN, puesta de manifiesto por la marcada desactivación del estado S_1 de cada compuesto ensayado que provoca el incremento en la [ADNtt].

(ii) El agregado de ADN no induce la formación de nuevas especies emisoras (no se observan cambios en las longitudes de onda máximas de emisión), ni la aparición de procesos secundarios tal como lo indica el comportamiento lineal observado en las correspondientes gráficas de Stern-Volmer (Figuras 4.6 y 4.7).

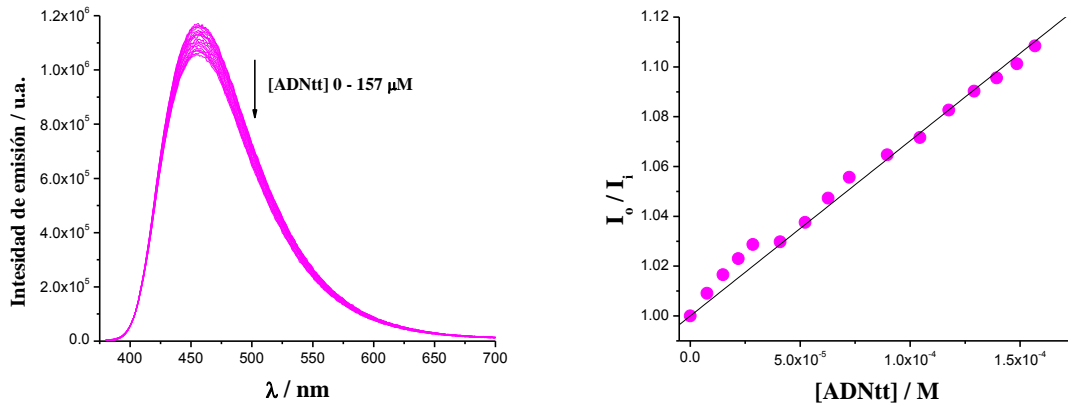
(iii) Los valores de las constantes de Stern-Volmer, listados en la Tabla 4.2, muestran una clara dependencia de la magnitud de la interacción global observada con la estructura química de la β C analizada. En particular, a medida que se incrementa el grado de sustitución del anillo de β C, se observa un incremento en la magnitud de la constante de desactivación total: $K^{(2-Me-Ha)} > K^{(2-Me-Ho)} > K^{(2-Me-nHo)}$ y $K^{(2,9-diMe-Ha)} > K^{(2,9-diMe-Ho)} > K^{(2,9-diMe-nHo)}$, para los 2-Me- β Cs y los 2,9-diMe- β Cs derivados, respectivamente.

Es cierto que son diversos los procesos de desactivación que puede sufrir un fluoróforo en manos de un agente desactivador de las características del ADN. Sin embargo, se ha demostrado que las β Cs interaccionan, mayormente, a través de la formación de complejos entre el alcaloide y el ADN, ambos en sus estados electrónicos

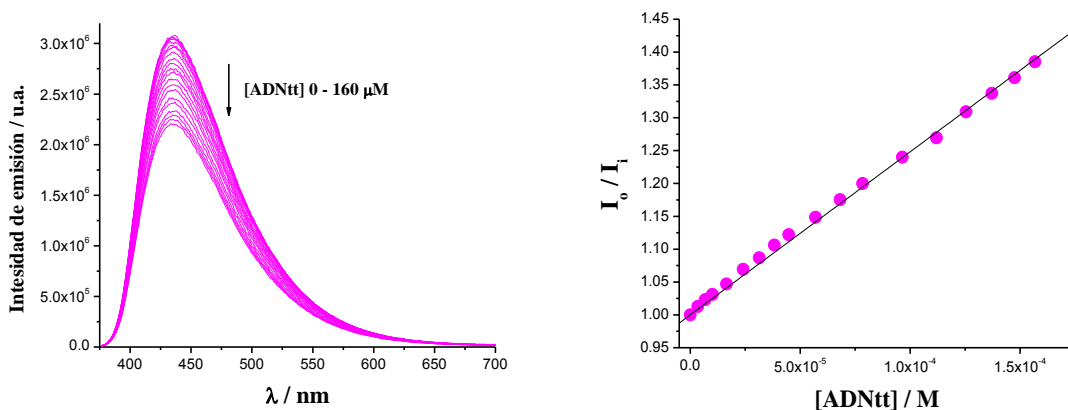
fundamentales (Capítulo 1). Si, además, tenemos en cuenta la naturaleza de la carga que presentan los cationes de β Cs estudiados en esta sección, junto con la carga neta negativa presente en la superficie de la molécula de ADN (debido a la presencia de los grupos fosfatos), es lógico suponer que el caso de estos derivados particulares la interacción sea, mayormente o puramente, estática. Esta suposición es, también, apoyada por los resultados obtenidos a partir de los ensayos realizados en condiciones dinámicas que se presentarán más adelante (sección 4.2.1.3).

Por lo tanto, si interpretamos a K_{sv} como representativa de la constante de complejación (K_S), la dependencia observada podrá interpretarse como una mayor contribución de fuerzas no polares a la interacción global. En este sentido, si tenemos en cuenta que el tipo de sustituyentes agregados en el caso de los N-metil derivados de Ho y Ha incrementan el carácter no polar de la molécula (sustituyentes alquílicos), su capacidad de intercalación entre los pares de bases de la molécula de ADN (entornos hidrofóbicos) también se verá incrementada. Este concepto se discutirá con mayor detalle en las secciones siguientes.

(a)



(b)



(c)

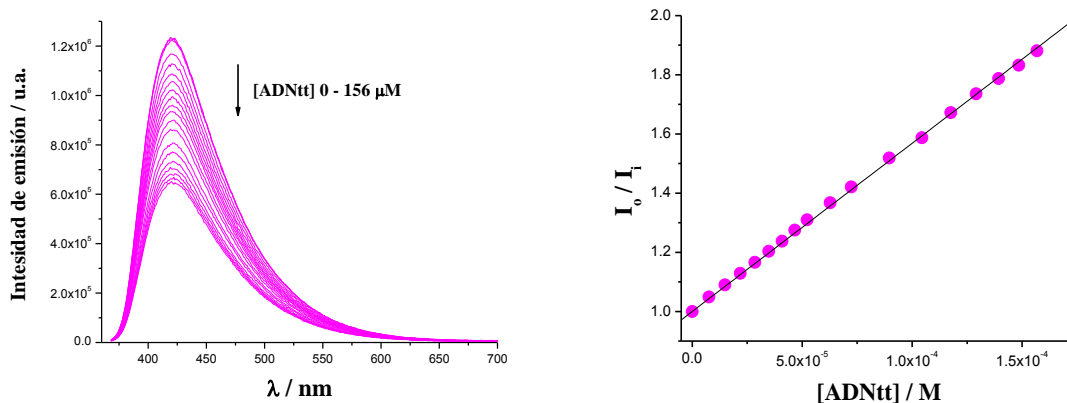
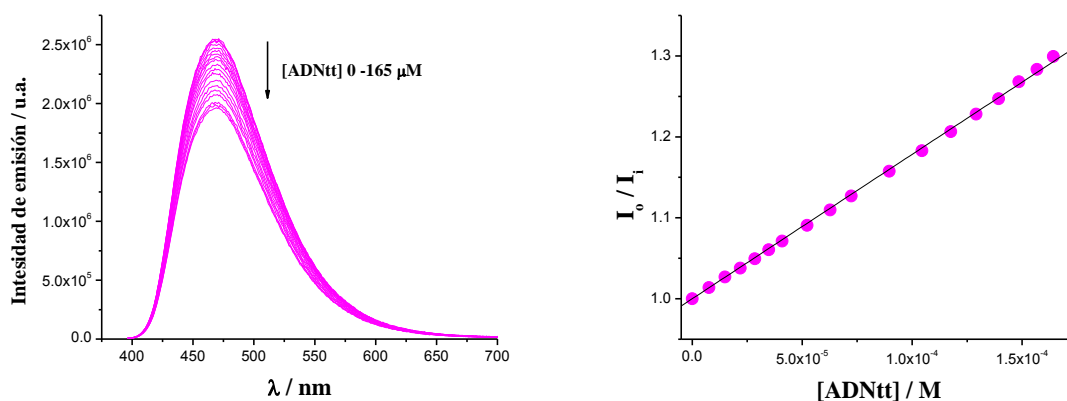
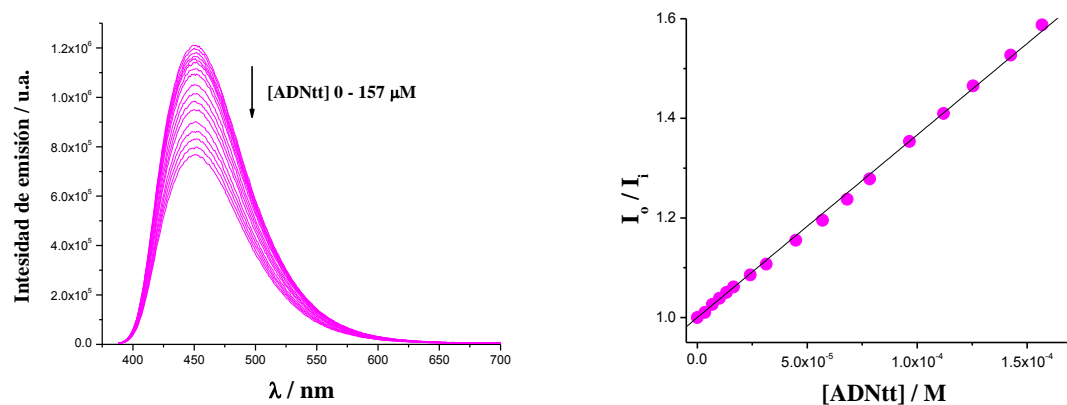


Figura 4.6. Espectros de emisión de fluorescencia de 2-Me- β Cs en presencia de cantidades crecientes de ADNtt (las concentraciones límites se indican en cada gráfico) en soluciones acuosas de *buffer* fosfato a pH 7,4. (a) 2-Me-nHo (35 μM , $\lambda_{\text{exc}} = 374$ nm), (b) 2-Me-Ho (30 μM , $\lambda_{\text{exc}} = 368$ nm), y (c) 2-Me-Ha (15 μM , $\lambda_{\text{exc}} = 360$ nm). En la columna derecha se representa la gráfica de Stern-Volmer correspondiente.

(a)



(b)



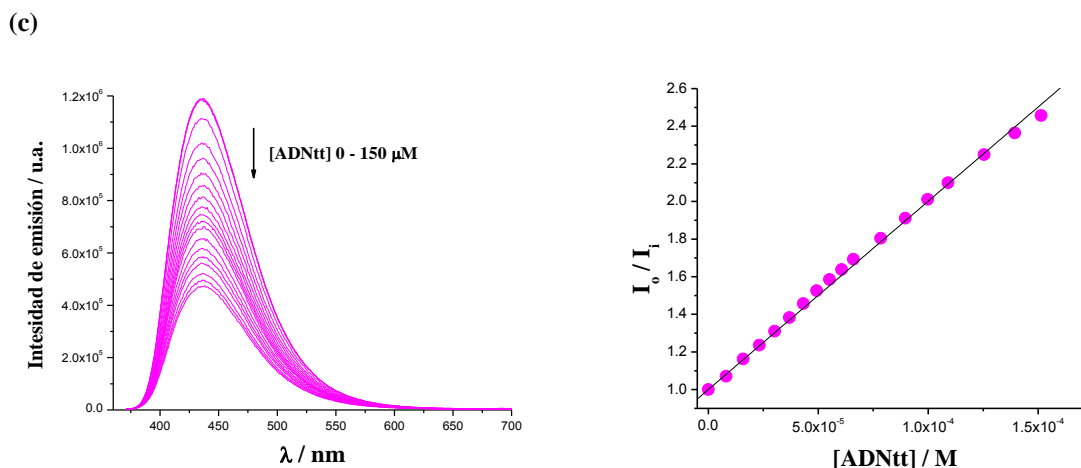


Figura 4.7. Espectros de emisión de fluorescencia de 2,9-diMe- β Cs en presencia de cantidades crecientes de ADNtt (las concentraciones límites se indican en cada gráfico) en soluciones acuosas de *buffer* fosfato a pH 7,4, (a) 2,9-diMe-nHo (35 μ M, λ_{exc} = 388 nm), (b) 2,9-diMe-Ho (25 μ M, λ_{exc} = 380 nm), y (c) 2,9-diMe-Ha (25 μ M, λ_{exc} = 363 nm). la En columna derecha se representa la gráfica de Stern-Volmer correspondiente.

Tabla 4.2. Resumen de parámetros de interacción β C-CH₃⁺ / ADN_{tt}: K_{SV} representa la constante de Stern-Volmer obtenida a partir de los experimentos de fluorescencia en estado estacionario.

Compuesto	K_{SV} / M en pb 10^3		
	pH 4,8	pH 7,4	pH 9,5
2-Me-nHo	0,7 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1
9-Me-nHo	6,3 \pm 0,1	2,7 \pm 0,1	2,6 \pm 0,3
2,9-diMe-nHo	1,74 \pm 0,05	1,78 \pm 0,05	1,71 \pm 0,04
2-Me-Ho	---	2,48 \pm 0,02	---
9-Me-Ho	10,5 \pm 0,2	6,4 \pm 0,7	3,6 \pm 0,4
2,9-diMe-Ho	---	3,67 \pm 0,02	---
2-Me-Ha	---	5,9 \pm 0,3	---
9-Me-Ha	24,7 \pm 0,8	16,8 \pm 0,5	10,0 \pm 0,5
2,9-diMe-Ha	---	9,9 \pm 0,2	---

Por su parte, en las Figuras 4.8 a 4.10 se representan los resultados para los 9-metil derivados obtenidos a partir de los experimentos realizados en las tres condiciones de pH establecidas (4,8, 7,4 y 9,5). Brevemente, los resultados obtenidos para este tipo de derivados permiten hacer las siguientes generalizaciones:

(i) En términos cuali- y cuantitativos, estos compuestos muestran un comportamiento similar al observado para los derivados catiónicos descritos en el párrafo anterior. Típicamente, en las tres condiciones de pH analizadas, los espectros de emisión registrados en presencia de cantidades crecientes de ADNtt muestran una clara desactivación del

estado S₁ de las βCs. Asimismo, en ninguno de los casos se observa cambio alguno en las longitudes de onda máximas de emisión (~450 nm).

(ii) La disminución de la intensidad total de fluorescencia (I_F) como función de la concentración de ADN_{tt} mostró un comportamiento lineal en la gráfica de Stern-Volmer (columna derecha en las Figuras 4.8 a 4.10). Los valores obtenidos de las constantes de Stern-Volmer (K_S) correspondientes se muestran en la Tabla 4.2. Brevemente, se observaron dos tendencias claras: **(a)** para un mismo derivado de βC, los resultados muestran una dependencia de K_{SV} con el pH del medio: a mayor carácter ácido de la solución, mayor es el valor de la constante observada. Esto está de acuerdo con una contribución electrostática a la interacción global. Cabe recordar que, en condiciones de pH 4,8 predomina la especie protonada 9-Me-βCH⁺, mientras que, en condiciones alcalinas, es la forma neutra 9-Me-βCN la especie predominante en solución. Consecuentemente, las fuerzas de atracción electrostáticas entre la molécula de ADN cargada negativamente, con la molécula protonada de βC (con carga neta positiva) se hace más relevante en condiciones ácidas. **(b)** Al igual que lo observado para los derivados sustituidos en N-2, los valores de las constantes muestran la dependencia con la estructura mencionada anteriormente: $K^{(9\text{-Me-Ha})} > K^{(9\text{-Me-Ho})} \geq K^{(9\text{-Me-nHo})}$.

