

Tesis  
29

NO SE PRESTA

25449

DONACION

Maria del Valle Bohorquez



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FISICO-QUIMICAS Y NATURALES



INHIBICION DE LA FLUORESCENCIA DE DERIVADOS INDOLICOS

POR AMINOACIDOS ALIFATICOS



TESIS EN QUIMICA

MARIA DEL VALLE BOHORQUEZ

- 1985 -

14442

25442



MFN: 29
Clasif.:  T033

Dr. Leon Bompardier

Dr. Barthelemy Benoit

Dr. Hector Capner

Faint text at the bottom of the page, possibly a signature or date.



El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Química y Física de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, y se presenta como requerimiento para optar al **grado** de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Dr. Carlos Mario Previtali

Director de Tesis

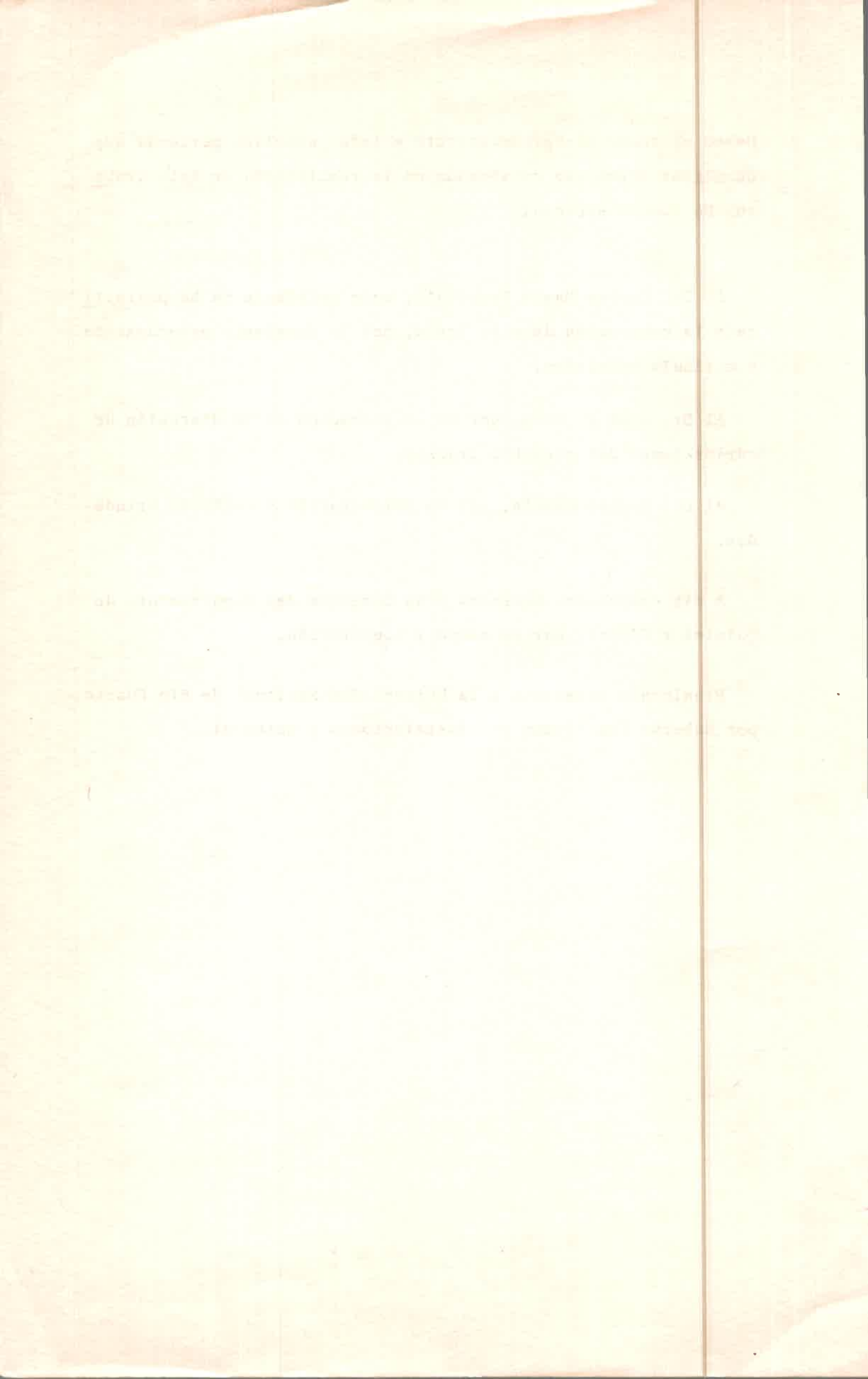
Aprobada por el Jurado:

Dr. Erwin Baumgartner

Dr. Enrique San Román

Dr. Héctor Gsponer

Río Cuarto, 28 de marzo de 1985



A mis padres

A mis hermanos

A Cristina

1. Introducción de las especies  
2. Descripción de las especies  
3. Características de las especies  
4. Hábitat de las especies  
5. Comportamiento de las especies  
6. Alimentación de las especies  
7. Reproducción de las especies  
8. Distribución de las especies  
9. Conservación de las especies  
10. Conclusión

ANEXO I

1. Descripción de las especies  
2. Características de las especies  
3. Hábitat de las especies  
4. Comportamiento de las especies  
5. Alimentación de las especies  
6. Reproducción de las especies  
7. Distribución de las especies  
8. Conservación de las especies  
9. Conclusión

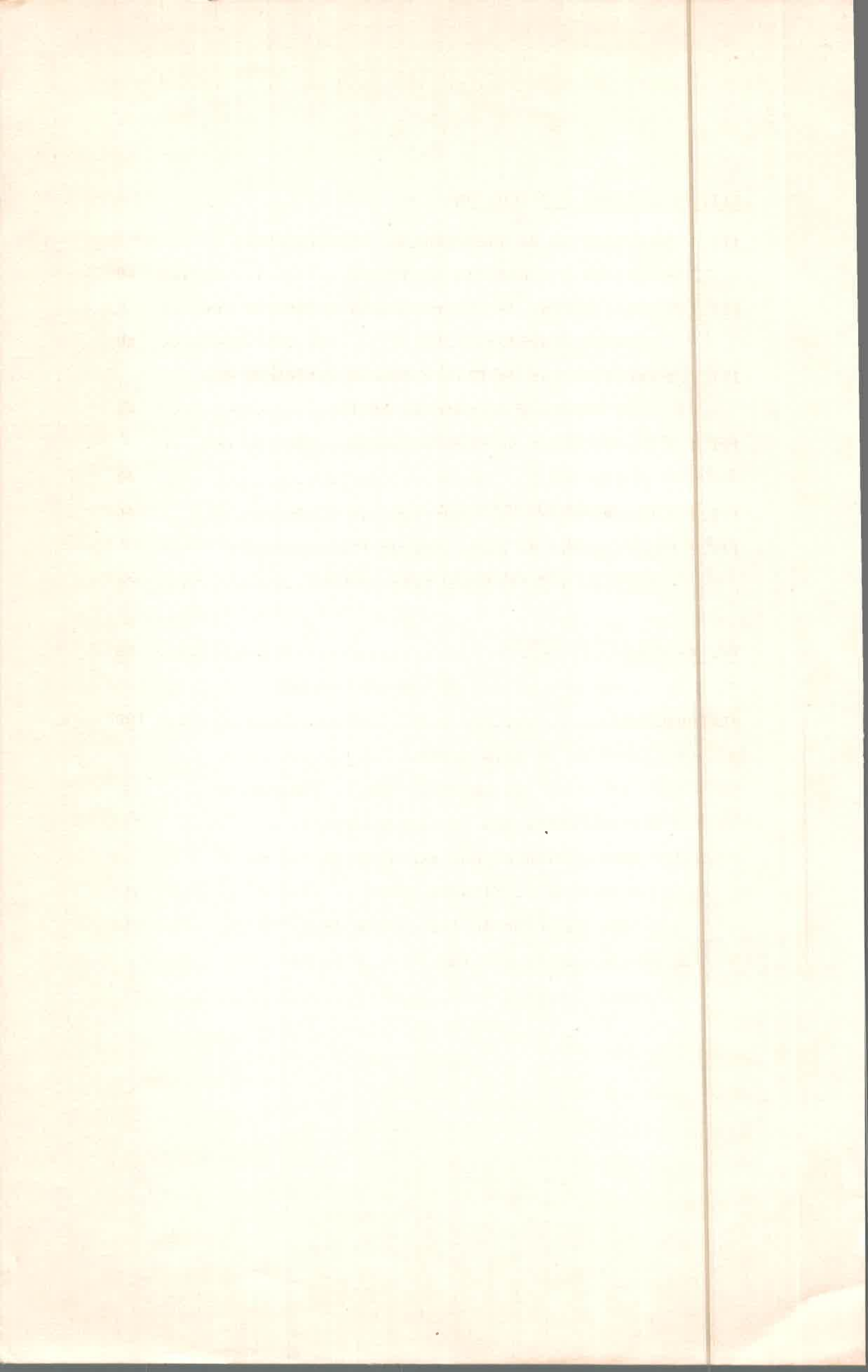
## INDICE

### I. INTRODUCCION

I.1 Generalidades.....	1
I.2 Fluorescencia de derivados indólicos.....	4
I.2.1 Factores que afectan al rendimiento cuántico de fluorescencia.....	5
I.2.1.a Efecto de temperatura.....	7
I.2.1.b Efecto de pH.....	8
I.3 Quenching de fluorescencia.....	13
I.4 Quenching de derivados indólicos.....	20
I.5 Antecedentes de Aminoácidos alifáticos.....	26

### II. PARTE EXPERIMENTAL

II.1 Procedencia y pureza de las sustancias empleadas.....	29
II.2 Preparación de soluciones.....	30
II.3 Desarrollo de las experiencias de fluorescencia..	30
II.3.1 Medidas estáticas de fluorescencia.....	30
II.3.1.1 Realización de una experiencia típica de quenching de fluorescencia.....	31
II.3.1.2 Determinación de las curvas de $I_f$ vs pH.....	31
II.3.2 Determinación de tiempos de vida de fluorescencia.....	32



III. RESULTADOS Y DISCUSION

III.1 Experiencias de quenching de fluorescencia  
    estáticas y dinámicas a 25°C..... 40

III.1.1 Experiencias de fluorescencia estáticas con  
    los  $\alpha$  Aminoácidos..... 40

III.1.2 Experiencias de fluorescencia estáticas con  
    Etil amonio y Acetato de etilo..... 40

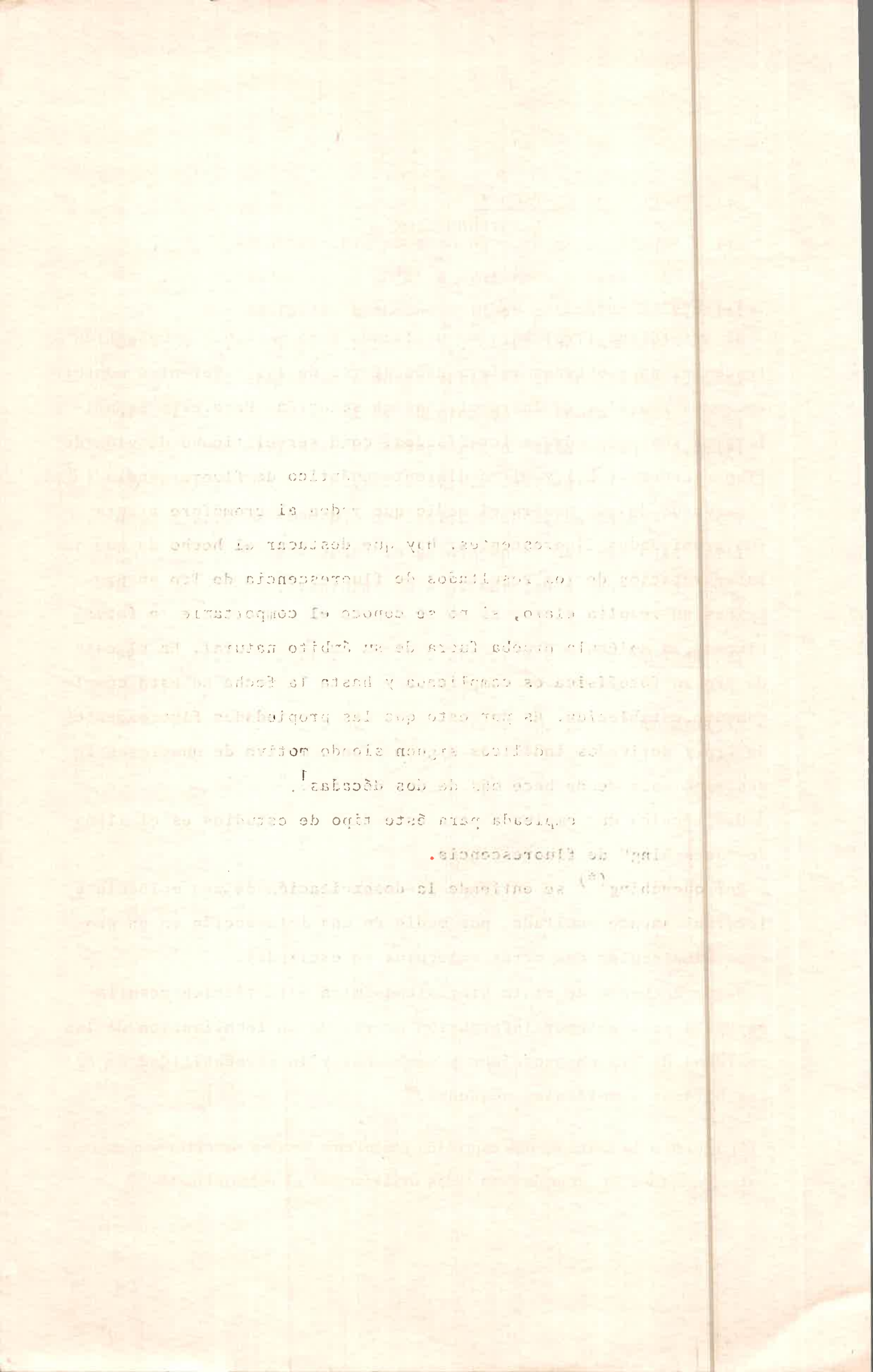
III.1.3 Experiencias de fluorescencia estáticas con  
     $\beta$  Alanina..... 44

III.1.4 Experiencias de fluorescencia dinámicas..... 46

III.2 Experiencias de quenching de fluorescencia  
    estáticas a diferentes temperaturas..... 56

IV. RESUMEN ..... 99

REFERENCIAS..... 100



## I. INTRODUCCION

### I.1. Generalidades

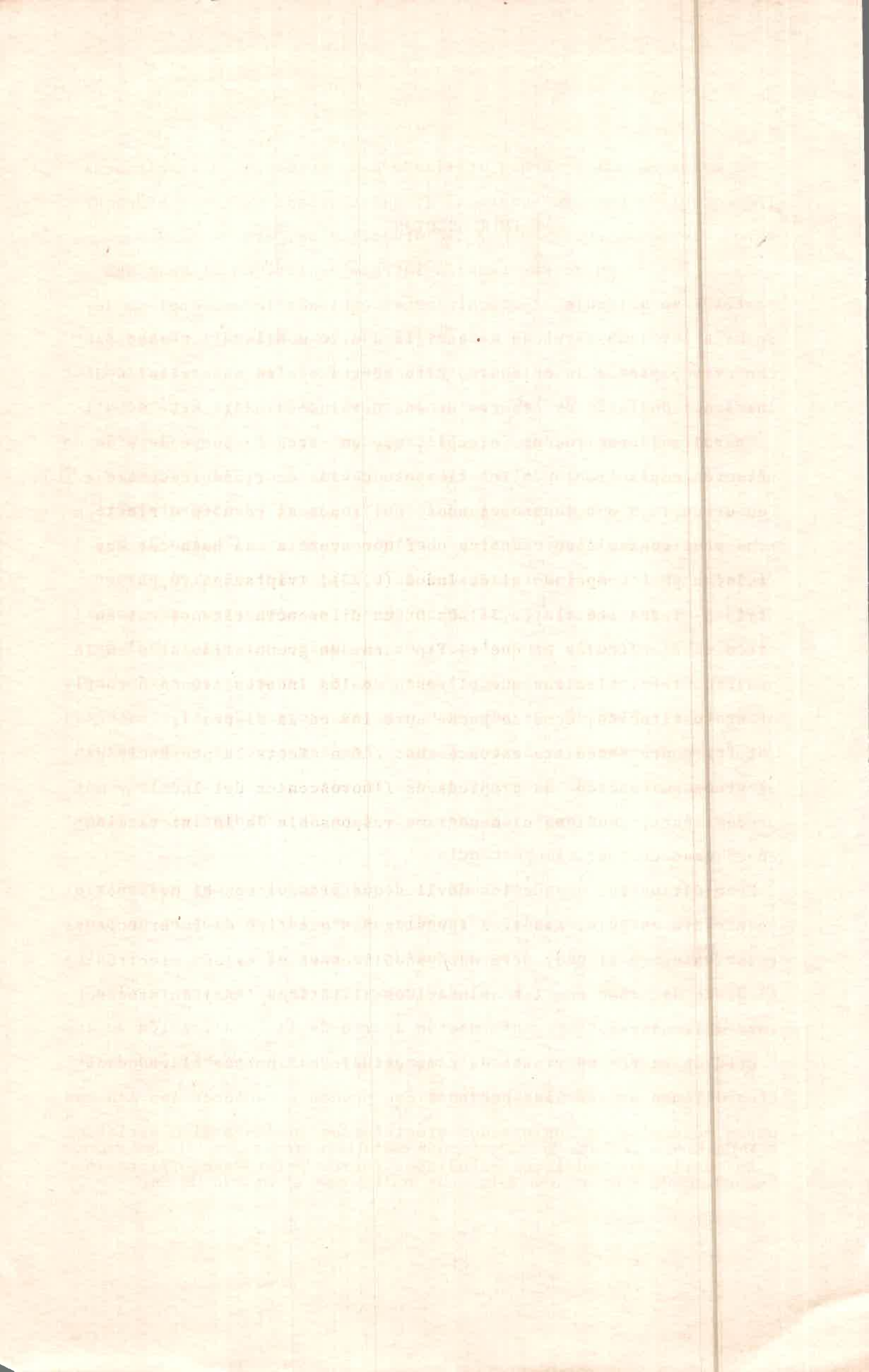
El triptófano (Trp) ha sido utilizado como molécula prueba fluorescente, para obtener información acerca de las diferentes conformaciones posibles de las proteínas en solución. Para esto se utilizaron sus propiedades fotofísicas, como ser el tiempo de vida de fluorescencia ( $\tau$ ) y el rendimiento cuántico de fluorescencia ( $\Phi_f$ ), observando de que manera el medio que rodea al cromóforo afecta sus propiedades fluorescentes. Hay que destacar el hecho de que la interpretación de los resultados de fluorescencia de Trp en proteínas no resulta claro, si no se conoce el comportamiento fotofísico de la molécula prueba fuera de su ámbito natural. En el caso de Trp su fotofísica es complicada y hasta la fecha no está completamente establecida. Es por esto que las propiedades fluorescentes de Trp y derivados indólicos siguen siendo motivo de numerosas investigaciones desde hace más de dos décadas<sup>1</sup>.

Una técnica muy empleada para éste tipo de estudios es el llamado "quenching" de fluorescencia.

Por quenching<sup>(\*)</sup> se entiende la desexcitación de una molécula electrónicamente excitada, por medio de una interacción en un proceso bimolecular con otras moléculas no excitadas.

Desde un punto de vista Biofísicoquímica ésta técnica resulta muy útil para obtener información acerca de la localización de los residuos de Trp en proteínas y membranas y la permeabilidad de éstas últimas a moléculas pequeñas.<sup>2</sup>

(\*) Debido a la falta de una expresión castellana breve y sencilla que exprese este concepto a lo largo de ésta tesis utilizaremos el vocablo inglés.



En estos estudios se han utilizado como moléculas desexcitantes ("quenchers") una gran variedad de sustancias: oxígeno, hidrocarburos clorados, succinamida, dicloroacetamida, etc.

El quenching puede ser también intramolecular, en el cual una parte de la molécula electrónicamente excitada (cromóforo) se desexcita por transferencia de energía u otro medio de interacción con otra parte de la molécula. Esto se refleja en la variación de las propiedades fluorescentes de los derivados indólicos.

Resulta llamativo, por ejemplo, que en estos compuestos se observe un amplio rango en los tiempos de vida de fluorescencia que van desde 10,5 a 0,1 nanosegundos (ns)<sup>3</sup>; además resulta difícil entender el rendimiento cuántico de fluorescencia tan bajo del Trp (0,14) a pH 6 comparado al de Indol (0,23), Triptamina (0,25) e ácido 3- Indol acético (0,33). La única diferencia estructural entre dichas moléculas es que el Trp tiene un grupo aminoácido en la posición tres, mientras que el resto de los Indoles tienen otro tipo de sustitución, como se puede apreciar en la figura 1.

La pregunta inmediata entonces es: ¿cómo afecta la presencia de el grupo aminoácido las propiedades fluorescentes del Indol? y más precisamente, ¿cuál es el mecanismo responsable de la interacción en el caso de Trp?

Esto último fue uno de los móviles que promovieron el desarrollo de nuestro estudio. Nosotros investigamos que tipo de interacciones existían entre algunos derivados indólicos en el estado electrónico singlete excitado con los aminoácidos alifáticos (AAa) en procesos intermoleculares.

Otro objetivo importante de este estudio es ampliar el reducido conocimiento de las interacciones que pueden establecer los AAa con otras moléculas en sus estados electrónicos fundamental o excitado.<sup>4-6</sup>

Los derivados indólicos estudiados fueron Triptófano, Triptamina



INDOL-3-CARBOXYLIC ACID

TRYPHTOPAN



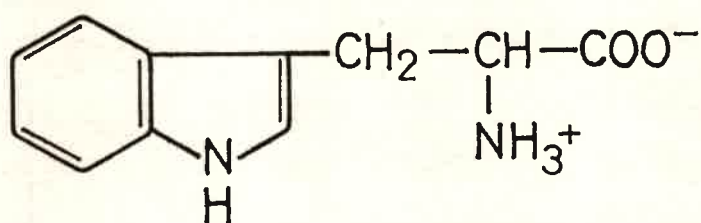
INDOLE



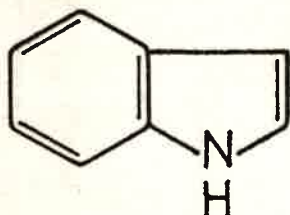
Ac 3-INDOL ACETIC



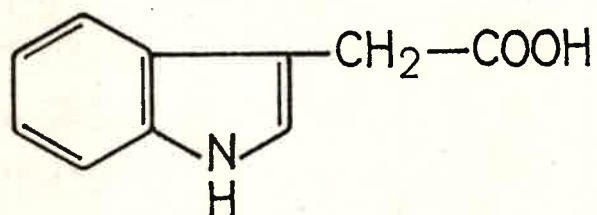
TRYPHTOPAN



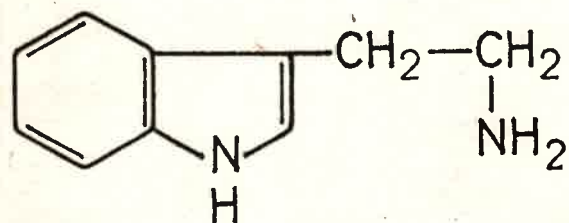
TRIPTOFANO



INDOL



Ac.3-INDOL ACETICO



TRIPTAMINA

fig.1

Handwritten text at the top of the page, possibly a title or header.

Handwritten text in the upper middle section of the page.

Handwritten text in the middle section of the page.

Handwritten text in the lower middle section of the page.

Handwritten text in the lower section of the page.

Handwritten text at the bottom of the page, possibly a signature or footer.

Indol y ácido-3-Indol acético, cuyas fórmulas estructurales se presentan en la figura 1. Los aminoácidos alifáticos empleados fueron: Glicina, Alanina, Valina, Prolina, Serina, Treonina, Hidroxiprolina y  $\beta$  Alanina.

De esta manera se pudo conseguir una amplia variación estructural y estudiar como estos cambios afectan el proceso de quenching.

Así se pudo establecer un mecanismo general para la interacción intermolecular entre un grupo indólico electronicamente excitado y el grupo  $\alpha$ -aminoácido en su forma de ión dipolar.

Estos resultados cuando se extrapolan al caso intramolecular de Trp permiten explicar su comportamiento fotofísico y sus diferencias con otros indoles.

### I.2. Fluorescencia de derivados indólicos

El espectro de fluorescencia del Triptófano en soluciones acuosas carece de estructura, presentando un máximo de emisión a 348nm con un ancho medio de banda de 60nm.<sup>7</sup> La forma y posición del máximo del espectro de fluorescencia del Trp estan determinados por el anillo indólico de la molécula sin apreciable contribución de los grupos sustituyentes ya que el Indol y sus derivados tienen prácticamente el mismo espectro de fluorescencia.<sup>1</sup>

Otras características del espectro de fluorescencia de Trp y derivados indólicos es el gran corrimiento de Stokes (alrededor de 70nm) del máximo de emisión en solventes polares<sup>8-13</sup>. Este efecto es esperado ya que los derivados indólicos experimentan una transición del tipo  $\pi-\pi^*$  con un incremento en el momento dipolar en el estado excitado.<sup>14</sup>

Los espectros de fluorescencia en solventes no polares, se caracterizan por presentar bandas agudas y algo estructuradas<sup>1</sup>, siendo el corrimiento de Stokes mucho menor que en solventes polares.

Por otra parte fue observado por varios autores<sup>1,10-12</sup>, que pe-

Faint, illegible text at the top of the page, possibly bleed-through from the reverse side.

Section of faint, illegible text in the middle of the page.

Section of faint, illegible text at the bottom of the page.

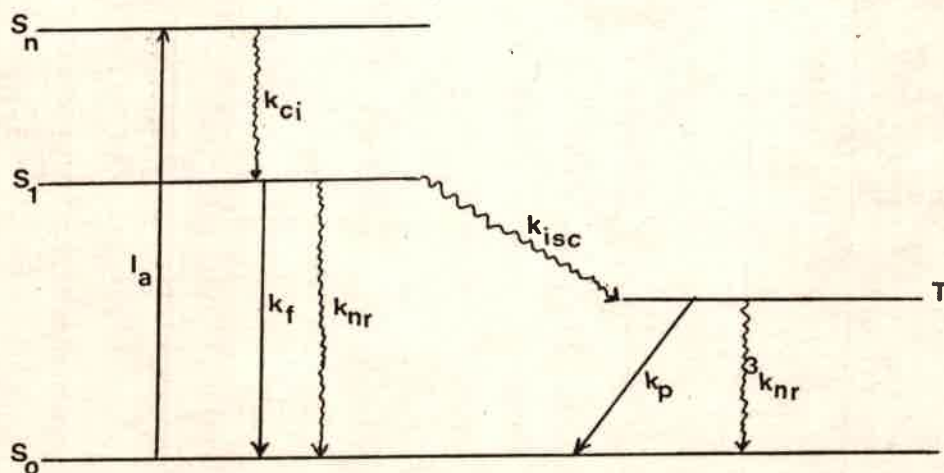
queñas porciones de n-butanol, en solventes no polares, que contenían a diversos derivados indólicos, producían un corrimiento al rojo del máximo de emisión y ensanchamiento del espectro con pérdida de la estructura vibracional.

Este efecto se atribuyó a la existencia de una interacción específica soluto-solvente, resultando en la formación de un complejo con una estequiometría definida. Lumry et al.<sup>10,11</sup> opinan que estos complejos se forman en el estado excitado, ( $In^*..BuOH$ ) llamados exciplexos, estando estabilizados por interacciones dipolo-dipolo con contribuciones menores de transferencia de carga. Sin embargo, Szabo et al.<sup>12</sup> sostienen que se forman complejos en el estado fundamental los que al excitarse experimentan una reorganización de su estructura en el estado excitado.

Otra explicación alternativa es la que ofrece Konev<sup>1</sup>, quien supone que en solventes próticos, algunos derivados indólicos pueden establecer unión puente hidrógeno, la que sería responsable de los corrimientos de Stokes.

### I.2.1. Factores que afectan al rendimiento cuántico de fluorescencia.

Se puede ejemplificar mediante un esquema de Jablonski cuales son los caminos de desactivación de una molécula cuando es excitada por luz u.v. o visible.<sup>15</sup>



Faint, illegible text at the top of the page, possibly bleed-through from the reverse side.

Section of faint, illegible text in the middle of the page.

Section of faint, illegible text in the lower middle of the page.

Faint, illegible text at the bottom of the page.

Cuando la molécula absorbe luz (Ia), puede excitarse a estados singletes de mayor contenido energético que el primer estado sin glete ( $S_1$ ) y luego rápidamente degradar su energía por conversión interna ( $k_{ci}$ ) hasta el  $S_1$ . Las vías posibles de desactivación del estado  $S_1$  pueden ser fluorescencia ( $k_f$ ), procesos no radiativos al estado fundamental  $S_0$  ( $k_{nr}$ ) o al primer estado triplete (T), proceso este conocido como cruce de sistema ( $k_{isc}$ ). Finalmente desde el estado T puede fosforecer ( $k_p$ ) o decaer no radiativamente al estado fundamental ( ${}^3k_{nr}$ ).

El rendimiento cuántico de fluorescencia se define según:

$$\Phi_f = \frac{\text{velocidad de emisión desde } S_1}{\text{velocidad de absorción por } S_0} = \frac{k_f}{\sum k} \quad 1$$

siendo  $\sum k = k_f + k_{nr} + k_{isc}$

La cinética de decaimiento de una especie excitada,  $M^*$ , es de primer orden, así su dependencia con el tiempo está dada por:

$$[M^*] = [M^*_0] e^{-\sum kt} \quad 2$$

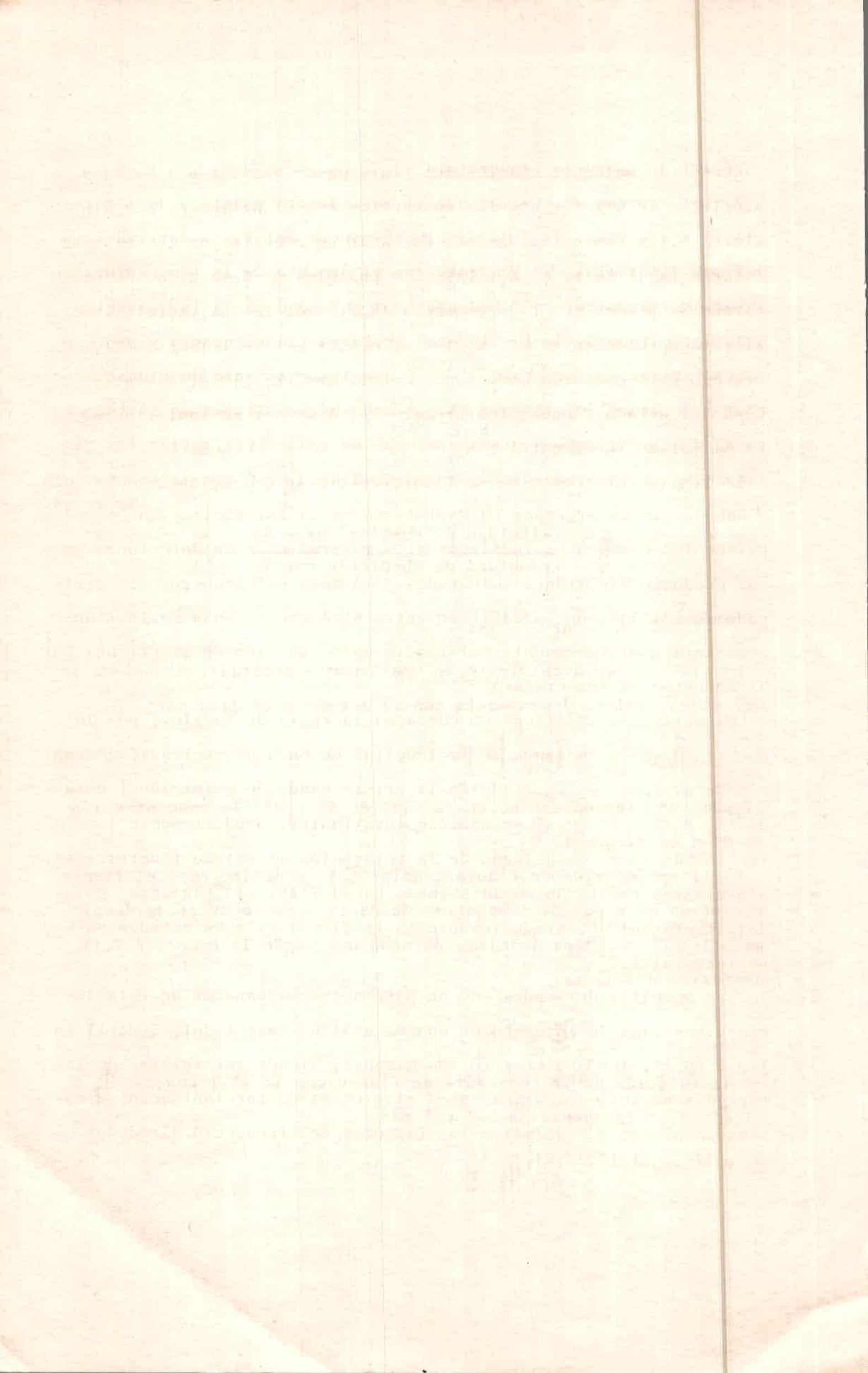
siendo  $[M^*_0]$  la concentración inicial de  $M^*$  y  $[M^*]$  la concentración de  $M^*$  a un tiempo  $t$ .

El tiempo de vida de fluorescencia ( $\tau$ ) se define como el tiempo requerido para que la concentración de la especie excitada decaiga a  $1/e$  de su valor inicial, de modo que según la ecuación 2, la expresión del  $\tau$  es:

$$\tau = (\sum k)^{-1} \quad 3$$

y la relación de la constante de fluorescencia ( $k_f$ ) con el  $\Phi_f$  y el  $\tau$  según las ecuaciones 1 y 3 es:

$$k_f = \Phi_f / \tau \quad 4$$



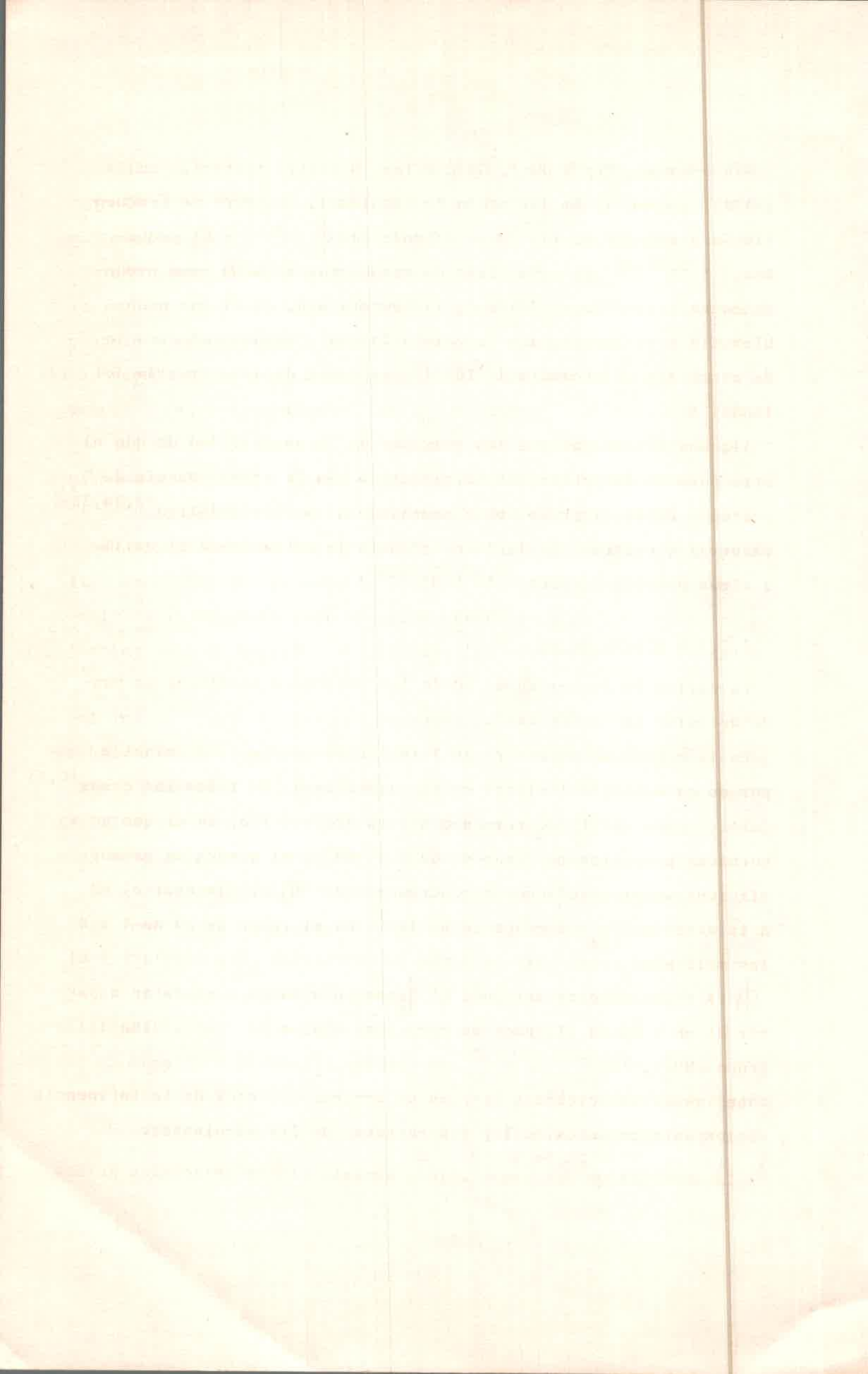
### I.2.1.a Efecto de Temperatura

Varios autores observaron que el rendimiento cuántico de fluorescencia y el tiempo de vida de fluorescencia del Trp y derivados indólicos disminúan marcadamente con el aumento de la temperatura en soluciones acuosas.<sup>16-22</sup> Los procesos que conducen a la desexcitación del estado  $S_1$  de los Indoles incluyen fluorescencia y procesos no radiativos. Es aceptado<sup>17,23-26</sup> que las constante de fluorescencia ( $k_f$ ) y de cruce de sistemas ( $k_{isc}$ ) son independientes de la temperatura, o sea que otro u otros procesos no radiativos serían los responsables de la pronunciada dependencia del  $\Phi_f$  y  $\tau$  con la temperatura.

