

***“Comportamiento fotoquímico de
complejos diiminos frente a
nanoestructuras metálicas y modelos
biológicos: asociación a biopolímeros y
fotosensibilización celular”***

**Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias
Químicas**



Lic. Pablo Facundo Garcia

**Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba
Córdoba, Argentina
2016**

El presente trabajo de tesis fue realizado en el INFIQC y CIBICI, Departamentos de fisicoquímica y Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, bajo la dirección del Dr. Gerardo Argüello y se presenta a consideración de dicha Facultad para optar al grado de Doctor en ciencias Químicas

Dr. Gerardo Argüello

Comisión evaluadora:

Dra. Ana Cabanillas

Dr. Juan Argüello

Dra. Adriana Pierini

**Dra. Adriana Casas
(Evaluadora Externa)**

Contenidos.....	A-H
Abreviaturas.....	I-J
Introducción.....	1
Referencias.....	4

Capítulo 1: Aspectos Teóricos y generales

1.1 Resumen.....	7
1.2 Procesos fotofísicos y fotoquímicos.....	8
1.2.1 Aspectos generales.....	8
1.2.2 Procesos de Transferencia Electrónica.....	13
1.2.3 Mecanismos de <i>Quenching</i>	15
1.2.4 Procesos de oxidación inducidos por sustancias fotosensibilizadoras.....	17
1.3 Propiedades fotofísicas y fotoquímicas de los complejos metálicos.....	20
1.3.1 Aspectos generales.....	20
1.3.2 Espectro de absorción del estado fundamental.....	20
1.3.3 Espectro de absorción del estado excitado.....	23
1.3.4 Decaimiento de los estados excitados.....	24
1.3.5 Relajación del estado excitado.....	25
1.3.6 Reacciones de fotosolvólisis.....	25
1.3.7 Mecanismo de fotosustitución.....	26
1.3.8 Propiedades REDOX.....	27
1.3.9 Reacciones de Transferencia Energética y Electrónica del estado excitado.....	29

1.3.10	Toxicidad de los complejos metálicos de Cr(III).....	30
1.3.11	Interacción con ADN.....	31
1.4	Referencias.....	33

Capítulo 2: Materiales y métodos experimentales

2.1	Resumen.....	39
2.2	Materiales.....	40
2.2.1	Complejos polipiridínicos.....	40
2.2.2	Proteínas.....	40
2.2.3	Otros reactivos.....	41
2.3	Metodologías experimentales.....	43
2.3.1	Espectrofotometría de Absorción UV-visible.....	43
2.3.2	Espectroscopía Infraroja con Transformada de Fourier (FTIR).....	45
2.3.3	Luminiscencia.....	46
2.3.3.1	Luminiscencia resuelta en el tiempo.....	48
2.3.3.2	Luminiscencia en estado estacionario.....	49
2.3.4	Fotólisis continua y pulsada.....	50
2.3.5	Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	51
2.3.6	Espectroscopía RAMAN.....	53
2.3.6.1	Espectroscopía Raman incrementada por la Superficie.....	54
2.3.7	Dicroísmo circular.....	55
2.3.8	Procesos de transferencia de energía resonante (FRET).....	60
2.3.9	Técnicas microscópicas.....	63
2.3.9.1	Microscopía de Transmisión electrónica (TEM).....	63
2.3.9.2	Microscopía de Fluorescencia.....	64
2.3.9.3	Microscopía óptica.....	65

2.3.10	Citometría de flujo.....	66
2.3.11	Electroforésis en poliacrilamida.....	67
2.3.12	Ensayo MTT.....	68
2.3.13	Ensayo COMETA.....	69
2.3.14	Microondas.....	70
2.3.15	Estudios de transferencia de iones entre dos soluciones de electrolitos no miscibles (ITIES).....	73
2.4	Referencias.....	76
	Hipótesis, objetivos, y lineamientos generales.....	79

Capítulo 3: Interacción de Nanopartículas de Au con complejos metálicos de Ru (II).

3.1	Resumen.....	83
3.2	Introducción.....	84
3.2.1	Nanomedicina.....	84
3.2.2	Agregación de Nanosistemas.....	86
3.3	Motivación y objetivos.....	88
3.4	Materiales y métodos.....	89
3.4.1	Materiales.....	89
3.4.2	Síntesis del complejo.....	89
3.4.2.1	Síntesis asistida por microondas.....	89
3.4.3	Síntesis de las NPs.....	90
3.4.4	Medidas espectroscópicas.....	91
3.4.5	Microscopía de transmisión electrónica.....	91
3.5	Resultados y discusión.....	93

3.5.1	Síntesis de complejos.....	93
3.5.2	Interacción NPs-complejos.....	94
3.5.2.1	Experimentos de campo lejano.....	94
3.5.2.2	Microscopía.....	101
3.5.2.3	Experimentos de campo cercano (SERS).....	105
3.5.2.4	<i>Quenching</i> de los complejos por las NPs.....	108
3.6	Conclusiones parciales.....	113
3.7	Referencias.....	114

Capítulo 4: Caracterización espectroscópica de la asociación entre Cr(phen)₃³⁺ y Transferrina

4.1	Resumen.....	119
4.2	Introducción.....	120
4.2.1	Metabolismo del Hierro.....	120
4.2.2	Transferrina: Apotransferrina y Holotransferrina.....	121
4.2.3	Metabolismo de la Transferrina.....	124
4.2.4	Uso de la Transferrina en la Terapia Fotodinámica.....	126
4.3	Motivación y objetivos.....	127
4.4	Materiales y métodos.....	128
4.4.1	Materiales.....	128
4.4.2	Estudios de asociación.....	128
4.4.3	Modelo de asociación.....	130
4.4.4	Transferencia de energía.....	131
4.4.5	Estudios de Dicroísmo Circular.....	131
4.5	Resultados y discusión.....	133
4.5.1	<i>Quenching</i> del estado excitado de la proteína.....	133

4.5.2	Asociación entre $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ y Transferrina. Efecto del pH.....	141
4.5.3	Parámetros termodinámicos y naturaleza de las fuerzas de interacción.....	144
4.5.4	Transferencia energética de la Holotransferrina al $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$	149
4.5.5	Cambios estructurales inducidos por el $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ a la HoloTransferrina.....	151
4.6	Conclusiones parciales.....	156
4.7	Referencias.....	158

Capítulo 5: Caracterización del proceso de asociación y fotodegradación de la Albúmina Sérica humana y Bovina en presencia de complejos de Cr (III).

5.1	Resumen.....	163
5.2	Introducción.....	164
5.2.1	Albúmina Sérica.....	164
5.2.2	Fotooxidación de proteínas.....	167
5.3	Motivación y objetivos.....	169
5.4	Materiales y métodos.....	170
5.4.1	Materiales.....	170
5.4.2	Medidas espectroscópicas.....	170
5.4.3	Estudios de asociación.....	171
5.4.4	Modelo de asociación.....	171
5.4.5	Estudios de Dicroísmo Circular.....	172

5.4.6	Estudios de transferencia de Energía.....	172
5.4.7	Estudios de fotodegradación.....	172
5.4.8	Estudios de transferencia de iones entre dos soluciones de electrolitos no miscibles (ITIES).....	173
5.5	Resultados y discusión.....	174
5.5.1	Albúmina Sérica Humana.....	174
5.5.1.1	Asociación entre $\text{Cr}(\text{5Cl-phen})_3^{3+}$ y HSA.....	174
5.5.1.2	Parámetros termodinámicos y naturaleza de las fuerzas de interacción.....	177
5.5.1.3	Cambios conformacionales de la HSA inducidos por la presencia de complejo.....	179
5.5.1.4	Estudios resueltos en el tiempo.....	181
5.5.1.5	Estudios de fotodegradación.....	183
5.5.2	Albúmina Sérica Bovina (BSA).....	185
5.5.2.1	Asociación entre los complejos de Cr (III) y BSA.....	185
5.5.2.2	Parámetros termodinámicos y naturaleza de las fuerzas de interacción.....	188
5.5.2.3	Estudios de Transferencia de iones entre dos soluciones de electrolitos no miscibles (ITIES).....	189
5.5.2.4	Estudios resueltos en el tiempo.....	190
5.5.2.5	Transferencia de energía entre la BSA y los complejos metálicos.....	192
5.6	Conclusiones parciales.....	194
5.7	Referencias.....	195

Capítulo 6: Estudios de interacción entre Cr(phen)₃³⁺ y medios

biológicos

6.1 Resumen	199
6.2 Introducción	200
6.2.1 Uso de los fotosensibilizadores en PDT.....	200
6.2.2 Antecedentes de los complejos de Cr (III) como fotosensibilizadores para la PDT.....	201
6.3 Motivación y objetivos	203
6.4 Materiales y métodos	204
6.4.1 Líneas celulares.....	204
6.4.2 Mantenimiento de las líneas celulares.....	204
6.4.3 Ensayos de viabilidad celular.....	204
6.4.4 Tinción nuclear.....	205
6.4.5 Ensayo COMETA.....	205
6.4.6 Citometría de flujo.....	207
6.4.7 Fotólisis.....	208
6.5 Resultados y discusión	210
6.5.1 Efectos fotodinámicos.....	210
6.5.1.1 Efectos fotodinámicos sobre la viabilidad celular.....	210
6.5.1.2 Efectos fotodinámicos sobre el núcleo.....	212
6.5.2 Estudios genotóxicos (Ensayo COMETA).....	214
6.5.3 Mecanismo de muerte celular.....	215
6.6 Conclusiones parciales	218
6.7 Referencias	221

Capítulo 7: Conclusiones generales

7.1 Resumen.....	225
7.2 Conclusiones generales.....	226
7.3 Lineamientos a futuro derivados de la presente tesis.....	228

ANEXO

Publicaciones generales de la presente tesis.....	231
Trabajos en colaboración.....	232
Actividades de Extensión y Articulación.....	233

Abreviaturas

τ	Tiempo de vida
ADN	Ácido desoxirribonucléico
AEF	Factor de Incremento analítico
ApoTf	Apotransferrina
Bpy	2,2'-bipiridina
BSA	Albúmina Sérica Bovina
Cr(4,7-diMephen)₃³⁺	Tris(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)Cr(III)
Cr(5-Clphen)₃³⁺	Tris(5-cloro-1,10-fenantrolina)Cr(III)
Cr(5-Mephen)₃³⁺	Tris(5-metil-1,10-fenantrolina)Cr(III)
Cr(5-Phphen)₃³⁺	Tris(5-fenil-1,10-fenantrolina)Cr(III)
Cr(phen)₃³⁺	Tris(1,10-fenantrolina)Cr(III)
DC	Dicroísmo Circulas
Dppz	Dipirofenazina
E	Eficiencia de Transferencia energética
FA	Fotoacústica
FACS	Clasificación de células activadas por fluorescencia
FRET	Transferencia de energía resonante
FT	Fototérmico
FTIR	Infrarojo con transformada de Fourier
HoloTf	Holotransferrina
HSA	Albúmina Sérica Humana
IR	Infrarojo
ITIES	Transferencia de iones entre dos soluciones de electrolitos no miscibles
K_b	Constante de asociación
K_{sv}	Constante de Stern volmer
MO	Microondas
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

PACT	Terapia fotodinámica antimicrobiana
PDT	Terapia fotodinámica
Phe	Fenilalanina
Phen	1,10-fenantrolina
Q	Quencher
<i>r</i>	Distancia donador aceptor
R₀	Radio crítico
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SERS	Espectroscopía Raman incrementada por superficie
TEM	Microscopía de Transmisión electrónica
Trf	Transferrina
TrfR	Receptor de la Transferrina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
UV	Ultravioleta
ΔG	Cambio de energía libre de Gibbs
ΔH	Cambio de entalpia
ΔS	Cambio de entropía
ϵ	Coeficiente de absorptividad
σ	Distancia interpartícula

Introducción

El estudio de los metales (y los complejos metálicos) interactuando con sistemas biológicos, ha cobrado en los últimos años un especial interés debido a la potencialidad de estos como posibles fármacos en el tratamiento de distintas enfermedades. Esta área, que involucra el estudio de compuestos inorgánicos en medios biológicos, se conoce como Química Bioinorgánica, y se encuentra en la interfase entre la Química y la Biología, pero toca de lleno modelos y conceptos de la Fisicoquímica, Biología molecular, Biología celular, Bioquímica, Medicina, Física, Química Inorgánica, Química Orgánica, etc.

S.J. Lippard¹ define las principales líneas de actuación de la Química Bioinorgánica como:

- Estudio de la función de los biometales^a y de sus mecanismos de acción.
- Síntesis de modelos sencillos que reproduzcan el comportamiento de sistemas más complejos (Por ejemplo, el estudio de centros activos de enzimas dependientes de iones metálicos).
- Adición de iones metálicos o complejos de coordinación a sistemas biológicos como pruebas de estructura y función.

Además de estos aportes de la Química Bioinorgánica, esta disciplina creciente ha tenido un especial interés desde que se propuso a determinados complejos de platino como potenciales fármacos anticancerígenos. Estos complejos metálicos de Pt(II) interactúan con las hebras de ADN y han sido relativamente eficaces en el tratamiento de varios tipos de cáncer, entre los que podemos incluir linfomas, sarcomas, algunos carcinomas, y tumores de células germinales. (Figura 1)

^a Los biometales son aquellos metales esenciales para la vida. Incluyen tanto a los metales que son esenciales en cantidades importantes (Calcio, Hierro, etc.) como a aquellos metales que son necesarios en trazas (Cobre, Cromo, etc.).

Sin embargo los complejos de Pt(II) no han sido los únicos metalofármacos estudiados en los últimos años. Podemos mencionar a los complejos de Ru(II) y Ru(III) ² utilizados como agentes antimetastásicos; o radiofármacos de Tc(V); o bien, complejos aurosos como agentes antiartríticos. Numerosos ejemplos nos muestran como la presencia de un átomo metálico interactuando con estructuras orgánicas, conforman un nuevo agente con propiedades importantes en relación a su actividad biológica, como por ejemplo: la citotoxicidad, genotoxicidad, selectividad, mecanismo de acción, farmacocinética, etc. ³

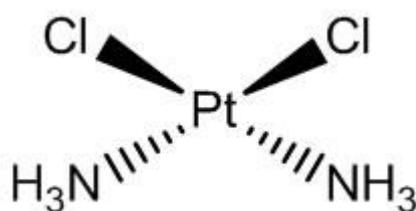


Figura 1. Cis-diaminodichloroplatino (II)

Uno de los caminos más importantes que ha tomado la Química Bioinorgánica es en relación con la Fotoquímica y la Fotofísica, permitiendo así explorar el efecto de la luz cuando un complejo metálico se encuentra inmerso en un sistema biológico.

En este sentido aparece como una de las estrategias terapéuticas para el tratamiento de lesiones neoplásicas, la terapia fotodinámica (PDT, del inglés Photodynamic Therapy).^{4,7} Esta terapia utiliza la absorción de un fotón por parte de un cromóforo para generar un estado excitado capaz de promover daño a nivel celular. En este sentido los complejos metálicos poseen propiedades fotofísicas y fotoquímicas interesantes en torno a la PDT. Entre ellas podemos mencionar que tienen tiempos de vida lo suficientemente largos como para generar daño, directo o indirecto (según los mecanismos de Foote) en una entidad celular. El estudio de estos mecanismos y de su efectividad

tiene una importancia clave a la hora de diseñar y sintetizar nuevos fotosensibilizadores para la PDT.

Es, quizás, uno de los inconvenientes mayores de los tratamientos anticancerígenos, la falta de selectividad de los fármacos para identificar a las células neoplásicas. Esto genera que el tratamiento no sea, a veces, lo suficientemente efectivo, y que, a su vez, genere efectos secundarios en el paciente. En este sentido la terapia fotodinámica aporta una gran ventaja, ya que esta necesita de irradiar el tejido a ser tratado, generando así daño celular solamente en el tejido irradiado. Esta ventaja de la PDT, es también una limitación, puesto que es una terapia que permite tratar lesiones neoplásicas que se encuentren accesibles a ser irradiadas, ya sea con una irradiación directa (cáncer de piel) o bien, una irradiación que implique el uso de fibras ópticas (cáncer de estómago, por ejemplo).

En los últimos años se ha profundizado sobre este aspecto diseñando distintas vías de transporte específico de fármacos, utilizando nanosistemas, polímeros, proteínas de transporte, etc. Se conoce que existen algunos receptores de membrana sobre-expresados en células tumorales, y esto motiva el uso de proteínas como agentes transportadores de fármacos.^{8,9,10,11,12}

Por último es interesante mencionar el aporte de la nanociencia a la medicina, ya sea como terapia o bien como método para diagnosticar patologías. La Nanociencia es la disciplina que se encarga de estudiar especies de tamaño nanométrico. En compuestos de este tamaño, las propiedades espectroscópicas difieren mucho de los compuestos en tamaños varios ordenes de magnitud mayores. Estas propiedades hacen rico el estudio de estos compuestos, ya que tienen un potencial importante en áreas tan variadas como la medicina, la industria, el arte, el deporte, etc.

Referencias

-
- ¹ S.J. Lippard, J.M. Berg, *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, **1994**.
- ² H. Sigel, *Metal ions in Biological System*, Vol. 11, *Metal complexes as anticancer agents*, Marcel Dekker Inc., New York, **1980**.
- ³ i) P.J. Sadler, *Advances in Inorganic Chemistry*, Vol. 36, *Inorganic Chemistry and Drug Design*, A.G. Sykes Ed. Academic Press, California, **1997**; ii) C.J. Jones, J.R. Thornback, *Medicinal Applications of Coordination Chemistry*, The Royal Society of Chemistry, **2007**.
- ⁴ V. Balzani, L. Moggi, M.F. Manfrin, F. Bolletta, G.S. Laurence, *Coord. Chem. Rev.*, 15 (**1975**) 321.
- ⁵ B.W. Henderson, T.J. Dougherty, *Photochem. Photobiol.*, 55 (**1992**) 145.
- ⁶ J.G. Levy, M. Obochi. *Photochem Photobiol.*, 64 (**1996**) 737.
- ⁷ T.J. Dougherty, *Photochem Photobiol.*, 58 (**1993**) 895.
- ⁸ L. Esserman, S. Takahashi, V. Rojas, R. Warnke, R. Levy, *Blood*, 74 (**1989**) 2718.
- ⁹ R. Sciot, A.C. Paterson, P. van Eyken, F. Callea, M.C. Kew, V.J. Desmet, *Histopathology*, 12 (**1988**) 53.
- ¹⁰ P.T. Gomme, K.B. MacCann, *Adv. Drugs Delivery Rev.*, 10 (**2005**) 267.
- ¹¹ H. Du, J. Xiang, Y. Zhang, Y. Tang, G. Xu, *J. Inorg. Biochem.*, 102 (**2008**) 146.
- ¹² S.C. Shivastava, L.F. Mausner, M.J. Clarke, *Ruthenium and other Non-Platinum Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, Ed. Springer-Verlag, Heidleberg, **1989**.

Aspectos teóricos y generales

Capítulo 1

1.1 Resumen

En el siguiente capítulo se detallan los aspectos teóricos más relevantes de los procesos fotoquímicos y fotofísicos que ocurren cuando un fotón interactúa con una molécula determinada. De manera más específica se detallan los aspectos más importantes de la fotofísica y fotoquímica de los complejos metálicos (de Rutenio y Cromo) que se utilizaron durante el transcurso de la tesis.

1.2 Procesos fotofísicos y fotoquímicos

1.2.1 Aspectos generales

Existen numerosas reacciones que se inician con la presencia de un fotón, algunas de suma importancia, como por ejemplo la fotosíntesis o la síntesis de la vitamina D que utilizan (comúnmente) la luz solar para poder ocurrir. También podemos incluir aquellos procesos de absorción de radiación ultravioleta (UV), que dan lugar al calentamiento de la atmósfera durante el día; o bien procesos de absorción de radiación infrarroja (IR) relacionados con el crecimiento y la producción de algunas proteínas en las plantas.

Al comienzo de cualquier proceso fotofísico o reacción fotoquímica, una molécula debe absorber un fotón. Cuando un fotón se encuentra en la vecindad de una molécula se produce una interacción entre el vector de campo eléctrico asociado a la molécula y el vector de campo eléctrico asociado al fotón. Esta interacción puede generar que el fotón sea absorbido por la molécula y le transfiera toda su energía, generando cambios en la estructura electrónica de la molécula.

La absorción de un fotón es el primer paso de una serie de múltiples pasos que nos llevarán hasta la obtención de un producto químico final distinto al inicial. El estado excitado formado posee una mayor energía que el estado fundamental haciéndola una especie inestable. Si la molécula no modifica su estructura química (proceso fotoquímico), perderá su energía de excitación para volver a su estado basal (proceso fotofísico). La diferencia en estos procesos reside en que en un proceso fotoquímico existe una modificación en la naturaleza química del compuesto, mientras que en un proceso fotofísico no.

Las vías de desactivación del estado excitado las podemos categorizar en las siguientes (Figura 1.1):

- Proceso radiativo o luminiscente, donde el estado excitado emite una radiación electromagnética de menor energía que la absorbida por la molécula, de este modo, la molécula retorna a su estado basal.
- Proceso no radiativo, donde la desactivación del estado excitado ocurre sin la emisión de radiación electromagnética, sino a través de calor.
- Proceso de *quenching*, donde otra especie (Q) presente en el medio puede desactivar el estado excitado.

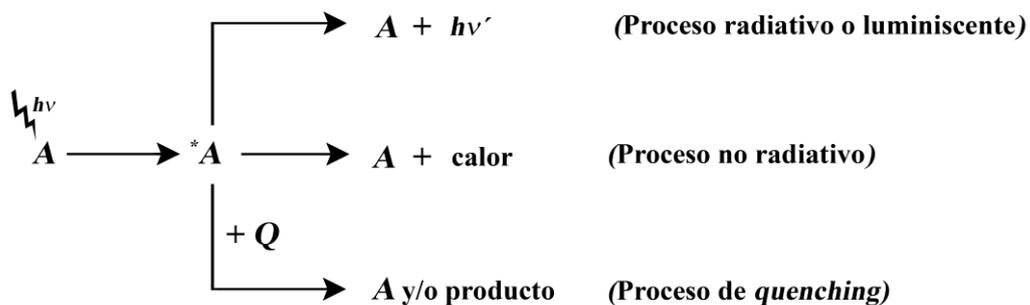


Figura 1.1 Esquema representativo de los procesos de desactivación del estado excitado

El diagrama de Jablonski es, quizás, el diagrama más explicativo de los procesos fotofísicos que ocurren cuando un fotón es absorbido por una molécula. La probabilidad de que un fotón se absorba está relacionada con la función de onda de los estados involucrados y con el número cuántico de espín. Podemos clasificar las transiciones electrónicas en prohibidas y permitidas, siendo estas últimas las que ocurren de un estado a otro que posee la misma multiplicidad. Las transiciones prohibidas son aquellas que involucran estados con distinta multiplicidad, y que se encuentran impedidas por reglas de selección de la mecánica cuántica y difícilmente se observan directamente en los espectros de absorción.

En casi todos los procesos fotofísicos, el primer estado excitado es un estado *triplete* y el fundamental es un estado *singlete*. Las reglas de selección indican que el estado triplete no puede poblarse directamente desde el estado

singlete fundamental. Sin embargo si es posible que el estado triplete se pueble a través de procesos de desactivación de estados superiores. En este sentido, como podemos observar, en un proceso fotofísico, hay por lo menos tres estados involucrados. (Figura 1.2)

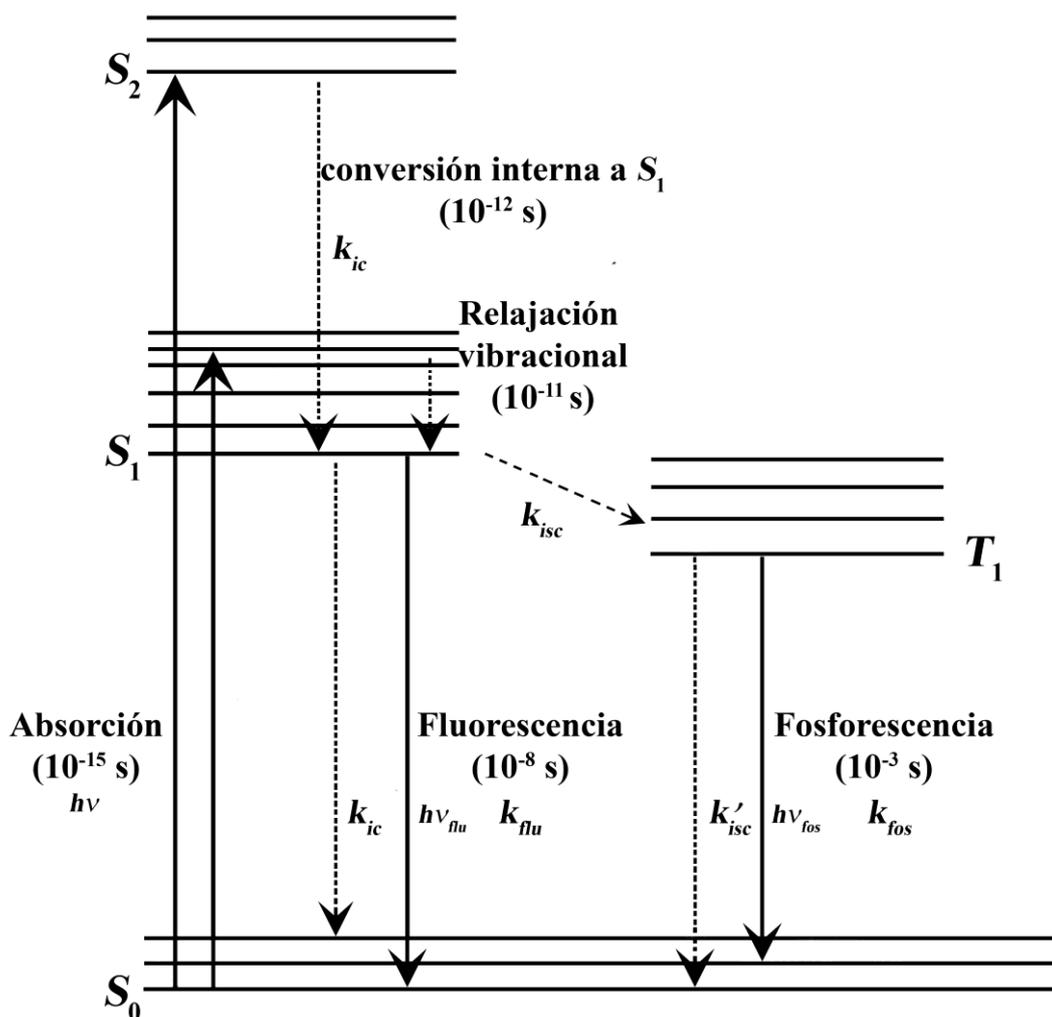


Figura 1.2 Diagrama de Jablonski donde se pueden observar los distintos procesos que ocurren desde que una especie absorbe un fotón. k_{ic} , k_{flu} , k_{isc} , k'_{isc} y k_{fos} son las constantes de velocidad unimoleculares para los procesos de conversión interna, fluorescencia, cruce intersistemas ($S_1 \rightarrow T_1$), cruce intersistemas ($T_1 \rightarrow S_0$) y fosforescencia, respectivamente.

La emisión de luz puede clasificarse, según de que estado superior provenga, en **fluorescencia** o **fosforescencia**. Si el estado excitado posee la misma multiplicidad que el estado fundamental estamos ante un proceso que podríamos denominar **fluorescencia**, mientras que si poseen diferente multiplicidad, es un proceso de **fosforescencia**. En este mismo sentido la desactivación no radiativa puede llamarse **conversión interna** cuando ocurre entre estados de igual multiplicidad, o **cruce intersistemas** cuando ocurre entre estados de diferente multiplicidad.

Cada proceso se encuentra caracterizado por su constante de velocidad, y cada estado excitado se encuentra, a su vez, también caracterizado por su **tiempo de vida**. Existe una relación estrecha entre estos dos parámetros, dada por la ecuación 1.1:

$$\tau = \frac{1}{\sum k_i}, \quad (\text{Ec. 1.1})$$

donde, k_i es la constante de decaimiento para un proceso i tal que conduce a la desaparición del estado excitado.

Para cada proceso, también se puede determinar el rendimiento cuántico, que se define como la relación entre la cantidad de especie formada y la cantidad de luz absorbida. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_{flu}) y de fosforescencia (Φ_{fos}) son cantidades características de cada especie y teniendo en cuenta el diagrama de Jablonski, pueden expresarse mediante las siguientes ecuaciones.

$$\Phi_{flu} = k_{flu} \tau_{S_1}, \quad (\text{Ec.1.2})$$

$$\Phi_{fos} = \eta_{isc} k_{fos} \tau_{T_1}, \quad (\text{Ec.1.3})$$

donde, τ_{S_1} y τ_{T_1} son los tiempos de vida del estado excitado singlete y triplete, respectivamente,

$$\tau_{S_1} = \frac{1}{k_{flu} + k_{ic} + k_{isc}} \quad \text{y} \quad \tau_{T_1} = \frac{1}{k_{fos} + k'_{isc}}, \quad (\text{Ec 1.4 y 1.5})$$

y η_{isc} es la eficiencia de población del estado excitado $A(T_1)$ a partir del estado $A(S_1)$:

$$\eta_{isc} = \frac{k_{isc}}{k_{flu} + k_{ic} + k_{isc}}. \quad (\text{Ec.1.6})$$

Cuando tenemos procesos de desactivación intramolecular que no son lo suficientemente rápidos, el estado excitado tiene una mayor probabilidad de encontrar una molécula diferente (Q) con la cual interactuar dando lugar a un proceso bimolecular. (Figura 1.3)

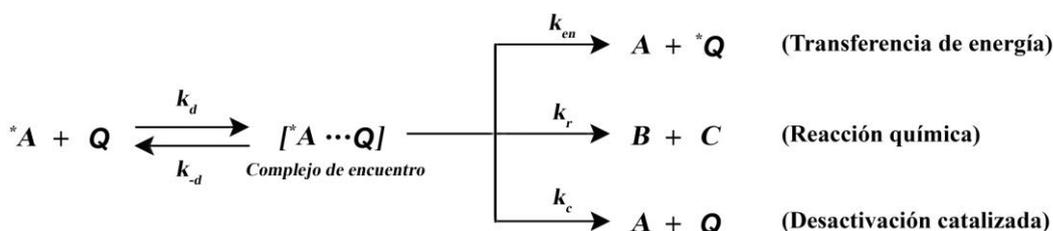


Figura 1.3 Esquema de los procesos que pueden ocurrir una vez que se encuentran la especie excitada *A y una molécula diferente Q.

Cabe aclarar que, en solución, solo aquellos estados excitados que posean tiempos de vida mayores que ~1ns van a tener la oportunidad de encontrarse con otras especies. Inicialmente cuando el estado excitado se encuentra con una molécula Q, se forma un complejo de encuentro, con sus respectivas constantes de formación y de disociación, que luego puede dar lugar a una transferencia energética, una reacción química, o bien una desactivación catalizada.

Los procesos de este tipo más comunes son los de transferencia energética y los de transferencia electrónica; estos últimos dan lugar a la reducción u oxidación de alguna de las dos especies involucradas.

La capacidad de un estado excitado en intervenir en un proceso de transferencia de energía está relacionada con las energías espectroscópicas de punto cero (E^{0-0})^a de las especies involucradas. Para los procesos de transferencia electrónica, los potenciales de oxidación y reducción del estado excitado ($^*A/A^+$ y $^*A/A^-$) son los parámetros termodinámicos relevantes. Debido a su alto contenido energético, un estado excitado es en general, un agente oxidante y/o reductor más fuerte que su estado fundamental.

1.2.2 Procesos de Transferencia Electrónica

La teoría de la transferencia electrónica puede aplicarse tanto a especies que se encuentren en su estado fundamental (transferencia de electrones térmica) como a especies que se encuentren en su estado excitado (transferencia de electrones fotoinducida).

En la Figura 1.4 se muestra el mecanismo general para un proceso de transferencia electrónica donde la sustancia D le transfiere un electrón a la especie A en su estado excitado. Llamaremos a la especie D =especie donora o donador y a A =especie aceptora o aceptor.¹

En la figura 1.4 podemos distinguir a k_d , k'_d , k_{-d} y k'_{-d} que son constantes de velocidad para la formación y desaparición del complejo de encuentro precursor y sucesor de esfera externa, respectivamente, k_e y k_{-e} son las

^a La energía espectroscópica de punto cero corresponde a la diferencia de energía entre el primer nivel vibracional del primer estado electrónico excitado ($A(S_1, \nu_0)$) y el primer nivel vibracional del estado electrónico fundamental ($A(S_0, \nu_0)$).

constantes de velocidad unimoleculares para la etapa de transferencia electrónica que involucra el estado excitado y $k_e(g)$ y $k_{-e}(g)$ son las correspondientes constantes de velocidad para el proceso de transferencia electrónica en el estado fundamental.

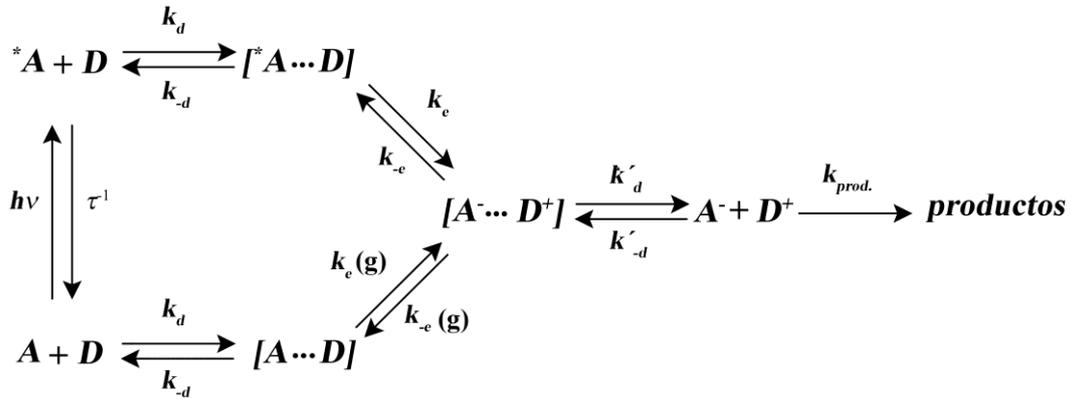


Figura 1.4 Mecanismo general para un proceso de transferencia electrónica desde el estado fundamental y desde un estado excitado.

Podríamos expresar el proceso de transferencia electrónica en una simple ecuación:



Y su correspondiente constante de velocidad experimental, puede expresarse como una función de las constantes de velocidad de las distintas etapas (Ec.1.8):

$$k_{\text{exp}} = \frac{k_d}{1 + \frac{k_{-d}}{k_e} + \frac{k_{-d}}{k'_d} \frac{k_{-e}}{k_e}}. \quad (\text{Ec.1.8})$$

1.2.3 Mecanismos de *Quenching*

Las sustancias que tienen la capacidad de inhibir la emisión lumínica de una especie en su estado excitado, son conocidos como *quenchers*, y el proceso por el cual se da esta inhibición es conocido como *quenching*. La interpretación teórica y mecanística de estos procesos son accesibles mediante el estudio de las constantes de *quenching* y de los rendimientos cuánticos de reacción.

La constante bimolecular de *quenching*, k_q , puede obtenerse mediante la medición de los tiempos de vida y/o de la intensidad de luminiscencia de una especie excitada (A^*) como una función de la concentración de *quencher* (Q), a partir de la ecuación de Stern-Volmer²

$$\frac{\tau_0}{\tau} = \frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q], \quad (\text{Ec.1.9})$$

donde τ_0 y τ son los tiempos de vida de la especie excitada en ausencia y presencia de Q, respectivamente; F_0 y F son las intensidades de luminiscencia de A^* en ausencia y presencia de *quencher*, respectivamente y K_{sv} es la constante de Stern-Volmer, siendo

$$K_{sv} = k_q \tau_0 \quad (\text{Ec.1.10})$$

Es importante distinguir que existen dos tipos de *quenchings*, el *quenching* dinámico (o colisional o bimolecular) y el *quenching* estático. En el primero lo que ocurre es la desactivación del estado excitado por una colisión con el *quencher*. En el segundo existe una asociación previa entre el estado fundamental y el *quencher*, que genera la desactivación de la emisión lumínica. (Figura 1.5) Graficando F_0/F y τ_0/τ en función de la concentración de Q, deberían ambas curvas coincidir y ser lineales con pendiente igual a K_{sv} si nos encontramos en presencia de un *quenching* puramente dinámico. Por el contrario si el *quenching* es puramente estático las mediciones resueltas en el

tiempo (τ_0/τ) no debieran sufrir cambio alguno en presencia de agregado de *quencher*.

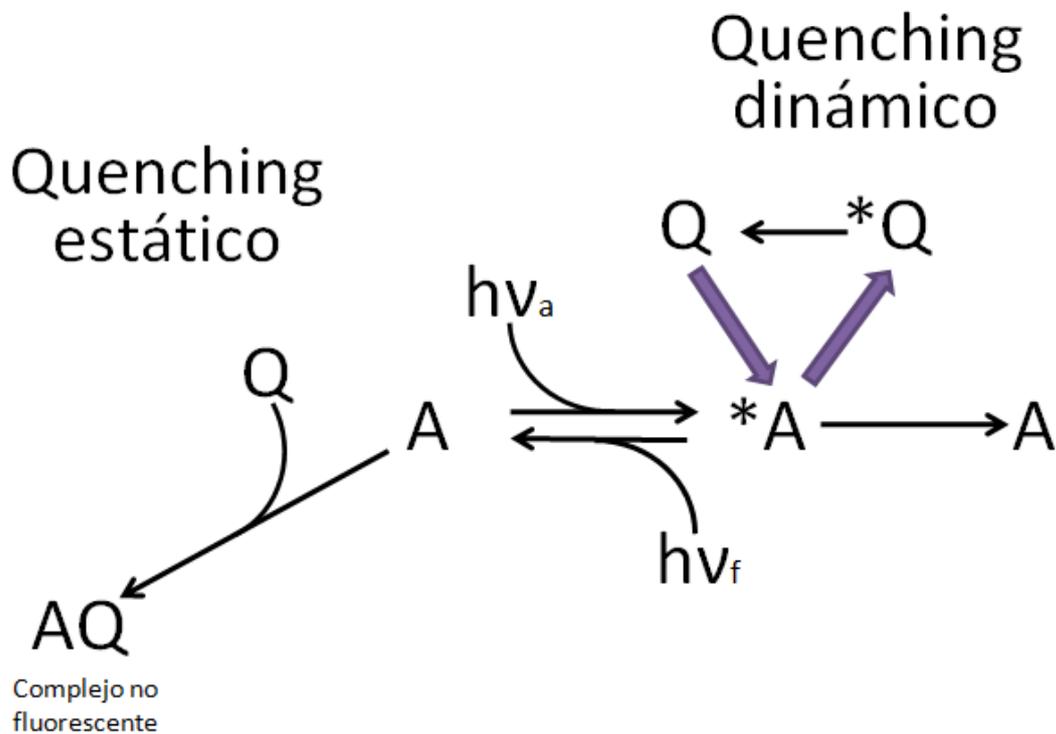


Figura 1.5 Esquema representativo para un proceso de *quenching* tanto estático, como dinámico.

Otro dato importante para caracterizar si nos encontramos frente a un *quenching* dinámico o estático, consiste en evaluar como se modifica la K_{sv} en presencia de un cambio de temperatura. Si estamos en presencia de un *Quenching* dinámico, con un aumento de temperatura, el *quencher* tiene mayor energía cinética, y por ende, mayor probabilidad de desactivar el estado excitado. Por este motivo aumenta la K_{sv} si el *quenching* es dinámico. Por el contrario una disminución de la temperatura, genera un proceso de favorecimiento de la asociación entre A y Q , y por ende un aumento en la K_{sv} , si el *Quenching* es estático.

1.2.4 Procesos de oxidación inducidos por sustancias fotosensibilizadoras

Los fotosensibilizadores tienen la capacidad de inducir procesos oxidativos en determinados sustratos. Si, por ejemplo, inducimos un proceso oxidativo en un sustrato biológico clave para el desarrollo de una célula, podríamos estar generando un daño que conduzca a la muerte celular. En esto se sustenta la terapia fotodinámica, que consiste en generar daño en células neoplásicas utilizando la acción combinada de un fotosensibilizador y luz visible.³⁻⁹

La PDT (*PhotoDynamic Therapy*) es una técnica que se ha estudiado profundamente en los últimos años. Desde la investigación básica hasta ensayos clínicos, esta técnica ha demostrado ser una técnica promisoriosa en el tratamiento de lesiones precancerosas y cancerosas, como así también en infecciones localizadas (PACT, photodynamic antimicrobial chemotherapy). La PDT ya posee procedimientos que han sido aprobados y adoptados por las agencias de salud de diferentes países.⁵⁻⁸

La estrategia de la PDT consiste en combinar dos agentes que por si solos no pueden generar daño celular: la luz y el fotosensibilizador. Sin embargo cuando se combinan estos dos agentes, nos encontramos frente a un fenómeno que puede llevar a la destrucción de células tumorales y la, posterior, erradicación de un tumor mediante la generación *in situ* de especies citotóxicas altamente reactivas. La presencia de oxígeno molecular disuelto se ha considerado como una condición necesaria para la obtención del fenómeno fototóxico deseado³⁻¹¹, sin embargo en una clásica discusión sobre los mecanismos de oxidación se puede encontrar que existen vías capaces de evitar la intervención del oxígeno.

Desde 1968, Foote¹¹ consideró dos categorías de fotoreacciones que prevalecen en soluciones aeróbicas y que son de suma importancia para la PDT. El primero de estos procesos tiene en cuenta la posibilidad de que el estado excitado del fotosensibilizador reaccione directamente con una molécula

del sustrato (S) y se genere una transferencia electrónica o de átomos de hidrógeno; este es conocido como mecanismo de Foote tipo I. Por otra parte, el mecanismo de Foote tipo II, considera que el proceso primario es la interacción entre el estado excitado del fotosensibilizador con una molécula de oxígeno.^{3-5,11} Figura 1.6

El estado excitado involucrado en estos procesos suele ser el primer estado excitado, *tripleto*, porque este estado vive mucho más tiempo con respecto al estado *singlete* y esto favorece interacciones entre este estado y el sustrato (S) y/o el oxígeno molecular.

En el mecanismo de Foote tipo I, el par radical del sustrato que se genera luego de la transferencia electrónica o de átomo de hidrógeno, puede reaccionar con oxígeno molecular disuelto pudiendo producir así una variedad de especies reactivas derivadas del oxígeno como ser radicales peróxido (HOO^\bullet en su forma protonada), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e hidroxilos (HO^\bullet), entre otros. Por su parte, en las reacciones de mecanismo de Foote tipo II, la especie reactiva formada es el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2^*$).

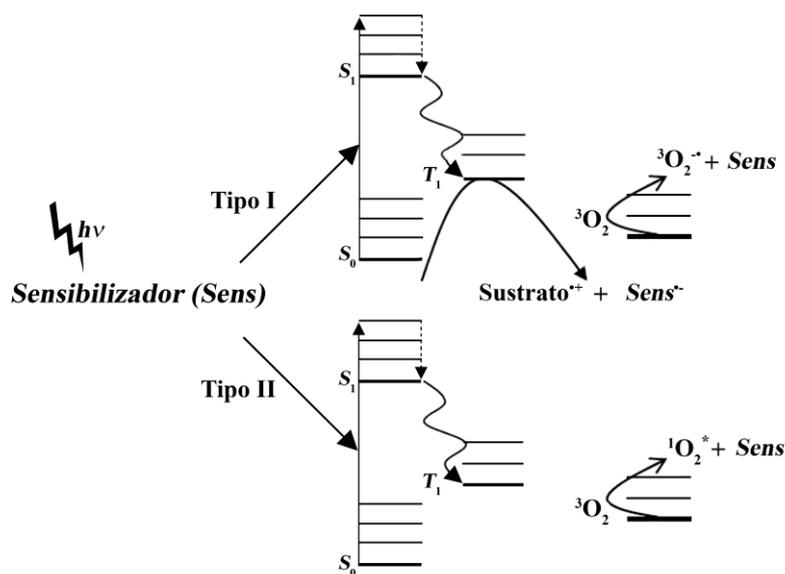


Figura 1.6 Representación esquemática de los mecanismos de Foote tipo I y tipo II

Cuando las especies se encuentran libres en solución los parámetros que gobiernan el tipo de mecanismo son las k_I y k_{II} y las concentraciones de sustrato y oxígeno presentes. Sin embargo el panorama cambia rotundamente cuando tenemos el fotosensibilizador asociado (enlace no covalente) a algún sustrato biológico, como ser una proteína, una membrana, o el mismo ácido desoxirribonucleico (ADN).^{12,13,14,15,16} Al estar el agente fotosensible (en su estado basal) asociado a un sustrato, el mecanismo Tipo I se vuelve mucho más competitivo, especialmente cuando el fotosensibilizador se encuentra en una región de difícil acceso al oxígeno molecular. En otras palabras, la asociación a un sustrato ofrece un resguardo contra el *quenching* difusional por el oxígeno^{17,18}.

Es importante considerar otros aspectos también cuando existe una asociación del fotosensibilizador en su estado basal a un biopolímero. Por ejemplo, dada la naturaleza del microambiente en el que se puede ubicar el fotosensibilizador, pueden existir cambios en las propiedades fotofísicas y fotoquímicas del mismo. Por otra parte considerando la ubicación del fotosensibilizador, la dinámica de separación de los productos fotoquímicos primarios puede verse alterada, por lo que vías de reacción que no se observan para especies libres en solución, pueden volverse más competitivas en espacios restringidos.

1.3 Propiedades fotofísicas y fotoquímicas de los complejos metálicos

1.3.1 Aspectos generales

A pesar de que ambas familias de complejos -Ru(II) y Cr(III)- son de microsimetría octaédrica (O_h), poseen propiedades fotofísicas bien diferentes. Los complejos polipiridínicos del Cr(III) poseen una configuración del estado fundamental (t_{2g}^3) con simetría octaédrica d^3 , mientras que los complejos de Ru(II) poseen una configuración de estado fundamental (t_{2g}^6), también con simetría octaédrica d^3 .

Los complejos de Cr(III) poseen un estado fundamental 4A_2 y el estado excitado más bajo permitido es el 4T_2 , mientras que el más bajo prohibido por espín son dos estados dobles muy cercanos entre sí que se encuentran en equilibrio térmico ($^2T_1/{}^2E$)^{19,20}. (Figura 1.7)

Cabe aclarar que durante el transcurso de la tesis se trabajó con mayor ahínco en los complejos polipiridínicos del Cr(III), mientras que los complejos de Ru(II) se utilizaron solamente como agentes agregantes en los sistemas nanoscópicos. Por tal motivo el desarrollo de este capítulo apuntará en su mayoría a exhibir mayoritariamente los aspectos teóricos de los complejos de Cr(III).

1.3.2 Espectro de absorción del estado fundamental

En un contexto de microsimetría octaédrica, el estado fundamental de los complejos de Cromo (III) es un estado 4A_2 , es decir un estado con multiplicidad^b

^b La multiplicidad de un sistema se define como $2s+1$, donde s es el número cuántico de spin.

cuartete. La letra A que asigna el estado se refiere al número cuántico azimutal (en notación espectroscópica) y el subíndice 2 corresponde al número cuántico de momento angular total. Todos los estados electrónicos se definen de este modo.

En la Figura 1.8 podemos observar los espectros de absorción para los complejos $[\text{Cr}(\text{bpy})_3]^{3+}$ (bpy = 2,2'-bipiridina) y $[\text{Cr}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{3+}$ (dppz = dipirido[3,2-a:2',3'-c]-fenacina). Existen tres bandas correspondientes a transiciones permitidas por espín (${}^4\text{A}_2 \rightarrow {}^4\text{T}_n$, $n = 1$ y 2) en la región del ultravioleta y visible, y dos más débiles (${}^4\text{A}_2 \rightarrow {}^2\text{T}_n$, $n = 1$ y 2) prohibidas por espín en la zona del rojo.^{21,22}

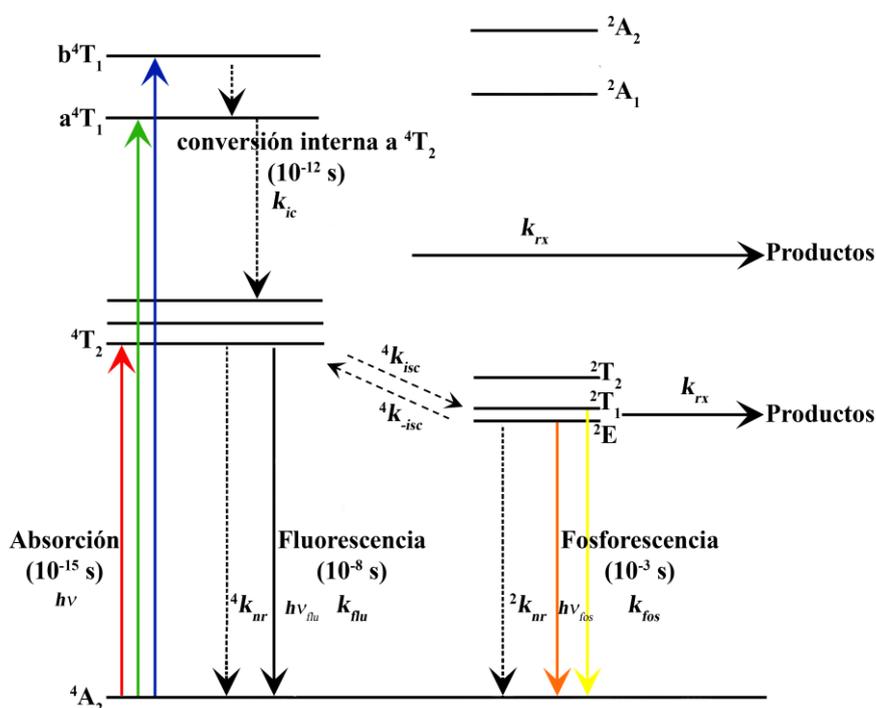


Figura 1.7 Diagrama de Jablonski para el complejo metálico $\text{Cr}(\text{bpy})_3^{3+}$. Dada la similitud en el comportamiento fotofísico, este esquema se aplica para todos los complejos polipiridínicos de Cr(III) estudiados en esta tesis. Adaptado de la referencia²³

Para el complejo $[\text{Cr}(\text{bpy})_3]^{3+}$ se ven las tres bandas $\lambda = 427, 346$ y 283 nm se asignaron a las transiciones ${}^4\text{A}_2 \rightarrow {}^4\text{T}_2$, ${}^4\text{A}_2 \rightarrow {}^4\text{T}_1$ y ${}^4\text{A}_2 \rightarrow {}^4\text{T}_1$,

respectivamente, correspondientes al acoplamiento $d-d$ y modo vibracional del ligando. Las bandas de absorción en la región de $\lambda = 306$ nm y $\lambda = 280-230$ nm corresponden a transiciones $\pi-\pi^*$ centradas en el ligando.^{24,25}

Para el complejo $[\text{Cr}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{3+}$, por ejemplo, se presentan dos bandas características, una de baja intensidad a $\lambda = 430$ nm, correspondiente a la transición $d-d$ del metal y otra de mayor intensidad correspondiente a las transiciones electrónicas del tipo $\pi-\pi^*$, características del ligando dppz,²⁶ en la región de $\lambda = 350-380$ nm.²⁷

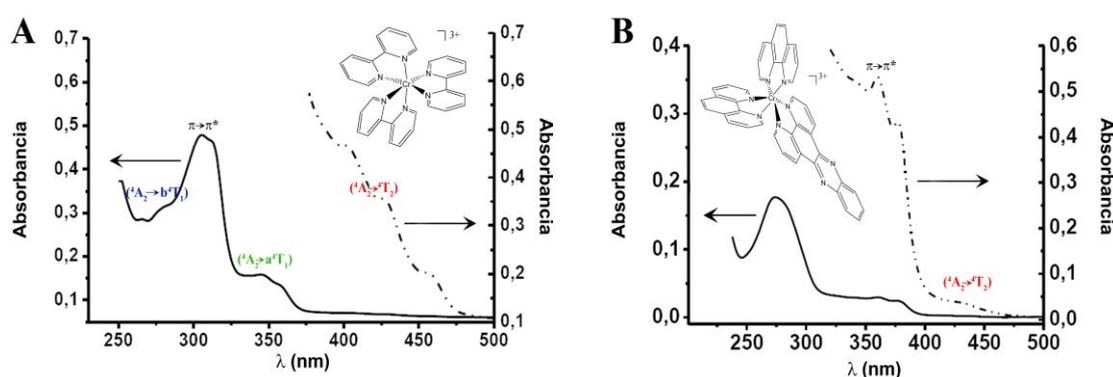


Figura 1.8 Espectro de absorción para el $[\text{Cr}(\text{bpy})_3]^{3+}$ (A) y el $[\text{Cr}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{3+}$ (B). Las curvas continuas y punteadas corresponden a diferentes concentraciones. Adaptado de referencia²⁸

Es importante destacar que la introducción de sustituyentes en los ligandos bpy o phen (1,10-fenantrolina) genera cambios en las propiedades fotofísicas de los complejos que se traducen en cambios en el espectro de absorción del estado fundamental.^{25,29} A modo de ejemplo cuando la bpy se sustituye por una especie metílica (Me) o bencénica (Ph) en la posición 4,4', se induce un corrimiento hacia el azul de la principal banda de absorción en la región visible. Por otro lado los valores de los coeficientes de extinción se incrementan de modo abrupto cuando los ligandos tanto phen como bpy se encuentran sustituidos por Ph.

1.3.3 Espectro de absorción del estado excitado

La técnica de flash fotólisis permite obtener los espectros de absorción del estado excitado de diversas moléculas para obtener información sobre las propiedades fotofísicas de dichas moléculas. La excitación es generada a través de un láser pulsado, y la especie transitoria que se forma presenta un espectro de absorción característico. En la figura 1.9 podemos observar el espectro de absorción del estado excitado del complejo $[\text{Cr}(\text{phen})_3]^{3+}$ ($^*[\text{Cr}(\text{phen})_3]^{3+}$).

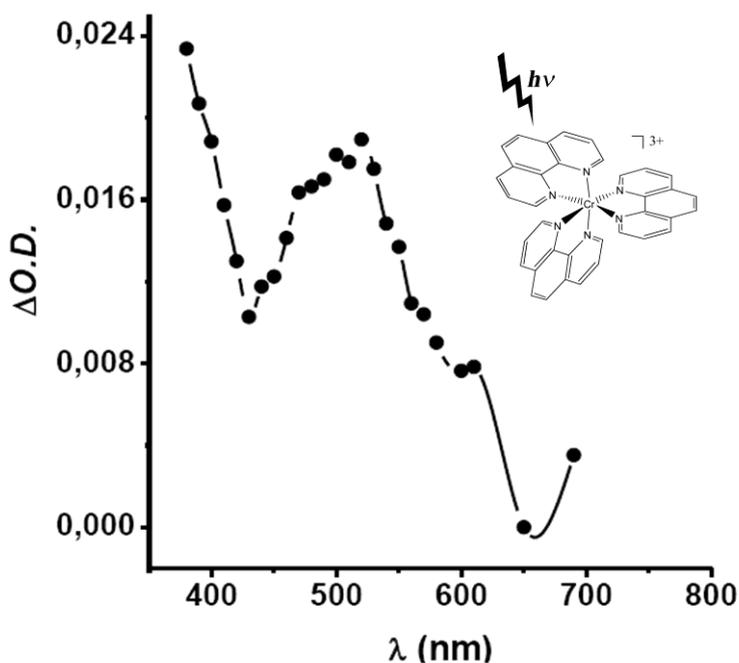


Figura 1.9 Espectro de absorción del $[\text{Cr}(\text{phen})_3]^{3+}$ en su estado excitado. Espectro tomado a 150 μs luego del flash del láser. $\lambda_{\text{exc}}=337$ nm. Adaptado de la referencia 29.