(iii) Un aspecto cualitativo relevante que vale la pena marcar es que, a diferencia de lo observado en para ASB, la interacción entre 9-Me-βCs con el ADN no da lugar a la formación de nuevas especies emisoras. Es decir, en todas las condiciones de pH la molécula de βC, o al menos el anillo piridínico, censa un entorno polar prótico. Esto se pone de manifiesto con la presencia de la especie protonada ¹[nHoH⁺]* como especie emisora dominante aún en condiciones de pH alcalino (ver Capítulo 1, propiedades ácido-base del estado S₁ de βCs).

En este punto es importante tener en cuenta los resultados de González *at et*, [2] donde se demuestra la ausencia de transferencia de protones entre la nucleobase y la βC excitada. Una intercalación completa de la molécula de βC entre los pares de bases que constituyen el ADN le proporcionaría, sin dudas, un entorno no polar. Este hecho se pondría en evidencia en los espectros de emisión, a través de un aumento en la intensidad de la banda de emisión de la forma neutra, ~380 nm (Capítulo 3). Claramente en presencia de ADN no ocurre lo mismo, y aun a pH 9,5 tiene lugar la protonación del nitrógeno piridinico (N-2) en el estado electrónico excitado, como se ve al aumentar la concentración relativa de ADN_{tt}.

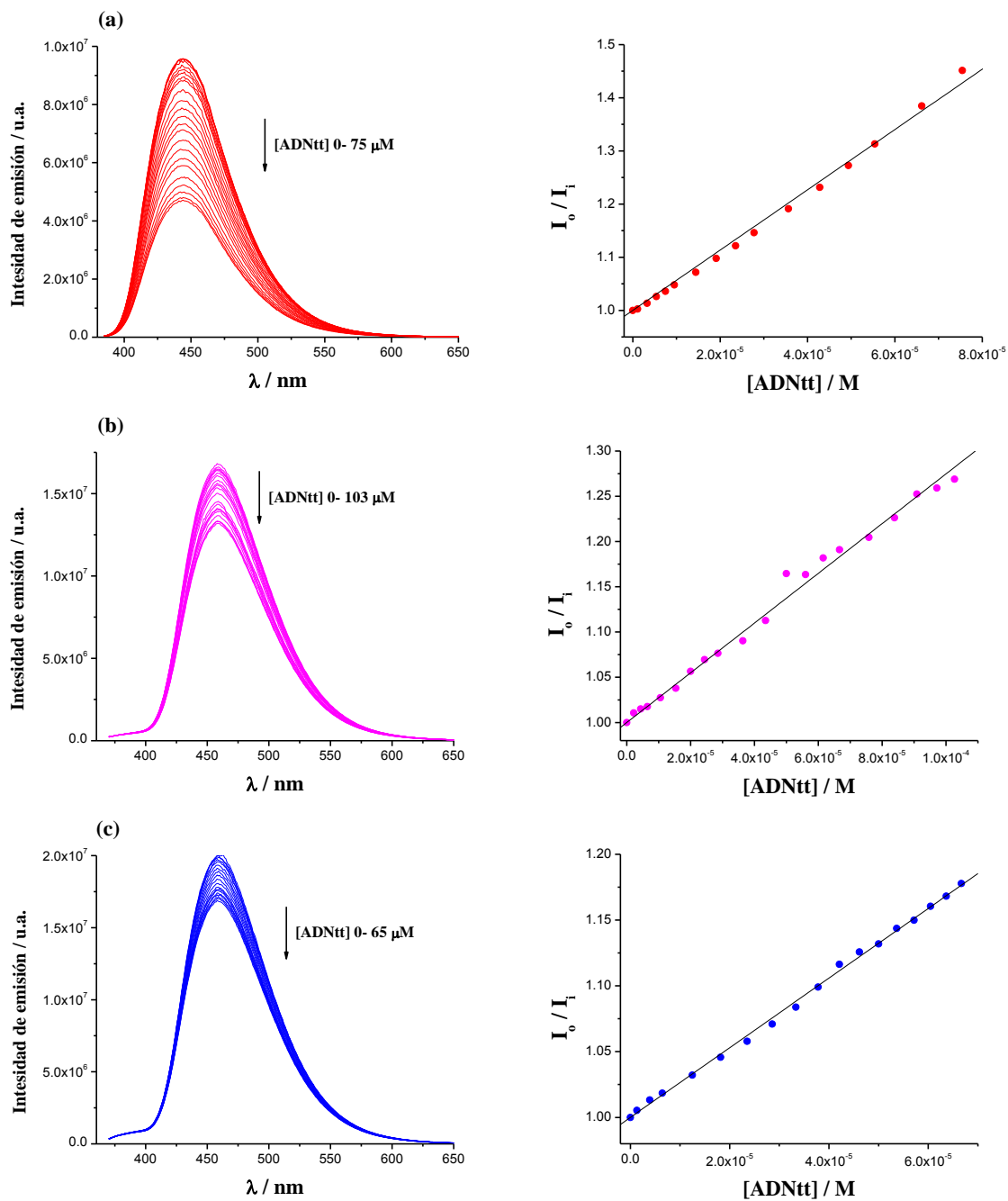


Figura 4.8. Espectros de emisión de fluorescencia de 9-Me-nHo ($20 \mu\text{M}$) en presencia de cantidades crecientes de ADNtt (las concentraciones límites se indican en cada gráfico) en soluciones acuosas de buffers: (a) acetato pH 4,8 ($\lambda_{exc} = 384$ nm), (b) fosfato pH 7,4 ($\lambda_{exc} = 365$ nm), y (c) bórax pH 9,5 ($\lambda_{exc} = 362$ nm). En la columna derecha se representa la gráfica de Stern-Volmer correspondiente.

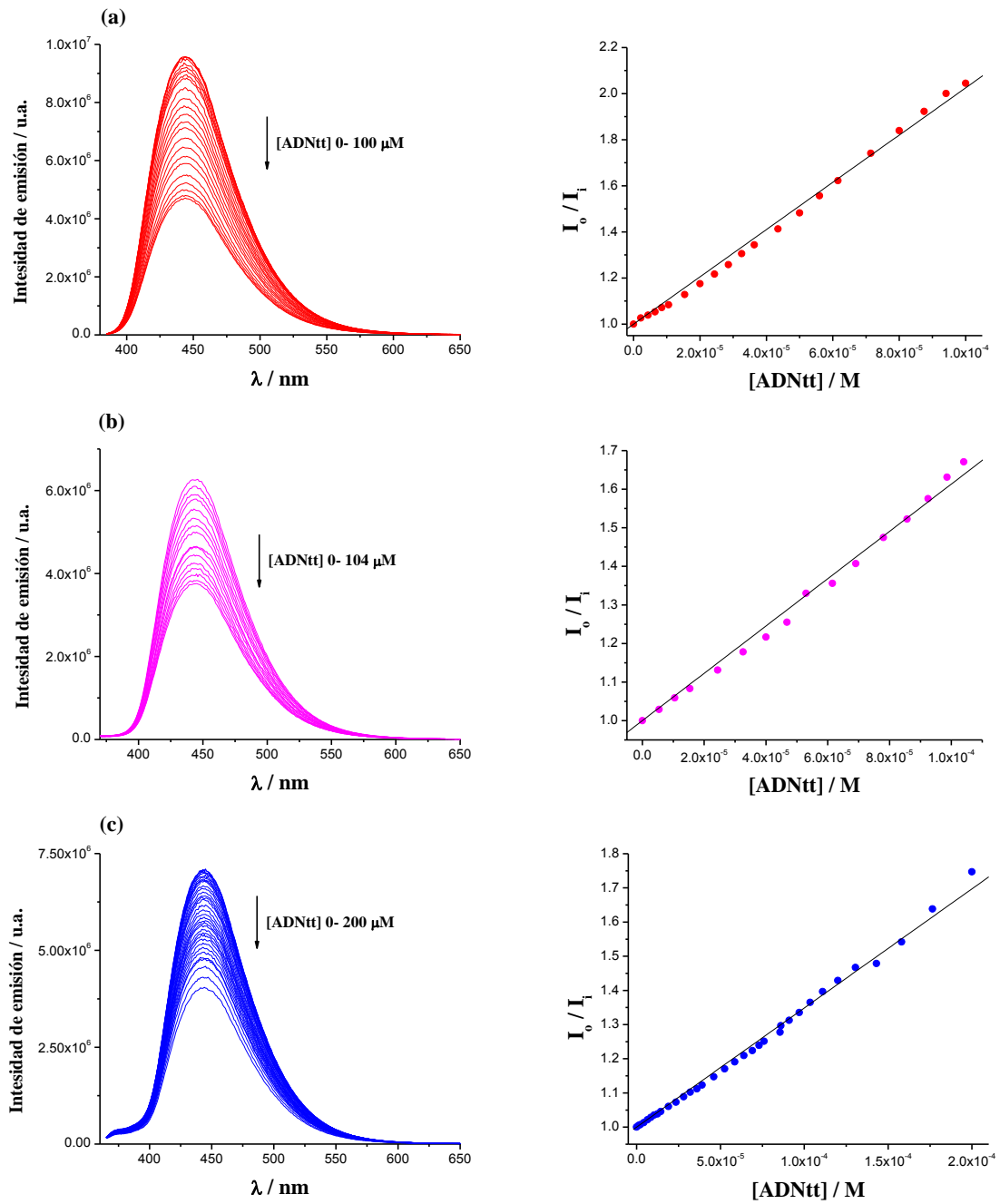
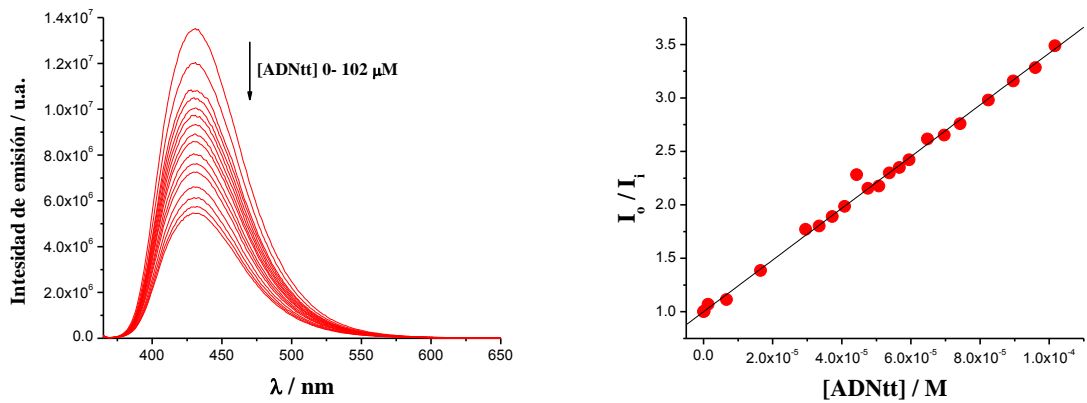
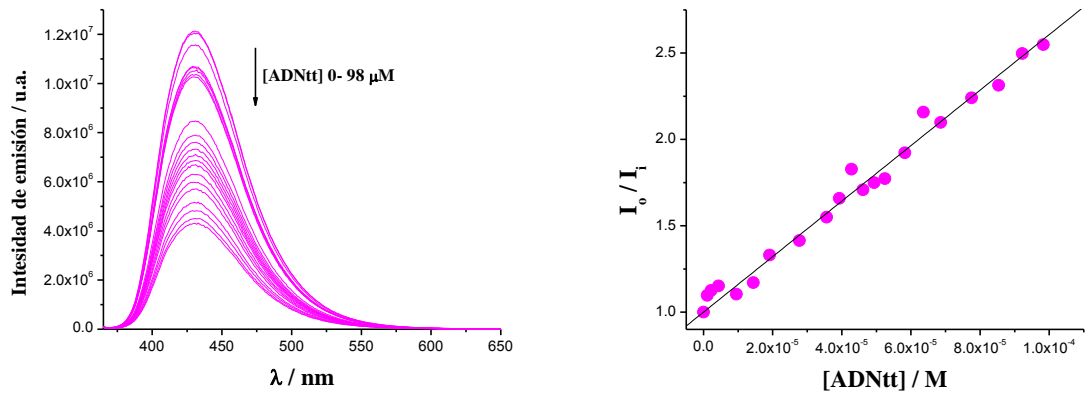


Figura 4.9. Espectros de emisión de fluorescencia de 9-Me-Ho ($20 \mu\text{M}$) en presencia de cantidades crecientes de ADNtt (las concentraciones límites se indican en cada gráfico) en soluciones acuosas de buffers: **(a)** acetato pH 4,8 ($\lambda_{exc} = 377$ nm), **(b)** fosfato pH 7,4 ($\lambda_{exc} = 365$ nm), y **(c)** bórax pH 9,5 ($\lambda_{exc} = 360$ nm). En la columna derecha se representa la gráfica de Stern-Volmer correspondiente.

(a)



(b)



(c)

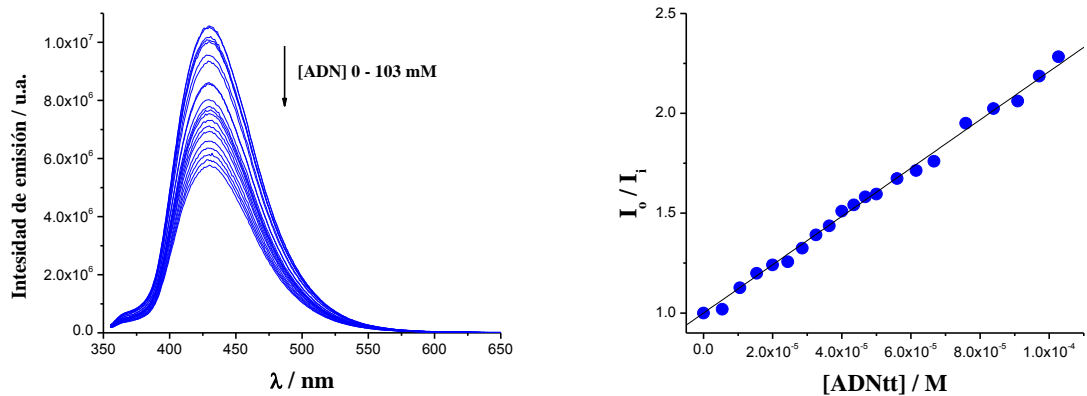


Figura 4.10. Espectros de emisión de fluorescencia de 9-Me-Ha (20 μ M) en presencia de cantidades crecientes de ADNtt (las concentraciones límites se indican en cada gráfico) en soluciones acuosas de *buffers*: (a) acetato pH 4,8, (b) fosfato pH 7,4, y (c) bórax pH 9,5. En la columna derecha se representa la gráfica de Stern-Volmer correspondiente.