Uno de dichos procesos no radiativos es la fotoionización<sup>10,17,20</sup> ya que los compuestos indólicos al ser irradiados en soluciones acuosas producen electrones solvatados.<sup>27</sup> Además se encontró para derivados sencillos, un paralelismo entre el decrecimiento de la fluorescencia y el incremento del rendimiento cuántico de electrones ( $\Phi_{e^-}$ ) al aumentar la temperatura.<sup>19,20,25</sup>

Los derivados indólicos no obedecen la regla de Vavilov, por lo que el  $\Phi_f$  es dependiente de la longitud de onda de excitación. Además cuando el Indol es excitado en la primera banda de absorción (estados  $^1L_a$  y  $^1L_b$ ) el  $\Phi_f$  y  $\Phi_{e^-}$  permanecen invariantes, produciéndose la eyección de electrones luego de la relajación al estado fluorescente. Sin embargo excitando en la segunda banda ( $^1B_b$ ) el  $\Phi_{e^-}$  aumenta con detrimento del  $\Phi_f$ , produciéndose la fotoionización en estados superiores al  $S_1$ <sup>28-31</sup>

Para aquellos derivados que no poseen grupos capaces de establecer algún tipo de interacción con el anillo, como Indol, 3-Metil In Trp a pH 11, los  $\Phi_f$ ,  $\tau$  y  $\Phi_{e^-}$  son grandes, siendo los valores de las energías de activación ( $E_a$ ) para el proceso de fotoionización aproximadamente de 12Kcal/mol y los factores de frecuencia alrededor de  $10^{17}$  seg<sup>-1</sup>.<sup>17,23,24,32-33</sup>



Sin embargo, Trp a pH=7, Glicil-Trp, N-acetil triptofan amida (NATA), presentan  $E_a$  del orden de 6Kcal/mol, factores de frecuencia de alrededor de  $10^{13}$   $\text{seg}^{-1}$  siendo los  $\Phi_f$ ,  $\tau$ , y  $\Phi_e$  pequeños.<sup>17,22,33,34</sup> En esta clase de compuestos se suma otro proceso no radiativo dependiente de la temperatura, en el que probablemente esté involucrada la cadena lateral, siendo entonces la  $E_a$  observada un promedio de los dos procesos de deexcitación del Indol.<sup>33</sup>

Algunos investigadores han considerado la posibilidad de que el otro paso de desactivación no radiativo sea la transferencia de protones desde el grupo amino protonado al anillo indólico<sup>23,24,35</sup> mientras que otros, la de transferencia de carga desde el anillo a algún posible aceptor.<sup>17,32,33,36-39</sup>

#### I.2.1.b Efecto de pH

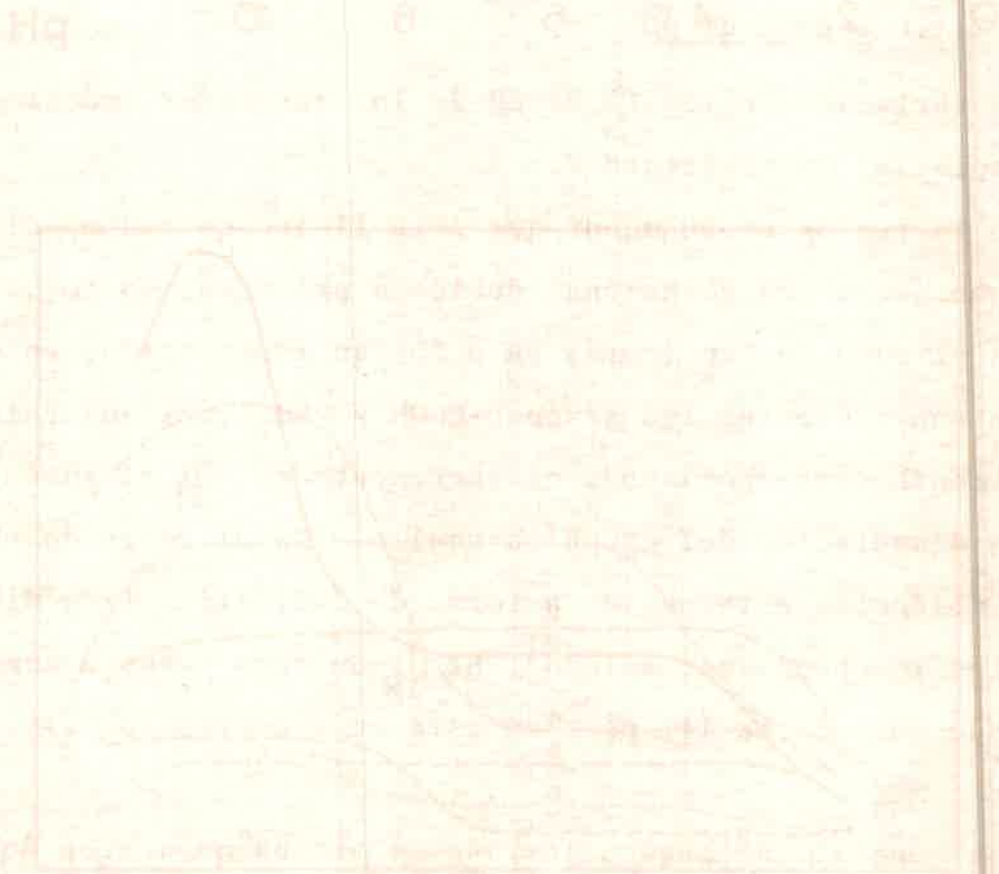
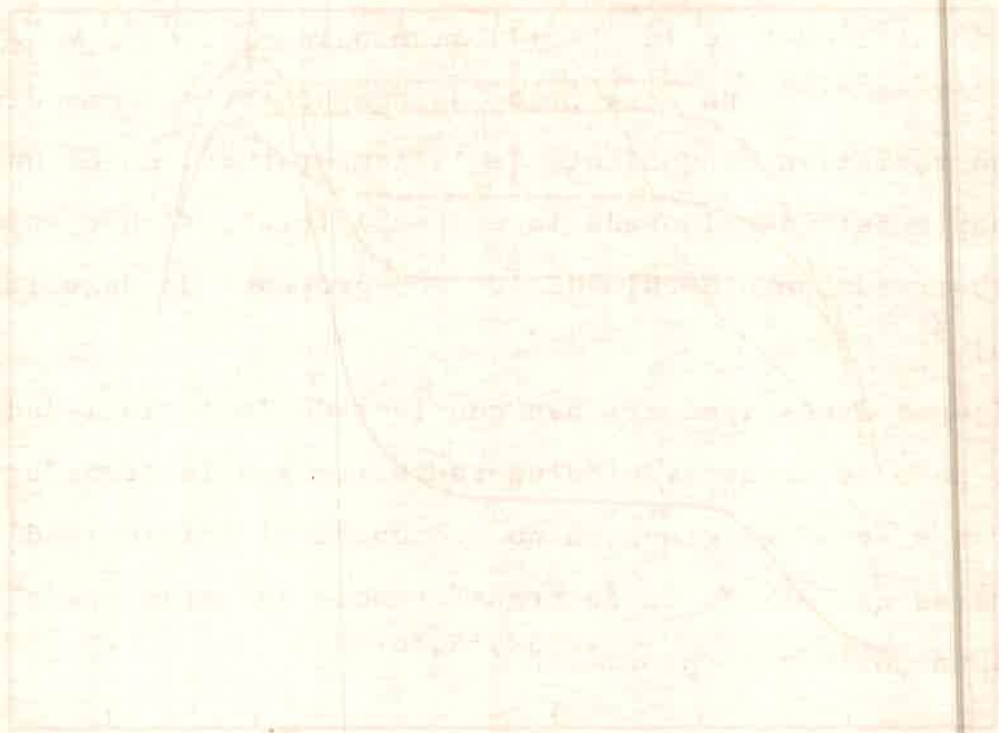
La variación de los  $\Phi_f$  vs pH de los derivados indólicos se puede apreciar en la figura 2.

En la región de pH menor que 3 la fluorescencia es disminuida por un quenching colisional debido a protones, en todos los casos<sup>40,41</sup>

En el caso de Trp (curva 6a o 3b) en medio ácido, en el que se encuentran presentes los grupos  $-\text{COOH}$  y  $-\text{NH}_3^+$ , el quenching es muy eficiente, correspondiendo el incremento en  $\Phi_f$  al aumentar el pH a la disociación del grupo carbonilo<sup>1</sup>. En el rango de pH de 4 a 8 las moléculas están bajo la forma de Zwitterion (ión dipolar) y el  $\Phi_f$  es independiente del pH<sup>1</sup>. El  $\Phi_f$  comienza luego a aumentar a partir de pH 8 hasta 11, pues en esta zona ocurre la disociación del grupo  $-\text{NH}_3^+$ .

Las generalizaciones a las que se arribaron acerca de la influencia de los sustituyentes en Trp y derivados son las siguientes:

- La acetilación del grupo amino, aumenta el  $\Phi_f$  en soluciones ácidas



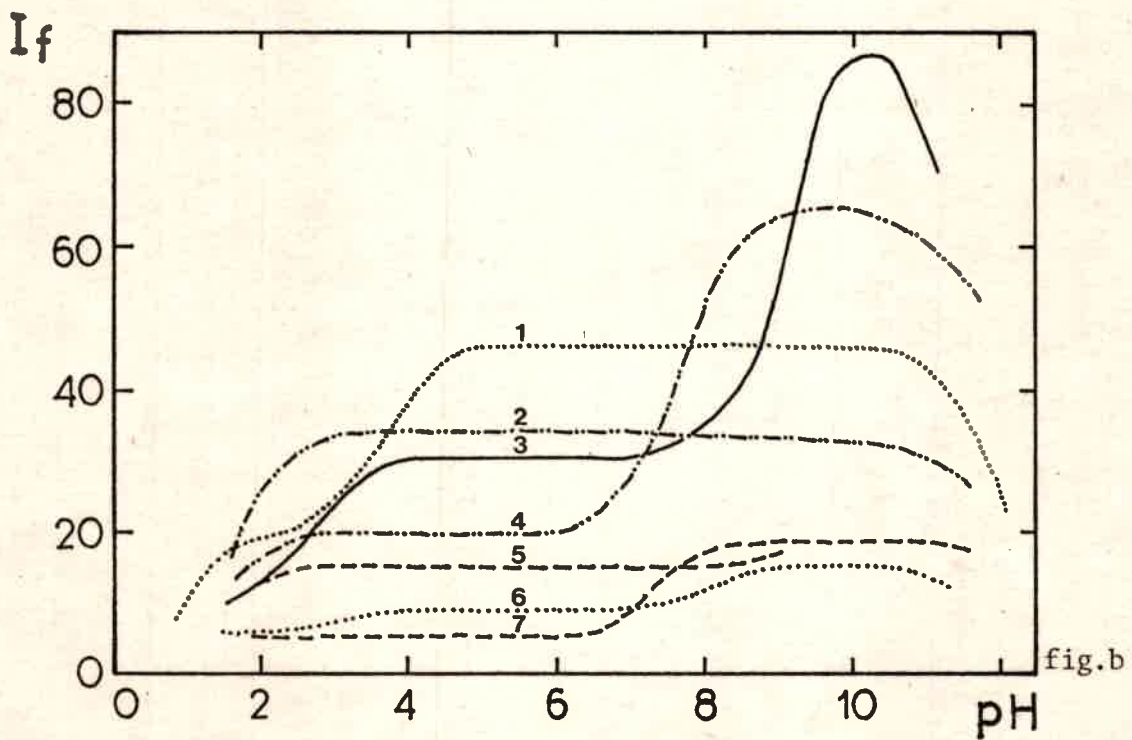
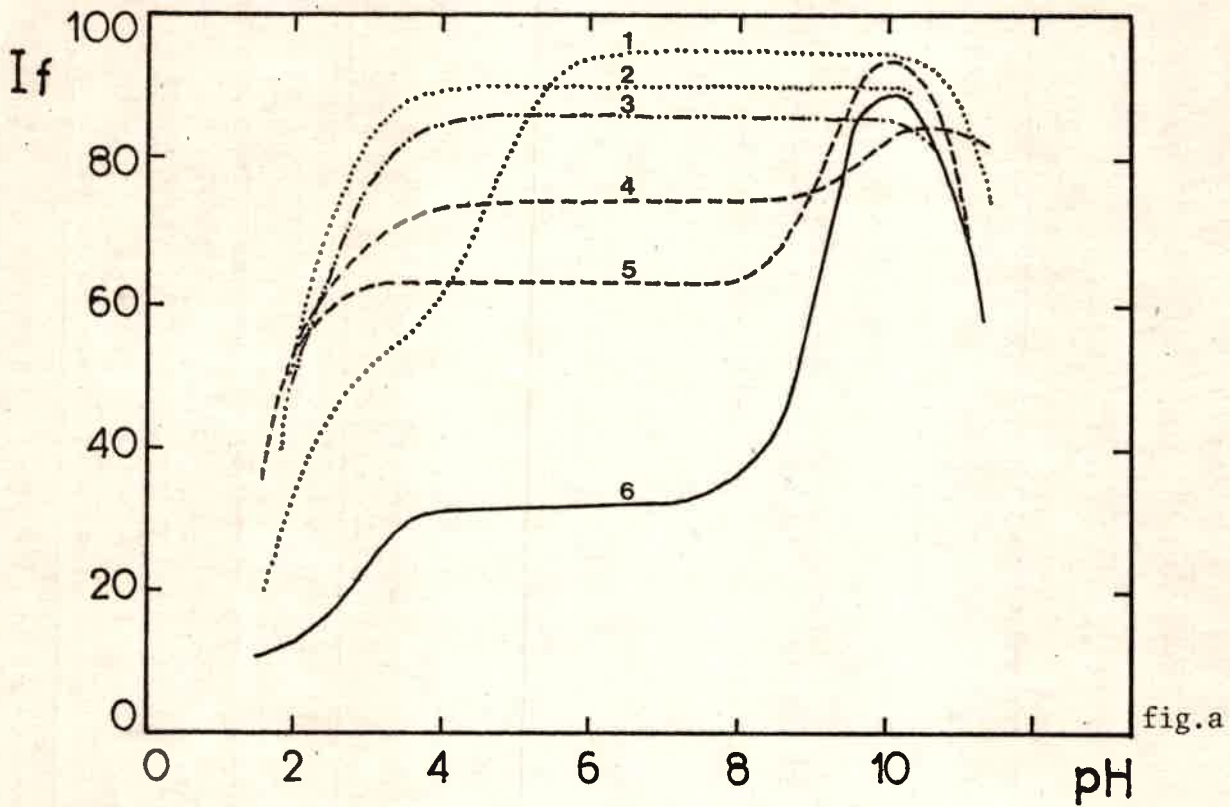


fig.2 Variación de la Intensidad de fluorescencia con el pH de derivados indólicos.

Handwritten text at the top of the page, possibly a title or header.

Main body of handwritten text, consisting of several lines of cursive script.

Second main section of handwritten text, continuing the narrative or list.

Final section of handwritten text at the bottom of the page.

Vertical handwritten text on the right margin, possibly a list or index.

y neutras, como se puede apreciar en la figura 2-b, si se comparan las curvas 1 y 3.<sup>23,36,42</sup>

- La esterificación o amidación del grupo carboxilo reduce drásticamente el  $\Phi_f$  independientemente del estado de ionización del grupo amino<sup>9,23,36,42</sup> (Comparar las curvas 7 y 4 con la 3 de la figura 2-b). Este efecto persiste, aunque en menor extensión, si el grupo amino es acetilado (Curva 2 y 5 de la figura 2-b) o si el carboxilo está separado por otro residuo desde el Trp como en el péptido Trp-Gly<sup>23,42</sup>

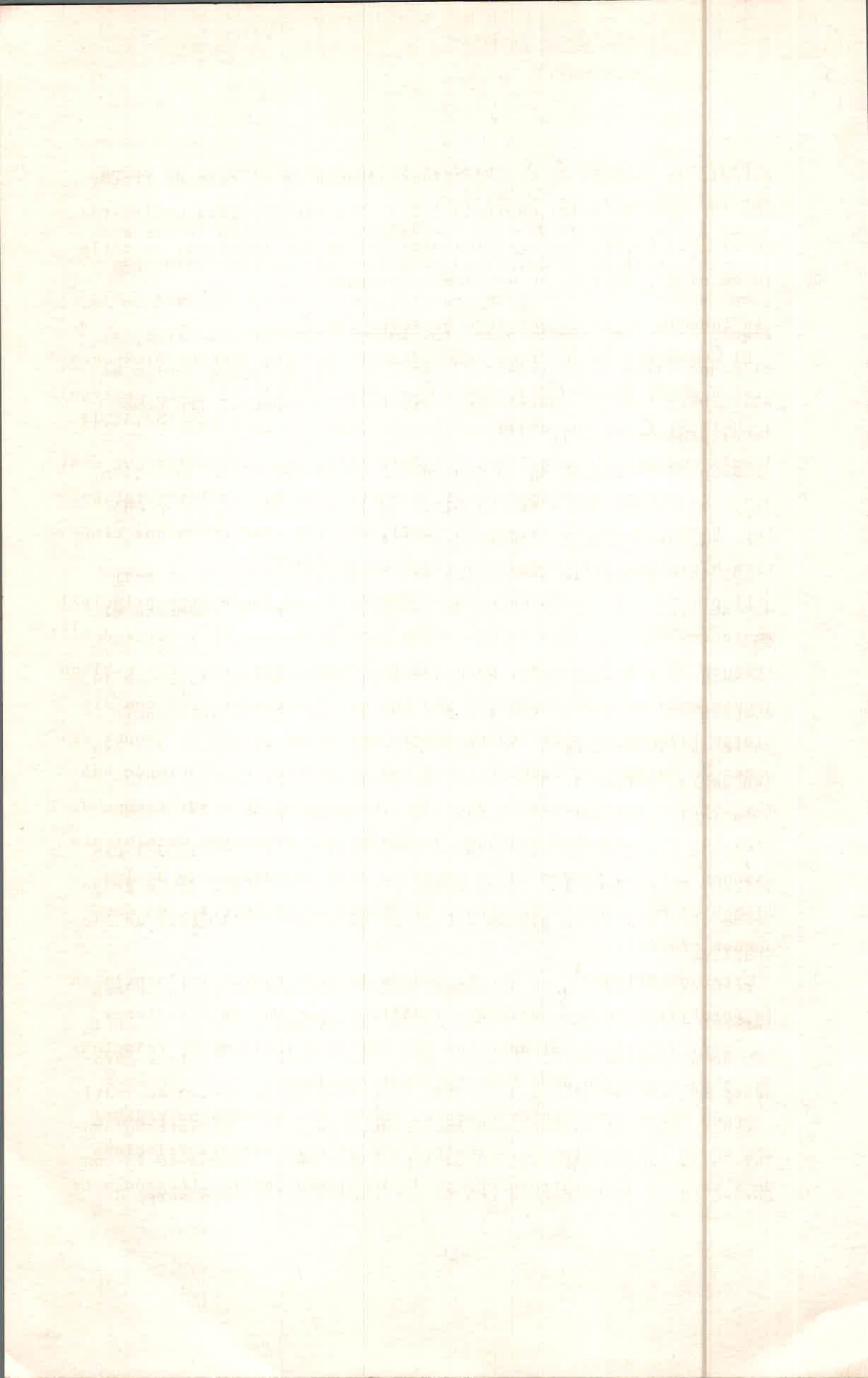
- Se produce quenching de fluorescencia ya sea si la formación de la unión peptídica se establece en la posición COOH o NH<sub>2</sub> (Ver la curva 6 de la figura 2-b).<sup>23,42</sup>

- Al incrementar la separación entre un grupo NH<sub>3</sub><sup>+</sup> y el residuo de Trp, como en la serie NH<sub>3</sub><sup>+</sup> - (Gly)<sub>n</sub> - Trp-COO<sup>-</sup> aumenta el  $\Phi_f$  y el  $\tau$ .<sup>43</sup>

- Según observamos en la figura 2-a el grupo amino, haciendo la comparación de las curvas 4 y 5 a pH= 10, no ejerce influencia sobre la fluorescencia.<sup>9,32</sup> Sin embargo, según se deduce del examen de las curvas 4, 5 y 6, hay un progresivo quenching debido a la influencia del NH<sub>3</sub><sup>+</sup> sobre los diferentes grupos.<sup>32</sup>

Similarmente el grupo amida no afecta la fluorescencia del cromóforo (Curva 2 de la figura 2-a), pero la proximidad de un grupo amino (Curva 4 de la figura 2-b) hace que reduzca el  $\Phi_f$  del anillo indólico<sup>32</sup>.

Resulta evidente que, la naturaleza de los grupos de la cadena lateral y el estado de ionización de los mismos según el pH influyen notablemente en el  $\Phi_f$  de los compuestos indólicos. Esto seguramente se debe no sólo a un efecto inductivo o mesomérico de sustituyente sobre el anillo indólico, sino a un quenching intramolecular de la cadena lateral, el cual probablemente dependa de la conformación de dicha cadena con respecto al anillo, como surge del



estudio de tiempos de vida de fluorescencia en el caso de Trp. Según la ecuación 4 del Capítulo I.2.1., la sensibilidad manifestada en el  $\Phi_f$  al variar los sustituyentes del anillo indólico, se refleja en el  $\tau$ , pues  $k_f$  se mantiene constante.

#### Influencia de la cadena lateral sobre los $\tau$

El  $\tau$  del Trp se describe adecuadamente por una función biexponencial a pH=7, siendo  $\tau_1=3,13\text{ns}$  y  $\tau_2=0,51\text{ns}$ .<sup>12,24,33,38</sup> Sin embargo a pH=11 el  $\tau$  es monoexponencial cuyo valor es de  $8,18\text{ns}$ .<sup>33,38,44</sup> Además podemos citar a 3-metil Indol, NATA, In, Triptamina que exhiben decaimiento monoexponencial, mientras que N-acetil triptofanester (NATE), N-acetil triptofan (NAT), Gly-Trp obedecen a una cinética biexponencial en todo el rango de pH.<sup>33,38</sup>

El origen del decaimiento no exponencial, se fundamenta principalmente en la existencia de más de un conformero en Trp y derivados<sup>12,38</sup> (Figura 3). Así es como, para que los compuestos indólicos exhiban decaimiento no exponencial, o sea que existan conformeros con distintos tiempos de vida, es necesario que estén presentes grupos capaces de establecer interacciones con el anillo, evidenciando una más intensa interacción en aquellos conformeros de menor tiempo de vida. Por el contrario aquellos derivados que presentan decaimiento exponencial, no poseen tales grupos o bien la naturaleza de los mismos es muy similar en cuanto al efecto de la interacción que pueden producir.

Otra posibilidad<sup>45</sup> es que la cadena lateral ejerce influencia en la fotofísica de los derivados indólicos, por las interacciones específicas soluto-solvente las que estarían íntimamente relacionadas a la formación de diferentes conformaciones.

Según mencionamos anteriormente, uno de los caminos no radiativos es la fotoionización, mientras que el otro estaría relacionado a un quenching intramolecular de la cadena lateral. Llegado a es



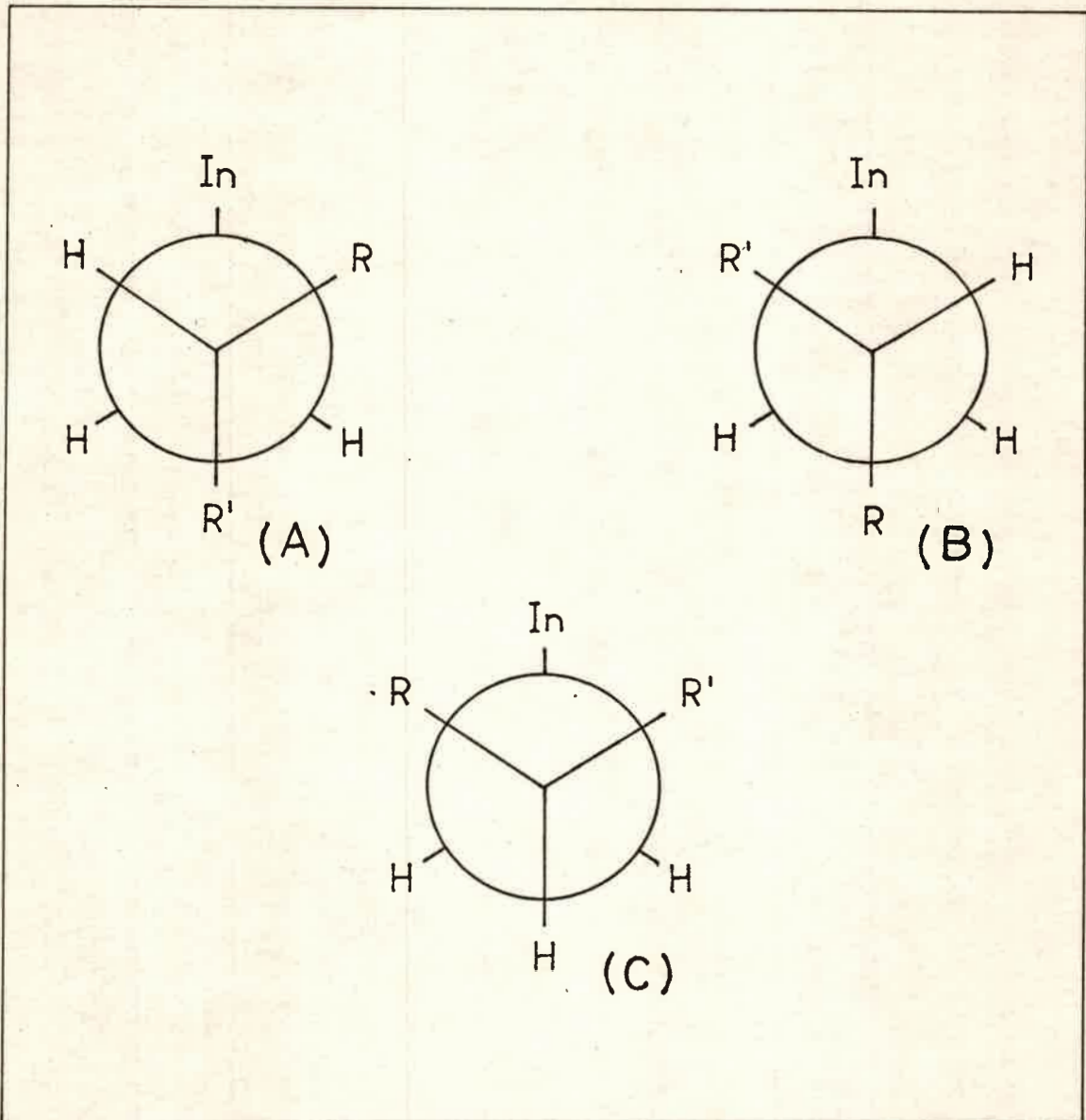


fig.3 Conformeros alrededor de la unión triptofílica  $C_{\alpha}$  -  $C_{\beta}$ . Siendo  $R = NH_3^+$  o sustituido y  $R' = COO^-$  o sustituido

Handwritten text at the top of the page, possibly a title or introductory sentence.

Handwritten text in the upper middle section of the page.

Handwritten text in the middle section of the page.



Handwritten text in the lower middle section of the page.

Handwritten text in the lower section of the page.

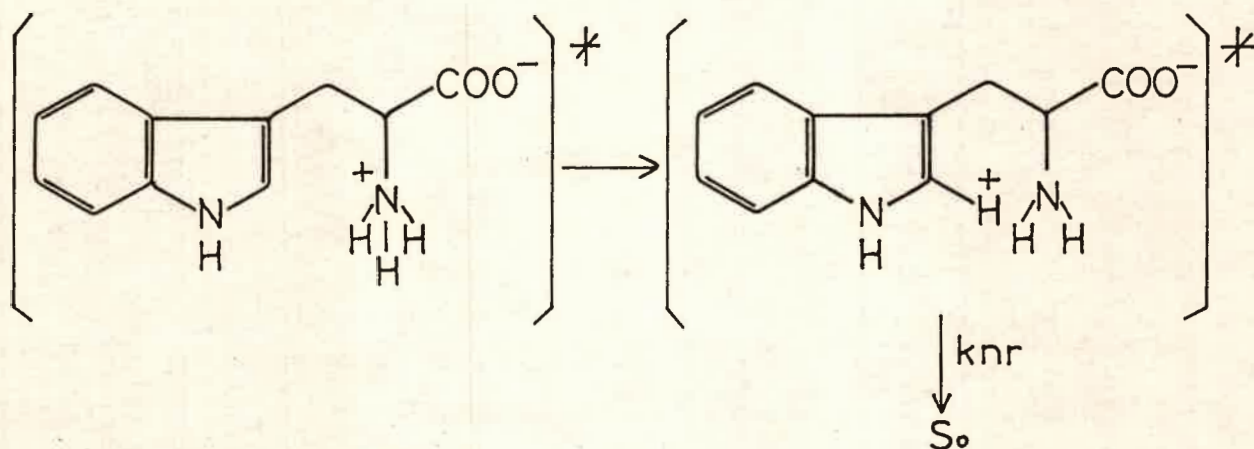
Handwritten text in the lower section of the page.

Handwritten text in the lower section of the page.

Handwritten text at the bottom of the page.

te punto podemos desarrollar con más detalles, cuales fueron las hipótesis acerca del modo de acción de la cadena lateral.

Una de las alternativas posibles es la transferencia de protones del grupo amonio al anillo indólico, siendo el aceptor el átomo de carbon adyacente al nitrógeno, el cual es más electronegativo en el estado excitado.<sup>46</sup> Esto se ejemplifica para el caso de Trp en el siguiente esquema:



El otro paso posible es la transferencia de carga del anillo indólico a un aceptor, siendo éste un grupo amonio o carbonilo.

Una inquietud que surge de los antecedentes presentados, es la de tratar de establecer cual es la naturaleza del proceso no radiativo existente, en el Trp, en el que está involucrada la cadena lateral.

Por este motivo, nosotros investigamos qué interacciones estaban presentes entre los derivados indólicos y los AAa desde un punto de vista intermolecular, para luego intentar correlacionar estos resultados con el mecanismo de quenching intramolecular de Trp.

### 1.3. Quenching de fluorescencia

Como nuestro estudio se desarrolla fundamentalmente a través del análisis del quenching de fluorescencia, nos extenderemos en detalle acerca de la naturaleza y mecanismo del mismo.

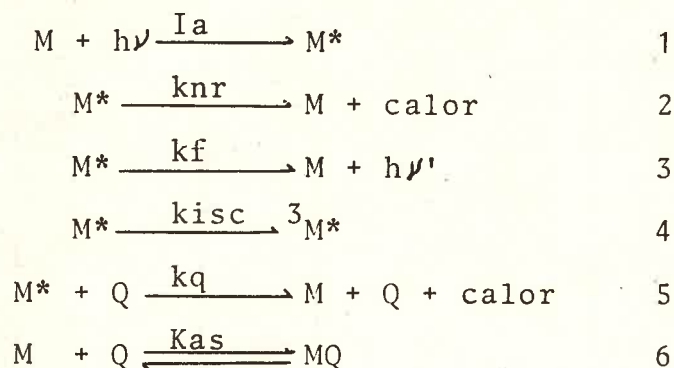
En general la interacción entre un cromóforo excitado M y una mo-

Handwritten text at the top of the page, possibly a title or introductory paragraph.



Main body of handwritten text, appearing to be a detailed description or explanation related to the diagram above.

lícula que provoca la disminución de la intensidad de fluorescencia, llamada "quencher" (Q), puede describirse por el siguiente mecanismo:<sup>15</sup>



siendo 5 la etapa de quenching bimolecular y 6 una posible asociación en el estado fundamental que también contribuye al quenching observado.

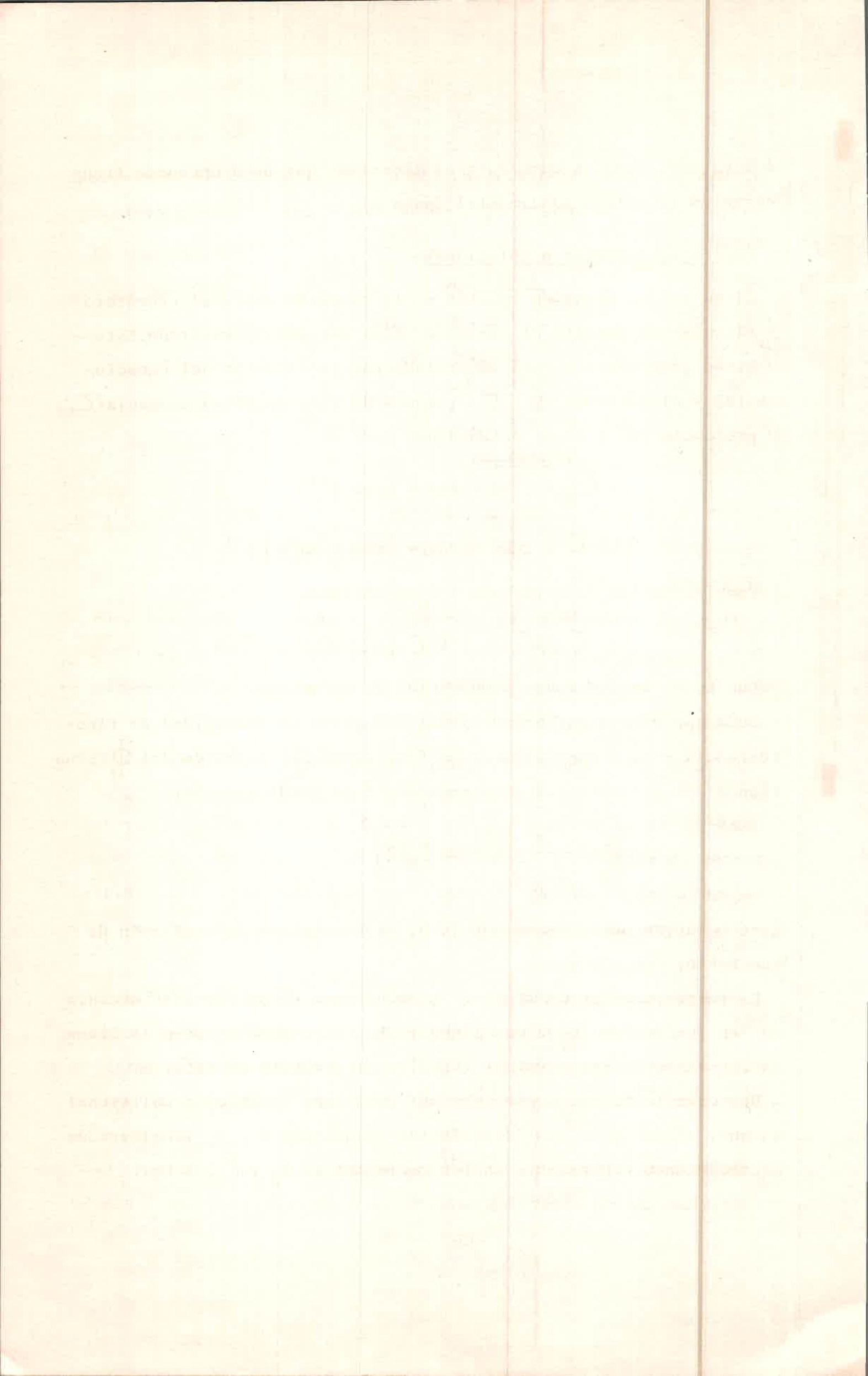
Si están operando en el sistema en estudio los dos mecanismos, que corresponden a las etapas 5 y 6 las variaciones en la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de quencher est n descriptas por la ecuación 5:

$$\frac{I^{\circ}_f}{I_f} - 1 = (K_q + \beta K_{as})[Q] + K_q \beta K_{as}[Q]^2 \quad 5$$

donde  $K_q$  es el producto  $k_q$ ,  $I^{\circ}_f$  y  $I_f$  las intensidades de fluorescencia en ausencia y presencia del quencher respectivamente y  $K_{as}$  la constante de asociación en el estado fundamental. Los gráficos que resultan de la representación de  $I^{\circ}_f / I_f$  en función de  $[Q]$  presentarán curvaturas.

Generalmente se trabaja con soluciones ópticamente diluidas siendo el valor de  $\beta$  la unidad, situación que cambia si la solución es ópticamente densa, para lo cual  $\beta$  representa un cociente entre el coeficiente de extinción molar del complejo MQ ( $\epsilon_{MQ}$ ) y el del cromóforo ( $\epsilon_M$ )<sup>47</sup>.

Otras situaciones que pueden presentarse son que,  $K_{as}=0$  lo cual significa que el quenching procede en el estado excitado (paso 5)





o bien que,  $K_q=0$  en cuyo caso el mecanismo que está operando transcurre en el estado fundamental (paso 6).

### Quenching dinámico o colisional

El quenching dinámico resulta de la colisión entre el cromóforo y el quencher durante el tiempo de vida del estado excitado. Este proceso generalmente está controlado por la difusión del cromóforo (M) y el quencher (Q). Los tiempos de vida de  $M^*$  en ausencia ( $\tau_0$ ) y presencia ( $\tau$ ) de Q, están dados por:

$$\tau_0 = (k_f + k_{nr} + k_{isc})^{-1} \quad 6$$

$$\tau = (k_f + k_{nr} + k_{isc} + k_q[Q])^{-1} \quad 7$$

Combinando las ecuaciones 6 y 7 se obtiene:

$$\tau_0 / \tau = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad 8$$

donde  $k_q$  es la constante bimolecular de quenching.

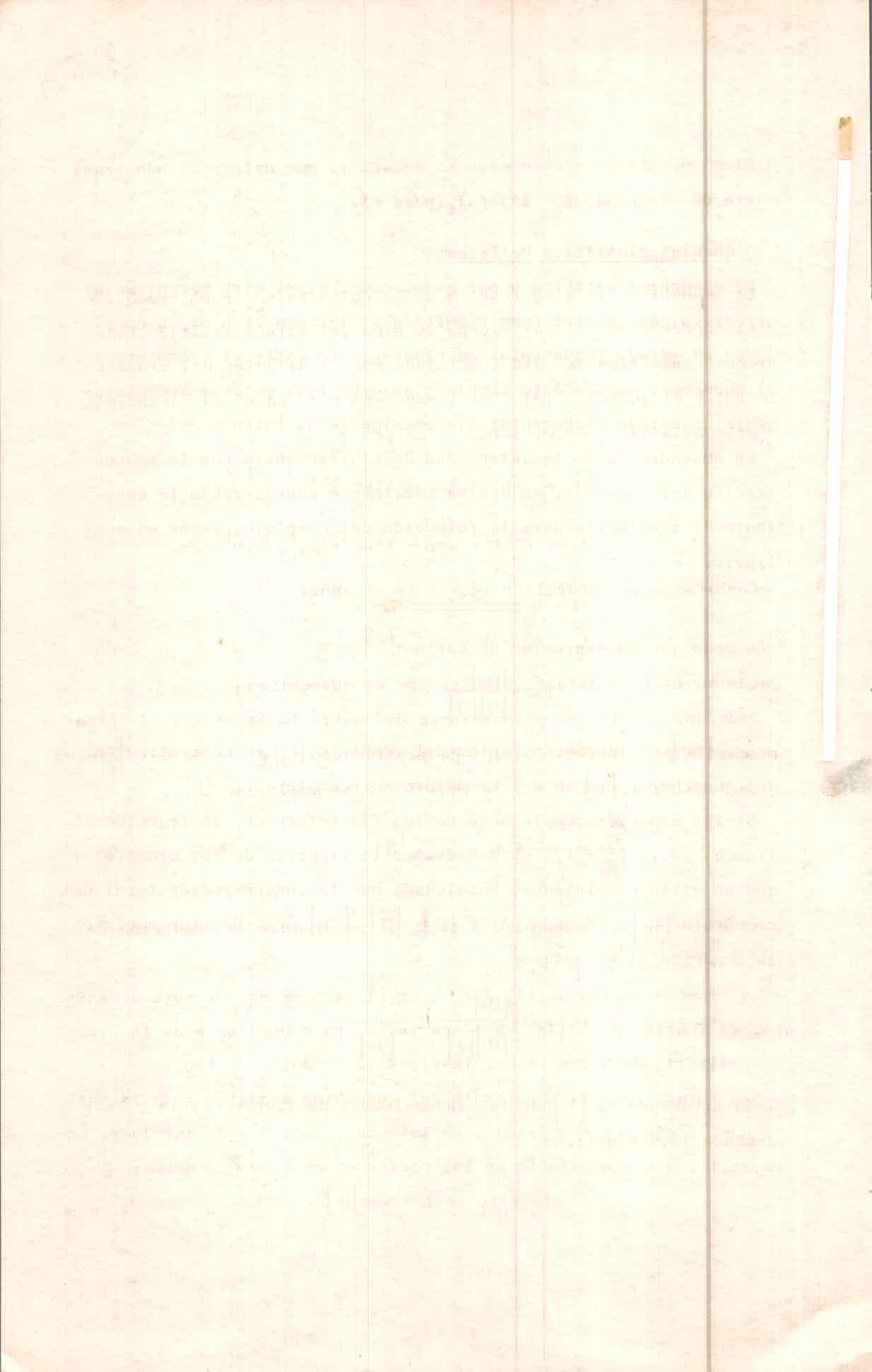
Dado que existe una proporcionalidad entre la intensidad de fluorescencia y el tiempo de vida de fluorescencia, a través del  $\Phi_f$  (ecuación 4 del capítulo I.2) la ecuación 8 se puede escribir:

$$\frac{\Phi_f^0}{\Phi_f} = \frac{I_f^0}{I_f} = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad 9$$

Esta ecuación es la misma que la 5, si se incluye la condición de que  $K_{as}=0$ .