Dicho espectro ($^2T_1/{}^2E$) se caracteriza por exhibir una extensa banda centrada en $\lambda = 515$ nm (asignada a la transición ${}^2E \rightarrow b^2T_1$)²⁸. Esta banda es

poco sensible a la sustitución de los ligandos en las posiciones 4,7 y 3,4,7,8 por grupos Me. Sin embargo, la presencia de grupos Ph, en las posiciones 4,7 y la sustitución en la posición 5 con Cl induce un corrimiento hacia mayores longitudes de onda de la principal banda de absorción ~ 20 nm.²⁸

1.3.4 Decaimiento de los estados excitados

El decaimiento radiativo de los complejos de Cr(III) ha sido motivo de estudio intenso en las últimas décadas.³⁰⁻³⁵ Una vez que el complejo absorbe un fotón, se ocupa un estado excitado 4T_2 que rápidamente (~10ps) se despuebla, a través de un cruce entre sistema, a un estado *doblete*. Desde aquí se da la emisión fosforescente.

Cabe aclarar que el rendimiento cuántico de cruce intersistemas (Φ_{isc}) a los estados *doblete* tiene un valor próximo a 1,0. Para ser más precisos 0,95³⁶ o 1,0^{37,38} para $[Cr(phen)_3]^{3+}$ y 1,0³⁹ para $[Cr(bpy)_3]^{3+}$.

El espectro de emisión de fosforescencia posee dos bandas bien definidas, las cuales son asignadas a las transiciones $^2E \rightarrow ^4A_2$ (la mayor centrada cerca de los 725nm) y $^2T_1 \rightarrow ^4A_2$ (el *hombro* centrado cerca de los 695nm). El decaimiento de las dos bandas de emisión presenta un tiempo de vida similar. (Figura 1.10)

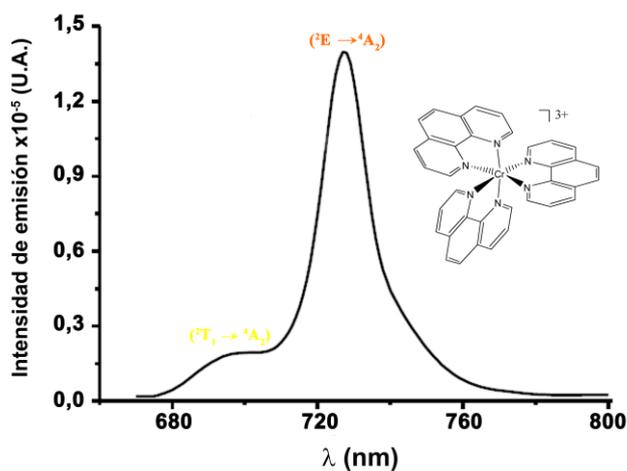


Figura 1.10 Espectro de emisión para el $[Cr(phen)_3]^{3+}$ a temperatura ambiente.

La presencia de sustituyentes en los ligandos, o el reemplazo de un ligando fenantrolina por uno similar, como puede ser el dppz no genera cambios radicales sobre la longitud de onda del máximo de emisión. Sin embargo el tiempo de vida del estado excitado y los potenciales rédox si pueden variar significativamente.^{24,40}

1.3.5 Relajación del estado excitado

El tiempo de vida de los estados excitados *doblete* es controlado por todos los procesos que toman partido con ese estado; a considerar decaimientos radiativos (k_r), no radiativos (k_{nr}) y procesos fotoquímicos (k_{rx}):

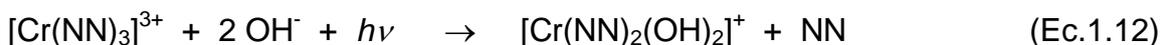
$$\tau_0 = \frac{1}{k_r + k_{nr} + k_{rx}} \quad (\text{Ec 1.11})$$

El proceso no radiativo (k_{nr}), es el que más contribuye al tiempo de vida del estado excitado, ya que el rendimiento cuántico de emisión es bajo ($\Phi_r < 0,001$)^{21,41} y $\Phi_{rx} \leq 0,2$ por lo tanto se podría expresar el tiempo de vida como $\tau_0 \approx 1/k_{nr}$. El hecho de que los complejos se encuentren sustituidos no genera cambios en el rendimiento cuántico de emisión.

1.3.6 Reacciones de fotosolvólisis

Los complejos de Cr(III) como todos los complejos inorgánicos pueden sufrir reacciones de sustitución en las que los ligandos se sustituyen por moléculas de solvente, actuando este como un nucleófilo. Este tipo de reacciones se puede dar tanto en presencia de luz, como en ausencia de ella.

En soluciones acuosas (neutras o básicas) de $[\text{Cr}(\text{phen})_3]^{3+}$ y $[\text{Cr}(\text{bpy})_3]^{3+}$, la presencia de luz conduce a reacciones donde se sustituye uno de los ligandos bidentados por moléculas de H_2O o OH^- a través de la siguiente reacción:



Esta reacción de fotosolvólisis es también llamada, por ser el sustituyente H_2O o OH^- , reacción de fotoacuación; y es una reacción altamente dependiente del pH de la solución. En tal sentido en la figura 1.11 se muestra como varía el rendimiento cuántico de fotoacuación (Φ_{fot}) y la constante de velocidad térmica de sustitución (k_{th}) en función del pH para el $[\text{Cr}(\text{bpy})_3]^{3+}$ (sin embargo cabe aclarar que todos los complejos polipiridínicos de Cr(III) poseen un comportamiento similar).^{21,24,42}

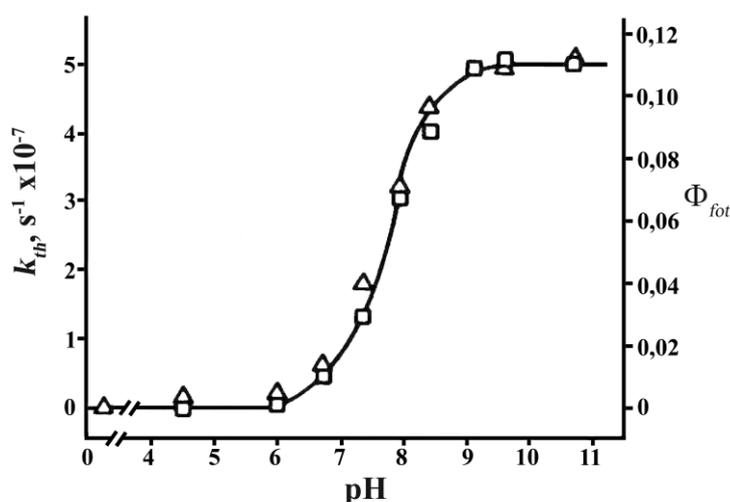


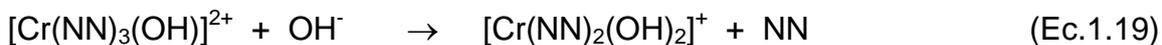
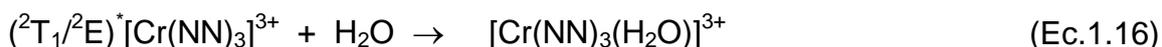
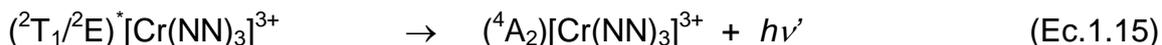
Figura 1.11 Representación gráfica de la relación entre el rendimiento cuántico de fotoacuación (Φ_{fot}) y la constante de velocidad térmica de sustitución (k_{th}) y el pH para el $[\text{Cr}(\text{bpy})_3]^{3+}$. Adaptado de la referencia ²¹.

1.3.7 Mecanismo de fotosustitución

El mecanismo más aceptado para entender el proceso de fotosustitución por una molécula de agua (fotoacuación), involucra necesariamente al estado

excitado ${}^2T_1/{}^2E$. La evidencia más clara de que este estado excitado se encuentra involucrado en el proceso de fotoacuación es el hecho de que un *quencher* que desactive dicho estado excitado, genera que el rendimiento de la fotoacuación disminuya un 97%.

El mecanismo de reacción propuesto es el siguiente:



La presencia del intermediario $[Cr(NN)_3(H_2O)]^{3+}$ es clave para entender la dependencia del rendimiento cuántico de fotoacuación con el pH. Es un intermediario que se encuentra presente en los procesos de sustitución tanto en la vía fotoquímica como en la vía térmica.^{24,40,42}

1.3.8 Propiedades Rédox

La voltametría cíclica permite conocer los potenciales de reducción de los complejos polipiridínicos de Cr(III) en su estado basal, mientras que para conocer los potenciales de reducción del estado excitado (${}^*E^0$ Cr(III)/Cr(II)) se debe aplicar la siguiente ecuación (ec 1.20):

$$E^0([\text{Cr}(\text{NN})_3]^{3+/2+}) = E^0([\text{Cr}(\text{NN})_3]^{3+/2+}) + E_{00}([\text{Cr}(\text{NN})_3]^{3+}) \quad (\text{Ec.1.20})$$

donde $E^0([\text{Cr}(\text{NN})_3]^{3+/2+})$ es el potencial de reducción del estado fundamental y $E_{00}([\text{Cr}(\text{NN})_3]^{3+})$ es la energía del estado excitado.^{24,40}

En la Tabla 1.1 podemos observar los potenciales de reducción del estado fundamental y del estado excitado *doblete* para algunos de los complejos de Cr(III) estudiados en la presente tesis:

Tabla 1.1 Potenciales redox para los complejos polipiridínicos de Cr(III) en su estado fundamental y en su estado excitado. Electrodo de referencia de Ag/AgCl Datos de referencia 27,43

Complejos del Cr(III)	E^0, V Cr(III)/Cr(II)	${}^*E^0, V(^2T_1/{}^2E)$ ${}^*\text{Cr(III)/Cr(II)}$
$[\text{Cr}(\text{phen})_3]^{3+}$	-0,28	1,42
$[\text{Cr}(5\text{-Mephen})_3]^{3+}$	-0,30	1,40
$[\text{Cr}(4,7\text{-diMephen})_3]^{3+}$	-0,45	1,24
$[\text{Cr}(3,4,7,8\text{-tetraMephen})_3]^{3+}$	-0,57	1,11
$[\text{Cr}(5\text{-Phphen})_3]^{3+}$	-0,21	1,49
$[\text{Cr}(5\text{-Clphen})_3]^{3+}$	-0,17	1,53
$[\text{Cr}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{3+}$	-0,17	1,53

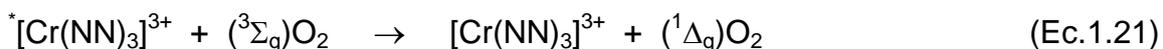
Como se puede observar existe una diferencia notable entre los potenciales de reducción de un estado fundamental y el de un estado excitado, al menos para los complejos de Cr(III). Esto es una evidencia contundente del alto poder oxidante que poseen los estados excitados (en comparación con su estado fundamental) y como esto favorece que estos compuestos sean buenos agentes fotosensibilizadores para la PDT.

1.3.9 Reacciones de Transferencia energética y electrónica del estado excitado

El tiempo de vida en solución acuosa de los complejos polipiridínicos de Cr(III) oscila entre los 40 y 700 μ s. Este tiempo de vida es mucho más largo que el de los complejos de Ru(II) (~100ns), que han sido los complejos metálicos estudiados por excelencia de cara a la PDT. En este sentido los complejos de Cr(III) poseen una ventaja mayor (comparativamente con los complejos de Ru(II)), ya que *tienen más tiempo* para reaccionar con algún sustrato biológico y así generar daño celular en algún tejido neoplásico. Además de esta propiedad clave para la PDT, existen otras propiedades que los hacen buenos candidatos como, absorber luz visible, ser fotoestables en medio ácido, de fosforecer a temperatura ambiente, etc.

Un dato importante a considerar es que algunos fotosensibilizadores (cuyo mecanismo es de Foote tipo II) pierden efectividad en regiones tumorales que sufren hipoxia (baja concentración de oxígeno molecular). En este sentido los complejos de Cr(III) poseen una amplísima ventaja, ya que se ha demostrado que la principal vía de reacción de estos, no involucra al oxígeno molecular. Las constantes de *quenching* bimolecular para el estado excitado $^2T_1/{}^2E$ de los $Cr(NN)_3^{3+}$ con O_2 son del orden de $10^7 M^{-1}s^{-1}$, valor radicalmente más bajo que aquellos procesos que ocurren controlados difusionalmente. Este valor de k_q es entre 100 y 1000 veces más chico que las k_q para estados *tripletes* de compuestos orgánicos que reaccionan con O_2 .^{29,44}

La reacción de generación del estado $^1\Delta_g$ del O_2 se da a través de la siguiente ecuación:



Brunschwig B. S. y Sutin N.²⁹ sugieren que en el proceso de *quenching* se da la formación del intermediario $^1\Sigma_g$ que luego decae al estado reactivo $^1\Delta_g$. La transferencia de energía entre el estado excitado de los $Cr(NN)_3^{3+}$ y el

estado ($^3\Sigma_g$)O₂ es factible si comparamos sus energías (alrededor de 13700cm⁻¹ para el donador y 12900cm⁻¹ para el aceptor).

El estado *doblete* de los complejos de Cr(III) puede conducir a reacciones de *quenching* tanto oxidativo como reductivo^{24,29,40,45}, siendo estos procesos de especial interés no solo para la PDT, sino también para posibles aplicaciones en el campo del diseño de fotoceldas solares.

1.3.10 Toxicidad de los complejos metálicos de Cr(III)

Lo primero que es clave a la hora de entender la toxicidad de los complejos metálicos, es que la naturaleza orgánica de los ligandos genera que, como es bien sabido, las propiedades del catión metálico aislado sean extremadamente diferentes a cuando este se encuentra quelado por especies orgánicas. Lo segundo que es clave para analizar las propiedades tóxicas de los complejos de Cr(III) es que existe una diferencia abismal entre diferentes estados de oxidación. Así para el caso particular del átomo de cromo aislado, en función del estado de oxidación del mismo, podemos tener una especie altamente reactiva y peligrosa por su capacidad carcinogénica, como es el Cr(VI). O bien, podemos tener una especie más estable y que, no solo no genera daño al organismo, sino que se convierte en un metal esencial para la vida, como es el caso del Cr(III).

El Cr(III) es un oligoelemento esencial para la vida que cumple la función de potenciar la acción de la insulina e influir en el metabolismo de los carbohidratos, las proteínas y las grasas. Un déficit de dicho metal puede generar, entre otros, algún tipo de intolerancia a la glucosa, hiperglucemia en ayunas (alta concentración de glucosa en sangre), hiperlipidemia (nivel de grasa elevada en la sangre), o en casos más severos, hipercolesterolemia o diabetes tipo II.^{46,47}

Por el contrario el cromo hexavalente es una especie altamente dañina para cualquier organismo por su alta capacidad oxidante. Las fuentes de este compuesto son mayoritariamente provenientes de la industria, sobretodo de la producción de algunas pinturas, pigmentos, tintas, etc. Los daños que puede provocar este compuesto dependen del tiempo de exposición y la vía de ingreso al organismo. Las enfermedades más comunes involucran: irritación, alergias, dermatitis, asma, bronquitis, ulceración de mucosas gástricas e intestinales, cáncer de hígado, daño renal, etc.^{48,49,50,51}

Como ya mencionamos existe una diferencia considerable entre el átomo metálico aislado y quelado con ligandos orgánicos. Un estudio reciente muestra que los complejos fenantrolínicos de Cr(III) inducen apoptosis en linfocitos, con la formación de especies reactivas del oxígeno (EROS) y de tirosinas quinasas. Otros trabajos, sobre el efecto en fibroblastos, muestran que la presencia de complejos de Cr(III) genera condensación de la cromatina, formación de cuerpos apoptóticos, y formación de ADN aneuploide. Sin embargo, a pesar de la existencia de trabajos que profundizan sobre la citotoxicidad, genotoxicidad y los mecanismos de daño celular de los complejos de Cr(III), estos no hacen foco sobre el efecto de la presencia de luz en los sistemas de trabajo.

1.3.11 Interacción con ADN

Uno de los principales blancos de acción para generar daño en sistemas tumorales, es el ADN.⁵² Por tal motivo muchos fotosensibilizadores se diseñan pensando en la posibilidad de actuar sobre este biopolímero.^{53,54,55,56} El modo de interaccionar que tiene un complejo de metal de transición con el ADN puede darse a través de tres mecanismos: electrostático, superficial (sobre los surcos de la doble hélice) o de intercalación.^{57,58}

El mecanismo electrostático está fuertemente ligado a la carga del complejo metálico, que está dada por la carga positiva del núcleo metálico y por la naturaleza de los ligandos presentes en el complejo. Complejos con carga positiva son fuertemente atraídos por el esqueleto de residuos fosfatos periféricos en la doble hélice del ácido nucleico. El mecanismo de interacción superficial ocurre en los surcos mayor y menor de la doble hélice, y generalmente es una interacción gobernada por puentes de hidrógeno.

Por último, los complejos metálicos que se unen por intercalación de las hebras de ADN tienen ligandos aromáticos heterocíclicos planos y espacialmente extendidos, los cuales pueden insertarse y anclarse en el espacio existente entre los pares de bases nitrogenadas en la doble hélice. En este sentido el ligando dppz cumple con los requisitos necesarios para intercalarse.^{59,60,61}

En trabajos previos de Toneatto et al. se ha observado que la asociación del $[\text{Cr}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{3+}$ sigue, principalmente un modelo de intercalación que involucra la inserción y posterior anclaje del ligando dppz entre los pares de bases del ADN; mientras que por otro lado el complejo $[\text{Cr}(\text{phen})_3]^{3+}$ tiene una interacción con el ADN de tipo superficial en el surco menor de la hebra de ADN. En ninguno de los dos casos se puede descartar la presencia de interacciones electrostáticas debido a la carga de ambos complejos involucrados en el proceso.^{62,63}

1.4 Referencias

-
- ¹ V. Balzani, F. Bolletta, F. Scandola, *J. Am. Chem. Soc.*, 102 (1980) 2152.
 - ² J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Ed. Kluwer/Plenum-2^o ed., New York, 1999.
 - ³ B.W. Henderson, T.J. Dougherty, *Photochem. Photobiol.*, 55 (1992) 145.
 - ⁴ J.G. Levy, M. Obochi, *Photochem Photobiol.*, 64 (1996) 737.
 - ⁵ T.J. Dougherty, *Photochem Photobiol.*, 58 (1993) 895.
 - ⁶ D. Kessel, *Drugs Today*, 32 (1996) 385.
 - ⁷ I.K. Kandela, J.A. Bartlett, G.L. Indig, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 1 (2002) 309.
 - ⁸ C.S. Oliveira, K.P. Branco, M.S. Baptista, G.L. Indig, *Spectrochim. Acta Part A*, 58 (2002) 2971.
 - ⁹ A. Katrin, M.D. Salva, *Clinics in dermatology*, 20 (2002) 571.
 - ¹⁰ L.M. Lewis, G.L. Indig, *Dyes Pigm.*, 46 (2000) 145.
 - ¹¹ C.S. Foote, *Science*, 162 (1968) 963
 - ¹² G. Oster, J.S. Bellin, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 294.
 - ¹³ J.S. Bellin, C.A. Yankus, *Arch. Biochem. Biophys.*, 123 (1968) 18.
 - ¹⁴ S. Yariv, D.K. Ghosh, L.G. Hepler, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 87 (1991) 1201.
 - ¹⁵ G. Jones, M.A. Rahman, *J. Phys. Chem.*, 98 (1994) 13028.
 - ¹⁶ M.S. Baptista, G.L. Indig, *J. Phys. Chem. B*, 102 (1998) 4678.
 - ¹⁷ G. Cilento, *Experientia*, 44 (1988) 572.
 - ¹⁸ G. Cilento, W. Adam, *Free Radicals Biol. Med.*, 19 (1995) 103
 - ¹⁹ N.A.P. Kane-Maguire, J. Conway, C.H. Langford, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1974) 801.
 - ²⁰ N.A.P. Kane-Maguire, R.C. Kerr, J.R. Walters, *Inorg. Chim. Acta*, 33 (1979) L163.
 - ²¹ E. Konig, S. Herzog, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 32 (1970) 585.
 - ²² N. Serpone, M.A. Jamieson, R. Sriram, M.Z. Hoffman, *Inorg. Chem.*, 20 (1981) 3983.
 - ²³ M. Maestri, F. Bolletta, L. Moggi, V. Balzani, M.S. Henry, M.Z. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.*, 100 (1978) 2694.

-
- ²⁴ M.A. Jamieson, N. Serpone, M.Z. Hoffman, *Coord. Chem. Rev.*, 39 (1981) 121.
- ²⁵ N. Serpone, M.A. Jamieson, S.S. Emmi, P.G. Fuochi, Q.G. Mulazzani, M.Z. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.*, 103 (1981) 1091.
- ²⁶ C. Hiort, P. Lincoln, B. Nordén, *J. Am. Chem. Soc.*, 115 (1993) 3448.
- ²⁷ K.D. Barker, K.A. Barnett, S.M. Connell, J.W. Glaeser, A.J. Wallace, J. Wildsmith, B.J. Herbert, J.F. Wheeler, N.A.P. Kane-Maguire, *Inorg. Chim. Acta*, 316 (2001) 41.
- ²⁸ K.D. Barker, K.A. Barnett, S.M. Connell, J.W. Glaeser, A.J. Wallace, J. Wildsmith, B.J. Herbert, J.F. Wheeler, N.A.P. Kane-Maguire, *Inorg. Chim. Acta*, 316 (2001) 41.
- ²⁹ N. Serpone, M.A. Jamieson, M.S. Henry, M.Z. Hoffman, F. Bolletta, M. Maestri, *J. Am. Chem. Soc.*, 101 (1979) 2907.
- ³⁰ B.S. Brunschwig, N. Sutin, *J. Am. Chem. Soc.*, 100 (1978) 7568.
- ³¹ R. Sriram, M.Z. Hoffman, M.A. Jamieson, N. Serpone, *J. Am. Chem. Soc.*, 102 (1980) 1754.
- ³² M.A. Jamieson, C.H. Langford, N. Serpone, M.W. Hersey, *J. Phys. Chem.*, 87 (1983) 1004.
- ³³ M.A. Jamieson, N. Serpone, M.Z. Hoffman, F. Bolletta, *Inorg. Chim. Acta*, 72 (1983) 247.
- ³⁴ G. Neshad, M.Z. Hoffman, M. Bolte, R. Sriram, N. Serpone, *Inorg. Chem.*, 26 (1987) 2984.
- ³⁵ D. Lynch, J.F. Endicott, *Inorg. Chem.*, 27 (1988) 2181.
- ³⁶ N.A.P. Kane-Maguire, C.H. Langford, *J. Am. Chem. Soc.*, 94 (1972) 2125.
- ³⁷ F. Bolletta, M. Maestri, V. Balzani, *J. Phys. Chem.*, 80 (1976) 2499.
- ³⁸ N.A.P. Kane-Maguire, C.H. Langford, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1971) 895.
- ³⁹ R.L.P. Sasseville, C.H. Langford, *Inorg. Chem.*, 19 (1980) 2850.
- ⁴⁰ K. Kalyanasundaram, *Photochemistry of polypyridine and porphyrin complexes*, Academic press, Cap. 8, London, 1992.
- ⁴¹ A.D. Kirk, G.B. Porter, *J. Phys. Chem.*, 84 (1980) 887.

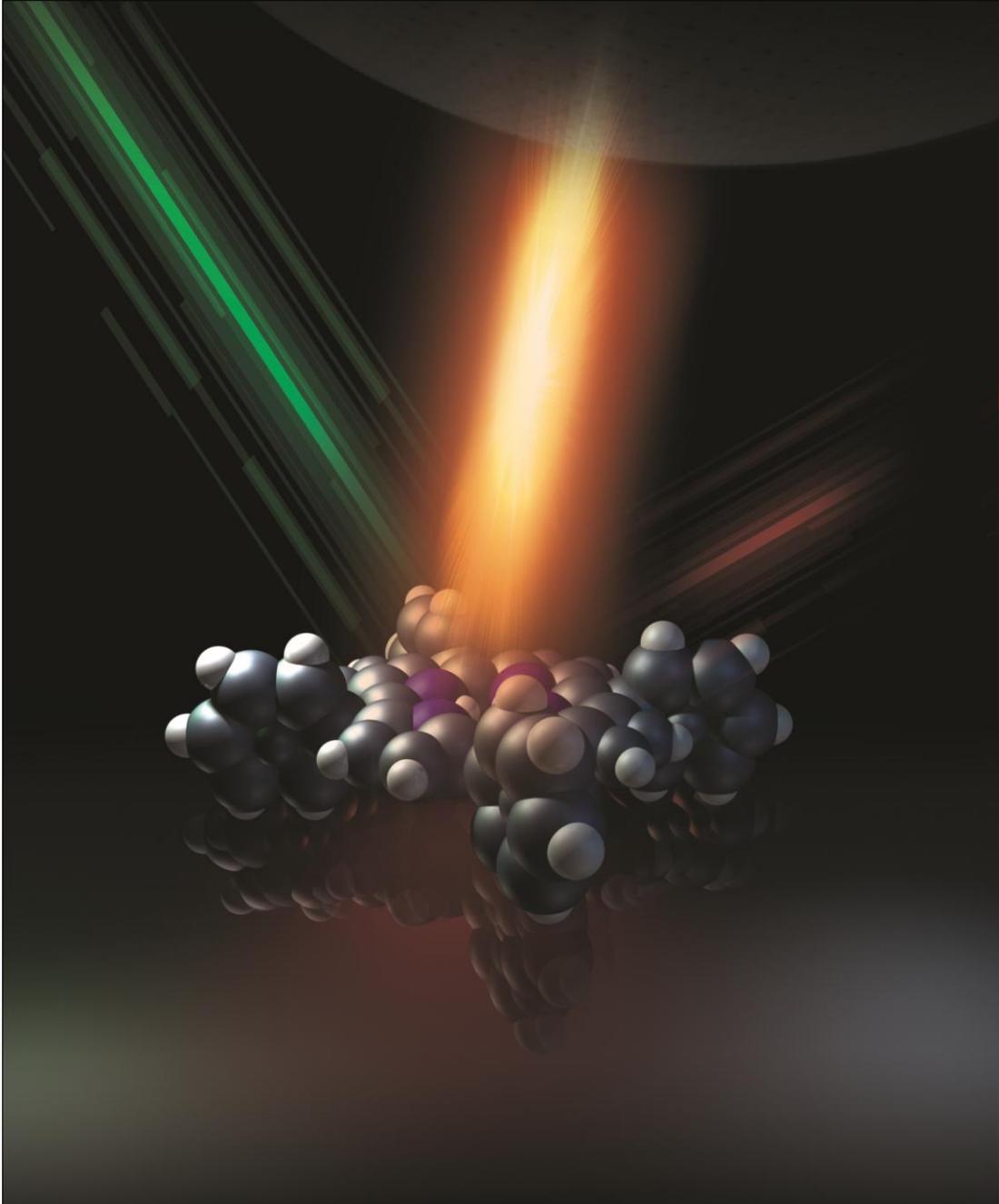
-
- ⁴² F. Bolletta, M. Maestri, L. Moggi, M.A. Jamieson, N. Serpone, M.S. Henry, M.Z. Hoffman, *Inorg. Chem.*, 22 (1983) 2502.
- ⁴³ N. Serpone, M.Z. Hoffman, *J. Chem. Educ.*, 60 (1983) 853.
- ⁴⁴ N. Serpone, M.A. Jamieson, M.Z. Hoffman, *Inorg. Chim. Acta*, 31 (1978) L447.
- ⁴⁵ D. Pagliero, G.A. Argüello, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 138 (2001) 207
- ⁴⁶ Schwarz K.; Mertz W. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 85 (1959) 292-295
- ⁴⁷ Balk E.M.; Tatsioni A.; Lichtenstein A.H.; Lau J.; Pittas A.G.; *Diabetes Care* 30 (2007) 2154-2163
- ⁴⁸ Bielicka, A. *Polish Journal of Environmental Studies* 14 (2005) (1) 5-10
- ⁴⁹ Gutierrez, M. Miranda, J. *Estudios de Caso: Cromatos de México. Capitulo III UNAM* (1994) 14,35,81,86-98 108-111.
- ⁵⁰ Sugden, K.; Campo, C.; Martin, B. *Chem. Res. in Tox.*, 14 (2001) 1315-1322
- ⁵¹ Valko, M.; Rhodes, C.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M. *Chemico-Biological Interactions*, 160 (2006) 1-40
- ⁵² B. Elias, A. Kirsch-D. Mesmaeker, *Coord. Chem. Rev.*, 250 (2006) 1627.
- ⁵³ S.J. Lippard, *Acc. Chem. Res.*, 11 (1978) 211.
- ⁵⁴ D.S. Sigman, T.W. Bruice, A. Mazumder, C.L. Sutton, *Acc. Chem. Res.*, 26 (1993) 98.
- ⁵⁵ B. Nordén, P. Lincoln, B. Akerman, E. Tuite, *DNA interactions with substitution-inert transition metal ion complexes, in Metal ions in biological systems*, Vol. 33 (1996) pp 177.
- ⁵⁶ C. Metcalfe, J.A. Thomas, *Chem. Soc. Rev.*, 32 (2003) 214.
- ⁵⁷ A. Kirsch-De Mesmaeker, J.P. Lecomte, J.M. Kelly, *Topics en Current Chemistry*, 177 (1996) 25.
- ⁵⁸ P.J. Carter, S.A. Ciftan, M.F. Sistare, H.H. Thorp, *J. Chem. Educ.*, 74 (1997) 641.
- ⁵⁹ K.E. Erkkila, D.T. Odom, J.K. Barton, *Chem. Rev.*, 99 (1999) 2777.
- ⁶⁰ Y. Sun, D.A. Lutterman, C. Turro, *Inorg. Chem.*, 47 (2008) 6427.

⁶¹ S. Delaney, M. Pascaly, P.K. Bhattacharya, K. Han, J.K. Barton, *Inorg. Chem.*, 41 (2002) 1966.

⁶² Toneatto J.; Boero R. A.; Lorenzatti G.; Cabanillas A. M.; Argüello G. A.; *J. Inorg. Biochem.* 104 (2010) 697-703.

⁶³ Toneatto J.; Lorenzatti G.; Cabanillas A. M.; Argüello G. A.; *J. Inorg. Biochem.* 15 (2012) 43-46.

Materiales y métodos experimentales



Capítulo 2

2.1 Resumen

En el presente capítulo se mencionan y describen los materiales y las técnicas empleadas en la presente tesis doctoral. Uno de los logros del presente trabajo de doctorado es quizás la amplitud de técnicas utilizadas durante el desarrollo de la misma: involucrando metodologías netamente de la biología celular hasta técnicas de la fisicoquímica.

2.2 Materiales

2.2.1 Complejos polipiridínicos

Los complejos $\text{Tris}(1,10\text{-fenantrolina})\text{Cr}(\text{III})$, $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$, $\text{Tris}(5\text{-metil-}1,10\text{-fenantrolina})\text{Cr}(\text{III})$, $\text{Cr}(5\text{-Mephen})_3^{3+}$, $\text{Tris}(4,7\text{-dimetil-}1,10\text{-fenantrolina})\text{Cr}(\text{III})$, $\text{Cr}(4,7\text{-diMephen})_3^{3+}$, $\text{Tris}(3,4,7,8\text{-tetrametil-}1,10\text{-fenantrolina})\text{Cr}(\text{III})$, $\text{Cr}(3,4,7,8\text{-tetraMephen})_3^{3+}$, $\text{Tris}(5\text{-fenil-}1,10\text{-fenantrolina})\text{Cr}(\text{III})$, $\text{Cr}(5\text{-Phphen})_3^{3+}$ y $\text{Tris}(5\text{-cloro-}1,10\text{-fenantrolina})\text{Cr}(\text{III})$, $\text{Cr}(5\text{-Clphen})_3^{3+}$, como sales de perclorato, fueron sintetizados por nuestro grupo, según procedimientos reportados en bibliografía^{1,2,3} y purificados por recristalización. Las estructuras de los ligandos se muestran en la Figura 2.1.

Las soluciones *stock* de los complejos $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$, $\text{Cr}(5\text{-Mephen})_3^{3+}$, $\text{Cr}(4,7\text{-diMephen})_3^{3+}$, $\text{Cr}(3,4,7,8\text{-tetraMephen})_3^{3+}$, $\text{Cr}(5\text{-Phphen})_3^{3+}$ y $\text{Cr}(5\text{-Clphen})_3^{3+}$ se prepararon en solución amortiguadora (*buffer*) fosfato (0,04 M PO_4^{3-} , 0,1 M NaCl, pH = 7,4) y las concentraciones se determinaron por espectroscopía UV-visible usando los siguientes coeficientes de extinción molar: $\epsilon_{354} = 4.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{275} = 63.778 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{380} = 3.388 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{320} = 12.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{243} = 93.325 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{275} = 61.660 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectivamente.

También se trabajó con el complejo de rutenio comercial $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$.

2.2.2 Proteínas

Las proteínas: albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos y de globulinas (BSA, A-0281), albúmina sérica humana libre de ácidos grasos y de globulinas (HSA, A-3782), apotransferrina bovina libre de hierro (apoTf, T-1428) y holotransferrina bovina saturada de hierro (holoTf, T-1283) fueron obtenidas de Sigma-Aldrich Corporation.

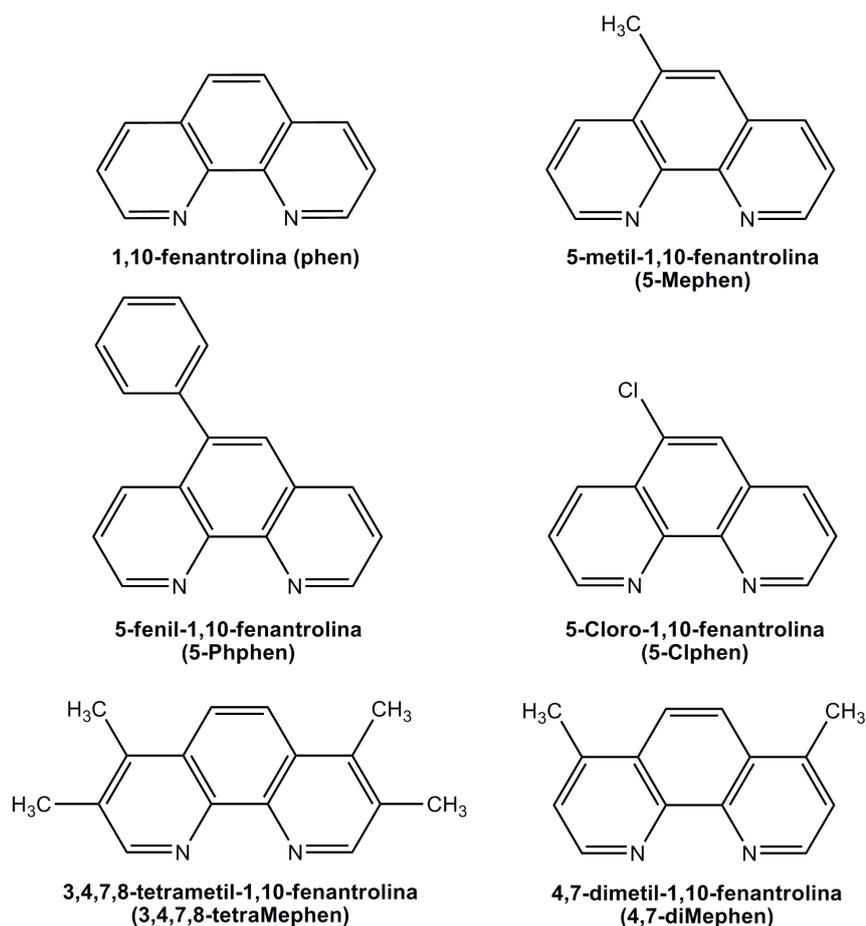


Figura 2.1 Estructuras de los ligandos de los complejos polipiridínicos del Cr(III) en estudio.

2.2.3 Otros reactivos

Los *buffers* fueron preparados a partir de: TRIS (Anedra), NaCl (Cicarelli), EDTA (Anedra), NaH₂PO₄ (Anedra) en agua Millipore Milli Q (18,5 MΩ cm⁻¹). Otros solventes y reactivos utilizados fueron: ácido clorhídrico (Merck), metanol HPLC (MeOH, Merck), ácido acético (HAc, Dorwil), agarosa (Seakem LE agarose -Bioproducts, p.a.), bromuro de etidio (BrEt, Bio-Rad), glicerina bidestilada (Cicarelli, p.a.), azul de bromofenol (Merck), Células competentes (XL1-Blue Subcloning-Grade, Stratagene La Jolla, CA, USA), Agar-agar

(Britania), triptona (Britania), extracto de levadura (Britania), MgCl_2 (Cicarelli) y MgSO_4 (Cicarelli).

2.3 Metodologías experimentales

2.3.1 Espectrofotometría de Absorción UV-visible

La espectroscopía de absorción UV-visible es una técnica óptica basada en la absorción de luz por parte de algunas moléculas, denominadas cromóforos. La relación existente entre la intensidad de luz antes (I_0) y una vez transmitida (I) a través de una muestra dada, es lo que se conoce como transmitancia (T). Este parámetro, no sólo depende de la presencia de cromóforos en la muestra, sino de la capacidad de absorción de estos, su concentración y la longitud de onda de la radiación incidente. La aplicación cuantitativa de este fenómeno se fundamenta en la Ley de Lambert-Beer (Ec.2.1), que establece una relación de proporcionalidad directa entre la concentración de la sustancia absorbente y la cantidad de luz absorbida por ésta, para una determinada longitud de onda (λ):

$$A_\lambda = \log\left(\frac{I_0}{I_T}\right) = \varepsilon_\lambda \times l \times c, \quad (\text{Ec.2.1})$$

donde A es la absorbancia (adimensional), I_T e I_0 son los flujos fotónicos transmitido e incidente, respectivamente, l es el paso óptico (espesor atravesado por el haz de luz, en cm), c es la concentración de la sustancia absorbente (en moles/litro) y ε es el coeficiente de absortividad molar o coeficiente de extinción, característico de un cromóforo a una longitud de onda dada (en $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Esta constante es una propiedad molecular para un solvente dado, a una temperatura y presión particular.

Las limitaciones que surgen en las medidas de absorbancia derivan de las desviaciones instrumentales o químicas que se producen en la ley de Lambert-Beer. Así, a concentraciones elevadas (generalmente $> 0,01 \text{ M}$) la distancia

entre las moléculas absorbentes es tan pequeña que interaccionan entre sí, alterando la capacidad de absorción de la especie a una determinada longitud de onda. Del mismo modo, se producen desviaciones químicas de esta ley cuando se produce la asociación, disociación o interacción del cromóforo con el disolvente, originando una nueva especie cuyo espectro de absorción es diferente del de la especie inicial.

Los espectros de absorción de las especies estudiadas fueron obtenidos con un espectrofotómetro UV-visible (UV-Vis) Agilent modelo 8453 con detector PDA (Arreglo de Fotodiodo), con resolución 1 nm. El equipo cuenta con un porta celda termostatazido, el cual permitió realizar experimentos con control de temperatura. (Figura 2.2)



Figura 2.2 Espectrofotómetro de Absorción UV-visible

2.3.2 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR, Fourier Transform Infrared)

La espectroscopía Infrarroja es una técnica analítica instrumental que permite conocer los principales grupos funcionales de la estructura molecular de un compuesto. Luego de someter a una muestra a radiación infrarroja, se recoge la luz remanente para determinar la absorbancia del compuesto. Los fotones infrarrojos tienen la capacidad de generar transiciones en los niveles vibracionales y rotacionales de las moléculas.

Al igual que las transiciones electrónicas, las transiciones vibracionales corresponden a energías específicas, y las moléculas solo absorben radiación IR a una longitud de onda (y frecuencia) particular. Debido a la posibilidad de transiciones entre estados de energía vibracionales y rotacionales de las moléculas, una molécula puede absorber la energía de fotones en el rango energético del IR si se produce un cambio en el momento dipolar de la molécula durante un movimiento vibracional o rotacional, entonces se dice que son vibraciones activas al IR. Cuanto mayor sea el cambio en el momento dipolar del enlace provocado por la excitación, mayor será la intensidad de la absorción de la molécula. Además, es necesario que la energía que incide sobre ella, sea del mismo valor que la energía de vibración que poseen las moléculas de esa sustancia. Ya que en una molécula existen diferentes átomos que forman distintos enlaces, en el espectro de IR aparecerán bandas de absorción a distintos valores de frecuencia o longitud de onda.

La región entre 1400cm^{-1} a 4000cm^{-1} es de especial utilidad para la identificación de muchos grupos funcionales presentes en la molécula orgánica. Las absorciones que aparecen en esta zona, proceden fundamentalmente de las vibraciones de estiramiento. La zona situada a la derecha de 1400cm^{-1} , es por lo general, compleja, debido a que en ella aparecen vibraciones de *stretching* (estiramiento) y *bending* (flexión). Esta zona del espectro se

denomina “Región de la huella dactilar” por ser extremadamente específica para cada molécula.

Un espectrofotómetro FTIR utiliza un interferómetro. La luz IR va desde la fuente lumínica hasta un separador de haz luminoso (de KBr pulido) y colocado a un ángulo de 45° con respecto al haz. Parte de la luz atraviesa el separador y parte es reflejada con un ángulo de 90° . La luz reflejada incide sobre un espejo estacionario, mientras que la transmitida sobre un espejo que se mueve a velocidad constante. Los rayos retornan de los espejos para recombinarse en el separador. Los rayos del espejo móvil han recorrido una distancia diferente a la recorrida por los del espejo fijo y los dos tipos de rayos se combinan para crear un modelo de interferencia denominado interferograma. Dicho interferograma, que contiene simultáneamente todas las frecuencias pero desfasadas unas de otras una fracción de segundo, pasa luego a través del compartimiento de la muestra hasta alcanzar el detector.

El espectro de IR se puede registrar utilizando muestras sólidas, líquidas, o gaseosas. Los sólidos se pueden analizar después de un tratamiento previo de triturar y dispersar la muestra en un soporte de KBr, hasta conseguir una muestra homogénea que se somete a altas presiones en un molde.

Para esta tesis se utilizó un equipo FTIR Bruker IFS 28, con un detector DTGS (Cristal piroeléctrico de sulfato de triglicina deuterada).

2.3.3 Luminiscencia⁴

Cuando una molécula se excita por la radiación UV-Vis, los electrones más externos que participan en sus enlaces son promovidos a niveles electrónicos energéticamente superiores y, dentro de estos, a distintos niveles vibracionales. El primer proceso que se produce tras la excitación de una molécula es la relajación vibracional, liberando así una parte (muy pequeña) de la energía adquirida con la absorción de luz. Desde el estado vibracional más

bajo de un estado electrónico excitado, la molécula puede volver al estado fundamental emitiendo un fotón de luz. Este fenómeno es lo que se denomina, de manera general, luminiscencia y se caracteriza por ocurrir a longitudes de onda superiores a las de la luz incidente, debido a la pérdida de energía producida por la relajación vibracional. La distancia existente entre la longitud de onda del máximo de absorción y emisión en un compuesto se denomina **desplazamiento de Stokes**. Sin embargo, en la mayoría de las moléculas orgánicas, la desactivación de la molécula excitada electrónicamente se produce mediante un proceso de **conversión interna** (seguido de relajación vibracional), en el que los electrones pasan a niveles electrónicos inferiores sin emisión de luz. Este proceso compite cinéticamente de manera eficaz con la luminiscencia, lo que se traduce en un número muy limitado de moléculas emisoras de luz.

Según el **Principio de exclusión de Pauli**, en un orbital no puede haber más de dos electrones y estos deben tener los espines apareados, dando lugar a especies diamagnéticas y a estados electrónicos singlete. Cuando uno de estos electrones es promocionado a un nivel energéticamente superior conserva su espín, generando de nuevo un estado singlete desde el que puede desactivarse emitiendo un fotón de luz, en un fenómeno que se denomina **fluorescencia**, o bien invertir su espín, generando un nuevo estado de menor energía, conocido como estado triplete, en un proceso denominado **cruce intersistemas**. El cambio de espín es un fenómeno poco común y está favorecido en moléculas con un alto número de electrones. Cuando la desactivación ocurre desde un triplete a un singlete con emisión de luz se denomina **fosforescencia**. Los tiempos de permanencia de la molécula en el estado excitado son mucho mayores en este caso (μs – ms) que en los procesos que implican fluorescencia (ns), ya que se requiere el cambio de espín, con lo que se favorece la competencia de otros sistemas de desactivación no radiativos. Por esta razón se conocen muy pocas especies que emitan fosforescencia a temperatura ambiente.

2.3.3.1 Luminiscencia resuelta en el tiempo

Esta técnica se utilizó principalmente en la medición de los tiempos de vida de fosforescencia de los diferentes complejos del tipo $[\text{Cr}(\text{NN})_3]^{3+}$ y $[\text{Cr}(\text{NN})_3 \cdot x(\text{N}'\text{N}')_x]^{3+}$ y para las medidas de *quenching*. Las experiencias consistieron en irradiar la solución del fluoróforo (complejo metálico) contenida en una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico con las cuatro caras pulidas, con una fuente de luz pulsada; en este caso se utilizó un láser de NdYAG, (**Figura 2.3**) $\lambda = 355$ nm, cuyo pulso tiene un tiempo de 5 ns. La luminiscencia se recoge a 90° con un monocromador Oriel 77200 y se detecta con un tubo fotomultiplicador Hamamatsu R928 extendido al rojo.



Figura 2.3 Sistema láser para las mediciones resueltas en el tiempo

La señal proveniente del fotomultiplicador se digitalizó y almacenó a través de un osciloscopio LeCroy SS 140. Se adquirieron los decaimientos de emisión correspondientes a un promedio de 8 a 16 señales, dependiendo de la relación señal-ruido. Las curvas obtenidas se ajustaron mediante cuadrados mínimos no lineales, con una función monoexponencial, y las curvas de los datos procesados fueron representadas gráficamente con programas adecuados. Los

datos experimentales fueron analizados con el programa Origin Versión 7.5 de Origin Lab Software Corporation.

2.3.3.2 Luminiscencia en estado estacionario

Las mediciones de intensidad de luminiscencia se realizaron con un espectrofluorómetro PTI QM2 (Quanta Master 2) de Photon Technology Internacional (**Figura 2.4**), el cual posee como fuente de excitación una lámpara de Xe de 75 W y como detector un contador de fotones.

Las medidas de *quenching* del estado excitado de los complejos polipiridínicos del Cr(III) se llevaron a cabo con el uso de un filtro de corte $\lambda = 620$ nm (rojo) a fin de eliminar el segundo orden de la red de difracción del equipo que se sitúa en la región donde emiten los complejos del Cr(III) en estudio (longitud de onda de excitación, $\lambda_{exc.} = 305-420$ nm según el complejo).

Las medidas de *quenching* de intensidad de luminiscencia de proteínas se realizaron usando como longitudes de onda de excitación $\lambda = 280$ y 295 nm, obteniendo los espectros de emisión en la región de $\lambda = 300-500$ nm. A su vez, las intensidades de fluorescencia fueron corregidas por filtro interno (*FI*), usando la siguiente (Ec.2.2),

$$FI = K[10^{-\varepsilon_{exc}l_1c} (1 - 10^{-\varepsilon_{exc}l_2c}) 10^{\varepsilon_{em}l_3c}], \quad (Ec.2.2)$$

donde $\varepsilon_{exc.}$ y $\varepsilon_{em.}$ son los coeficientes de absorción molar de todas las especies presentes a la longitud de onda de excitación y de emisión, respectivamente, c la concentración de las especies presentes que absorben; l_1 , l_2 y l_3 son parámetros que tienen en cuenta la distancia de recorrido del haz en la celda, 0,4, 0,2 y 0,5 cm, respectivamente y K es una constante que incorpora los diferentes parámetros instrumentales y el rendimiento cuántico de fluorescencia.

Los datos se procesaron con el Software del equipo y a posteriori representados gráficamente con el programa Origin Versión 7.5 de Origin Lab Software Corporation.



Figura 2.4 Espectrofluorómetro PTI de Quanta Master 2

2.3.4 Fotólisis continua y pulsada

Los experimentos de fotólisis continua se realizaron con un sistema de LEDs blancos (type NSPW500CS, Nichia America Corporation, $I_0 = 2,1 \times 10^{15}$ fotones $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ o $2,1 \times 10^{-7}$ einstein min^{-1} , determinada por actinometría, usando ferrioxalato de potasio como actinómetro). La irradiación incidió de forma vertical a la muestra. La longitud de onda de irradiación fue $\lambda = 457 \text{ nm}$.

La elección de la fuente de irradiación fue en función de lograr una absorción selectiva, es decir que la única especie que absorbiera la irradiación fuera el complejo metálico presente en el medio de reacción. De esta manera la $\lambda = 457 \text{ nm}$ corresponde a la banda de absorción centrada en el metal para los complejos polipiridínicos del Cr(III), desde la percepción de la teoría del campo de los ligandos.

Las muestras fotolizadas se analizaron usando las técnicas de espectrofotometría UV–Vis, luminiscencia estacionaria, electroforesis en geles de agarosa.

2.3.5 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Esta técnica espectroscópica puede utilizarse solo para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones (o de ambos). Los núcleos atómicos más estudiados son los de ^1H y ^{13}C . Un núcleo con un número atómico impar, o con un número de masa impar tiene un espín nuclear que se puede observar en el espectrómetro de RMN. Este tipos de núcleos son magnéticamente activos, ya que poseen carga positiva y un movimiento de rotación sobre un eje, el cual genera un campo magnético, llamado *momento magnético*. En ausencia de campo magnético externo (B_0), los espines nucleares se orientan al azar, mientras que en presencia de un campo magnético B_0 los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo, en un estado de mínima energía. Este estado es llamado de espín α . Por otra parte, los núcleos con espín negativo se orientan en dirección opuesta a la del campo magnético en un estado de mayor energía llamado de espín β .

Como el estado de espín α es de menor energía, hay mas protones con espín α que con β . La diferencia de energía entre los dos estados depende de la fuerza del campo magnético aplicado (B_0). Cuanto mayor sea el campo

magnético, mayor diferencia energética habrá entre los dos estados de espín. Cuando una muestra que contiene un compuesto orgánico es irradiada brevemente por un pulso intenso de radiación, los núcleos en el estado de espín α son promovidos al estado β . Esta radiación se encuentra en la región de las radiofrecuencias del espectro electromagnético. Cuando los núcleos se relajan a su estado inicial emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía entre los estados de espín α y β . El espectrómetro de RMN detecta estas señales y las registra como una gráfica de frecuencias frente a intensidad, que es el llamado espectro de RMN.

Debido al mayor ancho espectral en sus desplazamientos químicos, los espectros de ^{13}C presentan en general un mejor ancho espectral que los correspondientes espectros de ^1H . Este hecho puede ser explotado a través de la realización de experimentos en dos dimensiones (2D) de correlación ^1H - ^{13}C , los cuales aportan evidencias directas (por ejemplo) de qué protones están unidos a cada carbono en una molécula.

El problema de la asignación ha sido simplificado de manera importante gracias a la espectroscopía de correlación heteronuclear bidimensional, en la cual las dos coordenadas de cada resonancia son los desplazamientos químicos de un protón y del carbono enlazado directamente a él (o a 2, 3 enlaces). Hay dos técnicas de amplio uso que proporcionan correlaciones heteronucleares a un enlace y que son conocidas como HMBC y HSQC. Esta última, emplea la aproximación de establecer las correlaciones vía detección (inversa) de ^1H , en la cual el núcleo de protón es usado como "origen" y como "detectado". La necesaria supresión de las señales principales correspondientes a los protones unidos a heteroátomos de espín nuclear $\frac{1}{2}$ como ^{12}C , es actualmente realizada con gran efectividad mediante la aplicación de gradientes de campo magnético.

Por otra parte la secuencia básica HMBC es bastante sencilla y solo consta de 4 pulsos de radiofrecuencia, rf. La secuencia comienza con la excitación del protón seguida de la evolución de su magnetización bajo la influencia del

acoplamiento $^1J_{CH}$. Durante un periodo determinado, de aproximadamente 3,3ms, se desarrolla una magnetización en antifase de 1H con respecto a $^1J_{CH}$.

2.3.6 Espectroscopía RAMAN

El efecto de la dispersión inelástica de la luz fue predicho en 1923 por Adolf Smekal, pero fue recién en 1928 que sir C. V. Raman y K. S. Krishnan⁵ lo observaron experimentalmente. Por su descubrimiento C. V. Raman recibió en 1930 el premio Nobel de Física.

Cuando una molécula es irradiada por una onda electromagnética monocromática pueden ocurrir dos procesos dispersivos: Rayleigh y Raman.^{6,7} El primero se refiere a un proceso colisional elástico, siendo la radiación incidente y dispersada de la misma frecuencia. Por otra parte, el efecto Raman es un proceso inelástico donde la radiación incidente y la dispersada poseen diferentes frecuencias.

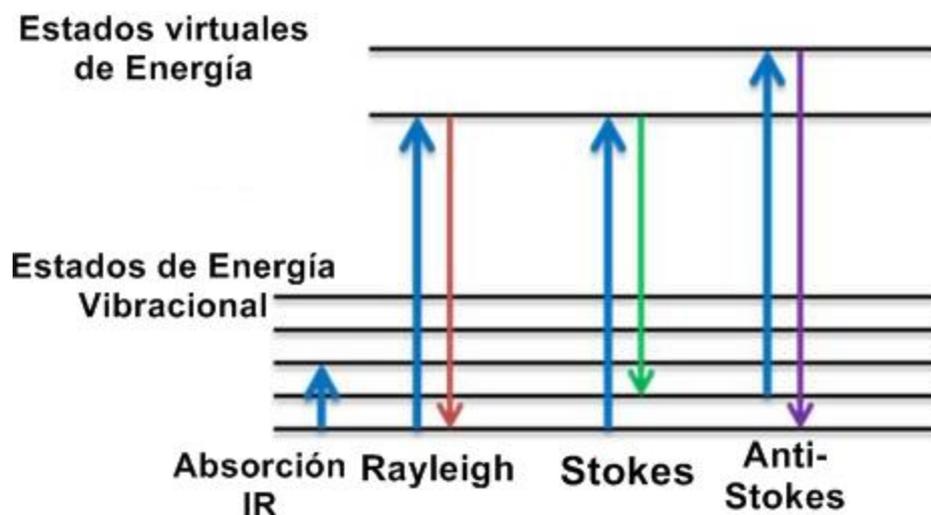


Figura 2.5 Esquema de los decaimientos de Rayleigh, Stokes y Anti-Stokes.

Si la molécula se encuentra en su estado fundamental, y al interactuar con el fotón llega a un estado virtual de energía y luego se relaja a un estado vibracional, tenemos lo que se conoce como Raman Stokes. En este caso la energía del fotón incidente es mayor que la del fotón dispersado. Si, por el contrario, la molécula inicialmente se encuentra en un estado vibracionalmente excitado, y luego de llegar a un estado de energía virtual se relaja a su estado fundamental, tenemos un efecto de Raman anti-Stokes, en donde la energía del fotón incidente es menor que la energía del fotón dispersado. Figura 2.5

Cabe aclarar que el efecto Raman es un efecto diferente al de la fluorescencia, ya que en el efecto Raman, el fotón no necesita ser absorbido; cuestión necesaria en la fluorescencia. En este sentido, el efecto Raman ocurre en tiempos mucho más cortos que los de la fluorescencia. A la hora de tomar un espectro Raman es importante considerar si la molécula fluoresce, puesto que si lo hace, podría interferir con la medición.

2.3.6.1 Espectroscopía Raman incrementada por la Superficie^{8,9}

Una de las técnicas de mayor crecimiento en las últimas décadas ha sido la Espectroscopía Raman incrementada por la Superficie, más conocida como SERS, del inglés: Surface Enhanced Raman Spectroscopy. Este fenómeno fue observado por primera vez en 1974 por Fleischmann¹⁰ y colaboradores, donde se observó un incremento de la señal Raman de 10^2 unidades en una monocapa de piridina adsorbida sobre una superficie de Ag, en comparación con la señal Raman de la piridina en solución.^{10,11,12,13,14} Básicamente, la SERS se constituye como un proceso por el cual la señal Raman de una determinada molécula, aumenta de manera considerable, cuando esta se encuentra adsorbida sobre una superficie metálica, ya sea, por ejemplo, un electrodo o una estructura de tamaño nanométrico.