4.2.1.2. Estudio de interacción entre 9-metil β Cs y ADNtt: análisis mediante espectroscopía de absorción UV-visible

Motivados por las observaciones descritas en el Capítulo 3, donde la interacción de la especie neutra en entornos polares fue fácilmente evidenciada a través del análisis espectroscópico de las mezclas de reacción, se resolvió estudiar la interacción de las 9-Me- β Cs con ADNtt mediante la técnica de espectrofotometría de absorción UV-visible. Brevemente, se registraron los espectros de absorción UV-visible de estos alcaloides en presencia de cantidades crecientes de ADNtt (Figuras 4.11 a 4.13). Asimismo se determinaron las constantes de asociación (K_G) correspondientes, mediante el empleo de la ecuación Benesi-Hildebrand (columna derecha en Figuras 4.11. a 4.13). Aunque las mismas se obtuvieron con márgenes de error altos, los valores promedios obtenidos a diferentes longitudes de ondas se presentan en la Tabla 4.3, donde con fines comparativos se incluyen, además, los valores de K_{SV} obtenidos en los ensayos de desactivación de fluorescencia en estado estacionario.

A modo de resumen, se pueden realizar las siguientes observaciones generales:

- (i) En todos los casos se confirmó la hipótesis formulada en la sección anterior, ya que los compuestos investigados, en sus estados electrónicos fundamentales S_0 , interactúan con ADNtt.
- (ii) Las Figuras 4.11 a 4.13 muestran que la unión de ADNtt a las β Cs no producen un cambio significativo en los espectros de absorción UV-visible. Asimismo se observa a toda condición de pH, que la banda de menor energía correspondiente, sufre un corrimiento batocrómico al aumentar la concentración relativa de ADNtt. Eso indicaría que la unión posee una importante contribución de interacciones tipo surcos de ADNtt y β Cs. Este hecho está de acuerdo con los resultados descritos en literatura por Taira *et al.*, [14] González *et al.*, [2,15,16] etc.
- (iii) En ninguno de los casos estudiados, se observó el incremento o aparición de la banda de absorción típica de la especie neutra de las β Cs, incluso en condiciones alcalinas (pH 9,5). Esto confirma, una vez más, que las moléculas de 9-Me- β Cs, o al menos el anillo piridínico de las mismas, no se intercala entre los pares de bases del ADN. Dicha intercalación le brindaría a la molécula un entorno hidrofóbico (no polar) donde solo la especie neutra de estos alcaloides podrá localizarse.

(iv) Desde el punto de vista cuantitativo, los valores observados para las constantes de asociación calculados a partir del método de Benesi-Hildebrand permitieron confirmar el mismo patrón observado para los valores de K_{SV} . Es decir, aunque con valores ligeramente inferiores (pero del mismo orden de magnitud), se observó nuevamente: **(a)** la dependencia de K_G con el pH del medio: a mayor carácter ácido de la solución, mayor es el valor de la constante observada, confirmando la contribución electrostática a la interacción global y **(b)** la dependencia de K_G con la estructura química del compuesto estudiado: $K^{(9\text{-Me-Ha})} > K^{(9\text{-Me-Ho})} > K^{(9\text{-Me-nHo})}$.

Tabla 4.3. Resumen de las constantes de interacción 9-Me-βCs / ADNtt. K_G representa la constante de unión según la ecuación Benesi-Hildebrand. Con fines comparativos, se incluyen en esta misma tabla los valores de K_{SV} representados en la Tabla 4.2 obtenidos a partir de los experimentos de fluorescencia en estado estacionario.

Compuesto	$K_G / M \text{ en pb}^{-1} 10^3$			$K_{SV} / M \text{ en pb } 10^3$		
	pH 4,8	pH 7,4	pH 9,5	pH 4,8	pH 7,4	pH 9,5
9-Me-nHo	2,4 ± 0,2	1,1 ± 0,4	0,6 ± 0,2	6,3 ± 0,1	2,7 ± 0,1	2,6 ± 0,3
9-Me-Ho	2,0 ± 0,3	1,9 ± 0,5	2,6 ± 0,3	10,5 ± 0,2	6,4 ± 0,7	3,6 ± 0,4
9-Me-Ha	8,3 ± 0,2	6,6 ± 0,5	0,8 ± 0,5	24,7 ± 0,8	16,8 ± 0,5	10,0 ± 0,5

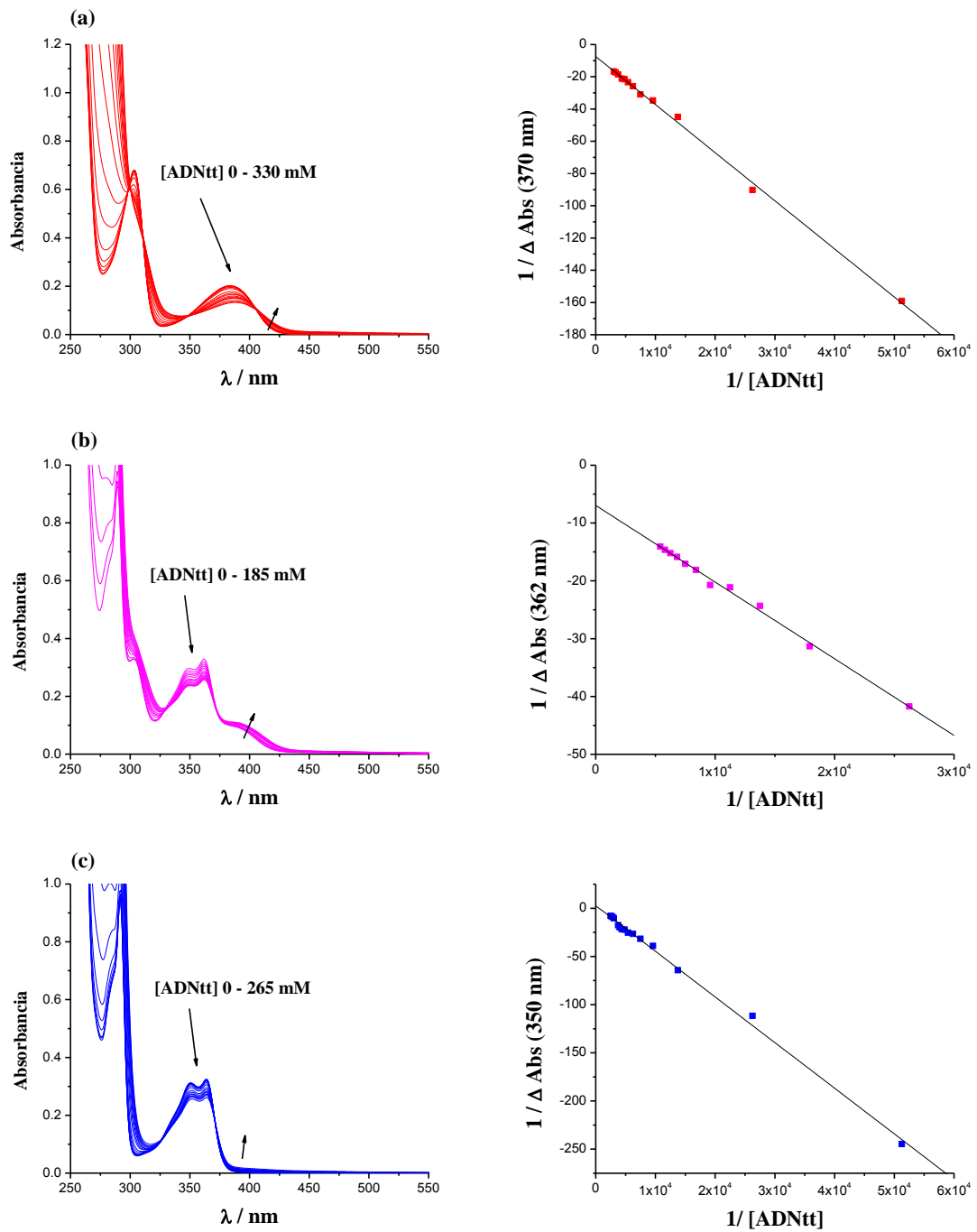


Figura 4.11. Espectros de absorción UV-visible de 9-Me-nHo ($40 \mu\text{M}$) en presencia de cantidades crecientes de ADNtt (las concentraciones límites se indican en cada gráfico) en soluciones acuosas de *buffers*: (a) acetato pH 4,8, (b) fosfato pH 7,4 y (c) bórax pH 9,5. En la columna derecha se representa la grafica de Benesi-Hildebrand obtenida una longitud de onda representativa.

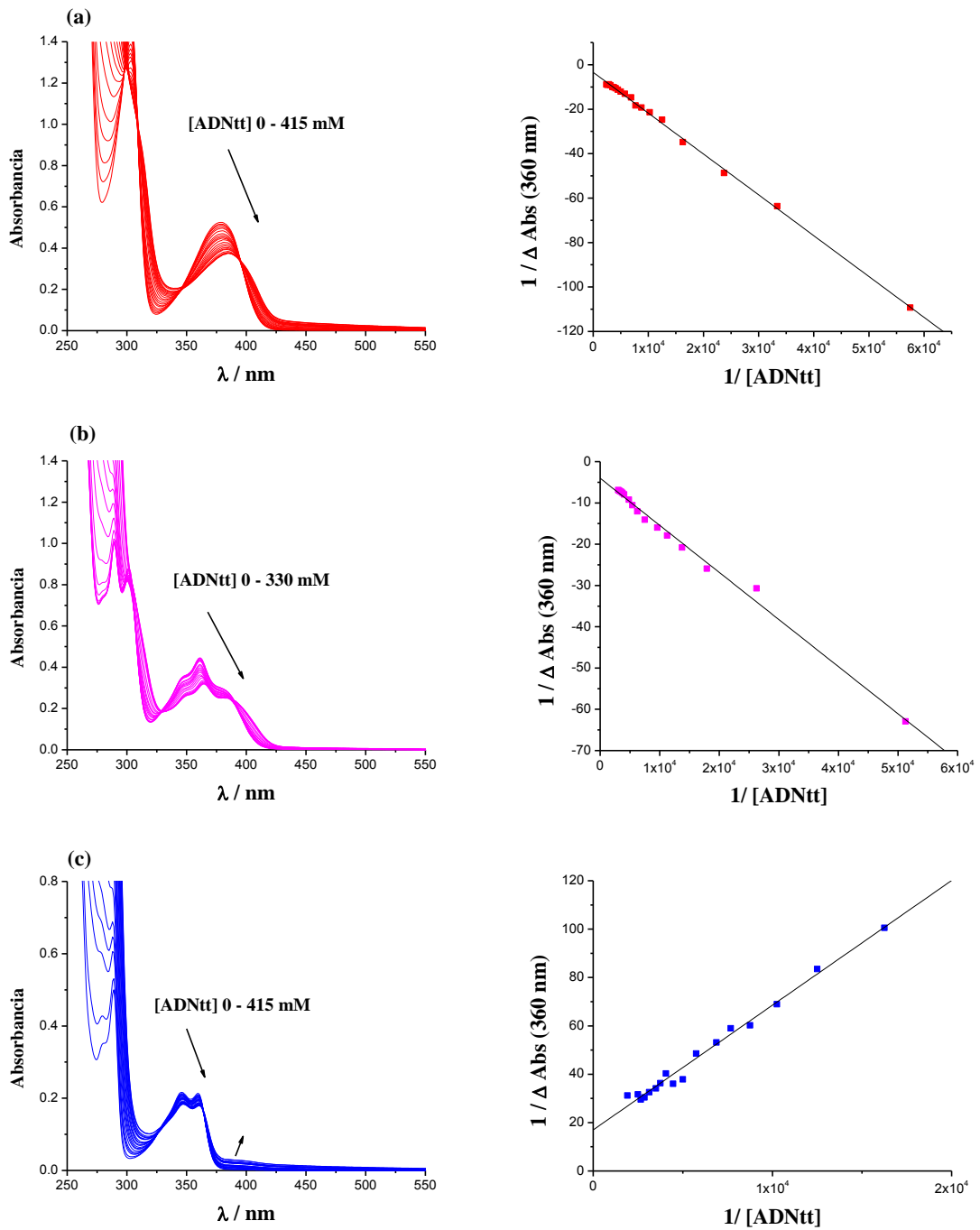


Figura 4.12. Espectros de absorción UV-visible de 9-Me-Ho (105 μM para (a) y (b), y 50 μM para (c)) en presencia de cantidades crecientes de ADNtt (las concentraciones límites se indican en cada gráfico) en soluciones acuosas de *buffers*: (a) acetato pH 4,8, (b) fosfato pH 7,4 y (c) bórax pH 9,5. En la columna derecha se representa la grafica de Benesi-Hildebrand obtenida una longitud de onda representativa.

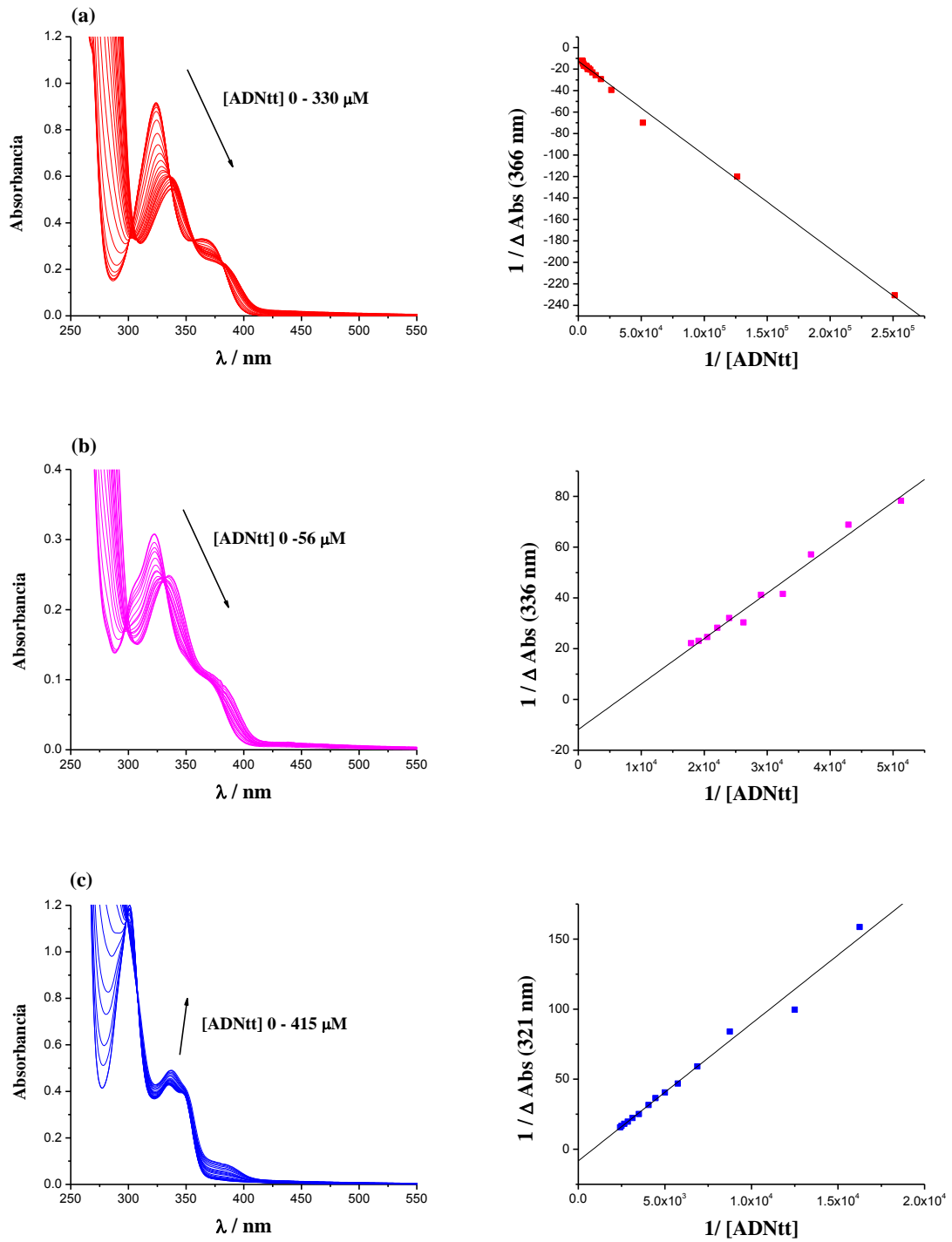


Figura 4.13. Espectros de absorción UV-visible de 9-Me-Ha (45 μ M, 30 μ M, y 80 μ M, (a), (b) y (c) respectivamente) en presencia de cantidades crecientes de ADNtt (las concentraciones límites se indican en cada gráfico) en soluciones acuosas de *buffers*: (a) acetato pH 4,8, (b) fosfato pH 7,4 y (c) bórax pH 9,5. En columna derecha se representa la grafica de Benesi-Hildebrand obtenida una longitud de onda representativa.