La representación de  $I_f^0 / I_f$ , en el caso de operar este mecanismo, en función de  $[Q]$  da una línea recta, cuya pendiente es la llamada constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ), es el producto de  $k_q \tau_0$ .

Una característica importante del quenching dinámico o colisional es que, según queda explícito en las ecuaciones 8 y 9, involucra un decrecimiento equivalente en los cocientes de  $I_f$  y  $\tau$ , o sea:



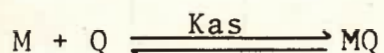
$$I_f^{\circ} / I_f = \tau_0 / \tau$$

10

### Quenching estático

El quenching estático o por asociación, es el otro mecanismo alternativo, que ocurre como resultado de la formación de un complejo en el estado fundamental no fluorescente entre el cromóforo y el quencher. Cuando éste complejo absorbe luz, retorna inmediatamente al estado fundamental sin emisión de un fotón.

La dependencia de la intensidad de fluorescencia con la concentración del quencher, se deriva fácilmente considerando la constante de asociación para la formación del complejo, según el equilibrio:



de modo que la expresión de  $K_{as}$  es:

$$K_{as} = \frac{[MQ]}{[M][Q]} \quad 11$$

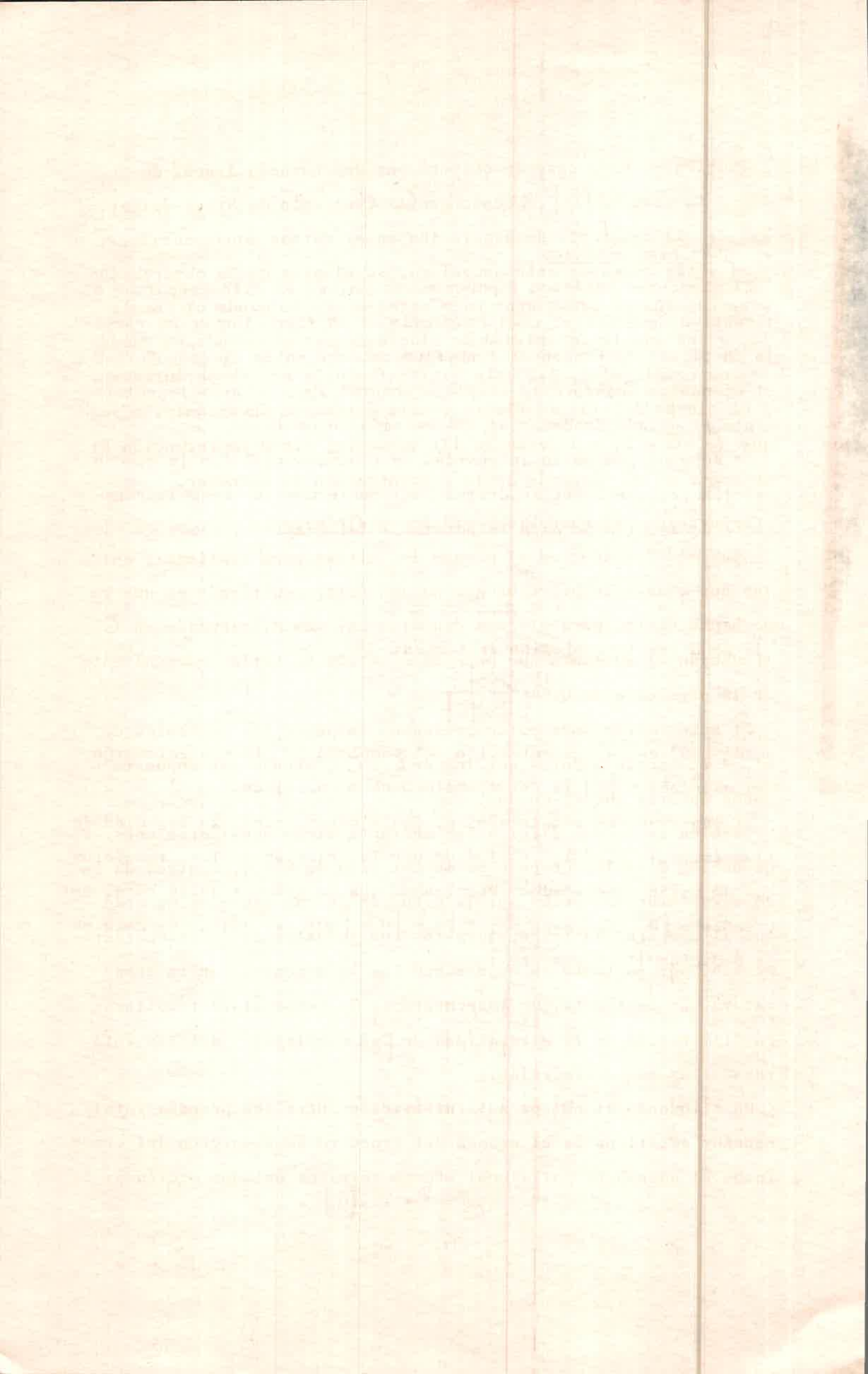
donde  $[MQ]$  es la concentración del complejo,  $[Q]$  la concentración del quencher y  $[M]$  la del cromóforo no complejoado.

Si las especies complejadas no son fluorescentes, la fracción de fluorescencia  $I_f^{\circ} / I_f$  está dada por la fracción de los cromóforos que no están complejados. Recalcando que la concentración total del cromóforo  $[M_0]$  está dada por:  $[M_0] = [M] + [MQ]$ , y sustituyéndola en la ecuación 11 se obtiene:

$$K_{as} = \frac{[M_0]}{[M][Q]} - \frac{1}{[Q]} \quad 12$$

Sustituyendo la  $[M]$  por las intensidades de fluorescencia y reordenando 12, se obtiene:

$$I_f^{\circ} / I_f = 1 + K_{as}[Q] \quad 13$$



También en este caso se observa una dependencia lineal de  $I_f^\circ / I_f$  con la  $[Q]$ , excepto que la constante de Stern-Volmer  $K_{sv}$ , es la constante de asociación en el estado fundamental.

Al estar operando este mecanismo, se elimina de la observación una fracción de cromóforos pues estos están formando el complejo, o sea que la intensidad de fluorescencia observada es desde los no complejados. Así esta última fracción no es perturbada y el tiempo de vida de fluorescencia permanece invariante, o sea que  $\tau_0 / \tau = 1$ , a diferencia del quenching dinámico (ecuación 8) en donde el  $\tau$  depende de la concentración de quencher.

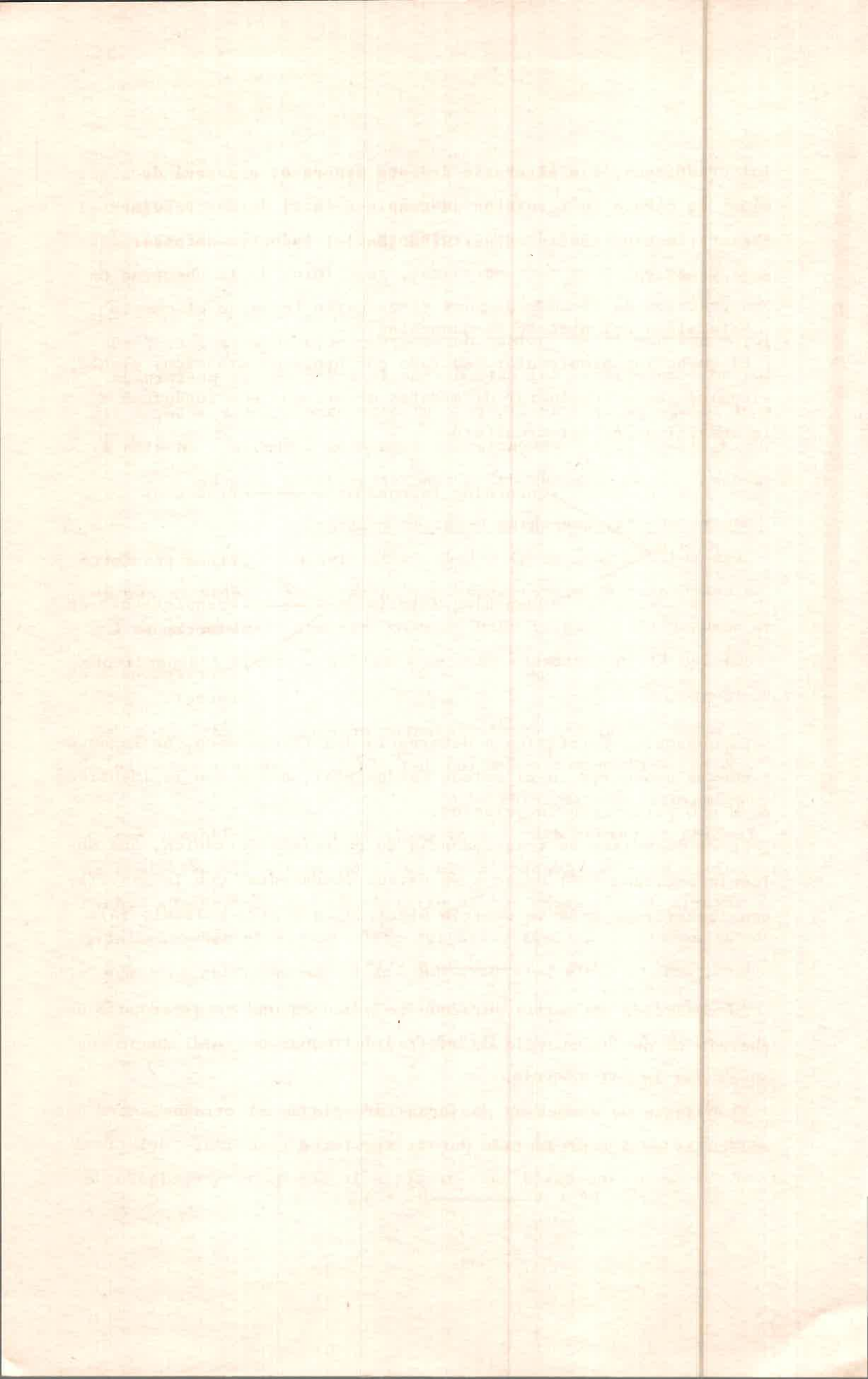
#### Comparación del quenching estático y dinámico

Las medidas de  $\tau$  es el método definitivo para distinguir entre las dos clases de procesos que pueden estar ocurriendo ya que como hemos visto, para el caso dinámico hay una disminución en  $\tau$  (ecuación 8) en tanto que para el estático  $\tau$  sería independiente de la presencia de Q.

Si ambos mecanismos están presentes entonces los cocientes de  $I_f^\circ / I_f$  serán mayores que los de  $\tau_0 / \tau$ , siendo por supuesto ambos mayores que la unidad.

También se pueden diferenciar mediante otras consideraciones. El quenching dinámico depende de la colisión de  $M^*$  y Q, controlada en la mayoría de las veces por la difusión de las especies. De modo que al aumentar la temperatura los coeficientes de difusión incrementan, por lo tanto se espera que las  $k_q$  aumenten con la temperatura. En contraste, un incremento de la temperatura resultaría en disminución de la estabilidad de los complejos y así los valores de las  $K_{sv}$  decrecerían.

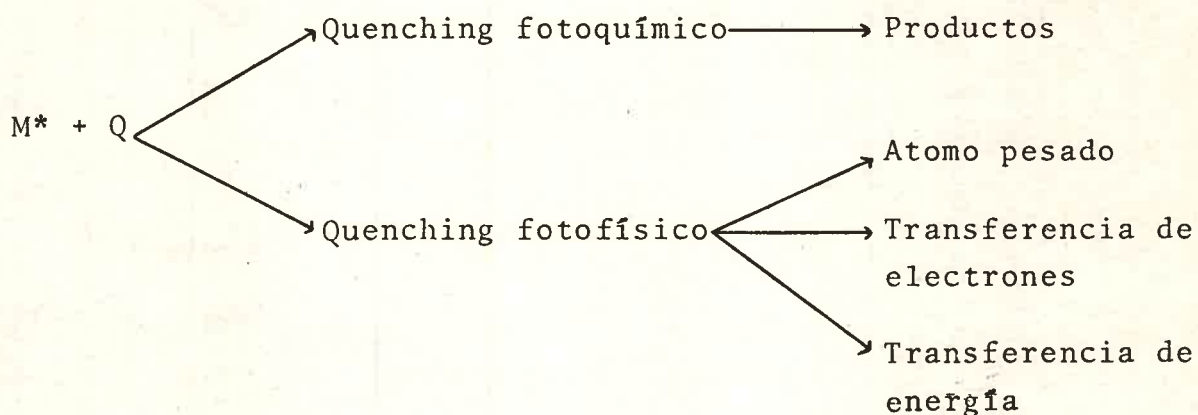
Un método adicional para la distinción entre los procesos dinámicos y estáticos es el examen del espectro de absorción del cromóforo. El quenching colisional afecta sólo los estados excitados de



los cromóforos, sin alterarse de esta manera el espectro de absorción. En cambio la formación de complejo en el estado fundamental frecuentemente resulta en perturbación del espectro de absorción del cromóforo.

#### Naturaleza del proceso de quenching

El quenching bimolecular asociado con procesos dinámicos o colisionales puede involucrar diferentes mecanismos que conduzcan a la desactivación del cromóforo.<sup>15</sup>



El quenching fotofísico a diferencia del fotoquímico, no conduce a nuevos productos en el estado fundamental, o sea que la identidad de M y Q permanecen invariantes.

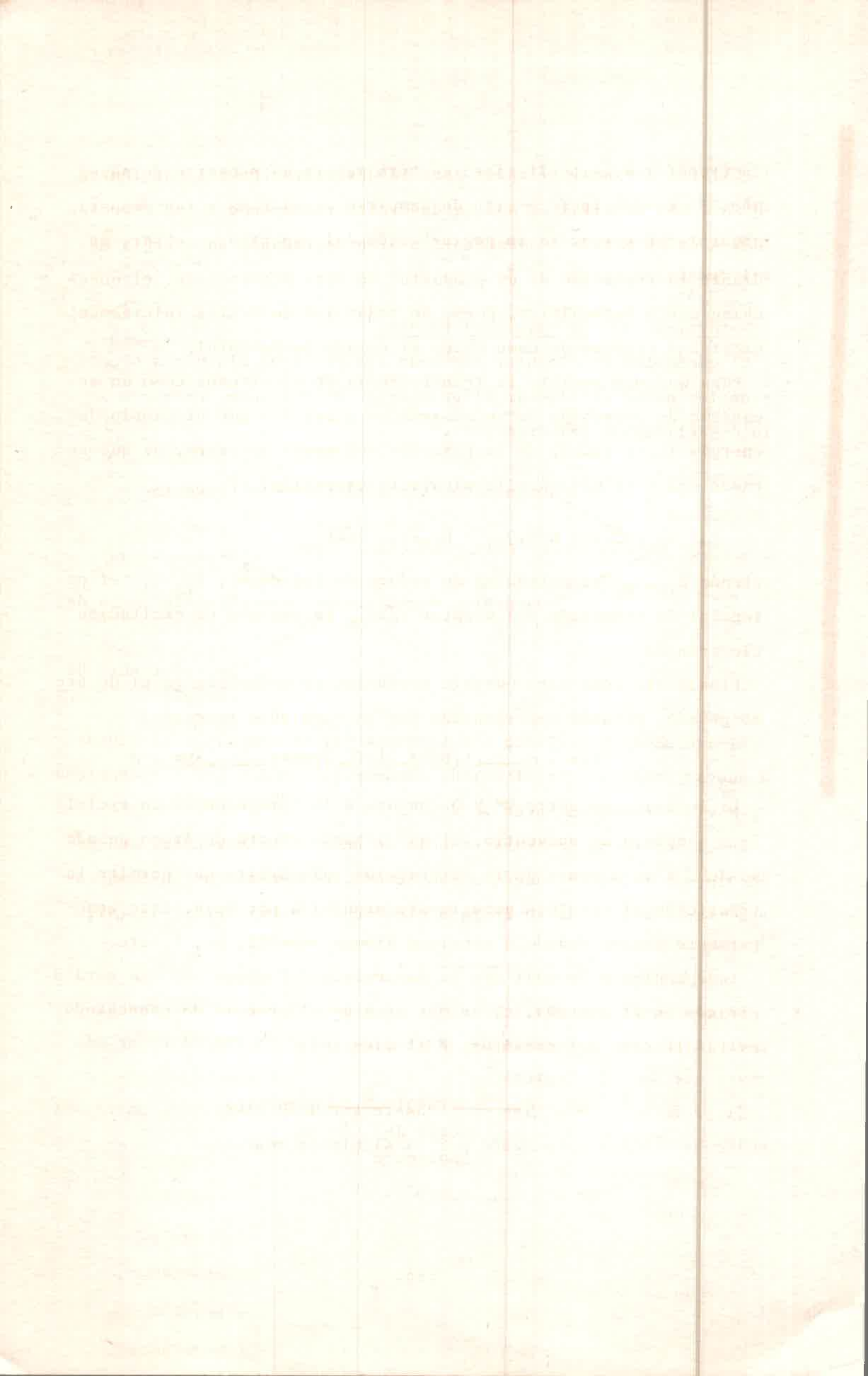
En el mecanismo de transferencia de energía electrónica, una molécula excitada (D\*) decae a su estado fundamental con la simultánea transferencia de su energía electrónica a otra molécula (A).



La condición necesaria para que se produzca una transferencia de energía es que la energía de excitación (banda 0-0) del donador sea mayor que la del aceptor.

El proceso de quenching por transferencia de electrones entre dos moléculas está representada por la siguiente reacción:





Existen dos posibilidades para la desactivación del par iónico  $D^+ A^-$ . Una de ellas es que se desexcite retornando a las especies D y A en el estado fundamental, o bien degradando su energía mediante la formación de un producto. En este último caso, el quenching sería fotoquímico, pues, no todas las moléculas inicialmente excitadas retornaron como tales al estado fundamental.

Para que sea posible la transferencia de electrones como un mecanismo de quenching en un sistema es necesario que el cambio de energía libre ( $\Delta G$ ) de la reacción sea menor que cero, el que se puede calcular mediante la siguiente expresión:

$$\Delta G = E_{(D^+/D)} - E_{(A^-/A)} - \Delta E_{00}$$

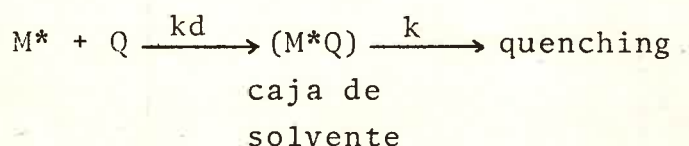
siendo  $E_{(D^+/D)}$  el potencial de reducción del donador,  $E_{(A^-/A)}$  el potencial de reducción del aceptor y  $\Delta E_{00}$  la energía de excitación electrónica.

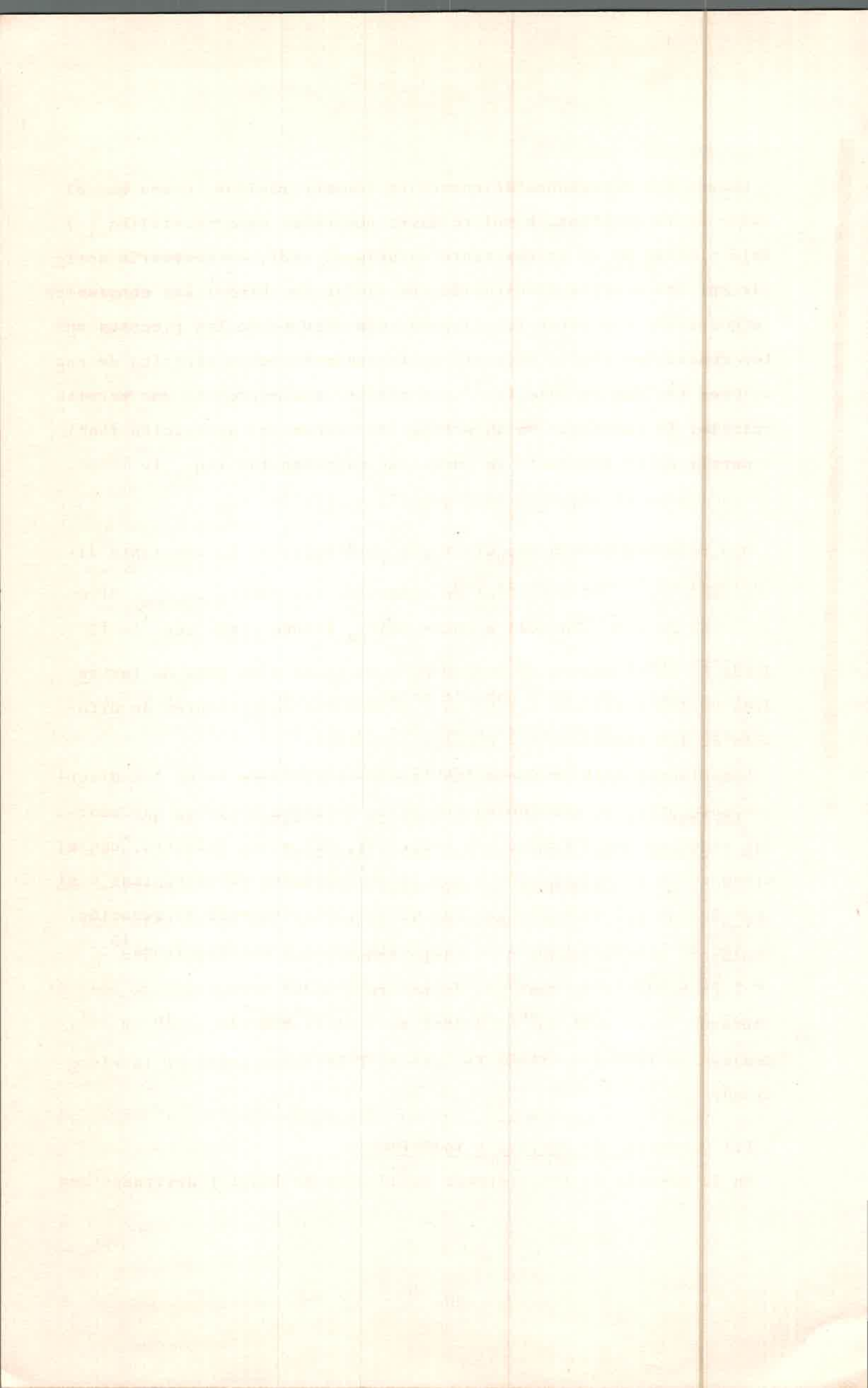
Finalmente como otro posible mecanismo de quenching es el de átomo pesado, estando representado por la siguiente reacción:



La interacción entre  $M^*$  y Q conduce a la formación de un exciplexo o complejo de encuentro. El así llamado efecto de átomo pesado se debe a un aumento de la interacción spin-órbita que permite la transición al triplete normalmente prohibida por spin. Esto generalmente ocurre cuando Q contiene átomos como Cl, Br, I, etc.

Independiente de cual sea la naturaleza del mecanismo que está operando en el sistema, el primer paso en el proceso de quenching es la difusión del cromóforo y el quencher:





Cuando las reacciones de quenching son muy rápidas, o sea que el valor de la constante bimolecular de quenching experimental ( $kq_{exp}$ ) está próximo al de la constante difusional ( $kd$ ), es necesario corregir por los efectos de difusión con el fin de obtener las constantes de quenching que están relacionadas con algunos de los procesos antes descritos ( $kq'$ ). Mediante un tratamiento de la cinética de reacciones rápidas en solución<sup>48</sup>, se obtiene una expresión que permite calcular la constante de quenching controlada por activación ( $kq'$ ) a partir de la constante de quenching experimental ( $kq_{exp}$ ).

$$1/kq_{exp} = 1/kd + 1/kq' \quad 14$$

Una relación comúnmente utilizada para calcular la constante difusional es la ecuación de Debye<sup>15</sup>:

$$kd = 4\pi a (Da + Db) N_0 / 1000 \quad (M^{-1}seg^{-1}) \quad 15$$

donde  $N_0$  es el número de Avogadro,  $a$  es igual a la suma de los radios de los reactivos A y B,  $Da$  y  $Db$  son los coeficientes de difusión de los reactivos A y B respectivamente.

Normalmente para predecir los valores máximos de  $kq$  en los diversos solventes, se consideran una serie de aproximaciones que son: las especies que difunden son esféricas, del mismo diámetro, con el mismo radio de interacción y que las velocidades macroscópicas y microscópicas del solvente son las mismas. Sustituyendo la ecuación de Stokes-Einstein que tiene implícito estas consideraciones<sup>49</sup>:

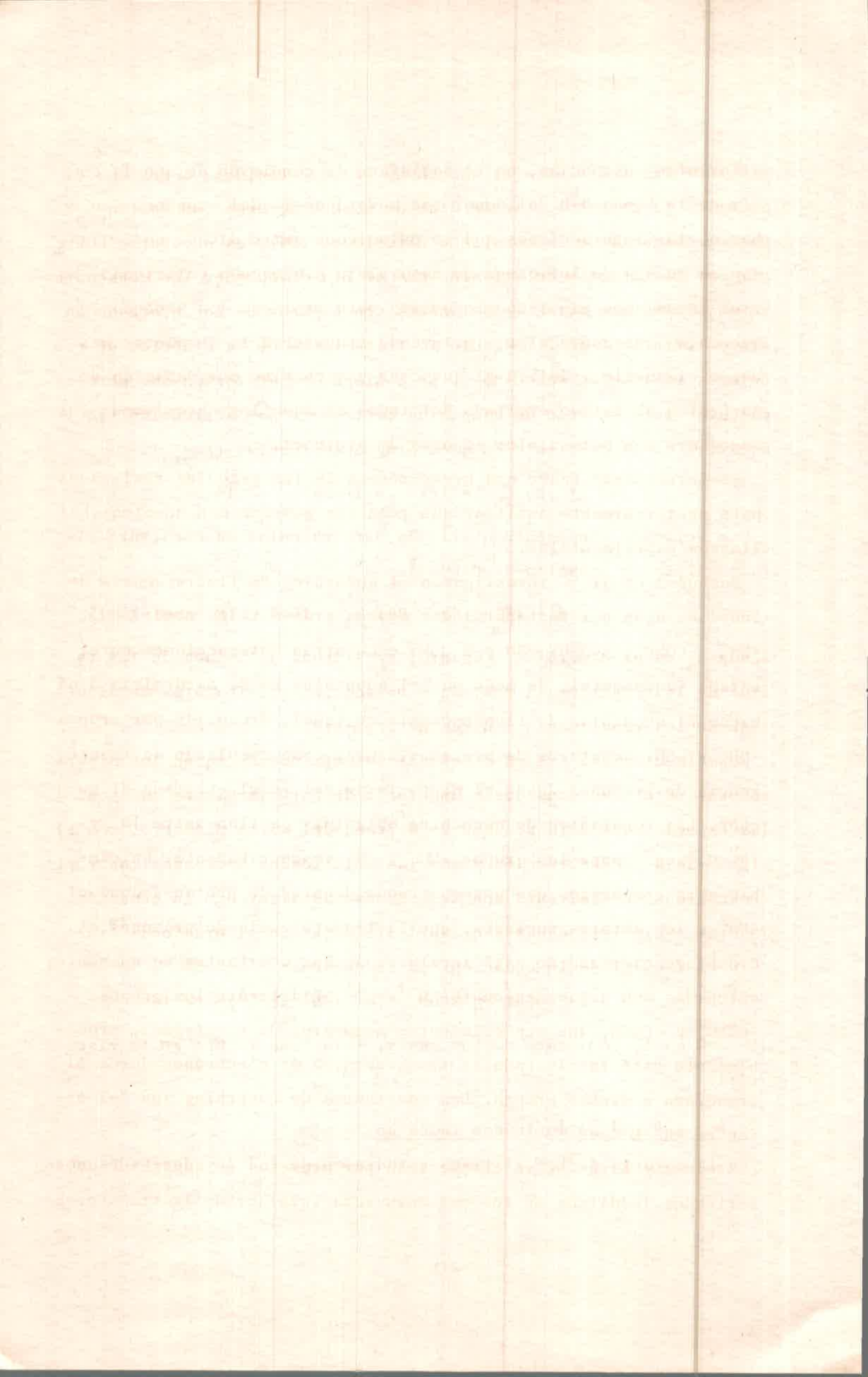
$D = kT / 6\pi\eta r$  en la ecuación 15, se obtiene:

$$kd = 8RT / \eta \cdot 3000 \quad (M^{-1}seg^{-1}) \quad 16$$

donde  $R$  es la constante de los gases,  $T$  la temperatura y  $\eta$  la viscosidad.

#### I.4 Quenching de derivados indólicos

En la mayoría de los sistemas estudiados de Indol y derivados con



diferentes sustancias, no se satisface la condición de que la energía de la banda 0-0 del donador sea mayor que la del aceptor. Sin embargo, las interacciones que se establecen entre dichas moléculas, son en muchos de los casos de naturaleza dinámica o colisional. Varios mecanismos han sido propuestos para explicar los procesos de quenching intermolecular, incluyendo transferencia de electrones desde el anillo indólico al quencher y quenching por donación de un protón al estado excitado del Indol en aquellos casos donde los quenchers son potenciales donores de protones.

Es interesante hacer una breve reseña de los estudios realizados para posteriormente analizar que relación guardan con nuestros hallazgos experimentales.

Bushueva et al.<sup>50</sup> investigaron el quenching de fluorescencia de Indol en agua por sustancias que poseen grupos tales como:  $-\text{NH}_3^+$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{CONH}_2$ ,  $-\text{CONH}^-$ ,  $-\text{SH}$  y  $-\text{S}^-$ . No encuentran interacciones en el estado fundamental, de modo que el quenching es de naturaleza dinámico. El quenching de fluorescencia de Indol, producido por grupos  $-\text{NH}_2$  y  $-\text{SH}$ , aceptores de protones, surge como resultado de transferencia de protones desde el grupo imino del Indol excitado al quencher. Las constantes de quenching obtenidas oscilan entre  $10^7$  y  $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  para los grupos  $-\text{NH}_2$  y  $-\text{S}^-$  respectivamente. En cambio para compuestos que poseen grupos donores de protones como el  $-\text{NH}_3^+$ , los autores sugieren, que la transferencia de protones al cromóforo excitado no está involucrada. Las constantes de quenching obtenidas son del orden de  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ . Finalmente los grupos  $-\text{CONH}_2$  y  $-\text{CONH}$ , que son eficientes aceptores de electrones, probablemente esté involucrada la transferencia de electrones desde el cromóforo a dichos grupos. Las constantes de quenching son del orden de  $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ .

Steiner y Kirby<sup>39</sup>, se interesaron por procesos de quenching de los derivados indólicos en los que estuviera involucrada la transferen

Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page. The text is mirrored and difficult to decipher.

cia de electrones. Por este motivo eligieron como quenchers, sustancias aceptores de electrones. Un breve resumen de sus resultados experimentales son los que se mencionan a continuación:

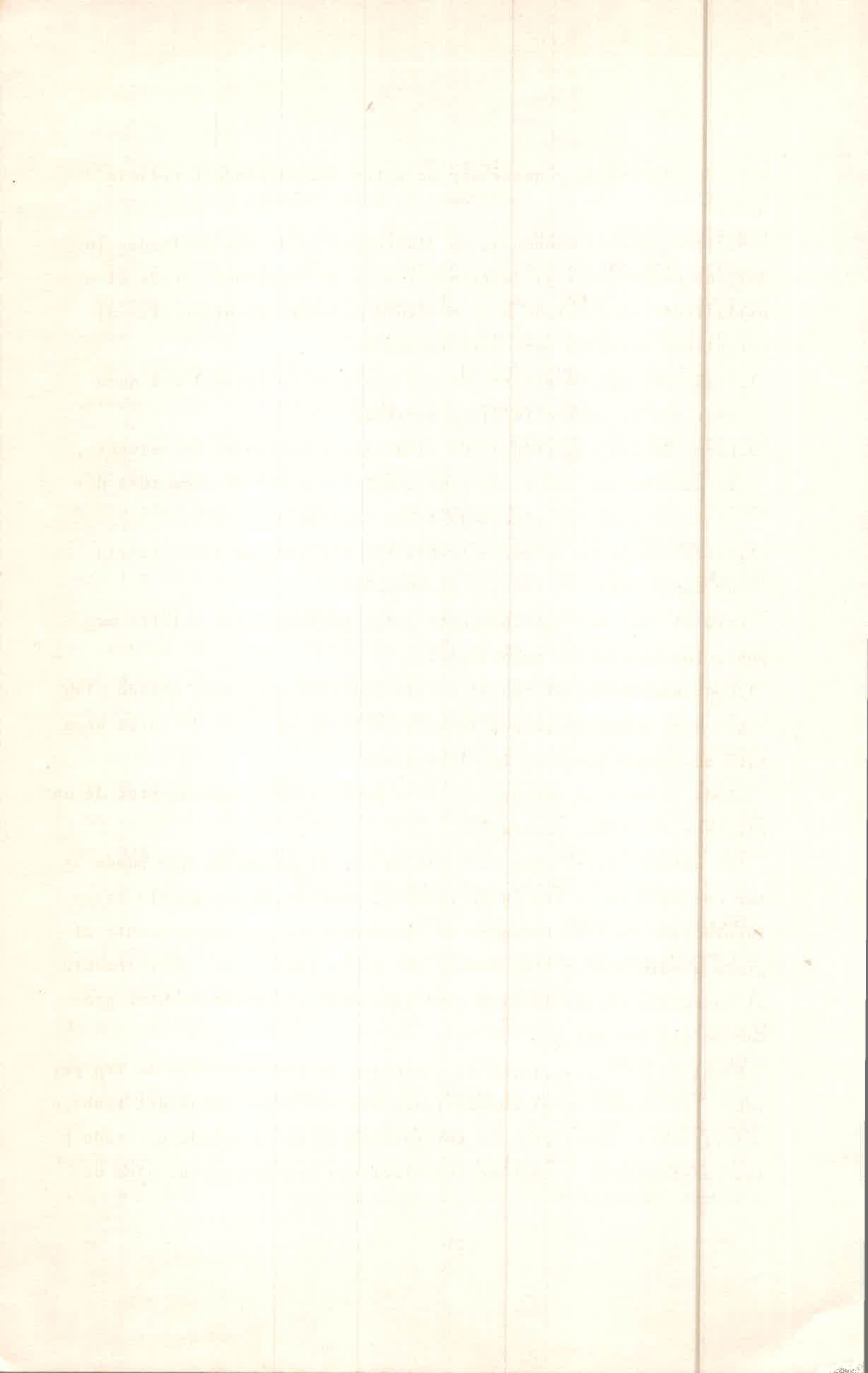
- Quenching por cationes y aniones: Los iones metálicos tales como  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Pb}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  y los aniones  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{IO}_3^-$  y fumarato son eficientes aceptores de electrones y a su vez efectivos quenchers de los derivados de Indol. En contraste los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Ba}^{+2}$  y los aniones  $\text{CNS}^-$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{HCOO}^-$ ,  $\text{SO}_4^{-2}$  y citrato son inactivos en ambos aspectos.

- Quenching por aminoácidos, péptidos y compuestos que contienen azufre: Nuevamente se encuentra que los compuestos más eficientes como quenchers son aquellos cuyas constantes de captura de electrones ( $k_e$ ) se aproximan a valores difusionales. Ejemplos de tal comportamiento lo constituyen  $\text{S}_2\text{C}$ , Tiourea, Cisteína, Histidina y Cistina. La  $k_e$  de Prolina es la misma que la de Lisina, si bien el primo es significativamente más eficiente como quencher. Los autores lo atribuyen a que posiblemente se forme un complejo en el estado fundamental entre Prolina y derivados de Indol.

- Quenching por compuestos alifáticos sin carga: Los hidrocarburos clorados tales como Cloroformo y Tetracloruro de carbono, se combinan con los electrones a velocidades controladas por difusión siendo además eficientes quenchers de los derivados indólicos en soluciones acuosas.

El mecanismo dominante de quenching es la desactivación del estado excitado, con la excepción de algunos aminoácidos tales como Arginina, Histidina, Prolina y Cisteína que forman complejos en el estado fundamental.

Los autores resaltan el hecho de que, la eficiencia de quenching puede estar influenciada por factores tales como, naturaleza de la sustitución en el derivado indólico, tamaño y densidad de carga del quencher, factores estéricos, de modo tal que los procesos de cap-



tura de electrones y quenching no esten necesariamente relacionados.

Sugieren que el quenching de fluorescencia de los derivados indólicos puede resultar de transferencia de electrones desde el anillo indólico excitado a la molécula aceptor. Plantean tres alternativas posibles para este mecanismo:

1. Transferencia de electrones por contacto colisional del quencher con el anillo indólico excitado.
2. Eyección del electrón desde el anillo a moléculas de solvente, su combinación con el aceptor compitiendo con la recaptura por el Indol o escape al estado libre solvatado.
3. Formación de un complejo transiente del tipo de transferencia de carga entre el Indol y el quencher.