Existen dos mecanismos complementarios que explican el efecto del incremento de la señal Raman: uno de ellos es el *Incremento por el campo electromagnético*, donde el incremento de la señal se debe a que en las

cercanías de nanoestructuras plasmónicas el campo se encuentra incrementado, por lo que el momento dipolar inducido en la molécula está también incrementado. El otro mecanismo es el *Incremento Químico*, donde el incremento se debe a la formación de complejos de transferencia de carga por los cuales se modifica la identidad molecular, y por lo tanto la sección eficaz de la molécula adsorbida sobre la superficie. A pesar de que este mecanismo es, en literatura, considerado como un mecanismo para explicar la SERS, es el incremento químico, en realidad, la modificación de la identidad molecular del analito.

La técnica de SERS se ha posicionado como una herramienta analítica poderosísima en la espectroscopía vibracional. Posee límites de detección muy bajos, pudiéndose obtener factores de incremento de hasta 10^{15} , permitiendo hasta la detección de una única molécula.^{15,16}

2.3.7 Dicroísmo Circular¹⁷

El dicroísmo circular es una técnica espectroscópica no destructiva, que puede emplearse en el análisis conformacional de sustancias ópticamente activas.

La luz polarizada circularmente tiene naturaleza quiral, y se puede considerar formada por dos componentes que son imágenes especulares una de la otra y que pueden ser diferenciadas por su interacción con moléculas ópticamente activas.^a Esta última interacción puede detectarse por dos maneras: por una diferencia en la velocidad de los dos haces de luz a través de la muestra –que da lugar a la llamada dispersión óptica rotatoria (DOR) –, o bien por la diferente absorción de cada haz por parte de la muestra –originando

^a Para que una molécula sea ópticamente activa debe ser quiral ya sea (1) por factores intrínsecos provenientes de su estructura, (2) porque se encuentre enlazada a un centro quiral o (3) por estar ubicada en un ambiente asimétrico.

el dicroísmo circular (DC) –. El gran desarrollo y aplicabilidad de la técnica en el estudio de sistemas biológicos permite interpretar directamente los cambios en la estructura secundaria y terciaria de proteínas.

Las medidas de DC se realizan determinando la diferencia de absorbancias entre la luz polarizada circularmente hacia la derecha (A_D) y hacia la izquierda (A_I). Teniendo en cuenta la ley de Lambert-Beer, puede expresarse esta diferencia de absorbancias como (Ec.2.3)

$$\Delta A = A_I - A_D = (\varepsilon_I cl) - (\varepsilon_D cl), \quad (\text{Ec.2.3})$$

donde c es la concentración molar del soluto quiral, ε es el coeficiente de extinción molar y l es la longitud del paso óptico. De aquí, se define $\Delta\varepsilon = \varepsilon_I - \varepsilon_D$, de donde resulta $\Delta A = \Delta\varepsilon cl$.

Al atravesar un medio quiral, los vectores campo eléctricos de luz polarizada describen una elipse cuyo eje mayor se mueve hacia un nuevo ángulo de rotación. Cuando los vectores campo eléctricos de las dos componentes circulares se encuentran en la misma dirección, la suma de sus magnitudes proporciona el semieje mayor de la elipse; cuando, por el contrario, se encuentran en direcciones opuestas, la diferencia de sus magnitudes proporciona el semieje menor de la elipse. El DC se define, precisamente, a partir de la relación entre los semiejes mayor y menor. Esta relación es la tangente del ángulo θ , conocido como **elipticidad**, mostrado en la Figura 2.6.

Moléculas con un centro o plano de simetría tienen fuerzas rotacionales nulas para todas las transiciones y por lo tanto son aquirales. Por otro lado, las moléculas intrínsecamente quirales son aquellas que carecen de simetría de reflexión no teniendo restricciones en sus transiciones y por lo tanto, exhiben dicroísmo. Moléculas complejas contienen cromóforos con transiciones electrónicas identificables, débilmente acopladas con el resto de la molécula. Algunos de estos cromóforos pueden ser intrínsecamente quirales. Además,

existen los cromóforos aquirales con simetría perturbada, los cuales, a causa de otros grupos presentes en la molécula, experimentan distorsiones en sus estructuras electrónicas alterándose la simetría de reflexión. El grupo peptídico planar y los aminoácidos fenilalanina (Phe), Trp y Tyr son ejemplos de éste tipo de cromóforos, lo que permite estudiar la estructura secundaria y terciaria de proteínas por DC en diferentes regiones espectrales.

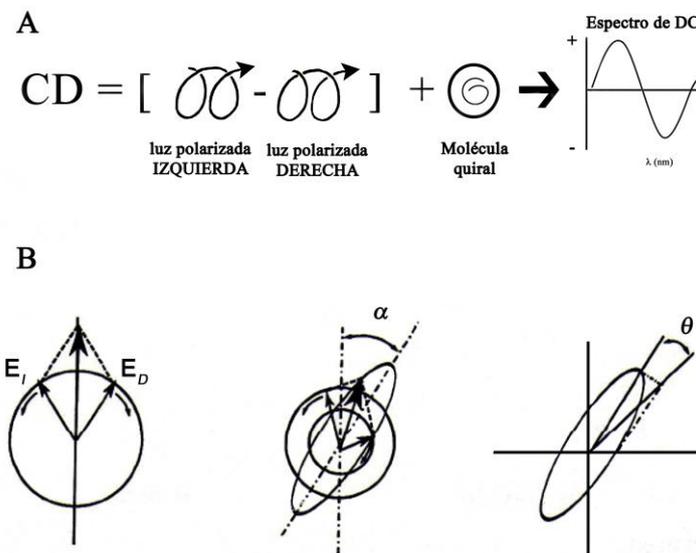


Figura 2.6 Ilustración esquemática del fenómeno de absorción diferencial de la luz polarizada circularmente hacia la izquierda (I) y hacia la derecha (D) al pasar por una muestra ópticamente activa. La recomposición de los haces produce luz elípticamente polarizada. La diferencia entre la absorción de ambas componentes es la señal de dicroísmo circular. B: Se muestra de izquierda a derecha: luz polarizada en un plano representada por sus vectores campo eléctricos a la derecha (E_D) y a la izquierda (E_I); luz polarizada elípticamente con un ángulo α de corrimiento, y el ángulo θ conocido como elipticidad, definido a partir de la elipse.

En la región del UV lejano, típicamente entre 180 y 250 nm, el grupo absorbente es la unión peptídica, pudiéndose estimar el contenido de estructura secundaria de proteínas. Por otro lado, en el UV cercano y particularmente en la zona comprendida entre 250 y 300 nm, absorben las cadenas laterales de aminoácidos aromáticos los cuales pueden informar sobre el plegamiento terciario de la cadena polipeptídica.¹⁸

Las transiciones principales que ocurren en el grupo amida en la región del UV lejano son: la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ que involucra a los electrones π del carbonilo y la $n \rightarrow \pi^*$ en donde participan los electrones no enlazados del oxígeno de ese mismo grupo.

Dependiendo del ordenamiento de los enlaces peptídicos, las transiciones ópticas del enlace amida pueden dividirse en múltiples transiciones de diferente frecuencia e intensidad, y, en consecuencia, las estructuras secundarias (ya sea α -hélice, lámina β , giro β o desordenada) tendrán espectros de DC característicos. Una representación esquemática de lo antedicho se muestra en la Figura 2.7.

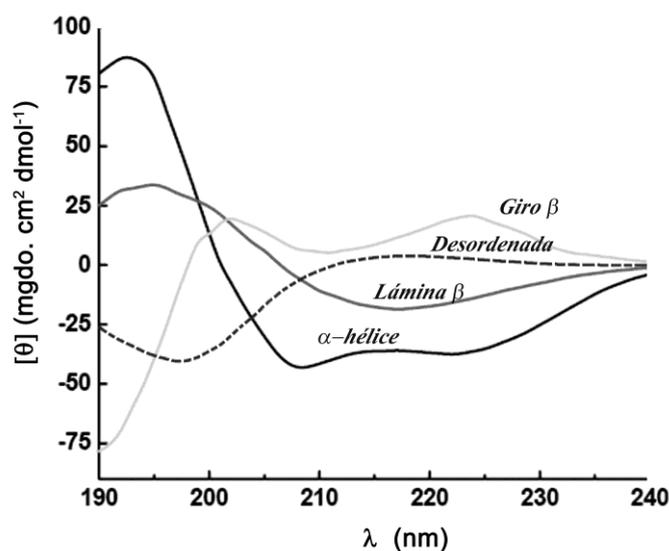


Figura 2.7 Apariencia general de los espectros de dicroísmo circular en la región del ultravioleta lejano (UV-lejano) para las conformaciones más comunes que presentan las proteínas: α -hélice (—), lámina β (—), desordenada (- - -) y giro β (—). Adaptado de la ref.¹⁸

Se describe a continuación sintéticamente el espectro característico para cada una de estas estructuras.

- *α-hélice*. Es la estructura secundaria más común, observada con frecuencia en proteínas globulares. El espectro presenta tres bandas características que corresponden a las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ (banda negativa a 220-222 nm), $\pi \rightarrow \pi^*$ paralela (banda negativa a 207-209 nm), $\pi \rightarrow \pi^*$ perpendicular (banda positiva a 191-193 nm). La intensidad de estas tres bandas refleja la proporción de elipticidad en los péptidos analizados.
- *lámina β*. El espectro muestra una banda negativa ancha sobre los 216 nm, una banda positiva entre 190 y 200 nm, y otra banda negativa alrededor de 175 nm. Estos espectros presentan mayor variabilidad que los de una *α-hélice*, tanto en la amplitud como en la posición de las bandas.
- *Giro β*. Las transiciones características de un giro *β* son las $n \rightarrow \pi^*$, que muestran una banda negativa débil alrededor de los 220-230 nm, y la $\pi \rightarrow \pi^*$ que muestra una banda positiva a 200-215 nm y una banda negativa a 180-200 nm.
- *Desordenada*. El espectro típico de una estructura desordenada –en inglés, ampliamente usado, *random coil*– se caracteriza por una banda intensa negativa alrededor de los 190 nm y otra banda muy débil, negativa o positiva, en la región de los 220-230 nm.

La estimación de los distintos tipos de estructura secundaria está basada en la deconvolución de un espectro complejo utilizando como referencia un conjunto de espectros de proteínas de estructuras conocidas. Varios factores pueden afectar la exactitud de los resultados obtenidos. Entre ellos pueden mencionarse: la falta de una solución única, la absorción de aminoácidos aromáticos y puentes disulfuro en la región del UV lejano y la regularidad y longitud de los distintos elementos estructurales que pueden modificar la forma del espectro¹⁸.

El grupo fenilo, fenólico e indol de Phe, Tyr y Trp, respectivamente, así como puentes disulfuro y cofactores absorben en la zona del UV cercano. Las contribuciones de los aminoácidos aromáticos tienen perfiles característicos y

la intensidad de las bandas de DC puede ser afectada por la rigidez del ambiente en donde están ubicados, por interacciones con otros aminoácidos aromáticos y el número de los mismos. En el caso de proteínas nativas, las cadenas laterales de estos aminoácidos se ubican en un ambiente asimétrico característico de la estructura terciaria de la conformación plegada, pudiéndose utilizar sus propiedades espectrales como sondas sensibles a la conformación de la proteína y la unión de ligandos.¹⁸

Las medidas de dicroísmo circular se realizaron a temperatura ambiente en un espectropolarímetro Jasco 810 bajo purgado constante de N₂. Las proteínas fueron disueltas en *buffer* TRIS o fosfato. Los datos de DC fueron expresados en términos de elipticidad media por residuo ($[\theta]$) en gdo.cm².dmol⁻¹ (Ec.2.4)

$$[\theta] = \left(\frac{CD_{observado}}{C_p n l 10} \right), \quad (\text{Ec.2.4})$$

donde C_p es la concentración molar de proteína (mol cm⁻³), n es el número de aminoácidos y l es la longitud del paso óptico (cm).

Los datos experimentales fueron analizados con el programa Origin Versión 7.5 de Origin Lab Software Corporation.

2.3.8 Procesos de transferencia de energía resonante (FRET)

La transferencia de energía por resonancia se debe a la existencia de una perturbación que permite el acoplamiento entre la desactivación del estado excitado de la molécula donora (D) y la excitación de una molécula aceptora (A) originalmente en su estado fundamental.¹⁹ Es un proceso que compite con los demás procesos de desactivación del estado excitado de la molécula donora y por ello determina la disminución del rendimiento cuántica de fluorescencia.

De acuerdo a la teoría de Förster,^{20,21} la constante de velocidad de transferencia de energía (k_T) entre el donador y aceptor a una distancia (r) es (Ec.2.5)

$$k_T = \frac{1}{\tau_D^0} \left[\frac{R_0}{r} \right]^6, \quad (\text{Ec.2.5})$$

donde τ_D^0 es el tiempo de vida del estado excitado del donador (en ausencia del aceptor) y R_0 se conoce como el radio crítico de Förster y corresponde a la distancia para la cual $k_T = 1/\tau_D^0$, de tal manera que la transferencia de energía y el decaimiento espontáneo del estado excitado del donador son igualmente probables. La eficiencia de la transferencia de energía (E) se define según (Ec.2.6)

$$E = \frac{k_T}{1/\tau_D^0 + k_T} = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6}. \quad (\text{Ec.2.6})$$

La expresión para el radio crítico (R_0) desarrollada por Förster es, (Ec.2.7)

$$R_0^6 = \frac{9(\ln 10)}{128\pi^5 N_A} \frac{\kappa^2 \Phi_D}{n^4} J, \quad (\text{Ec.2.7})$$

donde N_A es el número de avogadro, κ^2 es el factor que tiene en cuenta la orientación relativa de los momentos de transición de donador y aceptor, importante para evaluar el efecto del campo eléctrico generado por el dipolo de transición del donador sobre el dipolo de transición del aceptor, n es el índice de refracción del medio en la región del solapamiento espectral, Φ_D es el rendimiento cuántico de fluorescencia del donador en ausencia del aceptor y J corresponde a la integral del solapamiento entre la emisión del donador y la absorción del aceptor, definida alternativamente como (Ec.2.8)

$$J^{\lambda} = \int \bar{I}_{\lambda}^{D*} \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \int \bar{I}_{\lambda}^{D*} d\lambda = 1, \quad (\text{Ec.2.8})$$

donde ε_A es el coeficiente de absorción molar del aceptor y \bar{I}_{λ}^{D*} es el espectro de emisión del donador normalizado a área unitaria sobre longitud de onda, λ .

La teoría de Förster está restringida al caso límite de acoplamiento débil. Para transiciones permitidas esta aproximación funciona bien cuando la distancia D-A excede los tamaños de los cromóforos (1-10 nm). La distancia entre el donador y aceptor debe ser constante durante el tiempo de vida del primero, y mayor a 1nm. Cuando esto no ocurre, el promediar las densidades de transición y luego acoplarlas no es adecuado, ya que el término coulombico se ve fuertemente influenciado por la forma de la distribución de cargas molecular debido a que se origina de un acoplamiento de las densidades de transición de ambas moléculas.²² Además, cuando las distancias son menores a 1 nm, las interacciones de corto alcance, que resultan del solapamiento entre orbitales deben tenerse en cuenta.^{23,24} Otro factor a considerar es la dependencia de la interacción coulombica con la constante dieléctrica del solvente alrededor del donador y aceptor. Cuando éstos están muy próximos entre sí, cambia la esfera de solvatación y la forma del entorno dieléctrico alrededor de ambas moléculas, de tal manera que el apantallamiento de la interacción por el solvente se ve reducido.²⁵

Existen varios métodos que pueden ser usados para determinar la eficiencia de transferencia de energía. Es fundamental tener en cuenta que, para cualquier método que se emplee, dado que las características del donador y/o el aceptor se deben medir en ausencia y presencia de transferencia, la concentración de los mismos, como así también sus microambientes deben ser iguales.

2.3.9 Técnicas microscópicas

Existen diversas técnicas de microscopía con diversos fundamentos y límites en la detección de los tamaños a ser observados. Durante el trayecto experimental de la tesis doctoral se trabajó con distintas técnicas de microscopías para estudiar tanto muestras de agregados metálicos, como muestras biológicas.

2.3.9.1 Microscopía de Transmisión electrónica (TEM, Transmission Electron Microscopy)

La técnica de microscopía TEM utiliza un haz de electrones para visualizar la muestra, lo que permite obtener una imagen de hasta 6 órdenes de magnitud más grande. El equipo consta de un tubo cilíndrico de 2 metros aproximadamente donde se genera vacío, y por donde transita un *disparo* de electrones que atraviesa la muestra. Este *disparo* es direccionado a través de un complejo sistema de lentes magnéticos. Para recoger la imagen existe un sistema detector anclado a un sistema computarizado que muestra las imágenes.

La fuente de emisión de electrones suele ser un filamento de Tungsteno o bien una fuente de hexaboruro de Lantano. Luego estos son direccionados en el vacío a través de un conjunto de lentes magnéticas que permiten focalizar y localizar el disparo de electrones en la muestra.

La importancia de generar un buen sistema de vacío yace en que los electrones pueden interaccionar fuertemente con las moléculas gaseosas presentes en la trayectoria de los electrones. Por tal motivo se buscan lograr presiones bajísimas normalmente entre 10^{-4} y 10^{-7} Pa.

La técnica TEM ha cobrado una altísima importancia en las últimas décadas debido al potencial tremendo que tiene en el análisis de minerales y metales. A su vez, debido al potencial alcance para analizar estructuras sub-celulares, esta técnica puede ser utilizada para diagnóstico de ciertas patologías.

2.3.9.2 Microscopía de Fluorescencia

La microscopía de fluorescencia, es a diferencia de la TEM, una microscopía óptica, donde es radiación lumínica lo que recorre lentes ópticos hasta llegar a la formación de una imagen. En el caso particular de la microscopía de fluorescencia lo que se observa es la emisión radiativa de diferentes fluoróforos que son marcadores específicos de diferentes organelas o moléculas.

Luego de algún tratamiento a un cultivo celular se pueden *marcar* diferentes partes de la célula con algún fluoróforo particular. El microscopio excita el fluoróforo con una longitud de onda específica y recoge la emisión de esa especie excitada en una imagen de microscopía. La técnica permite localizar que zonas son las que se han *marcado* específicamente. Se puede utilizar una combinación de fluoróforos siempre y cuando se puedan diferenciar espectroscópicamente; esto es que no absorban y emitan en la misma zona del espectro electromagnético.

En la Figura 2.8 se observa una imagen de microscopía de fluorescencia de células epiteliales de ovario de hámster chino (CHO-K1). En la misma se puede ver la presencia de distintos *marcadores* como el DAPI, anti- α tubulina, Faloidina, etc.

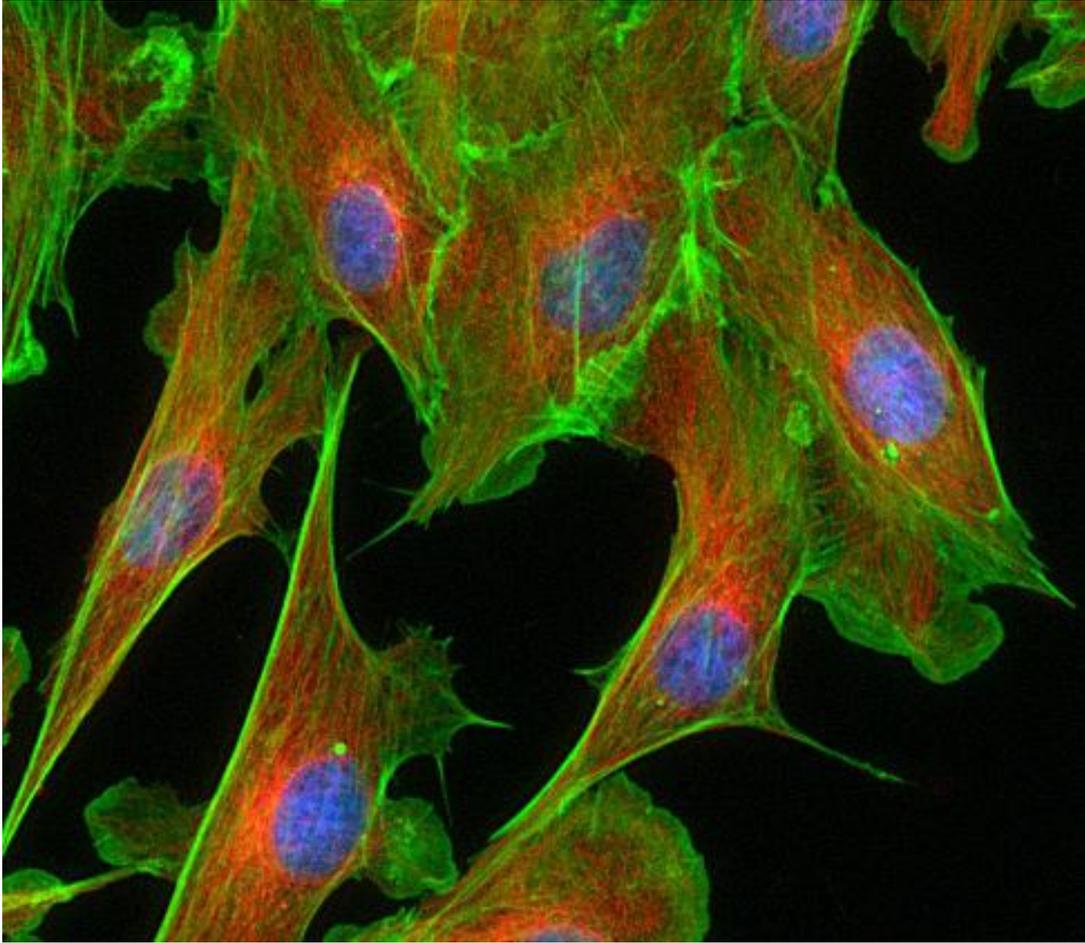


Figura 2.8 Imagen de microscopía de fluorescencia de CHO-K1, en presencia de marcadores fluorescentes específicos

2.3.9.3 Microscopía Óptica

La microscopía óptica es la más sencilla de entender, pues es un dispositivo constituido con una serie de lentes ópticos que amplían y toman una imagen de la muestra. En la Figura 2.9 se observan imágenes de microscopía de un cultivo celular de CHO-K1.



Figura 2.9 Imagen de microscopía óptica de CHO-K1.

2.3.10 Citometría de flujo

Una de las técnicas más revolucionarias de los últimos años, en el universo de la bioquímica y biología celular, ha sido la citometría de flujo. Sus aplicaciones han permitido agilizar el diagnóstico y el seguimiento (y por ende el tratamiento) de numerosas enfermedades como por ejemplo leucemias, el SIDA o la granulomatosis crónica.

En los citómetros de flujo, las células suspendidas en un fluido atraviesan un pequeño tubo sobre el que incide un rayo láser. La luz dispersada, y transmitida llega a una serie de detectores, los cuales permiten determinar algunas propiedades de las células como ser tamaño, tipo y complejidad.

Los citómetros actuales pueden analizar varios miles de partículas por segundo y separarlas y aislarlas en función de propiedades comunes. Una de las aplicaciones más importantes de la citometría es la “Clasificación de células activadas por fluorescencia” (FACS, del inglés, *Fluorescence Activated Cell Sorting*). Esta técnica clasifica células en función de las propiedades fluorescentes que tiene cada población. Estas propiedades luminiscentes vienen dadas por la presencia de marcadores específicos para evaluar alguna propiedad en particular en la muestra (daño mitocondrial, actividad enzimática,

expresión proteica, etc). Para estos estudios existen numerosos colorantes orgánicos disponibles para su uso, como ser la picroeritrina, rodamina, yoduro de propidio, DAPI, Hoescht, Naranja de Acridina, etc. Pero también en los últimos años se han comenzado a usar marcados isotópicos y los *quantum dots* (Puntos cuánticos), que hacen uso de nanoestructuras de última generación.

2.3.11 Electroforesis en poliacrilamida

Una de las técnicas más utilizadas para conocer la estabilidad de una proteína luego de un proceso degradativo es la de las corridas electroforéticas. En las mismas se hace *correr* una muestra proteica en un gel de poliacrilamida. La muestra se encuentra entre dos potenciales durante un determinado de tiempo, y debido a la carga superficial que tienen las proteínas, estas se movilizan a lo largo del gel.

El movimiento de las proteínas depende del potencial eléctrico de la corrida, del medio en el que se encuentren las proteínas (pH, porosidad del gel, etc), y de su tamaño. Por tal motivo fragmentos pequeños de proteína tienen la capacidad de *correr* más rápidamente hacia el ánodo que fragmentos más grandes. Debido a esto es que podemos identificar si han existido procesos degradativos luego de un tratamiento con nuestros fotosensibilizadores, ya que en caso de existir un degradación proteica, los fragmentos de la proteína migrarían más rápido (por su menor tamaño) que la proteína no degradada (que se encuentra entera).

Esta técnica también se utiliza para separar e identificar proteínas. En nuestro caso, solo nos permitió identificar procesos degradativos, sin ahondar en el tamaño y composición de los fragmentos.

2.3.12 Ensayo MTT

El ensayo de MTT es un ensayo colorimétrico que determina, a través de la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), los cambios en la viabilidad celular dado un determinado tratamiento. El ensayo consiste en la formación de una sal de formazan (insoluble en medio acuoso) que luego se redisuelve en DMSO y se cuantifica colorimétricamente. La formación de esta sal ocurre cuando el MTT reacciona con la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa²⁶. Dicha enzima se encuentra presente en células viables. Figura 2.10

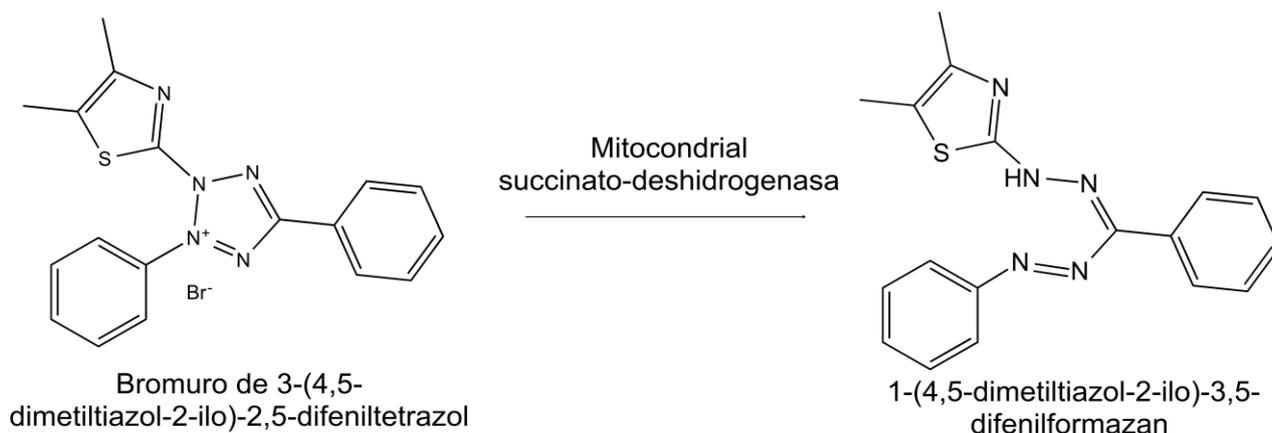


Figura 2.10 Reacción de formación de la 1-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-3,5-difenilformazan.

La cantidad de sal de formazán es directamente proporcional a la cantidad de enzima presente en la muestra, y esta es directamente proporcional a la cantidad de células viables.

Existen otras sales de la misma familia del MTT (sales de tetrazolio) que se han propuesto para determinar la viabilidad celular, entre ellas:

- XTT: Mayor sensibilidad
- MTS: Ensayo con menor cantidad de pasos
- WSTs: Sales de tetrazolio solubles en agua

2.3.13 Ensayo COMETA

Conocer el efecto genotóxico de una droga, es de especial interés antes de considerar a esa droga como un posible fármaco terapéutico. En ese sentido se han diseñado numerosas técnicas en pos de conocer el daño genotóxico que podría generar un determinado tratamiento. Dentro de las técnicas que mas han avanzado en los últimos años, se encuentra el ensayo cometa, llamado así por la estela, similar a la de los cometas espaciales, que se genera en los núcleos cuando existe un daño genotóxico. (Figura 2.11)

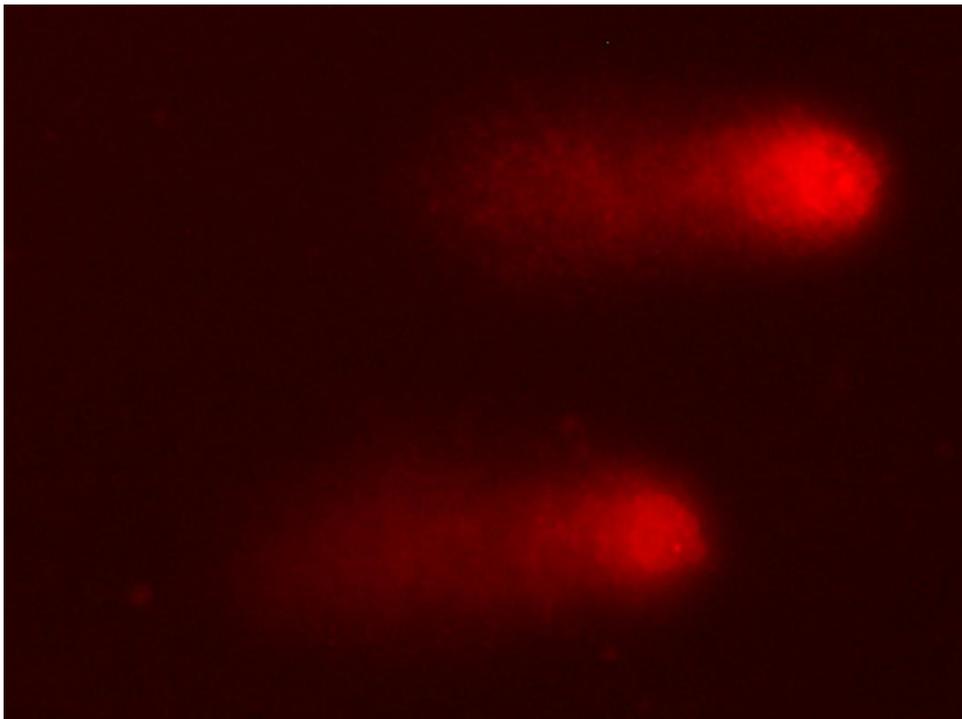


Figura 2.11 Imagen de microscopía de fluorescencia de un *cometa* de núcleo de CHO-K1

La técnica es variable según la procedencia (cultivo celular, tejido, etc) y tipo de muestra (epiteliales, neuronales, linfocitos, etc), pero básicamente consiste en ubicar células tratadas (con sus respectivos blancos) en geles de agarosa y lizar de manera tal que solo permanezca el núcleo fijado a la célula. Luego, se procede a realizar una corrida electroforética horizontal (similar para la detección de fragmentos proteicos) de modo que los fragmentos de ADN más pequeños migren por el gel de modo más rápido, y así se genere la estela en caso de daño genotóxico.

Luego de la corrida a pHs altos (pH~13), se procede a hacer una tinción con un marcador de ADN y se revelan las imágenes en el microscopio de fluorescencia

2.3.14 Microondas

Una técnica alternativa para la síntesis de compuestos químicos consiste en proporcionar energía térmica utilizando microondas (MO). Las principales ventajas de este tipo de síntesis consisten en el ahorro de energía, disminución del tiempo de reacción, optimización de rendimientos, disminución de la cantidad de pasos de síntesis, etc.

En este sentido, una de las principales ventajas del uso de MO es su contribución a la *green chemistry* (química verde). Esta química tiene por fin disminuir la contaminación y desarrollar nuevas técnicas y metodologías de trabajo que sean menos dañinas para el medio ambiente. En el año 1998, Anastas y Warner proponen doce principios para la consolidación de la química verde o sustentable:

- Prevenir la formación de residuos
- Economía atómica: minimizar la formación de subproductos
- Uso de compuestos de nula o baja toxicidad

- Generación de productos eficaces y no tóxicos
- Reducir el uso de sustancias auxiliares
- Disminuir el consumo energético
- Uso de materias primas renovables
- Evitar la formación de derivados innecesarios
- Potenciación de la catálisis
- Generación de productos biodegradables
- Desarrollo de metodologías analíticas para la monitorización en tiempo real
- Disminuir el potencial de accidentes químicos

A pesar de que cumplir estos doce principios es prácticamente imposible, sirven de guía general para volcar la investigación química a metodologías más sustentables. En miras de lograr este objetivo aparece la síntesis asistida por Microondas.

Las MO son ondas electromagnéticas que se encuentran entre las radiaciones infrarrojas y las radiofrecuencias. Es decir que son ondas de longitudes de onda (λ) entre 1mm y 1m; u ondas entre un rango de frecuencias de 0,3 y 300 GHz. Los equipos de microondas del laboratorio utilizan una frecuencia de 2,45 GHz ($\lambda=12,2\text{cm}$) y poseen una energía (por fotón) de $1 \times 10^{-5} \text{eV}$. Esta energía es insuficiente para generar rupturas de enlaces químicos, por lo que no es la absorción directa de radiación la que genera reacción, sino que la química del MO se basa en los efectos del calentamiento dieléctrico.

La componente eléctrica de las ondas electromagnéticas es la que interactúa principalmente con la materia pudiendo generar calentamiento mediante dos mecanismos: conductividad iónica y polarización dipolar. La componente magnética en ocasiones también puede interaccionar con la

materia. El mecanismo de la conducción iónica depende de la presencia de iones en la matriz que oscilan por la influencia del campo eléctrico de la onda colisionando con las moléculas y átomos vecinos. Estas colisiones generan movimientos que producen calor. Sin embargo este proceso es considerado secundario, porque no es tan eficiente como el de polarización dipolar.

Para que ocurra el proceso de polarización dipolar, es necesario que las moléculas tengan un momento dipolar para absorber las MO. Cuando son irradiadas, los dipolos tienden a alinearse con el campo eléctrico, pero como el campo es oscilante, se producen alineaciones y realineaciones secuenciales que generan fricción molecular y pérdida dieléctrica. Este efecto genera una energía calórica que depende de dos condiciones: la capacidad de las moléculas para alinearse y la frecuencia de oscilación de la onda. Si el dipolo no cuenta con tiempo suficiente para realinearse (radiación de alta frecuencia) o retorna a su estado inicial antes de que oscile el campo eléctrico (radiación de baja frecuencia), no se produce calentamiento alguno. El valor de irradiación de 2,45GHz es un valor de irradiación óptimo que se encuentra entre estos dos límites.

Esta forma de calentamiento utiliza la propiedad de algunas moléculas de transformar la energía electromagnética en calor, para entender un poco este fenómeno consideremos el efecto de una radiación electromagnética de alrededor de 900MHz, la cual provoca la rotación de los dipolos dentro del líquido lo que causa que las moléculas polares se alineen y luego relajen en el campo oscilante de la radiación electromagnética. Cuando la energía de la rotación de esos dipolos se disipa se produce el calentamiento del líquido, por eso, al producirse el calentamiento en el interior del líquido y no transferirse desde el vaso es por lo que el líquido está a mayor temperatura que el recipiente. A lo largo de la tesis se utilizó un microondas Monowave-300 de Anton Paar. Figura 2.12



Figura 2.12 Microondas Monowave-300 de Anton Paar.

2.3.15 Estudios de Transferencia de Iones entre dos soluciones de electrolitos no miscibles (ITIES)

La interfaz entre dos soluciones electrolíticas inmiscibles (*ITIES* – ‘*Interface between Two Inmiscibles Electrolytic Solutions*’) se forma cuando se ponen en contacto dos solventes líquidos de baja (idealmente cero) miscibilidad mutua, cada uno conteniendo un electrolito adecuado para aplicaciones electroquímicas. Uno de estos disolventes es por lo general agua, y el otro es un solvente orgánico con una permitividad dieléctrica moderada o alta, tal como nitrobenzeno (NB) o 1,2-dicloroetano (1,2-DCE).

En la década del 70, se desarrolló un enfoque experimental novedoso para estudiar los procesos de transferencia de iones en ITIES, basado en la polarización de estas interfaces. La diferencia de potencial de Galvani, ($\Delta_w^o \phi = \phi^o - \phi^w$, donde ϕ^o es el potencial de la fase orgánica y ϕ^w es el potencial de la fase acuosa) generada entre las dos fases es utilizada como

una fuerza motriz para las reacciones de transferencia de carga, y por lo tanto, se puede medir la corriente eléctrica que fluye a través de la interfaz. El pionero en este campo fue Claude Gavach en Francia, quien comenzó a aplicar métodos electroquímicos para estudiar las reacciones de transferencia de iones.^{27,28,29,30}

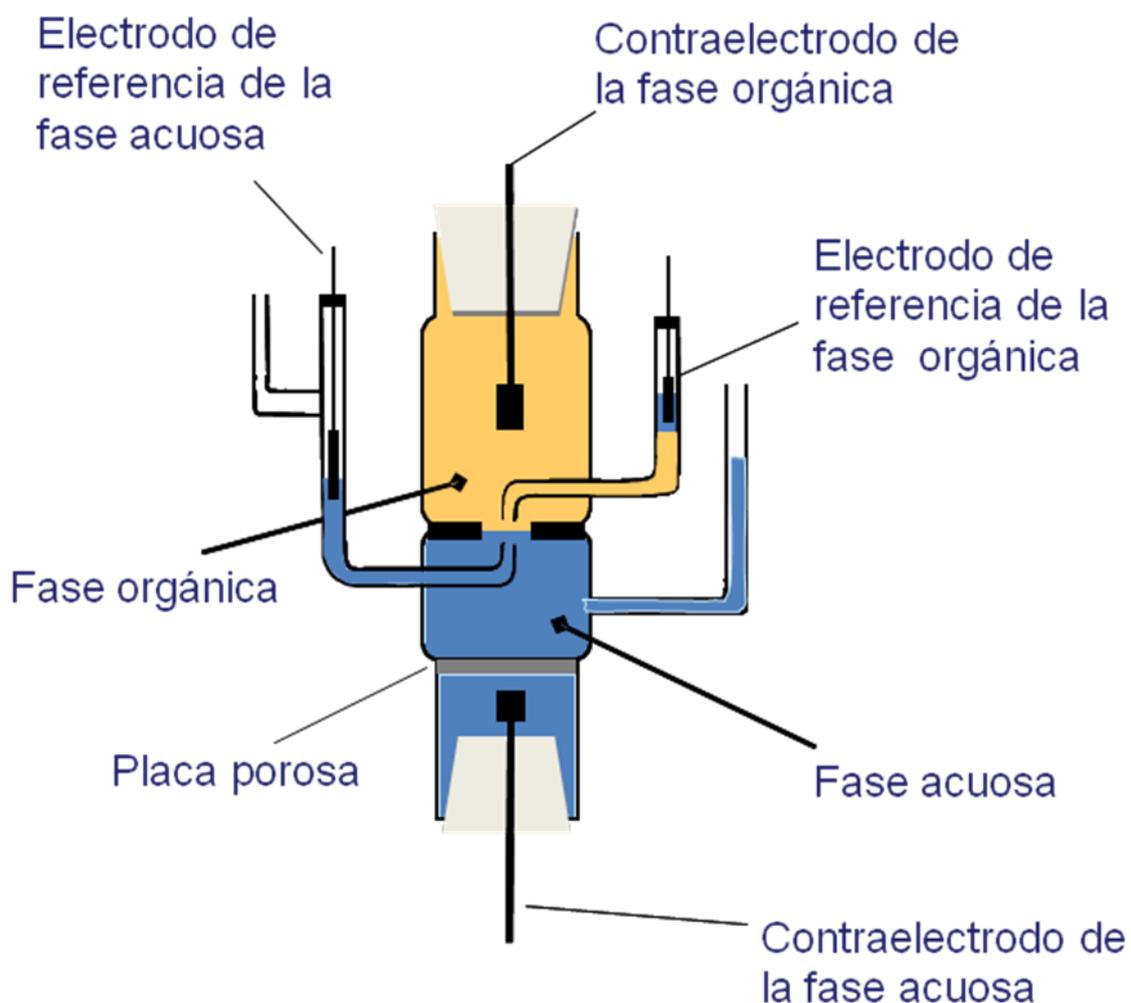


Figura 2.13 Esquema de la celda de vidrio donde se llevaron a cabo los experimentos de ITIES.³¹

Los experimentos voltamétricos se llevaron a cabo en una celda de vidrio, representada en la Figura 2.13, que permite utilizar un sistema de cuatro electrodos, dos de los cuales son electrodos de referencia de $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{Cl}^-$ y se utilizan para aplicar una diferencia de potencial a la interfaz en estudio. Los otros dos electrodos, contraelectrodos de platino, cierran el circuito y permiten

medir la corriente que circula a través de la interfaz líquida. El electrodo de referencia correspondiente a la fase orgánica se sumerge en una solución acuosa que está en contacto con la fase orgánica. Esta fase acuosa tiene disuelta una sal que contiene el mismo catión del electrolito soporte de la fase orgánica, y cloruro como contraión, de manera tal que la interfaz formada entre esta solución y la fase orgánica sea no polarizable.

Las soluciones utilizadas comprendieron siempre electrolitos conductores en fase acuosa o en 1,2-dicloroetano. Para la fase acuosa se empleó LiCl $1,0 \times 10^{-2}$ M, mientras que la fase orgánica se utilizó la sal dicarbolil cobaltato de tetrafenilarsonio (TPhAsDCC) en una concentración igual a $1,0 \times 10^{-2}$ M. La solución acuosa en contacto con la fase orgánica dentro del compartimiento del electrodo de referencia fue TPhAsCl $1,0 \times 10^{-2}$ M.

Los electrodos de referencia de Ag/AgCl fueron preparados conectando un alambre de plata y un contraelectrodo a un terminal positivo y negativo, respectivamente, de un galvanostato con el cual se aplica una corriente constante de 1 mA/cm^2 en una solución acuosa de NaCl y HCl. Esta corriente produce la oxidación de la superficie de plata, sobre la cual se genera un depósito de AgCl. Los electrodos de referencia usualmente se encuentran dentro de capilares Luggin localizados cerca de la interfaz, con el objetivo de minimizar la resistencia de la solución.^{32,33}

2.4 Referencias

-
- ¹ B.R. Baker, B.D. Mehta, *Inorg. Chem.*, 4 (1965) 848.
- ² D. Pagliero, G.A. Argüello, E.H. Staricco, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 115 (1998) 199.
- ³ N. Serpone, M.A. Jamieson, M.S. Henry, M.Z. Hoffman, F. Bolletta, M. Maestri, *J. Am. Chem. Soc.*, 101 (1979) 2907.
- ⁴ J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Ed. Kluwer/Plenum-2^o ed., New York, 1999.
- ⁵ I. N. Levine. *Molecular Spectroscopy*. (Wiley-Interscience, 1975)
- ⁶ A. R. Barron. *Physical Methods in Inorganic and Nano Chemistry*. (2011).
- ⁷ K. Nakamoto. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*. (John Wiley & Sons, Inc., 2009).
- ⁸ E. C. Le Ru, P. G. Etchegoin. *Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy*, Elsevier: Amsterdam, 2009; Vol. 1.
- ⁹ E. C. Le Ru, P. G. Etchegoin. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 2012, 63, 65–87
- ¹⁰ M. Fleischmann, P. J. Hendra, A. J. M. Quillan. *Chem. Phys. Lett.*, 1974, 26, 163–166.
- ¹¹ R. L. McCreery. *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*. New York (John Wiley & Sons, Inc., 2000)
- ¹² J. R. Ferraro, K. Nakamoto, C. W. Brown. *Introductory Raman Spectroscopy*. (Academic Press, 2003)
- ¹³ E. C. Le Ru, P. G. Etchegoin. *Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects*. (Elsevier, 2009).
- ¹⁴ R. Greef, R. Peat, L. Peter, D. Pletcher, J. Robinson. *Instrumental methods in electrochemistry. J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 258, (Ellis Horwood Limited, 1985). *Surface Analysis - The Principal Techniques*. (Wiley, 2009)
- ¹⁵ M. Moskovits. *Top. Appl. Phys.*, 2002, 82, 215–227.
- ¹⁶ E. Cortés, P. G. Etchegoin, E. C. Le Ru, A. Fainstein, M. E. Vela, R. C. Salvarezza. *J. Am. Chem. Soc.*, 132 (2010) 18034–18037

-
- ¹⁷ R.W. Woody *Theory of circular dichroism of proteins*, in: *Circular dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Fasman G.D., Ed. Plenum Press, New York, USA, **1996**.
- ¹⁸ S.M. Kelly, N.C. Price, *Biochim. Biophys. Acta*, 1338 (**1997**) 161.
- ¹⁹ B.W. Van Der Meer, G. Coker III, S.Y. Simon Chen, *Resonance energy transfer: Theory and data*. Wiley-VCH, New York, **1994**.
- ²⁰ T. Förster, *Discuss. Faraday Soc.*, 27 (**1959**) 7.
- ²¹ B. Valeur, *Molecular Fluorescence. Principles and Applications*, Wiley-VCH, **2002**, pp 247.
- ²² G.D. Scholes, *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 54 (**2003**) 57.
- ²³ D.L. Dexter, *J. Chem. Phys.*, 21 (**1953**) 836.
- ²⁴ S. Speiser, *Chem. Rev.*, 96 (**1996**) 1953.
- ²⁵ G.D. Scholes, C. Curutchet, B. Mennucci, R. Cammi, J. Tomasi, *J. Phys. Chem. B*, 111 (**2007**) 6978.
- ²⁶ Mosmann T.; *Journal of Immun. Meth.* 65 (**1983**) 55-63
- ²⁷ C. Gavach. *Experientia* 18 (Suppl.) (**1970**) 321-337
- ²⁸ C. Gavach, C. Gavach, A. Savajols, *Electrochim. Acta* 19 (**1974**) 575-581.
- ²⁹ C. Gavach, P. Seta, F. Henry. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 1 (**1974**) 329-342.
- ³⁰ C. Gavach, F. Henry. *J. Electroanal. Chem.* 54 (**1974**) 361-370
- ³¹ Tesis doctoral de Julieta Riva (**2014**) Universidad Nacional de Córdoba
- ³² Z. Samec, V. Marecek, D. Homolka. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, 77 (**1984**) 197-208.
- ³³ Z. Samec, V. Marecek, J. Koryta, M. W. Khalil. *J. Electroanal. Chem.*, 83 (**1977**) 393-397.



Hipótesis, objetivos y lineamientos generales

Nuestra hipótesis de trabajo supone que los complejos metálicos podrían ser posibles agentes fotosensibilizadores para la terapia fotodinámica; mientras que por otro lado, podrían ser útiles en el diseño de nanoestructuras metálicas con fines medicinales.

En primer lugar se buscará indagar sobre la interacción de los complejos metálicos con nanopartículas metálicas en pos de generar nuevas nanoestructuras con un potencial uso en la detección y el tratamiento de enfermedades neoplásicas.

Luego se plantea estudiar como interaccionan los complejos de Cr(III) con distintas proteínas de transporte, específicas y no-específicas, en pos de proponer algún mecanismo de transporte de ingreso al interior de células neoplásicas.

Por último se estudiará cuál es el efecto de uno de los complejos de Cr(III) en cultivo celular, analizando que ocurre cuando el complejo se encuentra en su estado basal, pero también en su estado excitado. A pesar de que existen ciertos estudios sobre la familia de estos complejos en relación a modelos celulares, ninguno de estos le da un rol fundamental a la luz.

Interacción de Nanopartículas de Au con complejos metálicos de Ru(II)

Capítulo 3

3.1 Resumen

En este capítulo se presenta un estudio de la interacción entre complejos metálicos de Ru(II) y nanopartículas de Oro metálicas de distintos tamaños. Inicialmente se realizó la síntesis de las nanopartículas y de los complejos de Ru(II) utilizando distintos protocolos.

Posteriormente se utilizaron técnicas espectroscópicas (Absorción, emisión, raman, etc) para analizar la interacción entre las nanopartículas y los complejos metálicos; y microscopía de transmisión electrónica para analizar la morfología de los nano-agregados sintetizados.

3.2 Introducción

3.2.1 Nanomedicina

Es quizás uno de los desafíos más grandes en la investigación en nanoplasmónica el diseño de nuevos nanosistemas que puedan responder a las demandas de la medicina. Las diferentes propiedades fotofísicas, y fotoquímicas de distintos nanosistemas (NS) han permitido el amplio crecimiento de la nanomedicina, como una herramienta eficaz en la detección y el tratamiento fototerapéutico de distintas enfermedades^{1,2,3,4,5,6}. Numerosos estudios se han desarrollado en relación al uso de nanocompuestos para el tratamiento terapéutico de enfermedades neoplásicas. Dicho tratamiento se conoce como terapia fototérmica, pues es la relajación de un estado superior el que genera un aumento (local) de la temperatura en la superficie de los NS. Si dicho NS se encuentra en el interior de una célula tumoral, el aumento de la temperatura podría generar algún daño irreparable que conduzca a la muerte de dicha célula.^{7,8}

Por otra parte, diversos nanosistemas se han propuesto como agentes contrastantes para la localización de un tejido tumoral, usando como técnicas de bioimagen la emisión visible de algún fluoróforo asociado al NS, o a través de Puntos cuánticos (Quantum Dots). Sin embargo una de las técnicas más promisorias y novedosas para el diagnóstico es el uso de la fotoacústica (optoacústica): técnica que mide los cambios de presión resultantes de la relajación no radiativa de un estado excitado⁹. Este campo de estudio es, aún, muy reciente, y no ha sido estudiado en su profundidad.

La técnica de bioimagen reconstruida a partir de señales fotoacústicas (FA) tiene enorme ventajas, entre ellas, podemos mencionar: gran resolución espacial, penetración tisular profunda, uso de radiación no ionizante, etc. Las señales FA se generan a través de alguno de estos cuatro mecanismos:

expansión térmica, vaporización, reacción fotoquímica y *optical breakdown*¹⁰. De estos cuatro mecanismos solo la expansión térmica es segura para su uso clínico¹⁰.

Cuando ocurre una expansión térmica, la eficiencia de conversión de energía lumínica a una onda de presión FA es el factor más relevante para lograr buenos resultados de contraste óptico en la reconstrucción de imágenes. La eficiencia de conversión está determinada mayoritariamente por la absorbancia y la capacidad calorífica del compuesto utilizado. Sin embargo, la expansión térmica es el mecanismo menos eficiente para generar este tipo de señales. Por tal motivo el diseño de agentes con buena capacidad para generar señal FA, es un campo de especial interés.

Una de las principales ventajas de este tipo de compuestos, es que tendrían la capacidad simultánea de actuar como agentes contrastantes y como agentes terapéuticos.

Recientemente se han estudiado las propiedades fotoacústicas y fototérmicas (FT) de diferentes nanosistemas: nanopartículas (NP) de oro¹¹, nanorods¹², nanotubos¹³, nanocajas¹⁴, etc. Sin embargo aún no se han estudiado en profundidad sistemas que involucren pequeños nanoagregados de NPs.

Estudios previos han demostrado que el plasmon de nanoagregados posee un incremento del campo eléctrico en la zona del *gap* (zona interpartícula). Este incremento del campo podría conducir a un aumento localizado de la temperatura y por ende, a un aumento de la señal FT y FA. En la figura 3.1 de Coronado et al. se observan cálculos electrodinámicos donde se manifiesta un aumento progresivo del campo a medida que disminuye la distancia entre dos NPs (σ).^{15,16,17}

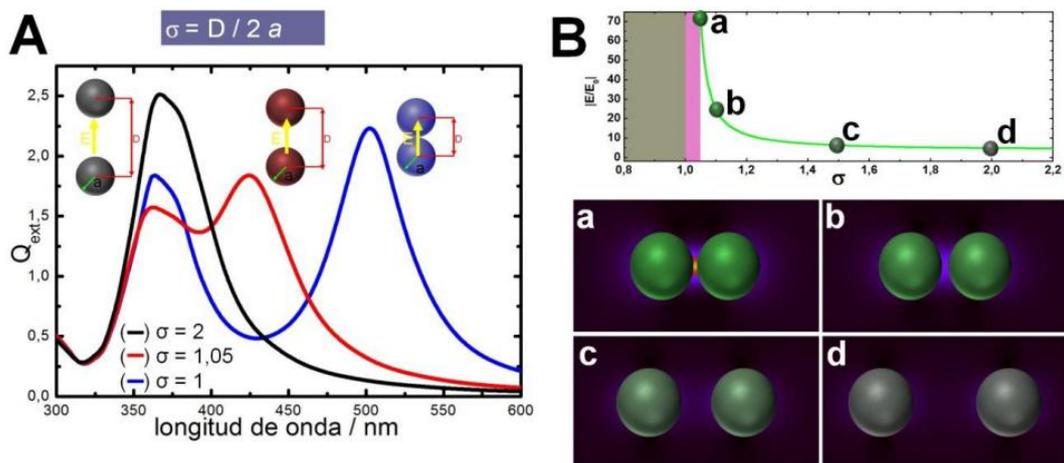


Figura 3.1 A) Espectros “teóricos” de dímeros de NPs de Plata (60nm) a diferentes valores de σ . B) Cálculos del incremento del campo eléctrico para dímeros de NPs de Plata (20nm) en función de σ .

Sin embargo, la exaltación del campo sólo se observa en agregados pequeños. Por tal motivo, la construcción de agregados pequeños supone un reto interesante pensando en un potencial uso en el campo de la nanomedicina. A medida que aumenta la cantidad de NPs en el agregado, el incremento teórico empieza a disminuir.

3.2.2 Agregación de Nanosistemas

Las Nps pueden ser de distintos tamaños y composición y son consideradas los ladrillos de la construcción en la nanoarquitectura de distintas estructuras. Sin embargo, en la actualidad los NS no solo están compuestos de NPs sino que están conformados por una basta red de sofisticadas interacciones entre componentes ópticos, electrónicos, químicos, etc. En este sentido, ha sido necesario desarrollar métodos específicos de medición, protocolos, etc. que permitan controlar detalladamente el proceso de "ensamble" de los componentes que forman las estructuras. Es la modificación superficial de las

NPs, un proceso de gran importancia en el diseño de la arquitectura de NS complejos.

Las metodologías de síntesis de las NPs pueden clasificarse, según la forma de obtención de las estructuras, en "bottom up" o "top down"; y dependiendo del principio empleado en la síntesis, pueden clasificarse en físicos y químicos.^{18,19,20,21} Las NPs sintetizadas, en esta tesis, se encuentran como dispersiones coloidales en un medio electrolítico.

3.3 Motivación y objetivos

El diseño de nanoestructuras para ser aplicadas al campo de la nanomedicina es un área de creciente auge. Una de las estructuras mas difíciles de sintetizar, por su alta inestabilidad, es la de agregados pequeños de nanopartículas. Estos agregados, al tener un incremento del campo en el *gap*, son de especial interés pues el efecto fototérmico es mucho mayor que en las NPs aisladas. Los complejos metálicos podrían servir como agentes capaces de agregar, y estabilizar los agregados formados.

3.4 Materiales y métodos

3.4.1 Materiales

Se trabajó con los complejos $\text{Ru}(1,10\text{-fenantrolina})_3^{2+}$ y el $\text{Ru}(5\text{amino-}1,10\text{-fenantrolina})_3^{2+}$. El primero fue obtenido comercialmente, mientras que el segundo se sintetizó utilizando una técnica asistida por microondas.

También se utilizó HAuCl_4 (Carlo Erba), citrato de sodio (SIGMA Aldrich), agua MQ, etilenglicol (SIGMA Aldrich)

Las concentraciones de las soluciones coloidales de NPs se determinaron utilizando los valores del máximo de absorbancia y modelando con la teoría de Mie.^{22,23,24,25}

3.4.2 Síntesis del complejo

3.4.2.1 Síntesis asistida por Microondas

Para la síntesis del $[\text{Ru}(5\text{amino-}1,10\text{-fenantrolina})_3]^{2+}$ (Figura 3.2) se pesaron 0,0138g de tricloruro de rutenio y 0,0527g del ligando fenantrolínico. La mezcla, de color negro, fue ubicada en un vial de 10mL apto para microondas.