4.2.1.3. *Estudio de interacción entre 2-metil β Cs y ADNtt: análisis mediante técnicas de emisión fluorescente resueltas en el tiempo.*

Tal como se describió en el Capítulo 1, en trabajos previos realizados por el grupo de investigación donde se llevó adelante esta Tesis se demostró que las β Cs y los 9-metil derivados interaccionan con ADN a través de mecanismos mayormente (o puramente) estáticos. En este contexto, es de esperar que los derivados catiónicos (2-Me- β Cs y 2,9-diMe- β Cs) también muestren el mismo comportamiento, más aún cuando son moléculas que presentan una carga neta positiva en sus estructuras moleculares. No obstante esto, se resolvió extender los estudios de interacción analizados por métodos dinámicos para este tipo particular de N-metil derivados catiónicos.

Las Figuras 4.14 y 4.15 muestran los decaimientos registrados para los 2-metil y los 2,9-dimetil derivados, respectivamente. En la columna de la derecha se representan, además, las correspondientes gráficas de Stern-Volmer. Tal como era de esperar, en todos los casos estudiados, la contribución estática a la desactivación total es claramente la más relevante. Esto se pone de manifiesto con los valores extremadamente bajos o nulos observados para la constante de desactivación dinámica K_D (Tabla 4.4).

Estos resultados dan valor a las suposiciones realizadas en la sección anterior en cuanto a considerar la constante de K_{SV} como representativa y/o indicativa de la magnitud de la constante de asociación en el estado S_0 . Consecuentemente, validan las conclusiones parciales allí obtenidas.

Tabla 4.4. Resumen de parámetros de interacción β C-CH₃⁺ / ADNtt: K_D representa la constante dinámica. Con fines comparativos, se incluyen en esta misma tabla los valores de K_{SV} representados en la Tabla 4.2 obtenidos a partir de los experimentos de fluorescencia en estado estacionario.

Compuesto	$K_{SV} / M \text{ pb } 10^3$	$K_D / M \text{ pb } 10^3$
	pH 7,4	pH 7,4
2-Me-nHo	0,6 ± 0,1	0
2,9-diMe-nHo	1,78 ± 0,05	0,04
2-Me-Ho	2,48 ± 0,02	0,19
2,9-diMe-Ho	3,67 ± 0,02	0,05
2-Me-Ha	5,9 ± 0,3	0,14
2,9-diMe-Ha	9,9 ± 0,2	0,07

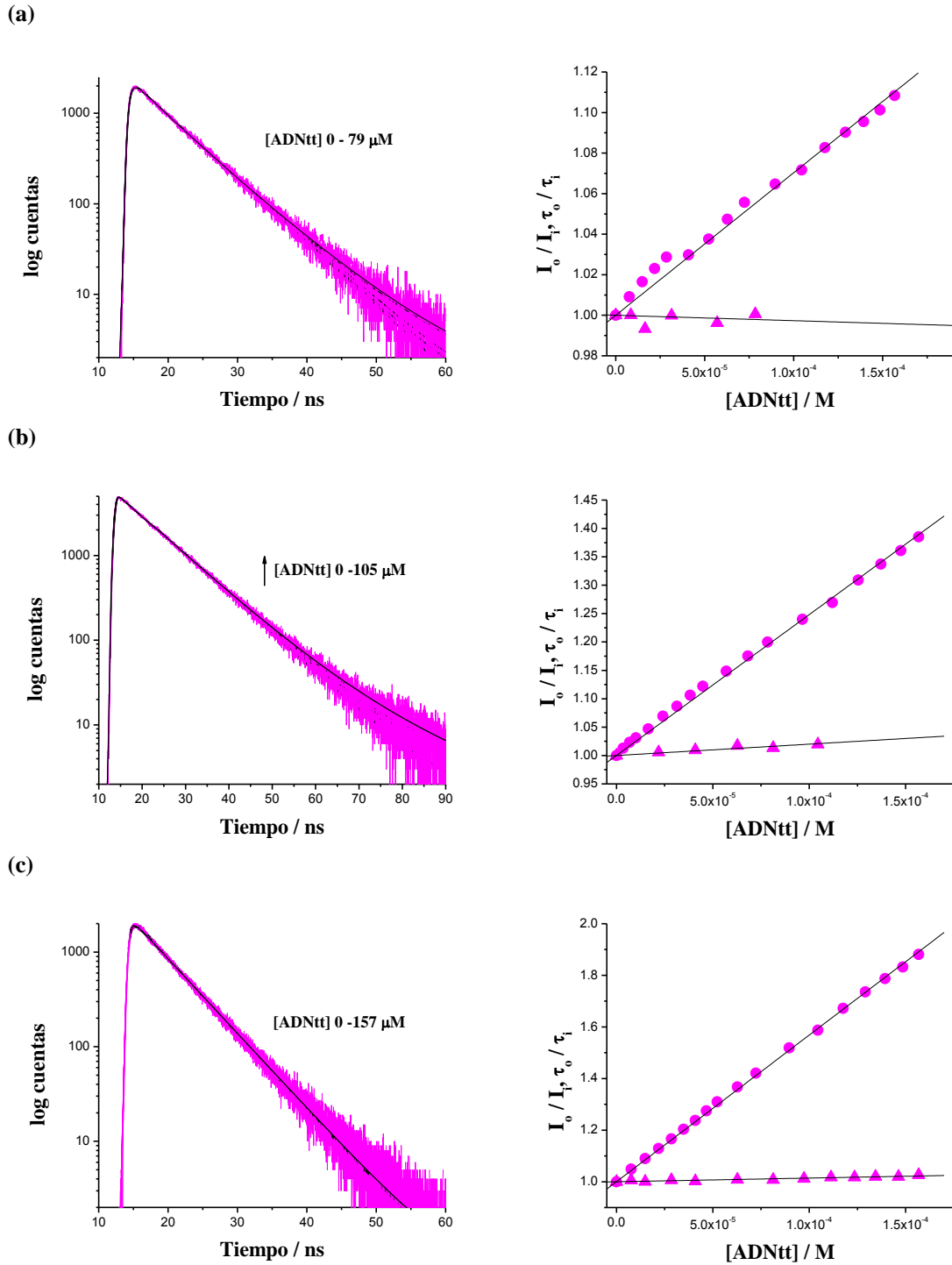


Figura 4.14. Decaimientos de la emisión fluorescente y sus respectivos ajustes mono-exponenciales registrados para 2-Me- β Cs (30 μ M, en *buffer* fosfato pH 7,4) en presencia de cantidades crecientes de ADNtt. $\lambda_{exc} = 341$ nm. En todos los casos, las concentraciones límites de ADNtt (μ Mpb) se indican en cada gráfico. (a) 2-Me-nHo ($\lambda_{fluo} = 454$ nm), (b) 2-Me-Ho ($\lambda_{fluo} = 440$ nm), y (c) 2-Me-Ha ($\lambda_{fluo} = 422$ nm). *Columna derecha:* Gráficas de Stern-Volmer (τ_F^0/τ_F) vs. $[ADNtt]$ (triángulos) observados en la columna de la izquierda. Con fines comparativos se incluye la representación de Stern-Volmer obtenida a partir de los datos estacionarios (I_0/I_1 vs. $[ADNtt]$, círculos).

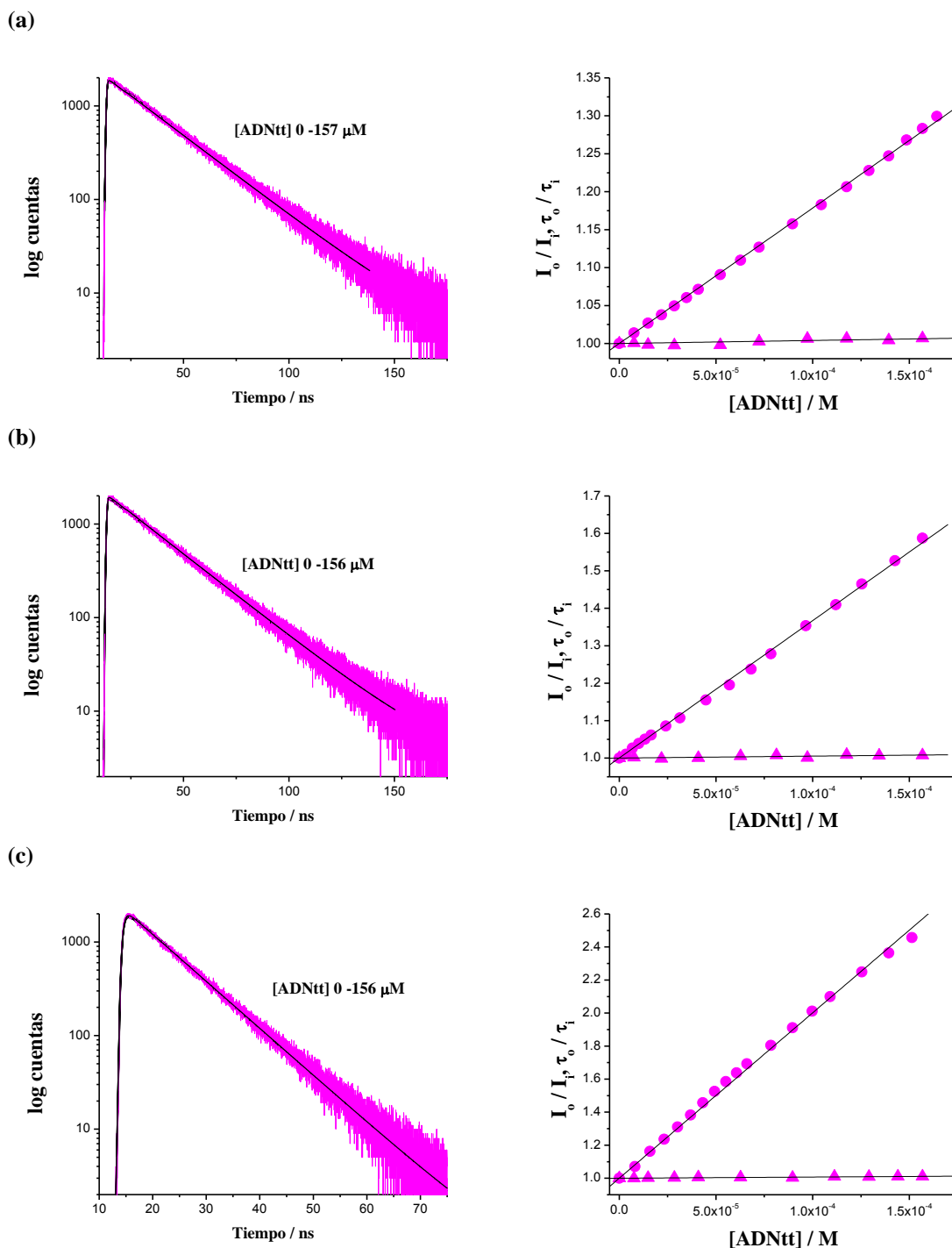
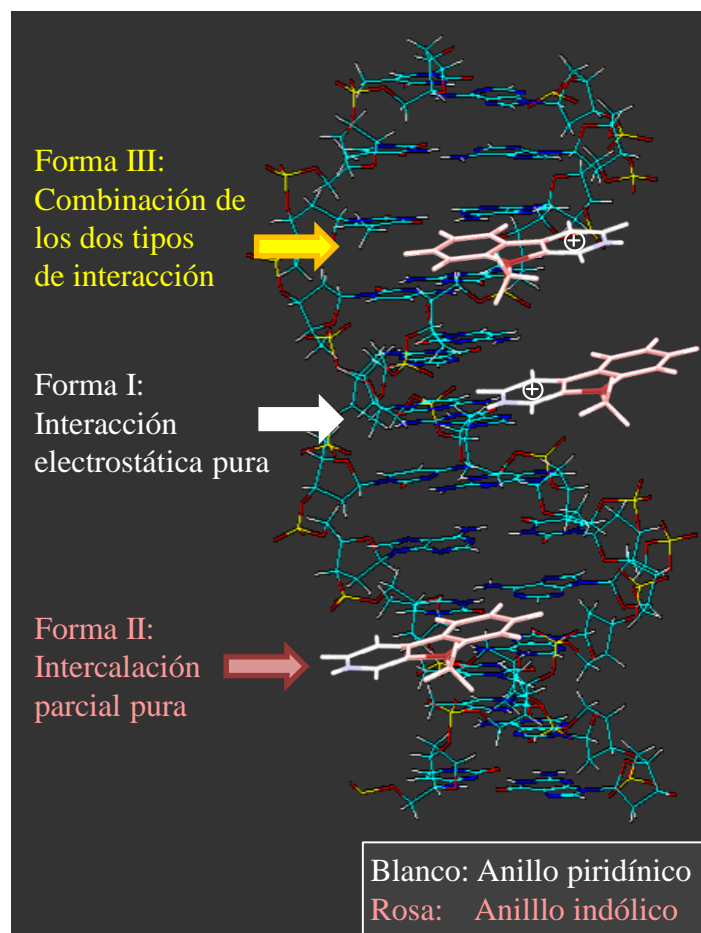


Figura 4.15. Decaimientos de la emisión fluorescente y sus respectivos ajustes mono-exponenciales registrados para 2,9-diMe- β Cs (30 μ M, en *buffer* fosfato pH 7,4) en presencia de cantidades crecientes de ADNtt. $\lambda_{exc} = 341$ nm. En todos los casos, las concentraciones límites de ADNtt (μ Mpb) se indican en cada gráfico. **(a)** 2,9-diMe-nHo ($\lambda_{fluo} = 462$ nm), **(b)** 2,9-diMe-Ho ($\lambda_{fluo} = 450$ nm) y **(c)** 2,9-diMe-Ha ($\lambda_{fluo} = 430$ nm). *Columna derecha:* Gráficas de Stern-Volmer (τ_F^0/τ_F) vs. [ADNtt] (triángulos) observados en la columna de la izquierda. Con fines comparativos se incluye la representación de Stern-Volmer obtenida a partir de los datos estacionarios (I_0/I vs. [ADNtt], círculos).