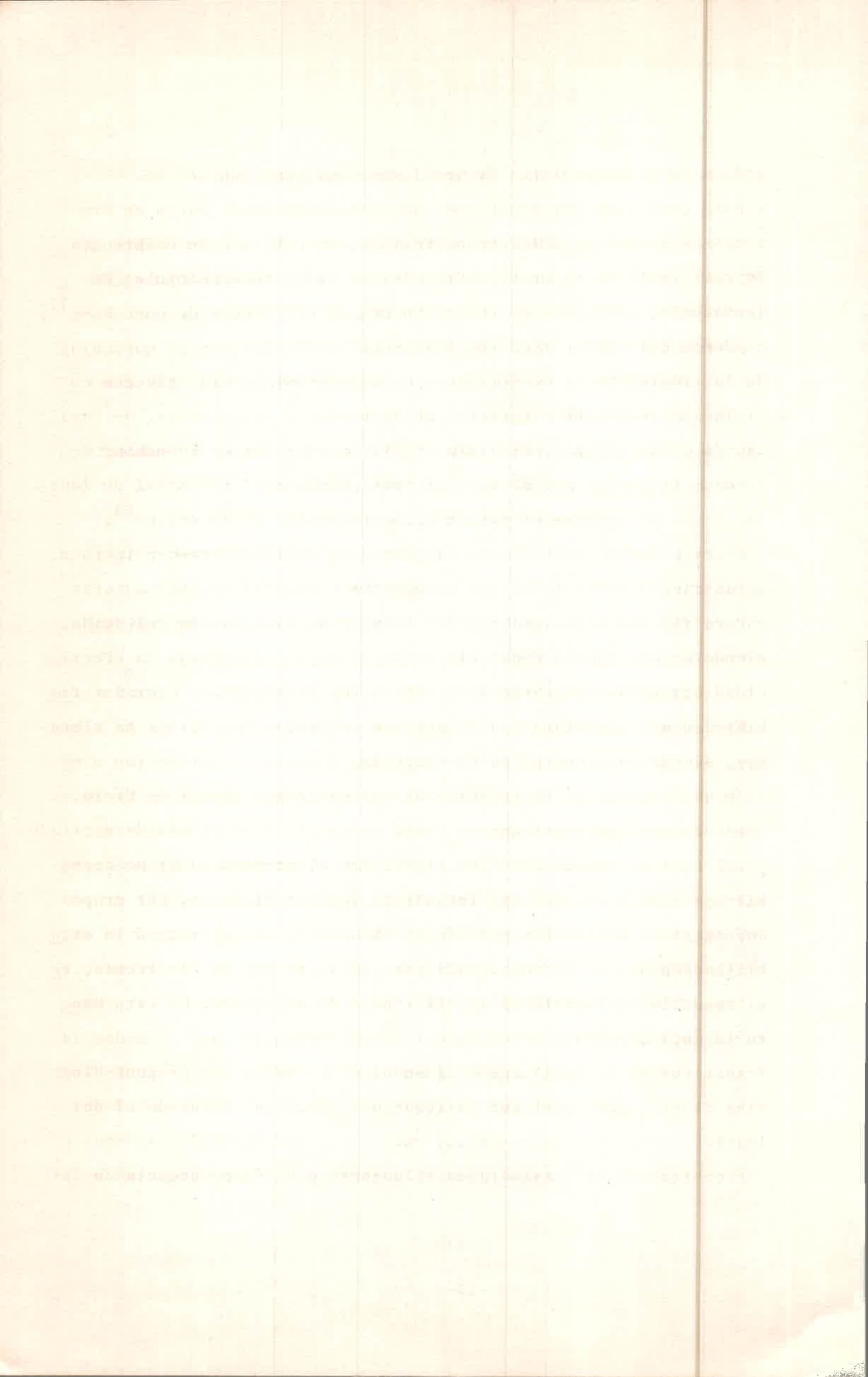
Para el caso del quenching por iones protones, los autores proponen los siguientes mecanismos:

1. Combinación del protón al anillo indólico excitado, siendo plausible esta posibilidad por la existencia de un sitio de carga negativa en exceso sobre el Indol excitado.

2. Dada la gran  $k_e$  del protón, éste puede actuar como aceptor de un electrón del Indol excitado.

Los autores relacionan esto último con el mecanismo que puede estar operando en el Trp Zwitterionico, sugiriendo que podría estar involucrada la transferencia de electrones ya sea directamente al grupo amonio o al protón donado por dicho grupo y que posiblemente el quenching intramolecular esté vinculado al intermolecular producido por los AAa.

Ricci et al.<sup>51</sup> estudiaron el quenching de fluorescencia de Trp por iones lantánidos cuyas conclusiones son similares a las del trabajo anteriormente descrito. La interacción es en el estado excitado y las constantes de quenching correlacionan con los potenciales de



reducción polarográficos de los iones, así como con las  $k_e$ .

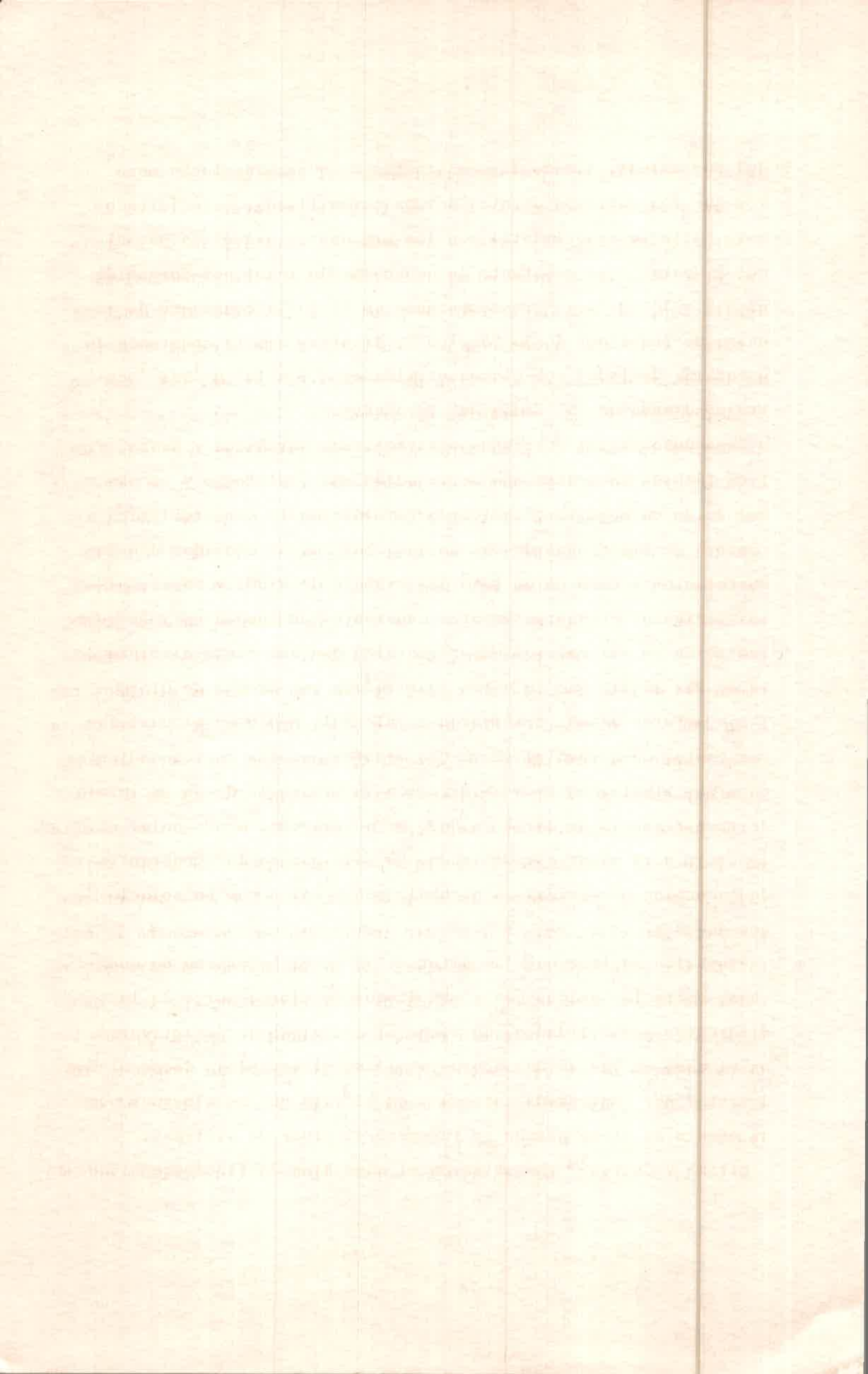
Para decidirse por mecanismos de transferencia de carga en procesos de quenching del estado excitado, se verificó la existencia de correlaciones de propiedades físicas tales como potencial de ionización, potencial de reducción con la eficiencia de quenching<sup>37</sup>.

Además del caso citado con los iones lantánidos, en el quenching de la fluorescencia de acridina por aminas existe una estrecha correlación entre las constantes de quenching y el potencial de ionización de la amina<sup>52</sup>. Similarmente las constantes de quenching de cetonas triplete por aminas correlacionan con el potencial de ionización de la amina y el potencial de reducción de la cetona<sup>53</sup>.

Ricci y Nesta<sup>37</sup> estudiaron el quenching de fluorescencia intra e intermolecular del Indol por compuestos carbonílicos. Los autores encuentran una correlación entre  $k_e$  y  $K_a$  de disociación del ácido, siendo  $k_e$  una pseudo constante de equilibrio que refleja la efectividad del ácido como quencher. Los ácidos carboxílicos clorados también dan una correlación del tipo que presentan los ácidos no clorados, siendo las constantes de quenching mayores e incrementan a medida que aumenta la sustitución de hidrógeno por átomos de Cloro.

Los autores sugieren que se forma un complejo en el estado excitado en el cual el anillo indólico transfiere electrones al grupo carbonilo. A medida que aumenta la sustitución, en el ácido, por grupos que atraigan electrones por efecto inductivo, se favorecerá la estabilización del anión por delocalización de su par de electrones, resultando en un aumento en la eficiencia de quenching. De esta manera la secuencia de eficiencia del grupo carbonilo para acomodar la transferencia de carga desde el Indol es la misma que propone Fleming et al<sup>38</sup> para explicar el reducido  $\Phi_f$  del Trp comparado al del Indol.

Froehlich et al<sup>54</sup> estudiaron el quenching de fluorescencia de In-



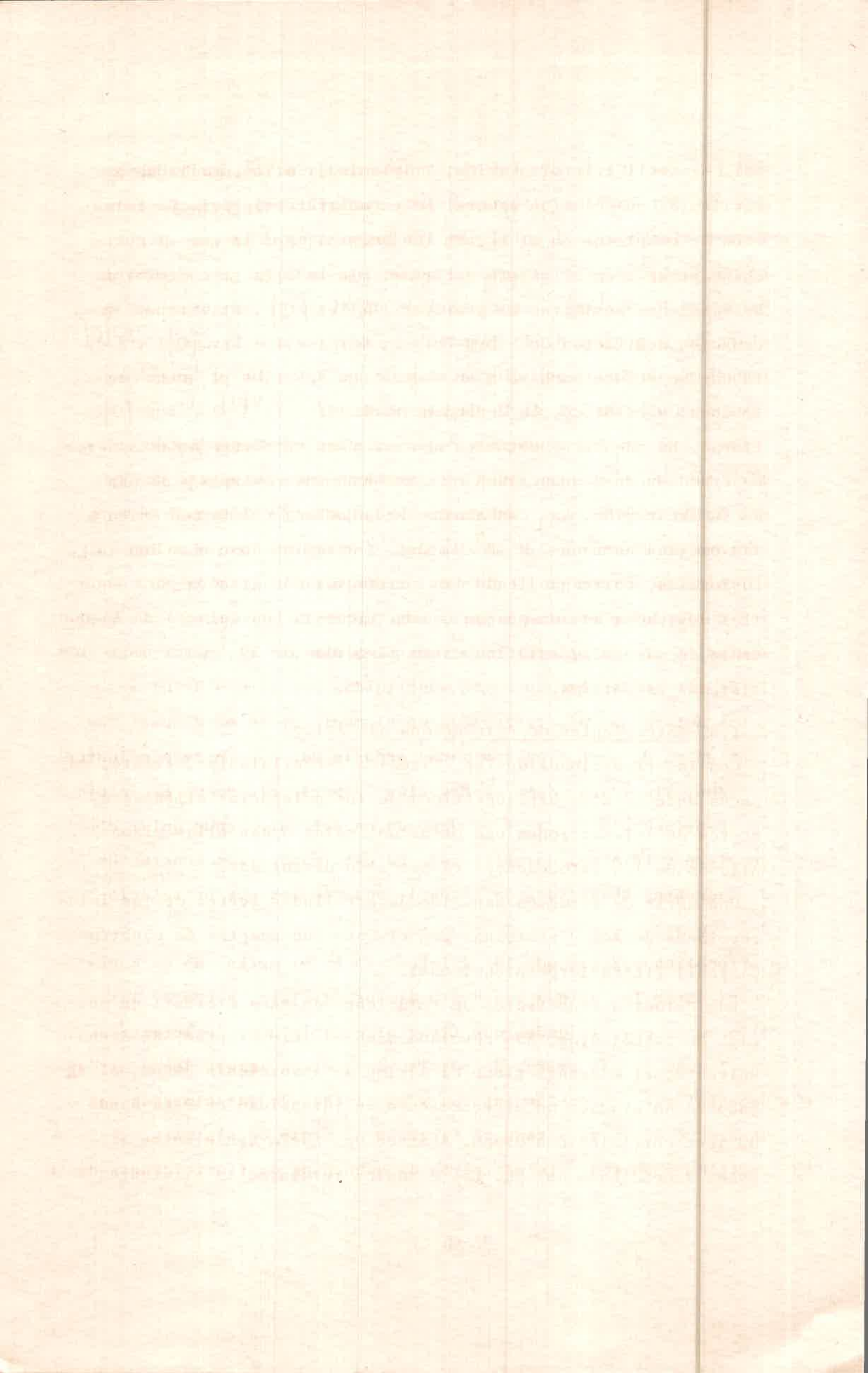
dol por amidas, siendo las constantes de quenching mucho menores que los correspondientes ácidos carboxílicos, coincidiendo este hallazgo experimental con los argumentos expuestos por Ricci y Nesta<sup>37</sup>. La constante de quenching de Indol por formamida es  $5,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  representando un 4% de la constante de quenching de Indol por ácido fórmico<sup>37</sup>, mientras que la constante de quenching de Indol por cloroacetamida es  $3,8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  correspondiendo un 73% de la de cloroacético.

Basandose en los conceptos desarrollados por Ricci y Nesta, Froehlich también encuentra una correlación entre el  $\log k_e$  y el  $pK_a$  del ácido carboxílico, indicando éste último la característica aceptora de electrones de las amidas. Las amidas cloradas dan la correlación y como en el caso del trabajo de Ricci y Nesta, estos derivados presentan mayores constantes de quenching y la representación de sus valores experimentales dan una recta distinta de la de las amidas que no están sustituidas por átomos de Cloro.

Los autores además trabajaron en alcohol, medio en el cual las constantes de quenching son mucho menores que las correspondientes en agua, ilustrando ésta observación la presencia de un exciplojo de transferencia de carga ya que, en un solvente menos polar el complejo está menos estabilizado. De esta manera las constantes de quenching observadas en alcohol, son menores que en soluciones acuosas.

Froehlich sugiere que las diferencias en el mecanismo de quenching entre las amidas con y sin átomos de Cloro, surge de las diferentes posibilidades que tiene el exciplojo de desactivarse. En el caso de las amidas no sustituidas, el exciplojo decae al fundamental por conversión interna y en el caso de las cloradas por un efecto de átomo pesado se favorece el cruce de sistemas.

Eftink y Ghiron<sup>55</sup> investigaron el quenching de fluorescencia de In



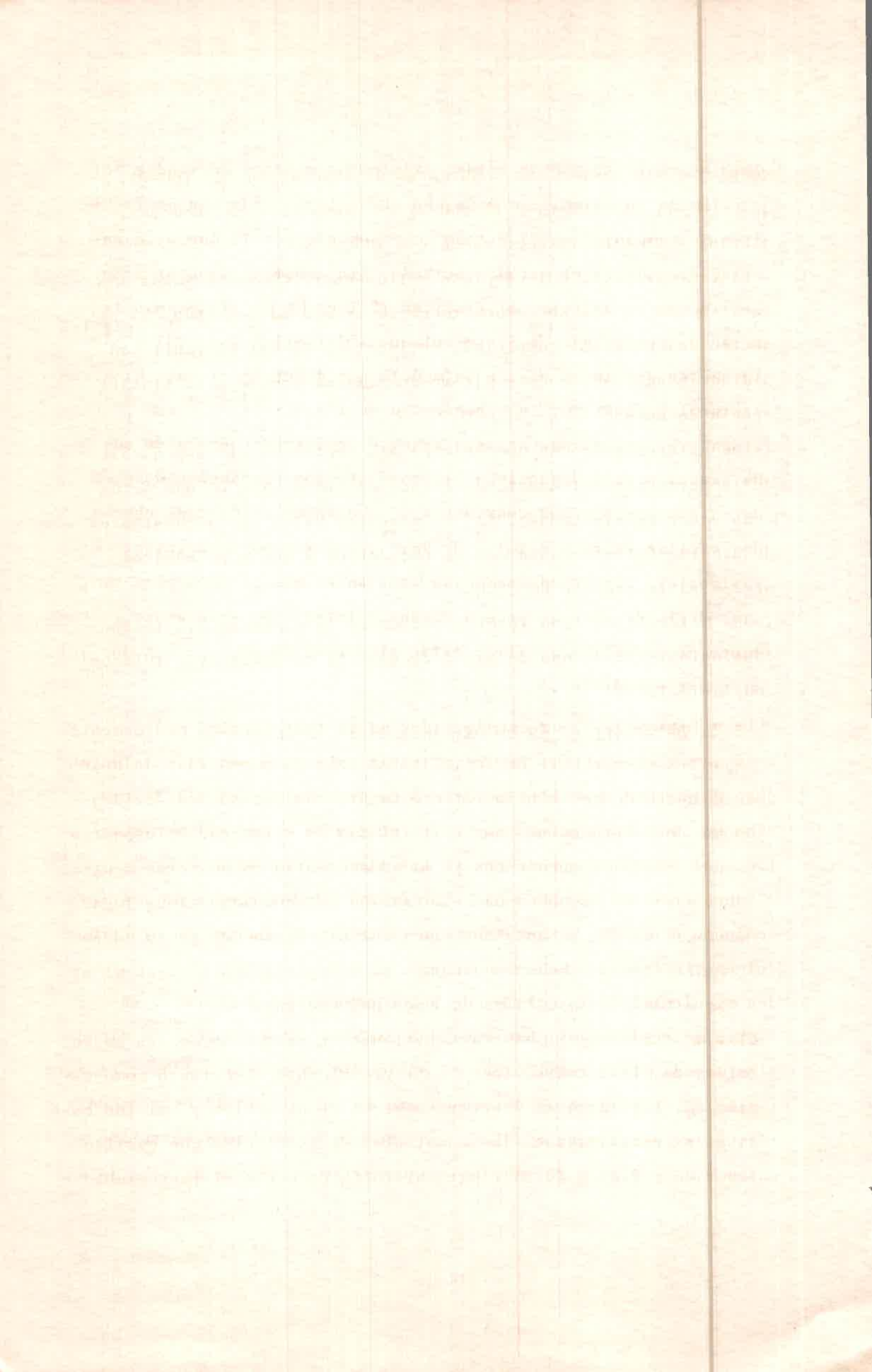
dol, N-acetil triptofan amida, Triptamina y otros derivados por acrilamida en solución acuosa. No encuentran evidencia de formación de complejos en el estado fundamental, por lo que el quenching procede en el estado excitado. Sin embargo se observaron desviaciones positivas al graficar  $I^0/I$  vs  $[Q]$ . Utilizando la ecuación modificada de Stern-Volmer,  $I^0/I = (1 + K_{sv} [Q]) e^{V [Q]}$ <sup>56</sup> la que se deduce en base a un modelo que describe el quenching colisional y estático, la dependencia de  $I^0/I (e^{V [Q]})^{-1}$  con  $[Q]$  es lineal. El quenching estático aparece como consecuencia de que una fracción de Q desactivan al cromóforo inmediatamente después de su excitación. Las constantes de quenching colisional obtenidas oscilan entre  $6-7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ , aproximándose a valores difusionales, correspondiendo las constantes más grandes para aquellos derivados que no poseen cadena lateral. Los valores de la constante de quenching estático están alrededor de  $2 \text{ M}^{-1}$  para todos los sistemas estudiados.

#### I.5. Antecedentes de Aminoácidos alifáticos

Con las excepciones de Trp, Tirosina y Fenilalanina, existen muy pocos antecedentes bibliográficos de los aminoácidos alifáticos, acerca de interacciones con otras moléculas o con ellas mismas<sup>57</sup>. Algunos de los antecedentes ya han sido discutidos.

Una serie de estudios han sido desarrollados acerca de las interacciones de AA y proteínas con el conocido aceptor de electrones Cloranil (Tetraclorobenzoquinona).

Los estudios espectrales de soluciones de AA y Cloranil en mezclas de etanol-agua, han revelado cambios interesantes. En dicho solvente, el Cloranil tiene el máximo de absorción a 290nm, el agregado de AA produce un decrecimiento en intensidad de ésta banda y un leve corrimiento a 295nm. Aparece una nueva banda entre 350 y 390nm dependiendo del pH. Los estudios revelaron la existencia de



complejos 1:1 siendo las constantes de asociación 298 (pH=5), 224 (pH=7), 318 (pH=8) y 11 (pH=7)  $M^{-1}$  para Glicina, Leucina, Alanina y Prolina respectivamente a 20°C.

El espectro I.R. del complejo sólido entre Cloranil y los AAa muestra que el AAa se encuentra en su estado no ionizado. El espectro del Cloranil complejado es idéntico al del Cloranil con hidroquinona, siendo éste último un clásico complejo de transferencia de carga.

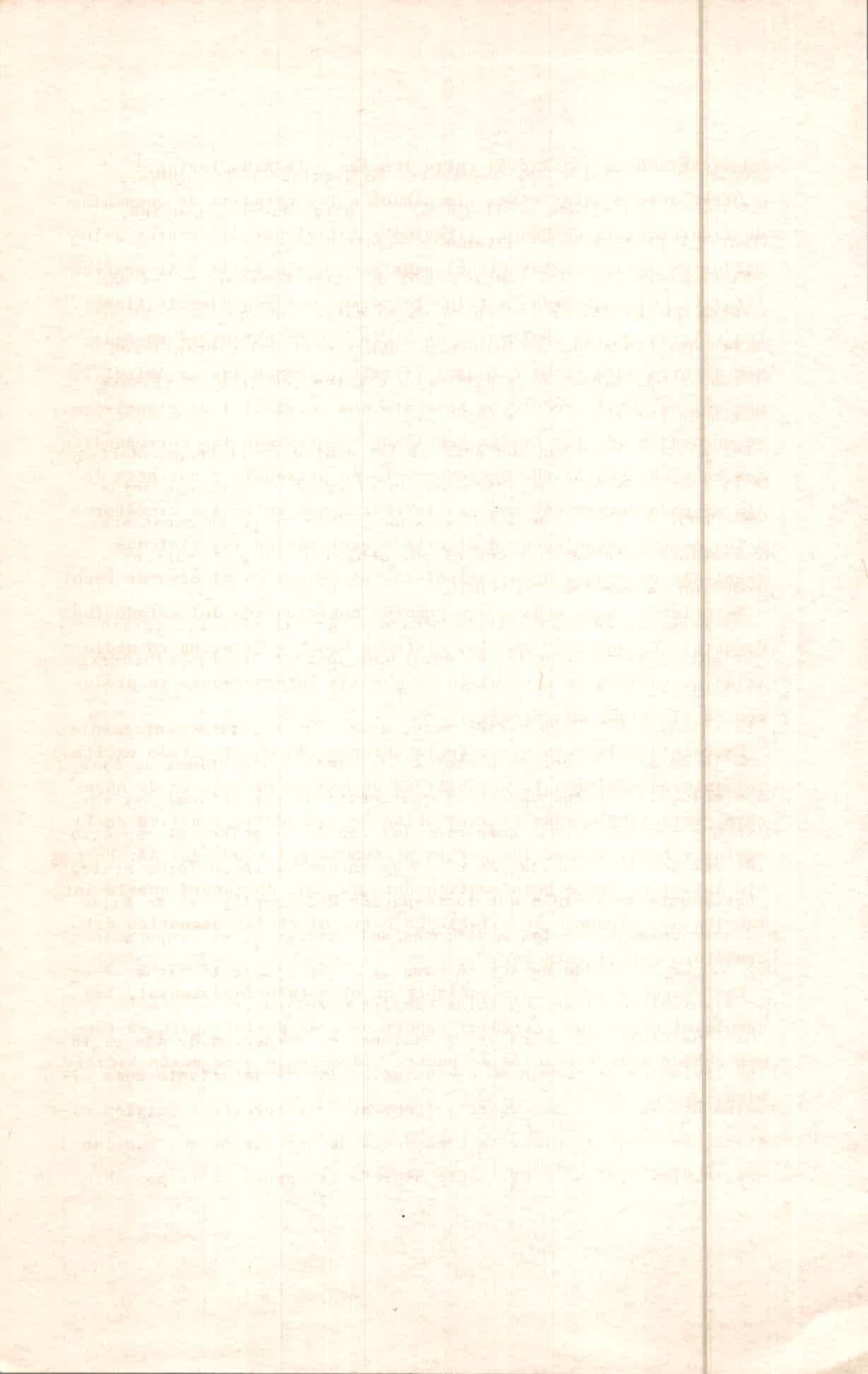
Los autores proponen que sólo el AAa neutro es el responsable de la formación del complejo, siendo el grupo  $-NH_2$  el que actúa como donador de electrones. Así es como, el valor de la constante de asociación incrementa con el pH, debido a que a pH básicos predomina la especie  $COO^-RCHNH_2$ .

Una molécula de gran interés médico es la vitamina  $B_{12}$  (Cianocobalamida) siendo uno de sus derivados la vitamina  $B_{12b}$  (Hidroxicobalamida).

La vitamina  $B_{12}$ <sup>58</sup> en estado puro, no es tan efectiva medicamente como lo es si contiene impurezas tales como AA o péptidos de bajo peso molecular. Estudios espectrofotométricos y cinéticos evidencian que los AAa forman complejos 1:1 con la vitamina. El espectro I.R. del complejo indica que el AA se encuentra en su forma neutra<sup>59</sup>.

Nuevamente se postula que la formación del complejo tiene lugar mediante donación de los electrones del nitrógeno del grupo amino del AA. La habilidad de los AA para el acomplejamiento sigue el orden siguiente: Glicina > Alanina > Serina > Prolina.

Otra molécula que sufre perturbaciones en presencia de AAa es la Riboflavina. Este compuesto es nutricionalmente importante como vitamina  $B_2$ . Por técnicas espectroscópicas de absorción y emisión estática, se establecieron las constantes de asociación que oscilan entre 0,07 y 0,45  $M^{-1}$ . El efecto hidrofóbico sería el responsable



del mecanismo de asociación entre los AAa y la Riboflavina.<sup>4</sup>

Otros antecedentes están vinculados a los estudios de quenching de fluorescencia de Fenol, Tirosina y Anisol por diferentes aminoácidos en agua, mezclas etanol-agua y en medio ácido.<sup>6</sup> Al graficar  $I^0/I$  vs  $[Q]$  se observa en todos los casos una dependencia lineal. Los valores de las constantes de Stern-Volmer obtenidas en agua, son mayores para Fenol que para Tirosina, siendo las de Anisol las más chicas. Utilizando como solvente una mezcla 1:1 de etanol-agua, se encuentra que las Ksv de Fenol son menores que las correspondientes en agua. Realizando medidas de  $\tau$  en presencia y ausencia de AAa se pudo determinar que las interacciones entre los cromóforos y los AAa se establecen en el estado excitado en los sistemas Fenol-AAa en etanol-agua, Anisol-AAa en agua y en el caso de Fenol y Tirosina en agua existe una pequeña contribución del estado fundamental. El análisis con los sistemas Fenol y Tirosina en medio ácido, condujo a la conclusión de que las interacciones se producen en el estado fundamental.

En cuanto a la naturaleza de la interacción en el estado excitado los autores sugieren la posibilidad de que en el proceso de quenching está involucrada la ionización del oxhidrilo fenólico de Tirosina y Fenol favorecida por la presencia del  $-COO^-$  del AA. En cambio Anisol no posee como sustituyente un  $-OH$ , de manera que la interacción posiblemente se establezca entre el núcleo aromático del cromóforo con el quencher.

Con respecto a las interacciones en el estado fundamental, los complejos entre los derivados fenólicos y AA posiblemente se formen debido a la formación de puente hidrógeno y asociación hidrofóbica.

Handwritten text, likely bleed-through from the reverse side of the page. The text is mirrored and difficult to decipher due to the bleed-through effect.

## II. PARTE EXPERIMENTAL

### II.1. Procedencia y pureza de las sustancias empleadas

DL-Glicina, Merck pa, purificada por recristalización de etanol-agua.

DL-Alanina, Carlo Erba RP, purificada de igual manera que Glicina.

$\beta$  Alanina, Sigma.

DL-Valina, Fluka puriss, purificada por recristalización de agua.

DL-Serina, Fluka puriss.

L-Treonina, Fluka puriss.

L-Prolina, Fluka puriss.

L-Hidroxiprolina, BDH, Cromatográficamente homogénea.

DL-Triptófano, Merck.

Clorhidrato de Triptamina, Sigma.

Indol, Sigma.

Acido Indol 3-acético, Koch-Light.

Hidróxido de Sodio, Carlo Erba RPE.

Fosfato monobásico de Potasio, Carlo Erba RPE.

Acido Clorhídrico, Merck.

Etilamina, Carlo Erba.

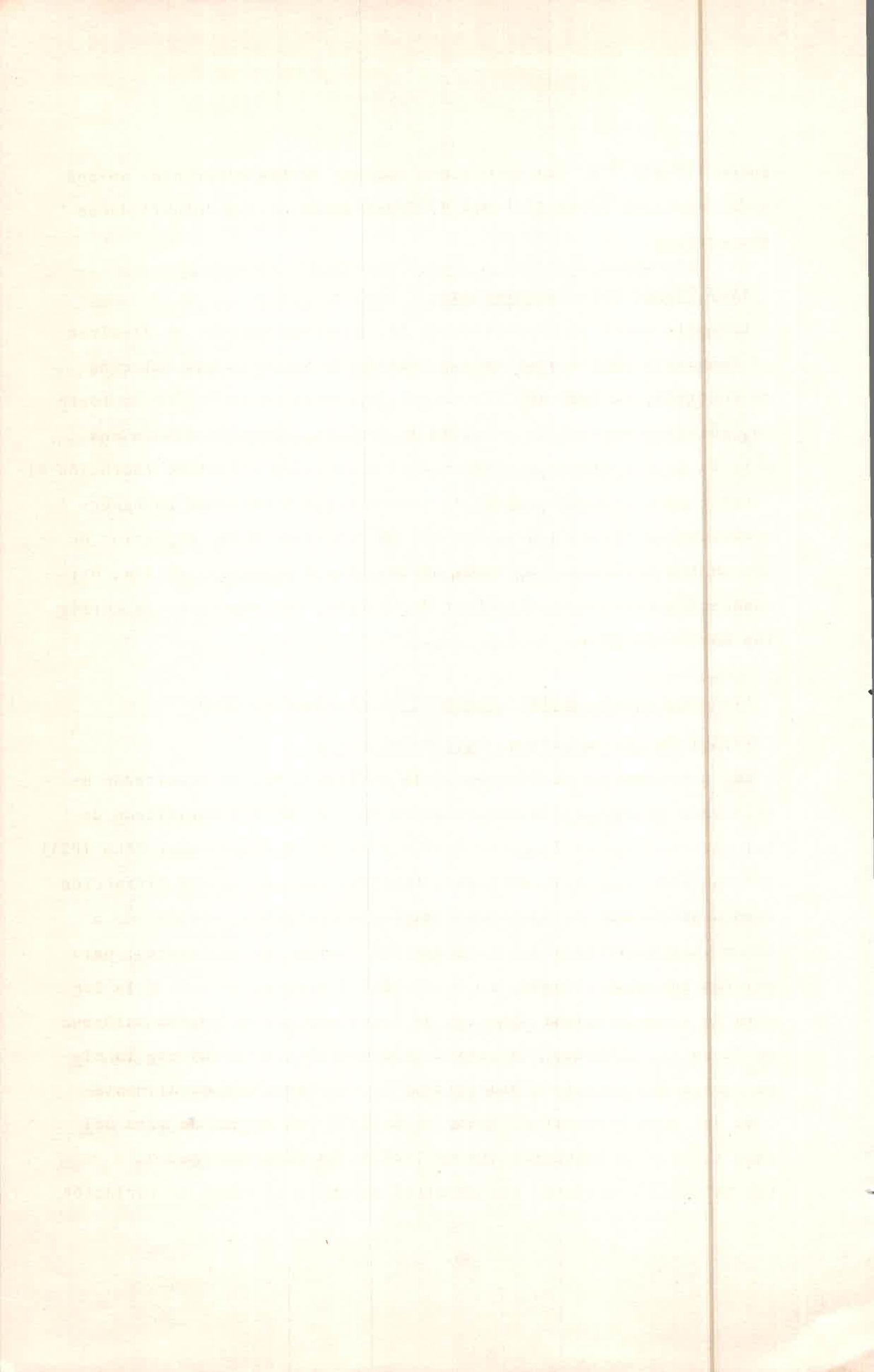
Acetato de Sodio, Carlo Erba.

Cloruro de Sodio, Carlo Erba RPE.

En los casos en que no se aclara, las drogas fueron utilizadas sin purificación previa.

Se utilizaron soluciones frescas, preparadas con agua tridestilada; en el caso de Indol-3-acético y de Triptamina sus soluciones fueron protegidas de la luz para evitar posibles fotorreacciones.

La concentración de las soluciones de los derivados indólicos utilizadas para las experiencias de fluorescencia variaron en el ran



go de  $1-2 \times 10^{-4}$  M. Las soluciones acuosas de los diferentes aminoácidos variaron entre 0,01-0,6 M, dependiendo de las solubilidades respectivas.

## II.2. Preparación de soluciones

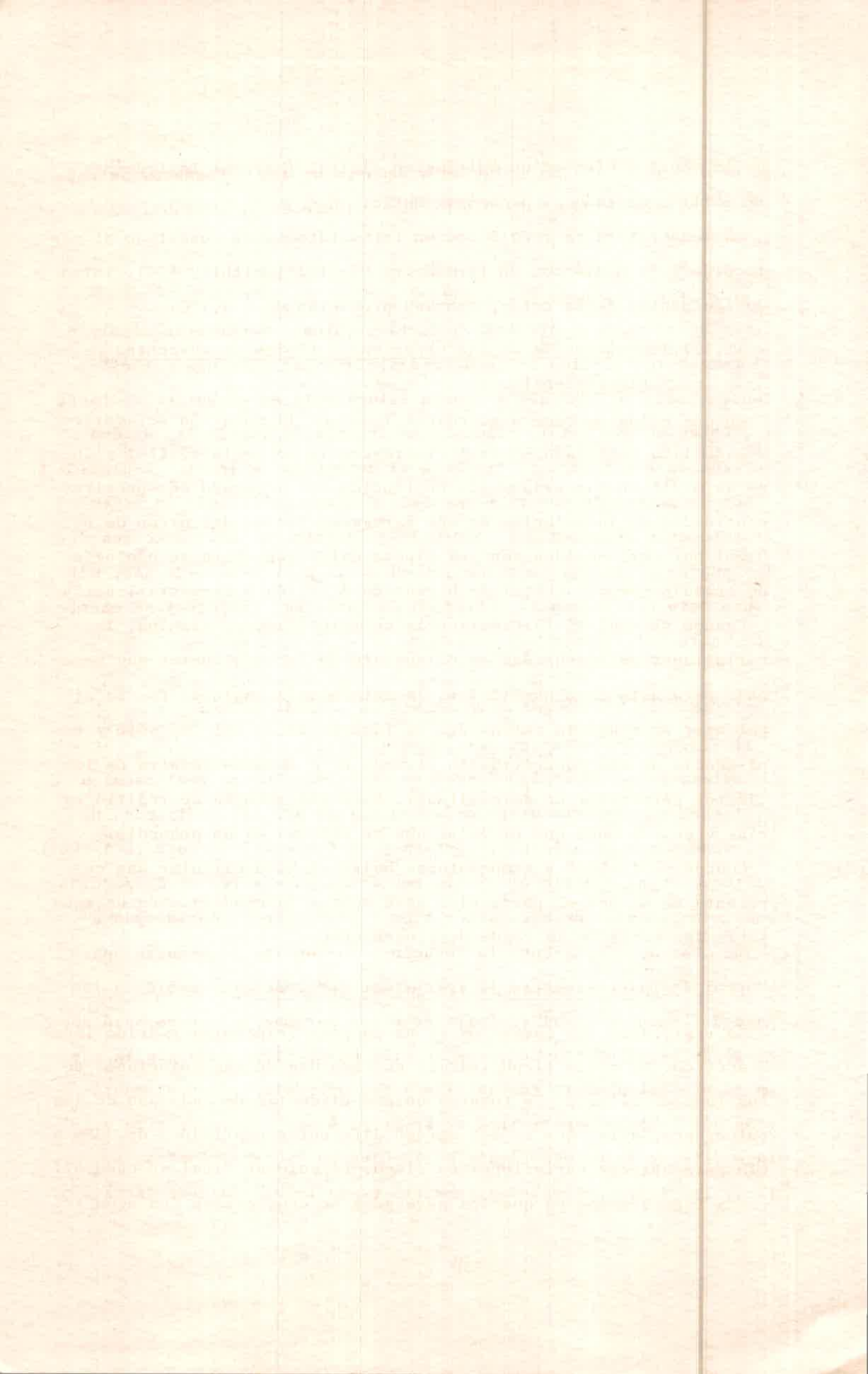
Las soluciones se prepararon de la siguiente manera: se disolvió el compuesto indólico en agua tridestilada haciendo una solución concentrada, se tomó una alícuota diluyéndola en un buffer de fosfato, obteniéndose así la solución de trabajo (Solución A); en una porción de las mismas se disolvió el aminoácido alifático (Solución B)

Los espectros de absorción se determinaron utilizando un espectrofotómetro Shimadzu U.V.-140-02. Se registraron los espectros de los cuatro derivados indólicos en ausencia y presencia de AAa, utilizando como referencia el buffer de fosfato. Los espectros se corrieron entre 350-230nm.

## II.3. Desarrollo de las experiencias de fluorescencia

### II.3.1. Medidas estáticas de fluorescencia

Las experiencias de fluorescencia estáticas fueron realizadas utilizando un espectrofotofluorómetro Aminco SPF 125 modificado de tal manera que sólo la parte óptica y el fotomultiplicador (RCA 1P21) pertenecían al aparato original, equipado con una red de difracción como monocromador de excitación tipo Czerny-Turner, optimizada a 500nm. Las modificaciones introducidas fueron las siguientes: para mejorar la estabilidad de la intensidad luminosa, se cambió la lámpara de Xenon original (Lámpara de arco) por una de cuarzo-halógeno de 24 volts, 150Watts (Lámpara de filamento) alimentada con la misma fuente del aparato (estabilizada en corriente). Como alimentación del tubo fotomultiplicador se utilizó una fuente de alto voltaje (LYP) y la fotocorriente se leyó en un picoamperímetro (Keithley 417) externo, que permitió expandir el rango de variación.



de la señal o bien en un multímetro digital (Marconi Instruments TF 2671) conectado al picoamperímetro.

La temperatura se reguló con un termostato Lauda conectado al portacelda y se midió con un termómetro Digital (Keithley 870), introducido dentro de la celda, con una precisión de  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ .

#### II.3.1.1. Realización de una experiencia típica de quenching de fluorescencia.

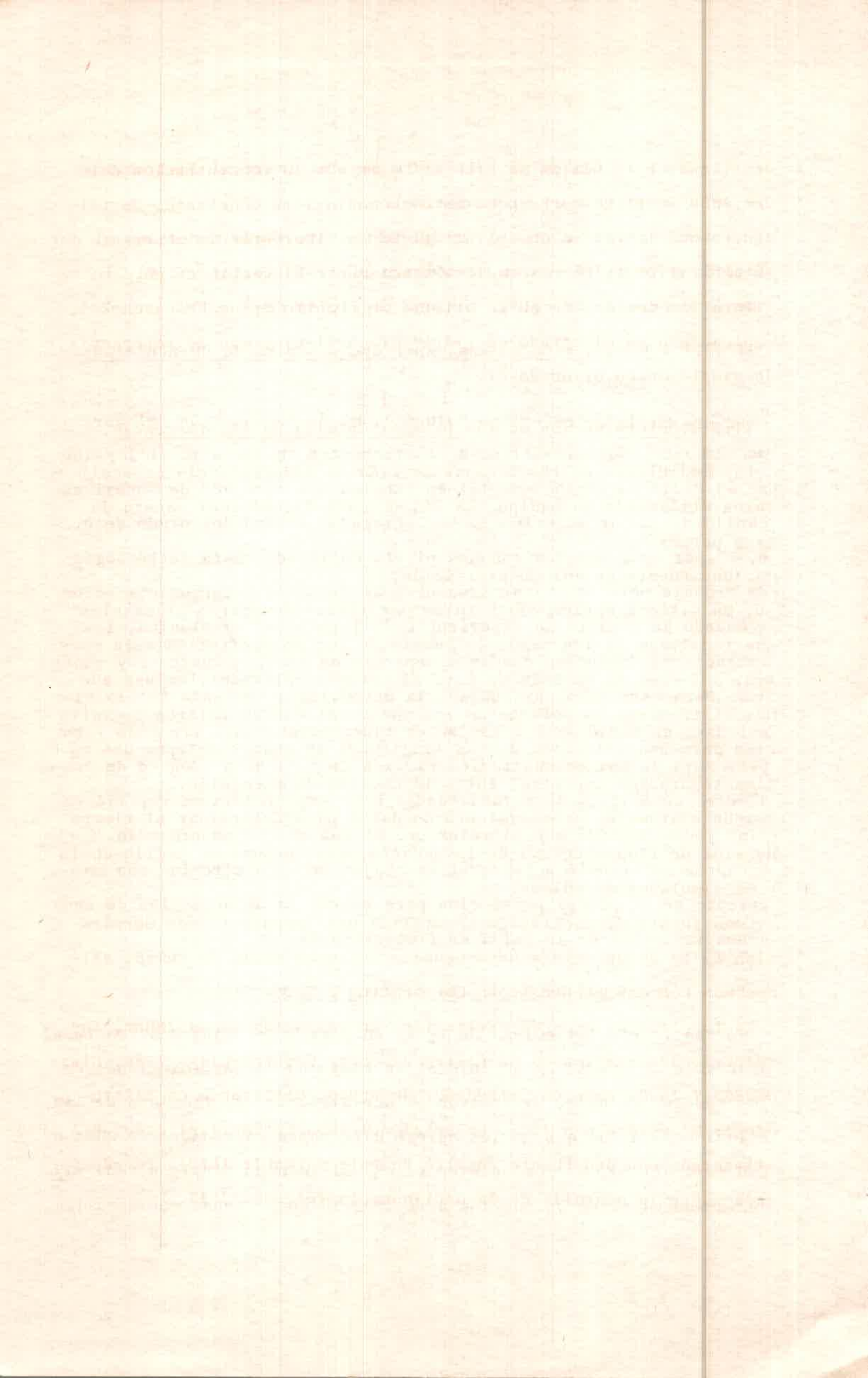
En una celda de cuarzo se colocó 1,5ml de la solución del derivado indólico (Solución A) cuya fluorescencia se registró ( $I^{\circ}$ ) y luego se midió la intensidad ( $I$ ) en función del agregado de sucesivas cantidades de la solución B. Los agregados fueron del orden de 0,2-0,3ml por vez, medidos con una pipeta calibrada. Esta metodología de trabajo permite evitar problemas de dilución y termostatación.

Cuando se realizó la experiencia de Triptófano y  $\beta$  Alanina, las variaciones de intensidad en el aparato de lectura fueron muy pequeñas. Para este caso particular, la metodología empleada fue la siguiente: se midió la intensidad de fluorescencia del Trp sólo y en presencia de una concentración elevada de  $\beta$  Alanina (dentro de los límites permitidos de solubilidad). Esta experiencia se repitió varias veces de modo que el valor que se informa es un promedio.

Cuando se trabajó a temperaturas bajas se hizo circular una corriente de  $\text{N}_2$  por el portacelda para evitar la condensación de agua sobre las caras de la celda de fluorescencia.

#### II.3.1.2. Determinación de las curvas de $I_f$ vs pH

Se realizaron las curvas de  $I_f$  vs pH para Triptamina y ácido Indol 3-acético. Se midió el pH inicial en cada una de las soluciones de los Indoles citados. Se tomaron quince alícuotas de cada una de las soluciones, a las que se les agregó diferentes cantidades de  $\text{OHNa}$  o  $\text{ClH}$  para obtener variaciones en el pH. El volumen final en cada alícuota fue el mismo ya que los agregados se completaban con agua tri



destilada. Esto último se hizo así para que la concentración del derivado indólico correspondiente se mantuviera constante, de tal manera que la variación de intensidad de fluorescencia observado en cada alícuota correspondiera exactamente al cambio de pH.

Para las medidas de pH se utilizó un pHmetro Orion Research 701, empleándose un electrodo de vidrio Orion 91-01 y uno de referencia de simple unión Orion 90-01.

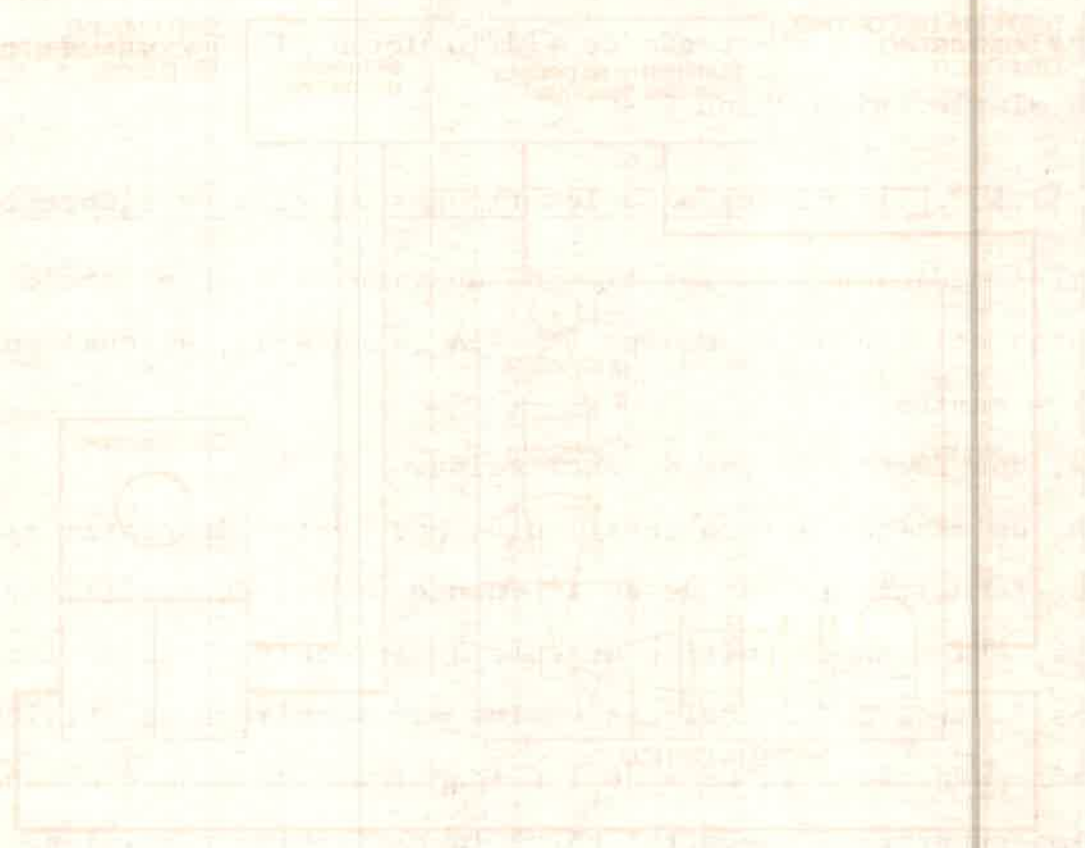
### II.3.2. Determinación de los tiempos de vida de fluorescencia.

Las mediciones de los tiempos de vida de fluorescencia se realizaron utilizando un equipo TRW 75A (Figura 4), el cual consta de tres partes<sup>43</sup>:

- a. Una fuente de luz de excitación.
- b. Un sistema optico constituido por lentes de cuarzo ajustables que focalizan la luz desde la fuente de luz de excitación a la muestra, así como la emisión de ésta al fotomultiplicador. Incluye además filtros que se colocan en los pasos opticos de emisión y excitación para una selección de las longitudes de onda y obtener una máxima separación espectral entre la excitación y emisión.
- c. Un sistema de procesamiento de datos para determinar el tiempo de vida de fluorescencia de la muestra, que incluye un osciloscopio y un simulador de pulsos.

Como fuente de excitación se utilizó una lampara (Xenon Corporation N-789 B) de veinte nanosegundos de ancho medio de pulso, alimentada con una fuente Xenon Corporation 437A.

La longitud de onda de excitación, en todos los casos 280nm, fue seleccionada utilizando un filtro de corte Corning Glass 7-54, Glass N°9863 y la de emisión, alrededor de 350nm, utilizando un filtro Jenger Glawerk & Gen 4267. La señal del tubo fotomultiplicador RCA 1P28 alimentado con una fuente de alto voltaje variable (LYP), fue desplegada sobre la pantalla de un osciloscopio Tetronix 7633.



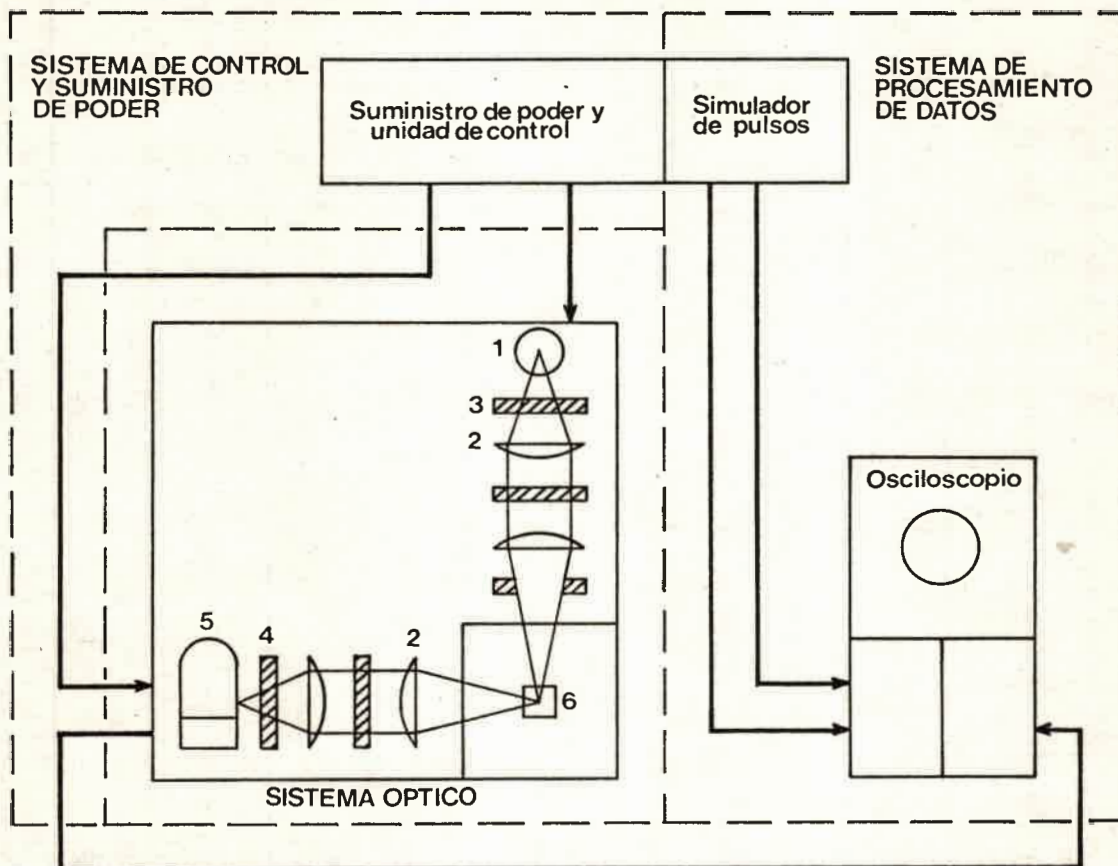
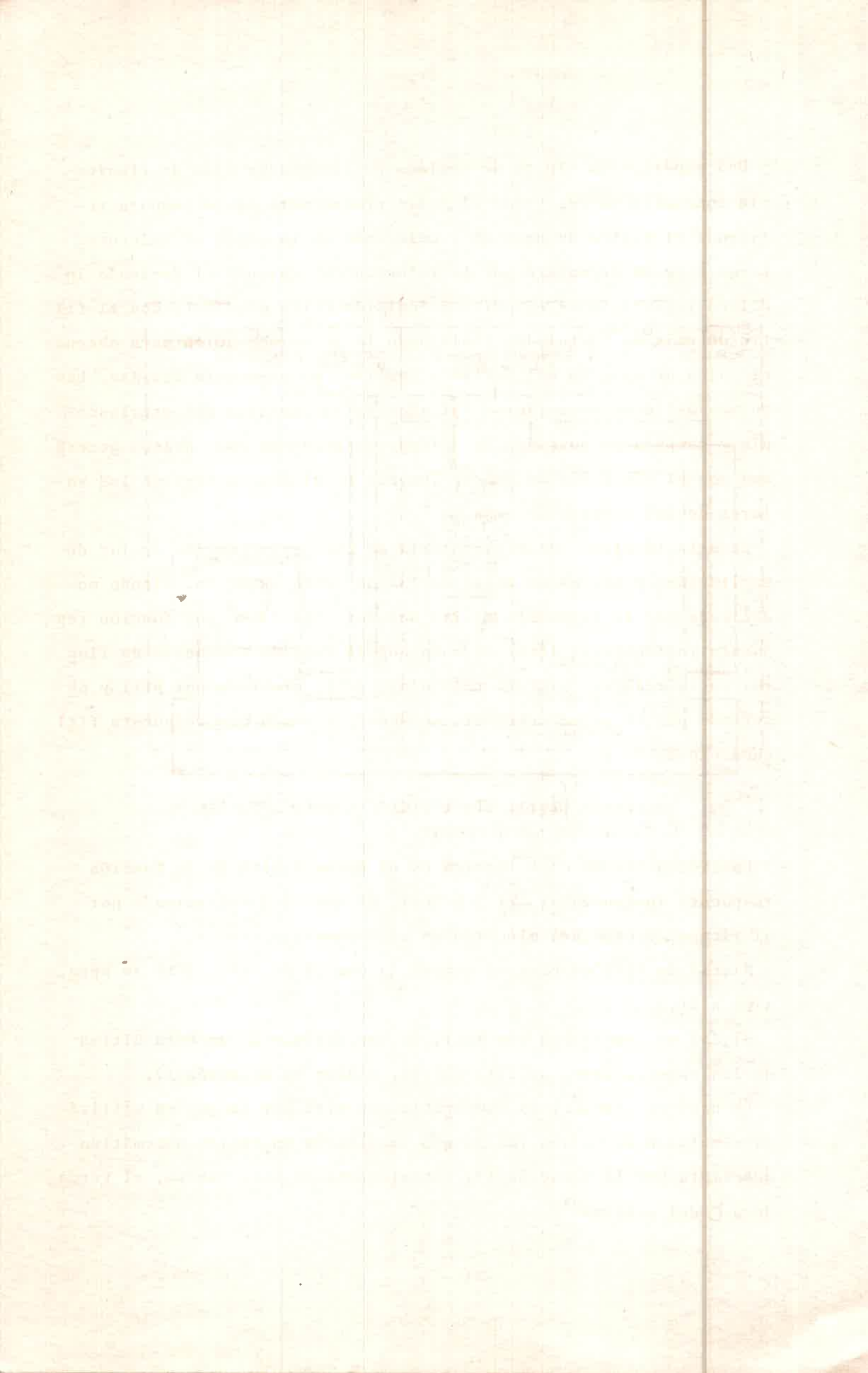


fig.4 Diagrama en bloques del equipo de fluorometría TRW 75A.

- 1. Fuente de luz de excitación
- 2. Lentes de cuarzo
- 3. Filtro de excitación
- 4. Filtro de emisión
- 5. Fotomultiplicador
- 6. Muestra



Una experiencia típica de medidas de tiempos de vida de fluorescencia consistió en registrar el pulso proveniente de la lampara retirando el filtro de emisión y colocando en la celda el solvente. Luego éste se reemplazó por la solución conteniendo el derivado indólico registrandose el pulso de emisión correspondiente con el filtro de emisión instalado, realizando la misma operación para obtener el pulso de emisión del derivado indólico en presencia del AAa. Los pulsos así obtenidos fueron calcados de la pantalla del osciloscopio y comparados buscando la optima coincidencia con pulsos generados por el simulador de pulsos TRW 32A en el que se leyeron los valores de los tiempos de vida.

En esta técnica<sup>60</sup> de fluorimetría de pulso, la función de luz de excitación,  $p(t)$ , es un pulso de luz de corta duración, siendo modificada por la respuesta finita del detector dando una función respuesta instrumental  $I(t)$ . De modo que la función respuesta de fluorescencia real del sistema molecular,  $i(t)$ , excitada por  $p(t)$  y observada por el mismo detector, se modifica dando una respuesta  $f(t)$  cuya expresión es:

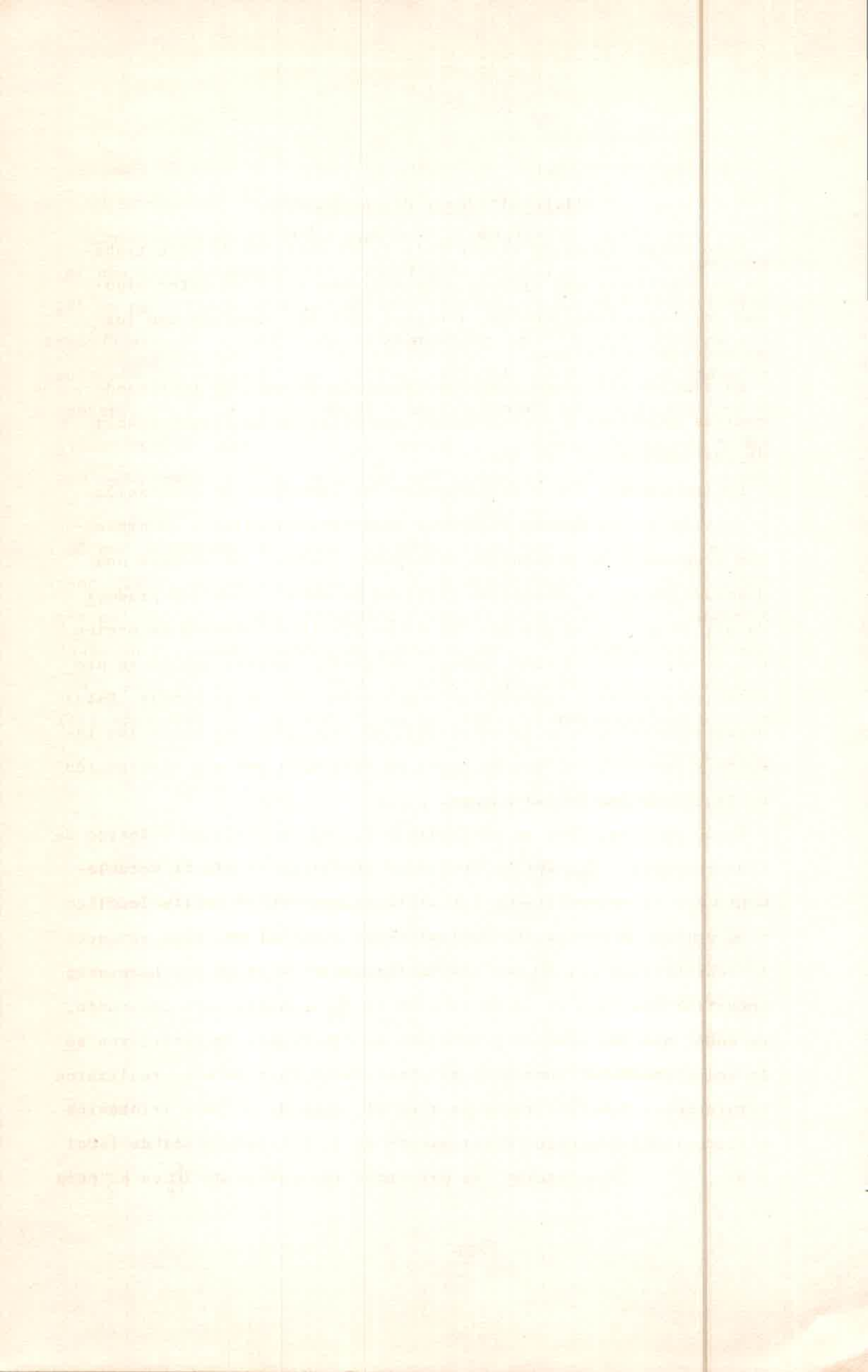
$$f(t) = \int_0^t I(t') i(t-t') dt' \quad 17$$

La limitación de esta técnica es el ancho finito de la función respuesta instrumental  $\Delta I$  ( $\geq 3ns$ ), el que está determinado por el tiempo de paso del electrón en el fotomultiplicador.

Si,  $\Delta I$  de  $I(t)$  es pequeño comparado con el de  $i(t)$ ,  $f(t)$  se aproxima a  $i(t)$ .

Si,  $\Delta I$  es comparable con  $i(t)$ , es necesario evaluar ésta última de las observaciones de  $f(t)$  e  $I(t)$ , usando la ecuación 17.

En nuestro caso  $\Delta I$  es comparable con  $i(t)$  por lo que se utilizó el simulador de pulsos TRW32A que realiza la operación matemática descrita por la ecuación 17, obteniendose de esta manera, el verdadero  $\tau$  del sistema<sup>61</sup>.



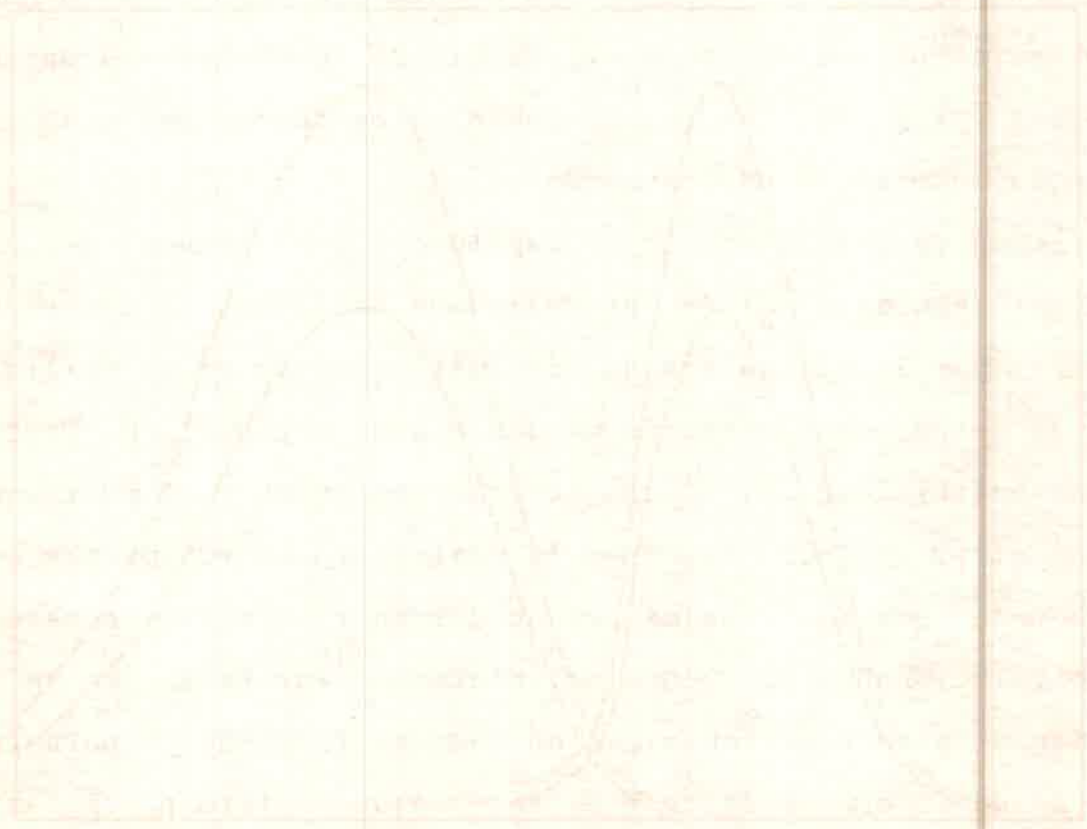
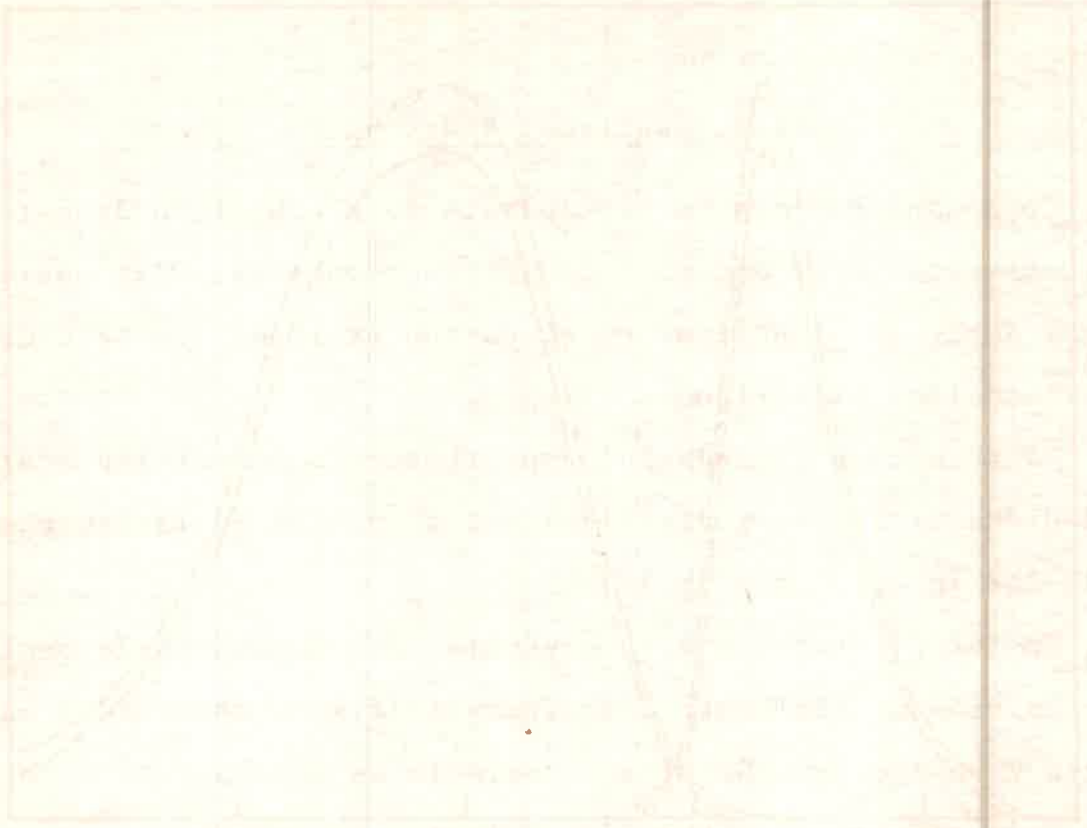
### III. Resultados y discusión

Como manifestamos en el Capítulo I, el objetivo de este trabajo es establecer que tipo de interacciones existían entre algunos derivados indólicos en el estado excitado singlete con los aminoácidos alifáticos.

La técnica utilizada fue espectroscopía de emisión realizando medidas estáticas y dinámicas del quenching de la fluorescencia de los Indoles por los AAa.

En las figuras 5 y 6 se presentan los espectros de excitación y emisión de los cuatro derivados indólicos estudiados en presencia y ausencia de Glicina en soluciones acuosas. Se observa una disminución en la intensidad relativa en ambos espectros producida por la presencia del AAa. El mismo efecto se observa en presencia de otros aminoácidos. Además se puede apreciar que no se producen corrimientos espectrales o aparición de nuevas bandas. Estas observaciones indican la existencia de interacciones entre los Indoles y los AAa, las que se ponen en evidencia por una disminución en la intensidad de las bandas.

Según ya detallamos en el Capítulo I.2 el rendimiento cuántico de fluorescencia ( $\Phi_f$ ) de los derivados indólicos se afecta notablemente por la naturaleza de los sustituyentes en el anillo indólico y el estado de ionización de los mismos según el pH. Dada entonces la sensibilidad del  $\Phi_f$  con los sustituyentes y el pH fue necesario encontrar una zona de pH en la cual el  $\Phi_f$  se mantuviera constante, de modo que los cambios producidos en fluorescencia estuvieran sólo relacionados al quenching intermolecular. Para esto se realizaron titulaciones fluorimétricas en todo el rango de pH para Triptamina e ácido Indol-3-acético y extrayendo de la literatura las de Indol y Trp.<sup>1,32</sup>. En la figura 7 se presentan las curvas de  $\Phi_f$  vs pH para



(100) X  
 100  
 90  
 80  
 70  
 60  
 50  
 40  
 30  
 20  
 10  
 0  
 0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100  
 Time

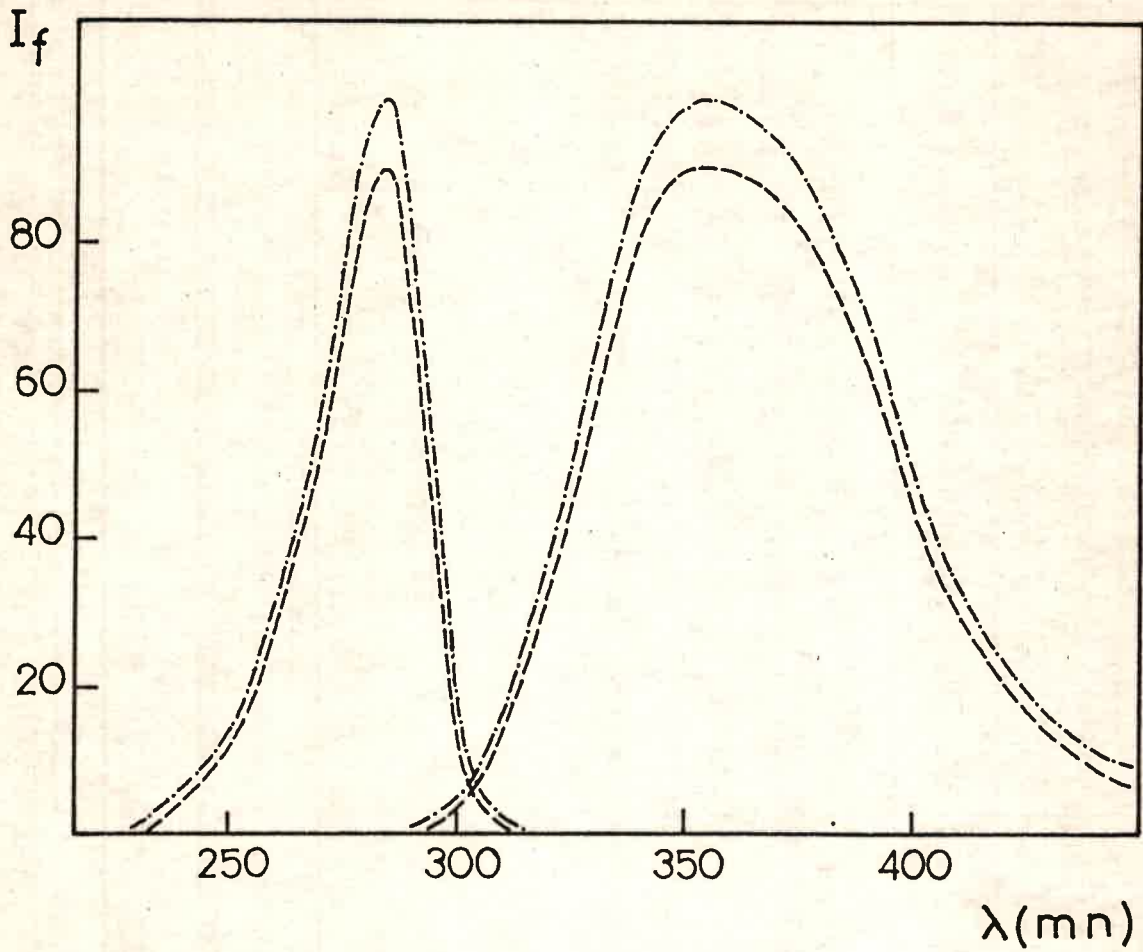


fig.a

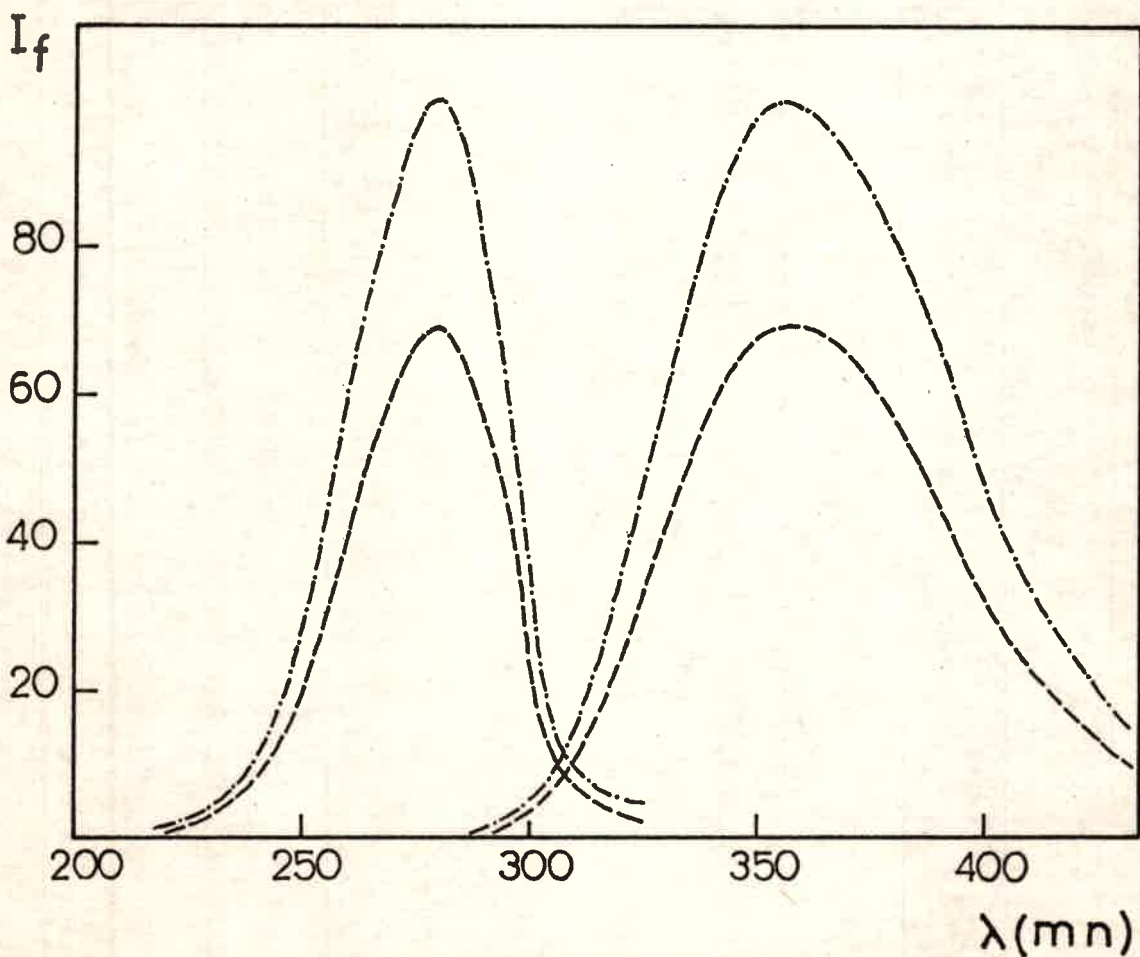
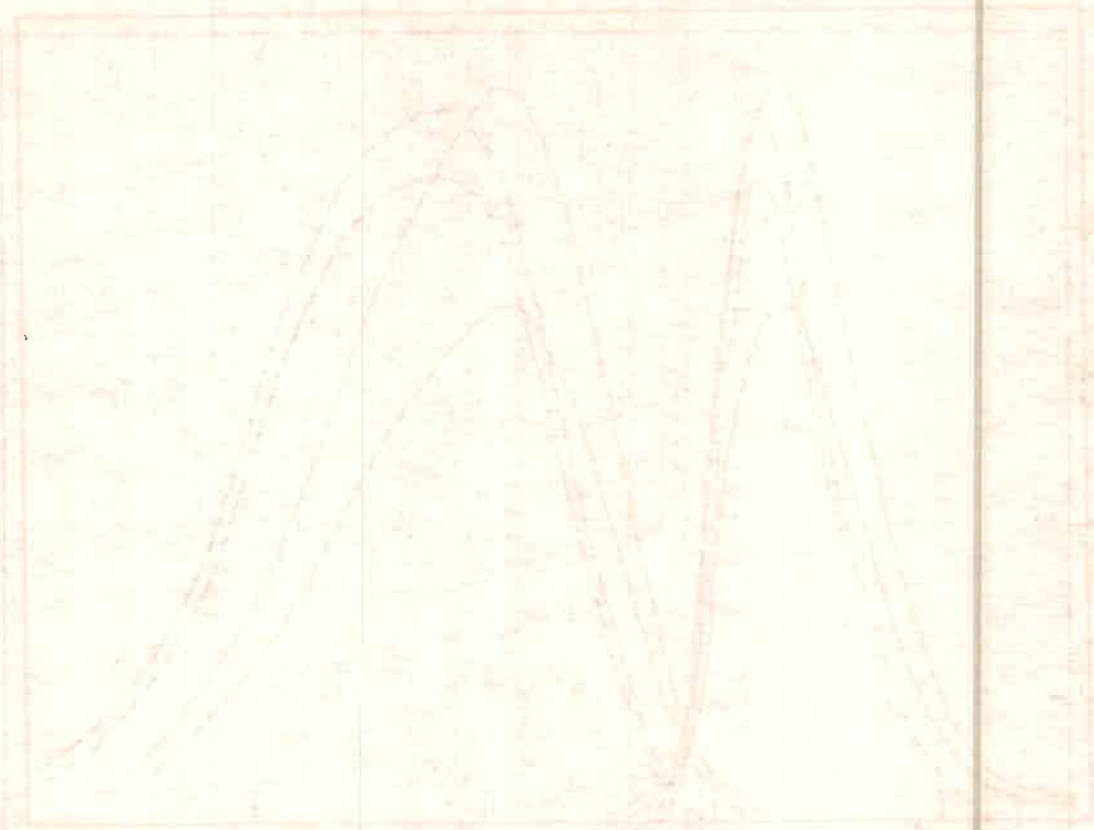


fig.b

fig.5 a. Espectros de excitación y emisión de fluorescencia de Triptófano  $1,5 \times 10^{-4}$  M en ausencia (---) y presencia (—·—) de Glicina 0,58 M.  
 b. Espectros de excitación y emisión de fluorescencia de Triptamina  $1,5 \times 10^{-4}$  M en ausencia (---) y presencia (—·—) de Glicina 0,84 M.



Graph



Graph

Handwritten text at the bottom of the page, likely bleed-through from the reverse side. It is mostly illegible but appears to contain mathematical or scientific notes.