Los parámetros para esta síntesis asistida por microondas fueron optimizados previamente. Para ello se probaron diferentes solventes, tiempos de reacción y temperaturas de reacción, encontrándose que para esta síntesis el mejor solvente fue el etilenglicol. Se trabajó con un tiempo de reacción de 2 minutos y 200°C de temperatura de reacción. La temperatura de ebullición del etilenglicol es de 198°C, por lo que la síntesis fue factible.

Una vez finalizada la reacción, se observó un color naranja oscuro en el crudo de reacción. Sobre el crudo se añadió gota a gota una solución saturada de NH_4PF_6 (hexafluorofosfato de amonio). Se observó una turbidez propia de la formación de un precipitado de la sal de hexafluorofosfato de nuestro complejo. Dicho precipitado se filtró, y se lavó numerosas veces la muestra con agua destilada y a posteriori con éter. Se dejó secar en estufa a 45°C durante 48hs y luego el sólido se pesó. Un procedimiento similar también involucró el uso de ácido perclórico, para formar el perclorato de nuestro compuesto.

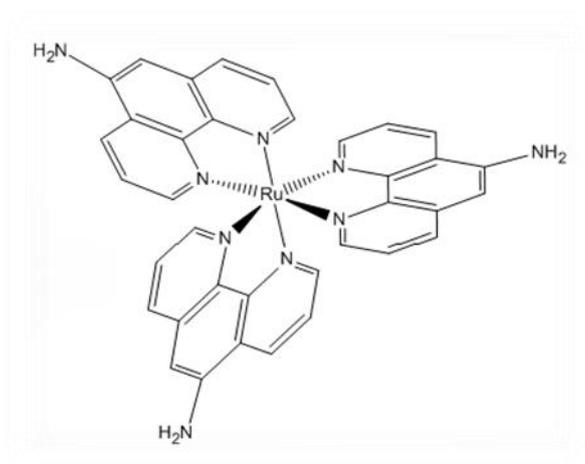


Figura 3.2 Estructura del $\text{Ru}(5\text{amino-1,10-fenantrolina})_3]^{2+}$

3.4.3 Síntesis de las NPs

Uno de los métodos más ampliamente difundidos para la síntesis de nanopartículas metálicas esféricas fue desarrollado por Turkevich y colaboradores²⁶. Este método consiste en la reducción de una sal precursora de oro, generalmente ácido tetracloro aúrico: HAuCl_4 , usando como agente reductor un reductor débil, como el citrato de sodio en solución acuosa. A temperatura ambiente, el proceso se encuentra cinéticamente desfavorecido por lo que la síntesis debe ser llevada a cabo a temperaturas mayores, en particular, cercanas a la ebullición (90°C aproximadamente). El tiempo de reacción es de aproximadamente 30 minutos.

Al comienzo de la reacción la solución permanece translúcida, y luego comienza a tornarse de color de acuerdo al tamaño de las partículas metálicas sintetizadas. Las NPs resultantes son relativamente estables durante periodos prolongados (incluso meses) encontrándose estabilizadas por el propio reductor (citrato) o sus productos de reacción.^{27,28} La relación de concentraciones entre el precursor y el estabilizante es de suma importancia, puesto que es responsable de sintonizar el tamaño deseado de las NPs. Mientras mayor sea la concentración de estabilizante, menor será el tamaño promedio de las NPs obtenidas. En este trabajo doctoral se utilizó un espectro amplio de NPs de diferentes tamaños y distintas relaciones de precursor/estabilizante.

3.4.4 Medidas espectroscópicas

Para los estudios de espectroscopía Raman de superficie aumentada (SERS, por sus siglas en inglés: Surface Enhanced Raman Spectroscopy) se, emplearon láseres de He-Ne de longitud de onda 632,8 nm, de iones Ar a 514,5 y 488 nm y de estado sólido 785 nm. En todos los casos las intensidades del haz incidente medido antes de las muestras fue del orden de algunos mW.

Se calcularon los valores del factor de incremento analítico (AEF), utilizando la siguiente ecuación:

$$AEF = \frac{I_{SERS}[Raman]}{I_{Raman}[SERS]} \quad (\text{Ec 3.1})$$

3.4.5 Microscopía de Transmisión electrónica

Las imágenes de microscopía de transmisión electrónica (TEM, del inglés Transmission Electronic Microscopy) de las NPs y nanoagregados, fueron registradas en un microscopio electrónico JEM-Jeol 1120, empleando un

voltaje de aceleración de 80 kV. Las muestras fueron preparadas dejando secar una gota de solución sobre la grilla TEM a temperatura ambiente.

Dicho microscopio se encuentra en el Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE), del INTA.

3.5 Resultados y discusión

3.5.1 Síntesis de complejos

La síntesis de los complejos de Ru(II) (Figura 3.3) ya ha sido bien descrita, nuestro aporte ha consistido en el uso de un equipo de microondas capaz de disminuir considerablemente el tiempo de reacción y el uso de solventes. En este sentido se busca aportar a lo que se conoce como *green chemistry*.

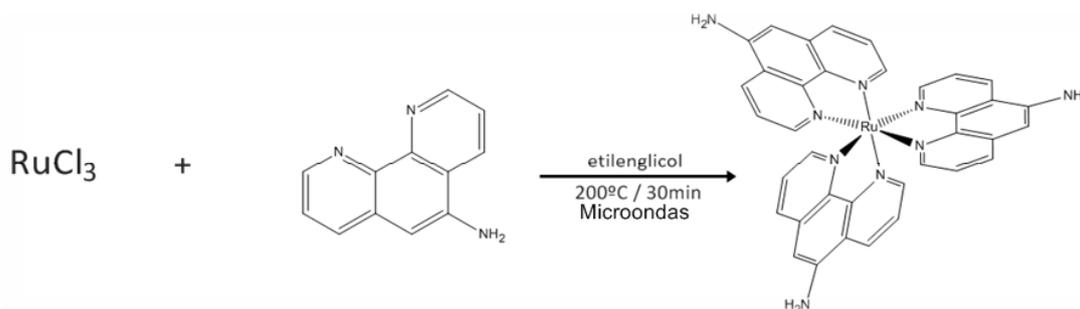


Figura 3.3 Diagrama de la reacción de síntesis por Microondas

Se usó hexafluorofosfato como contraión para precipitar el complejo del crudo y se calculó el rendimiento de la reacción encontrándose un valor de 93,7%.

Para identificar los complejos sintetizados se caracterizó el complejo espectroscópicamente (Figura 3.4), encontrándose los espectros característicos de absorción y emisión de los complejos fenantrolínicos de Ru(II).

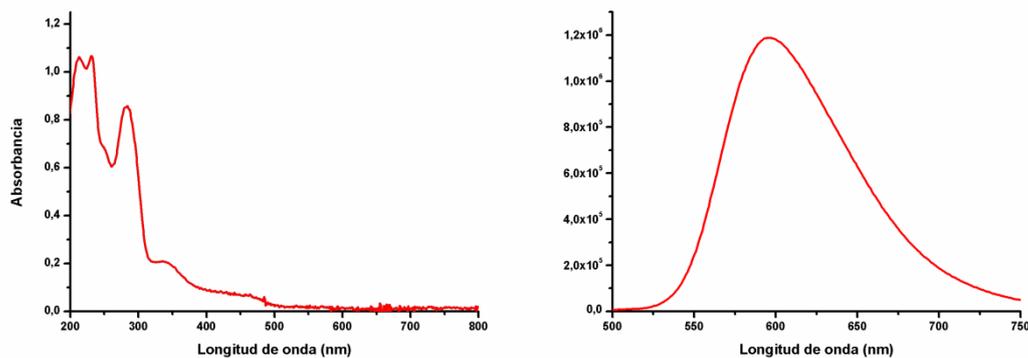


Figura 3.4 Espectro de Absorción (izq) y de emisión (der) del complejo $\text{Ru}(5\text{NH}_2\text{-1,10-fenantrolina})_3]^{2+}$ en medio acuoso.

El espectro de IR arrojó bandas características de los complejos fenantrolínicos de Ru(II) y mostró la presencia del sustituyente amino.^a Por otra parte el espectro de RMN^b coincide con los valores encontrados en bibliografía.^{29,30,31}

3.5.2 Interacción NPs-complejos

3.5.2.1 Experimentos de campo lejano

Cuando se procede a mezclar una solución de NPs con una solución de complejo de Ru (II) se obtienen cambios en el espectro de absorción, tal como muestra la Figura 3.5. En la misma se observa como la presencia de complejo genera la aparición de una banda a longitudes de onda superiores a la del

^a El espectro de infrarojo mostró las señales propias de los ligandos de tipo fenantrolina y la señal de *stretching* a 3402 cm^{-1} propia de la presencia del ligando -NH_2 .

^b RMN-¹H (400,16 MHz, Acetona deuterada, 22°C) δ (ppm), J (Hz) = 8,94 (3H, d, $J=8,4$); 8,67 (3H, dd, $J_1=8,5$, $J_2=1,8$); 8,37 (3H, d, $J=8,4$); 8,26 (3H, s. ancho); 8,22 (3H, m); 8,09 (3H, m); 8,02 (3H, dd, $J_1=6,2$, $J_2=1,7$).

plasmón de la NP (~550nm). La aparición de este tipo de bandas son típicas de la formación de agregados de NPs. Como control, en violeta podemos observar que ante un agregado de solvente no hay aparición de una nueva banda; solo se observa una disminución en la intensidad de la absorptividad propia de la dilución del sistema.

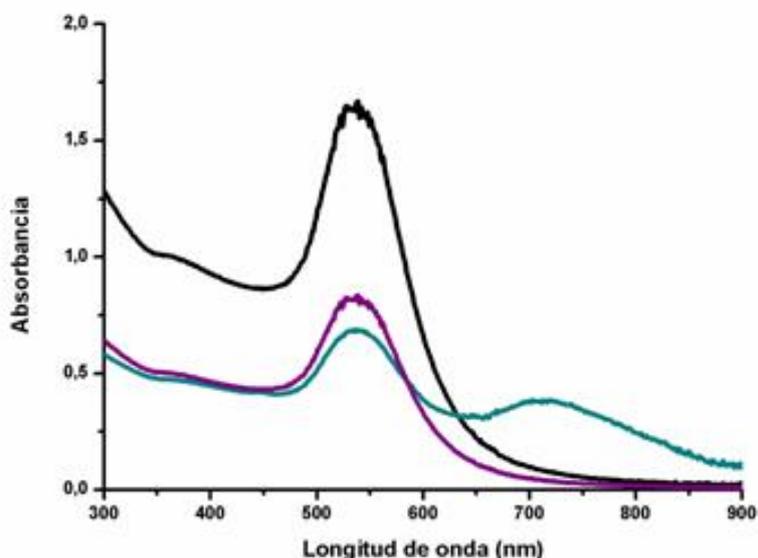


Figura 3.5 Espectros de extinción de una solución de NPs de Au (56 nm de diámetro), en ausencia (espectro negro) y presencia (espectro violeta) de $\text{Ru}(5\text{NH}_2\text{-phen})_3^{2+}$. En violeta se encuentra una solución de NPs con un volumen agregado de solvente similar al de complejo, a modo de control. Concentración de $[\text{NPs}] = 2,45 \times 10^{-11}$ M y $[\text{complejo}] = 2,39 \times 10^{-6}$ M.

Un estudio cinético nos permitió demostrar que a medida que pasa el tiempo desde que se realiza el agregado de complejo a la solución de NPs, aumenta la formación de nanoagregados. (Figura 3.6) Este efecto se observa tanto para el $\text{Ru}(5\text{-NH}_2\text{-phen})_3^{2+}$ como para el $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$.

A la hora de la formación de los nano-agregados, juega un rol importante la metodología por la cual se procede a mezclar las soluciones de NPs y de complejo de Ru(II). En la Figura 3.7 podemos observar tres soluciones, la primera **(a)** es una solución de NPs de Au de un tamaño de 56 nm ($1,07 \times 10^{-11}$ M). Cuando a dicha solución se le hace un agregado único de complejo no se observan cambios de color (apreciables), tal como nos indica la solución **(b)**.

Sin embargo cuando se procede a agregar el mismo volumen de complejo que en la solución **(b)**, pero ahora, alicuotado, obtenemos al final de los agregados una solución de color diferente **(c)**.

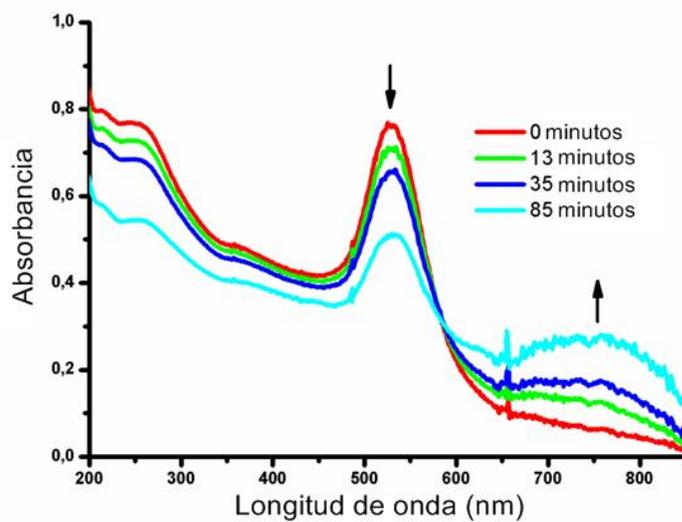


Figura 3.6 Espectros de extinción de una solución de NPs de Au (56 nm de diámetro), en presencia de Ru(5NH₂-phen)₃²⁺ a distintos tiempos de reacción. Concentración de [NPs]=1,14x10⁻¹¹ M y [complejo]=1,16x10⁻⁶ M.

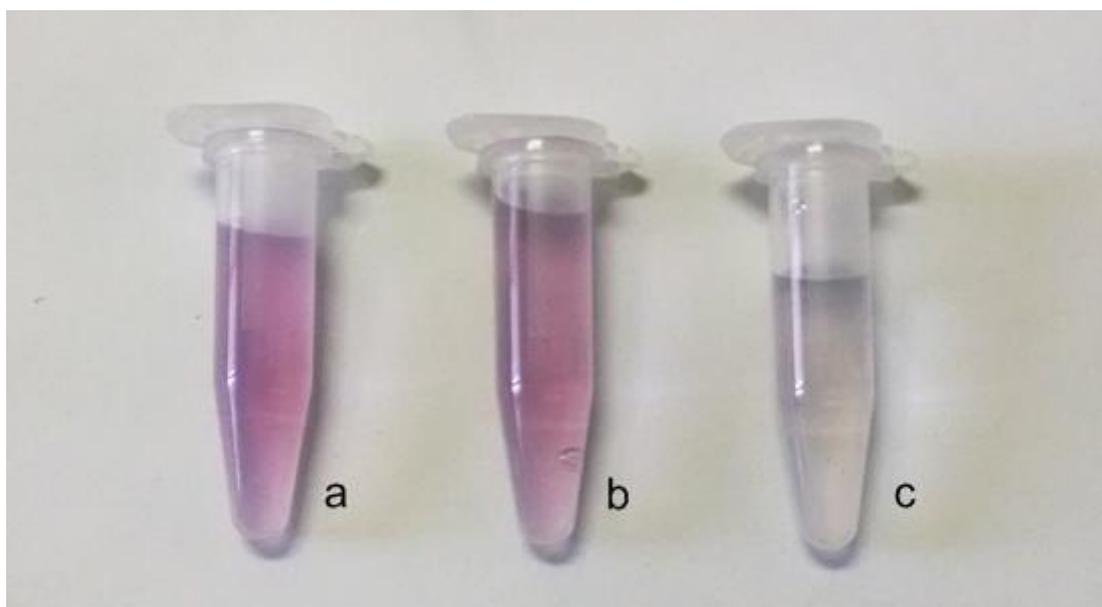


Figura 3.7 Soluciones de AuNPs. a. Sin agregado de complejo. b. Solución de AuNPs con agregados consecutivos de $\text{Ru}(5\text{NH}_2\text{-phen})_3^{2+}$. c. Solución de AuNPs con un agregado único de $\text{Ru}(5\text{NH}_2\text{-phen})_3^{2+}$.

Estos nos estaría indicando que el producto resultante de la reacción entre las NPs y los complejos, es sumamente lábil al método en que se agregan los reactivos. La Figura 3.8 muestra los espectros de absorción para las soluciones, donde se realiza un único agregado y agregados progresivos. El espectro negro corresponde a la solución **(b)** mientras que el rojo corresponde a la solución **(c)**.

Podemos observar que agregados progresivos de complejo, genera que los nanosistemas obtenidos sean de mayor tamaño, ya que la banda formada se encuentra corrida a longitudes de onda mayores.

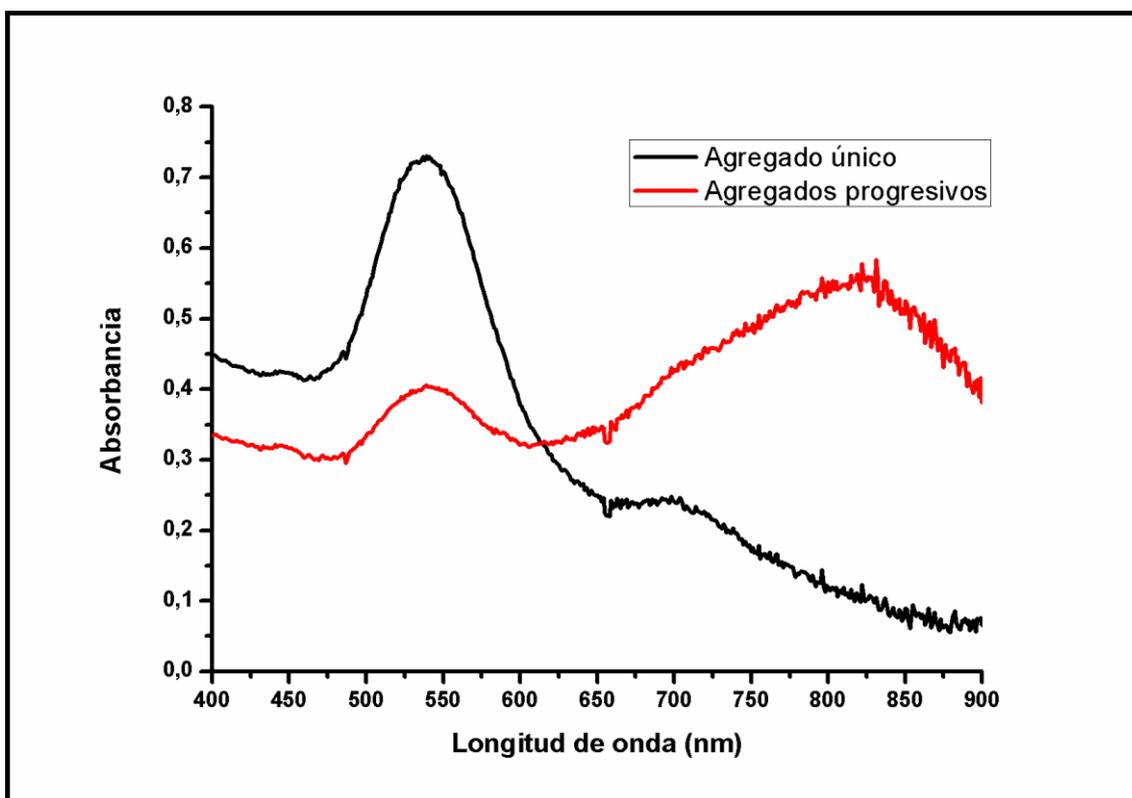


Figura 3.8 Espectros de Absorción de AuNPs. a. Sin agregado de complejo. b. Solución de AuNPs con agregados consecutivos de $\text{Ru}(5\text{NH}_2\text{-phen})_3^{2+}$. c. Solución de AuNPs con un agregado único de $\text{Ru}(5\text{NH}_2\text{-phen})_3^{2+}$. Concentración de $[\text{NPs}] = 1,07 \times 10^{-11} \text{ M}$ y $[\text{complejo}] = 1,07 \times 10^{-6} \text{ M}$

En tal sentido también podemos pensar que las relaciones de concentraciones de NPs y complejo juegan un rol importante en la formación de los nanoagregados.

La Figura 3.9 muestra una solución de NPs en ausencia de complejo (I) y soluciones de NPs con diferentes concentraciones de complejo (II a VI). Las condiciones de cada una de las mezclas aparecen en la Tabla 3.1. Como podemos observar no existe una respuesta lineal de la formación de los nanoagregados con la concentración de complejo añadido a la solución.

Tabla 3.1 Valores de relación de concentraciones de las NPs con el complejo.

Eppendorf n ^o	[Ru(5NH ₂ -phen) ₃] ³⁺	[NPs]	Relación de concentraciones
I	0	2,55x10 ⁻¹¹ M	-
II	2,55x10 ⁻⁴ M	2,55x10 ⁻¹¹ M	1x10 ⁷
III	2,55x10 ⁻⁵ M	2,55x10 ⁻¹¹ M	1x10 ⁶
IV	2,55x10 ⁻⁶ M	2,55x10 ⁻¹¹ M	1x10 ⁵
V	2,55x10 ⁻⁷ M	2,55x10 ⁻¹¹ M	1x10 ⁴
VI	2,55x10 ⁻⁸ M	2,55x10 ⁻¹¹ M	1x10 ³

Podemos observar que a concentraciones pequeñas de complejo (VI) las soluciones no sufren un cambio de color apreciable. Sin embargo a concentraciones mayores los cambios de color en las soluciones sí son considerables. A su vez, se llevó a cabo el análisis espectral de las distintas soluciones, considerando dos estadios en el proceso de agregación. (Figura 3.10). Como podemos observar, los cambios en el espectro de absorción para la mezcla III son considerablemente mayores que para las otras mezclas, entendiéndose por esto una mayor formación de agregados. También se

observa en esta mezcla, a diferencia de las otras, que existe una diferencia espectral a los diferentes estadios de la agregación (1 y 8 minutos) estudiados, indicando un aumento en el tamaño de los agregados.

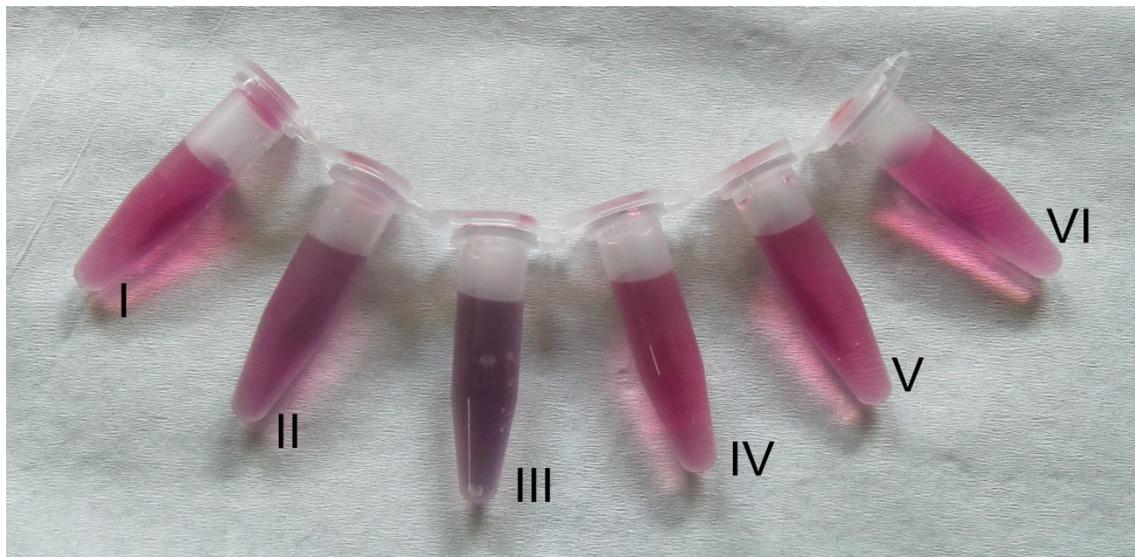


Figura 3.9 Soluciones de NPs de Au, con distintas concentraciones de $\text{Ru}(5\text{NH}_2\text{-phen})_3^{2+}$.

Si analizamos las mezclas (IV) y (V), donde las concentraciones de complejo son menores, podemos observar que no existen cambios considerables en los espectros aún. Incluso para la mezcla (V) prácticamente los cambios son nulos. Esto resulta lógico, puesto que a menor concentración de agente agregante (complejo de Ru(II)), menor será la formación de agregados.

Sin embargo cuando evaluamos comparativamente las mezclas (II) y (III), observamos que no existe la misma tendencia, que para las concentraciones menores. Cuando la concentración de complejo es mucho mayor, la agregación de las NPs no pareciera ser tan efectiva. La formación de agregados se debe a que los citratos (carga negativa), que se encuentran estabilizando las NPs, interaccionan con los complejos catiónicos de Ru(II). Un exceso de complejo, podría generar que, rápidamente, la totalidad de la superficie de la NP se recubra con complejo, y ahora se encuentren estabilizadas cargadas, en su superficie, positivamente. Existe, por tanto, una

concentración crítica a la cual, por debajo de esta, la formación de agregados es menor, y por encima de esta existe un efecto protector de los complejos catiónicos a las NPs.

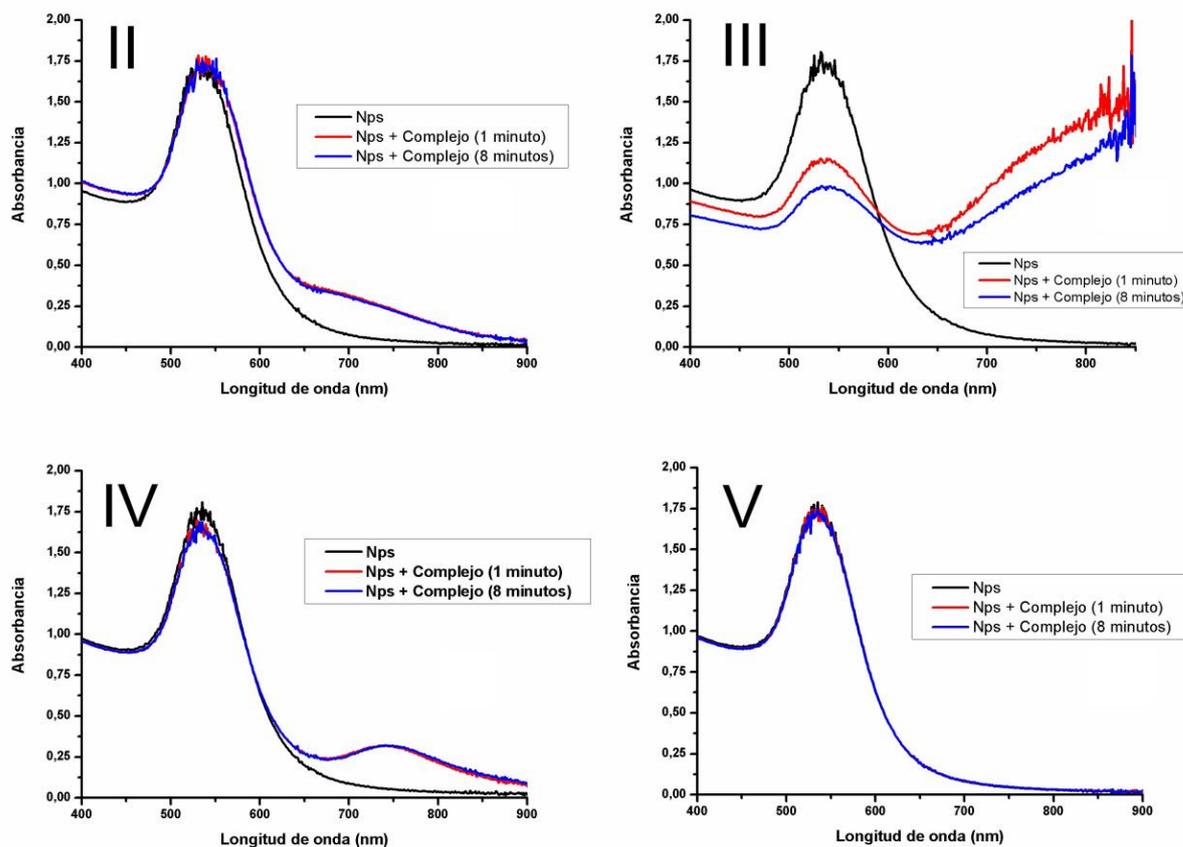


Figura 3.10 Espectros de soluciones de NPs de Au a distintas concentraciones de $\text{Ru}(\text{5NH}_2\text{-phen})_3^{2+}$. Relación de citrato/A. Áurico= 1,5.

Por otro lado analizando NPs que han sido sintetizadas con una concentración mayor de citrato (Figura 3.11) y tratadas con la misma relación de concentración $[\text{Complejo}]/[\text{NPs}]$, encontramos que la concentración crítica a la cual se da un mayor cambio espectral es diferente que para las NPs sintetizadas con una relación $[\text{citrato}]/[\text{HAuClO}_4]$. En tal sentido podemos inferir que no solo es relevante para la formación de los agregados, la relación $[\text{Complejo}]/[\text{NPs}]$, sino que también es de vital importancia tener en cuenta la relación $[\text{citrato}]/[\text{HAuClO}_4]$, pues da una idea de cuan estabilizada está la NP.

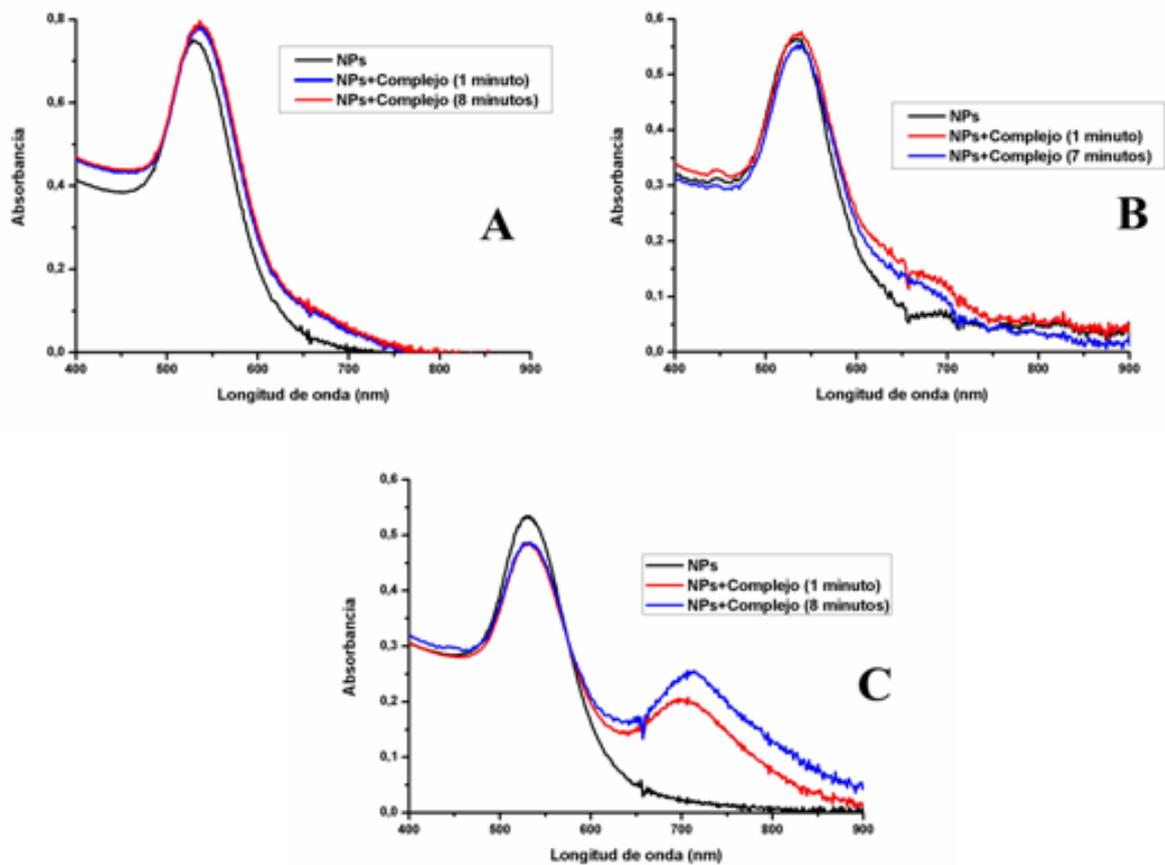


Figura 3.11 Espectros de soluciones de NPs de Au a distintas concentraciones de $\text{Ru}(5\text{NH}_2\text{-phen})_3^{2+}$. Relación de citrato/Ácido Aúrico= 2

3.5.2.2 Microscopía.

Se llevaron a cabo estudios en distintas imágenes TEM tomadas a diferentes estadíos del proceso de agregación. En particular se tomaron dos tiempos: 13 minutos (Fig 3.12a) y 35 minutos (Fig 3.12b).

Como podemos observar a estadíos iniciales de la agregación se obtiene una gran cantidad de agregados pequeños (dímeros y trímeros). La Figura 3.13 es una imagen ampliada (escala $1\mu\text{m}$) de la muestra a 13 minutos. La imagen posee marcados los monómeros (rojo), los dímeros (verde) y los trímeros (azul) de NPs. Se cuantificó el tipo de nanoestructura presentes en la muestra, analizando más de 500 NPs encontradas en diversas imágenes TEM de baja magnificación. Se encontró que tenemos un 38% de las NPs aisladas,

un 36% como dímeros y un 26% como trímeros o agregados mayores. Estos datos se obtuvieron considerando como total el número de NPs que tenemos en la imagen. Si cuantificamos en función de las nanoestructuras totales, obtenemos que tenemos solo un 52,5% de NPs aisladas, un 42,5% como dímeros, y un 5% como trímeros.

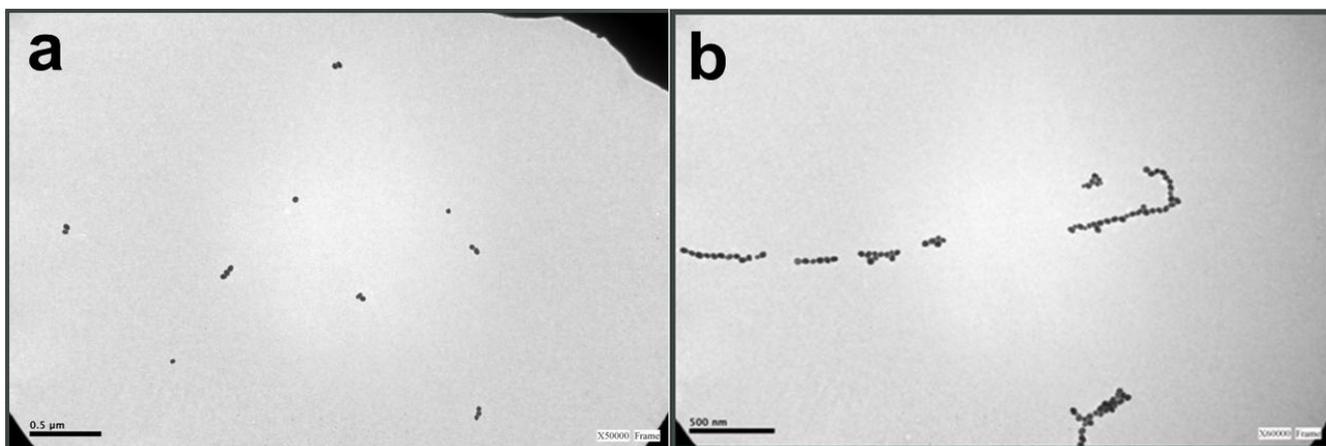


Figura 3.12 Imágenes de microscopía TEM a dos tiempos del proceso de agregación (a. 13 minutos. b. 35 minutos) para NPs de 56nm de diámetro en presencia de $\text{Ru}(\text{5NH}_2\text{-phen})_3^{2+}$.

Estos porcentajes muestran que a tiempos cortos de la agregación existe una gran cantidad de nanoagregados pequeños y que estos son relativamente estables. A diferencia de otros agentes agregantes, los complejos de Rutenio(II) tendrían la capacidad de generar agregados ordenados con una cinética controlada.

Estos porcentajes muestran que a tiempos cortos de la agregación existe una gran cantidad de nanoagregados pequeños y que estos son relativamente estables. A diferencia de otros agentes agregantes, los complejos de Rutenio(II) tendrían la capacidad de generar agregados ordenados con una cinética controlada.

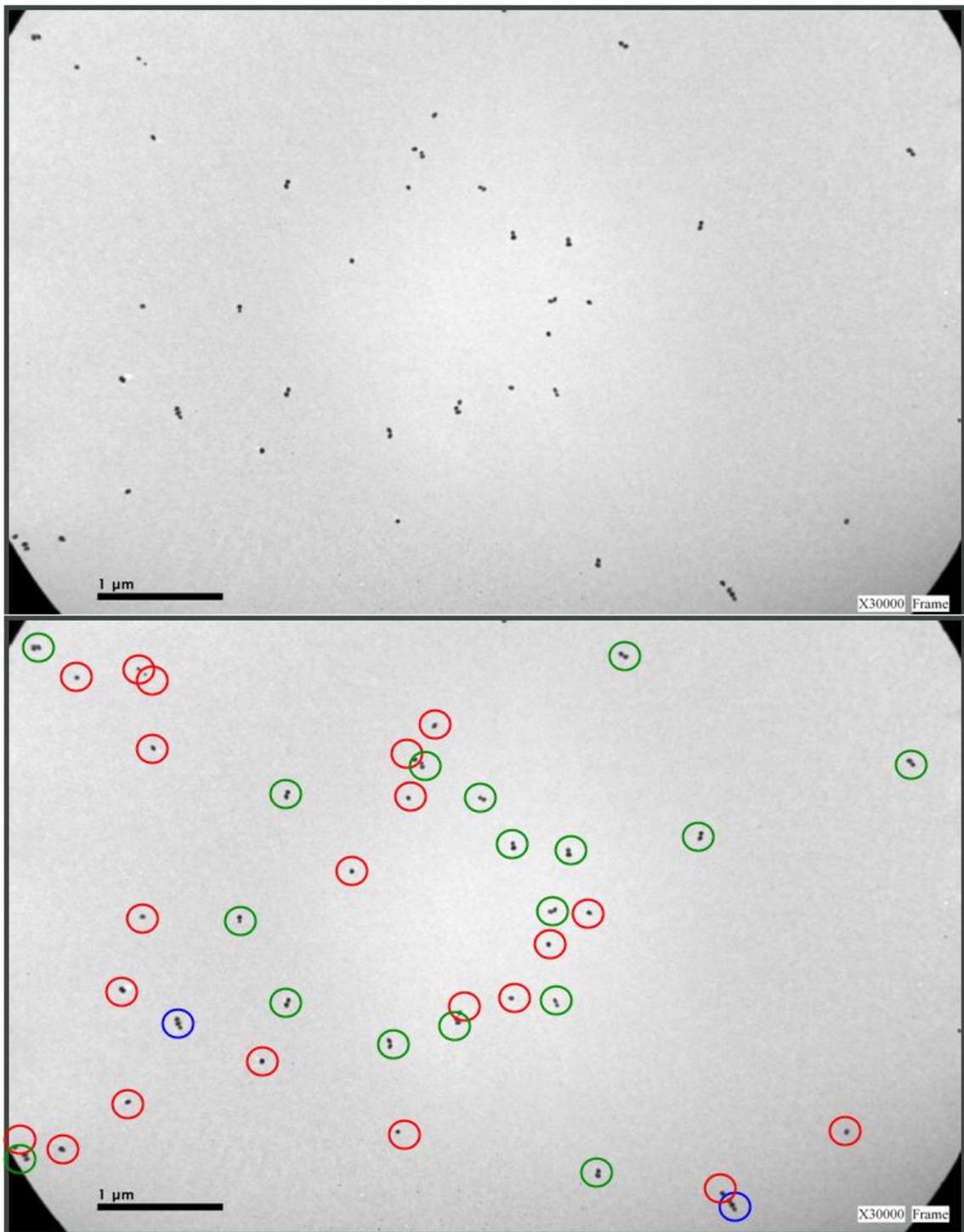


Figura 3.13 Imágenes de microscopía TEM a 13 minutos del proceso de agregación para NPs de 56nm de diámetro en presencia de $\text{Ru}(5\text{NH}_2\text{-phen})_3^{2+}$. b. Se encuentran marcados los tipos de estructuras presentes en la imagen, NPs aisladas (rojo), dímeros (verde) y trímeros (azul)

A estadios más largos de la agregación (35min) se puede observar la presencia de agregados lineales en forma de cadena. Un posible mecanismo podría explicarse considerando un proceso de adición secuencial de las NPs o de los agregados pequeños que se vayan formando. (Figura 3.14) Entender el mecanismo por el cual se generan estas nanocadenas requeriría un análisis más profundo que no es parte de los alcances de esta tesis.

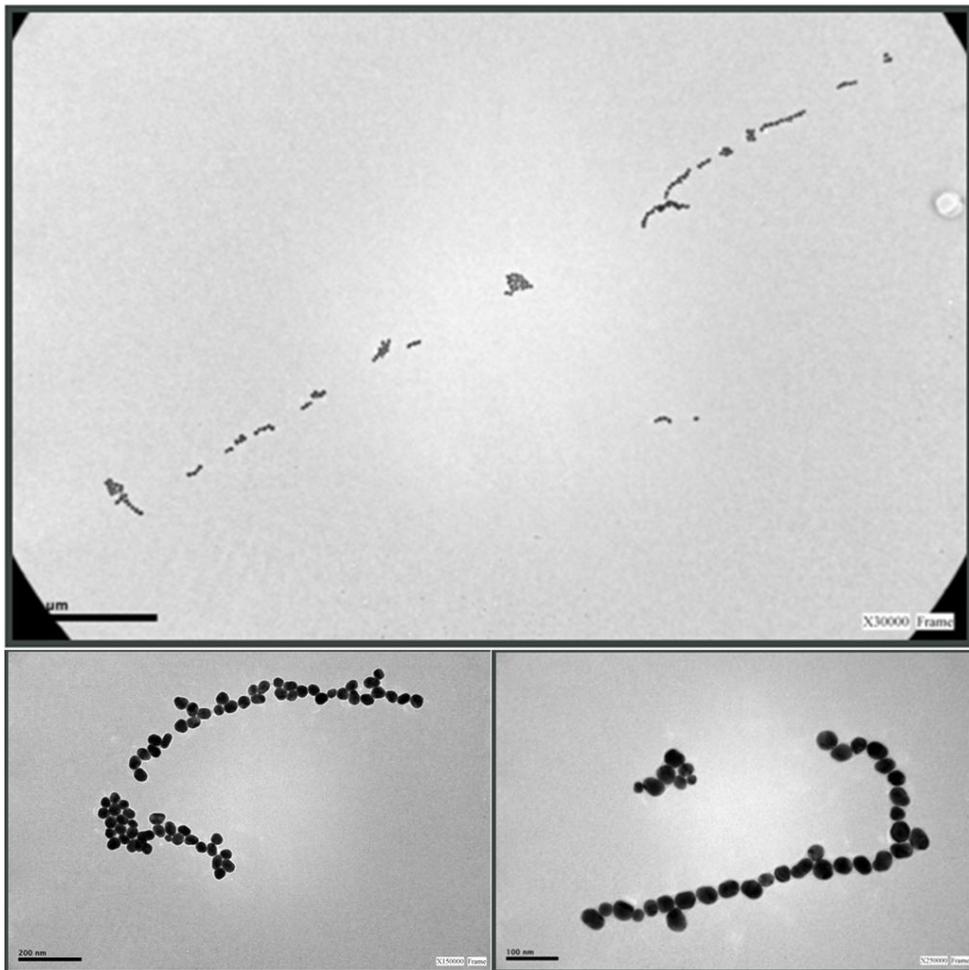


Figura 3.14 Imágenes de microscopía TEM a 35 minutos de agregación

3.5.2.3 Experimentos de campo cercano (SERS)

Cuando las NPs se encuentran agregadas, se produce un gran incremento del campo eléctrico en la región inter-partícula (*gap*). Este incremento del campo puede producir incrementos en la respuesta espectroscópica de las moléculas que se encuentren en el *gap*. Si nuestros complejos metálicos son responsables de la agregación, debieran encontrarse en espacio interpartícula donde el campo se encuentre incrementado.

Se realizaron experimentos SERS utilizando los dos complejos metálicos de Ru(II) estudiados y se procedió a determinar el factor de incremento analítico (AEF), utilizando la ecuación 3.1. Se trabajó con una solución de NPs de 35nm, utilizando una concentración de $3 \times 10^{-7} \text{M}$ de complejo en presencia de las NPs, y de $2,55 \times 10^{-4} \text{M}$ en ausencia de NPs.

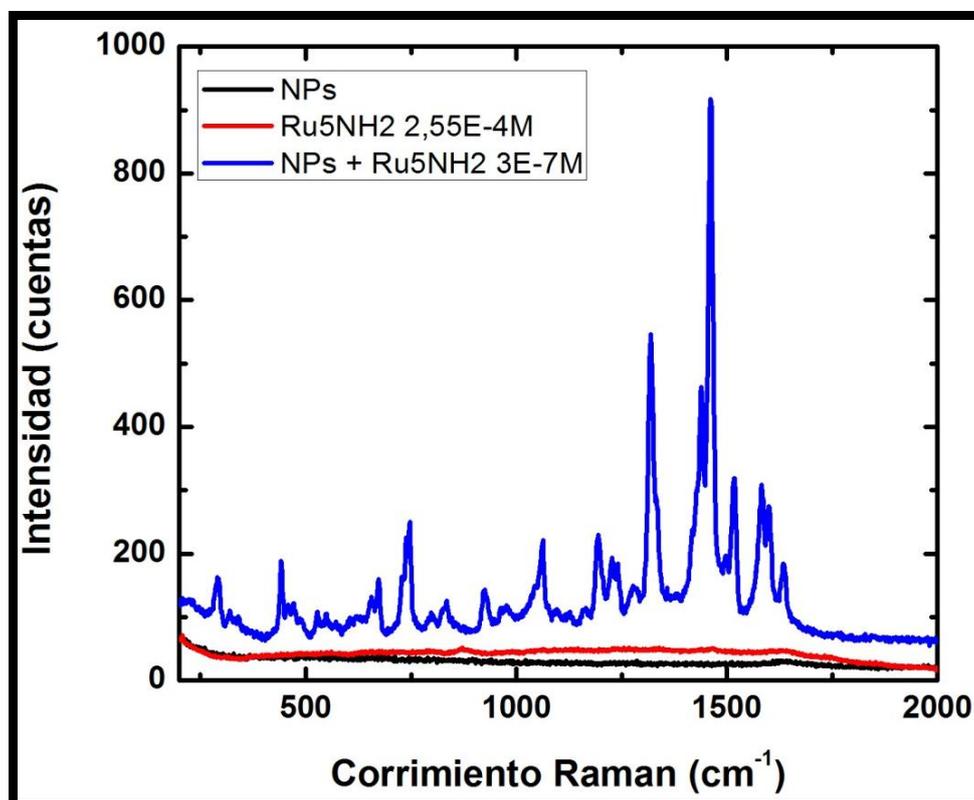


Figura 3.15 Señales Raman para una solución de NP (negro), una solución de complejo de Rutenio (II) (rojo) y una solución de agregados de NPs (azul).

Los factores de incremento analítico obtenidos para el modo 1490cm^{-1} fueron de $9,2 \times 10^4$ para el complejo $\text{Ru}(5\text{-NH}_2\text{-phen})_3^{2+}$ (Figura 3.15) y de $1,3 \times 10^4$ para el $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$. Estos valores son muy similares y pueden ser considerados casi idénticos dentro de las incertezas experimentales de la técnica. Estos valores implican que los complejos se encuentran localizados en el *gap* interpartícula formando puentes moleculares que son responsables de la formación de agregados. Por otro lado, podemos observar que la presencia de los sustituyentes aminos no influye en el proceso de agregación; siendo la fuerza impulsora de la agregación la interacción electrostática entre las cargas superficiales de las NPs y la carga global positiva del complejo metálico.

Como ya se mencionó previamente los procesos de agregación de las NPs son procesos dinámicos, es decir que a diferentes tiempos se encuentran distribuciones de agregados de diferente tamaño. Por tal motivo, se evaluó la señal SERS a intervalos diferentes de tiempos, adicionando a una solución de NPs, una concentración de 4×10^{-10} M de $\text{Ru}(5\text{-NH}_2\text{-phen})_3^{2+}$ inicial y fija. (Figura 3.16)

Este estudio cinético de la señal SERS, presenta ciertos inconvenientes experimentales. Al ser muy baja la concentración de complejo metálico, es necesario integrar el espectro SERS durante tiempos prolongados; sin embargo, los tiempos de integración deben de ser menores a los tiempos de agregación. Es esta situación de compromiso la que generó que se ensayaran diversas condiciones experimentales, logrando una buena respuesta entre la señal obtenida y la cantidad de mediciones realizadas cuando los espectros se integraron durante dos promedios de 30 segundos. La λ_{exc} fue de $632,8\text{nm}$ (que corresponde al láser de He-Ne). En paralelo se midieron los espectros de extinción de la misma solución de NPs de 50nm de diámetro a la misma concentración de complejo.

Como podemos observar en la Figura 3.16, luego de dos minutos de agregación de las NPs, la señal SERS (a 1306nm) tiene una intensidad significativa, y esta señal disminuye paulatinamente durante los siguientes 20

minutos. Evaluando los espectros de extinción se observa que la banda de las NPs aisladas disminuye con el tiempo, mientras que aumenta la extinción a longitudes de onda mayores, indicando la presencia de formación de agregados.

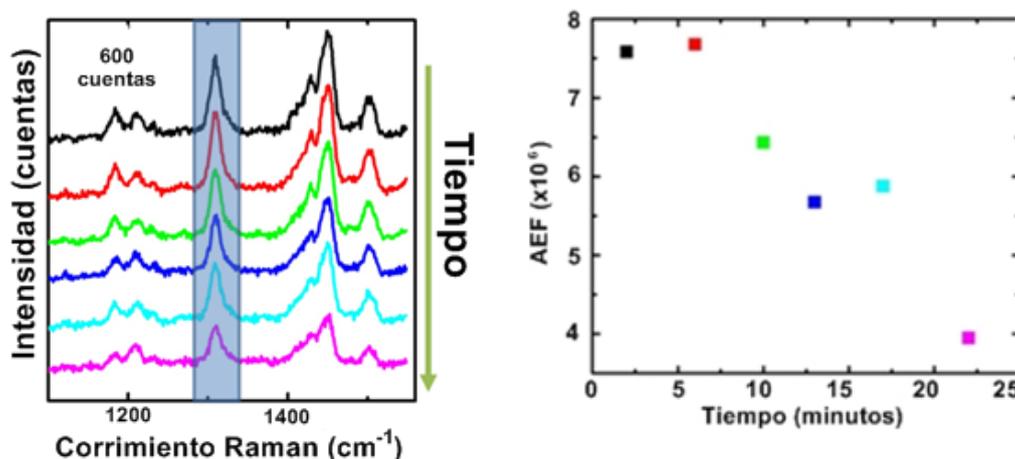


Figura 3.16 Evolución de la señal Raman y del AEF durante el proceso de agregación.

En la Figura 3.16 también se observa como se modifica el valor de la AEF en función del tiempo, observándose valores cercanos a 8×10^8 a tiempos cortos y una disminución cercana a valores de 4×10^8 luego de los 22 minutos de la agregación^c. Dicha disminución tiene relación con el tipo de agregado predominante a cada tiempo de agregación; a mayor tiempo se empiezan a observar agregados lineales de mayor longitud, los cuales poseen valores de señal SERS (y por ende de AEF) mucho menores.

También se procedió a determinar de manera conjunta con la variación del espectro Raman (y el AEF), la variación del espectro de extinción durante el proceso de agregación (Figura 3.17). Estas variaciones también soportan la idea de la formación de agregados cada vez mayores.

^c AEF es una magnitud adimensional.

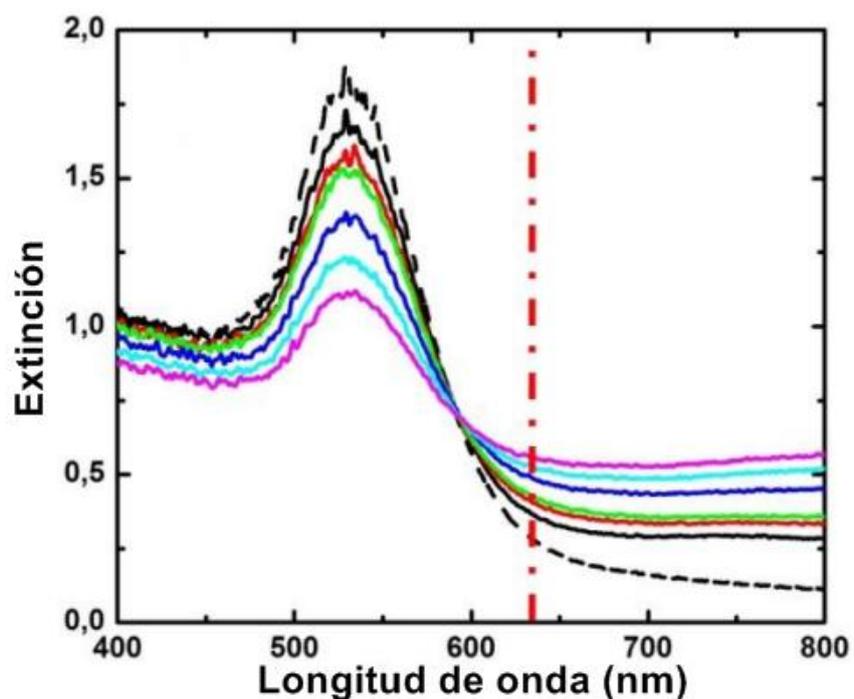


Figura 3.17 Evolución de la extinción durante el proceso de agregación.

3.5.2.4 Quenching de los complejos por las NPs

Los complejos polipiridínicos del Ru(II) poseen una emisión característica alrededor de los 610nm. Analizar los cambios de dicha emisión nos puede brindar importante información sobre la interacción entre el complejo metálico y las NPs. Se realizaron los estudios de *quenching* tanto para el complejo de Ru(II) sustituido con NH₂, como para el complejo con fenantrolina no sustituida.

Como podemos observar en las Figura 3.18, NPs de diferentes tamaños (30nm, 56nm y 70nm) tienen la capacidad de generar una disminución en la intensidad de emisión de los complejos de Ru(II) sin generar cambios en el máximo de emisión (*quenching*).

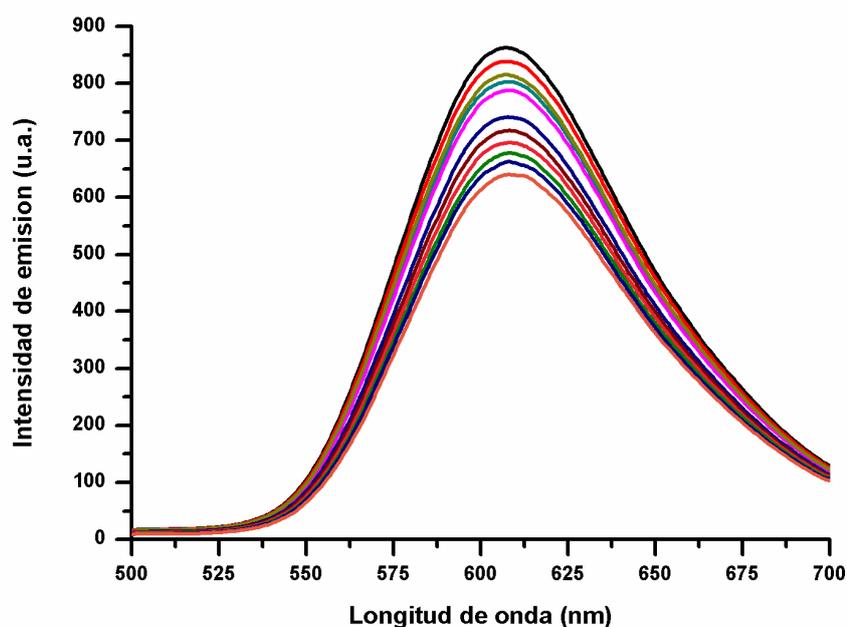


Figura 3.18 Intensidad de emisión del $\text{Ru}(5\text{NH}_2\text{-phen})_3^{2+}$ en presencia de diferentes agregados de NPs (70nm) a temperatura ambiente. Concentraciones de NPs de entre 0 pM (espectro negro) a 1,0 pM (espectro naranja).