4.2.1.4. Modelo propuesto para la interacción entre β Cs y ADN

Se han propuesto modelos de unión de derivados en el N-9 de β Cs [18,19] actuando como intercalantes, y con contribución electrostática a la unión.[16,19] *Paul et al.* han señalado que aunque el modo de interacción del Ho (harmano) con el ADN es principalmente por intercalación, la interacción electrostática de la especie protonada y el ADN también debe tenerse en cuenta.[19] A favor de este modelo, se ha demostrado que el nHo forma un complejo estable cuando interactúan de forma aislada con la 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato,[20] observándose una clara contribución de apilamiento- π (π -stacking) entre el alcaloide y la base nitrogenada (adenina), como también interacciones tipo culómbicas, donde el grupo fosfato del nucleótido juega un papel clave en la orientación relativa de las dos moléculas. Sin embargo, nuestros datos revelan, por un lado, que la intercalación no puede ser completa y, por otro lado, que la contribución electrostática es altamente significativa.

A partir de la información espectroscópica obtenida en las secciones precedentes y, en base a las características fotofísicas de estos alcaloides descritas en el Capítulo 2, se puede proponer el siguiente modelo para las múltiples interacciones que pueden tener lugar en el sistema N-Me- β Cs / ADN. Esta propuesta se base en la posibilidad de formación de tres tipos diferentes de complejos, cada uno de ellos formado como consecuencia de: **(i)** la interacción electrostática pura entre el anillo piridínico protonado (o metilado, en el caso de los derivados catiónicos) y los grupos fosfato del ADN (Forma I en el Esquema 4.4), **(ii)** una intercalación parcial de las especies neutras de β Cs, que implican exclusivamente el anillo indólico, ver el esqueleto de color rosa en el esquema (Forma II), y/o **(iii)** una combinación de ambos tipos de interacciones (Forma III).



Esquema 4.4. Modelo propuesto para los diferentes tipos de interacción posibles entre β Cs (y sus N-metil derivados) con el ADN de doble cadena.

4.2.2. Daño al ADN fotosensibilizado por N-Me- β Cs

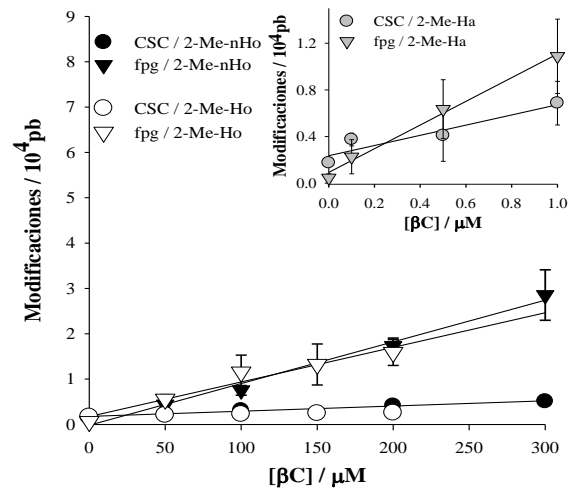
La dependencia con la concentración del daño fotoinducido del ADN por las β Cs se estudió utilizando ADN superenrollado del bacteriófago PM2. Este ADN PM2 se expuso a irradiación UVA (365 ± 20 nm, lámpara *Philips HPW 125 W*, ver sección 4.4.6.) en presencia de diferentes concentraciones de N-Me- β Cs: 2-Me-nHo, 2-Me-Ho, 2-Me-Ha, 9-Me-nHo, 9-Me-Ho, 9-Me-Ha, 2,9-diMe-nHo, 2,9-diMe-Ho y 2,9-diMe-Ha. En las condiciones de irradiación de trabajo, todas las β Cs estudiadas presentan una marcada absorción (Capítulo 2). Posteriormente, se cuantificó el número de cortes de simple cadena (CSC) y las modificaciones (o sitios) sensibles a la endonucleasa (MSE) de reparación fpg-glicosilasa (fpg), la cual reconoce 8-oxoGua y algunas otras modificaciones de purina oxidadas generadas como FapyAde y FapyGua, y también sitios AP.

La Figura 4.16 muestra que el número de modificaciones reconocidas por la enzima fpg aumenta casi linealmente en función de la concentración empleada de los derivados N-Me- β Cs. Los CSC se generaron con rendimientos mucho más bajos que las modificaciones

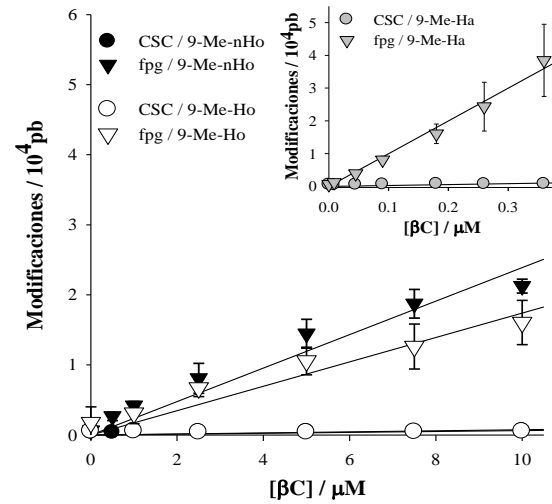
sensibles a fpg ($< 0,07$ por cada 10^4 pares de bases (pb)) en todas las concentraciones ensayadas. Los experimentos controles no mostraron daño alguno sobre la molécula de ADN. En particular, se realizaron dos controles diferentes para cada ensayo: *(i)* un control de irradiación en ausencia de N-Me- β Cs (datos obtenidos en condiciones de $[\text{N-Me-}\beta\text{Cs}] = 0 \mu\text{M}$) y *(ii)* un control en oscuridad, donde se incubó el ADN en presencia de cada N-Me- β C (a la máxima concentración empleada en cada experimento de daño), en ausencia de luz y durante el mismo tiempo del ensayo. Consecuentemente, los resultados representados en la Figura 4.16 indican que el daño observado es iniciado por los derivados fotoexcitados de las N-Me- β Cs.

Cabe destacar que, en el caso de los N-metil derivados de harmina (N-Me-Ha), el intervalo de concentración necesario para inducir un daño comparable al generado por los demás derivados investigados (N-Me-nHo y N-Me-Ho) fue un orden de magnitud inferior. Este resultado sugiere que el anillo estructural de harmina le confiere a sus derivados una elevada capacidad de fotosensibilizadora. En un análisis inicial, estos resultados siguen la misma tendencia que otro tipo de propiedades que muestran los derivados de harmina: mayores constantes de afinidad con el ADN y mayor eficiencia o rendimientos cuánticos de formación de tripletes (Φ_T) y, consecuentemente, mayores eficiencias de producción de oxígeno singlete (Φ_Δ) (Tablas 4.2 – 4.4 y 2.6, respectivamente).

(a)



(b)



(c)

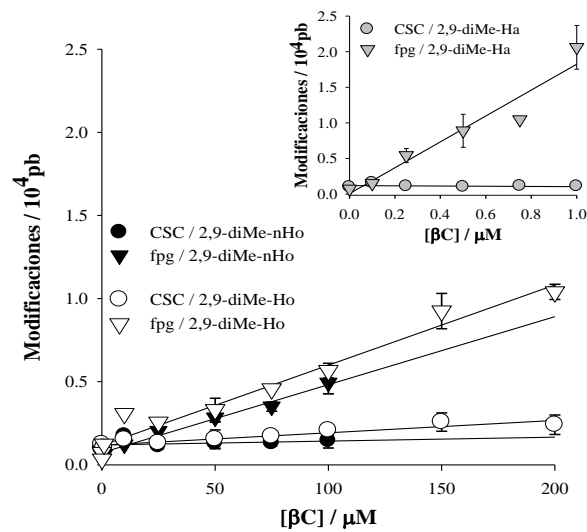


Figura 4.16. CSC y modificaciones sensibles a la proteína de fpg inducidos en el ADN PM2 por la exposición a luz UVA (365 ± 20 nm, durante 20 min, en soluciones de *buffer* fosfato pH 7,4) en presencia de diferentes concentraciones de: (a) 2-Me- β Cs, (b) 9-Me- β Cs y (c) 2,9-diMe- β Cs. Los datos son el promedio de 5 experimentos independientes (\pm DE).

Por otra parte, se analizó el perfil (o espectro) de daño al ADN PM2 inducido por las N-Me- β Cs (Figura 4.17). Concretamente, las muestras de ADN irradiadas en presencia de los fotosensibilizadores fueron luego sometidas al tratamiento con diferentes enzimas de tipo endonucleasa, cada una de ellas sensibles a grupos específicos de modificaciones o alteraciones del ADN. Específicamente se usaron las enzimas formamido pirimidina-ADN glicosilasa (fpg), endonucleasa IV, T4 endonucleasa V, endonucleasa III y tratamientos mezclando diferentes enzimas con el propósito de identificar los fotoproductos generados, dado que ciertas enzimas muestran reconocimiento cruzado (sección 4.4.6.1.2).

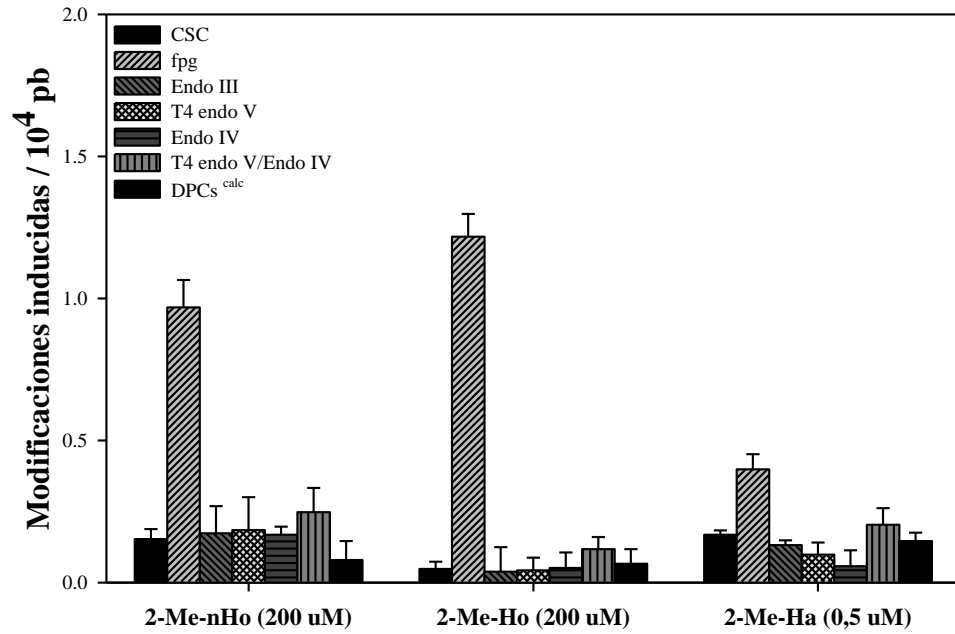
El análisis cuantitativo de estos resultados muestra perfiles muy característicos y fuertemente dependientes de la naturaleza del fotosensibilizador usado:

(i) Por un lado, es evidente que todos los compuestos investigados inducen, predominantemente, modificaciones de las bases purínicas pero muy pocos sitios de oxidación a pirimidinas (es decir, sitios sensibles a la endonucleasa III), DPCs y CSC.

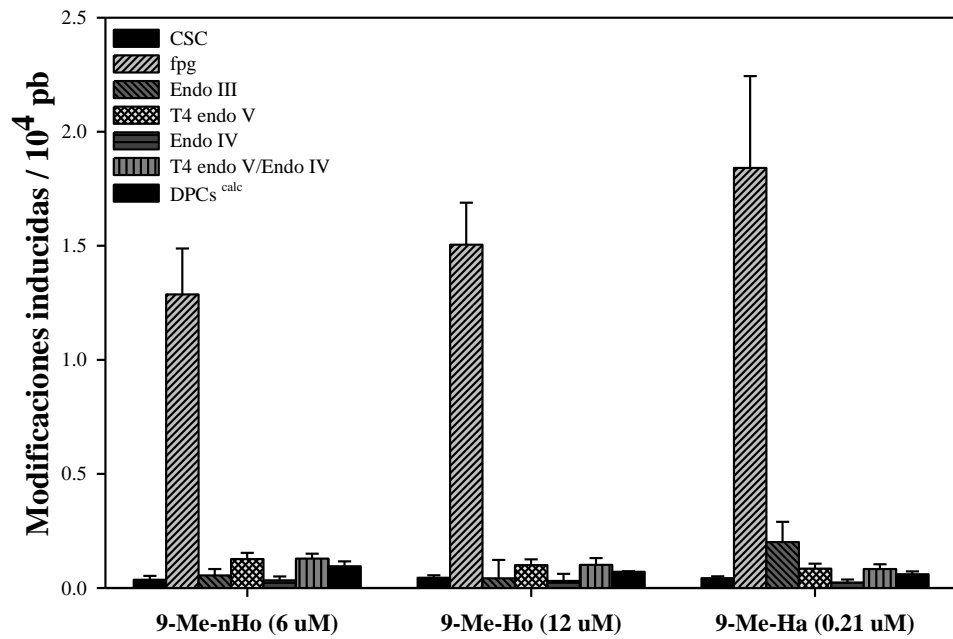
(ii) Por otra parte, solo el derivado N-2 metilado de harmina mostró un perfil de daño menos específico, dando lugar a la formación en cantidades relativamente importantes de otros tipos de modificaciones, tales como oxidaciones en las bases pirimidínicas, generación de sitios con pérdida de bases (sitios AP, identificados por endonucleasa IV) y, también, generación evidente de DPCs. Este último punto se pone en evidencia por la presencia de sitios sensibles a la T4 endonucleasa V, pero no a endonucleasa IV. Es decir, el número de sitios detectados por las actividades combinadas de las dos enzimas es mayor que el número de sitios de pérdida de base detectado solo por endonucleasa IV.

Como se mencionó anteriormente, los DPCs son generados por la excitación directa del ADN (mayoritariamente en el rango UVB y UVC del espectro), pero también se pueden formar por transferencia de energía entre el estado triplete del fotosensibilizador y el estado triplete de la timina. En este sentido, si bien en este trabajo de Tesis no se determinó de manera directa la energía del estado electrónicamente excitado triplete de los 2-metil derivados, sabemos que desde el punto de vista espectroscópico, la metilación en la posición N-2 no induce modificaciones severas en la distribución electrónica de las β Cs. Teniendo en mente que Ha sí posee la energía de triplete requerida para que el proceso de formación de DPCs tenga lugar, es esperable que su 2-metil derivado también cumpla con dicha condición. Este punto en particular, ciertamente, merece ser investigado en profundidad.