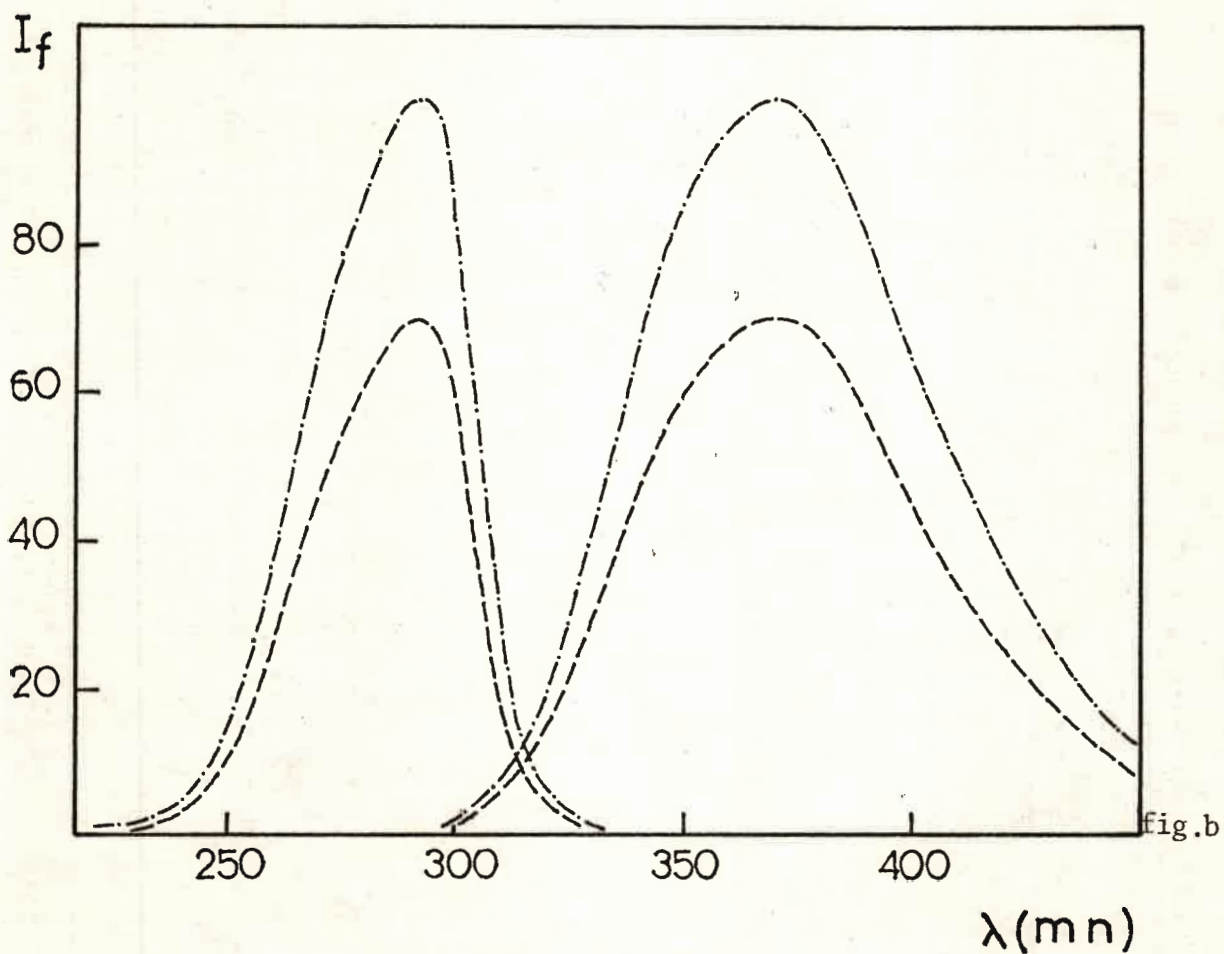
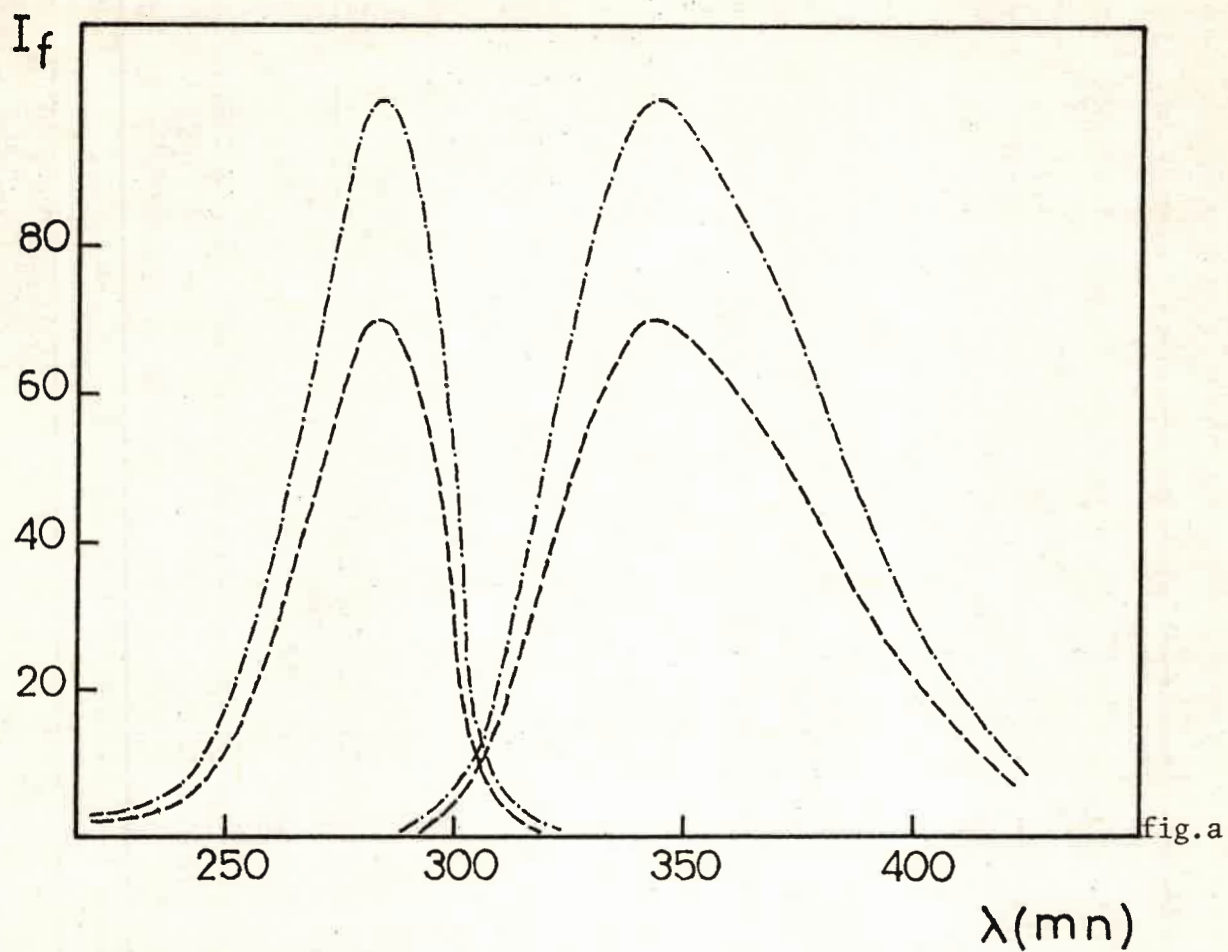


fig.6 a. Espectros de excitación y emisión de fluorescencia de Indol  $1,5 \times 10^{-4}$  M en ausencia (—) y presencia (---) de Glicina 0,49 M.

b. Espectros de excitación y emisión de fluorescencia de ácido Indol-3-acético  $1,5 \times 10^{-4}$  M en ausencia (—) y presencia (---) de Glicina 0,19 M.



Time

Height

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

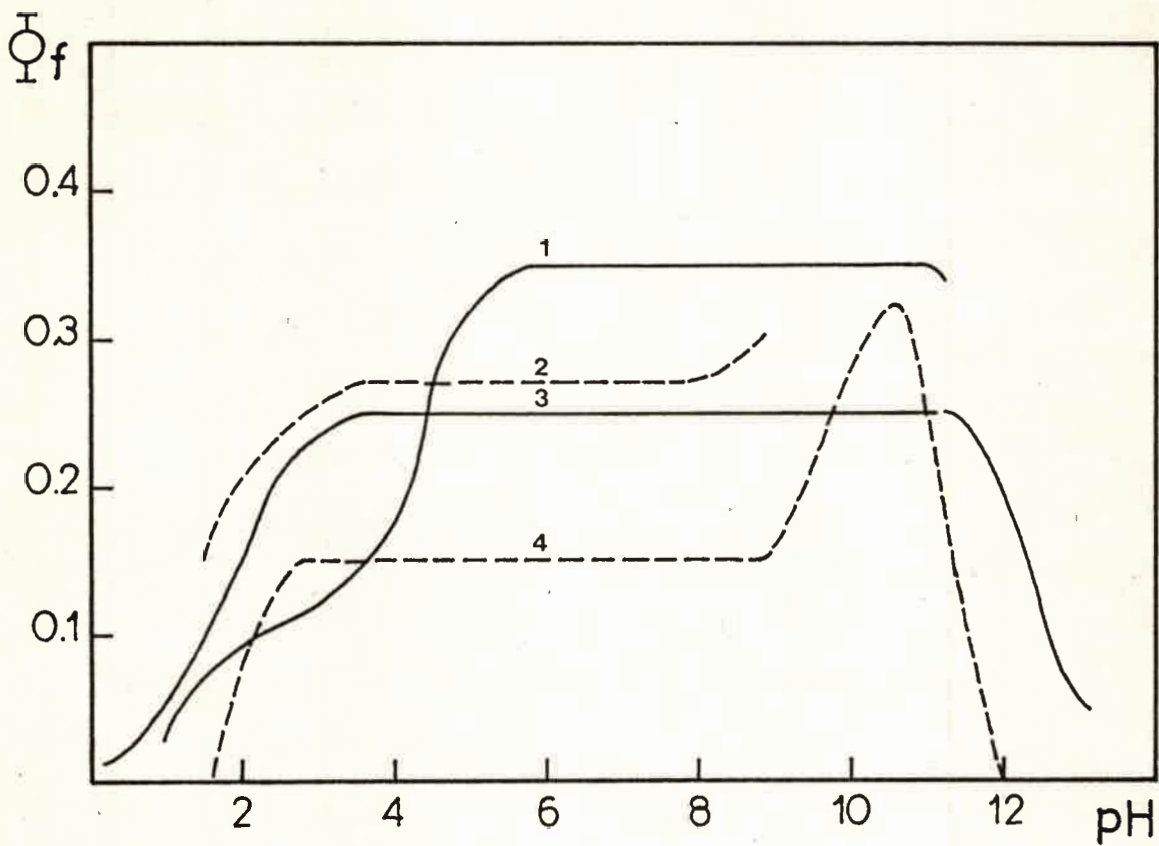


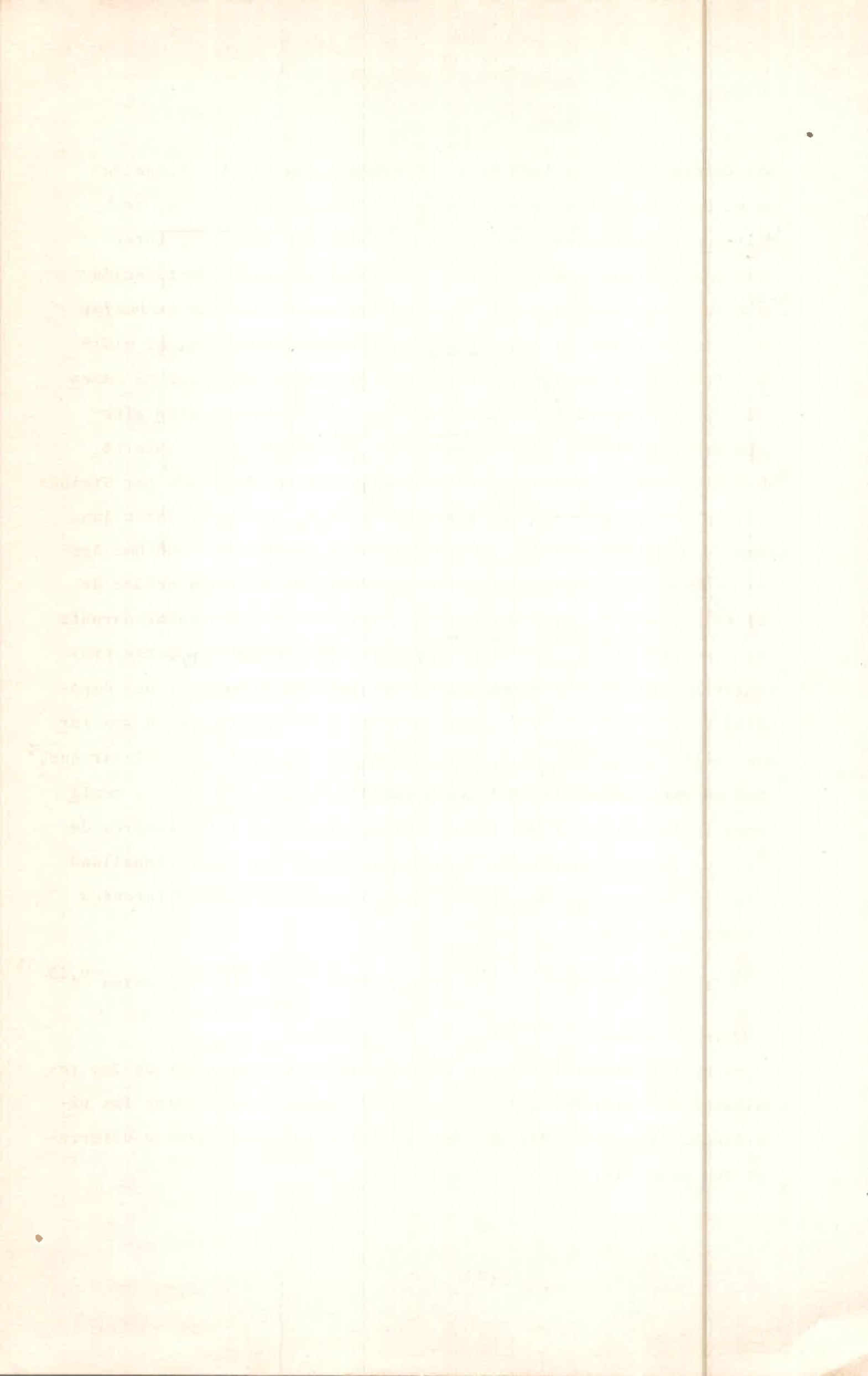
fig.7 Variación del rendimiento cuántico de fluorescencia vs pH

Curva 1- Indol Acético

Curva 2- Triptamina

Curva 3- Indol. Extraída de Ref. 1 y 32

Curva 4- Triptófano. Extraída de Ref. 1 y 32

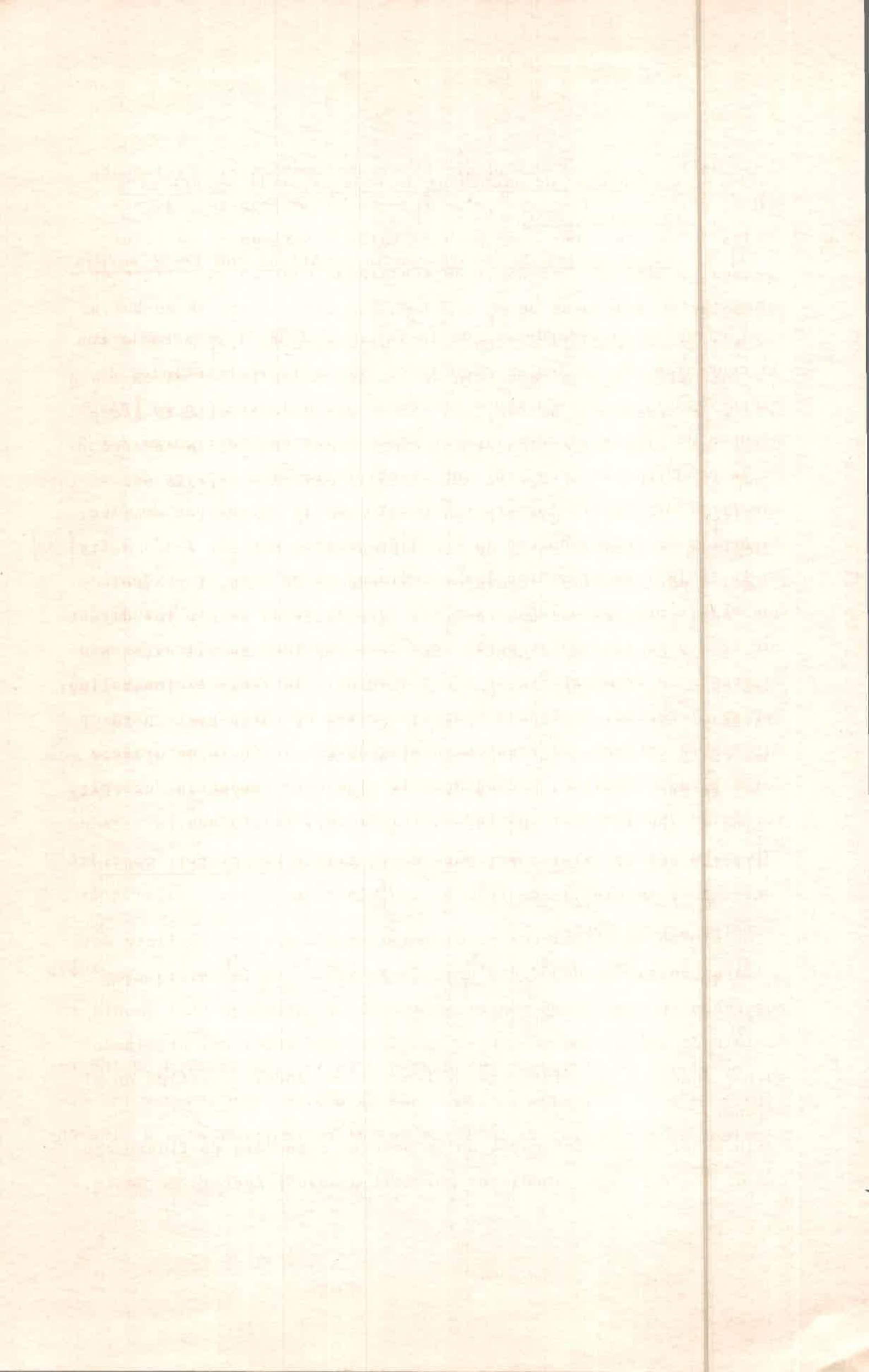


los cuatro derivados indólicos. Observamos que en el entorno de pH 6, para todos los casos, los  $\Phi_f$  se mantienen constantes, resultando en una buena zona para el estudio del quenching intermolecular. Así es como nosotros realizamos nuestra investigación en soluciones acuosas de pH 6. El pH fue controlado con un buffer de fosfato, siendo la concentración utilizada de 0,02 M. Se midió la intensidad de fluorescencia de los derivados indólicos en ausencia y presencia del buffer, con el fin de observar si éste afectaba las propiedades fluorescentes del cromóforo. No se observó quenching por el buffer, en coincidencia con lo observado por Steiner y Kirby<sup>39</sup> acerca de que los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{PO}_4\text{H}_2^-$  no modificaban las propiedades fluorescentes de los derivados indólicos. Dado que los AAa son por sí mismos reguladores alrededor de pH 6, la acidez de las soluciones se mantuvo constante alrededor de este valor durante las experiencias de quenching. Las especies iónicas que están presentes a este pH son: los AAa y el Trp bajo su forma de iones dipolares y Triptamina y ácido Indol-3-acético se encuentran en sus formas catiónicas y aniónicas respectivamente. Es necesario aclarar que, como se mencionó en la parte experimental, las curvas que se realizaron fueron de  $I_f$  vs pH, las que se normalizaron a los valores de  $\Phi_f$  según los de literatura, puesto que existe una proporcionalidad entre la  $I_f$  y el  $\Phi_f$ . Los valores de  $\Phi_f$  informados según diferentes autores a pH 6 son:

$$\Phi_{f, \text{Trp}} = 0,14-0,20^{9,25}; \Phi_{f, \text{Indol}} = 0,23^{25,35}; \Phi_{f, \text{Triptamina}} = 0,25^{35}$$

$$\Phi_{f, \text{Indol acético}} = 0,33^{17}.$$

Con el fin de ofrecer mayor claridad en la presentación de los resultados experimentales pensamos que es conveniente separar las experiencias a temperatura ambiente de las correspondientes a diferentes temperaturas.



### III.1 Experiencias de quenching de fluorescencia estáticas y dinámicas a 25°C.

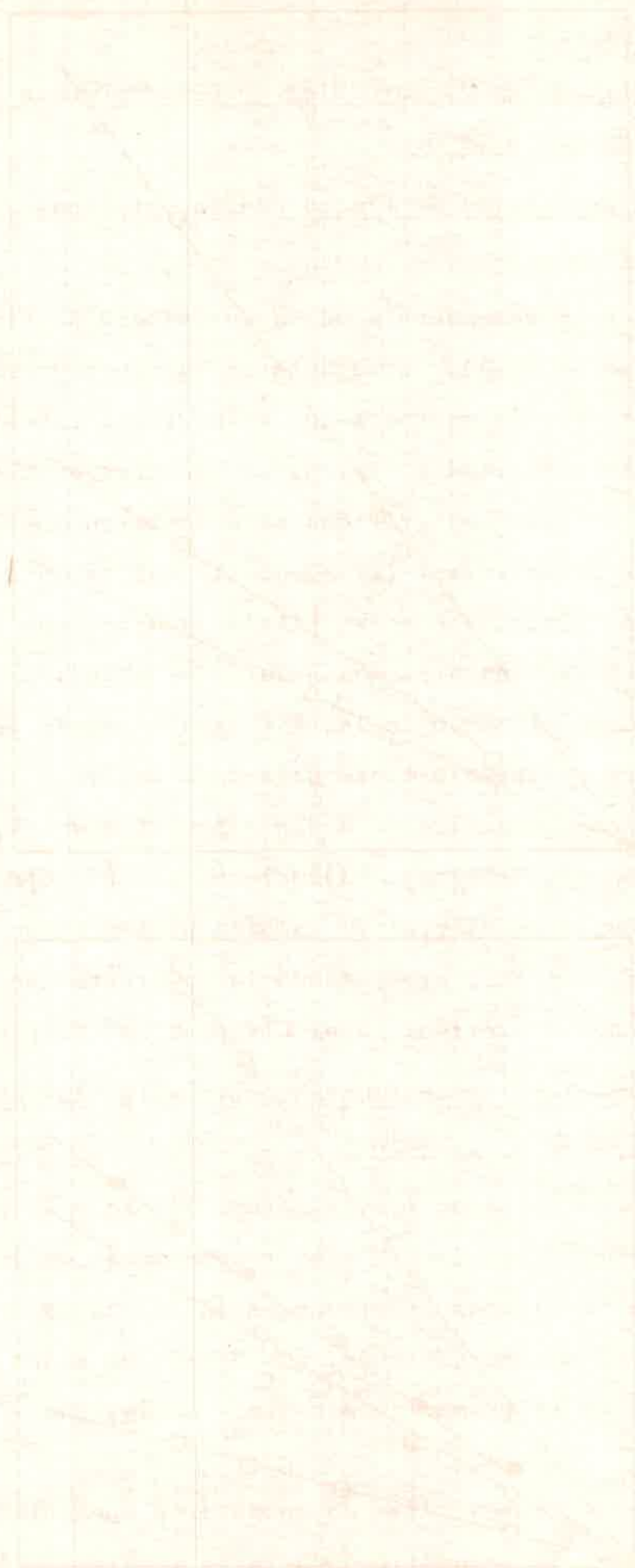
#### III.1.1. Experiencias de fluorescencia estáticas con los $\alpha$ Aminoácidos.

Al estudiar la dependencia de la intensidad de fluorescencia con la concentración de AAa se obtuvieron buenas representaciones de Stern-Volmer, siendo en todos los casos  $I^0/I$  lineal con la  $[AAa]$ . Algunos de los resultados típicos se muestran en las figuras 8 y 9. De la pendiente de esos gráficos se obtuvieron los valores de la constante de Stern-Volmer (Ksv), puesto que la intensidad de fluorescencia se relaciona con la  $[AAa]$  de acuerdo con  $I^0/I = 1 + Ksv[AAa]$ . En la tabla I se presentan los resultados obtenidos. Es evidente que existe una variación en las Ksv para la serie de AAa estudiados que se repite sistemáticamente para cada derivado indólico, siendo la secuencia de quenching de menor a mayor: Alanina, Glicina, Valina, Serina, Treonina, Prolina e Hidroxiprolina. Por otra parte para cada AAa se obtienen diferentes valores de Ksv según la naturaleza del derivado indólico, presentando la siguiente tendencia decreciente: ácido Indol-3 acético  $\approx$  Indol  $>$  Triptamina  $>$  Triptófano.

#### III.1.2. Experiencias de fluorescencia estáticas con Etil amonio y Acetato de Sodio.

Con el fin de establecer si el grupo amonio o el carboxilato del AAa en forma independiente eran responsables de la interacción observada se realizaron experiencias individuales con Etil amonio y Acetato de Sodio como quencher. Los derivados indólicos utilizados fueron Indol en el primer caso y Trp y ácido Indol-3-acético en el segundo.

Sin embargo en estos casos no se observó quenching de fluorescencia de los derivados indólicos por Etil amonio y Acetato de Sodio,



1. *Quartzite*  
 2. *Sandstone*  
 3. *Shale*  
 4. *Coal*  
 5. *Basalt*  
 6. *Granite*  
 7. *Marble*  
 8. *Schist*  
 9. *Gneiss*  
 10. *Amphibolite*  
 11. *Quartzite*  
 12. *Sandstone*  
 13. *Shale*  
 14. *Coal*  
 15. *Basalt*  
 16. *Granite*  
 17. *Marble*  
 18. *Schist*  
 19. *Gneiss*  
 20. *Amphibolite*

1. *Quartzite*  
 2. *Sandstone*  
 3. *Shale*  
 4. *Coal*  
 5. *Basalt*  
 6. *Granite*  
 7. *Marble*  
 8. *Schist*  
 9. *Gneiss*  
 10. *Amphibolite*  
 11. *Quartzite*  
 12. *Sandstone*  
 13. *Shale*  
 14. *Coal*  
 15. *Basalt*  
 16. *Granite*  
 17. *Marble*  
 18. *Schist*  
 19. *Gneiss*  
 20. *Amphibolite*

1. *Quartzite*  
 2. *Sandstone*  
 3. *Shale*  
 4. *Coal*  
 5. *Basalt*  
 6. *Granite*  
 7. *Marble*  
 8. *Schist*  
 9. *Gneiss*  
 10. *Amphibolite*  
 11. *Quartzite*  
 12. *Sandstone*  
 13. *Shale*  
 14. *Coal*  
 15. *Basalt*  
 16. *Granite*  
 17. *Marble*  
 18. *Schist*  
 19. *Gneiss*  
 20. *Amphibolite*

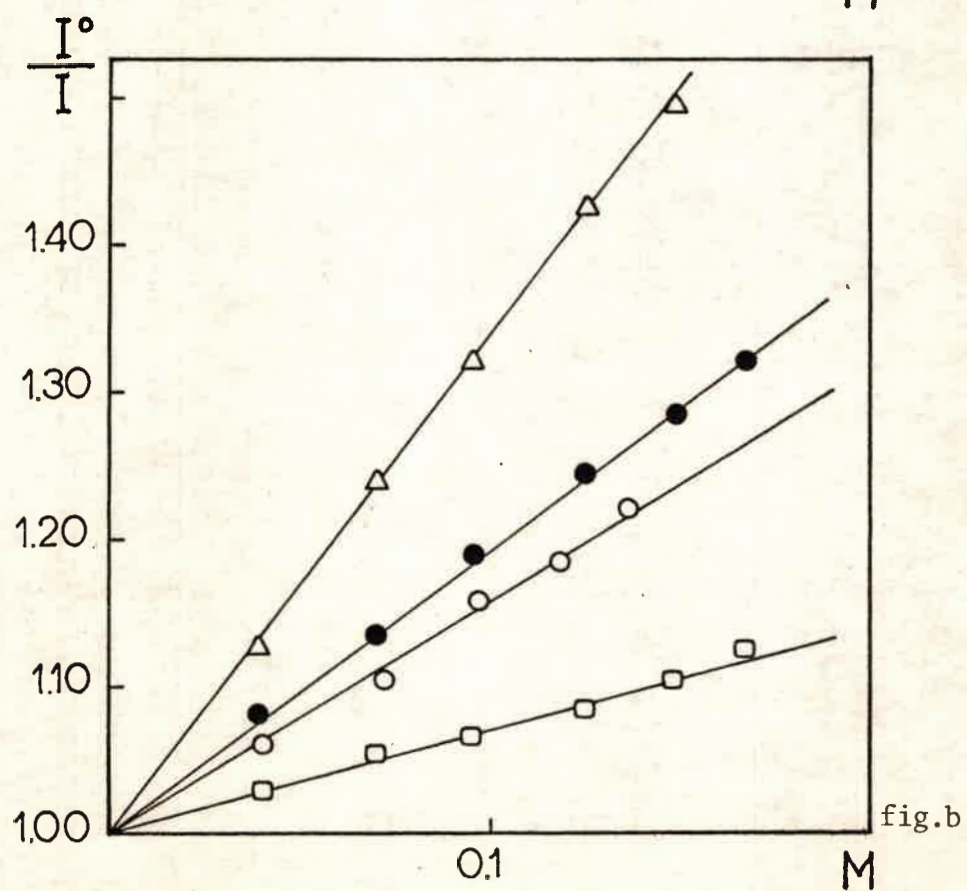
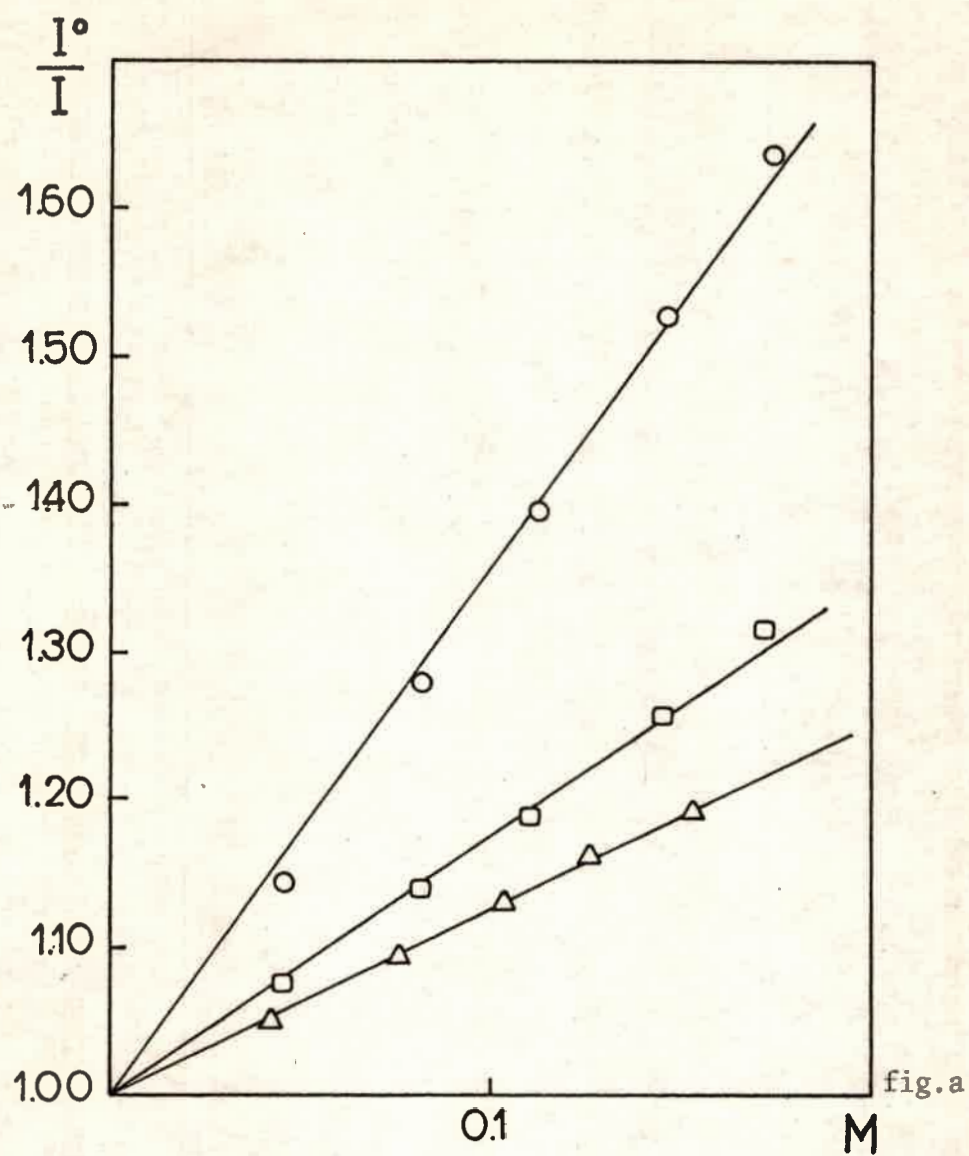
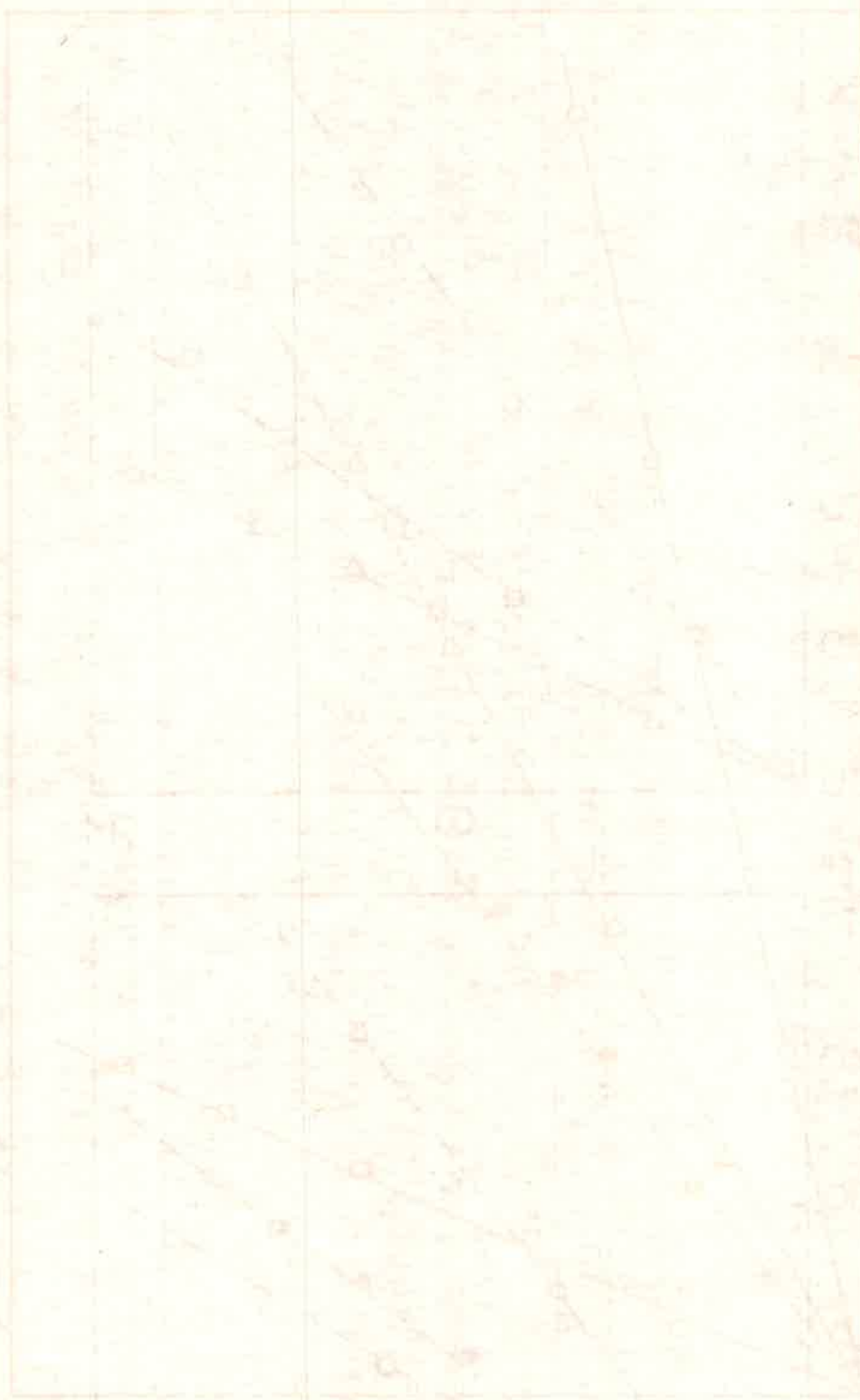


fig.8 a. Efecto de la concentración de Serina sobre la fluorescencia de:  $\circ$  Indol Acético;  $\square$  Indol;  $\triangle$  Triptamina. b. Efecto de la concentración de Treonina sobre la fluorescencia de:  $\triangle$  Indol Acético;  $\bullet$  Indol;  $\circ$  Triptamina;  $\square$  Triptófano



CH. 100  
100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150

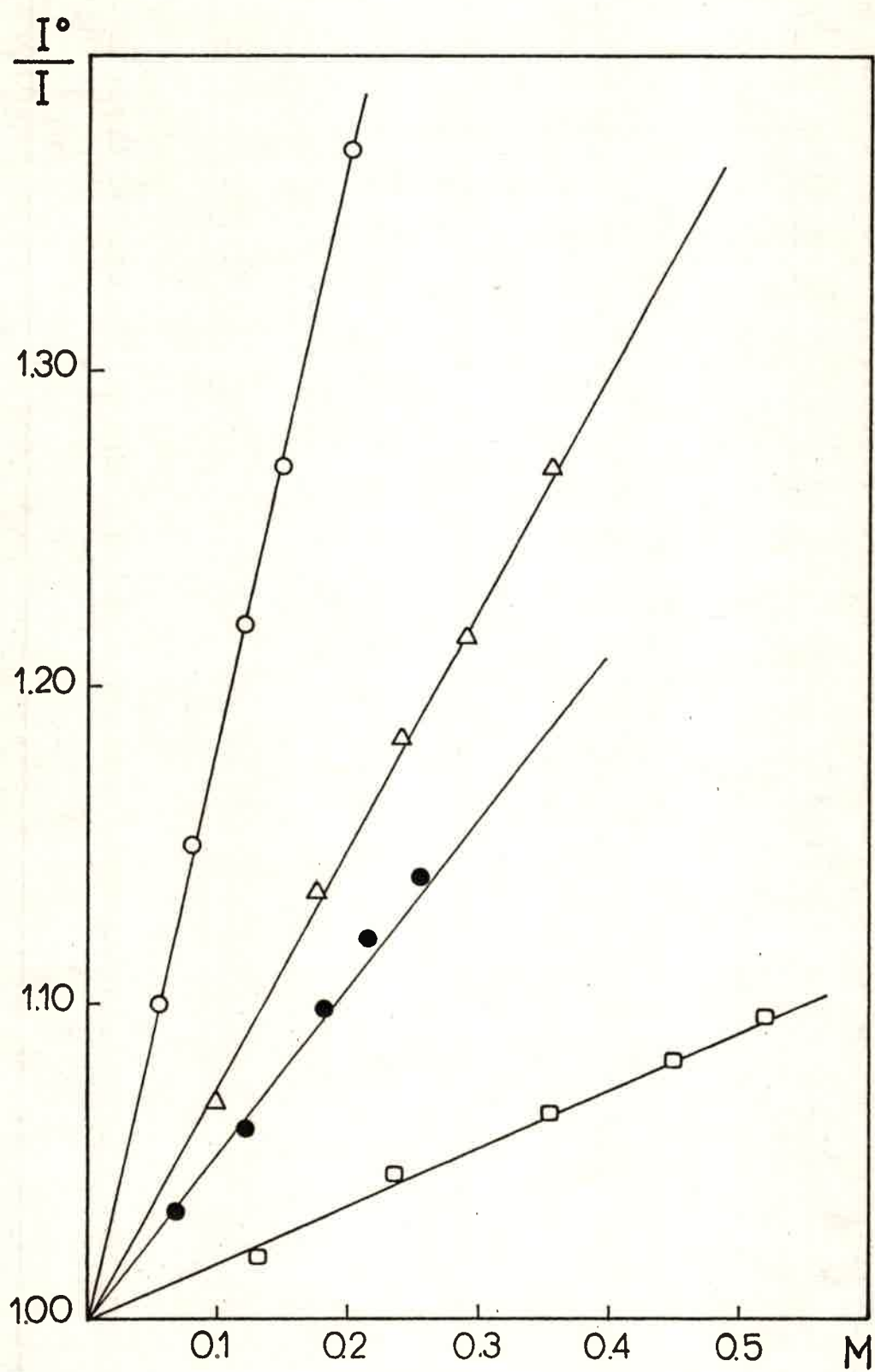


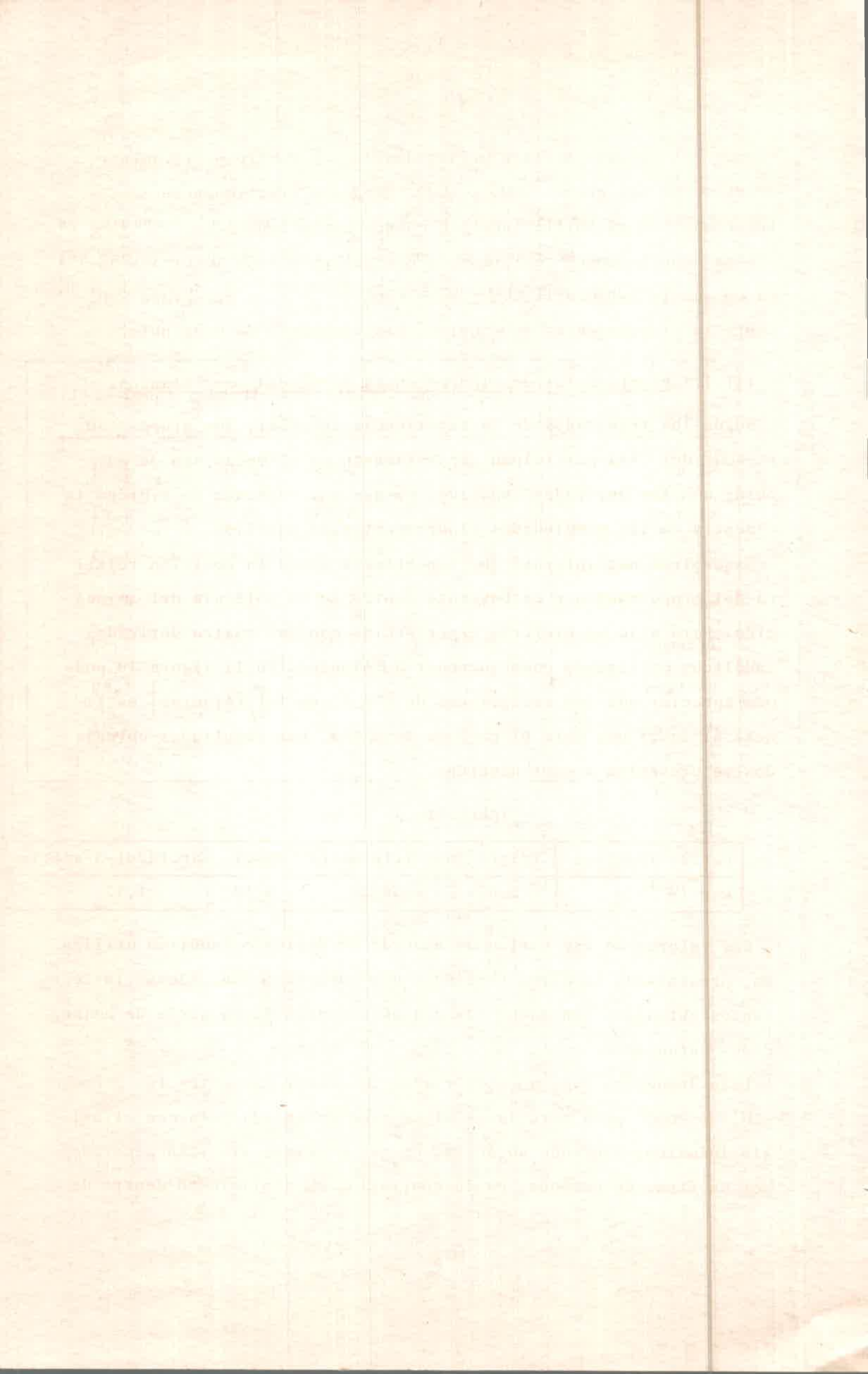
fig.9 Efecto de la concentración de Alanina sobre la fluorescencia de:  
 ○ Indol Acético; △ Indol; ● Triptamina; □ Triptófano a 25°C

Date	Description	Debit	Credit
1861	Jan 1		
1862	Feb 1		
1863	Mar 1		
1864	Apr 1		
1865	May 1		
1866	Jun 1		

TABLA I. Constantes de Stern-Volmer (Ksv) para el quenching de fluorescencia de compuestos indólicos por varios  $\alpha$  aminoácidos alifáticos a 25°C.