Graficando F_0/F vs. $[\text{NP}]$, (donde F_0 es la intensidad de emisión del complejo en ausencia de NPs y donde F es la intensidad de emisión en presencia de sucesivos agregados de NPs) podemos encontrar un comportamiento muy diferente para cada diámetro de NP. Para cada sistema se encontró que la relación F_0/F vs $[\text{Q}]$ fue lineal, pudiéndose aplicar así la ecuación de Stern Volmer (ec. 1.8). La linealidad para cada sistema se puede visualizar en la Figura 3.19

Tabla 3.2 Valores de K_{sv} (M^{-1}) para los sistemas NP- $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ y NP- $\text{Ru}(5\text{NH}_2\text{-phen})_3^{2+}$

Tamaño de las NPs	$K_{\text{sv}} (\times 10^{11}) \text{ Ru}(\text{phen})_3^{2+} \text{ M}^{-1}$	$K_{\text{sv}} (\times 10^{11}) \text{ Ru}(5\text{NH}_2\text{-phen})_3^{2+} \text{ M}^{-1}$
30nm	0,616±0,007	0,622±0,007
56nm	5,7±0,2	5,5±0,1
70nm	11,0±0,3	11,3±0,3

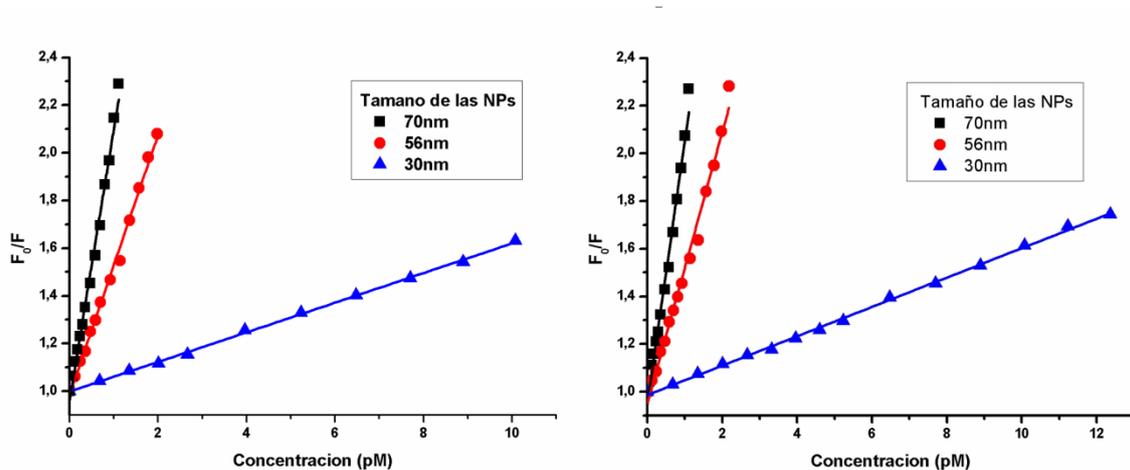


Figura 3.19 Representaciones de Stern Volmer para el $\text{Ru}(5\text{NH}_2\text{-phen})_3^{2+}$ (izq) y el $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ (der) a diferentes concentraciones picomolares de NPs.

A partir de la ecuación de Stern Volmer, pudimos determinar los valores de K_{sv} para cada sistema. Los valores se muestran a continuación en la Tabla 3.2.

Como primera observación podemos reconocer que los valores de las constantes de Stern Volmer aumentan según los diámetros de las NPs. Esto se puede ver representado en la Figura 3.19, y de manera más específica en la figura 3.20.

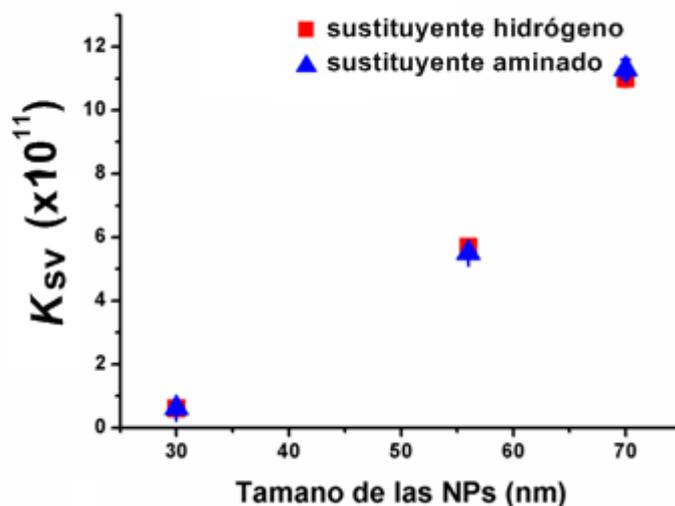


Figura 3.20 Valores de K_{sv} a diferentes tamaños de NPs para los sistemas NP- $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$ (rojo) y NP- $\text{Ru}(5\text{NH}_2\text{-phen})_3^{2+}$ (azul).

Del mismo modo podemos observar como los valores de las K_{sv} son independientes del tipo de complejo metálico. Esto nos daría una idea de que la interacción, en algún punto, está gobernada por las interacciones electrostáticas, y que el tipo de sustituyente presente en la fenantrolina es irrelevante. (Figura 3.21)

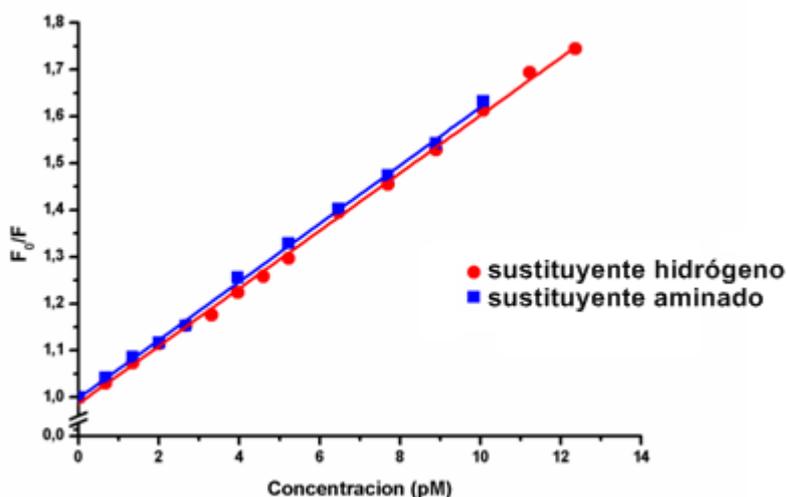


Figura 3.21 Gráficas de Stern Volmer para los sistemas NP-Ru(phen)₃²⁺ (rojo) y NP-Ru(5NH₂-phen)₃²⁺ (azul).

Cuando analizamos los valores de K_{sv} podemos observar que son valores varios órdenes de magnitud más grandes que los *quenchings* convencionales. Esto ocurre cuando la desactivación de la emisión es extremadamente eficiente, aún a bajas concentraciones de *quencher* (NPs). En nuestro sistema, podemos observar que las concentraciones de *quencher* son del orden de pM.

Realizando estudios resueltos en el tiempo para los complejos metálicos en ausencia y presencia de NPs, observamos que no existen cambios en los tiempos de vida de los complejos (Figura 3.22), por lo que podemos inferir que el *quenching* es estático y no dinámico. Esto nos permite entender que el proceso que está ocurriendo, implica la interacción directa de los complejos en su estado fundamental con la superficie de la NP. Mientras mayor es la superficie de la NP, esta tiene mayor posibilidad de interactuar con más

cantidad de complejos de Ru(II) en su estado basal. Estos ensayos se llevaron a cabo para los dos complejos metálicos.

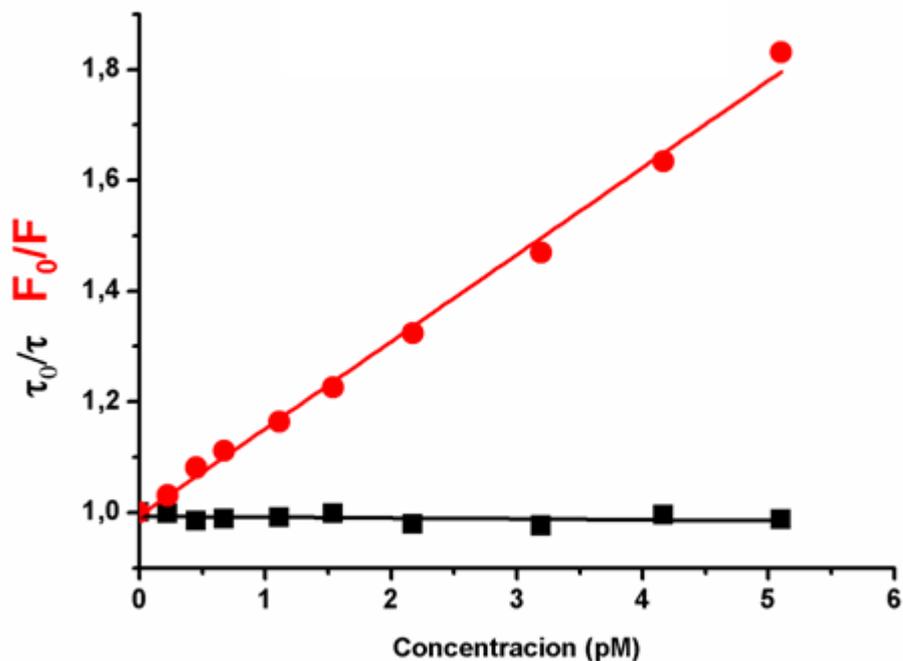


Figura 3.22 Gráficas de Stern Volmer para el sistema NP-Ru(5NH₂-phen)₃ determinado con medidas resueltas en el tiempo (□ negro) y de intensidad de emisión (○ rojo)

A pesar de que conocemos que el *quenching* es estático, no existe una relación lineal entre las K_{sv} y la superficie de la NP, mientras que si existe una relación lineal para con el volumen de la NP. Quizás esta pueda ser una línea interesante de trabajo a futuro, tratando de entender esa dependencia lineal con el volumen de la NP.

3.6 Conclusiones parciales

Los sistemas estudiados en este capítulo son sistemas materiales termodinámicamente inestables, es decir que energéticamente están desfavorecidos, siendo mas estable el material masivo. En este sentido el uso de complejos metálicos catiónicos de Ru(II) como agente agregante, favorece procesos de agregación controlados. Podemos sintetizar, de esta manera, agregados pequeños (dímeros o trímeros) y estables en el tiempo.

Esto nos permite obtener soluciones coloidales de nanoagregados para su posterior estudio o utilización en técnicas de microscopía como la “Microscopía optoacústica” donde los nanoagregados podrían tener propiedades muy interesantes.

Las diversas técnicas utilizadas en este capítulo ponen de manifiesto que el tipo de interacción entre las NPs y los complejos de Ru(II) es de naturaleza electrostática. Por otra parte, se observa un tipo de *quenching* estático, y no dinámico. Son los complejos los que se adsorben sobre la superficie de la NP, lo que permite explicar la estrecha relación entre el tamaño de la NP y la K_{sv} .

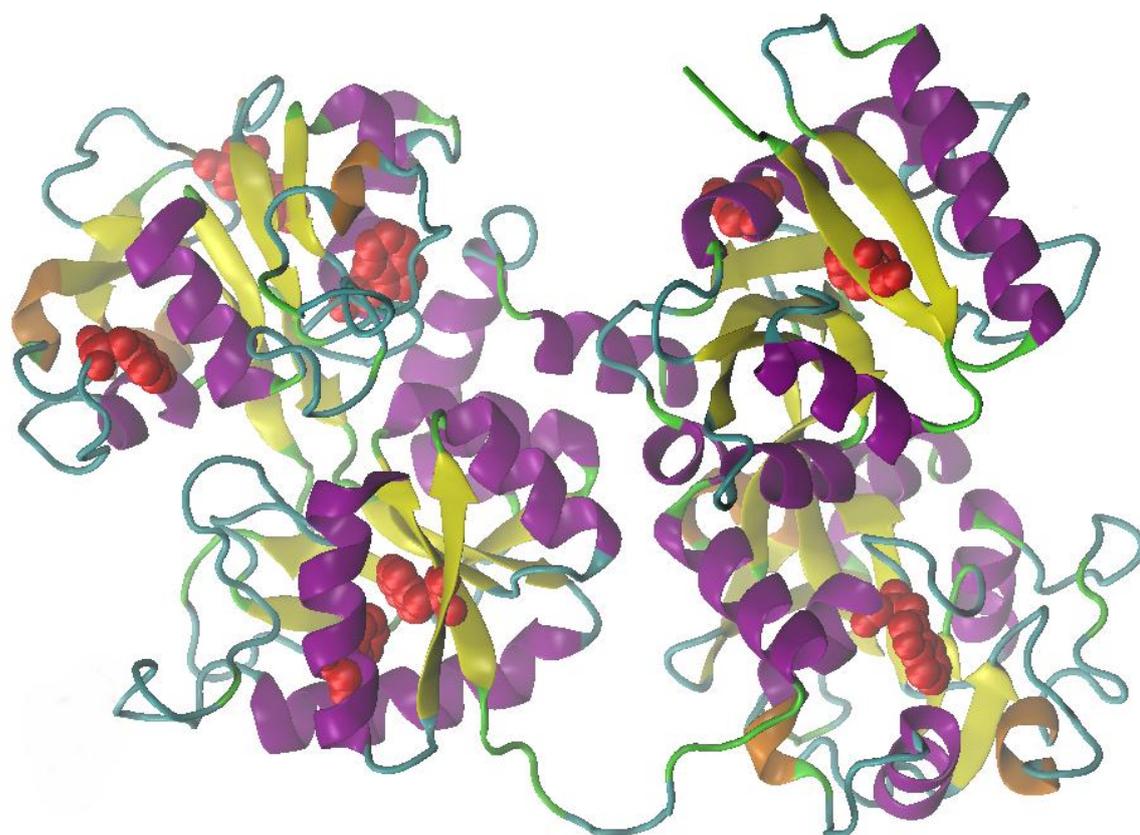
3.7 Referencias

-
- ¹ Guo, M.; Mao, H.; Li, Y.; Zhu, A.; He, H.; Yang, H.; Wang, Y.; Tian, X.; Ge, C.; Peng, Q.; *Biomaterials* 35 (2014) 4656–4666.
 - ² Jing, L.; Liang, X.; Deng, Z.; Feng, S.; Li, X.; Huang, M.; Li, C.; Dai, Z. *Biomaterials* 35 (2014) 5814–5821.
 - ³ Topete, A.; Alatorre-Meda, M.; Iglesias, P.; Villar-Alvarez, E. M.; Barbosa, S.; Costoya, J. A.; Taboada, P.; Mosquera, V. *ACS Nano* 8 (2014) 2725–2738.
 - ⁴ Wang, C.; Sun, X.; Cheng, L.; Yin, S.; Yang, G.; Li, Y.; Liu, Z. *Adv. Mater.* 26 (2014) 4794–4802.
 - ⁵ Lee, N.; Cho, H. R.; Oh, M. H.; Lee, S. H.; Kim, K.; Kim, B. H.; Shin, K.; Ahn, T. Y.; Choi, J. W.; Kim, Y. W.; et al. *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 10309–10312.
 - ⁶ Cheng, L.; Yang, K.; Chen, Q.; Liu, Z. *ACS Nano* 6 (2012) 5605–5613.
 - ⁷ Chen, Q.; Wang, C.; Zhan, Z.; He, W.; Cheng, Z.; Li, Y.; Liu, Z. *Biomaterials* 35 (2014) 8206–8214.
 - ⁸ Yin, W.; Yan, L.; Yu, J.; Tian, G.; Zhou, L.; Zheng, X.; Zhang, X.; Yong, Y.; Li, J.; Gu, Z.; et al. *ACS Nano* 8 (2014) 6922–6933.
 - ⁹ Ku, G.; Wang, X.; Stoica, G.; Wang, L. V. *Phys. Med. Biol.* 49 (2004) 1329–1338.
 - ¹⁰ Wilson, K.; Homan, K.; Emelianov, S. *Nat. Commun.* 3 (2012) 618–627
 - ¹¹ Mallidi, S.; Larson, T.; Tam, J.; Joshi, P. P.; Karpouk, A.; Sokolov, K.; Emelianov, S. *Nano Lett.* 9 (2009) 2825–2831.
 - ¹² Wilson, K.; Homan, K.; Emelianov, S. *Nat. Commun.* 3 (2012) 618–627.
 - ¹³ Kim, J. W.; Galanzha, E. I.; Shashkov, E. V.; Moon, H. M.; Zharov, V. P. *Nat. Nanotechnol.* 4 (2009) 688–694.
 - ¹⁴ Song, K. H.; Kim, C. H.; Cobley, C. M.; Xia, Y. N.; Wang, L. V. *Nano Lett.* 9, (2009) 183–188.
 - ¹⁵ Encina E.; Coronado E.; *J. Phys. Chem. C*, 115 (32) (2011) 15908–15914
 - ¹⁶ Encina E.; Coronado E.; *J. Phys. Chem. C*, 114 (9) (2010) 3918–3923
 - ¹⁷ Encina E.; Coronado E.; *J. Phys. Chem. C*, 114 (39) (2010) 16278–16284

-
- ¹⁸ R. G. Hobbs, N. Petkov, J. D. Holmes. *Chem. Mater.* 24 (2012) 1975–1991
- ¹⁹ B. Yan, S. V. Boriskina, B. M. Reinhard. *J. Phys. Chem. C*, 115 (2011) 24437–24453.
- ²⁰ X. Wu, P. G. Schultz. *J. Am. Chem. Soc.*, 131 (2009) 12497–12515.
- ²¹ A. M. Schwartzberg, J. Z. Zhang. *J. Phys. Chem. C*, 112 (2008) 10323–10337.
- ²² Y. I. Xu, B. A. S. Gustafson, *JQSRT.*, 70 (2001) 395-419
- ²³ Y. I. Xu, B. A. S. Gustafson, F. Giovane, J. Blum, S. Tehranian. *Phys. Rev E.*, 60 (1999) 2347-2365
- ²⁴ Y. I. Xu. *Phys. Lett. A*, 249 (1998) 30-36
- ²⁵ Y. I. Xu. *Appl. Opt.*, 36 (1997) 9496-9508
- ²⁶ J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier, *Discuss. Faraday Soc.*, 11 (1951) 55-75.
- ²⁷ G. Frens, *Colloid and Polymer Science*, 250 (1972) 736-741
- ²⁸ F. Zhang, D. G. Dressen, M. W. A. Skoda, R. M. J. Jacobs, S. Zorn, R. A. Martin, C. M. Martin, G. F. Clark, F. Schreiber. *Eur. Biophys. J.*, 37 (2008) 551–561.
- ²⁹ Brown K.; Hou X.; Olajide B.; Krueger K.; Hinson J.; Graham P.; *Int. J. Chem.*; 3 (2011) 12.
- ³⁰ Ellis C. *Inorg Chem*; 22, (1983) 1283-1291
- ³¹ Bachas L.; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1997) 1571–1577



***Caracterización espectroscópica de
la asociación entre $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ y
Transferrina***



4.1 Resumen

En este capítulo se presenta un estudio de la asociación del $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ con la Transferrina. Se determinaron los parámetros termodinámicos y se caracterizó el tipo de interacción presente. A su vez se analizaron los tipos de residuo presentes en el sitio de asociación.

Se realizaron estudios a distintos pHs, y se analizaron de manera comparativa las constantes de asociación a la Apotransferrina y a la Holotransferrina. Por último se estudiaron los cambios conformacionales en la proteína en presencia del complejo, analizando la estructura secundaria y terciaria de la misma.

4.2 Introducción

4.2.1 Metabolismo del Hierro

La Transferrina es una proteína plasmática, también llamada siderofilina, que transporta de manera específica el hierro al interior celular. El hierro es un elemento esencial para la vida de todos los organismos vivos ya que está asociado a numerosas reacciones vitales: está vinculado a reacciones que controlan el flujo de electrones, la síntesis de ADN y el transporte de oxígeno molecular a los tejidos, entre otros. Por tal motivo la homeostasis del hierro es un proceso altamente controlado y complejo, y su desbalance puede ser altamente nocivo.¹

El hierro que proviene de la dieta es absorbido como catión ferroso (Fe^{2+}) y catión férrico (Fe^{3+}). Dicho proceso se da en su mayoría en el duodeno, a través de diferentes caminos sobre la superficie apical de los enterocitos^a. El catión ferroso ingresa a través de un transportador de metales divalentes (conocido como DMT1, por *Divalent Metal Transporter 1*), mientras que el catión férrico posee un mecanismo más complejo que involucra su reducción a Fe^{2+} .² Dicha reducción y transporte se da a través de un complejo proteico citoplasmático que involucra proteínas como β_3 -integrina, mobilferrina, flavin monooxigenasa y β_2 -microglobulina.³ Por último el hierro también puede provenir de residuos de digestión proteolítica de hemoproteínas.^{4,5}

^a Células epiteliales encargadas de absorber moléculas procedentes de la alimentación y transportarlas al interior del organismo. Estas células poseen dos superficies características: apical (donde se da la absorción) y basolateral (donde se da la liberación al torrente sanguíneo).

Una vez dentro de los enterocitos, los cationes ferrosos son dispuestos para su almacenamiento o su transporte. El almacenamiento se da a través de una proteína llamada ferritina, la cual tiene la capacidad de almacenar hasta 4500 átomos de Hierro por proteína.^{6,7}

El transporte del catión se da a través de la Transferrina, la cual recibe los cationes férricos luego de que son liberados del enterocito a través de la ferroportina y oxidados por la proteína de membrana conocida como hefaestina o ceruloplasmina plasmática. Debido a que no existe una vía fisiológica para la excreción del hierro, su absorción a nivel duodenal está cuidadosamente regulada para mantener un equilibrio entre la incorporación y la pérdida corporal. En este sentido cabe destacar que, aparentemente, según McVey Ward, la ferroportina es la proteína clave en la regulación de la absorción de este metal⁸. Una vez los cationes férricos se encuentran fuera del enterocito, la Transferrina se encarga de transportarlos al interior celular.

4.2.2 Transferrina: Apotransferrina y Holotransferrina

La Transferrina tiene un peso molecular cercano a 80kDa, está constituida por una única cadena polipeptídica, y se puede encontrar, no solamente en plasma sanguíneo, sino también en otros fluidos como líquido cefalorraquídeo, leche, y semen. Su ligando natural es el catión férrico, el cual se une con alta afinidad a la Apotransferrina con una constante del orden de 10^{20} M^{-1} .^{9,10} Sin

embargo, también tiene la capacidad de unirse, con menor afinidad, a una variedad de iones multivalentes.^{9,10,11}

Posee 679 aminoácidos divididos en dos lóbulos, lóbulo-N (336 aminoácidos) y el lóbulo-C (343 aminoácidos). Cada lóbulo posee un sitio de unión al hierro, con propiedades químicas, cinéticas, espectroscópicas y termodinámicas diferentes entre sí, siendo el sitio ubicado en la región C-terminal el más afín por el catión férrico (Figura 4.1).¹²

Cuando la Transferrina no posee átomos de Hierro ligados, la proteína se denomina Apotransferrina (ApoTrf), mientras que cuando la proteína ya ha incorporado dos átomos de hierro (III), se denomina Holotransferrina (HoloTrf). Cada lóbulo de la Transferrina se divide en dos dominios que forman una “hendidura” entre sí, donde se ubica el sitio de unión al Fe^{3+} . Cuando el hierro se une, los dominios rotan alrededor de 60° , produciendo un cierre de la “hendidura”. Esto genera un cambio estructural muy marcado, que es de especial importancia, para que el Receptor de membrana de la Transferrina (Rtrf) identifique así a la proteína *cargada* de hierro.¹³

En ambos sitios de unión los Fe^{3+} se encuentran hexacoordinados, siendo uno de los ligandos necesarios un anión carbonato. El mismo juega un papel importante ya que facilita de manera sinérgica la unión del hierro a la Transferrina. La función del anión es la de actuar como un ligando *reforzador* de la unión entre la proteína y el metal. A su vez, también cumple un rol esencial en la liberación del hierro al interior celular.^{10,14,15}

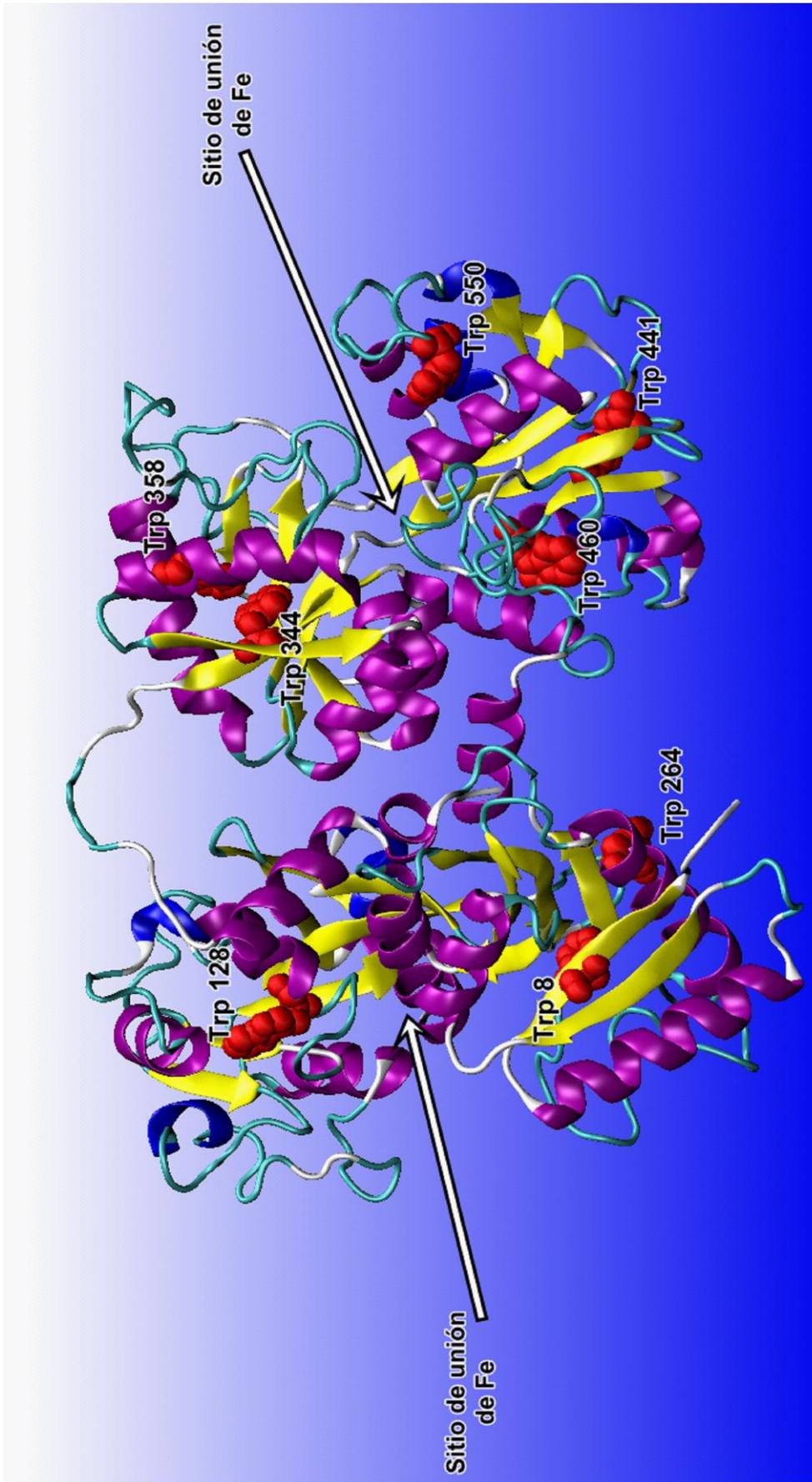


Figura 4.1 Estructura de la Transferrina

4.2.3 Metabolismo de la Transferrina

El ingreso de la Transferrina al interior celular es un proceso complejo, mediado por un receptor de membrana específico para esta proteína, RTrf. Dicho receptor es una glicoproteína homodimérica, de aproximadamente unos 190kDa que tiene la capacidad de unir a sí misma dos Transferrinas y, así, incorporar cuatro cationes férricos.¹⁶

El hierro ingresa al interior celular, a través de un proceso de endocitosis mediado por RTrf. El primer paso es la asociación de la Holotransferrina al receptor de la membrana. A pH 7,40, el receptor posee muy baja afinidad por la Apotransferrina, intermedia para la Transferrina monoférrica y cuatro veces más alta para la Transferrina diférrica.¹⁷

Los RTrf se encuentran concentrados en invaginaciones de la membrana revestidas internamente por la proteína clatrina; luego de que se forma el sistema Holotransferrina-RTrf, se completa la invaginación dando origen a la formación de vesículas que son transportadas al interior celular con la holotransferrina asociada al RTrf en su interior.¹⁸ (Figura 4.2)

Una vez que la clatrina es removida, la vesícula resultante se fusiona con un endosoma¹⁸. La acción de una bomba de protones en el endosoma, genera una disminución del pH hasta alrededor 5,5 puntos. A este pH, el catión férrico es liberado de la Transferrina. Posteriormente, este catión es reducido a catión ferroso por una ferri-reductasa endosomal, para luego ser transportada al citoplasma por el Transportador de cationes divalentes DMT1 (*Divalent Metal Transporter 1*).^{19,20}

El nuevo complejo Apotransferrina-Rtrf, despojado de las moléculas de Fe^{+3} , es transportado en forma intacta hacia la membrana plasmática, donde se disocia lo que permite a la Apotransferrina, comenzar otro ciclo de transporte e internalización.¹¹

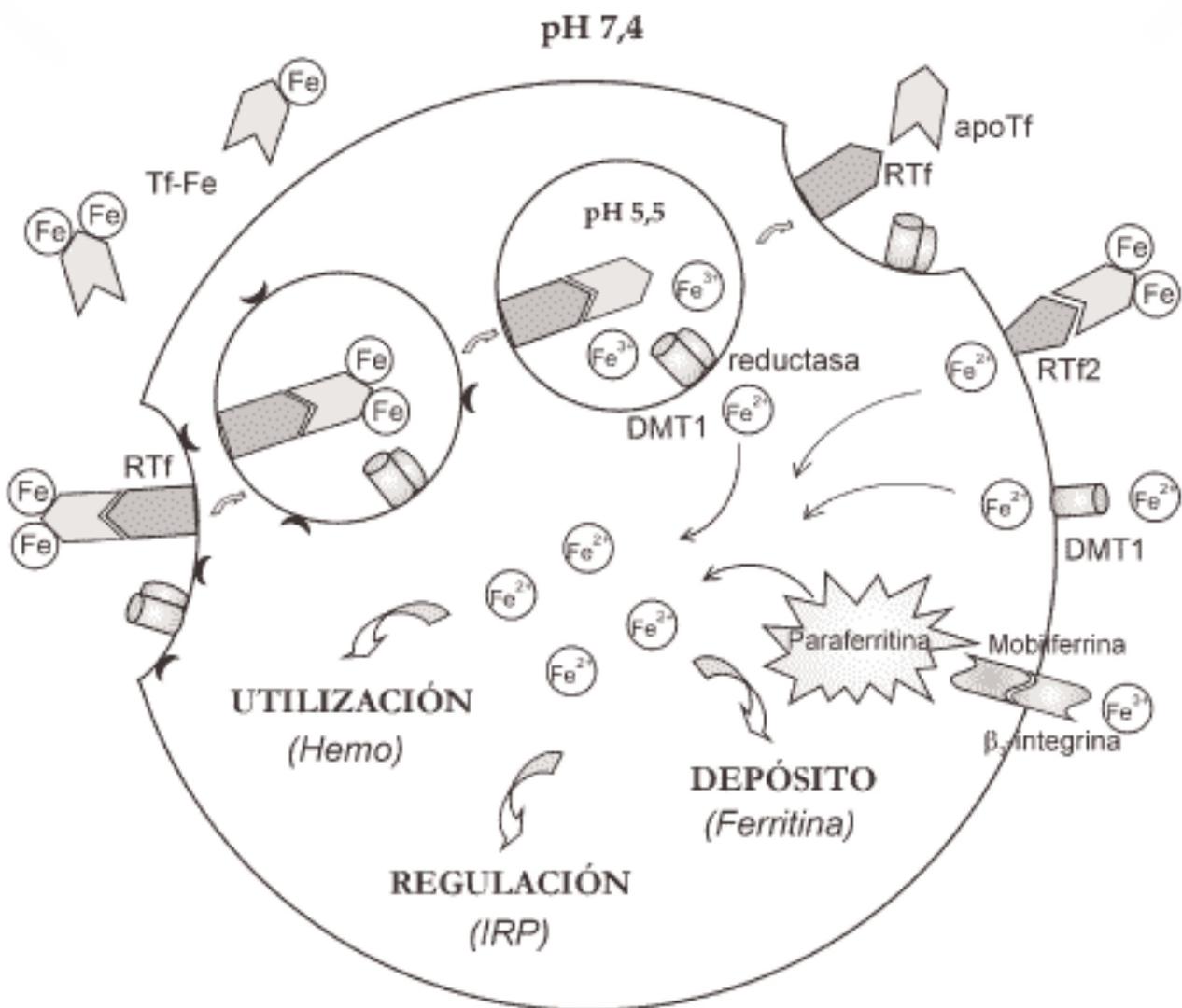


Figura 4.2 Esquema del ingreso de hierro al interior celular

4.2.4 Uso de la Transferrina en la Terapia Fotodinámica

Todas las células poseen en su membrana RTrf, pero éstas se encuentran sobre-expresadas en células hepáticas, placentarias y de progenitores eritroides.²¹ El número de receptores es aproximadamente constante en células en reposo, pero aumenta marcadamente durante la proliferación celular.¹

Las células tumorales poseen una alta demanda de Hierro debido a su crecimiento anormal. Por este motivo muchas células tumorales poseen una sobre-expresión del Receptor de Transferrina. En este sentido, en los últimos años se ha estudiado con profundidad la interacción de la Transferrina con drogas anticancerígenas bajo la premisa de utilizar a la Transferrina como un agente transportador (*carrier*) específico a células tumorales.^{22,23,24,25,26}

Para poder utilizar a la Trf como una proteína transportadora, la droga antitumoral debe cumplir ciertos requisitos:

- Asociarse a la proteína con cierta afinidad
- No debe modificar la estructura de la Trf, para que esta pueda ser reconocida por el RTrf.
- Ingresar y liberarse en el interior celular.

4.3 Motivación y objetivos

Estudios previos han demostrado que el Cr(phen)_3^{3+} tiene la capacidad de asociarse de manera espontánea a la ApoTrf con constantes de afinidad del orden de 10^5 M^{-1} .²⁷ En el presente Capítulo se reportan los experimentos y resultados realizados para caracterizar la asociación entre el Cr(phen)_3^{3+} y la holotransferrina. La importancia de estudiar este proceso de asociación radica en que es la holotransferrina la que ingresa al interior celular, y no la apotransferrina.

En el presente capítulo se realiza un análisis comparativo entre las constantes de asociación de la HoloTrf y la ApoTrf²⁷, se estudia el proceso de asociación a distintos pHs y se evalúa la estructura de la proteína en presencia de nuestro complejo.

4.4 Materiales y Métodos

4.4.1 Materiales

Se trabajó con el complejo metálico $\text{Cr}(\text{phen})_3(\text{ClO}_4)_3$, el cual fue sintetizado con anterioridad, según procedimientos reportados en bibliografía, en nuestro grupo de trabajo en el Departamento de Fisicoquímica. Estas proteínas estudiadas fueron la Transferrina (Tf) en sus dos estados: Apotransferrina (ApoTf) y Holotransferrina (HoloTf). Las soluciones de complejo y proteína fueron preparadas en buffer fosfato ($0,004 \pm 0,001$ M de Na_2HPO_4 , y $0,001 \pm 0,001$ M de NaCl) usando agua MQ, a tres pH diferentes: $5,40 \pm 0,01$; $6,40 \pm 0,01$; y $7,40 \pm 0,01$. Para llegar al pH de trabajo se utilizó HCl o NaOH.

Las concentraciones de las soluciones fueron determinadas por espectroscopía UV-visible (UV-Vis)^b, usando sus respectivos coeficientes de extinción molar. Los coeficientes de extinción molar utilizados en el presente capítulo fueron para la ApoTrf, $\epsilon_{280} = 74.400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; para la HoloTrf, $\epsilon_{280} = 93.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y para el $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$, $\epsilon_{354} = 4.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

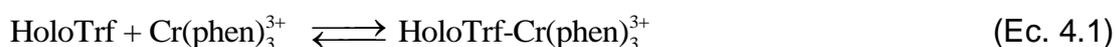
4.4.2 Estudios de asociación

Midiendo las constantes de asociación del complejo de Cr(III) con la Transferrina se determinaron los cambios de la intensidad de fluorescencia de

^b Detalles de la técnica han sido desarrollados en el capítulo 2 “Materiales y métodos experimentales”.

la proteína en presencia de distintas concentraciones de complejo metálico. Las intensidades de fluorescencia fueron corregidas por filtro interno.^c Inicialmente se registró la emisión de la proteína con una concentración de 1.5×10^{-6} M y, posteriormente, se tomaron los espectros de la misma solución en presencia de diferentes concentraciones de complejo (desde 0 M hasta 1×10^{-5} M aproximadamente). Este ensayo se realizó tanto para la ApoTf como para la HoloTf a tres diferentes pHs: desde el pH endosomal (5,40) hasta pH fisiológico (7,40) pasando por un pH intermedio (6,40).

El proceso de asociación que se busca estudiar se encuentra representado en el siguiente esquema (Ec. 4.1):



Las constantes de asociación se determinaron a partir del análisis de los cambios en la intensidad máxima de los espectros de emisión a $\lambda = 327$ nm con el incremento de la concentración de complejo metálico usando la ecuación desarrollada por Bhattacharyya,²⁸ (Ec.4.2),

$$\frac{1}{\Delta F} = \frac{1}{\Delta F_{\max}} + \frac{1}{\Delta F_{\max} K_b [Q]}, \quad (\text{Ec.4.2})$$

donde $\Delta F = F_x - F_0$ y $\Delta F_{\max} = F_{\infty} - F_0$, siendo F_0 , F_x y F_{∞} las intensidades de fluorescencia de la proteína en ausencia, en presencia de una concentración

^c Detalles sobre la corrección por filtro interno han sido desarrollados en el capítulo 2 “Materiales y métodos experimentales”.

intermedia y a una concentración de saturación de complejo metálico, respectivamente, K_b es la constante de asociación y $[Q]$ es la concentración de complejo metálico.

4.4.3 Modelo de asociación

Los parámetros termodinámicos del proceso de asociación HoloTrf-Cr(phen)₃³⁺, se obtuvieron mediante la ecuación de Van't Hoff, (Ec.4.3) una vez habiendo determinado las K_b a diferentes temperaturas. Para hacer uso de esta ecuación supusimos que el cambio de entalpía (ΔH) se mantenía constante en el rango de temperatura de trabajo. La siguiente es la expresión de Van't Hoff:

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}, \quad (\text{Ec.4.3})$$

donde T representa la temperatura en K y R la constante de los gases ideales. Los valores de ΔH y ΔS se calcularon a partir de la pendiente y la ordenada al origen de la gráfica de la ecuación de Van't Hoff, mientras que los valores de cambio de energía libre de Gibbs (ΔG) se determinaron a cada temperatura usando la ecuación 4.3.

$$\Delta G = -\Delta H + T\Delta S \quad (\text{Ec.4.3})$$

4.4.4 Transferencia de energía

Para obtener los espectros de emisión, para el donador, y de absorción, para el aceptor, es necesario tener en cuenta que la concentración de ambas especies deben ser equimolar, sumado a que las condiciones de medidas deben ser lo más semejante como sea posible.

Se determinaron los parámetros E , J , R_0 y r y se analizaron de manera comparativa a distintos pHs.

4.4.5. Estudios de Dicroísmo Circular

Se registraron los espectros de dicroísmo circular de la proteína en dos regiones determinadas, tanto en la región del UV-lejano, con longitudes de onda entre 200-250 nm, como en la zona del UV-cercano y visible, entre 250-500 nm con el objetivo de revelar posibles cambios estructurales. La primera zona evaluada nos permite conocer cambios en la estructura secundaria de la proteína, mientras que la zona de longitud de onda mayor nos da herramientas para analizar la estructura terciaria de la proteína.

Los espectros de dicroísmo circular varían su intensidad según la concentración y absorbancia de la muestra, por tal motivo las concentraciones para las dos regiones de trabajo fueron diferentes. Para estudiar la estructura secundaria se fijó una concentración de proteína a $1,5 \times 10^{-6}$ M, mientras que

para estudiar la estructura terciaria la concentración fue de $1,0 \times 10^{-4}$ M. Todos los ensayos se realizaron usando soluciones *buffer* frescas y filtradas con filtros de $0,22\mu\text{m}$.

Los experimentos se realizaron en un espectropolarímetro Jasco J-810 bajo un constante purgado de N_2^{d} . Se trabajó a temperatura ambiente, usando celdas de 0,2 cm de paso óptico para las medidas de estructura secundaria y celdas de 1,0cm de paso óptico para las medidas de estructura terciaria. Los datos se promediaron 5 veces, a una velocidad de barrido de 100 nm/min, con un ancho de banda de 1 nm y una resolución de 0,2 nm. Los datos se expresaron en términos de elipticidad media residual ($[\theta]$).

^d Detalles sobre la técnica han sido desarrollados en el capítulo 2 “Materiales y Métodos experimentales”

4.5 Resultados y discusión

4.5.1. Quenching del estado excitado de la proteína.

Entre los biopolímeros, las proteínas son las únicas que poseen una fluorescencia intrínseca útil. Los lípidos, membranas y sacáridos son esencialmente no fluorescentes, mientras que el ADN a pesar de fluorecer, tiene una intensidad de emisión que hace que sea de poca utilidad.²⁹ La proteína posee tres aminoácidos que son responsables de la fluorescencia (fluróforos): triptofano, tirosina y fenilalanina. Dos circunstancias permiten que la espectroscopía de fluorescencia sea una técnica relativamente sencilla y útil: la primera es que solo estos 3 residuos (de los 20 que pueden conformar una proteína) tienen la capacidad de emitir. Si los 20 aminoácidos fueran fluorescentes el análisis de la emisión de una proteína sería sumamente complicado. En segundo lugar, estos tres residuos fluorescentes son poco comunes de encontrar en las proteínas, por ejemplo el Triptófano (que es el fluoróforo dominante de la emisión de una proteína) se encuentra en una relación de 1 mol%.²⁹

La emisión de una proteína está dominada por el triptófano, que absorbe a longitudes de onda más largas y posee el coeficiente de extinción más grande (Figura 4.3). La energía absorbida por la tirosina y la fenilalanina es generalmente transferida a los residuos triptófanos de la misma proteína.²⁹

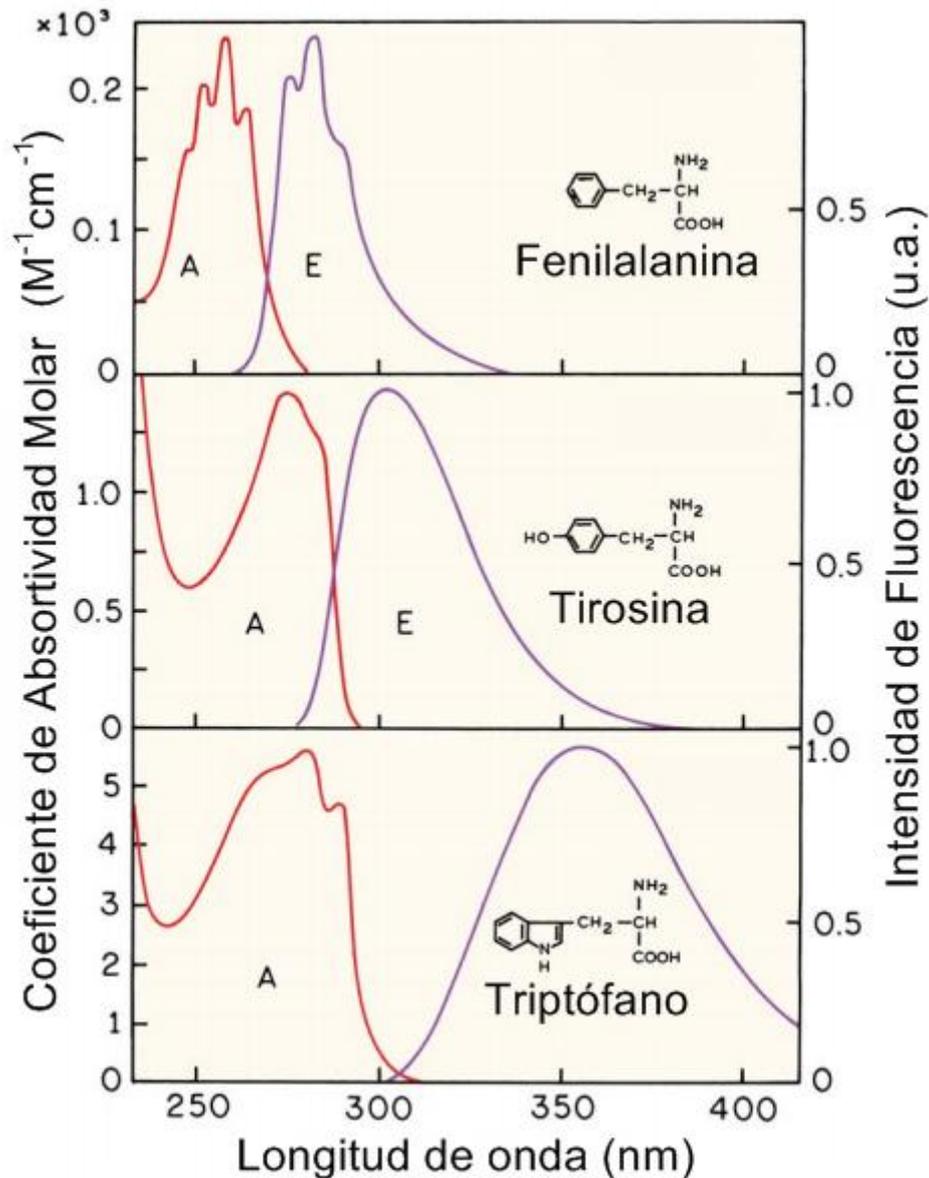


Figura 4.3 Espectros de absorción y emisión de la fenilalanina, tirosina y triptófano. Adaptación de la referencia **29**

De la figura 4.3 podemos ver que usando una longitud de onda de excitación de 280nm, la fenilalanina no se excita, mientras que si lo hace la tirosina y el triptófano. De todos modos, el rendimiento cuántico de fluorescencia de la fenilalanina es de 0,03, por lo que la emisión de este aminoácido es pocas veces observado.²⁹ Sin embargo si usamos una longitud de onda de excitación mayor o igual que 295nm, no sólo se observara que el

residuo fenilalanina no se excitará sino que la emisión se deberá solamente a la absorción de los residuos triptófanos. De este modo, podemos excitar selectivamente los residuos triptófanos de una proteína.

Una característica importante de la fluorescencia de las proteínas es que la emisión del triptofano es muy sensible a cambios en el microambiente que lo rodea. Los cambios en la emisión de éste residuo pueden deberse a varios fenómenos:

- Cambios conformacionales
- Asociación con una subunidad
- Asociación a un sustrato
- Desnaturalización
- Cambio de polaridad en el microambiente

La espectroscopía de fluorescencia permite analizar estos fenómenos, y así convertirse en una poderosa herramienta en el estudio de la biofísica de proteínas.

En la figura 4.4, se muestra el espectro de emisión de la HoloTrf excitada a 280nm, en ella podemos observar como la emisión de la proteína corresponde a la de los residuos triptófanos. Sucesivos agregados de $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ a una dada concentración fija de proteína ($1,5 \times 10^{-6}$ M) genera variaciones en la intensidad de emisión. Esta desactivación de la intensidad de emisión (*quenching*) implica que el ambiente químico en las vecindades inmediatas de alguno (o algunos) de los triptófanos está siendo perturbado por la presencia

del complejo metálico. Estos fuertes cambios en la intensidad corresponden a una interacción que refleja una asociación del complejo con la proteína.

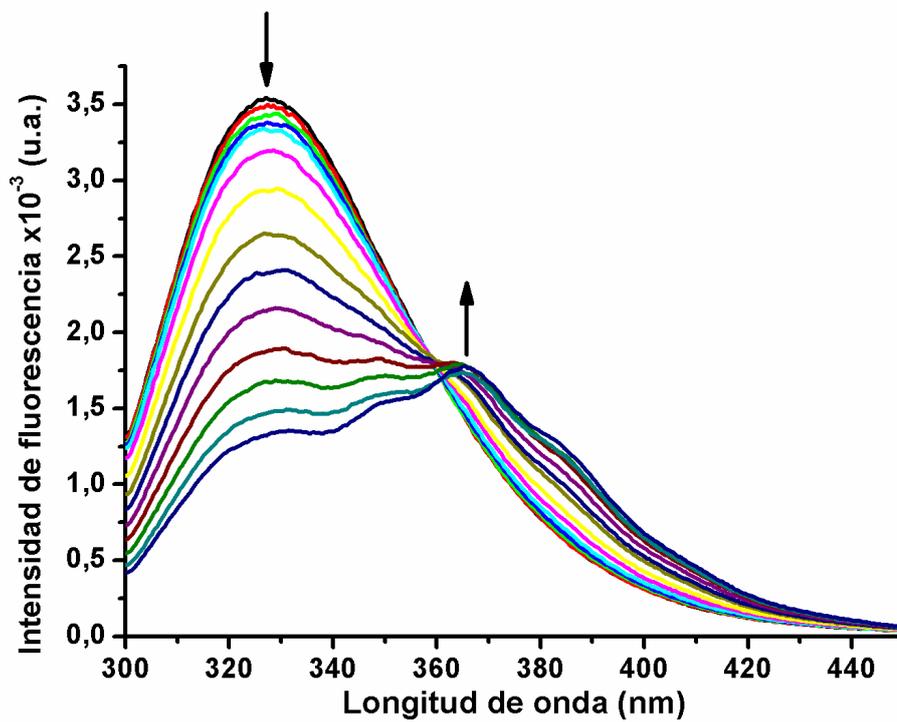


Figura 4.4 Espectro de emisión de la Holotransferrina en ausencia y presencia de $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$. La concentración de la proteína fue de $1,5 \times 10^{-6}$ M y las concentraciones de complejo fueron (0; 0,14; 0,29; 0,44; 0,59; 0,87; 1,1; 1,6; 2,5; 3,4; 4,6; 5,8; 7,1 y 8,4) $\times 10^{-6}$ M, desde el espectro negro al espectro azul respectivamente. Temperatura= 298K; pH = 7,4; $\lambda_{\text{exc.}} = 280\text{nm}$; $\lambda_{\text{emi.}} = 327\text{nm}$. Las *slits* de emisión y excitación se mantuvieron fijas a 5nm. Las flechas indican la disminución o el aumento de la emisión a medida aumenta la concentración de *quencher*.

A pesar de que se observa un notable *quenching* para nuestro sistema, no se observan corrimientos hipsocrómicos o batocrómicos. Esto indica que la polaridad del medio en el microambiente en el que se encuentran los residuos triptófanos, no se ve afectada, o por lo menos no de manera notable. Cabe destacar que este análisis es válido sólo para los residuos triptófano, ya que la emisión de los residuos tirosina no es sensible a los cambios en la polaridad del microambiente que los circunda. Esto ocurre porque a la longitud de onda

de absorción de trabajo de la tirosina se representa una única transición electrónica al primer estado singlete, mientras que para el triptófano, la longitud de onda de absorción (entre 240nm y 300nm) corresponde a una superposición de dos transiciones. Estas dos transiciones poseen energía similar, y dependiendo del ambiente en el que el triptófano se encuentre, puede uno u otro estado tener menor energía. La regla de Kasha postula que la emisión radiativa debe darse del estado excitado con menor energía, por lo que la emisión del triptófano depende de que estado tenga mayor o menor energía. Como cada estado posee un momento dipolar diferente, la emisión se verá modificada en función de los cambios en la polaridad del solvente.

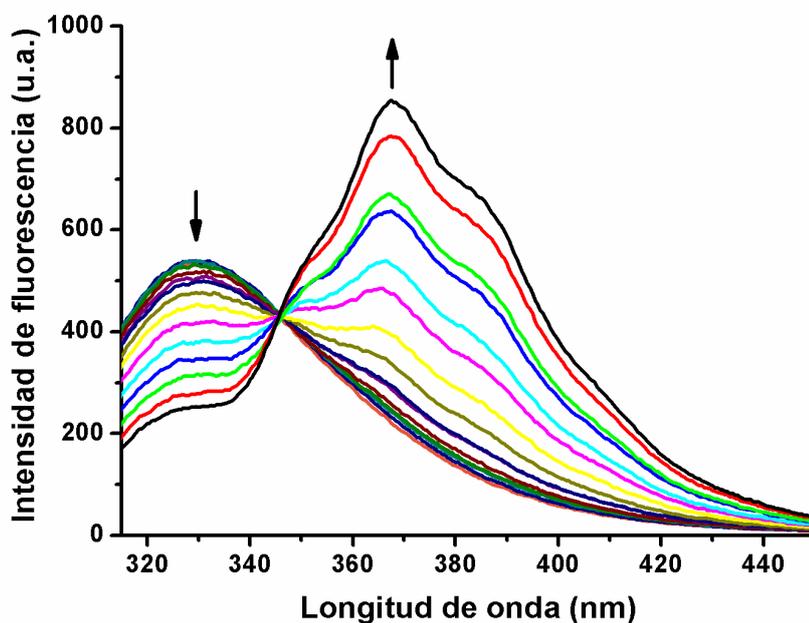


Figura 4.5 Espectro de emisión de la Holotransferrina en ausencia y presencia de Cr(phen)_3^{3+} . La concentración de la proteína fue de $1,5 \times 10^{-6}$ M y las concentraciones de complejo fueron (0; 0,14; 0,29; 0,44; 0,59; 0,87; 1,1; 1,6; 2,5; 3,4; 4,6; 5,8; 7,1; 8,4 y 9,7) $\times 10^{-6}$ M, desde el espectro negro al espectro azul respectivamente. Temperatura= 298K; pH = 7,4; $\lambda_{\text{exc.}} = 295\text{nm}$; $\lambda_{\text{emi.}} = 327\text{nm}$. Las *slits* de emisión y excitación se mantuvieron fijas a 5nm. Las flechas indican la disminución o el aumento de la emisión a medida aumenta la concentración de *quencher*.

La Figura 4.5 muestra el *quenching* de la proteína cuando esta es excitada a 295nm. En ambos casos, tanto a $\lambda_{exc.} = 280nm$ como a $\lambda_{exc.} = 295nm$, se observa, a concentraciones grandes de complejo, la deformación del espectro de emisión debido a los ligandos fenantrolinas libres provenientes de la fotoacuación del complejo al ser irradiado.^{30,31,32} A pesar de esta situación, el aporte a la emisión por parte de estos ligandos es despreciable a la longitud de onda máxima de emisión de trabajo.

Para ambos sistemas estudiados (excitando a 280nm y 295nm) se observa la formación de un pico alrededor de los 370nm. Este pico puede corresponder tanto a la emisión del complejo como a la emisión de la molécula de fenantrolina libre que se forma como parte de los procesos de fotoacuación. Se tomaron los recaudos para que dichos procesos no afecten la medición del proceso de asociación. Para evitar que la absorción del *quencher* afecte la medición se llevaron a cabo correcciones de filtro interno.^e

Como ya mencionamos anteriormente, cuando excitamos a 280nm la fluorescencia de la proteína proviene tanto de los residuos triptófanos como de los residuos tirosinas (por transferencia energética), mientras que si la $\lambda_{exc.} = 295nm$ solo los residuos triptófano serán excitados. Con el propósito de determinar si ambos fluoróforos (triptófano y tirosina) están involucrados en el proceso de asociación, se compararon las fluorescencias normalizadas de la HoloTrf excitada a 280nm y 295nm. Para realizar este análisis se graficó la

^e Para mayor información sobre las correcciones de filtro interno, revisar el subcapítulo 2.3.3.1

intensidad relativa de fluorescencia en función de la relación de complejo y proteína (r), tal como se observa en la figura 4.6.