(a)



(b)



(c)

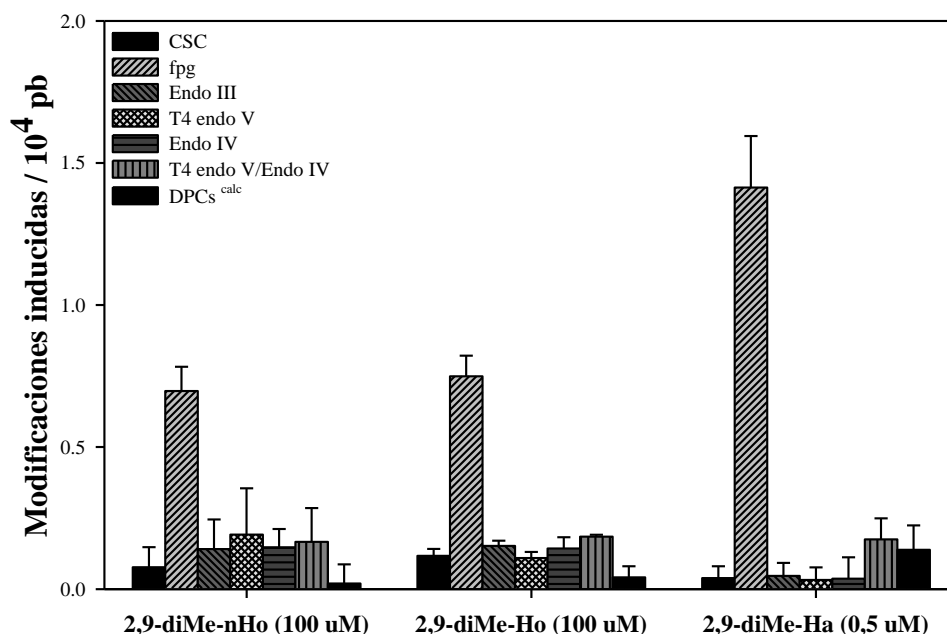


Figura 4.17. Perfiles de daño al ADN mostrando CSC y varias modificaciones (o sitios) sensibles a endonucleasas (MSE) inducidas en el plasmídico PM2 por: (a) 2-Me- β Cs, (b) 9-Me- β Cs y (c) 2,9-diMe- β Cs. Los datos son el promedio de 3 experimentos independientes (\pm DE). Condiciones de irradiación: UVA (365 ± 20 nm), durante 20 min, en soluciones de *buffer* fosfato pH 7,4.

4.3. Resumen y conclusiones

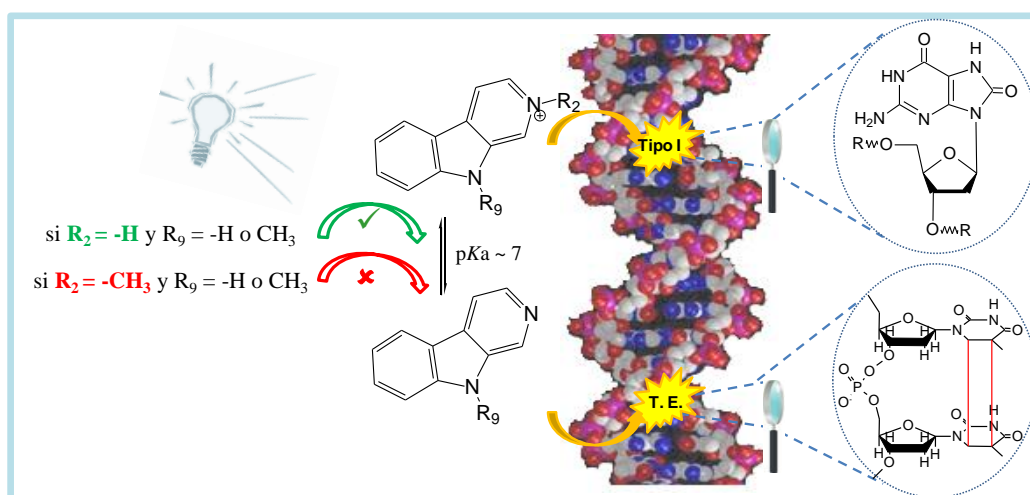
En este capítulo se presentó en un análisis comparativo la capacidad de diferentes *N*-Me- β Cs para inducir daño en la molécula de ADN, en presencia de luz UVA. Se realizó estudio cualitativo y cuantitativo detallado de la interacción de estos alcaloides con la biomolécula, conjuntamente con el análisis cinético y se caracterizaron los fotoproductos formados.

Se demostró que la interacción entre el ADN y las β Cs depende fuertemente de la carga neta de la molécula que, en aquellos derivados que no presentan sustitución en la posición N-2, esta carga neta estará regulada por el pH. Las formas protonadas (βCH^+) de estos alcaloides mostraron una unión no covalente mayor con el ADN que las formas neutras (βCN). Este hecho sugiere que la interacción global de estos alcaloides con el ADN presenta una fuerte contribución electrostática, sumada a la intercalación propia del anillo pirido-indólico. A su vez, cuanto mayor es el carácter no polar del anillo β -carbolínico (dado por el mayor grado de sustitución alquímica), mayor es la fuerza de interacción, hecho que se traduce en una mayor constante de interacción (K_G o K_{SV}).

En todos los casos se pudo caracterizar el espectro de daño inducido en el ADN

(perfil de fotoproductos formados). Para tal fin se recurrió al uso de diferentes enzimas de restricción sensibles a modificaciones específicas. Los resultados muestran que las N-Me- β Cs generan, principalmente, modificaciones oxidativas en las bases, sitios de pérdidas de bases y CSC. Además de estas modificaciones oxidativas, fueron detectados dímeros de timina sólo en el caso en que se utilizó la 2-Me-Ha como fotosensibilizador.

La relación entre estas lesiones y la capacidad total de daño fue dependiente de la naturaleza química de los alcaloides estudiados. La magnitud del daño observado se correlaciona positivamente con: (i) las diferentes propiedades fotofísicas de las β Cs estudiadas, (ii) las diferencias en las capacidad de interacción-unión de cada β Cs al ADN y (iii) la presencia de vías fotoquímicas adicionales, por ejemplo, foto-oxidaciones de bases y/o formación de dímeros de timidina inducidas selectivamente por el fotosensibilizador. Estos hechos se resumen gráficamente en el Esquema 4.5.



Esquema 4.5. El tipo y magnitud del daño al ADN fotosensibilizado por N-Me- β Cs depende fuertemente tanto de las condiciones del medio (pH) como de la naturaleza química del alcaloide.

4.4. Metodología experimental y análisis de datos

4.4.1. Reactivos generales

(a) β -Carbolinas: norHarmano, harmano y harmina fueron provistas por Sigma-Aldrich, con una pureza superior al 98 %, por lo cual se utilizaron sin posterior purificación. N-metil derivados empleados: 2-Me-nHo, 2-Me-Ho, 2-Me-Ha 9-Me-nHo, 9-Me-Ho, 9-Me-Ha y 2,9-diMe-nHo, 2,9-diMe-Ho y 2,9-diMe-Ha fueron sintetizados y caracterizados para este trabajo de tesis (secciones 2.4.2 y 2.4.3)

(b) ADN: En los estudios de interacción se utilizó el ADN timo de ternera (ADNtt) el cual

fue provisto por Sigma-Aldrich, y disuelto en *buffer* 10mM de Tris y 1 mM de EDTA pH 7.5- 8.0. Para los estudios de fotosensibilización se empleó el ADN del bacteriófago PM2 (aprox. 10^4 pares de bases (pb)) fue preparado acorde a el método de Salditt *et al.*[21]

(c) *Enzimas*: La formamino piridimina-ADN glicosilasa (proteína fpg) fue obtenida de la cepa *E. coli* JM105 que alberga el plásmido pFPG230.[22] Las endonucleasa IV (Endo IV) y T4 endonucleasa V (T4 endo V) fueron parcialmente purificadas a partir de un cepa inducible que las sobre-expresa (*E. coli* cepa A 32480 que lleva el plásmido ptac-denV) proporcionado por L. Mullenders y Leiden. La enzima Endonucleasa III (Endo III) también proveniente de *E. coli* fue gentilmente proporcionada por S. Boiteux, Fontenay aux Roses, Francia. Todas las endonucleasas de reparación fueron probadas por su incisión en modificaciones producidas por un sustrato de referencia (es decir, glicoles de timina inducida por OsO₄, sitiosapurínicos y/o apiridínicos (sitios AP) por pH ácido y dímeros de pirimidinas ciclobutano (DPCs) por irradiación con UVC, $\lambda = 254\text{nm}$) bajo las condiciones de ensayo aplicadas (véase 4.4.6.), para garantizar que las modificaciones del sustrato están plenamente reconocidas y que ninguna incisión se lleva a cabo en modificaciones que no son producidas por el sustrato.[23]

(d) *Otros reactivos utilizados*: Tris, Tris-HCl, ácido bórico, EDTA, glicerol, azul de bromofenol, fosfato monobásico de potasio, acetato de sodio, ácido acético, cloruro de sodio, hidróxido de potasio, glicerina y dodecil sulfato de sodio, Albumina de suero bovino empleada para estabilización de enzimas en solución y bromuro de etidio, todos provistos por Sigma-Aldrich.. Etanol usado para la precipitación de ADN PM2 fue provisto por Merck. Agarosa (Biodynamics).

4.4.2. Preparación de soluciones y metodología de interacción

Las soluciones de β Cs empleadas en los ensayos de interacción fueron preparadas en *buffer* de acetato, fosfato, y bórax. Estas soluciones *buffers* se prepararon tal como se describió en la sección 3.4.2.

4.4.3. Espectroscopía de absorción UV-visible

La fuerza de unión de las 9-metil β Cs al ADNtt fue analizada por titulación espectrofotométrica (absorción UV-visible), utilizando el espectrómetro de doble haz descrito en la sección 2.4.4.2 (*Perkin-Elmer λ 25*).

Las soluciones de β Cs fueron preparadas en *buffer* acetato pH 4,8 (ácido acético–

acetato de sodio), *buffer* fosfato de pH 7,4, y en *buffer* bórax de pH 9,5 (ver Tabla 3.5).

Las celdas, que en principio contenían 1800 μ l de una solución de concentración 20 - 100 μ M de la β C en el *buffer* correspondiente, fueron progresivamente “tituladas” incrementando la cantidad de ADNtt (de 0 hasta 415 μ M en pares de bases, según el caso). Las medidas fueron realizadas en celdas de cuarzo (*QS*) de 1 cm x 1 cm de camino óptico (*Hellma*), a temperatura ambiente.

Los espectros de absorción fueron corregidos utilizando el factor de dilución correspondiente. Las respectivas constantes de asociación (K_G) fueron estimadas mediante el uso de la ecuación de Benesi-Hildebrand (ecuación 3.1), presentada en la sección 3.4.3, adaptada a cada sistema β C / ADN.

4.4.4. Espectroscopía de emisión de fluorescencia

4.4.4.1. Emisión en estado estacionario

Estas medidas fueron realizadas para todos los metil derivados de β C en ambos espectrofluorómetros, presentado en la sección 2.4.4.5 (Equipo I y II). Los espectros de fluorescencia corregidos fueron obtenidos utilizando celdas de cuarzo (*QS*) de 1 cm x 1 cm de camino óptico y 4000 μ l de capacidad (*Hellma*), a temperatura ambiente. Para determinar la desactivación de la fluorescencia de cada β C a causa del ADNtt, los espectros de emisión de cada alcaloide (de concentración 15 – 35 μ M, según el derivado) fueron obtenidos en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de ADNtt (desde 0 hasta 630 μ M en pares de bases, según el caso). Estos experimentos fueron llevados a cabo a pH 4,8, 7,4 y 9,5 para las 9-Me- β Cs, 2-Me-nHo, y 2,9-diMe-nHo utilizando las mismas soluciones *buffers* que en los experimentos de titulación espectrofotométrica. Y a pH 7,4 (*buffer* fosfato) con los restantes derivados catiónicos. La intensidad de fluorescencia (I_F) fue obtenida por integración de los espectros de fluorescencia corregidos sobre el perfil total de emisión.

4.4.4.2. Emisión resuelta en el tiempo

Se utilizó un equipo FL3 TCSPC-SP (*Horiba Jobin Yvon*) descrito en el Capítulo 2 como equipo II (sección 2.4.4.5) y celdas de cuarzo *Hellma* de 1 cm x 1 cm de camino óptico. Las medidas se realizaron a temperatura ambiente. La ventana de tiempo elegida para las medidas fue de 0-200 ns. Los decaimientos fueron detectados a 450 nm. Los

tiempos de vida fueron obtenidos de los decaimientos mono-exponenciales observados luego de la deconvolución de la señal de fondo de la lámpara, para lo que se utilizó el *software* DAS6, provisto por *Horiba Jobin Yvon*. Todos los ajustes realizados con este programa se evaluaron por el criterio del χ^2 (cercano a la unidad) y la inspección visual de los residuos, y autocorrelación del ajuste en función de los datos experimentales.

4.4.5. Análisis de datos

La desactivación de la fluorescencia fue evaluada mediante el análisis de Stern-Volmer presentado en la sección experimental del capítulo 3 (sección 3.4.5).

4.4.6. Estudio in vitro del daño producido al ADN, y la caracterización enzimática de los fotoproductos

El pH de las soluciones acuosas madres de N-Me-βCs empleadas en la posterior preparación de las mezclas de irradiación se ajustaron mediante la adición de gotas de soluciones acuosas de HCl (concentración entre 0,1 M a 2,0 M) con una micropipeta. La concentración de las mismas fue determinada por espectrofotometría de absorción.

4.4.6.1. Caracterización de fotoproductos

4.4.6.1.1. Sistema de irradiación

Soluciones de N-Me-βCs (previamente cuantificadas por espectrofotometría de absorción, a pH ácido) y ADN PM2 (10 μg/ml) en *buffer* fosfato (10 mM KH₂PO₄, 50 mM NaCl, pH 7,4) fueron irradiadas, durante 20 minutos en placas de 96 pocillos en baño de agua hielo, utilizando una lámpara *Philips HPW 125W* de emisión centrada en 365 nm (ancho de banda ± 20 nm) a una distancia de 10 cm. En todos los ensayos se realizaron controles de irradiación (mezcla sin fotosensibilizador) y control de oscuridad (mezcla sin irradiar a la máxima concentración de fotosensibilizante testeada).

Después del tratamiento fotosensibilizador se precipitó el ADN PM2 con solución de etanol-acetato de sodio (5% de acetato de sodio 2,5M en etanol pH 7,2) en baño de hielo por 30 minutos, luego se centrifugó a 14000 rpm a 4°C por 30 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol 70% frío. Se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 4°C, para eliminar el etanol. Finalmente se redisolvió el ADN precipitado en

buffer BE1 (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) para la posterior cuantificación de los sitios (o modificaciones) sensibles a endonucleasas (MSE).