AAa \ INDOLES	Triptófano	Triptamina	Indol	Indol acético
Glicina	0,19	0,55	0,86	2,21
Alanina	0,18	0,53	0,77	1,81
Valina	0,52	1,00	1,40	3,07
Serina	0,74	1,25	1,77	3,57
Treonina	0,68	1,60	1,92	3,40
Prolina	1,26	2,95	4,94	8,60
Hidroxiprolina	2,60	5,08	6,41	10,28

El error en Ksv es de  $\pm 0.04$ ,



siendo las concentraciones utilizadas de 2 y 1 M respectivamente, de modo que los grupos  $-\text{NH}_3^+$  y  $-\text{COO}^-$  del  $\alpha$  AAa prácticamente no interactúan con el anillo indólico cuando están separados.

Estas conclusiones confirman lo que ya había sido informado acerca de que la influencia del grupo  $-\text{COO}^-$  <sup>9,37,39</sup> y del grupo  $-\text{NH}_3^+$  <sup>9,50</sup> sobre la fluorescencia de Indol es prácticamente despreciable.

### III.1.3. Experiencias de fluorescencia estáticas con $\beta$ Alanina.

Según los resultados de la experiencia anterior, los grupos  $-\text{NH}_3^+$  y  $-\text{COO}^-$  del AAa participan conjuntamente en el mecanismo de quenching con los derivados indólicos ya que por separado no ejercen influencia en las propiedades fluorescentes de aquellos.

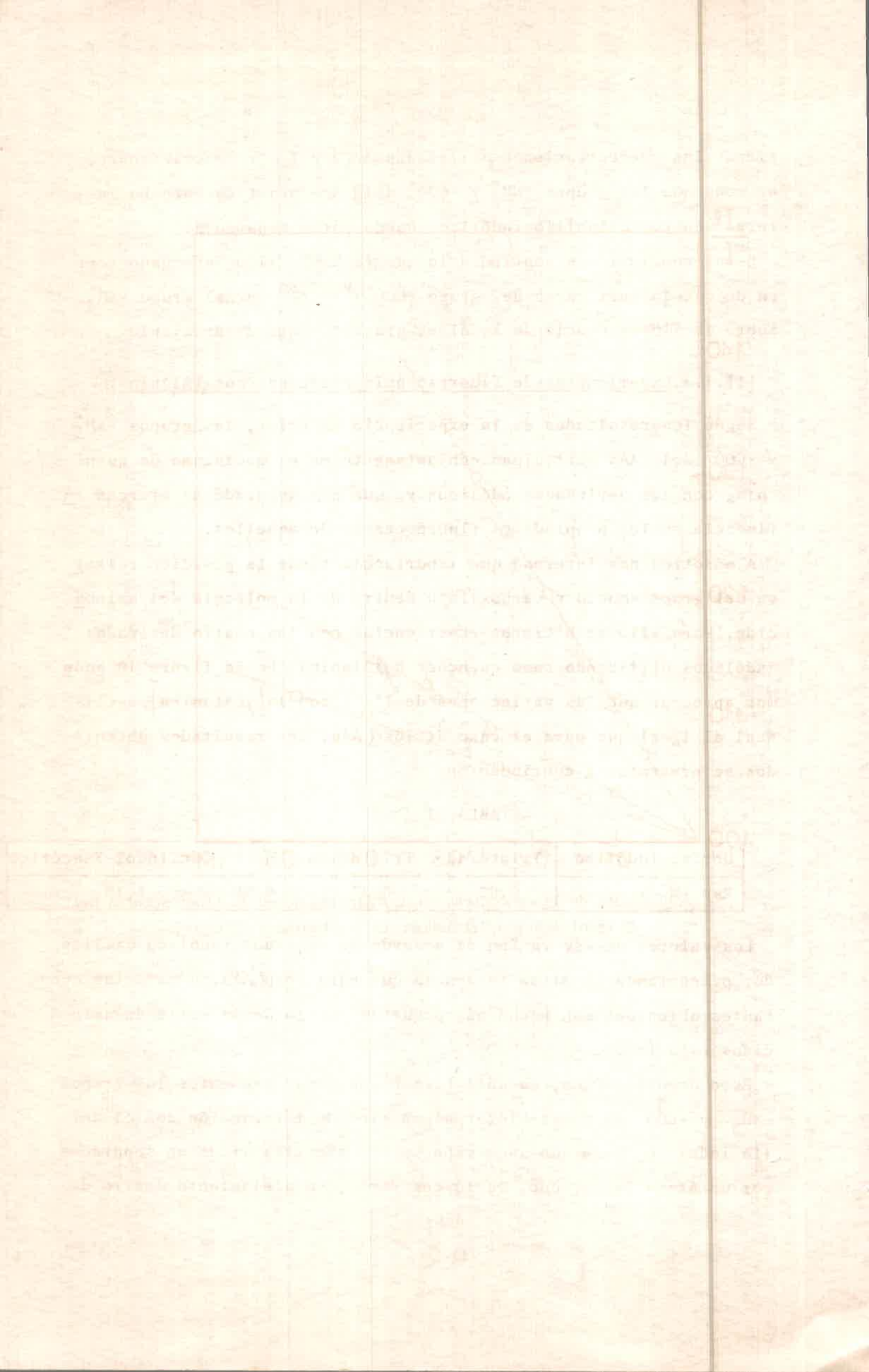
A nosotros nos interesó que importancia tiene la posición relativa del grupo amonio y carboxilato dentro de la molécula del aminoácido. Para ello se hicieron experiencias con los cuatro derivados indólicos utilizando como quencher a  $\beta$  Alanina. En la figura 10 podemos apreciar que las variaciones de  $I^0/I$  con la [ $\beta$  Alanina] es lineal al igual que para el caso de los  $\alpha$  AAa. Los resultados obtenidos se presentan a continuación:

TABLA II

Deriv. Indólico	Triptófano	Triptamina	Indol	ác. Indol-3-acético
Ksv ( $\text{M}^{-1}$ )	0,02	0,27	0,39	1,13

Los valores de Ksv varían de acuerdo al derivado indólico utilizado, presentando la misma tendencia que para los  $\alpha$  AAa. Además las constantes obtenidas son mucho más pequeñas dentro de la serie de aminoácidos estudiados.

Esto demuestra que, no sólo tienen que estar presentes los grupos  $-\text{NH}_3^+$  y  $-\text{COO}^-$  para establecer algún tipo de interacción con el anillo indólico, sino que su acción es más efectiva si están separados por un átomo de carbono. De lo contrario, su alejamiento dentro de



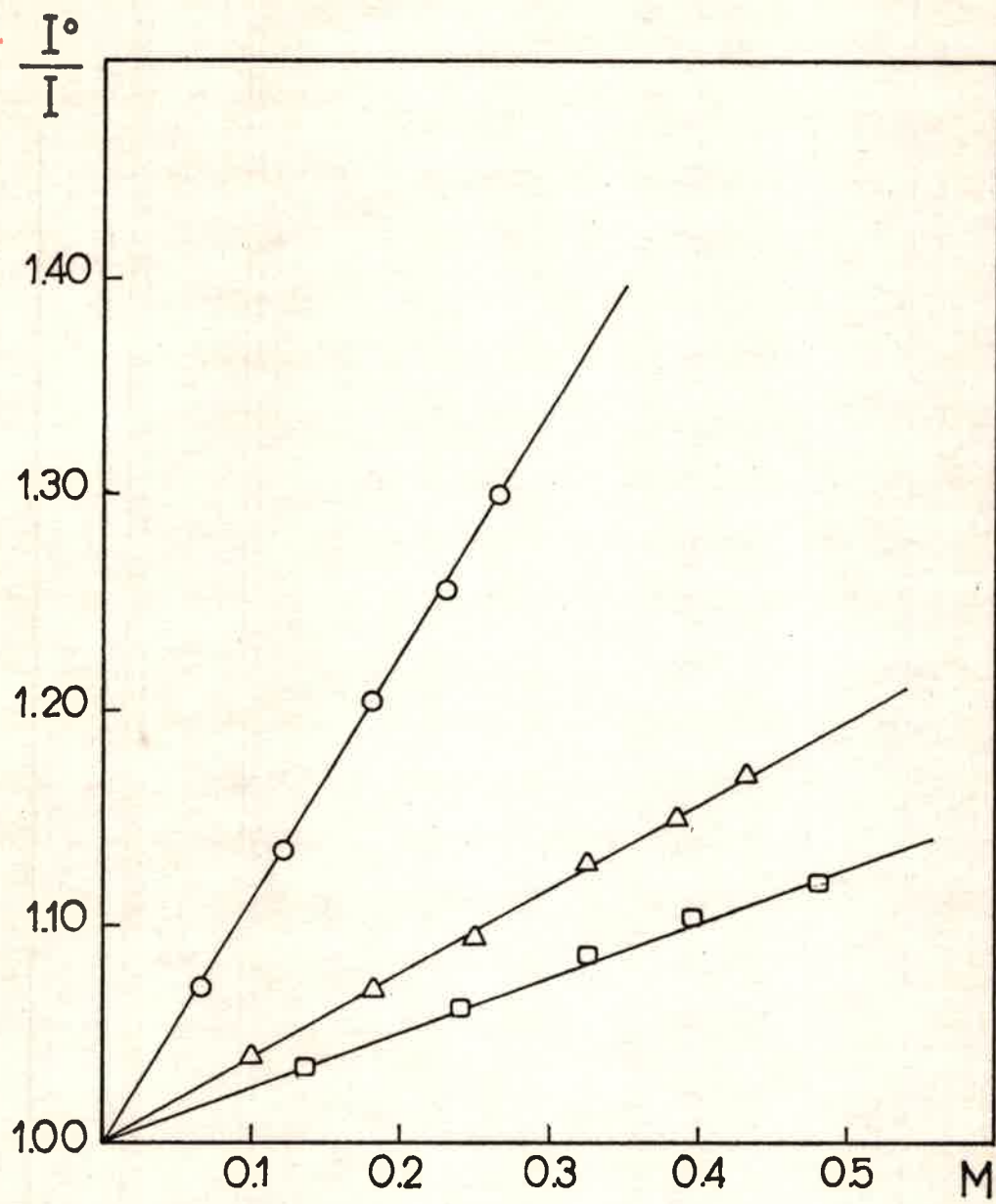


fig.10 Efecto de la concentración de  $\beta$ Alanina sobre la fluorescencia de:  
 ○ Indol Acético; △ Indol; □ Triptamina a 25°C

Handwritten text on a grid background, likely bleed-through from the reverse side of the page. The text is mostly illegible due to fading and the grid lines.

Vertical handwritten text on the right margin of the page, possibly serving as a title or a list of items.

la molécula de aminoácido, hace que el quenching sea considerablemente menor.

#### III.1.4. Experiencias de fluorescencia dinámicas

Según los resultados obtenidos en las medidas estáticas, los gráficos de  $I^0/I$  vs  $[AA]$  no presentan curvaturas en todos los sistemas estudiados. O sea que el quenching puede estar operando en el estado excitado o en el fundamental, existiendo también la posibilidad de que esten involucrados los dos estados electrónicos siendo predominante en alguno de ellos. De manera que para distinguir en que situación están ubicados nuestros sistemas es necesario realizar medidas de tiempos de vida del cromóforo en ausencia ( $\tau_0$ ) y presencia ( $\tau$ ) del quencher.

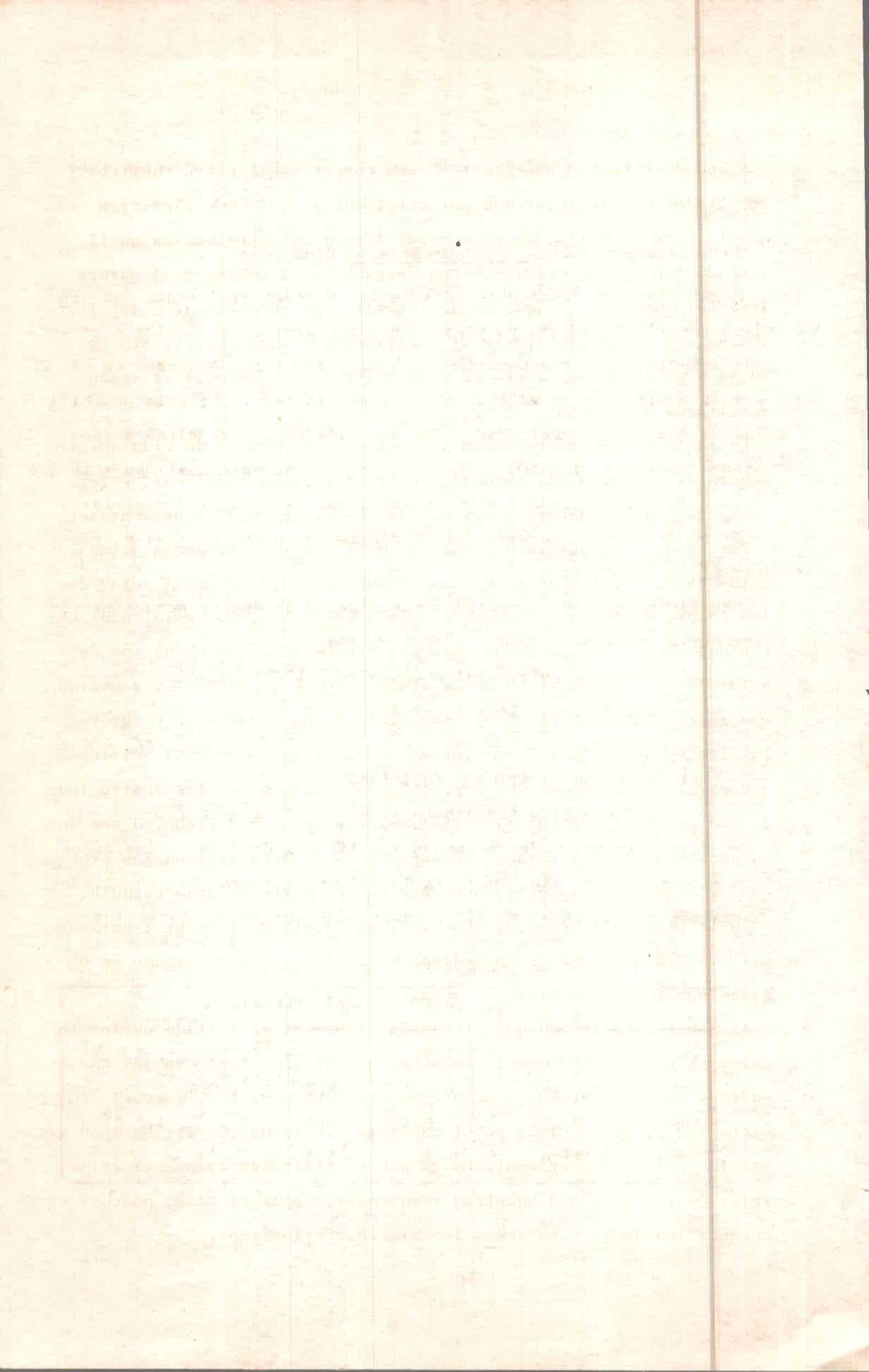
Recordemos que los resultados experimentales que se pueden presentar según la naturaleza del quenching son:

- i) Quenching colisional o dinámico  $I^0/I = \tau_0/\tau$
- ii) Quenching estático o por asociación  $I^0/I > 1 ; \tau_0/\tau = 1$
- iii) Quenching estático y colisional operando simultaneamente  $I^0/I > \tau_0/\tau > 1$

En primer lugar se determinaron los tiempos de vida de los indoles en ausencia de AAa. En la tabla III se presentan los resultados obtenidos por nosotros a 25°C y comparados con los de literatura.

TABLA III

	$\tau_{exp}$ (ns)	$\tau_0$ de literatura
Triptófano	2,8 ± 0,5	2,7-3 <sup>25</sup> , 2,7 <sup>41</sup> , 3,1 <sup>62</sup>
Triptamina	5,2 ± 1	5,2 <sup>41,63</sup> , 5,5 <sup>55</sup>
Indol	5,0 ± 0,5	4,5 <sup>40</sup> , 4,9 <sup>35</sup> , 4,3 <sup>55</sup>
Indol-3-acético	8,2 ± 1	8,7 <sup>54</sup>



Se puede observar que existe buena concordancia entre nuestros resultados con lo informado por otros autores, lo que significa que la técnica utilizada para estas determinaciones nos da un límite de confianza suficiente como para poder establecer la naturaleza del quenching en nuestros sistemas. Con respecto al  $\tau$  del Tripófano, no podemos observar el decaimiento biexponencial, sin embargo a pH 7 la componente de vida más larga es de 3,21 ns según resultados de Fleming<sup>38</sup>.

En la tabla IV se presentan los valores de tiempos de vida en presencia de algunos  $\alpha$  AAa para los cuatro derivados indólicos, y los cocientes que resultan de las medidas estáticas que ya presentamos.

Pese a que las determinaciones de los  $\tau$  en función de la  $[AAa]$  están afectadas por un error considerable,  $\pm 0,5$  ns en el mejor de los casos, debido al sistema de medida utilizado, los resultados obtenidos confirman claramente que los procesos de quenching son de naturaleza dinámica. Como puede observarse en la tabla IV, a medida que  $\tau_0/\tau$  aumenta el error mencionado tiene mayor peso y favorece la discrepancia con  $I^0/I$ . Contamos además, con otro dato adicional que es el hecho de que los espectros de absorción de los cuatro indoles en presencia de los AAa prácticamente no se modifican. O sea que la contribución del estado fundamental es despreciable en los procesos de quenching que están operando en los sistemas bajo estudio.

En la figura 11 se puede observar, que dentro del error experimental, la  $K_{sv}$  que resulta de medidas estáticas es la misma que se obtiene por las dinámicas.

Al haber establecido que el estado electrónico excitado de los Indoles es el que está involucrado en las interacciones con los AAa, podemos identificar la constante de Stern-Volmer,  $K_{sv}$ , como el producto  $k_q \tau_0$ , según vimos en el Capítulo I.3 (ecuación 8). De modo que con los valores experimentales de  $K_{sv}$  y utilizando como  $\tau_0$  el mejor valor de literatura o nuestros resultados, según el caso, podemos conocer los  $k_q$  para todos los sistemas estudiados.

Handwritten text at the top of the page, possibly a title or introductory paragraph, which is mostly illegible due to fading.

1878	...	...
1879	...	...
1880	...	...
1881	...	...
1882	...	...
1883	...	...
1884	...	...
1885	...	...
1886	...	...
1887	...	...
1888	...	...
1889	...	...
1890	...	...
1891	...	...
1892	...	...
1893	...	...
1894	...	...
1895	...	...
1896	...	...
1897	...	...
1898	...	...
1899	...	...
1900	...	...

Handwritten text at the bottom of the page, possibly a conclusion or a signature block, which is mostly illegible.

TABLA IV. Valores de tiempos de vida de fluorescencia de los derivados indólicos en presencia de AAa a 25°C. EL cociente  $I_f^{\circ} / I_f$  corresponde a las medidas estáticas a la misma temperatura.

DERIVADO INDOLICO	AAa	$\tau_0/\tau$	$I_f^{\circ} / I_f$
Indol $1 \times 10^{-4}$ M	Valina 0,50 M	1,5	1,7
	Valina 0,35 M	1,6	1,5
	Prolina 0,21 M	1,9	2,0
	Glicina 0,83 M	1,7	1,7
	Glicina 0,41 M	1,3	1,4
Indol Acético $1 \times 10^{-4}$ M	Alanina 0,43 M	2,2	1,8
	Glicina 0,54 M	2,0	2,2
	Prolina 0,23 M	2,0	3,0
	Prolina 0,47 M	3,2	5,0
Tryptamina $1 \times 10^{-4}$ M	Prolina 0,78 M	3,0	3,3
	Valina 0,50 M	1,5	1,5
Triptófano $1 \times 10^{-4}$ M	Prolina 0,78 M	1,9	2,0

10.11.18

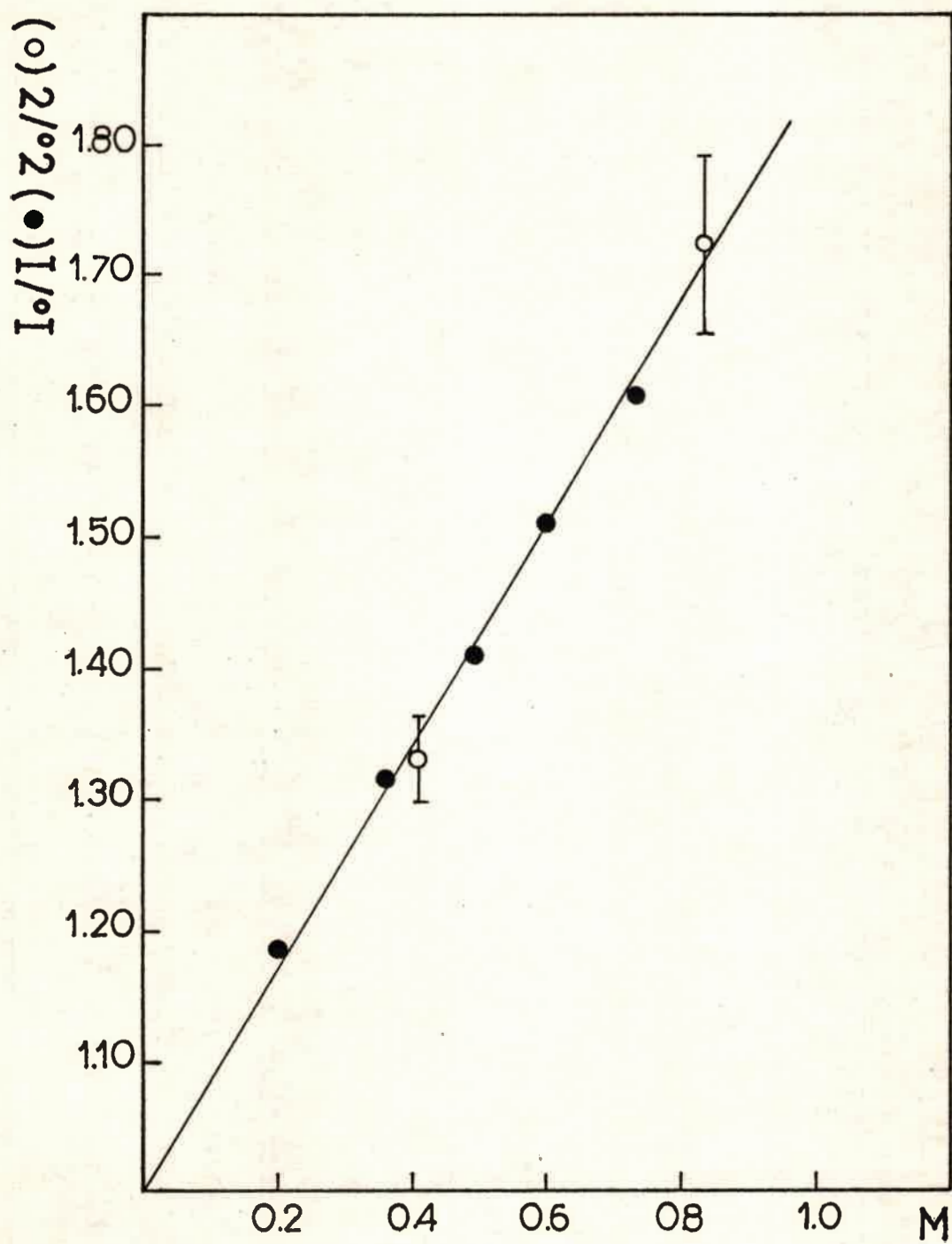
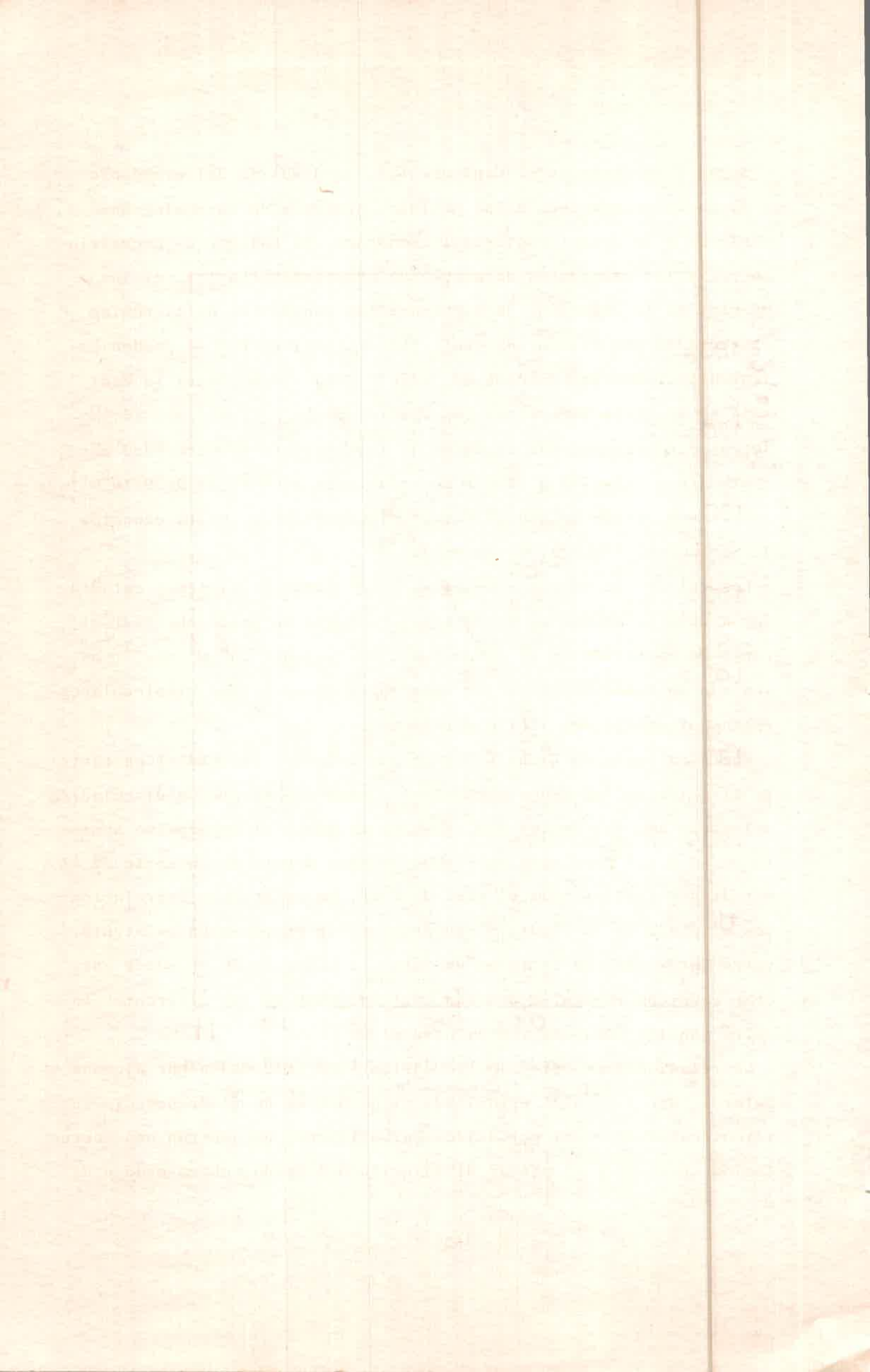


fig.11 Comparación de los resultados del quenching de Indol por Glicina a 25°C por medidas estáticas y dinámicas.



Según discutimos en el Capítulo I.3, la difusión del cromóforo y el quencher antecede a los posibles procesos de quenching que conducen a la desactivación del cromóforo. Es así que es necesario corregir las constantes de quenching observadas ( $k_{q_{obs}}$ ) por los efectos de la difusión, para obtener las constantes de quenching controladas por activación ( $kq'$ ). Los valores de  $kq'$  se pueden hallar utilizando la ecuación 14,  $1/kq' = 1/kq - 1/kd$ , para lo cual sólo se requiere reemplazar los valores de  $kq_{obs}$  y estimar  $kd$ . No nosotros consideramos que el valor de la constante de velocidad controlada por difusión a 25°C y en soluciones acuosas es de  $9 \times 10^9 M^{-1} seg^{-1}$  con la suposición de que el factor electrostático, en la ecuación de Smoluchowski-Debye, es la unidad.<sup>64</sup>

Los valores de  $kq$  experimentales y  $kq'$  para los sistemas estudiados a 25°C se presentan en la tabla V. Según se puede observar el rango de variación en  $kq$  es de  $6,0 \times 10^6 - 1,6 \times 10^9 M^{-1} seg^{-1}$ , o sea que en todos los casos las constantes de velocidad bimoleculares están por debajo del límite difusional.

Por otra parte en dicha tabla se han colocado los  $pKa1$  (Constante de disociación del grupo carboxilo) y  $pKa2$  (Constante de disociación del grupo amonio) de los AAa. Resulta evidente el progresivo aumento en  $kq$  o  $kq'$  para cada derivado indólico dentro de la serie de AA estudiados al disminuir el  $pKa1$  de éste, no existiendo correlación con el  $pKa2$ . En la figura 12 se presenta la correlación existente entre  $kq'$  y  $pKa1$  en la forma de  $\ln kq'$  vs  $pKa1$ . Según se puede apreciar en dicha figura, todas las correlaciones de los diferentes Indoles con los AAa son rectas paralelas.

Correlaciones de este tipo ya habían sido informadas por algunos autores. Ricci et al<sup>37</sup> estudiando el quenching de fluorescencia intermolecular de Indol por ácidos carboxílicos, encuentran una correlación entre  $kq$  y el  $pKa$  de disociación del ácido, obteniéndose di

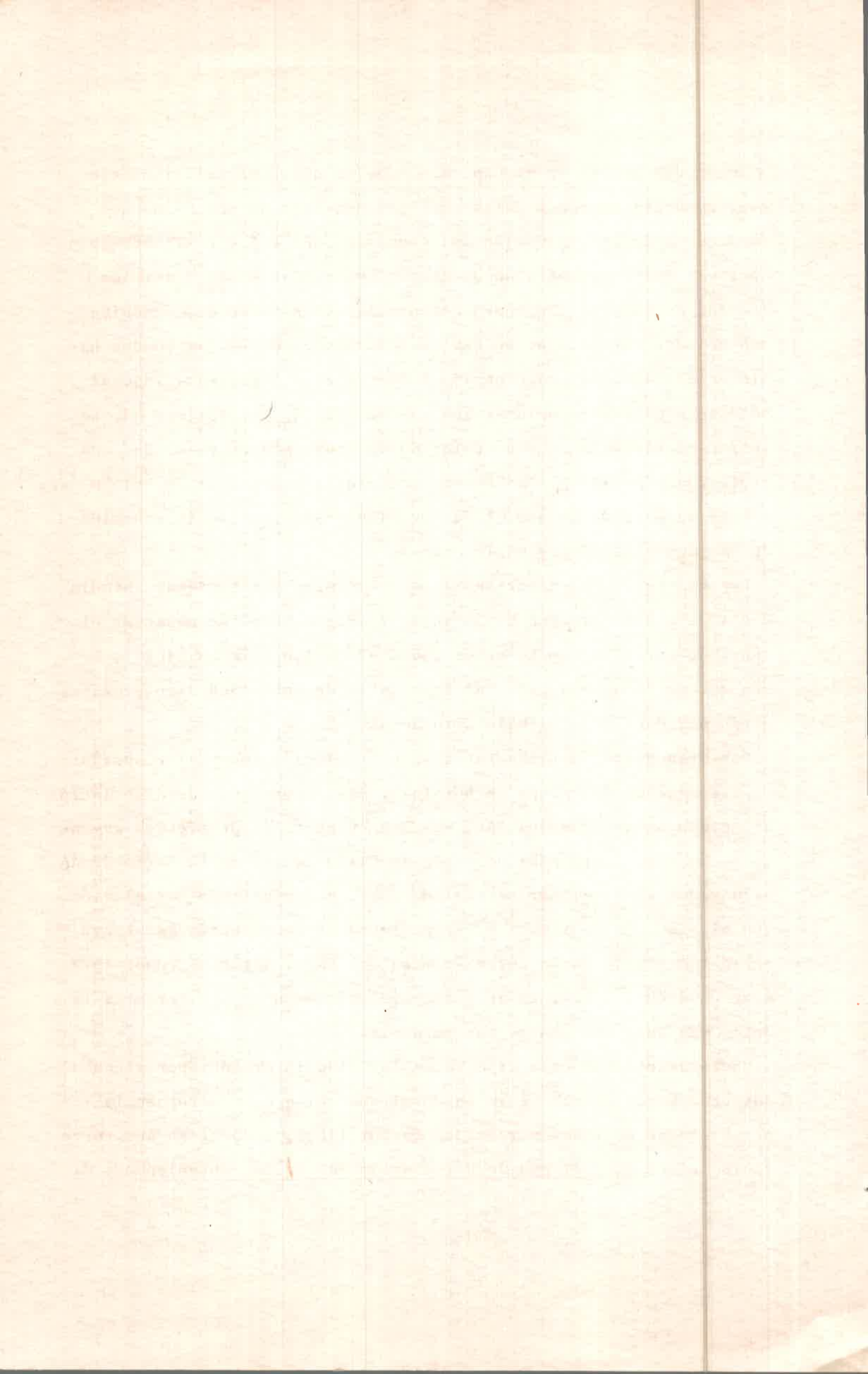
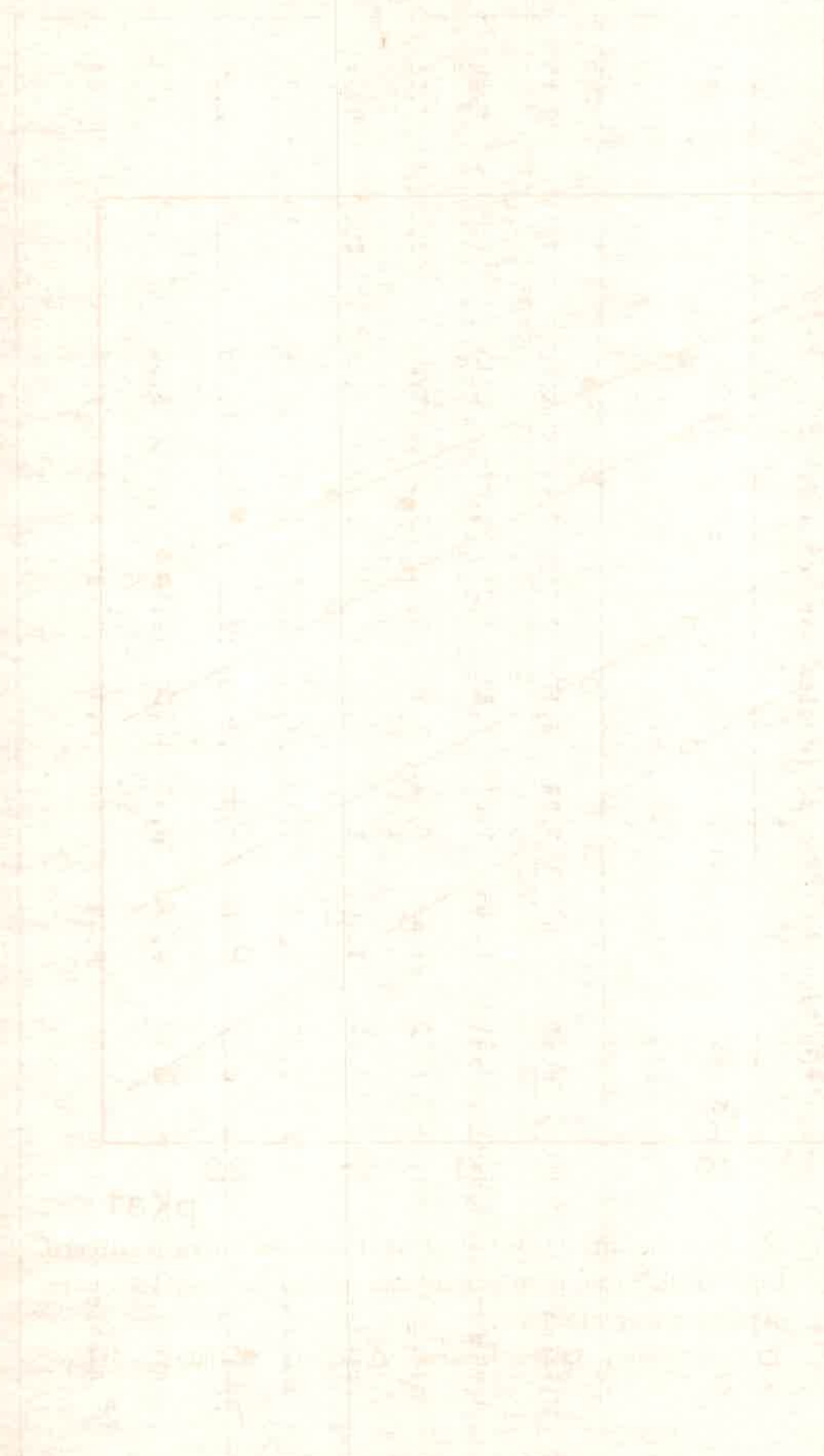


TABLA V. Constantes de velocidad ( $kq$  y  $kq'$  x  $10^{-8} \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ ) para el quenching del estado singlete excitado de Indoles por AAa a 25°C.