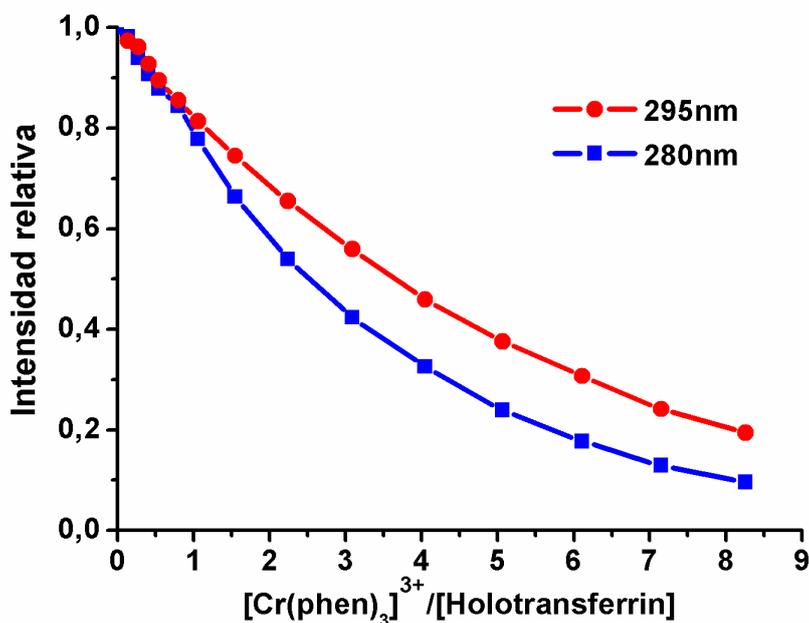


Figura 4.6 Gráfico de intensidad de fluorescencia relativa de albúmina sérica (F/F_0) vs $[Cr(phen)_3]^{3+}/[Holotransferrina]$ excitando a 280nm y 295nm. Temperatura=298K; pH=7,40.

La figura muestra que existe una diferencia en el *quenching* cuando excitamos a 280nm y a 295nm. Esta diferencia se atribuye a que existen residuos tirosina que se encuentran próximos al sitio de unión del complejo, y se desactivan en presencia de éste, generando que el *quenching* sea más eficiente a 280nm. A modo comparativo a una relación molar de $r = 3,7$ la fluorescencia se desactiva un 64% cuando se excita a 280nm, mientras que cuando excitamos el residuo triptófano de manera selectiva (295nm) la fluorescencia decae solo un 51%. Esta diferencia pone de manifiesto que ambos residuos debieran estar en cercanías al sitio de unión.

Un mecanismo probable de *quenching* para nuestro sistema HoloTrf-Cr(phen)₃³⁺ se evidencia de la gráfica de Stern Volmer, donde podemos observar una curva con desviación positiva. Esto sugiere que ambos mecanismos de *quenching* (dinámico y estático) se encuentran presentes ya sea excitando a 280nm, como a 295nm. (Figura 4.7) Este comportamiento ya ha sido observado en el sistema Cr(phen)₃³⁺ - Apotransferrina.²⁷

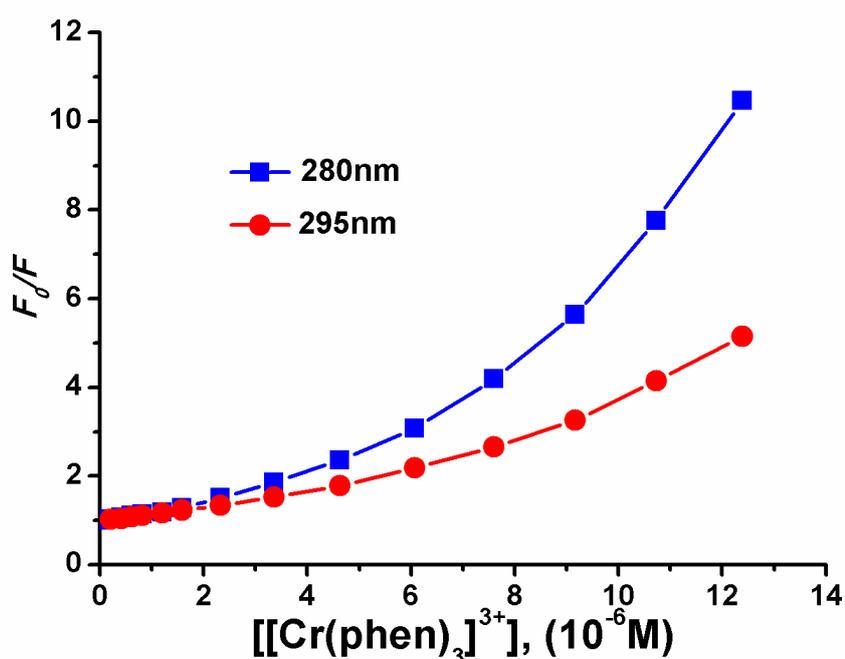


Figura 4.7 Gráfico de Stern Volmer. Temperatura=298K; pH=7,40.

Los modelos matemáticos para determinar las K_{sv} en sistemas de *quenching* simultáneo no son sencillos de aplicar en sistemas donde el *quenching* es tan complejo.²⁹ Por otro lado no ha sido posible determinar en el trabajo de esta tesis el *quenching* dinámico, pese a sucesivos intentos realizados. Sin

embargo para sistemas similares se ha demostrado que la contribución del *quenching* dinámico es mucho menor que la del *quenching* estático.³³

4.5.2 Asociación entre Cr(phen)_3^{3+} y Transferrina. Efecto del pH.

Para caracterizar la interacción entre el complejo y la Transferrina se determinaron las constantes de asociación a distintos pHs y temperaturas, a partir de medidas de *quenching* de la emisión de la proteína. La determinación de las constantes se hizo a través de la ecuación de Bhattacharya (ec. 4.1).

Tabla 4.1 Constantes de asociación obtenidas para la interacción del $[\text{Cr(phen)}_3]^{3+}$ con la Apotransferrina y la Holotransferrina a distintos pHs.

pH	ApoTrf- $[\text{Cr(phen)}_3]^{3+}$		HoloTrf- $[\text{Cr(phen)}_3]^{3+}$	
	K_b ($\times 10^5 \text{ M}^{-1}$)	r^2	K_b ($\times 10^5 \text{ M}^{-1}$)	r^2
7,40±0,01	1,5 ± 0,2	0,9997	1,5 ± 0,3	0,9995
6,40±0,01	1,0 ± 0,2	0,9997	1,1 ± 0,2	0,9995
5,40±0,01	0,7 ± 0,1	0,9995	0,43 ± 0,07	0,9997

El valor de r^2 corresponde al coeficiente de regresión lineal.

La Tabla 4.1, muestra las constantes de asociación obtenidas para la Transferrina en sus dos estados (Apotransferrina y Holotransferrina) y el complejo de cromo de trabajo, a distintos pHs. Se puede observar que la constante de asociación disminuye al disminuir el pH desde pH 7,40 a 5,40. Esto se observa para ambos estados de la proteína. (Figura 4.8)

Los valores del coeficiente de regresión lineal para todos los casos estudiados muestran un perfecto comportamiento lineal, lo que se correlaciona con un modelo de interacción “uno a uno” entre ambas partes, proteína y complejo metálico.

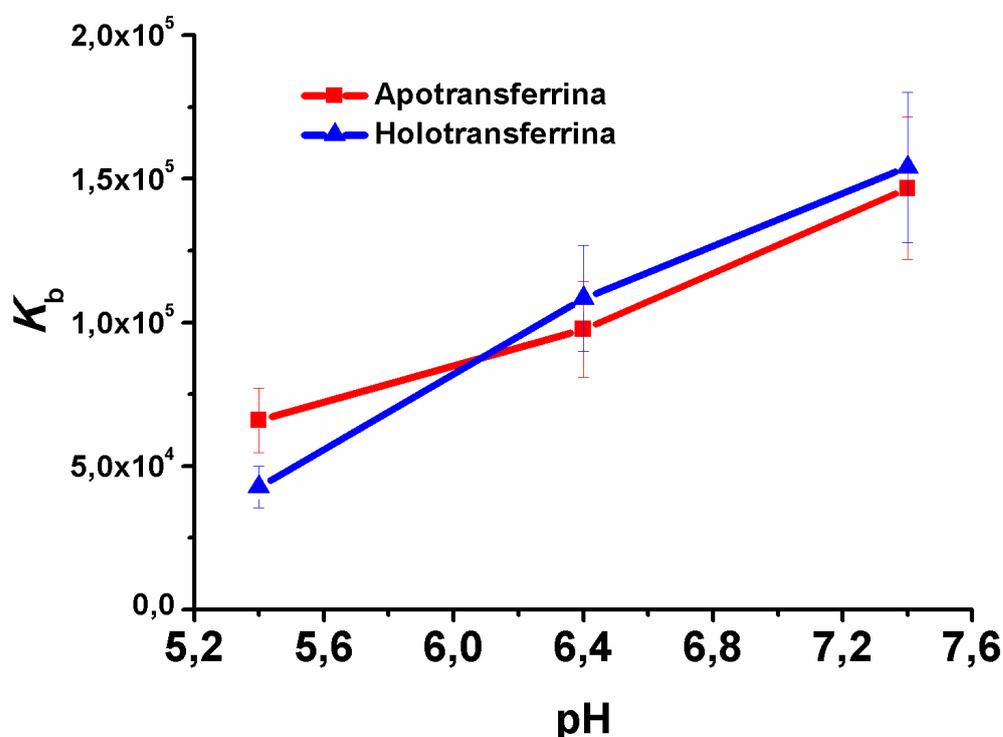


Figura 4.8 Gráfico de las constantes de asociación vs. pH para el sistema $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ -HoloTrf
Temperatura=298K.

Cambios en el pH pueden protonar o desprotonar los grupos funcionales de algunos residuos de la proteína (al igual que alguna de sus terminales: carboxílica o amino), modificando así sus propiedades químicas. A un pH bajo se puede protonar un residuo ácido generando una mayor repulsión con el complejo de Cr(III) haciendo mas difícil su asociación con la proteína. Analizando el pK_a de los aminoácidos (en su estado libre), observamos que la

histidina posee un grupo imidazol con pK_a igual a 6,04. Este pK_a se encuentra en el rango de pH de trabajo, indicando que podría estar protonándose. Este análisis indicaría que en las cercanías al sitio de asociación del complejo, debiera haber por lo menos una histidina.

Los valores de K_b para ambos sistemas estudiados son similares a un dado pH, lo que podría estar indicando que el proceso de asociación estaría ocurriendo en un sitio diferente al de los cationes de Fe(III) de la proteína. Del mismo modo, podríamos inferir que el sitio de asociación del complejo, es el mismo tanto para la ApoTrf como para la HoloTrf. Si el complejo interaccionara con la ApoTrf en el sitio de asociación del hierro, la constante para este sistema debiera ser muy diferente comparado con el sistema HoloTrf-Cr(phen)₃³⁺, ya que la presencia de los cationes Fe³⁺ generaría una repulsión electrostática considerable con el complejo.

La Tabla 4.2 muestra las constantes de asociación obtenidas para el Cr(phen)₃³⁺ con la HoloTrf a diferentes temperaturas. Se puede observar que las K_b aumentan al aumentar la temperatura, resultando en un aumento en la estabilidad del complejo proteína-[Cr(phen)₃]³⁺. Los valores de K_b , se utilizaron para determinar los parámetros termodinámicos.

Todos los valores de constante de asociación se encuentran del orden de 10⁵ M⁻¹; valores que son mayores que los encontrados para los complejos de Rutenio, que se encuentran en el orden de 10³ M⁻¹ - 10⁴ M⁻¹.^{33,34,35} En este sentido y analizando bibliografía, se refleja la alta afinidad del [Cr(phen)₃]³⁺ por

la Transferrina. Esta afinidad también se observa en el estudio de este mismo complejo con las albúminas séricas bovina y humana.³⁶

4.5.3 Parámetros termodinámicos y naturaleza de las fuerzas de interacción

El motivo de determinar y analizar los parámetros termodinámicos yace en la necesidad de caracterizar el tipo de proceso de asociación que se está dando entre la proteína con el $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$.

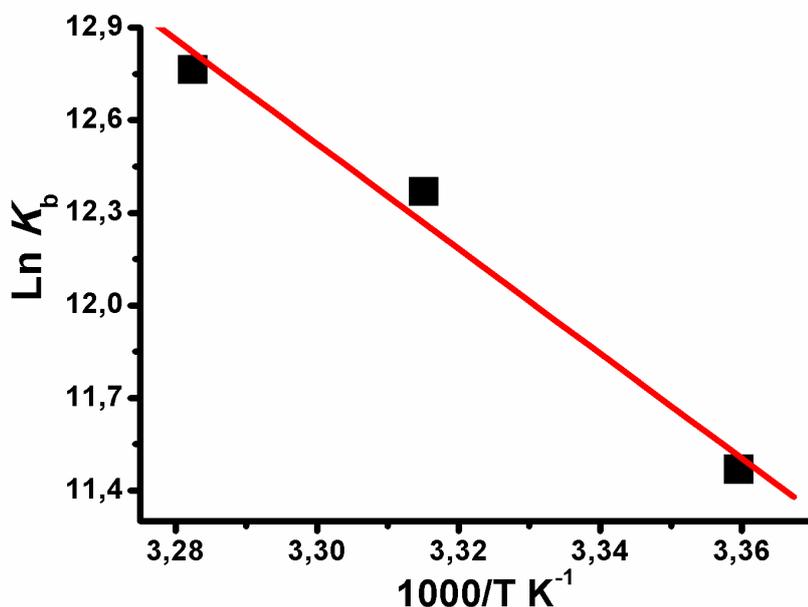


Figura 4.9 Gráfico de Van't Hoff ($\text{Ln } K_b$ vs. $1/T$) para el sistema $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ -HoloTrf. pH=7,40.

Generalmente, las fuerzas moleculares que contribuyen a las interacciones entre una macromolécula (proteína) y una molécula pequeña incluyen,

primordialmente, a los puentes hidrógeno, las fuerzas de Van Der Waals, las interacciones electrostáticas y las interacciones hidrofóbicas.³⁷

El cambio de entropía (ΔS) y el cambio de entalpía (ΔH) de la reacción de asociación son importantes para caracterizar la interacción presente en la asociación del complejo con la proteína. Por este motivo estudiamos la variación de la K_b en función de la temperatura. Si asumimos que el valor de ΔH no varía significativamente dentro del rango de temperaturas estudiadas, este valor, como el de ΔS pueden ser fácilmente calculados mediante la ecuación de Vant's Hoff (Ecuación 4.2). Las temperaturas de trabajo fueron 298 K, 302 K y 305 K y los cambios de entalpía y entropía (ΔH y ΔS) se calcularon a partir de la pendiente y de la ordenada al origen de la ecuación. Por otro lado, el cambio de energía libre de Gibbs (ΔG) se estimó a partir de la ecuación 4.3.

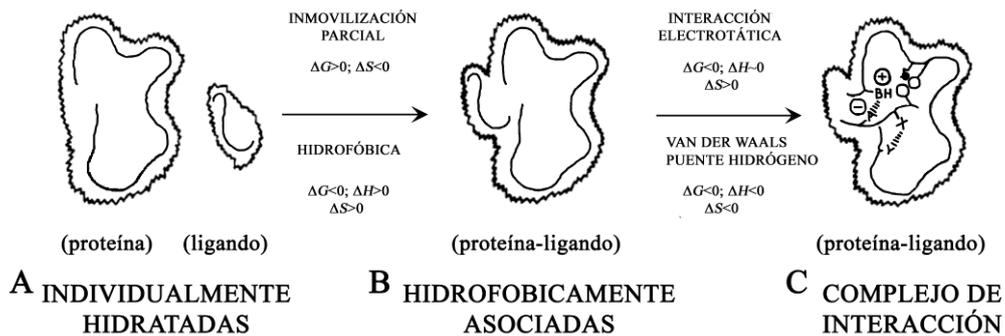


Figura 4.10. Representación del proceso de asociación proteína-ligando. Modelo termodinámico hipotético. Adaptado de la referencia **38**

En la tabla 4.3 se muestran los valores de ΔG , ΔH y ΔS obtenidos para la asociación del complejo con la Holotransferrina.

Según Ross y Subramanian³⁸, el signo y magnitud de los parámetros termodinámicos están asociados con un tipo particular de interacción entre un ligando determinado y una proteína.

En la Tabla 4.3 se observan los valores (signo y magnitud) de ΔH y ΔS , y el tipo de interacción asociado a esos parámetros termodinámicos.

Tabla 4.2 Constantes de asociación para el sistema HoloTrf-Cr(phen)₃³⁺ a pH=7,40

HoloTrf-[Cr(phen) ₃] ³⁺		
T (K)	K_b (x10 ⁵ M ⁻¹)	r^2
298	1.0 ± 0.1	0.999
302	2.4 ± 0.3	0.997
305	3.5 ± 0.8	0.992

El valor de r^2 corresponde al coeficiente de regresión lineal.

Ross y Subramanian proponen un modelo para interpretar la asociación entre una molécula pequeña y una proteína. Para entender este modelo debemos de suponer tres estados termodinámicos hipotéticos (A, B y C en el esquema de la Figura 4.10). Inicialmente nos encontramos en el estado A, luego pasamos a un estado B (transición A-B), para luego finalizar en un estado C (transición B-C).

El estado A representa a las especies hidratadas aisladas una de otra, mientras que en el estado B ya existe una interacción parcial entre ambas especies. Esta interacción es una penetración mutua de sus capas de hidratación para formar un estado de “especies asociadas hidrofobicamente”. Esta asociación se debe a la capacidad que posee el agua para formar

estructuras más ordenadas en el microambiente próximo a cadenas hidrocarbonadas no polares.³⁹

Este modelo propone que los residuos hidrofóbicos que se encontraban inicialmente accesibles al solvente en el estado aislado (estado A) se “ocupan” durante la transición A-B, generando así un desplazamiento de las moléculas de agua de ese microambiente. Por consiguiente, ahora las moléculas de agua adquieren un estado más “desordenado”. A este proceso le corresponden valores de ΔH y ΔS positivos y ΔG negativo. (Tabla 4.3)

En una segunda etapa, la especie hidrofóbicamente asociada (estado B) participa en una serie de interacciones intermoleculares que involucran casi de manera exclusiva a la proteína y al ligando en cuestión, prácticamente sin considerar a las moléculas del solvente. Estas interacciones intermoleculares, propias de la transición B-C, incluyen interacciones electrostáticas, puentes hidrógenos, y de Van der Waals (dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido, y el efecto de dispersión de London). El signo y la magnitud de los parámetros termodinámicos para este tipo de interacciones se detalla en la Tabla 4.4.

Tabla 4.3 Parámetros termodinámicos para el sistema HoloTrf-[Cr(phen)₃]³⁺.

T (K)	HoloTrf-[Cr(phen) ₃] ³⁺		
	ΔG (kJ mol ⁻¹)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
298	-30 ± 7		
302	-32 ± 8	140 ± 2	570 ± 6
305	-34 ± 8		

El valor de regresión lineal fue de $r^2 = 0.99124$.

Interacciones de Van der Waals, y puentes hidrógeno poseen, para la asociación de un ligando a proteína, valores de ΔH y ΔS negativos. Este tipo de interacciones son las interacciones más comunes entre un ligando y una proteína. Por otro lado, las interacciones de tipo electrostática se caracterizan por presentar valores de ΔH pequeño, ya sean positivos o negativos, y ΔS positivos. Los valores de ΔG negativos para nuestro sistema muestran que la presencia del complejo interacciona con la proteína estabilizando el sistema, y dicha estabilización energética posee una fuerte contribución entrópica.

Procesos	ΔH	ΔS
Asociación hidrofóbica	<i>Pos</i>	<i>Pos</i>
Van der Waals	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>
Formación de puente de hidrógeno, (medio de bajo dieléctrico)	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>
Electrostáticas (neutralización de cargas)	<i>Levemente Pos o Neg</i>	<i>Pos</i>
Protonación	<i>Neg</i>	<i>Neg</i>

Tabla 4.4 Signos de los parámetros termodinámicos para los diferentes tipos de interacciones intermoleculares. Adaptado de referencia **38**. (Pos=positivo y Neg=negativo)

En nuestro caso de estudio, los valores de los parámetros termodinámicos encontrados para la asociación entre el $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ y la Holotransferrina mostrarían que el tipo de interacción predominante es de tipo hidrofóbica. Esto resulta lógico si tenemos en cuenta que los ligandos fenantrolínicos del complejo son de naturaleza hidrofóbica. Sin embargo tampoco podemos

descartar la presencia de interacciones de naturaleza electrostática en nuestro sistema, dado que el complejo posee una carga considerable.

4.5.4 Transferencia energética de la Holotransferrina al Cr(phen)_3^{3+}

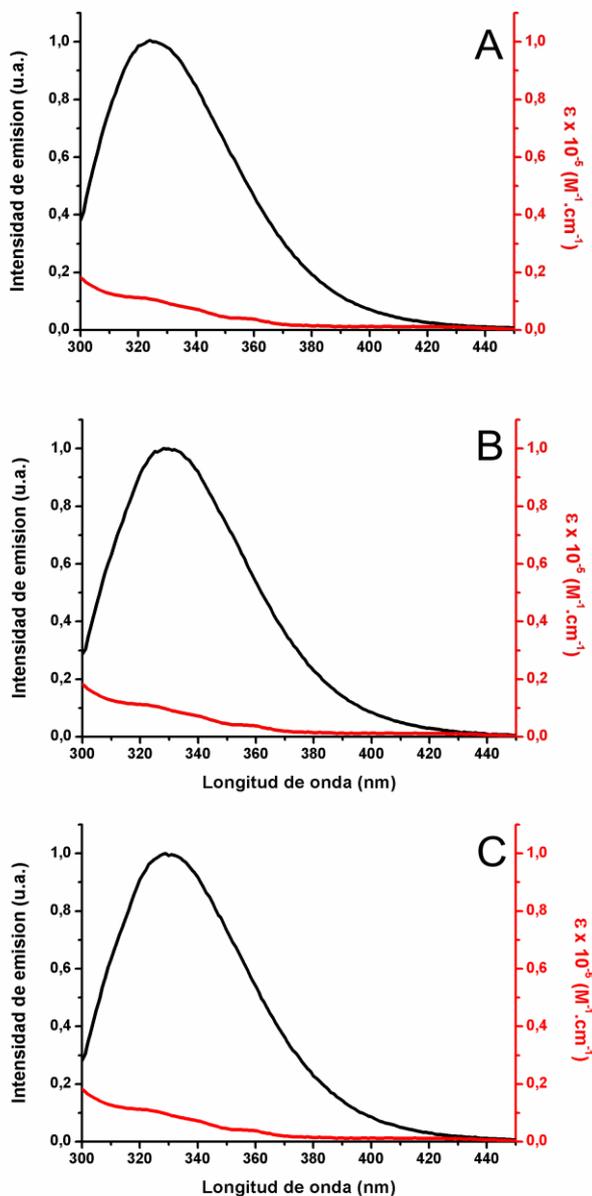


Figura 4.11. Solapamiento del Espectro de emisión de la HoloTrf y el espectro de absorción del complejo a tres pHs diferentes: **A:** 5,40 **B:** 6,40 y **C:** 7,40. $[\text{Cr(phen)}_3^{3+}] = 1,50 \times 10^{-6}$ M. $[\text{HoloTrf}] = 1,50 \times 10^{-6}$ M. Temperatura = 298K.

El estudio de la transferencia energética, en la bioquímica, tiene un especial interés porque es la base del diseño de *reglas moleculares* (“rulers”). Las *reglas moleculares* son técnicas que determinan la distancia entre un fluoróforo y un aceptor de la energía, permitiendo así *medir distancias* en sistemas complejos.

En la figura 4.11 podemos apreciar el solapamiento entre el espectro de absorción del complejo metálico (aceptor) y el espectro de emisión de fluorescencia de la Holotransferrina (donor) a los tres pHs de trabajo, excitando a 280 nm. Como podemos observar, no existe una diferencia significativa en las gráficas.

Los valores de eficiencia de transferencia de energía (E) se obtuvieron usando la ecuación 2.6 empleando concentraciones equimolares de aceptor y donador ($[\text{aceptor}] = [\text{donor}] = [1,5 \times 10^{-6} \text{M}]$). Los valores de J , R_0 , E y r , se obtuvieron usando las ecuaciones respectivas haciendo uso del programa Microsoft Office Excel 2007 y usando los siguientes parámetros $\kappa^2 = 2/3$, $\eta = 1,33$ y $\Phi = 0,13$.^{29,40}

En la Tabla 4.5 se pueden observar los valores de J , R_0 , E y r para los tres sistemas estudiados. Estos valores indican que no existe una diferencia sustancial en la distancia promedio (r) del aceptor de la energía a los fluoróforos, por lo que podríamos inferir que el sitio de asociación no varía al variar el pH.

Tabla 4.5 Parámetros de la teoría de transferencia energética no radiativa de Förster's para el sistema holoTf-[Cr(phen)₃]³⁺ a diferentes pHs.

Parámetros	pH=7.40±0.01	pH=6.40±0.01	pH=5.40±0.01
J	$8.93 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \text{ l mol}^{-1}$	$8.94 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \text{ l mol}^{-1}$	$9.28 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \text{ l mol}^{-1}$
E	0.227	0.235	0.216
r	3.01 nm	2.99 nm	3.06 nm
R_0	2.45 nm	2.45 nm	2.47 nm

Estas distancias promedio entre el donador y el aceptor se encuentran entre los 2nm y 8nm, y entre $0.5R_0 < r < 1.5R_0$ ⁴¹, lo que indicaría que la transferencia energética de la proteína a Cr(phen)₃³⁺ ocurre con una alta probabilidad.

4.5.5 Cambios estructurales inducidos por el Cr(phen)_3^{3+} a la HoloTransferrina.

Cuando una molécula se une a una proteína, esta puede sufrir un cambio conformacional, modificando su estructura secundaria y/o terciaria. En el caso de nuestro sistema de estudio, es conocido que el receptor de membrana de la Transferrina posee una afinidad mayor por la HoloTransferrina que por la Apotransferrina. Dicha afinidad se debe a un reconocimiento a partir de un cambio de estructura terciaria que posee la proteína al pasar de su estado a otro. Dicho cambio conformacional se debe a que la unión de los dos cationes Fe(III) en sus respectivos sitios de asociación genera cambios en el entorno de cada sitio, que devienen en un *giro* (60°) de los dos lóbulos de la proteína. Este giro posee la capacidad de romper interacciones y generar nuevas, modificando el espectro de dicroísmo circular luego de los 275nm. (Figura 4.12)

En nuestro sistema de estudio, si el complejo generase cambios conformacionales en la proteína, esta podría no ser reconocida por el receptor, generando así que la utilización de la HoloTransferrina como carrier sea improductiva, a los fines buscados en esta tesis. En ese marco nos dispusimos a estudiar si la presencia del complejo generaba cambios en la estructura, tanto secundaria como terciaria, de la Transferrina.

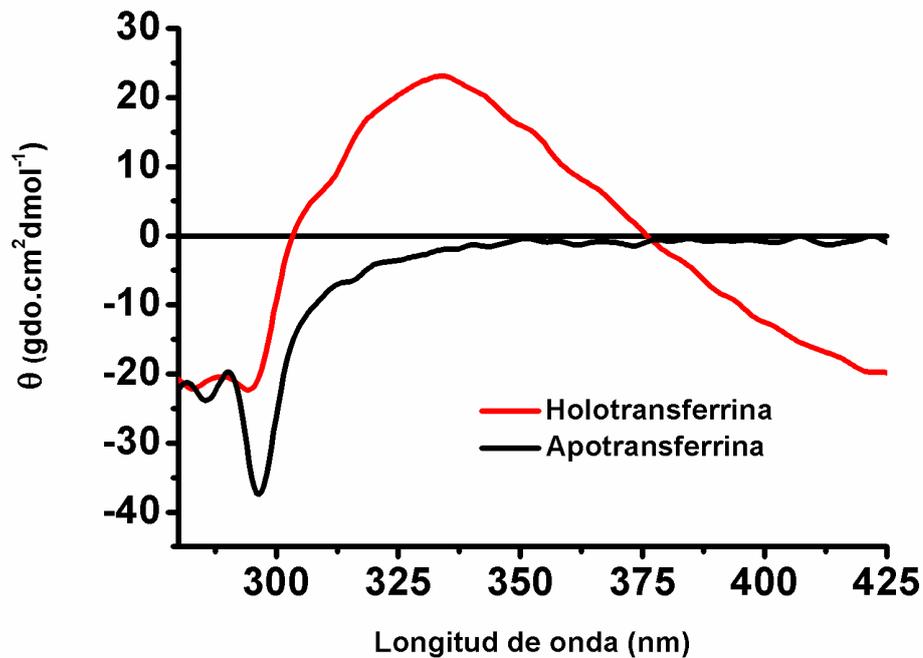


Figura 4.12 Espectros de Dicroísmo circular para la ApoTrf y la HoloTrf.

Para el análisis de la estructura secundaria, se estudio la región entre los 200nm y los 250nm del espectro de dicroísmo circular de la proteína (a una concentración de 1.5×10^{-6} M) en presencia de diferentes concentraciones de complejo. Este estudio se realizó a los tres pHs de trabajo (5,40; 6,40; y 7,40), para así poder evaluar el comportamiento conformacional de la proteína tanto a pH endosomal como a pH extracelular.

Como podemos observar en la Figura 4.13, cuando se añaden distintas concentraciones de $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ a la solución de HoloTrf, no se observan cambios en el espectro de dicroísmo circular entre los 200 y los 250nm, lo cual nos estaría indicando que no existen cambios significativos en la estructura secundaria en presencia del complejo metálico. El mismo comportamiento se observó para los tres pHs de trabajo.

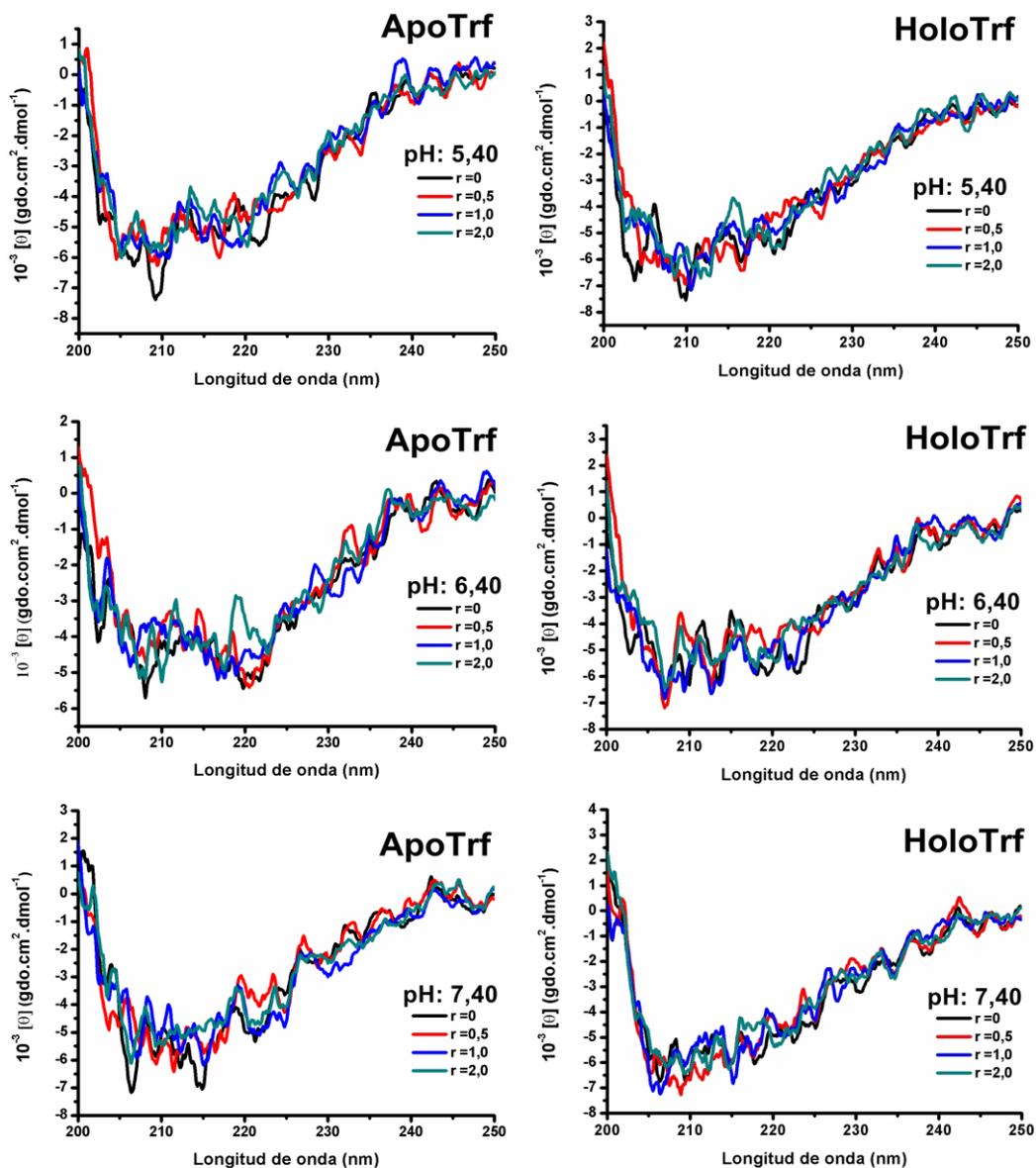


Figura 4.13 Espectros de Dicroísmo circular para la HoloTrf a distintas relaciones molares ($r=[Cr(phen)_3^{3+}]/[HoloTrf]$). Temperatura = 298K. Buffer libre de cloruros (0,04M de fosfato y 0,1M de Sulfato)

Para estudiar la estructura terciaria, analizamos el espectro de dicroísmo circular en la región comprendida entre 320-500nm, usando una concentración de proteína de 1×10^{-4} M y diferentes concentraciones de complejo de Cromo.

Este análisis se llevó a cabo solo para la HoloTransferrina a pH 7,40. Esto se debió a que este es el estado de la proteína que interacciona, fuera de la pared celular, con el receptor. Por otro lado, el estudio conformacional de la Transferrina en su estado carente de cationes férricos, ya se estudió anteriormente.⁴²

El espectro de dicroísmo circular de la HoloTransferrina se caracteriza por tener dos bandas características: un máximo a 334nm y un mínimo a 450nm. Las señales que se encuentran a longitudes de onda entre 250nm y 300nm corresponden a señales de los residuos aromáticos: fenilalanina (255-270nm), tirosina (280nm) y triptófano (290nm). (Figura 4.14)

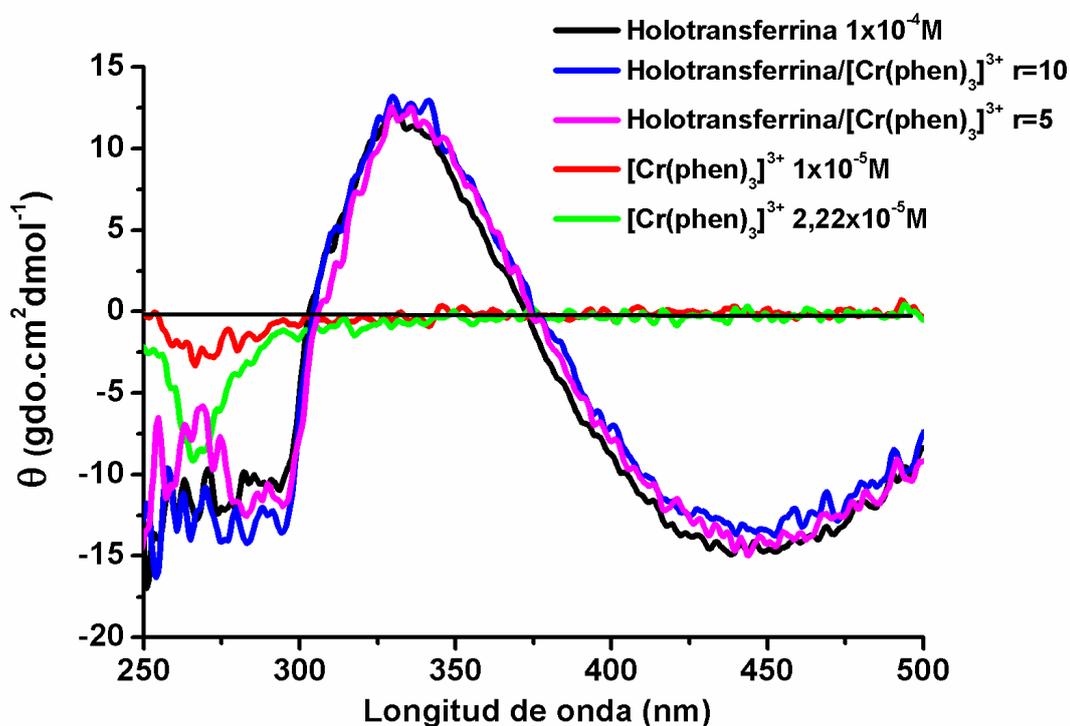


Figura 4.14 Espectros de Dicroísmo circular para la HoloTrf a distintas relaciones molares ($r=[\text{Cr}(\text{phen})_3]^{3+}/[\text{HoloTrf}]$). Temperatura = 298K. pH=7,40.

Cuando el complejo de cromo se añade a la solución de HoloTransferrina no se observan cambios significativos en el espectro de la proteína, indicando que

la presencia de $[\text{Cr}(\text{phen})_3]^{3+}$ no produce cambios sustanciales en la estructura terciaria de la Holotransferrina. Con anterioridad, ya se había observado el mismo comportamiento para la Apotransferrina.

4.6 Conclusiones parciales

Analizando estos resultados de manera global, podemos inferir que el complejo $[\text{Cr}(\text{phen})_3]^{3+}$ se une tanto a la Apotransferrina como a la Holotransferrina con constantes de afinidad del orden de 10^5 M^{-1} . Cabe destacar que estas constantes de afinidad son mayores que los encontrados para los complejos homólogos de Rutenio, que se encuentran en el orden de $10^3 \text{ M}^{-1} - 10^4 \text{ M}^{-1}$.^{33,34,35} En este sentido, los complejos de Cromo podrían ser más fácilmente transportables por la Transferrina que los de Rutenio.

Como hemos observado, las constantes de asociación son similares tanto para la ApoTrf como para la HoloTrf a los tres pHs estudiados. Esto nos indicaría que el sitio de unión del complejo a la proteína es el mismo para los dos estados de la proteína y que dicho sitio es diferente al del catión Fe^{3+} .

Acorde a los parámetros termodinámicos, el sitio de asociación reside en un bolsillo hidrofóbico de la proteína, donde el complejo tendría la capacidad de interactuar tanto con residuos Triptófano como Tirosina.

El hecho de que la estructura secundaria y terciaria no presenten cambios contundentes ante la presencia de complejo, indica que el Receptor de la Transferrina podría reconocer a la HoloTrf aún esté esta asociada al $[\text{Cr}(\text{phen})_3]^{3+}$. Esto generaría la presunción de que el complejo podría ingresar a la célula asociado a la Holotransferrina; y dado que la constante de asociación disminuye conforme disminuye el pH, podríamos suponer que durante la endocitosis (mecanismo por el que la Holotransferrina ingresa a la

célula y que involucra una disminución de pH a 4,5), el complejo podría ser liberado en el interior celular.

4.7 Referencias

- ¹ Perez, G.; *Acta bioquím. clín. latinoam.* 39 (2005) (3) 301-314.
- ² Latunde-Dada G. O.; Van der Westhuizen J.; Vulpe C. D.; Anderson G. J.; Simpson R. J.; McKie A. T.; *Blood Cells Mol Dis* 29 (2002) 356-60.
- ³ Conrad M. E.; Umbreit J. N.; Peterson R. D.; Moore E. G.; Harper K. P.; *Blood* 81 (1993) 517-21.
- ⁴ Uzel C, Conrad ME. *Semin Hematol* 35 (1998) 27-34.
- ⁵ Worthington M. T.; Cohn S. M.; Miller S. K.; Luo R. Q.; Berg C. L.; *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280 (2001) 1172-7.
- ⁶ Theil E. C.; *Ann. Rev. Biochem.* 56 (1987) 289-315
- ⁷ Andrews S.; *Journal of Inorganic Biochemistry*, 47 (1), (1992), pp. 161-174.
- ⁸ Nemeth E.; Tuttle M. S.; Powelson J.; Vaughn M. B.; Donovan A.; McVey Ward D.; *Science* 306 (2004) 2090-3.
- ⁹ Baker E. N.; Lindley P. F.; *J Inorg Biochem* 47 (1992) 147-60.
- ¹⁰ Pakdaman R, El Hage Chahine JM. A mechanism for iron uptake by transferrin. *Eur J Biochem* 236 (1996) 922-31.
- ¹¹ Aisen P.; Listowsky I.; *Annu Rev Biochem* 49 (1980) 357-93.
- ¹² Worthington M. T.; Cohn S. M.; Miller S. K.; Luo R. Q.; Berg C. L.; *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 280 (2001) 1172-7.
- ¹³ P. Aisen, in: A. Sigel, H. Sigel (Eds.), *Metal ions in Biological Systems*, Marcel Dekker, New York, (1998) 585.
- ¹⁴ S. Bailey, R.W. Evans, R.C. Garratt, B. Gorinsky, S. Hasnain, C. Horsburgh, H. Jhoti, P.F. Lindley, A. Mydin, R. Sarra, J.L. Watson, *Biochemistry*, 27 (1988) 5804.
- ¹⁵ R.T.A. MacGillivray, S.A. Moore, J. Chen, B.F. Anderson, H. Baker, Y. Luo, M. Bewley, C.A. Smith, M.E.P. Murphy, Y. Wang, A.B. Mason, R.C. Woodworth, G.D. Brayer, E.N. Baker, *Biochemistry*, 37 (1998) 7919.
- ¹⁶ Huebers HA, Finch CA. *Physiol Rev.*; 6 (1987) 520-82.
- ¹⁷ Brittenham GM. Disorders of Iron Metabolism: Iron deficiency and overload. En Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave

P, editors. *Hematology: Basic Principles and Practice*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone, (2000) 397-427.

¹⁸ Wileman T, Harding C, Stahl P. *Biochem J* 232 (1985) 1-14.

¹⁹ Fleming MD, Romano MA, Su MA, Garrick LM, Garrick MD, Andrews NC. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (1998) 1148-53.

²⁰ Gruenheid S, Canonne-Hergaux F, Gauthier S, Hackam DJ, Grinstein S, Gros P. *J Exp Med* 189 (1999) 831-41.

²¹ Beguin Y.; *Haematologica* 77 (1992) 1-10.

²² L. Esserman, S. Takahashi, V. Rojas, R. Warnke, R. Levy, *Blood*, 74 (1989) 2718–2729

²³ R. Sciot, A.C. Paterson, P. Van Eyken, F. Callea, M.C. Kew, V.J. Desmet *Histopathology*, 12 (1988) 53–63

²⁴ P.T. Gomme, K.B. MacCann, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 10 (2005) 267–273

²⁵ H. Du, J. Xiang, Y. Zhang, Y. Tang, G. Xu *J. Inorg. Biochem.*, 102 (2008) 146–149

²⁶ A. Bergamo, G. Sava *Dalton Trans.*, 40 (2011) 7817–7823

²⁷ J. Toneatto, P.F. Garcia, G.A. Argüello *J. Inorg. Biochem.*, 105 (2011) 1299–1305

²⁸ J. Bhattacharyya, M. Bhattacharyya, A. Chakrabarty, U. Chaudhur. R.K. Poddar, *Biochem. Pharmacol.*, 47 (1994) 2049.

²⁹ J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd Ed., Kluwer/Plenum, New York, (1999).

³⁰ F. Bolleta, M. Maestri, L. Moggi, M. A. Jamieson, N. Serpone, M. S. Henry, M. Z. Hoffman, *Inorg. Chem.*, 22 (1983) 2502

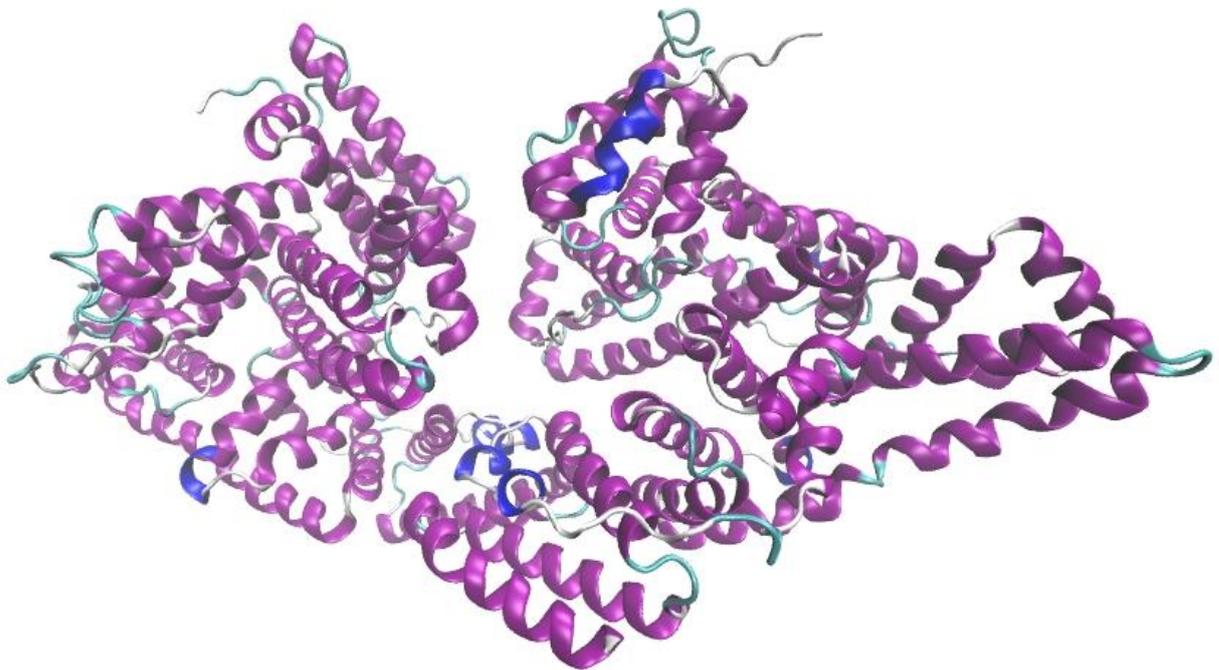
³¹ M. Maestri, F. Bolleta, L. Moggi, V. Balzani, M. S. Henry, M. Z. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 2694

³² M. A. Jamieson, N. Serpone, M. Z. Hoffman, *Coord. Chem. Rev.* 39 (1981) 121.

³³ O. Mazuryk, K. Kurpiewska, K. Lewinski, G. Stochel, M. Brindell *J. Inorg. Biochem.*, 116 (2012) 11–18

- ³⁴ Zahra Jannesari, Hassan Hadadzadeh, Taghi Khayamian, Batool Maleki, Hadi Amiri Rudbari. *European Journal of Medicinal Chemistry* 69 (2013) 577-590.
- ³⁵ Eththilu Babua, Paulpandian Muthu Mareeswarana, Subramanian Singaravadivel, Jayaraman Bhuvaneswari, Seenivasan Rajagopal. *Spect. Acta P. A: Mol. and Biom. Spec.* 130 (2014) 553–560.
- ³⁶ J. Toneatto, G.A. Argüello, *J. Inorg. Biochem.*, 105 (2011), pp. 645–651
- ³⁷ S.N. Timaseff, in: H. Peeters (Ed.), *Proteins of Biological fluids*, Pergamon Press, Oxford, (1972) pp. 511–519.
- ³⁸ P.D. Ross, S. Subramanian, *Biochemistry*, 20 (1981) 3096.
- ³⁹ Frank, H. S. & Evans, M. W. *J. Chem. Phys.* 13 (1945) 507–532.
- ⁴⁰ M. Suzukida, H.P. Le, F. Shahid, R.A McPherson, E.R. Birnbaum, D.W. Darnall, *Biochemistry*, 22 (1983) 2415.
- ⁴¹ B. Valeur *Molecular Fluorescence Principles and Applications* Wiley-VCH (2002), pp. 247–254
- ⁴² Tesis doctoral Judith Toneatto (2010) Universidad Nacional de Córdoba.

Caracterización del proceso de asociación y fotodegradación de la Albúmina Sérica Humana y Bovina en presencia de complejos de Cr(III).



Capítulo 5

5.1 Resumen

En el presente capítulo se presenta un estudio de la asociación de tres complejos de Cr(III) con la albúmina sérica bovina (BSA: Bovine Serum Albumin) y la albúmina sérica humana (HSA: Human Serum Albumin). Los tres complejos se encuentran derivatizados en la posición 5 por tres sustituyentes diferentes: fenilo, metilo, y cloro.

Se realizaron estudios para determinar las constantes de asociación y los respectivos parámetros termodinámicos para cada sistema complejo-proteína. A su vez se estudiaron los cambios conformacionales de la proteína en presencia y ausencia de complejo.

Por último se estudió el proceso de fotosensibilización del complejo a la proteína.

5.2 Introducción

5.2.1 Albúmina Sérica

La albúmina sérica ha sido estudiada de manera extensiva en las últimas décadas.^{1,2} Esto se debe a que esta proteína conforma la mayor parte de las proteínas solubles del sistema circulatorio, cumpliendo gran variedad de funciones fisiológicas.

La albúmina sérica es una proteína que se sintetiza en el hígado. Está presente en prácticamente todos los tejidos pero sobre todo en la piel y los músculos (entre los dos acumulan el 80% de albúmina extravascular). A su vez, está presente en cualquier fluido corporal (fluido vítreo y acuoso ocular, sudor, lágrimas, saliva y sangre).

Su principal función es actuar como proteína transporte de sustancias endógenas y exógenas en la sangre.³⁻⁶ Entre estos compuestos podemos mencionar fármacos, ácidos grasos aniónicos de cadena larga, ácidos biliares, hormonas, vitaminas, cationes, etc.⁷ Entre sus múltiples funciones, podemos mencionar:

- Ayuda a mantener el pH (buffer) y la presión osmótica en la sangre.⁸
- Actúa como almacén de ciertas toxinas, como cuando transporta bilirrubina hasta el hígado para su excreción biliar.⁹
- Interacciona con toxinas exógenas, haciendo que sean menos nocivas al organismo, como por ejemplo la aflatoxina G1.⁹
- Aumenta la solubilidad de algunos compuestos, como por ejemplo los ácidos grasos.¹⁰
- En ocasiones, la albúmina presenta actividad enzimática cuando interacciona con moléculas pequeñas.^{9,11}

- Posee actividad enolasa y también es capaz de actuar como tioesterasa, pudiendo llevar a cabo un importante proceso clínico como es la degradación de disulfiram^{9,11}.
- También presenta actividad esterasa en uno de sus múltiples sitios de unión, debido probablemente a la proximidad de la Arginina-410 y la Tirosina-411, pudiendo producir la hidrólisis de ácidos grasos.¹²
- También es de destacar su actividad glucuronidasa, mediante la cual se produce la hidrólisis del glucurónido de algunos fármacos, como carprofeno, naproxeno, flurbiprofeno o ketoprofeno.^{13,14}

Las albúminas son proteínas de una sola cadena polipeptídica simple sin grupos prostéticos con una masa molecular aproximada de 67kDa. Poseen tres dominios homólogos, en los cuales pueden interaccionar moléculas de naturaleza distinta; cada dominio posee tres subdominios. En estos diferentes dominios y subdominios pueden identificarse los sitios de unión de ligandos con propiedades multifuncionales.¹⁵

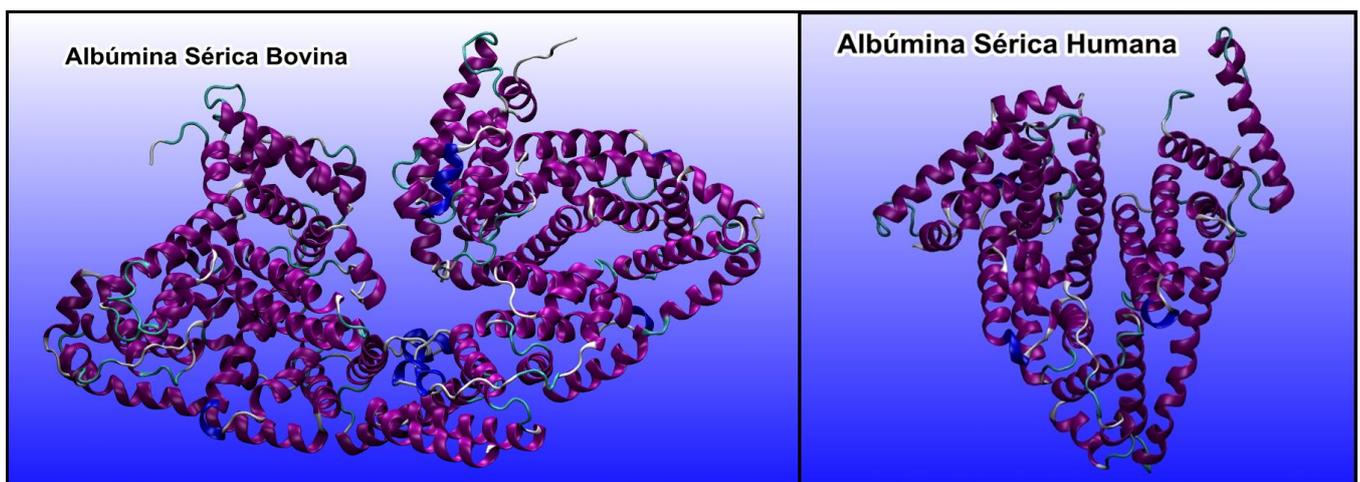


Figura 5.1. Representaciones gráficas de la Albúmina Sérica Bovina (BSA) y Albúmina Sérica Humana (HSA).

Las albúminas son proteínas flexibles que pueden adaptar su estructura para interactuar con una gran variedad de sustratos en sus distintos sitios de unión. Entre los compuestos con mayor grado de unión se encuentran aniones orgánicos hidrofóbicos como ácidos grasos de cadena larga, bilirrubina, etc., pero también existe una alta afinidad por distintos fármacos. El estudio de la interacción fármaco/Albúmina nos puede dar información sobre la biodistribución, el metabolismo, la eliminación y el efecto farmacológico de éstos en el organismo.

La naturaleza de estas interacciones puede ser de tipo electrostático, puente de hidrógeno, de tipo van der Waals, hidrofóbica, y en general los procesos son reversibles con constantes de asociación que oscilan entre 10^4 y 10^6 M^{-1} .¹⁵ En otras ocasiones, la asociación con algún tipo de fármacos puede ser irreversible.¹⁰

Las albúminas de distintas especies poseen una alta homología entre sí. Sin embargo diferentes estudios han puesto de manifiesto diferencias en la asociación para un mismo metabolito, según la albúmina que se estudie. Tal es el caso de la bilirrubina, que presenta diferentes grados de unión según interaccione con una u otra albúmina.