4.4.6.1.2. Cuantificación de modificaciones sensibles a endonucleasas

El ensayo de relajación utilizado para cuantificar las modificaciones (o sitios) sensibles a endonucleasas (MSE) y los cortes de simple cadena (CSC) en el ADN PM2 inducidos por fotosensibilización, se fundamenta en el hecho de que el ADN PM2 superenrollado se convierte en su forma relajada, ya sea por un corte de simple cadena, o por un corte específico realizado por endonucleasas de reparación, logrando que la forma relajada migre separadamente de la forma superenrollada en un gel de electroforesis.[24]

Alícuotas de 0,2 µg de ADN modificado en 20 µL de BE1 se incubaron durante 30 minutos a 37°C en baño de agua con 10 µL de *buffer* BE1 para la determinación de CSC producidos directamente, o con 10 µL de una de las siguientes preparaciones de endonucleasas: (i) formamido pirimidina-ADN glicosilasa (fpg), 3 µg/ml en BE1 (ii) endonucleasa IV, 0,3 µg/ml en BE1 (iii) T4 endonucleasa V, 3 µg/ml en *buffer* BE15 (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 15 mM EDTA) (iv) endonucleasa III, 30 ng/ml en BE1 (v) mezcla de endonucleasa III y endonucleasa IV (vi) mezcla de T4 endonucleasa V y endonucleasa IV. Todas las preparaciones tuvieron el agregado previo en el *buffer* correspondiente de albumina de suero bovino (ASB) (5mg/ml) para favorecer la estabilidad de las endonucleasas en solución.

Las reacciones se detuvieron con el agregado de 10 µL de stop *buffer* (Tris, acetato de sodio, con glicerol, azul de bromo fenol, y EDTA) con 2% de dodecil sulfato de sodio (SDS). Se realizaron electroforesis de cada una de las reacciones en geles de agarosa al 0,8% junto a los correspondientes controles, para cuantificar por fluorescencia las formas relajada y superenrollada del ADN después de la tinción con bromuro de etidio, permitiendo así el cálculo del número de CSC o, si la incubación fue con una endonucleasa de reparación, el número de CSC más MSE.

En la electroforesis se sembró 30-40 µL de cada muestra por pocillo, y se realizó en *buffer* TAE (40mM Tris, 5 mM acetato de sodio, 1mM EDTA, pH 7,8) durante 45-60 minutos a 80 V. Posteriormente se tiñó el gel con solución de bromuro de etidio al 0,005% por 30 min., se lavó y reveló empleando el sistema *Gel Doc XR+* (Bio-Rad), el cual permite cuantificar la fluorescencia del bromuro de etidio asociado al ADN mediante el programa *Image LabTM* (Bio-Rad).

Para calcular los CSC por molécula de PM2 (10^4 pb) se utiliza la siguiente relación:

$$CSC = -\ln [(1,43 \times Se) / ((1,43 \times Se) + Rel)] \quad (4.1)$$

donde CSC son los cortes en una simple cadena por molécula de bacteriofago (10^4 pb), *Se* y *Rel* son las intensidades de las formas superenrollada y relajada, respectivamente y 1,43 es el factor de corrección por la diferente intercalación del bromuro de etidio en la forma *Se* con respecto a la forma *Rel*.

Para obtener los perfiles de daño, los datos fueron corregidos por el número de lesiones “background” observados en los experimentos controles de oscuridad e irradiación. Así el número de lesiones de sitios sensibles a endonucleasas fueron obtenidos mediante la sustracción del número de cortes de simple cadena que se produjeron en cada experimento (en promedio el número de lesiones inducidas solamente por la irradiación UVA (365 nm, es decir el daño observado en ausencia de fotosensibilizador es $0,024 \pm 0,021$ modificaciones por 10^4 pb de ADN PM2).

Cabe recordar que las endonucleasa de reparación usadas reconocen diferentes modificaciones sobre el ADN.[25] La proteína fpg reconoce purinas oxidadas tales como 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoGua), 4,6-diamino-5-formamidopirimidina (FapyAde), 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapyGua) y también sitios de pérdidas de bases (sitios AP). En contraste, los sustratos de la endonucleasa III son varias pirimidinas oxidadas, en adición a los sitios AP. La T4 endonucleasa V reconoce DPCs junto con algunos tipos de sitios AP, mientras la endonucleasa IV reconoce todos los tipos de sitios de pérdida de base, incluyendo todos los tipos de sitios AP oxidados. Por lo tanto, la cantidad de DPCs producidos en la fotosensibilización, se calcula como la diferencia entre el número de sitios reconocidos en la incubación tanto con endonucleasa IV y T4 endonucleasa V y el número de sitios de AP reconocidos solo por la endonucleasa IV. Refiriendo a esta diferencia como "DPCs calc".[24]

4.5. Referencias

1. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids. Nature 1953;17:737-738.
2. Gonzalez MM. Piridoindoles naturales (β-carbolinas) y sintéticos como fotosensibilizadores en procesos de interés biológico. Estudio de su fotoquímica en solución acuosa. Tesis Doctoral 2012.
3. Nelson DL, Cox MM. Lehninger. Principles of Biochemistry 3rd Edition. Omega 2001.
4. O'Connor T, Mansy S, Bina N, et al. The pH-dependent structure of calf thymus DNA studied by Raman spectroscopy. Biophysical chemistry 1982;15:53-64.
5. Puppels GJ, Otto C, Greve J, et al. Raman microspectroscopic study of low-pH-induced changes in DNA structure of polytene chromosomes. Biochemistry 1994;33:3386-3395.
6. Coohill TP, Peak MJ, Peak JG. The effects of the ultraviolet wavelengths of radiation present in sunlight on human cells in vitro. Photochemistry and photobiology 1987;46:1043-1050.

7. Hiraku Y, Ito K, Hirakawa K, et al. Photosensitized DNA damage and its protection via a novel mechanism. *Photochemistry and photobiology* 2007;83:205-212.
8. Braslavsky SE. Glossary of terms used in photochemistry, (IUPAC Recommendations 2006). *Pure and Applied Chemistry* 2007;79:293-465.
9. Scaiano JC. *CRC handbook of organic photochemistry*. CRC press 1989
10. Delatour T, Douki T, D'Ham C, Cadet J. Photosensitization of thymine nucleobase by benzophenone through energy transfer, hydrogen abstraction and one-electron oxidation. *Journal of Photochem Photobiol B: Biology* 1998;44:191-198.
11. Lhiaubet-Vallet V, Cuquerella MC, Castell J, et al. Triplet excited fluoroquinolones as mediators for thymine cyclobutane dimer formation in DNA. *The Journal of Physical Chemistry B* 2007;111:7409-7414.
12. Colmenarejo G, Bárcena M, Gutiérrez-Alonso CM, Montero F, Orellana G. DNA photocleavage by novel intercalating 6-(2-pyridinium)phenanthridinium viologens. *FEBS Letters* 1995; 374:426-428.
13. Foote CS, Clennan EL. Properties and reactions of singlet dioxygen. In *Active oxygen in chemistry*. Springer Netherlands 1995:105-140
14. Taira Z, Kanzawa S, Dohara C, et al. Intercalation of six β-carboline derivatives into DNA. *Japan Journal of Toxicology and Environment Health* 1997;43:83-91.
15. Gonzalez MM, Pellon-Maison M, Ales-Gandolfo MA, et al. Photosensitized cleavage of plasmidic DNA by norharmane, a naturally occurring beta-carboline. *Organic and Biomolecular Chemistry* 2010;8:2543-2552
16. Gonzalez MM, Vignoni M, Pellon-Maison M, Ales-Gandolfo MA, Gonzalez-Baro MR, Erra-Balsells R, Epe B, Cabrerizo FM. Photosensitization of DNA by β-carbolines: kinetic analysis and photoproduct characterization. *Organic and Biomolecular Chemistry* 2012;10:1807-1819
18. Cao R, Peng W, Chen H, et al. DNA binding properties of 9-substituted harmine derivatives. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005;338:1557-1563.
19. Paul BK, Guchhait N. Exploring the strength, mode, dynamics, and kinetics of binding interaction of a cationic biological photosensitizer with DNA: implication on dissociation of the drug-DNA complex via detergent sequestration. *The Journal of Physical Chemistry B* 2011;115:11938-11949.
20. Gonzalez MM, Rasse-Suriani FAO, Franca CA, Pis Diez R, Gholipour Y, Nonami H, Erra-Balsells R, Cabrerizo FM. Photosensitized electron transfer within a self-assembled nor harmane-2'-deoxyadenosine 5'-monophosphate (dAMP) complex. *Organic and Biomolecular Chemistry* 2012;10:9359-9372.
21. Salditt M, Braunstein SN, Camerini-Otero RD, Franklin RM. Structure and synthesis of a lipid-containing bacteriophage: X. Improved techniques for the purification of bacteriophage PM2. *Virology* 1972;48:259-262.
22. Boiteux S, O'Connor TR, Lederer F, et al. Homogeneous Escherichia coli FPG protein. A DNA glycosylase which excises imidazole ring-opened purines and nicks DNA at apurinic/aprimidinic sites. *Journal of Biological Chemistry* 1990;265:3916-3922.
23. Müller E, Boiteux S, Cunningham RP, Epe B. Enzymatic recognition of DNA modifications induced by singlet oxygen and photosensitizers. *Nucleic Acids Research* 1990;18:5969-5973.
24. Epe B. DNA damage spectra induced by photosensitization. *Photochemical and Photobiological Sciences* 2012;11:98-106.
25. Häring M, Rüdiger H, Demple B, Boiteux S, Epe B. Recognition of oxidized abasic sites by repair endonucleases. *Nucleic Acids Research* 1994;22:2010-2015.

Las β -carbolinas (β Cs) son un grupo de heterociclos nitrogenados derivados del 9H-pirido[3,4-b]indol o *norharmano* que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, formando parte de los componentes endógenos normales de una gran variedad de sistemas biológicos (animales, plantas, insectos, etc.). En algunos casos, como el de ciertas plantas y mamíferos, estos alcaloides son enzimáticamente sintetizados a través de diferentes vías metabólicas, formando parte constitutiva de tejidos y fluidos corporales, incluyendo órganos y/o tejidos fotosensibles tales como las hojas (en plantas) o fluidos oculares (en mamíferos). Consecuentemente, estos compuestos están presentes en una gran variedad de alimentos y bebidas. Por lo tanto, en el caso del ser humano que presenta una alimentación basada en la ingesta de alimentos derivados de carnes, frutas y/o verduras, la dieta representa una vía exógena, adicional, de exposición a este tipo de alcaloides.

A pesar de su clara presencia en innumerables sistemas biológicos, el verdadero rol fisiológico de estos alcaloides es aún incierto. Este hecho ha despertado un gran interés en el estudio de las propiedades fisicoquímicas de las β Cs y, en particular, de su comportamiento fotoquímico, en entornos o medios bio-compatibles. El grupo de investigación donde se desarrolló este trabajo de Tesis, durante los últimos 10 años, ha llevado adelante investigaciones sistemáticas y rigurosas relacionadas con la caracterización de las propiedades fotoquímicas y fotosensibilizadoras de β Cs en solución acuosa. En este contexto, se demostró que este tipo de alcaloides presentan una gran versatilidad en relación a sus propiedades químicas y fotoquímicas, las que son altamente sensibles a pequeñas modificaciones tanto estructurales (presencia de sustituyentes) como del entorno. Hasta la fecha, los estudios realizados se enfocaron en un grupo reducido de β Cs. Por lo tanto, extender este tipo de estudios sistemáticos a nuevos derivados β -carbolínicos se hace, ciertamente, relevante.

En este contexto, se llevó adelante el presente trabajo de Tesis Doctoral, titulado: “Síntesis y caracterización de metil- β -carbolinas. Estudios fotofísicos en medio acuoso y evaluación de su comportamiento como fotosensibilizadores frente a biomacromoléculas”. En el mismo se exploran aspectos básicos de la química y fotofísica de tres β Cs (nHo, Ho y Ha) y sus N-metil derivados (2-Me- β Cs, 9-Me- β Cs y 2,9-diMe- β Cs), en solución acuosa. También, se evalúa la interacción de estos alcaloides con bio-macromoléculas. En particular, las macromoléculas utilizadas fueron ADN proveniente del timo de ternera (ADNtt) y albúmina de suero bovino (ASB), como modelos de material genético y

proteico, respectivamente. Finalmente, se investiga la cinética de clivaje del ADN PM2 fotosensibilizado por N-Me- β Cs y se caracterizan los fotoproductos generados.

Cabe aclarar que, si bien hasta la fecha se ha informado la presencia de solamente dos N-metil β Cs en la naturaleza (2-Metil-*nor*Harmanio o *nor*Melinonina F y 2-Metil-Harmanio o Melinonina F), las reacciones de metilación enzimática de diferentes sustratos son reacciones metabólicas altamente frecuentes. Consecuentemente, cobra interés extender los estudios a nuevos N-metil derivados.

Brevemente, las conclusiones generales más relevantes de este trabajo se detallan a continuación, separadas en tres secciones:

5.1 Caracterización de las propiedades fotofísicas de las N-Me- β Cs en solución acuosa

Se estudiaron las propiedades químicas y fotofísicas de los derivados de β Cs metilados en la posición N-2 (2-Me- β Cs y 2,9-diMe- β Cs) y del 9-Me-Ha. En todos los casos se evaluó su dependencia con diferentes variables experimentales tales como pH, fuerza iónica y de la presencia de *buffers* (Capítulos 2 y 3). Los resultados se analizaron, de manera comparativa, con la información disponible en literatura para las β Cs no sustituidas y los 9-metil derivados 9-Me-nHo y 9-Me-Ho.

En relación al pH, se conoce que en solución acuosa, en el intervalo de pH comprendido entre 3 y 11, las β Cs totalmente aromáticas, no sustituidas en la posición 2 del anillo (N-2) poseen un único equilibrio ácido-base con valores de $pK_a^{N-2} \sim 7$. Consecuentemente, y con el fin de conocer el comportamiento fotofísico individual de cada una de las especies ácido-base de las β Cs relevantes desde el punto de vista fisiológico, todos los ensayos de caracterización química y fotofísica se realizaron en dos condiciones de pH específicas: pH 4,9 y 9,5. En estas condiciones en las soluciones de trabajo predomina, en más de un 99 %, la forma protonada (βCH^+) y la forma neutra (βCN) del alcaloide, respectivamente.

Por el contrario, en el caso de los 2-metil derivados solo predomina en solución una única especie ácido-base (especie catiónica o $\beta\text{C-CH}_3^+$), en todo el rango de pH mencionado anteriormente. Cabe aclarar que, en condiciones alcalinas, los derivados catiónicos que, a su vez, presenten un grupo ionizable en la posición N-9 muestran un equilibrio ácido-base adicional con valores de $pK_a^{N-9} \sim 11,5$. Sin embargo, al carecer de relevancia desde el punto de vista fisiológico, la caracterización de estas especies ácido-base escapa al interés general de esta Tesis.

Los resultados generales obtenidos son:

- Desde el punto de vista espectroscópico, la adición de un grupo metilo en la posición N-2 no induce grandes modificaciones en relación a las propiedades observadas previamente para las formas protonadas del anillo βC no sustituido. Los espectros de absorción de los derivados 2-Me- βC s son similares (mismo perfil de bandas y coeficientes de absorción muy similares) a los que presentan los respectivos βCH^+ . La metilación en la posición N-2 solo induce un leve desplazamiento batocrómico de las bandas de absorción de $\sim 3\text{-}5$ nm. Esta tendencia se puede generalizar de la siguiente manera: $2\text{-Me-}\beta\text{C} \approx \beta\text{CH}^+$.
- Por el contrario, la metilación en N-9 induce modificaciones más significativas en la distribución electrónica del anillo β -carbolínico. Esto se pone de manifiesto con el desplazamiento batocrómico de $\sim 12\text{-}15$ nm observado con respecto a las especies no sustituidas en esta posición. Vale mencionar que este comportamiento se observa independientemente de cual sea el sustituyente en la posición N-2 (-H o $-\text{CH}_3$). La tendencia observada para los desplazamientos batocrómicos de las bandas de absorción se puede generalizar en la expresión: $9\text{-Me-}\beta\text{CH}^+ \approx 2,9\text{-diMe-}\beta\text{C} > \beta\text{CH}^+ \approx 2\text{-Me-}\beta\text{C}$.
- Estos alcaloides presentan valores de rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_{F}) elevados, llegando a alcanzar valores de $\sim 0,95$. En particular, el Φ_{F} de los 2-metil derivados es similar, dentro del error experimental, al descrito previamente para las especies protonadas de su correspondiente βC no sustituida: $\Phi_{\text{F}}^{\beta\text{CH}^+} \approx \Phi_{\text{F}}^{2\text{-Me-}\beta\text{C}}$ y $\Phi_{\text{F}}^{9\text{-Me-}\beta\text{CH}^+} \approx \Phi_{\text{F}}^{2,9\text{-diMe-}\beta\text{C}}$. A su vez, se conserva el comportamiento general que muestra que los derivados metilados en la posición N-9 presentan Φ_{F} superiores a los de los correspondientes derivados no sustituidos en dicha posición: $\Phi_{\text{F}}^{9\text{-Me-}\beta\text{CH}^+} \approx \Phi_{\text{F}}^{2,9\text{-diMe-}\beta\text{C}} > \Phi_{\text{F}}^{\beta\text{CH}^+} \approx \Phi_{\text{F}}^{2\text{-Me-}\beta\text{C}}$.
- Además, se demostró que, en todo el intervalo de pH analizado, la principal especie emisora es la forma catiónica $^1[\beta\text{C-CH}_3]^*$ o protonada $^1[\beta\text{CH}^+]^*$, en el caso de los derivados sustituidos en la posición N-2 y no sustituidos, respectivamente.
- El estado electrónicamente excitado, S_1 , de las βC s es desactivado eficientemente por la presencia de sales, componentes de *buffers*, tales como acetato, fosfato y bórax. En todos los casos se observó que la interacción de βC con los *buffers* no induce la formación de nuevas especies emisoras con respecto a lo observado en agua. En todos los casos, las tres sales agregadas (acetato, fosfato y bórax) inducen una clara desactivación del estado S_1 que se manifiesta en una marcada reducción de los valores de Φ_{F} ($\Phi_{\text{F}}^{\text{buffer}} \ll \Phi_{\text{F}}^{\text{H}_2\text{O}}$). Esta desactivación tiene lugar a través de procesos dinámicos donde $\tau_{\text{F}}^{\text{buffer}} \ll \tau_{\text{F}}^{\text{H}_2\text{O}}$, que

incluyen procesos de transferencia protónica entre las β Cs (desde su estado S_1) y las especies constitutivas de los *buffers* ($\text{CH}_3\text{COOH} / \text{CH}_3\text{COO}^-$, $\text{HPO}_4^{-2} / \text{H}_2\text{PO}_4^-$ o $\text{H}_3\text{BO}_3 / \text{B}_4\text{O}_7^{-2}$).

- Al igual que los demás β Cs investigadas con anterioridad, en solución acuosa, los derivados N-metilados presentan una capacidad de fotosensibilizar la producción de EROs moderada o baja ($\Phi_\Delta \sim 0,08-0,16$). Los valores de Φ_Δ observados en cada caso son similares, dentro del error experimental, a los previamente descritos para otras β Cs en el mismo tipo de solvente.

5.2. Interacción de nHo y sus N-metil derivados con albúmina de suero bovino

Con el objetivo de comprender los procesos fisicoquímicos involucrados en la interacción de β Cs y proteínas, se realizaron ensayos de interacción usando, como proteína modelo a la albúmina de suero bovino (ASB) (Capítulo 3). En particular, se estudió cuali- y cuantitativamente la interacción N-Me- β Cs con albúmina de suero bovino (ASB), en solución acuosa, en diferentes condiciones de pH. Las soluciones fueron analizadas con técnicas analíticas complementarias.

Las principales conclusiones obtenidas a partir de estos estudios centrados particularmente en el norharmano y sus N-metil derivados, se detallan a continuación:

- Las β Cs muestran una interacción particular con ASB, fuertemente dependiente del pH y de la estructura química del alcaloide. Ciertamente, interaccionan con los diferentes sitios o dominios proteicos, cada uno de los cuales le confiere a la molécula de β C interactuante un entorno característico. Estos entornos pueden ser fácilmente censados o revelados espectroscópicamente debido al comportamiento diferencial, en términos fotofísicos, que presentan estos alcaloides (Capítulo 2).
- En particular, para las β Cs que no presentan sustituyentes en la posición N-2, el sitio hidrofóbico localizado en el dominio II de la proteína, es eficientemente ocupado por las respectivas especies neutras (β CN), independientemente del pH de la solución. Es decir, esto ocurre aún en condiciones ácidas donde la βCH^+ es la especie predominante en la solución (> 99%).
- Por el contrario, las especies cargadas positivamente (es decir, tanto las catiónicas ($\beta\text{C-CH}_3^+$) como las protonadas (βCH^+), según sean β Cs metiladas o no metiladas, respectivamente) interaccionan fuertemente con el dominio hidrofílico y/o la superficie polar de la proteína. Cabe recordar que, dado el PI de ASB, en todas las condiciones de pH

analizadas, la proteína presenta una carga neta negativa. Por lo tanto, es de esperar que este tipo de interacciones este gobernado por fuerzas electrostáticas de atracción.

- En todos los casos, las especies libres en solución mostraron una muy fuerte desactivación dinámica por parte de ASB. Más aún, las β Cs libres en solución solo fueron detectadas en condiciones de muy bajas [ASB]. Por el contrario, las componentes ligadas a ASB mostraron una fuerte contribución estática al proceso global de interacción.
- Los resultados presentados en el capítulo 3 no solo representan un aporte inicial que, sin dudas, ayudarán a comprender los procesos fisicoquímicos involucrados en su interacción con ASB sino que además, proporcionan herramientas útiles para el estudio de nuevas proteínas que permitan caracterizar los entornos o dominios propios que modulan sus funciones proteicas.

5.3. Interacción y daño fotosensibilizado al ADN por N-Me- β Cs

Para evaluar y poner en evidencia la capacidad fotosensibilizadora de las N-Me- β Cs se realizó una serie de experimentos usando como molécula blanco, material genético. Se usaron diferentes formas o tipos de ADN: ADN lineal de doble cadena obtenido de timo de ternero (ADNtt) y ADN del bacteriófago PM2 (Capítulo 4). En particular, se estudió la interacción de N-metil β Cs y su acción fotodinámica sobre material genético en presencia de radiación UVA. Los estudios se realizaron en solución acuosa y en diferentes condiciones de pH controladas. Las soluciones fueron analizadas con diferentes técnicas analíticas complementarias. Así, se pudieron calcular constantes de asociación β Cs-ADN obtenidas por cada metodología.

Los resultados obtenidos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- La interacción estudiada depende fuertemente de la carga neta de la molécula de β Cs estudiada: las especies cargadas positivamente (es decir, las catiónicas metiladas (β C-CH₃⁺) o protonadas (β CH⁺), según sean β Cs metiladas o no metiladas, respectivamente) mostraron una unión no covalente con el ADN mayor que las correspondientes formas neutras (β CN). Dicha interacción es marcadamente estática, tal como lo demuestran sus extremadamente bajas constantes de desactivación dinámicas (K_D).
- El conjunto de resultados obtenidos a lo largo de este trabajo de tesis permiten concluir que hay una fuerte dependencia tanto de la intensidad del daño fotosensibilizado, como también de la distribución de fotoproductos del ADN, con la naturaleza química del alcaloide β -carbolínico usado como fotosensibilizador. Así, tres factores, a su vez

modulados por el pH del medio, están directamente implicados en la magnitud del daño producido: *(i)* las diferentes propiedades fotofísicas de las β Cs, *(ii)* las diferencias en la capacidad de interacción-unión de cada β C al ADN. Se detecta una mayor capacidad fotosensibilizadora para aquellos compuestos que presentan una mayor capacidad de interacción y *(iii)* la presencia de vías fotoquímicas adicionales tales como, foto-oxidaciones de bases y/o formación de dímeros de timidina inducidas, selectivamente, por el fotosensibilizador.

- Se caracterizaron los fotoproductos formados mediante experimentos con enzimas de restricción sensibles a modificaciones específicas en la estructura del ADN. Los resultados muestran que las β Cs generan modificaciones a nivel de las bases nucleicas, y que la relación entre estas lesiones depende de la naturaleza de la β C. Además de modificaciones oxidativas en las bases purínicas y pirimidínicas, sitios de pérdidas de bases y CSC, se detectaron dímeros de timina sólo en el caso en que se utilizó el derivado 2-Me-Ha como fotosensibilizador. Consecuentemente, este derivado en particular cumple con las condiciones energéticas necesarias, desde el punto de vista termodinámico, para inducir este tipo de lesión. Es decir, la energía del estado triplete excitado de 2-Me-Ha sería lo suficientemente alta como para inducir (vía transferencia de energía al estado triplete de las bases de timinas que conforman el ADN) la formación de dímero T \leftrightarrow T.

5.4. Consideraciones de carácter general

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo de tesis son, sin dudas un aporte muy importante y valioso de gran utilidad para lograr una mejor comprensión de las funciones y procesos biológicos en los que participan estos alcaloides en la naturaleza, además de potenciar sus posibles usos adicionándolos en sistemas biológicos. Principalmente, se enriquece el conocimiento de aquellos procesos que son desencadenados por la radiación UVA-visible. Así, se podrá entender el comportamiento de estos alcaloides bajo condiciones de excitación electrónica. Es decir, entender el comportamiento y la naturaleza de los estados electrónicamente excitados de las β Cs, en un medio o entorno de esencial importancia biológica como lo es el medio acuoso. En términos generales, los resultados presentados en esta Tesis muestran que en este medio hay una importante dependencia en el comportamiento fotoquímico y fotofísico *in vitro* y lo habría también en el de tipo fotobiológico *in vivo*, tanto con la naturaleza química de los sustituyentes como con la posición relativa de los mismos en el anillo central

[3,4b]piridoindólico de las β Cs. Además, queda claro que a esta dependencia se suma la del pH del medio acuoso donde estos alcaloides se encuentran.

Asimismo, no caben dudas de que el conocimiento detallado aquí expuesto brinda herramientas indispensables al momento del diseño y síntesis de nuevos derivados de β Cs y compuestos relacionados. De esta manera, fácilmente se pueden seleccionar los sustituyentes adecuados que se deben introducir en el anillo de β C de manera de potenciar o inhibir alguna propiedad fotoquímica/fotofísica en particular.

Finalmente, este trabajo de tesis ha demostrado que, bajo irradiación UVA, las β Cs participan en procesos redox y de oxidación fotosensibilizada de biomoléculas. Por este conjunto de propiedades, las β Cs deben ser tenidas en cuenta como potenciales fotosensibilizadores biológicos naturales endógenos o exógenos.

Asimismo, en entornos acuosos, estos alcaloides muestran una eficiencia de producción fotosensibilizada de EROs relativamente baja (por ej. $0,04 < \Phi_{\Delta} < 0,2$). Teniendo en cuenta su amplia distribución en órganos y/o tejidos fotosensibles (por ejemplo, en las hojas de diferentes tipos de plantas), las β Cs podrían tener un rol activo en los procesos de señalización intracelular mediada por EROs. Sin dudas, este potencial rol fotobiológico merece ser explorado en profundidad.

5.5. Lista de publicaciones científicas

El presente trabajo de Tesis doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:

- 1) "Mechanisms of DNA damage by photoexcited 9-methyl- β -carbolines". M. Vignoni, F. A. O. Rasse-Suriani, K. Butzbach, R. Erra-Balsells, B. Epe and F. M. Cabrerizo, *Organic and Biomolecular Chemistry*, **2013**, 11, 5300-5309.
- 2) "Chemical and photochemical properties of 2-methyl- β -carbolinium salts in aqueous solution". F. A. O. Rasse-Suriani, P. David Gara, R. Erra-Balsells and F. M. Cabrerizo (en preparación).
- 3) "Interaction between N-methyl β -carbolines and bovine serum albumin". F. A. O. Rasse-Suriani, R. Erra-Balsells and F. M. Cabrerizo (en preparación).

Asimismo, durante su etapa de formación doctoral, el Bioqco. Federico A. O. Rasse Suriani, participó en las siguientes publicaciones científicas:

- 4) "pH Effect on the interaction and the photosensitization of 2'-deoxyadenosine-5'

monophosphate (dAMP) by *nor*harmane in aqueous solution". M. M. Gonzalez, F. A. O. Rasse-Suriani, C. A. Franca, Y. Gholipour, H. Nonami, R. Pis Diez, R. Erra-Balsells and F. M. Cabrerizo. *Organic and Biomolecular Chemistry*, **2012**, 10, 9359-9372.

- 5) "In vitro evaluation of β -carbolines alkaloids as potential anti-Toxoplasma agents". M. L. Alomar; F. A. O. Rasse-Suriani, A. Ganuza, V. M. Coceres, F. M. Cabrerizo and S. O. Angel. *BMC Research Notes*, **2013**, 6, 193.
- 6) "Chemical and photochemical properties of chloroharmane derivatives in aqueous solutions". M. P. Denofrio, F. A. O. Rasse-Suriani, J. G. Yañuk, M. M. Gonzalez, E. Wolcan, M. Seifermann, R. Erra-Balsells and F. M. Cabrerizo. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2016**, 18, 886-900.

5.6. Lista de comunicaciones en congresos, simposios y/o reuniones nacionales e internacionales

- 7) "Interaction between novel N-methyl- β -carboline derivatives and Bovine Serum Albumin, a typical carrier protein" F. A. O. Rasse-Suriani, J. G. Yañuk, S. Garcia Einschlag, M. Gonzalez, R. Erra-Balsells, F. M. Cabrerizo. XI Encuentro Latinoamericano de Fotoquímica y Fotobiología (XI ELAFOT), Córdoba, Argentina, Oct-**2012**.
- 8) "Mecanismos del daño al ADN fotoinducido por 9-metil- β -carbolinas". M. Vignoni, F. A. O. Rasse-Suriani, K. Butzbach, J. G. Yañuk, F. Simon, V. E. Alvarez, M. M. Gonzalez, M. P. Denofrio, R. Erra-Balsells, B. Epe, F. M. Cabrerizo. Segunda Reunión de Fotobiólogos Moleculares Argentinos, Córdoba, Argentina. Oct-**2013**.