En particular, en nuestro estudio nos hemos dispuesto a trabajar con la Albúmina Sérica Humana y la Bovina que comparten un 76% la identidad de secuencia y poseen la misma distribución de puentes disulfuro. Las diferencias observadas en la secuencia primaria son de naturaleza estructural conservativa, es decir, aminoácidos de un tipo son reemplazados por otros con características similares.^{18,16}

Sin embargo a pesar de la homología secuencial y estructural, estas dos albúminas poseen una diferencia espectroscópica significativa. Mientras que la HSA posee sólo un residuo Triptófano (Trp-214), la BSA posee dos (Trp-214 y

Trp-135). Esto genera una diferencia en la intensidad de fluorescencia de las proteínas, y por ende un análisis espectral diferente.^{16,18}

A pesar de que las albúminas séricas poseen varios sitios de unión a diferentes sustratos, se siguen aceptando dos sitios de unión específicos. Sudlow et al. designa estos dos sitios como sitio I (sitio de unión a la warfarina) y sitio II (sitio de unión al diazepam).¹⁷ El sitio I se encuentra situado en el subdominio IIA¹⁸ y las interacciones predominantes son de tipo hidrofóbicas.¹⁹ Ejemplos de sustratos con gran afinidad por el sitio I son warfarina, aspirina, bilirrubina, indometacina, fenilbutazona, etc. Algunas evidencias sugieren que el sitio I es flexible y de gran tamaño lo que ocasiona que sea difícil observar estereoselectividad en la interacción con los sustratos. Los aminoácidos que tienen mayor relevancia para la interacción con fármacos son Trp-214 y Arg-218.

El sitio II está situado en el subdominio IIIA¹⁸ y es de menor tamaño y menos flexible que el sitio I.¹⁹ Por esta razón, se cree que las interacciones estereoselectivas se pueden observar en mayor grado en este sitio de unión. Las interacciones que predominan son de tipo puente de hidrógeno y electrostáticas. Los aminoácidos Arg-410 y Tyr-411 desempeñan un papel importante en la interacción con ligandos.¹⁸

La clasificación de Sudlow no engloba todos los sitios de unión específicos que posee la albúmina para interactuar con fármacos. Por ejemplo, el propofol (agente anestésico) interactúa tanto en el sitio II como en el subdominio IIIB.

5.2.2 Fotooxidación de proteínas.

Se conoce que a nivel celular, que las proteínas son el principal blanco para la oxidación fotosensibilizada, también conocida como degradación fotosensibilizada. Esta situación se debe a que las proteínas comprenden

aproximadamente un 68% del peso seco de las células y tejidos, siendo así, el conjunto de moléculas más abundante en organismos vivos. Además poseen, una gran capacidad para ligarse con cromóforos y reaccionar rápidamente con su respectivo estado excitado.²⁰

La oxidación fotosensibilizada puede inducir numerosos cambios en las proteínas, entre ellos podemos mencionar la fragmentación, agregación, desnaturalización, alteración de la superficie hidrofóbica, cambios en susceptibilidad proteolítica, y cambios en la estructura.²¹

Si alguno de estos cambios se diera en una proteína esencial se podría inducir así la pérdida de funcionalidad, y por ende la muerte celular de aquella célula cuya proteína esencial fue dañada.

5.3 Motivación y objetivos

Debido a que la HSA y la BSA son consideradas modelo de proteínas de transporte, resultó de especial interés analizar qué fuerzas se hacen presentes cuando distintos complejos de Cr(III) interaccionan con ellas. El objetivo es conocer las potencialidades de estas proteínas como agentes transportadores de los complejos metálicos al interior celular, pero a su vez también estudiar la degradación fotosensibilizada de estas proteínas por los complejos, en pos de proponerlos como agentes terapéuticos.

5.4 Materiales y Métodos

5.4.1 Materiales

Los complejos metálicos de Cr(III) fueron sintetizados con anterioridad en nuestro grupo, según procedimientos reportados en bibliografía.^{22,23,24}

La Albúmina Sérica Humana (HSA) (Sigma Aldrich), libre de ácidos grasos y globulinas, se utilizó sin previa purificación. La Albúmina Sérica Bovina (BSA) utilizada se encontraba purificada al 98% (Fracción V).

Las soluciones de trabajo fueron preparadas en solución amortiguadora (buffer) de sal de fosfato (0,004 M de Na₂HPO₄ y 0,1 M de NaCl). Las concentraciones del complejo metálico y de las proteínas se determinaron por espectroscopía UV-visible. Para las soluciones madres (*stock*) de los complejos [Cr(5-Mephen)₃]³⁺, [Cr(5-Phphen)₃]³⁺, y [Cr(5-Clphen)₃]³⁺ se usaron los siguientes valores de coeficientes de absorptividad molar: $\epsilon_{275} = 63.778 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{243} = 93.325 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, y $\epsilon_{275} = 61.660 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ respectivamente. Para las soluciones madres de la HSA y de la BSA se usaron los siguientes valores de coeficientes de absorptividad molar: $\epsilon_{280} = 36.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{279} = 43.824 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectivamente.

5.4.2 Medidas espectroscópicas

Se llevaron a cabo mediciones de absorbancia y de *quenching* siguiendo la emisión de fluorescencia de la BSA y HSA.

Las medidas de dicroísmo circular se realizaron en un espectropolarímetro Jasco J-810 a temperatura ambiente, usando una celda de 0,2cm de paso óptico. Los datos informados constituyen un promedio de 5 medidas, a una velocidad de barrido de 100nm/min, con un ancho de banda de 1nm y una

resolución de 0,2nm. Los datos han sido expresados en términos de elipticidad media residual ($[\theta]$).

5.4.3 Estudios de asociación

Fue posible la determinación de las constantes de asociación entre los complejos con las albúminas a partir de determinar los cambios de la intensidad de fluorescencia de las proteínas con sucesivos agregados de complejo. Inicialmente se determinó la emisión de la proteína en ausencia de complejo a una concentración de $1,5 \times 10^{-6}$ M. Luego se registraron los espectros de emisión en presencia de distintas concentraciones de complejo metálico, que llegaron hasta concentraciones cercanas a $1,5 \times 10^{-5}$ M.

Las constantes de asociación se determinaron a partir del análisis de los cambios en la intensidad máxima de emisión con el incremento de la concentración de complejo de Cr(III) usando la ecuación desarrollada por Bhattacharya²⁵ (ec 4.1).

5.4.4 Modelo de asociación

Con la intención de determinar las fuerzas de interacción involucradas en el proceso de asociación entre los complejos estudiados con la HSA y la BSA, se determinaron las constantes de asociación, K_b , a distintas temperaturas y a partir de allí, se calcularon los parámetros termodinámicos.

Para determinar los parámetros termodinámicos, se partió de la aproximación de que el cambio de entalpía (ΔH) no varía significativamente en el intervalo de temperaturas de trabajo (amplitud de temperatura de 15°C). Tanto el valor de ΔH como el de cambio de entropía, puede determinarse a partir de la ecuación de Vant Hoff (4.2):

Finalmente los valores de cambio de energía libre de Gibbs (ΔG) a una determinada temperatura se pudieron obtener a partir de la ecuación 4.3, que relaciona los parámetros termodinámicos para un determinado proceso.

5.4.5 Estudios de Dicroísmo circular

Los espectros de Dicroísmo circular de las proteínas en ausencia y presencia de complejo se registraron en la región del ultravioleta lejano, $\lambda=200-250\text{nm}$, para determinar posibles cambios en la estructura secundaria de la proteína. El análisis de los espectros se hizo utilizando el programa Origin 8, para suavizar las gráficas y compararlas. La comparación se hizo analizando las intensidades a 208nm y 222nm, longitudes de onda características del porcentaje (%) de la estructura alfa-hélice de una proteína.

5.4.6 Estudios de transferencia de Energía

Acorde a la teoría de Förster, se realizaron estudios de transferencia de energía de la proteína (dador) a los complejos metálicos (aceptor). La transferencia de energía se define según las ecuaciones detalladas en el capítulo 4. El análisis y el procesamiento de los datos se llevaron a cabo del mismo modo para las albúminas que para la Transferrina (capítulo 4).

5.4.7 Estudios de fotodegradación

Los estudios de fotodegradación consistieron en irradiar diferentes muestras de HSA en presencia y ausencia de $\text{Cr}(\text{5Clphen})_3^{3+}$ así como también en presencia y ausencia de O_2 (a través de un intercambio gaseoso con N_2 en la superficie de la muestra). Como fuente de irradiación se dispuso un sistema de LEDs blancos (NSPW500CS, NICHIA America Corporation, $\lambda_{\text{em}}=452\text{nm}$ e intensidad de 10^{-7} Einstein. min^{-1}).

Se usaron concentraciones de HSA y $\text{Cr}(\text{5Clphen})_3^{3+}$ tales que en las muestras a fotolizar las concentraciones de las mismas fueran, $1,5 \times 10^{-5}\text{M}$ y $1,5 \times 10^{-4}\text{M}$, respectivamente. El volumen de muestra irradiado fue de $50\mu\text{l}$ y los tiempos de irradiación variaron entre 30 minutos y 24hs. La fotólisis se llevó a cabo a temperatura ambiente.

El análisis de las muestras irradiadas se realizó mediante el uso de la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas para poder determinar la posible fragmentación de la proteína. Los geles fueron armados en un equipo para minigeles (Mini Protean III Dual Slab Cell Electrophoresis System). La preparación de los geles se llevó a cabo siguiendo un protocolo que establece que la composición del gel separador debe ser: acrilamida 9,6% (p/v), bis-acrilamida 0,3% (p/v), TEMED 0,1% (v/v), APS 0,1% (p/v), Tris-HCl 1,5 M pH=8,8. Mientras que la composición del gel concentrador debe ser: acrilamida 3,9% (p/v), bis-acrilamida 0,1% (p/v), TEMED 0,1% (v/v), APS 0,1% (p/v), Tris-HCl 1 M pH=6,8. El buffer de corrida consistió en Tris 25 mM, Glicina 192 mM pH=8,3. Las electroforesis se llevaron a cabo a temperatura ambiente durante 1h a 100 V.

Una vez finalizada la corrida, los geles se tiñeron con una solución de Coomassie blue 0,1% (p/v) durante 30 minutos. La eliminación del exceso de colorante se realizó mediante sucesivos lavados con solución de fijado preparada a base de metanol 10% y ácido acético 10%.

Los estudios de fotodegradación se hicieron en presencia y en ausencia de oxígeno molecular. Para ellos se diseñó un sistema por el cual se burbujearon los pequeños volúmenes de muestra (50uL) con nitrógeno molecular para así arrastrar el oxígeno de la superficie de la muestra y del medio.

5.4.8 Estudios de Transferencia de Iones entre dos soluciones de electrolitos no miscibles (ITIES)

Los estudios de ITIES se hicieron utilizando una celda electroquímica con cuatro electrodos y como soluciones de trabajo: LiCl $1,0 \times 10^{-2}$ M en la fase acuosa. En la fase orgánica, 1,2-dicloroetano, se utilizó como electrolito dicarbóil cobaltato de tetrafenilarsonio (TPhAsDCC) en una concentración de $1,0 \times 10^{-2}$ M.

Se trabajó con concentraciones de complejo de Cr(III) del orden $\times 10^{-4}$ y se hizo un blanco control con NaClO₄ (contraíón de los complejos).

5.5 Resultados y Discusión

Se presentarán los resultados en dos bloques; inicialmente se presentarán los resultados de los experimentos realizados con la Albúmina Sérica Humana (5.4.1) y luego los realizados con la Albúmina Sérica Bovina (5.4.2). Al final de este último subcapítulo se encuentran los estudios de fotodegradación.

5.5.1 Albúmina sérica Humana

5.5.1.1 Asociación entre $\text{Cr}(\text{5Cl-phen})_3^{3+}$ y HSA.

Como ya vimos en el capítulo 4, la espectroscopía de fluorescencia es una técnica de especial uso en el estudio de la biofísica de bio-macromoléculas. La información obtenida a partir de esta técnica nos podría permitir identificar el sitio de unión a la proteína, la afinidad por este sitio, y los cambios que sufre el microambiente del sitio de unión cuando el ligando interacciona con la proteína. Los residuos que son responsables de la emisión en cualquier proteína (fluoróforos) son los aminoácidos triptófano, tirosina y fenilalanina.^a

El siguiente esquema representa el proceso de asociación a ser analizado en el presente subcapítulo (Ec 5.1):



En la figura 5.2 podemos observar el efecto del $\text{Cr}(\text{5Cl-phen})_3^{3+}$ sobre la intensidad de fluorescencia de la HSA. La intensidad de la emisión disminuye de manera notable a medida que aumenta la concentración de complejo metálico. El complejo tiene la capacidad para desactivar el estado excitado de los fluoróforos de la HSA. Sin embargo podemos observar que a concentraciones grandes de complejo metálico, el espectro se deforma

^a Esto ha sido detallado en el capítulo 4 “Caracterización espectroscópica de la asociación entre el $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ y la Transferrina”.

levemente. Esta deformación del espectro puede deberse a la presencia de fenantrolina libre en solución, ya que los complejos se ven afectados por un proceso de fotoacuación, que puede dejar fenantrolinas disponibles, en solución, para absorber y emitir luz.

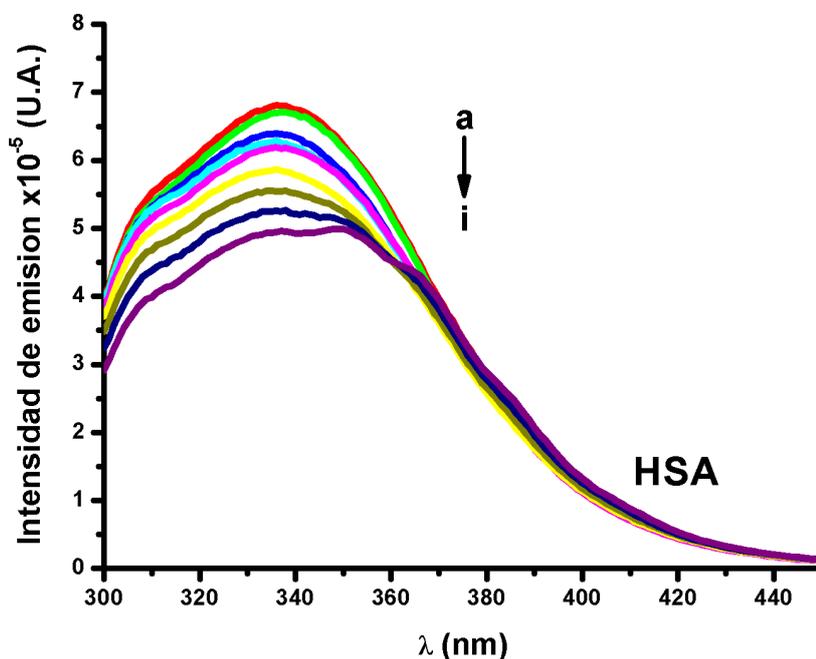


Figura 5.2 Espectro de emisión de la Albúmina Sérica Humana en ausencia y presencia de $\text{Cr}(\text{5Cl-phen})_3^{3+}$. La concentración de la proteína fue de $1,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ y la concentración de complejo fue de (0; 0,1; 0,2; 3,1; 5,1; 7,4; 1,5; 2,4; 3,4) $\times 10^{-6} \text{ M}$, desde el espectro rojo al violeta respectivamente. Temperatura= 300K; pH=7,40; $\lambda_{\text{exc}}= 280\text{nm}$. Las ranuras de paso de luz de emisión y excitación se mantuvieron fijas a 5nm.

Con el objetivo de evaluar si el residuo Trp-214 se encuentra involucrado en el proceso de asociación, se procedió a estudiar de manera comparativa el *quenching* de la HSA con distintos agregados de complejo, excitando la albúmina tanto a 280nm, como a 295nm. Al excitar a 280nm, los responsables de la emisión son tanto el residuo Triptófano como los residuos tirosina de la proteína, mientras que al excitar a 295nm, sólo se responsabiliza de la emisión

al residuo Triptófano, ya que las tirosinas no absorben a esa longitud de onda de excitación^b.

Como podemos observar en la Figura 5.3, existe una diferencia entre los perfiles de intensidad relativa cuando excitamos a 280nm y a 295nm. Esta diferencia nos permite suponer que el complejo estaría interactuando con el Trp-214, ubicándose, por ende, en cercanías al sitio de unión I.

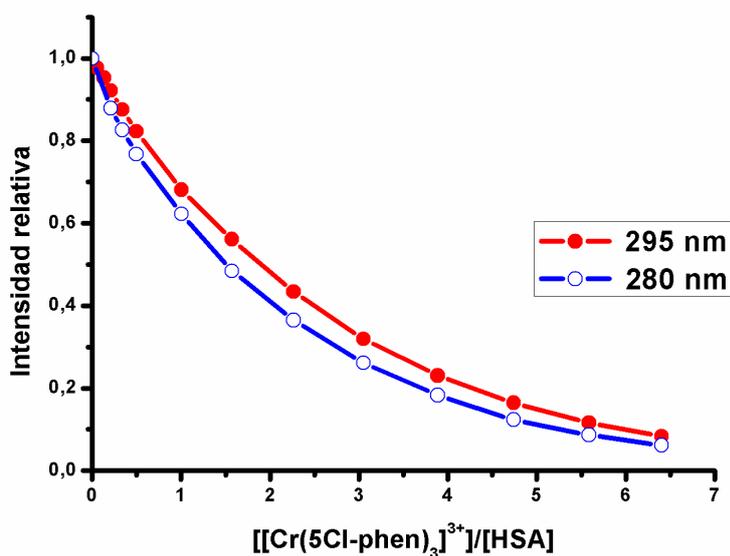


Figura 5.3 Espectro de emisión de fluorescencia de la HSA en ausencia y presencia de $\text{Cr}(\text{5Cl-phen})_3^{3+}$. La concentración de la proteína fue $1,5 \times 10^{-6}$ M.

La banda situada alrededor de los 336nm (λ_{max}) es característica de la emisión dada por la HSA. Al disminuir la intensidad de fluorescencia, el complejo debiera estar generando algún tipo de perturbación con los residuos fluoróforos circundantes al sitio de asociación. Sin embargo, como se puede observar, no existe un cambio en la posición del máximo de emisión (λ_{max}), lo

^b Para mayor información revisar el capítulo 4 “Caracterización espectroscópica de la asociación entre el $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ y la Transferrina”

que nos indicaría que el complejo no estaría alterando la polaridad del medio circundante al residuo Trp-214.

Con la intención de elucidar la afinidad con la que el complejo metálico interaccionaba con la HSA, se procedió a determinar la constante de asociación a partir de los estudios de *quenching* siguiendo el modelo de Bhattacharrya. Este modelo se encuentra bien descrito en el capítulo 4. Las constantes de asociación se determinaron a diferentes temperaturas.

Las constantes de asociación obtenidas se encuentran en la Tabla 5.1; y como podemos observar los valores de las K_b obtenidas, demuestran una gran afinidad de la proteína por el complejo.

Tabla 5.1 Constantes de asociación para el sistema HSA-Cr(5Cl-phen)₃³⁺ a diferentes temperaturas.

Temperatura(K)	$K_b(10^5)$
300,15	2,975
302,15	3,185
307,15	4,161

5.5.1.2 Parámetros termodinámicos y naturaleza de las fuerzas de interacción.

A partir de las constantes de asociación determinadas a tres diferentes temperaturas, se determinaron los parámetros termodinámicos a los fines de caracterizar las fuerzas de interacción presentes en el proceso de asociación entre las albúminas y los complejos. Las fuerzas moleculares que contribuyen a las interacciones entre una proteína y una molécula pueden ser: puentes hidrógeno, fuerzas electrostáticas, interacciones de tipo hidrofóbicas, interacciones de Van der Waals, entre otras.

A partir de los valores de pendiente y de ordenada al origen (extrapolación) de la ecuación de Vant hoff (Ec 4.3) se pudieron determinar los parámetros termodinámicos (ΔH y ΔS) para los sistemas estudiados. Estos parámetros son esenciales para determinar el cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG) y caracterizar las interacciones presentes en la asociación.

En el Figura 5.4 se observa la gráfica de Vant Hoff para el sistema HSA-Cr(5Cl-phen)₃³⁺.

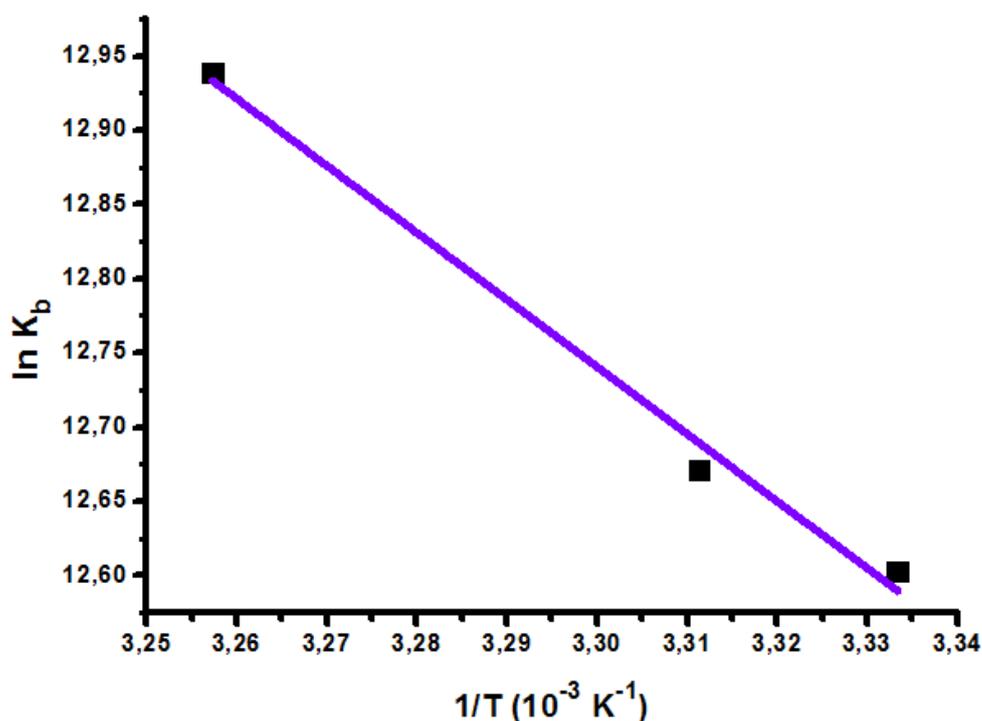


Figura 5.4 Representación de Van't Hoff para el sistema HSA-Cr(5Cl-phen)₃³⁺

A partir de esta Figura se determinaron los parámetros termodinámicos del proceso de asociación (tabla 5.2).

Tabla 5.2 Parámetros termodinámicos para la asociación del $\text{Cr}(\text{5Cl-phen})_3^{3+}$ con la HSA

Temperatura(K)	ΔG (kJ/mol)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/mol.K)
300,15	-31,42	37,55	229,84
302,15	-31,90		
307,15	-33,05		

Los valores tabulados de ΔG , ΔH , y ΔS muestran que el proceso de asociación del $\text{Cr}(\text{5Cl-phen})_3^{3+}$ a la HSA es un proceso espontáneo, ya que el valor de ΔG es negativo.

Por su parte los valores positivos de ΔH y ΔS nos indican que el proceso de asociación presenta una principal contribución entrópica. En función de los resultados, y analizándolos con el modelo de Ross y Subramanian (ver capítulo 4), se puede asumir que las interacciones de tipo hidrofóbica, juegan un rol importante en el proceso de asociación. De todos modos no podemos descartar la presencia de interacciones de tipo electrostática dada la carga +3 del complejo metálico y los valores pequeños de ΔH .

5.5.1.3 Cambios conformacionales de la HSA inducida por la presencia de complejo

Cuando una molécula se asocia a una proteína, esta puede sufrir cambios estructurales debido a las fuerzas intermoleculares que generan la asociación. La naturaleza de esas modificaciones estructurales, tanto en la estructura secundaria, como en la terciaria, dependen del ligando que se asocia a la proteína, de la flexibilidad de la proteína y de las condiciones experimentales (temperatura, pH, sales presentes en el medio, etc).

En la Figura 5.5 se muestran los espectros de Dicroísmo Circular en la región UV-lejano para la HSA en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de complejo metálico.

La forma del espectro de la proteína muestra dos mínimos, centrados en 208nm y 222nm, que son característicos de proteínas que presentan un alto porcentaje de estructura secundaria α -hélice. La forma de los espectros del sistema HSA-Cr(5Cl-phen) $_3^{3+}$ a distintas concentraciones, presentan la misma apariencia que la proteína en ausencia de complejo. A pesar de que se observan cambios mínimos en la intensidad de los espectros, estos no siguen tendencia alguna, por lo que pueden ser, más bien, atribuidas al error experimental.

En este sentido se observa que, a pesar de que existe una afinidad muy grande del complejo por la proteína, éste no es capaz de modificar las interacciones puente hidrógeno presentes en la proteína, lo que se traduce en la ausencia de cambios significativos en la estructura secundaria de la proteína.

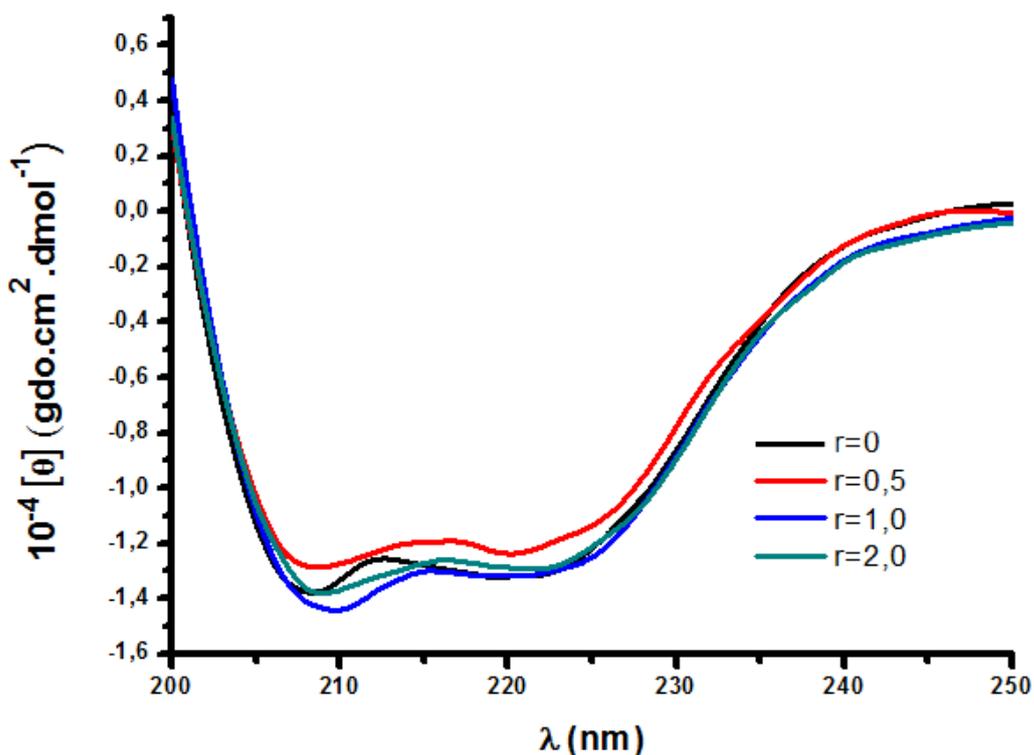


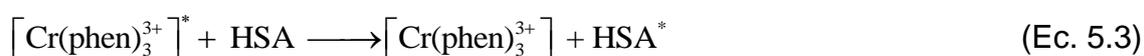
Figura 5.5 Espectros de dicroísmo circular para soluciones de HSA en ausencia y presencia de distintas concentraciones de Cr(5Cl-phen) $_3^{3+}$. Temperatura ambiente. Buffer fosfato, pH=7,40.

Donde r corresponde a las relaciones de complejo y proteína.

5.5.1.4 Estudios resueltos en el tiempo

La irradiación de soluciones de $\text{Cr}(\text{5Clphen})_3^{3+}$ (en ausencia y presencia de HSA) con longitudes de onda mayores a 330 nm (zona donde no absorbe la proteína) induce la formación del estado excitado del complejo metálico el cual emite a $\lambda=728$ nm. Esta emisión disminuye (*quenching*) en presencia de la proteína.

Se siguió la desactivación de la emisión por medio del estudio del tiempo de vida del estado excitado de los complejos con agregados progresivos de proteína. Dicho proceso se encuentra esquematizado en las siguientes ecuaciones:



Se observó que a medida que se incrementaba la concentración de *quencher* disminuía el tiempo de vida del complejo excitado (Figura 5.6).

El fenómeno de *quenching* puede ocurrir por diferentes mecanismos. El “*quenching colisional*” o también conocido como “*quenchig dinámico*” sucede cuando el estado excitado del fluoróforo (especie que emite) es desactivado como consecuencia de la colisión con otras moléculas en solución. En este caso el fluoróforo vuelve al estado basal a través de un encuentro difusional con el *quencher*. En otros casos, los fluoróforos pueden formar complejos no fluorescentes con los *quenchers*, y esto se conoce como “*Quenching Estático*” debido a que la asociación ocurre en el estado basal y no involucra difusión ni colisiones moleculares, disminuyendo la concentración del fluoróforo libre.

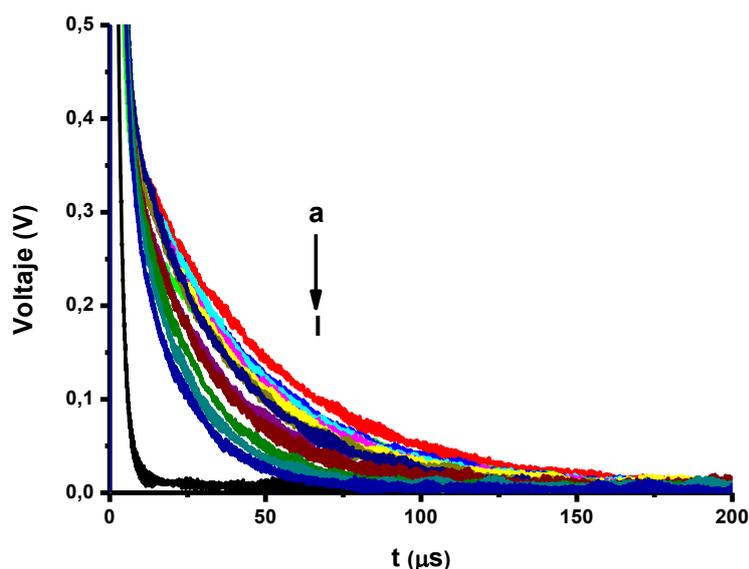


Figura 5.6 Medidas resueltas en el tiempo del $\text{Cr}(5\text{Clphen})_3^{3+}$ con agregados crecientes de HSA.

Las experiencias resueltas en el tiempo indicarían que al menos el mecanismo de *quenching* dinámico está presente. Aplicando la ecuación de Stern-Volmer (Ec. 5.4) y graficando τ^0 / τ en función de la concentración de *quencher* [Q], se pudo obtener información sobre la constante de desactivación del estado excitado de los complejos (Quenching):

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{SV} [Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (\text{Ec 5.4})$$

donde τ_0 y τ son los tiempos de vida del complejo en ausencia y presencia de los distintos agregados de *quencher*, respectivamente y K_{SV} es la constante de Stern-Volmer la cual equivale al producto entre k_q (constante de *quenching* bimolecular) y τ_0 . Para el sistema HSA- $\text{Cr}(5\text{Cl-phen})_3^{3+}$ se encontró una K_{SV} : $1,989 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ y k_q : $3,67 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (regresión lineal = 0,99747). Dichos valores se analizaron comparativamente con los valores obtenidos para la BSA.

5.5.1.5 Estudios de fotodegradación

Se usaron los geles de poliacrilamida para estudiar la capacidad que tiene el estado excitado de los complejos fenantrolínicos de Cr(III) para degradar proteínas. Para este estudio se utilizaron las albúminas como proteínas blanco del tratamiento foto-terapéutico y no solamente como potenciales agentes transportadores de los complejos al interior celular.

Los complejos de Cr(III) tienen un rendimiento cuántico de generación de oxígeno singlete bastante menor que el de otros complejos metálicos estudiados en la misma línea de la terapia fotodinámica (rutenio, por ejemplo). Sin embargo, los complejos de Cr(III) tendrían la capacidad de generar una oxidación fotoinducida actuando directamente sobre el sustrato, sin el requerimiento de oxígeno molecular. En este sentido los estudios de fotodegradación se hicieron en presencia y ausencia de oxígeno molecular.

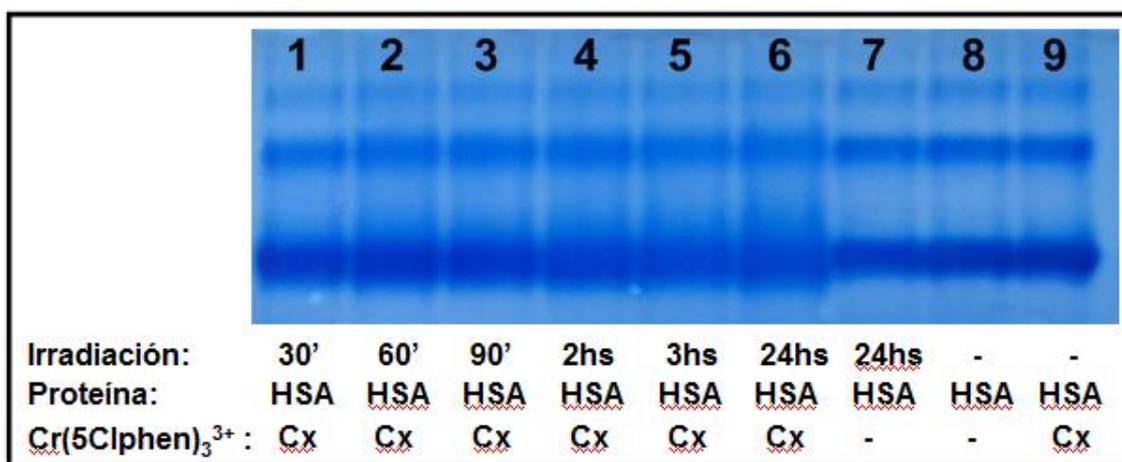


Figura 5.7 Gel de poliacrilamida para la fotólisis del sistema HSA- Cr(5Cl-phen)₃³⁺ a distintos tiempos de irradiación (desde 30 minutos hasta 24horas). Concentración de la proteína: $1,5 \times 10^{-5} \text{M}$. Concentración de complejo metálico: $1,5 \times 10^{-4} \text{M}$.

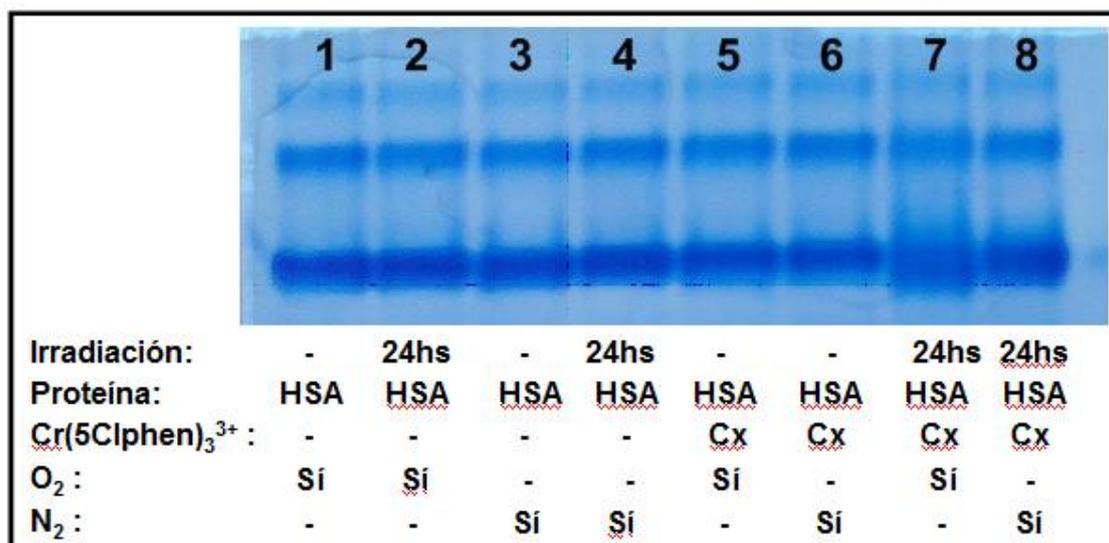


Figura 5.8 Gel de poliacrilamida para la fotólisis del sistema HSA- Cr(5Cl-phen)₃³⁺ en distintas condiciones (ausencia o presencia de oxígeno). Concentración de la proteína: $1,5 \times 10^{-5}$ M. Concentración de complejo metálico: $1,5 \times 10^{-4}$ M.

En la Figura 5.7 se observan los patrones de movilidad electroforética de la HSA en presencia de distintos tratamientos. Se puede observar que la movilidad de la proteína tratada con luz durante 24hs (en ausencia de complejo) y la movilidad de la proteína en presencia de complejo (pero en ausencia de irradiación) son similares a la movilidad de la proteína sin ningún tipo de tratamiento (carriles 7, 8 y 9)

Por otro lado, solamente en presencia de complejo e irradiación se observa algún tipo de efecto en la corrida electroforética. Dicho efecto se ve aún más marcado a tiempos de fotólisis más prolongados (carriles 1 al 6).

Analizando la figura 5.8, podemos observar como la proteína fotolizada aún en ausencia de oxígeno molecular (carril 8) posee una movilidad electroforética diferente a la proteína no tratada, lo que nos daría un indicio de que el oxígeno molecular no es un agente necesario para la degradación fotoinducida en nuestro sistema. Cabe aclarar que el daño a la proteína es mayor en presencia de oxígeno, esto se debe a que en solución hay una gran cantidad de complejo de cromo (III) libre (no asociado a la proteína) que podría tener la capacidad de generar oxígeno singlete, a pesar de su bajo rendimiento cuántico.

Trabajos previos indican un comportamiento similar cuando estos complejos interaccionan con ADN plasmídico en ausencia de oxígeno molecular.

A su vez, se trabajó con azida de sodio para reconocer la vía del oxígeno singlete. La azida de sodio (NaN_3) se utiliza como un inhibidor de la vía del oxígeno singlete, y en ese sentido puede ayudarnos a corroborar la hipótesis de cómo aún en ausencia de O_2 hay daño degradativo a las proteínas. Sin embargo encontramos que la azida tiene la capacidad de desactivar el estado excitado del complejo metálico, por lo que una disminución en la degradación de proteína no necesariamente podría deberse a la vía del oxígeno singlete, más si a una menor cantidad de complejo excitado capaz de generar daño.

5.5.2 Albúmina sérica Bovina (BSA)

5.5.2.1 Asociación entre los complejos de Cr(III) y BSA

Se estudió la interacción de la BSA con los complejos $\text{Cr}(\text{5Cl-phen})_3^{3+}$ (Ec. 5.1); $\text{Cr}(\text{5Me-phen})_3^{3+}$ (Ec. 5.2) y $\text{Cr}(\text{5Ph-phen})_3^{3+}$ (Ec. 5.3), a los fines de entender el papel que juega el sustituyente en la interacción con proteínas.



En la figura 5.9 podemos observar la disminución de la emisión de la BSA debido a la presencia del $\text{Cr}(\text{5Cl-phen})_3^{3+}$. El efecto que tiene el complejo sobre la emisión de la proteína es similar que el del $\text{Cr}(\text{5Cl-phen})_3^{3+}$ con la HSA: la intensidad de fluorescencia disminuye, lo que indica que los residuos fluoróforos circundantes al sitio de asociación estarían siendo, de algún modo, perturbados. También podemos observar la inexistencia de desplazamientos

hipsocrómicos y batocrómicos, lo que nos indica que los complejos no están afectando la polaridad del medio circundante al sitio de asociación.

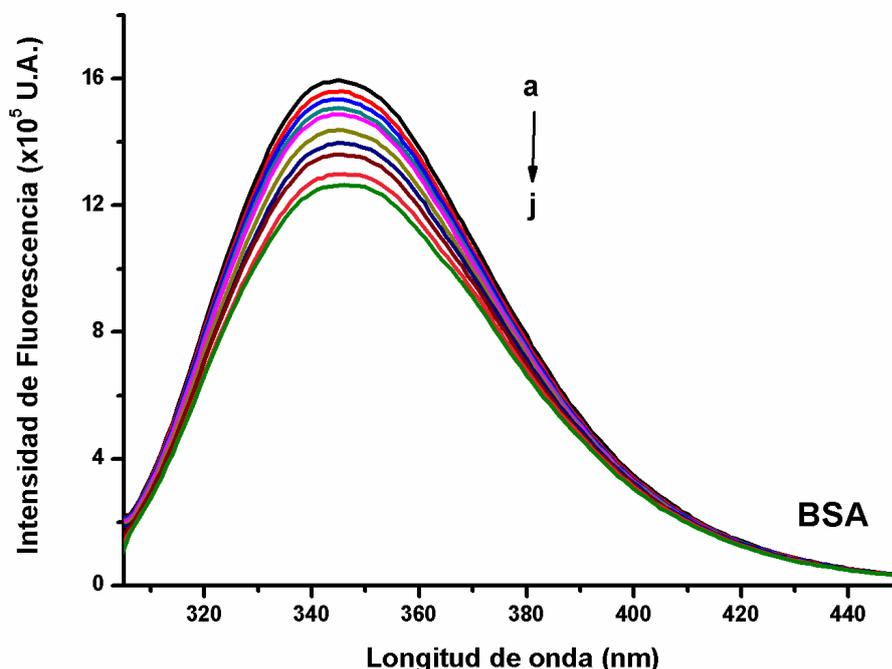


Figura 5.9 Espectro de emisión de la Albúmina Sérica Bovina en ausencia y presencia de $\text{Cr(5Cl-phen)}_3^{3+}$. La concentración de la proteína fue de $1,5 \times 10^{-6}$ M y la concentración de complejo fue de (0; 0,1; 0,2; 0,5; 0,7; 0,9; 1,3; 1,8; 2,6 y 3,7) $\times 10^{-6}$ M, desde el espectro negro al verde respectivamente. Temperatura ambiente; pH=7,40; $\lambda_{\text{exc}} = 280\text{nm}$. Las *slits* de emisión y excitación se mantuvieron fijas a 5nm.

Para los tres complejos se observa que existe una diferencia entre la intensidad relativa de fluorescencia cuando excitamos a 280 y 295nm (Figura 5.10), lo que nos indica que los residuos triptófano estarían involucrados en el proceso de *quenching*, y potencialmente en cercanías del sitio de asociación.

Nuevamente siguiendo el modelo de Bhattacharrya se determinaron las constantes de asociación que podemos observar en la Tabla 5.3. Estos valores de K_b ponen de manifiesto que existe una importante afinidad de los complejos por la BSA.

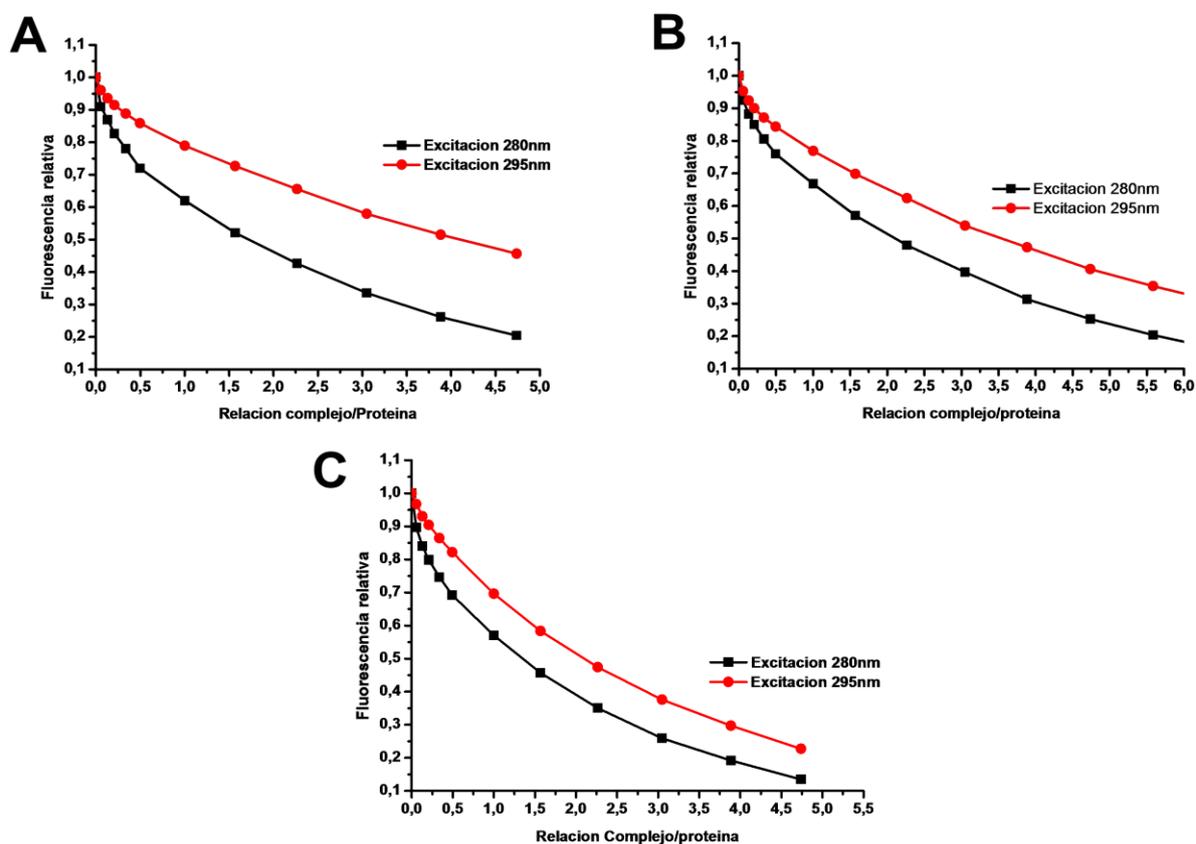


Figura 5.10 Representaciones de las intensidades relativas para los sistemas **(A)** BSA-Cr(5Cl-phen)₃³⁺ (metilo) **(B)** BSA-Cr(5Me-phen)₃³⁺ (cloro) y **(C)** BSA-Cr(5Ph-phen)₃³⁺ (fenilo) excitando a 280nm (negro) y a 295nm (rojo).

Tabla 5.3 Valores de las constantes de asociación para los sistema BSA-Cr(5Me-phen)₃³⁺ (metilo) BSA-Cr(5Cl-phen)₃³⁺ (cloro) y BSA-Cr(5Ph-phen)₃³⁺ (fenilo) a diferentes temperaturas.

Temperatura (K)	Fenilo (x10 ⁵)	Cloro (x10 ⁵)	Metilo (x10 ⁵)
300,3	1,64	3,33	5,92
303,0	-	-	9,57
304,0	2,31	4,38	-
308,6	4,00	6,64	15,9

5.5.2.2 Parámetros termodinámicos y naturaleza de las fuerzas de interacción

En la Figura 5.11 mostramos los gráficos de Van't Hoff para los sistemas BSA-Cr(5Me-phen)₃³⁺ (rojo), BSA-Cr(5Cl-phen)₃³⁺ (verde) y BSA-Cr(5Ph-phen)₃³⁺ (azul). De los mismos se desprenden los valores de los parámetros termodinámicos, que se encuentran informados en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4 Parámetros termodinámicos para los sistemas BSA-Cr(5Me-phen)₃³⁺ (metilo) BSA-Cr(5Cl-phen)₃³⁺ (cloro) y BSA-Cr(5Ph-phen)₃³⁺ (fenilo). Valores de ΔG determinados a 298 K.

Complejo	ΔG (KJ/mol)	ΔS (J/mol.K)	ΔH (KJ/mol)
Fenilo	-29,1	364	79,3
Metilo	-32,1	418	92,5
Cloro	-31,0	313	62,3

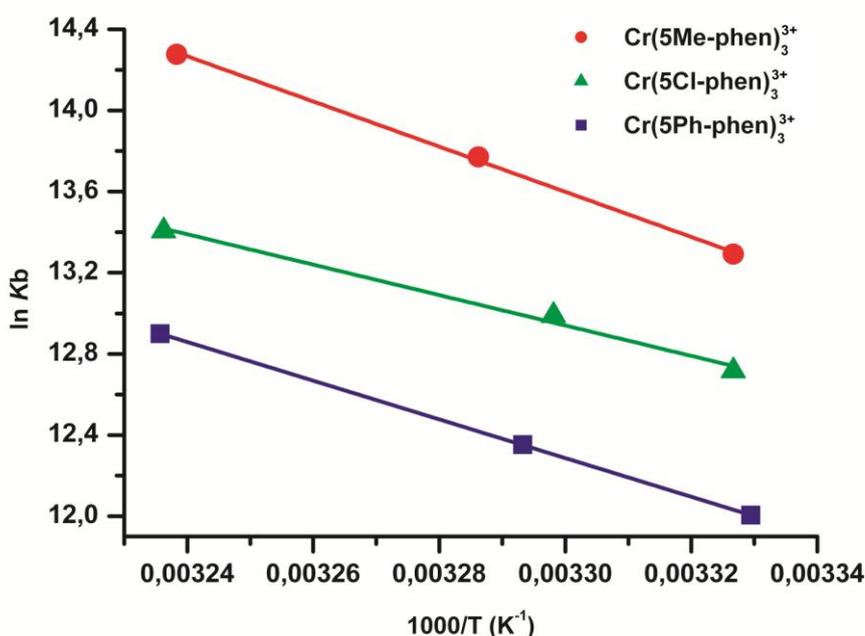


Figura 5.11 Gráficos de Van't Hoff para los sistemas BSA-Cr(5Me-phen)₃³⁺ (rojo), BSA-Cr(5Cl-phen)₃³⁺ (verde) y BSA-Cr(5Ph-phen)₃³⁺ (azul).

De los datos informados en la Tabla 5.4 podemos inferir que los procesos de asociación para los tres complejos con la BSA son espontáneos, ya que los valores de cambio de energía libre de Gibbs son negativos. Al igual que para el sistema HSA-Cr(5Me-phen)₃³⁺, los valores de ΔS y ΔH indican que los procesos de asociación de los complejos a la BSA, presentan una principal contribución entrópica.

En función de los resultados, y analizando los mismos con el modelo de Ross y Subramanian (ver capítulo 4), se puede inferir que el tipo de interacción que pondera más en el proceso de asociación, para todos los sistemas estudiados, es de tipo hidrofóbica. De todos modos, dada la carga del complejo metálico y los valores pequeños de ΔH , no podemos descartar la presencia de interacciones de tipo electrostática. Este tipo de interacciones también se observaron anteriormente para complejos de la misma familia de Cr(III) con albúmina.

5.5.2.3 Estudios de Transferencia de Iones entre dos soluciones de electrolitos no miscibles (ITIES)

Los estudios de ITIES nos dan información acerca del potencial que necesitamos aplicarle a un sistema para transferirlo de un medio a otro. De este modo podemos inferir la afinidad que tiene una molécula por tal o cual fase. En nuestro caso, estudiamos el voltaje necesario para transferir los complejos de Cr(III) de la fase acuosa a la fase orgánica.

Como podemos observar en la Figura 5.12 haciendo un barrido de potenciales entre 0,8V y 0,1V observamos el siguiente orden de Hidrofobicidad creciente:



Este orden de Hidrofobicidad coincide con el orden de espontaneidad para el proceso de asociación de los complejos a la BSA. Mientras más hidrofóbico es el complejo, mayor es su cambio de energía libre de Gibbs para el proceso

de asociación, por lo que podríamos, en este sentido, respaldar que el tipo de interacción, entre el complejo y la BSA, sea principalmente hidrofóbica.

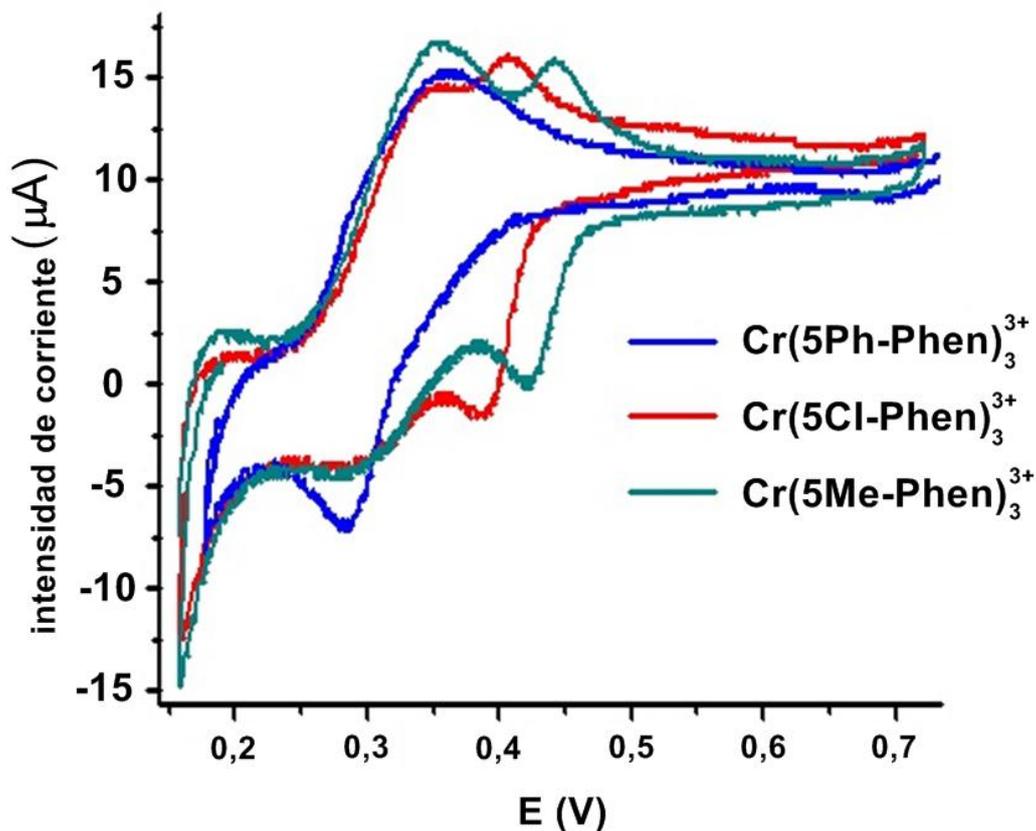
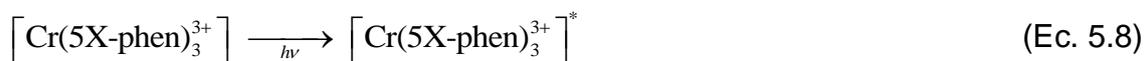


Figura 5.12 Voltamperogramas para el $\text{Cr}(5\text{Me-phen})_3^{3+}$, $\text{Cr}(5\text{Cl-phen})_3^{3+}$ y $\text{Cr}(5\text{Ph-phen})_3^{3+}$.
Velocidad de barrido: 25mV/s

5.5.2.4 Estudios resueltos en el tiempo

De igual modo se llevaron a cabo experimentos resueltos en el tiempo con los complejos $\text{Cr}(5\text{Mephen})_3^{3+}$, $\text{Cr}(5\text{Clphen})_3^{3+}$ y $\text{Cr}(\text{Phphen})_3^{3+}$ y la albúmina sérica bovina (BSA) tal como se indica en el siguiente esquema (Ec 5.8 y ec. 5.9):



donde X es el sustituyente metilo, fenilo o cloro, según el experimento.

Luego se calcularon todas las constantes de desactivación (Tabla 5.5) del estado excitado a partir de la representación de Stern-Volmer (Figura 5.13).

Tabla 5.5 M , K_{sv} y k_q para los sistemas BSA-Cr(5Me-phen) $_3^{3+}$, BSA-Cr(5Cl-phen) $_3^{3+}$ y BSA-Cr(5Ph-phen) $_3^{3+}$.

Complejo	Proteína	K_{sv}	$k_q(s^{-1})$	Regresión Lineal
Cr(5Cl-phen) $_3^{3+}$	BSA	5764,54	$1,15 \times 10^8$	0,99500
Cr(5Me-phen) $_3^{3+}$	BSA	25184,48	$4,54 \times 10^8$	0,99750
Cr(5Ph-phen) $_3^{3+}$	BSA	5764,54	$1,40 \times 10^8$	0,99936

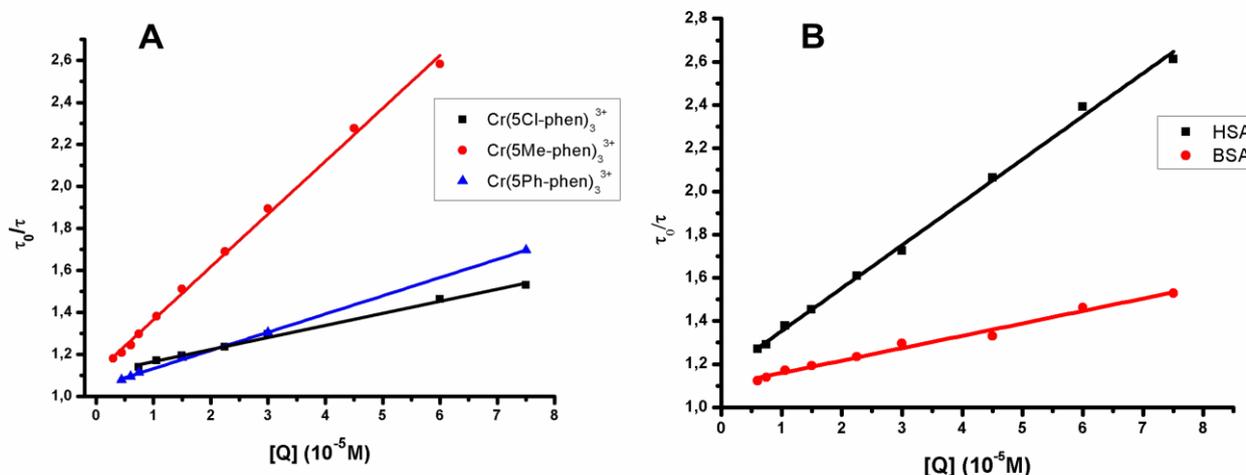


Figura 5.13 A) Gráficas de Stern Volmer (resueltas en el tiempo) para los sistemas Cr(5Me-phen) $_3^{3+}$ -BSA, Cr(5Cl-phen) $_3^{3+}$ -BSA y Cr(5Ph-phen) $_3^{3+}$ -BSA. **B)** Gráficas de Stern Volmer (resueltas en el tiempo) para los sistemas Cr(5Cl-phen) $_3^{3+}$ -HSA (negro y en presencia de HSA (negro) y Cr(5Cl-phen) $_3^{3+}$ -BSA (rojo).

Se pudo observar (Figura 5.13 A) que el *quenching* de fluorescencia de los complejos por la BSA fue mayor para Cr(5Me-phen) $_3^{3+}$ que para Cr(5Ph-phen) $_3^{3+}$ y éste último fue a su vez mayor que el *quenching* observado para el Cr(5Cl-phen) $_3^{3+}$.

Analizando la Figura 5.13 B se pudo determinar que los agregados de HSA al complejo $\text{Cr}(\text{5Cl-phen})_3^{3+}$ provocaron un fenómeno de quenching mayor que agregados equivalentes de BSA al mismo complejo. Esto nos indica que, a pesar de la homología entre ambas proteínas, existen diferencias intrínsecas a estas albúminas que imposibilitan que la desactivación de la emisión del complejo sea similar.

5.5.2.5 Transferencia de energía entre la BSA y los complejos metálicos

La transferencia de energía de una especie en su estado excitado a otra, y su estudio a través de la superposición de espectros, nos da una idea de la distancia promedio entre los fluoróforos presentes en la proteína y el *quencher*. En las Tablas 5.6 y 5.7 podemos observar los valores de Eficiencia de Energía (E), el radio crítico de Förster (R_0) y la distancia promedio entre el *quencher* y los fluoróforos de la proteína (r) para dos longitudes de excitación diferentes, 280nm y 295nm respectivamente. Las diferencias entre excitar a 280nm y 295nm generan que los valores informados sean distancias promedio a los fluoróforos considerando la excitación de los residuos tirosina (280nm) y no considerándolos (295nm)

Como podemos observar, al excitar a 280nm, las r son similares para los tres complejos estudiados pero es mayor para el complejo que posee el grupo fenilo. Esto puede deberse a que el impedimento estérico que aportan los grupos fenilos, hace que el complejo se ubique a una distancia promedio mayor de los fluoróforos. Este efecto también se observa cuando excitamos a 295nm.

Debido a que la distancia promedio entre el dador y el receptor es $r < 10\text{nm}$ podemos considerar que la transferencia de energía ocurre con una muy alta probabilidad.

Tabla 5.6 Parámetros de transferencia energética para los sistemas BSA-Cr(5Me-phen)₃³⁺ (metilo), BSA-Cr(5Cl-phen)₃³⁺ (cloro), y BSA-Cr(5Ph-phen)₃³⁺ (fenilo) excitando a 280nm.

	Fenilo	Metilo	Cloro
E	0,430	0,333	0,380
Ro (nm)	2,88	2,62	2,42
r (nm)	3,01	2,94	2,63

Tabla 5.7 Parámetros de transferencia energética para los sistemas BSA-Cr(5Me-phen)₃³⁺ (metilo), BSA-Cr(5Cl-phen)₃³⁺ (cloro), y BSA-Cr(5Ph-phen)₃³⁺ (fenilo), excitando a 295nm.

	Fenilo	Metilo	Cloro
E	0,304	0,231	0,211
Ro (nm)	2,87	2,61	2,41
r (nm)	3,29	3,19	3,00

5.6 Conclusiones parciales

Analizando los resultados de manera global, y a la luz de estudios previos con complejos de Cr(III) similares, podemos inferir que la familia de los complejos fenantrolínicos de Cr(III) posee una fuerte interacción con la HSA y la BSA; siendo sus K_b del orden de $\sim 10^5$. En este sentido, los complejos podrían ser transportados por estas albúminas a través del plasma sanguíneo.

Los estudios conformacionales nos muestran que la HSA no sufre cambios en su estructura secundaria, lo que permite que la proteína no pierda su funcionalidad. Estos resultados son similares a los realizados con HSA y BSA y complejos de Cr(III) de la misma familia.²⁶

El tipo de interacción presente en los sistemas complejo-proteína estudiados es de tipo hidrofóbico, pero no podemos descartar que la carga positiva (+3) del complejo no sea un factor importante en el proceso de asociación. Este fenómeno se observa, y se ha observado, para todos los complejos estudiados y su interacción con albúminas.

El uso de una técnica electroquímica de interfase nos da información que nos sirve para respaldar el tipo de interacción presente entre las albúminas y los complejos.

5.7 Referencias

-
- ¹ He X. M.; Carter D. C.; *Nature*, 358 (1992) 209.
- ² Carter D. C.; Chang B.; Ho J. X.; Keeling K.; Krishnasami Z.; *Eur. J. Biochem.*, 226 (1994) 1049.
- ³ Olson R. E.; Christ D.D.; *Ann. Rep. Med. Chem.*, 31 (1996) 327.
- ⁴ Hu Y. J.; Liu Y.; Shen X. S.; Fang X. Y.; Qu S. S.; *J. Mol. Struct.*,738 (2005) 143.
- ⁵ Hu Y. J.; Liu Y.; Wang J. B.; Xiao X. H.; Qu S. S.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 36 (2004) 915.
- ⁶ Guharay J.; Sengupta B.; Sengupta P. K.; *Proteins*, 43 (2001) 75.
- ⁷ Dockal, M.; Carter, D. C.; Ruker, F. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 29303
- ⁸ Sugio, S.; Kashima, A.; Mochizuki, S.; Noda, M.; Kobayashi, K. *Protein Eng.* 12 (1999) 439.
- ⁹ Ewaskiewicz, J. I.; Devlin, T. M.; Ch'ih, J. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179 (1991) 1095
- ¹⁰ Kragh-Hansen, U.; Chuang, V. T. G.; Otagiri, M. *Biol. Pharm. Bull.* 25 (2002) 695.
- ¹¹ Drmanovic, Z.; Voyatzi, S.; Kouretas, D.; Sahpazidou, D.; Papageorgiou, A.; Antonoglou, O. *Anticancer Res.* 1 (1999), 4113.
- ¹² Ikeda, T. *Proceedings of the International Symposium on Serum Albumin and a1-Acid Glycoprotein*; ed. by Otagiri, M., Sugiyama, Y., Testa, B., Tillement, J. P.: Kumamoto, Japan, 2001.
- ¹³ Dubois-Presle, N.; Lopicque, F.; Maurice, M.-H.; Fournel-Gigleux, S.; Magdalou, J.; Abiteboul, M.; Siest, G.; Netter, P. *Mol. Pharmacol.* 47 (1995) 647
- ¹⁴ Georges, H.; Presle, N.; Buronfosse, T.; Fournel-Gigleux, S.; Netter, P.; Magdalou, J.; Lopicque, F. *Chirality* 12 (2000) 53
- ¹⁵ Peters, T.; *Biochemistry, Genetics and Medical Applications*; Academic Press: New York, (1995)

-
- ¹⁶ Hirayama, K.; Akashi, S.; Furuya, M.; Fukuhara, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173 (1990) 639.
- ¹⁷ Sudlow, G.; Birkett, D. J.; Wade, D. N. *Mol. Pharmacol.* 12 (1976) 1052.
- ¹⁸ He, X. M.; Carter, D. C. *Nature* 358 (1992) 209.
- ¹⁹ Lopicque, F.; Muller, N.; Payan, E.; Dubois, N.; Netter, P. *Clin. Pharmacokinet.* 1993, 25, 115.
- ²⁰ Sakharov D.V.; Bunschoten A.; Van Weelden H, Wirtz KW. *Eur J Biochem.* 270(24) (2003) 4859-65.
- ²¹ Fuoco D.; *Adv in Toxicol* 2015 (2015) 10.
- ²² B.R. Baker, B.D. Mehta, *Inorg. Chem.*, 4 (1965) 848
- ²³ N. Serpone, M.A. Jamieson, M.S. Henry, M.Z. Hoffman, F. Bolletta, M. Maestri, *J. Am. Chem. Soc.*, 101 (1979) 2907
- ²⁴ D. Pagliero, G.A. Argüello, E.H. Staricco, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 115 (1998) 199.
- ²⁵ Bhattacharyya J.; Bhattacharyya M.; Chakrabarty A.; Chaudhur U.; Poddar R. K.; *Biochem. Pharmacol.*, 47 (1994) 2049.
- ²⁶ Toneatto J.; Argüello G. *J. Inorg. Biochem.* 105 (2011) 645–651

***Estudios de interacción entre el
 $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ y medios biológicos***

Capítulo 6

6.1 Resumen

El presente capítulo es un primer estudio sobre las interacciones entre el $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ con líneas celulares en cultivo, en presencia y ausencia de luz. Se realizaron estudios de citotoxicidad, tanto del estado basal como del estado excitado. A su vez se realizaron estudios de genotoxicidad, evaluaciones de la morfología del núcleo, y se realizaron unos primeros ensayos para proponer un posible mecanismo de muerte celular, utilizando la técnica de citometría de flujo.

6.2 Introducción

6.2.1 Uso de los fotosensibilizadores en PDT

Como ya mencionamos en el Capítulo 1, durante muchos años ha sido un requisito indispensable la presencia de oxígeno molecular para generar efecto tóxico a nivel celular. Sin embargo, ha crecido el estudio por un nuevo tipo de fotosensibilizadores con capacidad fototóxica directa sobre los sustratos esenciales para el desarrollo de la vida celular. En este sentido la presencia de O₂ no sería esencial para la terapia fotodinámica.¹

Comercialmente el fotosensibilizador por excelencia es el PhotoFrin® o porfímero sódico, que ha sido aprobado para ser usado en numerosas enfermedades:^{2,3,4}

- Cáncer de piel (carcinoma basocelular o espinocelular)
- Enfermedad de Bowen
- Cáncer de esófago y esófago de Barrett^a
- Cáncer de pulmón

Cabe aclarar que en la mayoría de los casos se utiliza la PDT asociada a otro tipo de tratamientos como la quimioterapia, radiación, o cirugía.

La principal limitación que tiene el tratamiento fotodinámico es que la luz (necesaria para activar al fotosensibilizador) no puede penetrar los tejidos por más de 1cm. Por tal motivo, se utiliza para el tratamiento de enfermedades localizadas en la superficie de un tejido para que la luz sea de fácil acceso a la lesión.⁵

^a Enfermedad precancerosa que puede desencadenar en cáncer de esófago.

Un tipo de PDT, que está cobrando impulso en los últimos años es el de la fotoféresis extracorpórea. En este procedimiento un aparato recoge las células sanguíneas del paciente, las trata con una sustancia fotosensibilizadora y luz, y luego las reingresa al organismo. Se están realizando estudios para una posible aplicación de este tratamiento en distintos tipos de leucemias y también para ayudar a reducir las posibilidades de rechazo de órganos luego de trasplantes.^{6,7,8,9,10,11}

6.2.2 Antecedentes de los complejos de Cr(III) como fotosensibilizadores para la PDT

Poco se sabe acerca de la fototoxicidad de los complejos de Cr(III) en cultivos celulares. Existen numerosos trabajos sobre la toxicidad de los estados fundamentales de los complejos de Cr(III) sobre células, pero es aún muy poca la información sobre el efecto tóxico de los estados excitados.

Los estudios de Toneatto et al. mostraron como el estado excitado de los complejos de Cr(III), y en particular con un ligando intercalador *cuchillo* (dppz), pueden oxidar hebras de ADN. Estos estudios^{12,13,14}, en particular, exhibieron:

- Los complejos metálicos de Cr(III) tienen la capacidad de oxidar Guanina a través de un proceso directo entre el complejo y la base.
- El $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ se asocia sobre las hebras de ADN a través de un mecanismo diferente al del $\text{Cr}(\text{phen})_2(\text{dppz})^{3+}$, siendo el primero a través de un mecanismo superficial, y el segundo, a través de un proceso intercalante.
- El mecanismo de fotooxidación más favorecido es el Tipo I (directo) en relación al de la formación de oxígeno *singlete* (Tipo II).

- Estudios fotodinámicos en ADN plasmídico, demostraron que se genera foto-daño a nivel bacteriano.

Todos estos estudios previos, hacen suponer que los complejos metálicos de Cr(III) son buenos candidatos a ser considerados para la terapia fotodinámica. En ese sentido aparece la necesidad de estudiar qué ocurre con este tratamiento en sistemas más complejos como son los cultivos celulares de mamíferos.

6.3 Motivación y objetivos

El presente capítulo busca indagar sobre la toxicidad, genotoxicidad, y fototoxicidad del $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ en cultivos celulares. Luego de numerosos trabajos donde se demuestra la capacidad oxidante del estado excitado de los complejos de Cr(III) frente a proteínas, plásmidos, y moléculas pequeñas, nos motiva realizar un primer estudio sobre lo que ocurre en sistemas biológicos mas complejos.

6.4 Materiales y métodos

6.4.1 Líneas celulares

Durante esta tesis se utilizaron dos líneas celulares:

- CHO-K1, células epiteliales de ovario de hámster chino (*Cricetulus griseus*).
- MDA-MB-231, células de adenocarcinoma de mama humanas.

6.4.2 Mantenimiento de las líneas celulares

Las líneas celulares fueron mantenidas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, y con el agregado de Glutamina al 1% y Penicilina 100 U/mL y Estreptomicina 100 µg/mL

Las células fueron mantenidas en placas plásticas estériles de Petri de 10 cm de diámetro y repicadas cada 3-4 días utilizando tripsina 0,25%, para evitar que las células lleguen a confluencia. Se mantuvieron en estufas a 37°C y 5% de CO₂. Los experimentos y repiques celulares fueron llevados a cabo en total esterilidad, en campanas de flujo laminar tipo II. Los *stocks* de células se mantuvieron congelados en nitrógeno líquido en medio de congelación, constituido por DMSO al 10% en SFB.

6.4.3 Ensayos de viabilidad celular

A los fines de evaluar el efecto tóxico de nuestro tratamiento sobre las líneas celulares se utilizó el ensayo de MTT. Ante la presencia de una célula

viable, se genera un precipitado de sal de formazán, que luego al redisolverse en DMSO genera una solución coloreada cuya absorbancia se mide espectrofotométricamente. A mayor medida de absorbancia, mayor es la cantidad de células viables^b. Se trabajó con la línea celular tumoral MDA-MB-231, a distintos tiempos de fotólisis, distintas concentraciones de complejo metálico, y en presencia o ausencia de Transferrina. De este modo, podemos entender cómo la presencia de complejo en su estado fundamental y en su estado excitado pueden afectar la viabilidad celular. Por otro lado, utilizamos la Transferrina para evaluar si puede servir como una proteína transportadora (*carrier*) del complejo al interior celular.

Para la fotólisis se diseñó un sistema de LEDs que pudiera fotolizar de manera homogénea una placa de 96 *wells*. Dichos LEDs de luz blanca emiten un amplio espectro del visible, que incluye el espectro de absorbancia de los complejos de Cr(III).

6.4.4 Tinción nuclear

Se evaluó si la presencia de complejo, en su estado fundamental y excitado, modificaba la morfología nuclear de células de MDA-MB-231 mediante la tinción con un colorante nucleotrópico como el Hoestch 33258.

A tal fin se dejaron crecer las células a confluencia sobre vidrios cubreobjetos dispuestos en placas de Petri de 10 cm de diámetro. Luego de tratar las células con $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ a una concentración fija de $50\mu\text{M}$ durante dos horas, se irradiaron las muestras durante 30 minutos.

6.4.5 Ensayo COMETA

Este método se realizó para evaluar la genotoxicidad de los complejos de Cr(III). El ensayo COMETA se llevó a cabo en trabajo conjunto con la Dra. Miriam Virgolini del Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias

^b Para mayor información, la técnica se encuentra descrita en el capítulo “Materiales y métodos experimentales”.

Químicas de la UNC. Se utilizó la línea celular CHO-K1, a dos tiempos de exposición (2 hs y 18hs) a una concentración fija de 50 μ M del complejo.

El ensayo de Cometa requiere de la preparación de vidrios porta objetos con tres capas diferentes de agarosa, descritas del siguiente modo, y ordenadas de abajo hacia arriba (Figura 6.1):

- 500 μ L de Agarosa Punto de Fusión Normal (APFN) 1%. APFN.
- 100 μ L de Agarosa Bajo Punto de Fusión (ABPF) 0,5%, en presencia de 10 μ L de muestra a una concentración de 1x10⁶ células/mL, para asegurar un sembrado de 1x10⁴ células en la capa de agarosa.
- 200 μ L de ABPF 1%.

Para asegurar una buena adherencia de la agarosa al vidrio, y evitar que se despeguen durante la corrida, se lavaron los portaobjetos y los cubreobjetos numerosas veces con detergente y agua, y luego se dejaron sumergidos en Ácido nítrico concentrado. Esto asegura la oxidación total de cualquier componente que se encuentre sobre la superficie del vidrio.

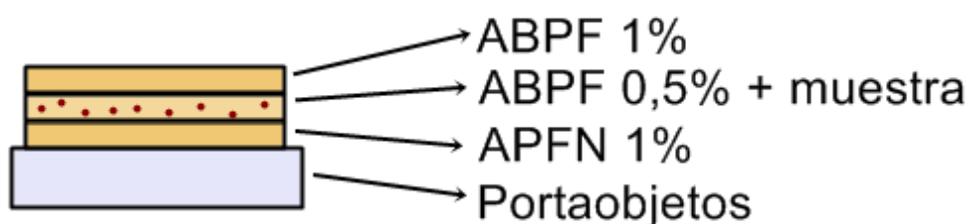


Figura 6.1 Esquema del soporte de geles de agarosa para el ensayo cometa.

Luego de sembrar la muestra, se procedió a sumergir las muestras cuidadosamente en buffer de lisis (2,5M de NaCl, 100mM de EDTA, 10mM de base Tris) con un 1% de Tritón X-100 y un 10% de DMSO. Se dejaron las muestras por una hora a 4°C.

Posteriormente se procedió a sumergir las muestras en la cuba de corrida electroforética horizontal, en presencia de buffer de electroforesis (10N de NaOH, y 200mM de EDTA). La corrida se realizó a una intensidad de corriente fija de 300mA y un tiempo de 20 minutos. Previo inicio de la electroforesis, las muestras se dejaron reposar en el buffer de corrida por 20 minutos para que el buffer se homogenice en todas las capas de agarosa.

Finalizada la corrida se realizaron lavados con buffer de neutralización.

Para la cuantificación se procedió a analizar la longitud de cola de los cometas, y la intensidad luminica de las colas de 100 núcleos por muestra. Para esto se utilizó el programa comercial CASP de CaspLab.

6.4.6 Citometría de flujo

Para evaluar en alguna medida el mecanismo de muerte celular, se optó por teñir células tratadas con $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ con los siguientes colorantes: 7AAD, Anexina V y TMRE. Cada uno de estos colorantes permite identificar algún tipo de daño en particular y por ende permite intentar dilucidar el tipo de mecanismo de muerte celular que genera la presencia del estado excitado del $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$

El 7AAD es un colorante llamado 7-aminoactinomicina D que tiene una alta afinidad por las zonas G y D del ADN convirtiéndolo así en un excelente marcador (Figura 6.2). La anexina V es una proteína de unos 35-36 kDa que se une específicamente a la fosfatidilserina, y puede marcarse con facilidad con varios colorantes. Durante la primera fase de la apoptosis, la fosfatidilserina se trasloca desde la cara citoplasmática de la membrana a la cara externa. El uso de este colorante se basa en este fenómeno. Ambas técnicas se utilizan de modo conjunto para lograr una distinción positiva entre células apoptóticas y necróticas.

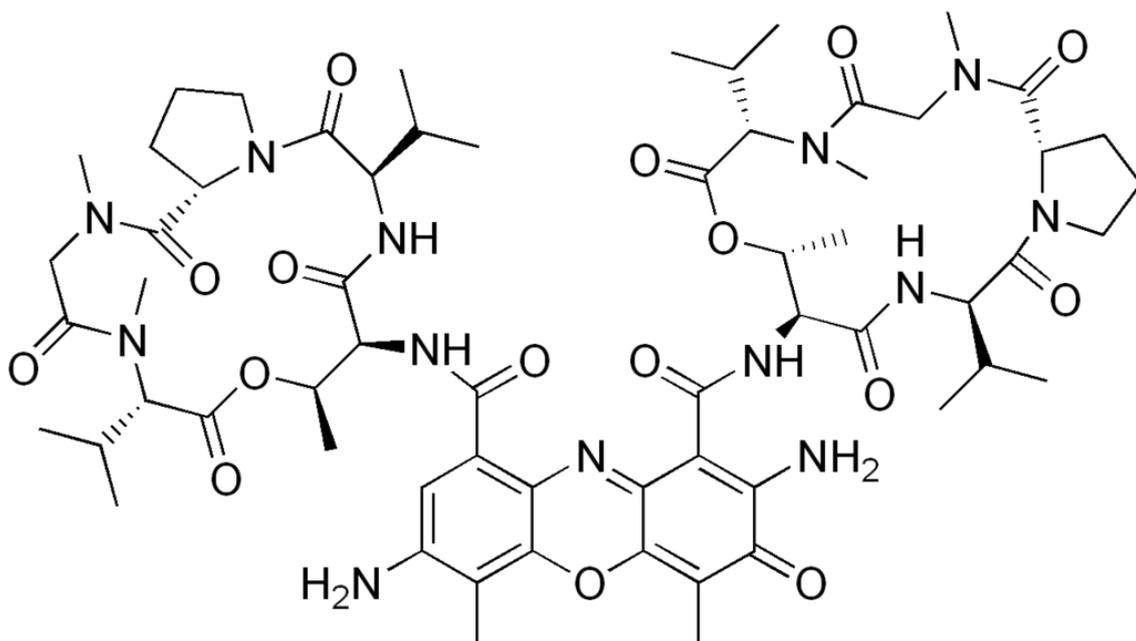


Figura 6.2 Estructura molecular del 7-aminoactinomicina D

Por otra parte se utilizó en conjunto con estos dos colorantes el TMRE (del inglés, TetraMethylRhodamine, Ethyl Ester) que nos permite observar cambios en el potencial de membrana mitocondrial. Este potencial es un parámetro de la función mitocondrial y un indicador de muerte celular. El colapso de este potencial coincide con la apertura de los poros mitocondriales, dando lugar a la liberación de citocromo C en el citosol, lo que a su vez desencadena eventos en la cascada apoptótica.

Como control positivo se utilizaron concentraciones al 10% de DMSO, mientras que como control negativo se utilizó medio de cultivo.

6.4.7 Fotólisis

El método para fotolizar los cultivos celulares se puso a punto a lo largo del desarrollo de la tesis. Inicialmente se utilizó un sistema de 5 LEDs dispuestos de manera homogénea sobre una plataforma de plástico, también se intentó realizar la fotólisis con un láser a 405nm, y por último el sistema que se

encontró más eficiente fue el de un sistema de 24 LEDs que permitía una fotólisis más homogénea y de tiempos más cortos.

6.5 Resultados y discusión

6.5.1 Efectos fotodinámicos

Se muestran y discuten los resultados del proceso fotodinámico que ocurre cuando un $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ se encuentra en medio celular. Inicialmente se discuten los procesos relacionados con la viabilidad celular y luego el proceso que ocurre a nivel nuclear.

6.5.1.1 Efectos fotodinámicos sobre la viabilidad celular

Los ensayos de MTT nos permiten graficar absorbancia en función de alguna variable a ser estudiada (tiempo de fotólisis, concentración de complejo, etc). Los valores de absorbancia guardan una relación lineal con la cantidad de células viables presentes.

La figura 6.3 muestra la relación entre la viabilidad celular y la concentración de complejo metálico. Como podemos observar a mayor concentración de $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ menor es la viabilidad celular. A su vez cuando el mismo sistema en estudio se encuentra fotolizado, observamos la misma tendencia, pero con valores de viabilidad celular menores.

Por encima de los $5\mu\text{M}$ se puede observar un efecto notable del daño tóxico del estado excitado del complejo a las células. Con anterioridad, en modelos biológicos menos complejos, se había demostrado que los estados excitados de la familia de complejos de Cr(III) tienen la capacidad de degradar ADN plasmídico y sistemas proteicos. Por este motivo es de esperar que, a nivel celular, exista un daño generado por el estado excitado doblete del $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$,

generado por cruce entre sistemas (*intersystem crossing*), luego de la excitación a un cuadruplete^c.

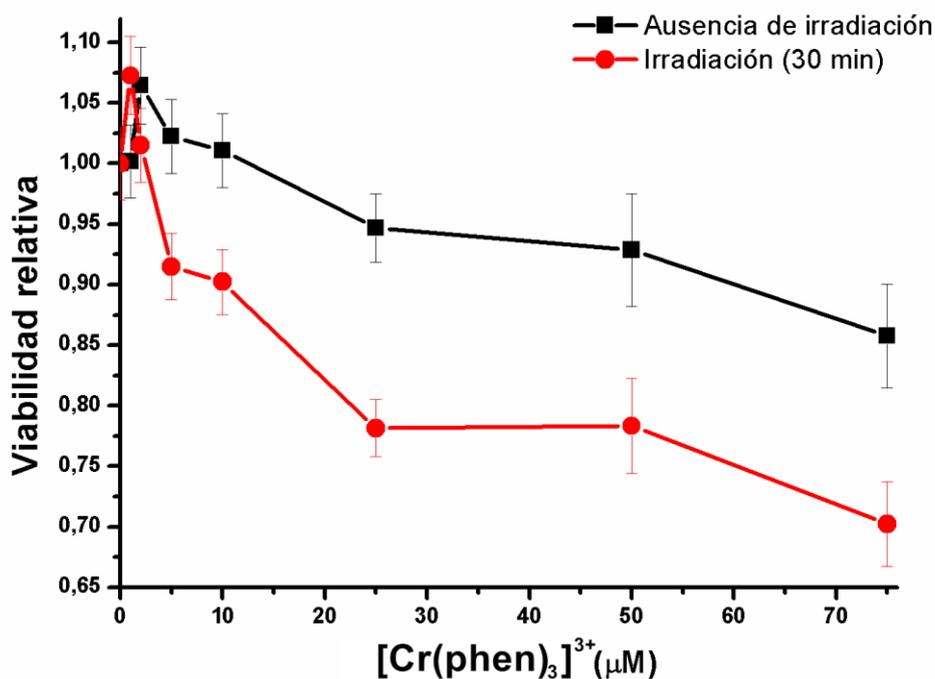


Figura 6.3 Gráficos de viabilidad relativa de la línea celular MDA-MB-231 en función de la concentración de $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ a oscuras (negro) y en presencia de irradiación (rojo). La irradiación se llevó a cabo con LED visible durante un tiempo de 30 minutos.

Por otra parte, al analizar la figura 6.4 podemos deducir que la irradiación sola, *per se*, no provoca cambios en la viabilidad celular ya que la ausencia de complejo no modifica considerablemente los valores de Absorbancia. En tanto, en presencia del complejo, se puede observar como a medida que aumenta el tiempo de irradiación, disminuye la absorbancia, valor que mide la viabilidad celular de una determinada muestra. Esto también ya se ha observado para otros fotosensibilizadores.

^c Para mayor información sobre la fotofísica de los complejos de Cr(III), referirse al capítulo 1 "Aspectos teóricos y generales"

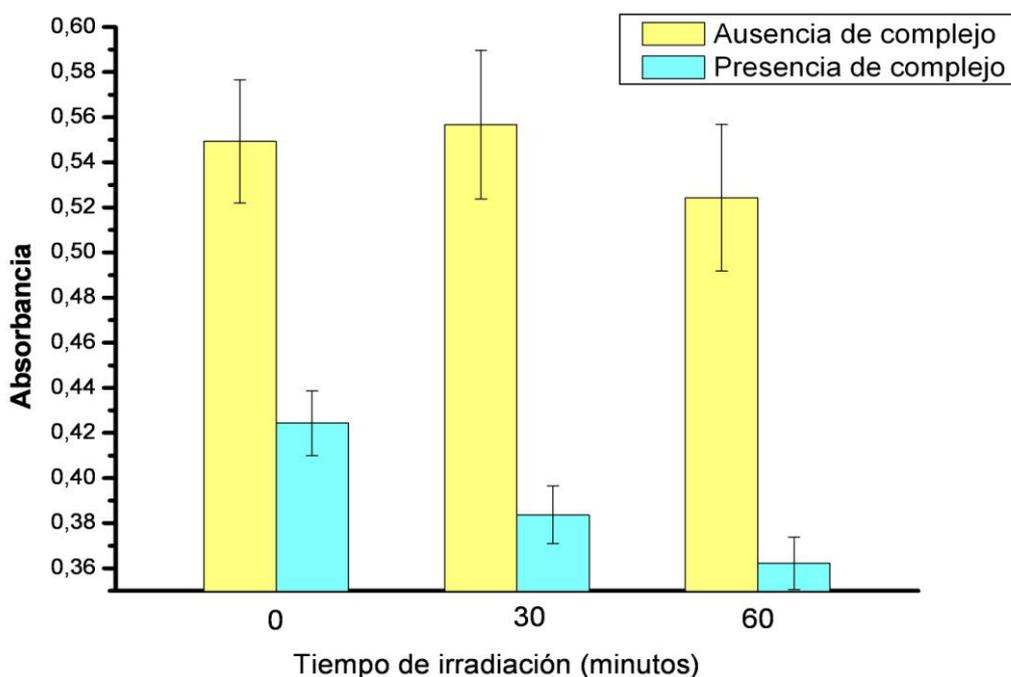


Figura 6.4 Gráficos de absorbancia (viabilidad celular) de las MDA-MB-231 en función de distintos tiempos de fotólisis. Concentración de Cr(phen)_3^{3+} fue de $50 \mu\text{M}$.

Es importante considerar que se eligió una concentración de $50\mu\text{M}$ de complejo, que a pesar de que genera daño en ausencia de luz, nos permite obtener valores de viabilidad bien variables con el tiempo de irradiación. Pensando en un tratamiento fotodinámico, lógicamente, se debieran buscar concentraciones de fotosensibilizador que en su estado basal no generen daño celular.

6.5.1.2 Efectos fotodinámicos sobre el núcleo

Entender qué ocurre con el núcleo de una célula, cuando éste es tratado con una droga en particular, es una herramienta valiosa para empezar a comprender el mecanismo de acción de la droga.

En la figura 6.5, podemos observar lo que ocurre con el núcleo cuando este se encuentra fotolizado y previamente incubado con 50 μ M de complejo de Cr(III). A su vez se muestran los controles negativos de núcleos sin complejo y en ausencia de irradiación; núcleos con complejo y en ausencia de irradiación; y núcleos sin complejo y en presencia de irradiación.

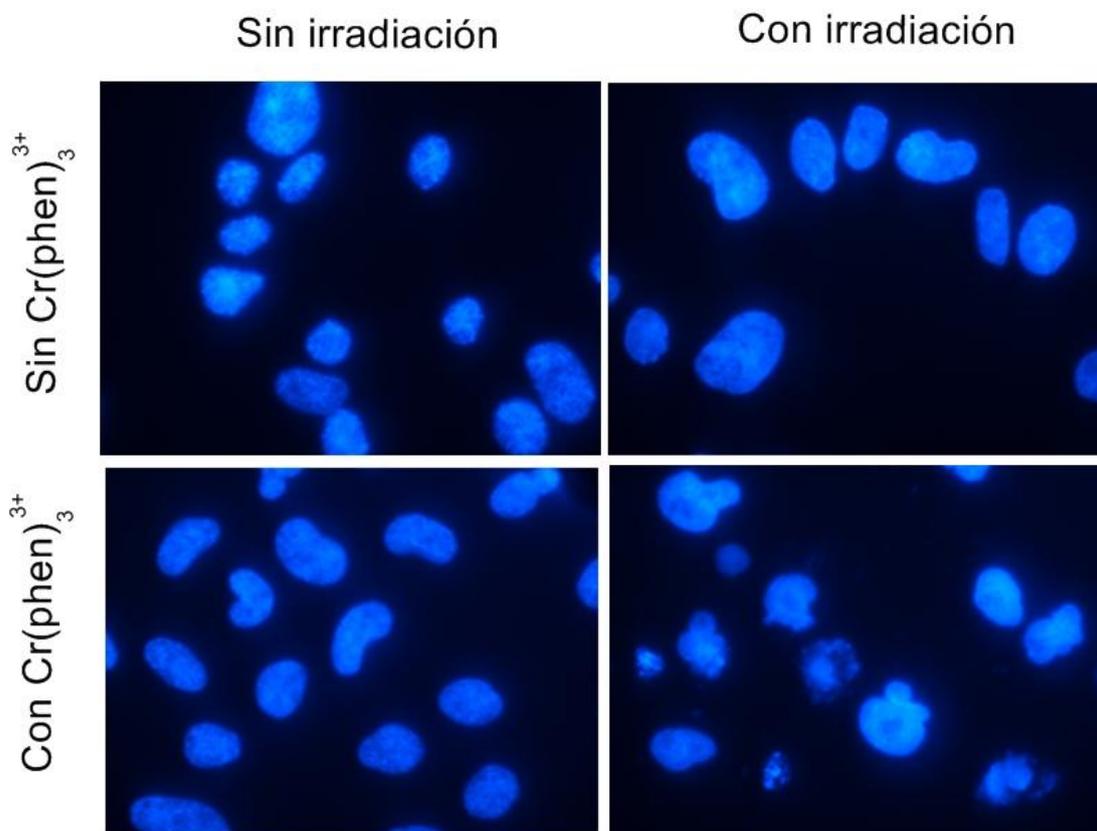


Figura 6.5 Imágenes de núcleos de células MDA-MB-231 teñidos con HOESCHT. La concentración de Cr(phen)₃³⁺ fue de 50 μ M.

Sólo aquellas células que han sido tratadas con complejo y con luz, presentan cambios en la morfología nuclear. Esto no quiere decir que nuestros complejos sean necesariamente genotóxicos, sino que por algún mecanismo, cuando ocurre la muerte celular se disparan procesos que modifican la estructura nuclear. Para indagar sobre esto, se dispusieron a hacer ensayos de genotoxicidad utilizando el ensayo COMETA.

6.5.2 Estudios genotóxicos (Ensayo COMETA)

Para determinar el daño genotóxico del $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ en CHO-K1, se determinaron dos parámetros luego de realizar el ensayo cometa. A cada núcleo, se procedió a medirle el porcentaje de ADN degradado y la distancia de la cola del cometa, ambos determinados con el programa CASP.

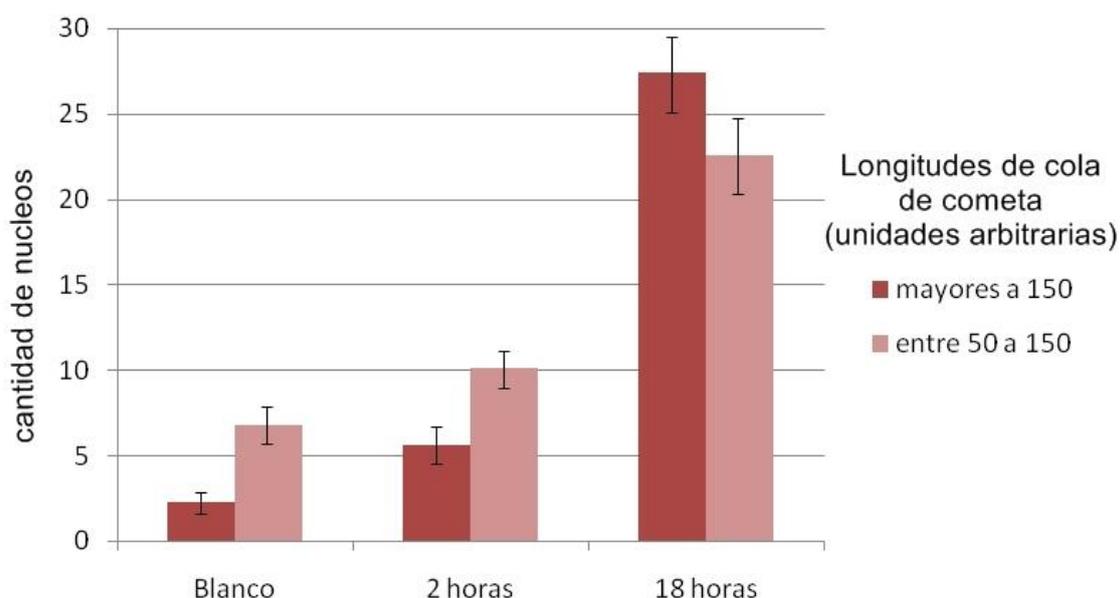


Figura 6.6 Gráficos de cantidad de núcleos dañados a diferentes tiempos de exposición a $50 \mu\text{M}$ de $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$.

Se analizaron más de 100 núcleos por muestra, a dos tiempos de exposición (2 horas y 18 horas). Como podemos observar en las figura 6.6 existe un aumento en la longitud de la cola del cometa a medida que aumenta el tiempo de exposición de las células al complejo metálico. Fragmentos pequeños tienen la particularidad de migrar a través del gel de agarosa mucho más rápido que fragmentos mayores. En este sentido, la longitud de la cola es una medida del daño nuclear puesto que, a mayor longitud de cola, mayor cantidad de fragmentos pequeños formados hay.

El aumento en la cantidad de núcleos dañados en función del tiempo de exposición, es un claro indicio de que el complejo está generando daño genotóxico. Para ello el complejo debe ser capaz de llegar a estar en contacto directo con el material genético nuclear.

A mayores tiempos de exposición existe un aumento de la cantidad de núcleos dañados con mayores longitudes (150 u.a.). Esto indica que el tipo de daño es más agresivo a medida que el sistema biológico se encuentra mas expuesto al complejo.

Otra manera de evaluar el ensayo cometa es a través del análisis del % de ADN degradado, pero observamos que el análisis de la longitud de las colas fue mucho más preciso.

6.5.3 Mecanismo de muerte celular

Determinar el tipo de mecanismo de muerte celular es un proceso complicado, pero sumamente necesario pensando en el diseño de nuevos fármacos. A través de numerosos modelos y vías moleculares propuestas podríamos clasificar los tipos de muerte celular en:

- Apoptosis (o muerte celular programada)
- Necrosis y Oncosis
- Autofagia
- Piroptosis
- Paraptosis
- Catástrofe mitótica

Cada mecanismo activa vías moleculares diferentes, que pueden ser marcadas con diferentes fluoróforos y seguidas así por citometría de flujo.

Los estudios realizados en células MDA-MB-231 no fueron concluyentes para determinar un mecanismo de muerte celular frente a un tratamiento de $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ y posterior irradiación. Sin embargo si se pudo determinar que en presencia del tratamiento no hay marcador de ANexina-V, por lo que no estaríamos en presencia de un proceso apoptótico. (Figura 6.7)

La citometría de flujo muestra histogramas con distintas poblaciones (expresadas en porcentajes) de cantidades de células marcadas con distintos fluoróforos. En la Figura 6.7 observamos dos poblaciones de células marcadas (derecha de cada gráfico) y no (izquierda de cada gráfico) con Anexina-V.

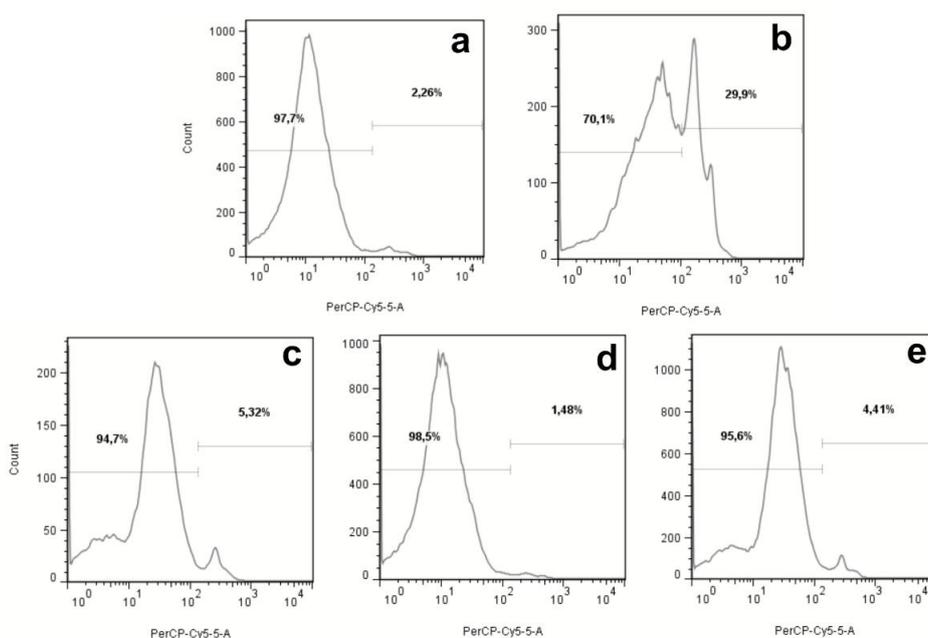


Figura 6.7 Histogramas de marcación con Anexina-V. **a.** Control negativo (RPMI). **b.** Control positivo (DMSO). **c.** Tratamiento con $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ **d.** Irradiación (30 minutos). **e.** Tratamiento $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ y posterior irradiación (30 minutos).

Como se puede observar, solo en presencia de DMSO (Figura 6.7 b) se observa la presencia de un porcentaje de células marcadas con Anexina-V (29,9%), mientras que ni en el control negativo con RPMI (Figura 6.7 a), ni en presencia de complejo metálico (Figura 6.7 c), ni en presencia de luz (Figura 6.7 d), ni en presencia de complejo en su estado excitado (Figura 6.7 e) se

observa un porcentaje de Anexina-V significativo que nos indique la presencia de un mecanismo apoptótico.

6.6 Conclusiones parciales

En el presente capítulo se exhibieron los resultados sobre la citotoxicidad y genotoxicidad del $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ en las líneas celulares MDA-MB-231 y en las CHO-K1. Es un primer reporte sobre los efectos fotodinámicos de este complejo, y a pesar de que restan numerosos experimentos por hacer, estos resultados abren un nuevo camino como línea de investigación. Existen varios trabajos que muestran la capacidad del estado excitado de dicho complejo para generar daño en ADN, sin embargo este trabajo de tesis es el primer trabajo en que se demuestra que tal efecto fototóxico puede ser trasladable a sistemas biológicos más complejos como es un cultivo celular.

Los estudios de viabilidad celular muestran que existe una disminución en la viabilidad celular cuando el sistema es irradiado a cuando el sistema permanece en ausencia de luz. En este sentido los complejos de Cr(III) se acercan más al potencial uso como fotosensibilizadores para la PDT. A pesar de que faltan numerosos ensayos para proponerlos como candidatos clínicos para el tratamiento fotodinámico, estos experimentos de viabilidad en líneas celulares son claves para continuar con el estudio de los complejos.

A su vez se observó daño en el núcleo celular, solo cuando existe tratamiento del complejo metálico en cuestión sumado a una irradiación de 30 minutos. Luego de que el estado excitado genere daño a nivel celular, se va a generar una cascada de eventos, dentro de los cuales puede encontrarse un cambio en la morfología del núcleo. Por este motivo, el hecho de que hayamos observado cambios en el núcleo, no implica necesariamente que el fotosensibilizador este actuando directamente en el.

A su vez se llevaron a cabo experiencias de viabilidad celular utilizando a la Transferrina como posible *carrier* del $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ (Para más información al respecto ver Capítulo 5). Sin embargo no se pudieron observar diferencias utilizando esta proteína como macromolécula transportadora, ya que en cultivo

celular, existes factores cinéticos que imposibilitaron realizar dicho experimento. En los estudios de Lilge et al. tampoco se pueden determinar diferencias de viabilidad celular utilizando complejos de Ru(II) con la Transferrina debido a factores cinéticos.

Los estudios COMETA demostraron que existe daño genotóxico dependiente del tiempo en líneas celulares. Es decir que el complejo tiene capacidad de interactuar con el ADN, tal como se propuso en estudios biofísicos con plásmidos.

Cabe aclarar que por más que un compuesto presente signos de genotoxicidad en líneas celulares, no indica que necesariamente en un organismo más complejo (tejido u animal), el mismo compuesto en las mismas concentraciones vaya a presentar daño genotóxico en el organismo. Esto se debe a que en sistemas más complejos, el organismo tiene posibilidad de metabolizar y eliminar el compuesto a través de diferentes vías.

A su vez, el ingreso del complejo al interior celular se ha dado a través de un proceso de permeabilidad a través de la membrana. Este mecanismo de ingreso puede variar en un organismo más complejo, donde existen proteínas u otras moléculas que pueden colaborar y favorecer el ingreso (incluso de manera selectiva) del complejo al interior celular. Una vía de ingreso diferente podría generar que el complejo se aloje en otra organela de la célula, evitando así el daño genotóxico.

Por otra parte, un profundo estudio de la genotoxicidad de los complejos de cromo (que no se abordan en la presente tesis) implicaría variar los tiempos de exposición del cultivo al complejo, las concentraciones de complejo, cotejar los resultados con otras técnicas, etc.

A pesar de no poder determinar cuál es, en profundidad, el mecanismo de muerte celular, pudimos encontrar que al no haber expresión de fosfatidilserina en la superficie celular, el mecanismo no sería un proceso común de apoptosis. Pensando en un tratamiento terapéutico, lo ideal es que el mecanismo de muerte celular sea un proceso apoptótico, para que el organismo pueda

asimilar los *restos* celulares como si fuera un proceso de muerte programado. A pesar de este resultado, existen vías de ingreso del fotofármaco al interior celular que podrían generar un mecanismo de muerte apoptótico.

6.7 Referencias

-
- ¹ C.S. Foote, *Science*, 162 (1968) 963
 - ² Dolmans D. E.; Fukumura D.; Jain R. K.; *Nature Reviews Cancer* 3(5) (2003) 380–387.
 - ³ Wilson B. C.; *Canadian Journal of Gastroenterology* 16(6) (2002) 393–396.
 - ⁴ Capella M. A.; Capella L.S.; *Journal of Biomedical Science* 10(4) (2003) 361–366.
 - ⁵ Vrouenraets M. B.; Visser G. W.; Snow G.B.; Van Dongen G. A.; *Anticancer Research* 23(1B) (2003) 505–522.
 - ⁶ Pérez-Carmona L.; Harto-Castaño A.; Díez-Recio E.; Jaén-Olasolo P.; *Actas Dermosifiliogr.* 100 (2009) 459-71
 - ⁷ Oliven A.; Shechter Y.; *Blood Rev* 15 (2001) 103-8.
 - ⁸ Edelson R.; *N Engl J Med.* 316 (1987) 297-303.
 - ⁹ Knobler R.; *Vox Sang* 78 (Supl. 2) (2000) 197-201.
 - ¹⁰ Perotti C.; Torretta L.; Viarengo G.; *Haematologica* 84 (1999) 237-41.
 - ¹¹ Schooneman F.; *Transfus Apheresis Sci.* 28 (2003) 51-61
 - ¹² Toneatto J.; Boero R. A.; Lorenzatti G.; Cabanillas A. M.; Argüello G. A.; *J. Inorg. Biochem.* 104 (2010) 697-703.
 - ¹³ Toneatto J.; Lorenzatti G.; Cabanillas A. M.; Argüello G. A.; *J. Inorg. Biochem.* 15 (2012) 43-46.
 - ¹⁴ Toneatto J.; Argüello G. A.; *J. Inorg. Biochem.* 105 (2011) 645-651.



Conclusiones generales

7.1 Resumen

A modo de cierre general de la presente tesis en el siguiente capítulo se presentan las conclusiones más relevantes de la tesis. A su vez se presentan brevemente, propuestas de lineamientos a futuro que pudieran derivar de la presente tesis.

7.2 Conclusiones generales

A modo de consideración final, se han presentado en esta presente tesis estudios fotoquímicos y biofísicos de los complejos de Cr(III), identificando su estado basal de su estado excitado doblete ($^2T_1/{}^2E$). A lo largo de dos capítulos se estudia la interacción de estos complejos metálicos de Cr(III) con proteínas de transporte, estudiando en un primer caso un transporte específico (Transferrina) y en un segundo caso, un transporte inespecífico (BSA y HSA). A su vez se estudió la capacidad foto-oxidativa de los complejos metálicos para oxidar proteínas.

En un siguiente paso se estudió un sistema más complejo (cultivo celular) en presencia de distintas concentraciones de $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$. Estos estudios se llevaron a cabo tanto estudiando el estado basal, como el estado excitado del complejo.

Por último se, en el marco de un estudio fisicoquímico, se analizaron sistemas coloidales de nanopartículas a los fines de sintetizar potenciales agregados estables de tamaño nanométrico que pudieran servir como agentes fototérmicos capaces de ser eficaces en tratamientos o diagnósticos neoplásicos.

Sobre la base de lo expuesto en el desarrollo de la presente tesis, se puede concluir:

El $\text{Cr}(\text{phen})_3^{3+}$ podría ser transportado al interior de una célula tumoral de manera específica a través de la Transferrina, debido a los resultados biofísicos presentados en la presente tesis.

Los complejos de Cr(III) podrían ser transportados por la BSA y la HSA de manera inespecífica. El sustituyente presente en la fenantrolina no modifica exacerbadamente las constantes de asociación, entendiendo así que el proceso se encuentra gobernado, en parte, por una componente electrostática debido a la carga +3 de los complejos.

El estado excitado de los complejos de Cr(III) tiene la capacidad de generar daño oxidativo en las estructuras proteicas.

El estado excitado del Cr(phen)_3^{3+} tiene la capacidad de generar daño celular, disminuyendo la viabilidad de un cultivo celular. A pesar de que no se elucidó el mecanismo de muerte celular se demostró que el núcleo sufre daño solo en presencia de complejo y de luz, y que el mecanismo de muerte no es un proceso de apoptosis simple.

Por último, los complejos de Ru(II) tienen la capacidad de generar nanoagregados pequeños estables. A estadios largos se forman nanoestructuras largas en forma de cadenas. La emisión de los complejos se ve afectada en presencia de nanopartículas de oro. La formación de estos nanoagregados estables puede ser un puntapié inicial al diseño de nuevas estructuras con un potencial importante en el área de los estudios fototérmicos.

Es claro que aún restan numerosos estudios para considerar a los complejos de Cr(III) como potenciales agentes fotosensibilizadores en la PDT, sin embargo consideramos que los resultados arrojados por la presente tesis son una herramienta clave e importante que contribuye al desarrollo de esta novedosa terapia anti-neoplásica.

7.3 Lineamientos a futuro derivados de la presente tesis

Por todo lo antedicho, la tesis presentada abre nuevos caminos considerando el diagnóstico y la terapia contra lesiones neoplásicas. Entre estos, podemos mencionar:

- Diseño de nanosistemas optoacústicos (agregados metálicos estables) capaces de amplificar señales sonoras, para el diagnóstico de neoplasias, utilizando microscopía optoacústica.
- Utilización de la Transferrina en estudios *in vivo* para evaluar la efectividad del uso de esta proteína como un agente transportador específico a células tumorales.
- Estudio de la familia completa de complejos de Cr(III) a los fines de elucidar si el sustituyente tiene algún efecto positivo sobre el proceso fotodinámico.

Anexos

Publicaciones derivadas de la presente tesis

- Toneatto J., Garcia P.F., Argüello G.A “Advances on the interaction of polypyridyl Cr(III) complexes with transporting proteins and its potential relevance in photodynamic therapy” *J. Inorg. Biochem.*, 105, 10 (2011) 1299-1305.
- Pablo F. Garcia, Judith Toneatto, J. Silvero, Gerardo A. Argüello “Binding of [Cr(phen)₃]³⁺ to Transferrin at extracellular and endosomal pHs: Potential application in Photodynamic Therapy”. *BBA-General Subjects*, 1840, 9, (2014) 2695-2701
- Pablo F. Garcia, Alejandra Velo, Consuelo Coronel, Rivas Julieta, Mabel Yudi, Gerardo A. Argüello. “Interaction of a family of polypyridyl Cr(III) complexes with Bovine Serum Albumin”. *En redacción.* (2016)
- Pablo F. Garcia, Alejandra Velo, Candelaria Llorens, Ana Cabanillas, Gerardo Argüello. “Degradation Studies of Human Serum Albumine in presence of diimine Cr(5Cl-phenanthroline)₃³⁺”. *En redacción* (2016)

Trabajos en colaboración

- María J Silvero, Walter J Pelaez, Pablo F Garcia and Gerardo A. Argüello. “Fast synthesis of Tris(N,N-diimine)chromium(III) complex by a microwave-assisted approach”. Publicado. MS ID 7907135881077777 Chemistry Central Journal.
- Hernando Hector, Pablo F. Garcia, Fabricio Ragone, Gustavo Ruiz, Gerardo Argüello and Ezequiel Wolcan. “Characterization of the association process between [ClRe(CO)₃(BCS)]⁻² complex and Bovine and Human Serum Albumin” En redacción. (2015)
- Fabricio Ragone; Hector Martinez, Pablo F. Garcia, Ezequiel Wolcan; Gerardo A. Argüello; Gustavo Ruiz; “On the Interaction between a Water-Soluble (Pterin)rhenium(I) Complex and Serum Albumins” *Inorg. Biochem.* Enviado. (2016)

Actividades de Extensión y Articulación

- Organizador de las Jornadas “¿Estudiar Química?” para alumnos del polimodal. Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba. Año 2010. (Resolución en trámite)
- Colaborador en la “EXPO CARRERAS 2010” de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba. Año 2010. (Res. 1072/2010)
- Colaborador en las “Actividades de Articulación con escuelas secundarias” de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNC. Año 2010/2011 (Res. 1073/2010)
- Colaborador en la realización de la “VII Semana de la Ciencia y la Tecnología” de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNC. Año 2010. (Res. 1074/2010)
- Organizador y disertante del ciclo de divulgación “Química Joven” para alumnos del polimodal, Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba. Año 2011.
- Organizador de la actividad de divulgación, “La ciencia a las calles” realizada en Setiembre de 2011 en el centro de Córdoba. (Res. 975/2011)
- Colaborador en la “Muestra de Carreras” de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba. Año 2011-2012-2013.
- Locutor en el programa radial “El mundo esta que arde”, programa de difusión sobre contaminación ambiental. 101.7. 2012
- Locutor en el programa radial “Heladeras al espacio”, programa de divulgación científica. Radio Gen. 2015
- Disertante en la muestra por el “Año Internacional de la Química”. Año 2011.
- Invitado al programa televisivo “El Show de la mañana” para realizar actividades de divulgación científica.
- Subsidio PROTRI 2014 para la confección de guías para estudiantes secundarios.
- Integrante del “Ensamble científico-teatral” de la UNC.
- Científico en el Proyecto “Los científicos van a la Escuela” del Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Nación.