	Triptófano		Triptamina		Indol		Indol acético		pKa1 <sup>(*)</sup>	pKa2 <sup>(*)</sup>
	kq	kq'	kq	kq'	kq	kq'	kq	kq'		
Glicina	0,64	0,64	1,07	1,08	2,15	2,21	2,49	2,56	2,35	9,78
Alanina	0,61	0,61	1,00	1,01	1,89	1,93	2,08	2,13	2,35	9,86
Valina	1,72	1,75	1,89	1,94	3,50	3,64	3,53	3,67	2,29	9,73
Serina	2,46	2,53	2,40	2,46	4,42	4,60	4,10	4,28	2,21	9,15
Treonina	2,29	2,35	3,08	3,19	4,80	5,07	3,91	4,08	2,15	9,12
Prolina	4,22	4,43	5,60	5,97	12,35	14,30	9,88	11,10	2,00	10,60
Hidroxiprolina	8,66	9,57	9,78	10,97	16,00	19,49	11,74	13,52	1,92	9,73
$\beta$ Alanina	0,06	0,06	0,50	0,50	0,98	0,99	1,29	1,30	3,55	10,24

(\*) Datos extraídos de la referencia 65.

El error en kq es del 5%.



CHAPTER 1

CHAPTER 2

CHAPTER 3

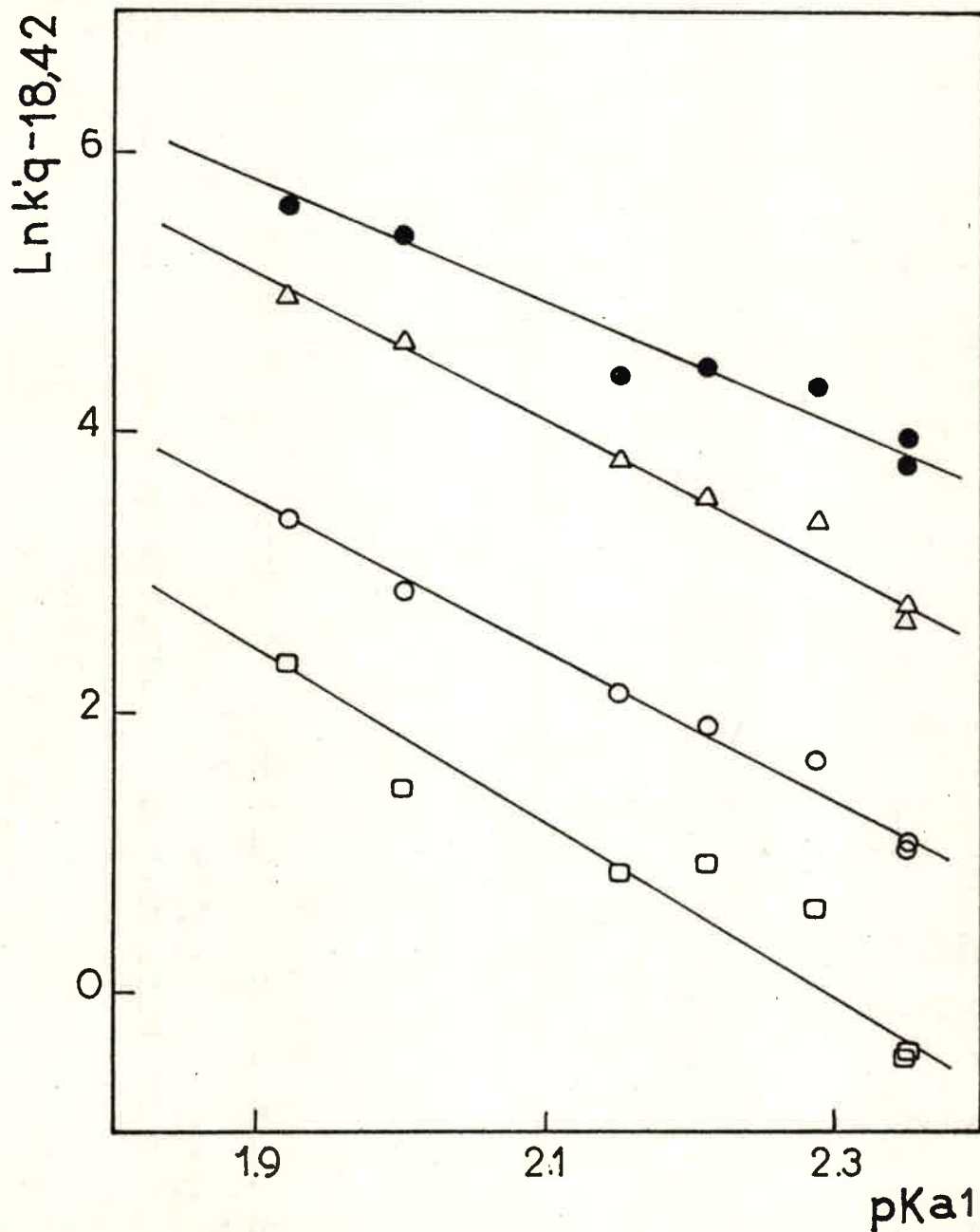


fig.12 Correlación entre  $\text{Ln}k'q$  y el  $\text{pKa}_1$  del AAa correspondiente.

Las curvas están desplazadas una unidad de logaritmo para ofrecer mayor claridad.

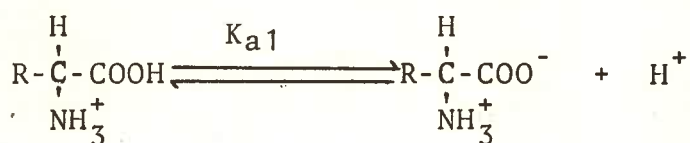
□ Triptófano; ○ Triptamina; △ Indol; ● Indol Acético

1850

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.

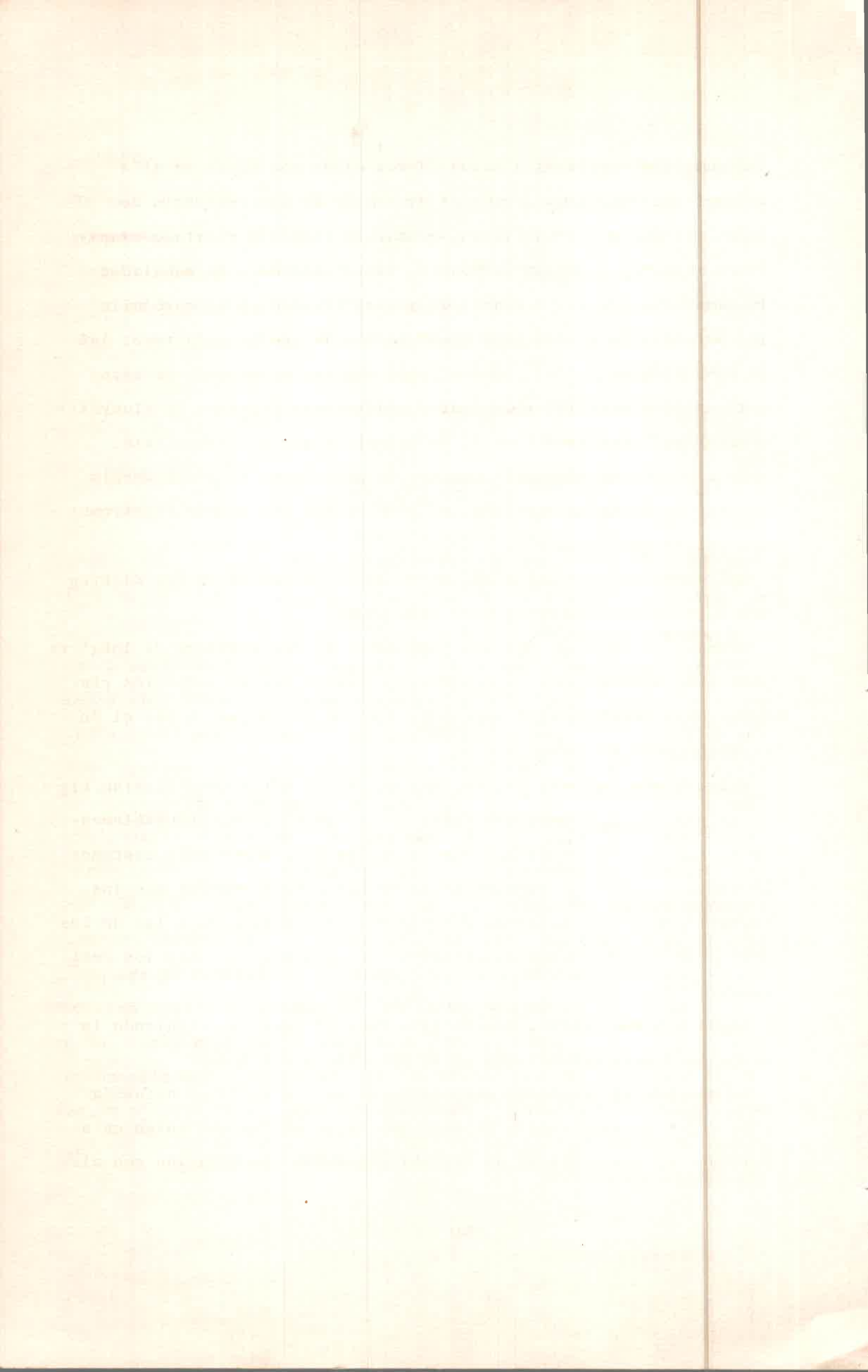
ferentes pendientes en los gráficos de  $\ln k_q$  vs  $pK_a$  según si el ácido carboxílico estaba o no sustituido por átomos de Cloro. Una situación semejante se da en el estudio del quenching de fluorescencia de Indol por amidas realizado por Froehlich<sup>54</sup>, en el cual nuevamente se obtiene una correlación entre el  $\ln k_q$  y el  $pK_a$  para las amidas cloradas y otra para aquellas que no están sustituidas por átomos de Cloro.

El equilibrio correspondiente al  $pK_{a1}$  es:



El hecho de que exista una correlación entre el  $pK_{a1}$  y el  $\ln k_q$ , nos permite decir que el ión carboxilato sería el responsable de los procesos de quenching.

Nosotros postulamos que el mecanismo que opera en nuestros sistemas es de transferencia de carga, actuando el ión  $-\text{COO}^-$  como aceptor y el anillo indólico como donador. Sin embargo según las conclusiones obtenidas de las experiencias con Etil amonio, acetato y  $\beta$  Alanina, los grupos  $-\text{NH}_3^+$  y  $-\text{COO}^-$  aislados no ejercen influencia sobre el estado excitado de los Indoles, así como cuando están dispuestos en el AA en posición  $\beta$ , su influencia es considerablemente menor que en posición  $\alpha$ . O sea que el grupo amonio también desempeña un rol en los procesos de quenching de los indoles por AA. Entonces según la correlación encontrada, la eficiencia de los procesos de quenching aumenta a medida que incrementa la acidez del  $-\text{COOH}$ . En este aspecto es donde el  $-\text{NH}_3^+$  desempeña su papel, a través de un efecto inductivo que posibilita que el  $-\text{COO}^-$  acepte los electrones. De allí que su influencia indudablemente tiene menor alcance al alejarse del  $-\text{COO}^-$  como en el caso de  $\beta$  Alanina y por lo tanto las  $k_{q_{obs}}$  son muy pequeñas.



Argumentos similares a estos fueron dados por Ricci et al<sup>37</sup> quienes sugirieron que, para el quenching de fluorescencia de Indol por ácidos carboxílicos, el anillo indólico excitado transfiera su carga al grupo carbonilo, incrementándose la habilidad de quenching por la presencia de grupos adyacentes al carbonilo que delocalizen su densidad electrónica por efecto inductivo. Así es como Fleming et al<sup>38</sup>, consolidado con los argumentos de estos autores, sugieren que el reducido rendimiento cuántico de fluorescencia del Triptófano a pH 7, se debería a que el carboxilato, pese a no ser un eficiente aceptor de electrones el grupo amonio decrece su densidad electrónica, permitiendo que acepte electrones del anillo indólico.

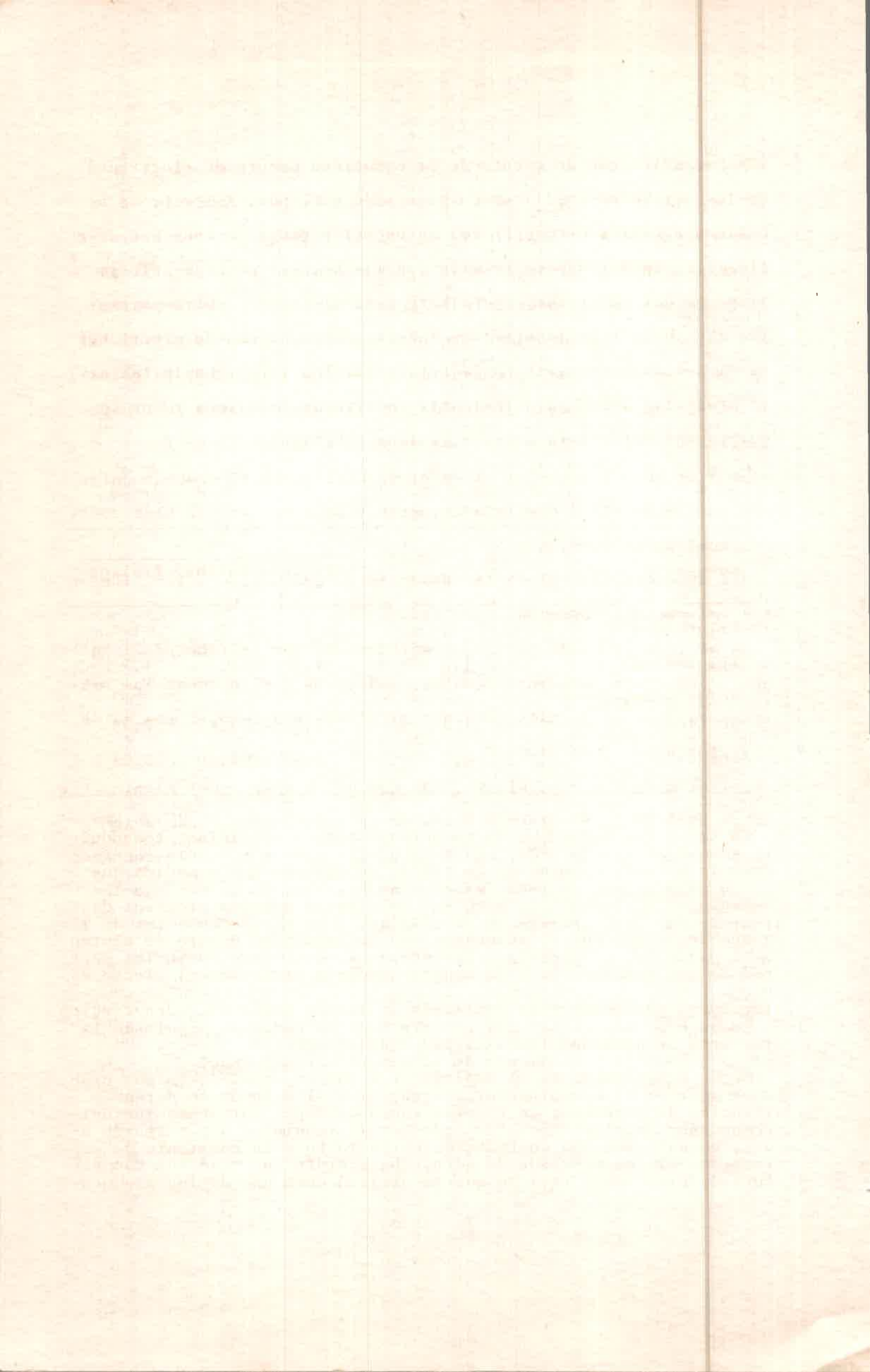
Así entonces se explica la secuencia de quenching de los diferentes aminoácidos observada para cada Indol.

Además, el hecho de que las pendientes de los gráficos de  $\ln kq'$  vs  $pK_{a1}$  sean aproximadamente iguales, indicaría que en todos los sistemas bajo estudio, está operando el mismo mecanismo, o sea el de transferencia de carga.

Relacionado con esto último, hay que hacer notar que  $\beta$  Alanina tiene un  $pK_{a1}$  de 3,55 quedando fuera de la correlación. Indudablemente no sabemos si los  $\beta$  derivados la darían puesto que sólo contamos de un solo valor, de todas maneras no hay porque esperar que las rectas, que posiblemente se obtendrían, sean paralelas a las de los  $\alpha$  AA dadas las diferencias estructurales existentes entre los derivados.

Según habíamos visto, las  $kq$  para cada AA variaban siguiendo la misma tendencia dependiendo de la naturaleza del Indol.

De acuerdo al mecanismo propuesto, el anillo indólico actuaría como donador de electrones, de modo que la inquietud que surge es averiguar si los procesos de quenching guardan una relación con al-



gún parametro que de cuenta de la capacidad donora de electrones de los derivados indólicos en su estado excitado. Así es como se hubiera necesitado conocer los potenciales redox de cada uno de ellos y encontrar una correlción con las kq, sin embargo sólo se dispones del valor correspondiente para el Indol<sup>66</sup>. Otro parametro que puede relacionarse con la eficiencia donora de electrones es el rendimiento cuántico de fotoionización ( $\Phi_e$ ). En la tabla VI se presentan los  $\Phi_e$  para los cuatro derivados indólicos y sus kq correspondientes para Glicina, Valina y Prolina:

TABLA VI

Compuesto	$\Phi_e$ (e <sup>-</sup> ac.) <sup>67</sup>	kq		
		Glicina	Valina	Prolina
Triptofano	1	1	1	1
Triptamina	1,2	1,7	1,1	1,3
Acido Indol-3-acético	1,5	3,9	2,05	2,34
Indol	2,1	3,37	2,20	2,93

En todos los casos  $\Phi_e$  y kq se normalizaron a Triptófano tomandolo como la unidad. Examinando la tabla, se observa que a medida que aumenta el  $\Phi_e$  también lo hace kq. Vale decir que los procesos de quenching estan muy relacionados con la habilidad donora de electrones de los Indoles. De esta manera quedaría explicado el efecto estructural observado y la variación de las kq según el orden creciente: Trp < Triptamina < Indol < ácido Indol-3-acético.

Según mencionamos en el Capítulo I.4, Ricci et al<sup>51</sup>, en sus experiencias de quenching de fluorescencia de Indol por iones lantánidos, encontraron una correlación entre la kq y la constante de captura de electrones (k<sub>e</sub>) la que se utilizó como uno de los argumen-

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page. The text is arranged in several paragraphs and appears to be a formal document or report. Some words are difficult to discern but seem to include terms like "The following", "It is", and "The purpose".

tos para postular la transferencia de electrones como un posible mecanismo de quenching. Sin embargo Steiner y Kirby<sup>39</sup> no encuentran tal correlación, siendo que proponen que un mecanismo posible sería el de transferencia de electrones como vía de desactivación de algunos derivados indólicos por aceptores de electrones.

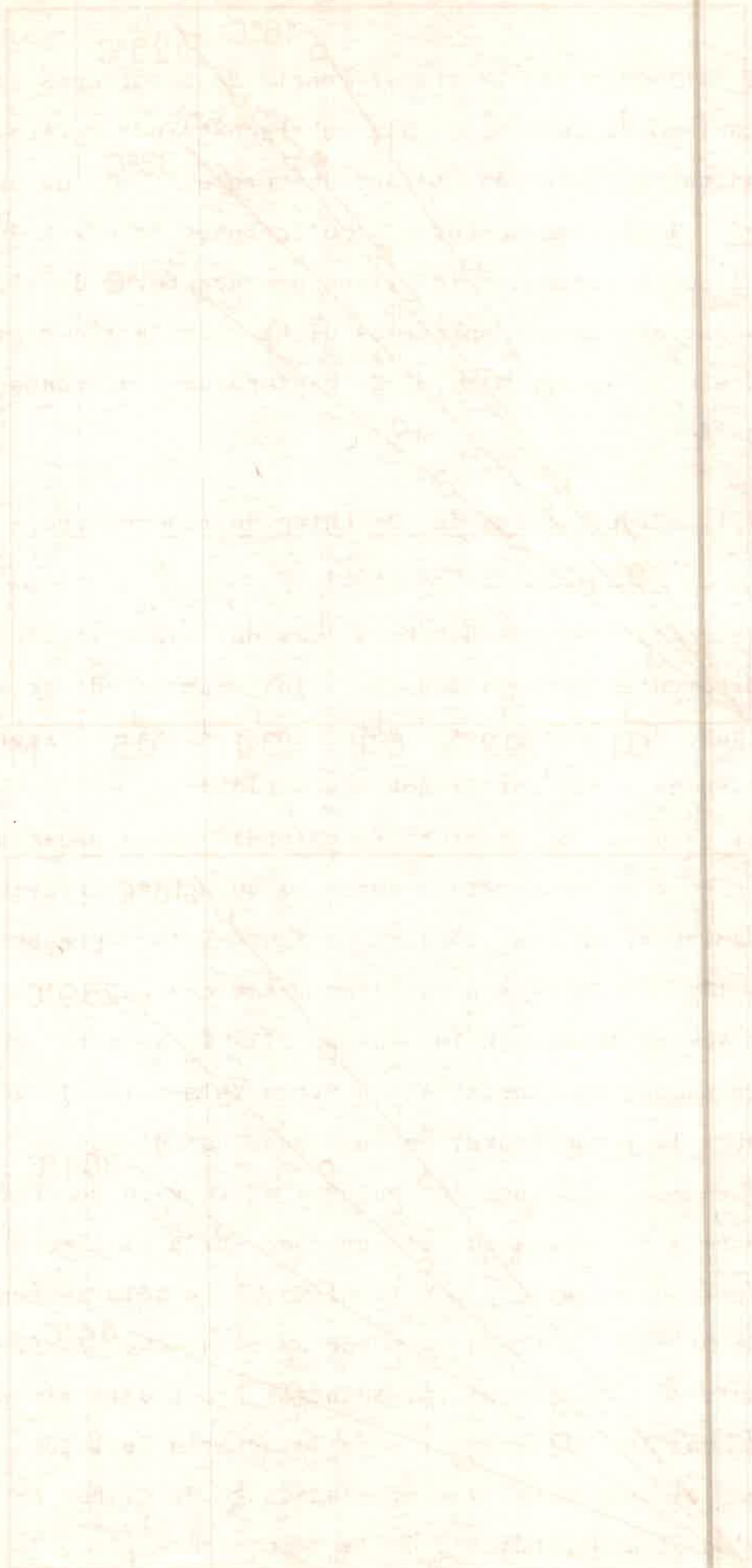
Nosotros tampoco obtenemos dicha correlación y posiblemente el proceso de quenching y el de captura de electrones no estén relacionados.

### III.2. Experiencias de quenching de fluorescencia estáticas a diferentes temperaturas.

Se realizaron medidas estáticas del quenching de fluorescencia a diferentes temperaturas para los cuatro indoles y seis de los aminoácidos estudiados a 25°C. Los resultados experimentales con  $\beta$  Alanina seran detallados más adelante.

El rango de temperatura se extendió aproximadamente entre 10-45°C. El efecto de temperatura sobre el quenching intermolecular se puede apreciar en los gráficos de Stern-Volmer presentados en las figuras 13- 20. Estos son resultados típicos que se obtuvieron para todos los sistemas. En las tablas VII- X, se puede observar que los valores de las constantes de Stern-Volmer (Ksv) disminuyen al aumentar la temperatura, en los casos estudiados.

Para poder obtener los valores de  $k_q$  y su dependencia con la temperatura es necesario conocer como varía el tiempo de vida del Indol correspondiente ( $\tau_0$ ) con la misma. Esto sólo se conoce para Indol<sup>17,19</sup> y Triptófano<sup>16</sup>, donde se puede apreciar que es fuertemente dependiente de la temperatura. Nosotros hemos determinado la dependencia de  $\tau_0$  con la temperatura, para los cuatro derivados indólicos, utilizando el método que a continuación se describe. Recordemos que:  $\Phi_f^0 = k_f \tau_0$  siendo  $k_f$  independiente de la temperatura<sup>17,25</sup>. Además siendo la in



100  
 200  
 300  
 400  
 500  
 600  
 700  
 800  
 900  
 1000  
 1100  
 1200  
 1300  
 1400  
 1500  
 1600  
 1700  
 1800  
 1900  
 2000  
 2100  
 2200  
 2300  
 2400  
 2500  
 2600  
 2700  
 2800  
 2900  
 3000  
 3100  
 3200  
 3300  
 3400  
 3500  
 3600  
 3700  
 3800  
 3900  
 4000  
 4100  
 4200  
 4300  
 4400  
 4500  
 4600  
 4700  
 4800  
 4900  
 5000  
 5100  
 5200  
 5300  
 5400  
 5500  
 5600  
 5700  
 5800  
 5900  
 6000  
 6100  
 6200  
 6300  
 6400  
 6500  
 6600  
 6700  
 6800  
 6900  
 7000  
 7100  
 7200  
 7300  
 7400  
 7500  
 7600  
 7700  
 7800  
 7900  
 8000  
 8100  
 8200  
 8300  
 8400  
 8500  
 8600  
 8700  
 8800  
 8900  
 9000  
 9100  
 9200  
 9300  
 9400  
 9500  
 9600  
 9700  
 9800  
 9900  
 10000

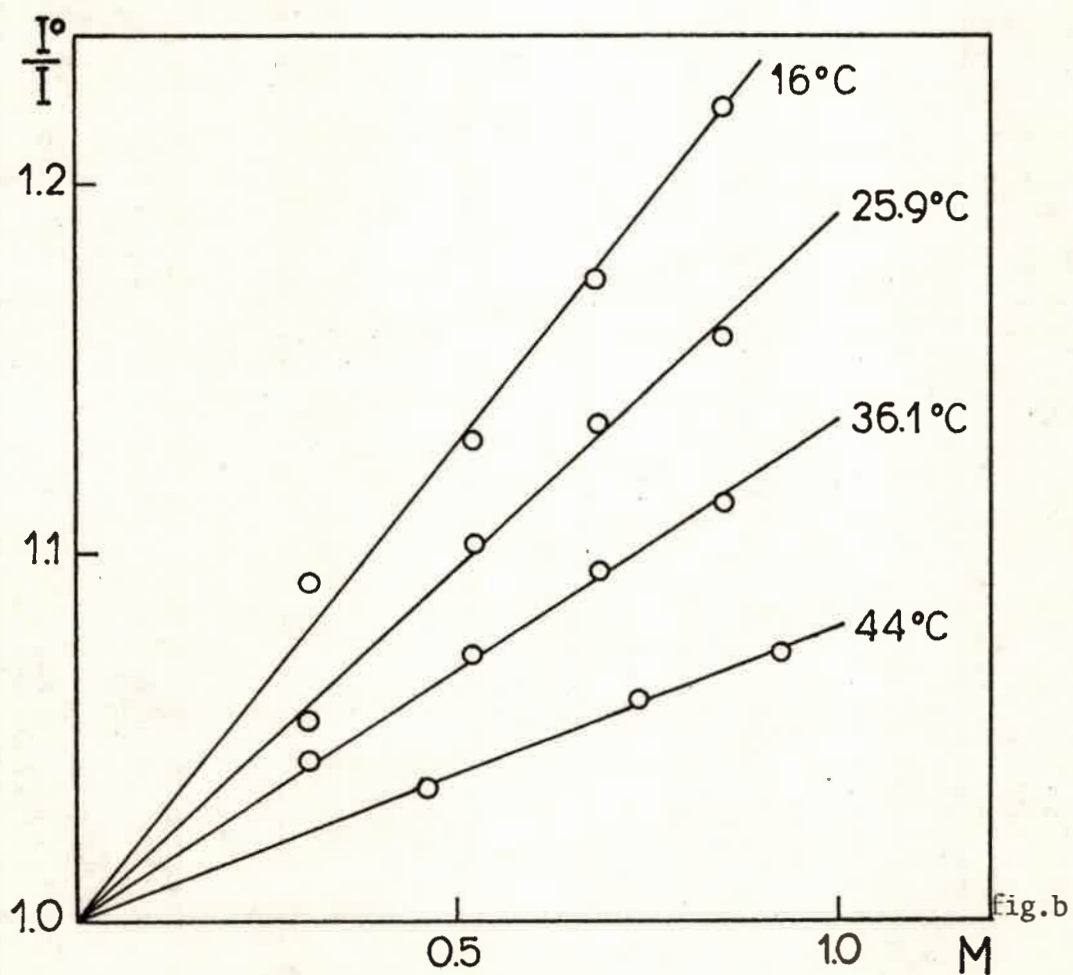
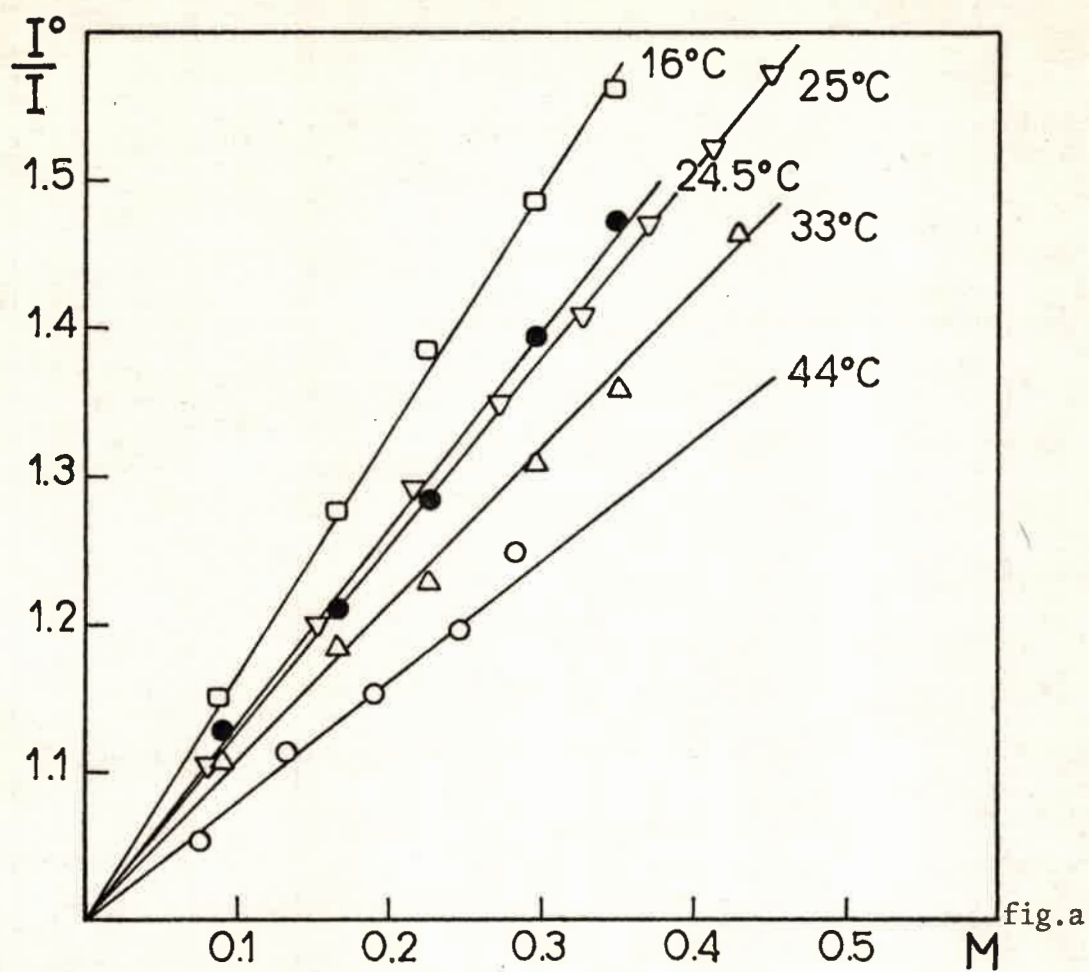


fig.13 a. Efecto de la concentración de Prolina sobre la fluorescencia de Triptófano.

b. Idem para Glicina



Handwritten text on the right side of the page, possibly a title or label for the graph. The text is written in blue ink and is partially obscured by the grid lines. It appears to be a list of numbers or a sequence of values, possibly representing the y-axis of the graph. The text is written vertically and is difficult to read due to the handwriting and the grid lines.

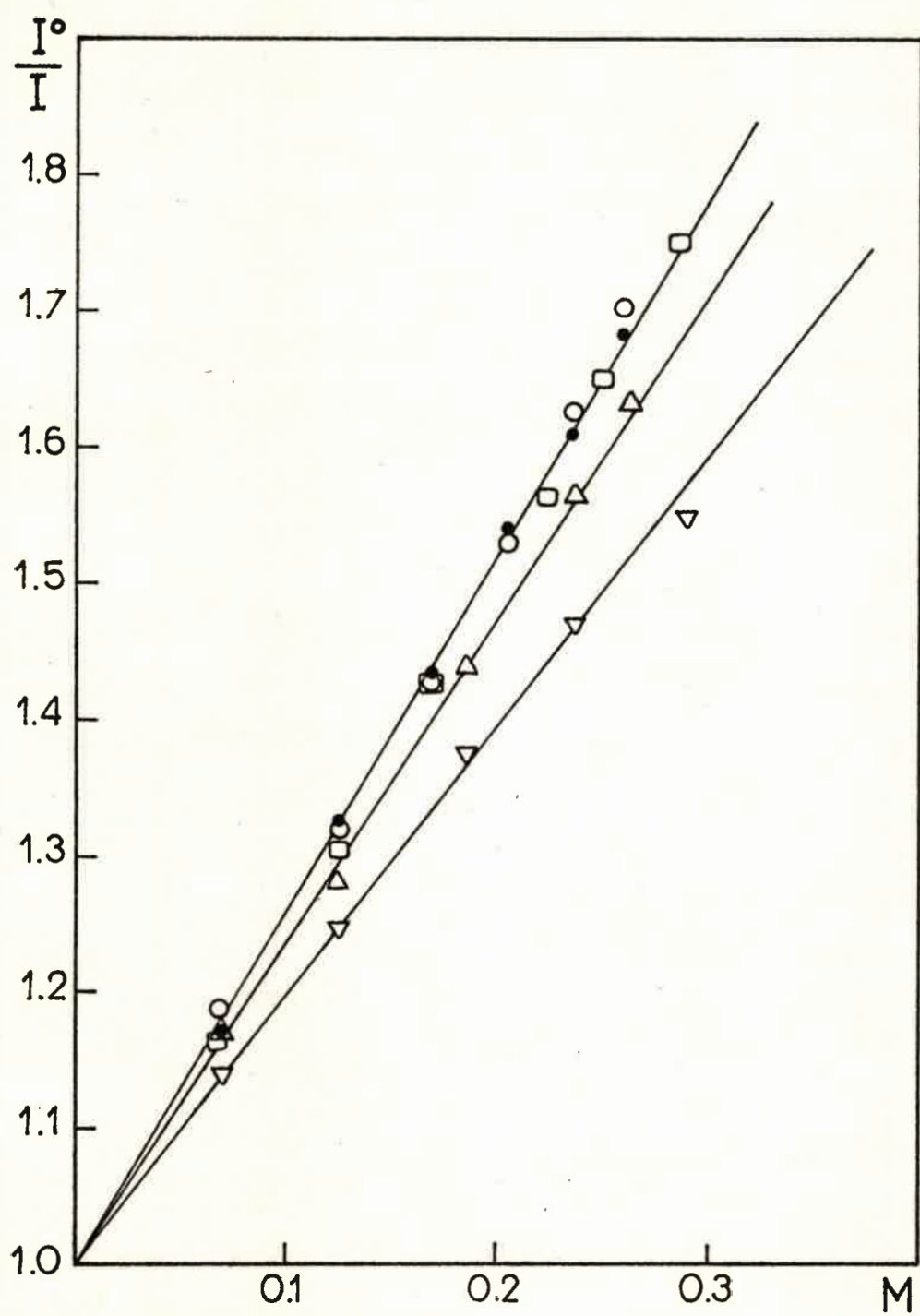


fig.14 Efecto de la concentración de Hidroxiprolina sobre la fluorescencia de Triptófano.

● 10,9°C; ○ 16,6°C; □ 25,4°C; △ 35,0°C; ▽ 44,2°C



M

100



M 100

Figure 50. The relationship between the variables M and Y.

The graph shows a clear negative correlation between M and Y.

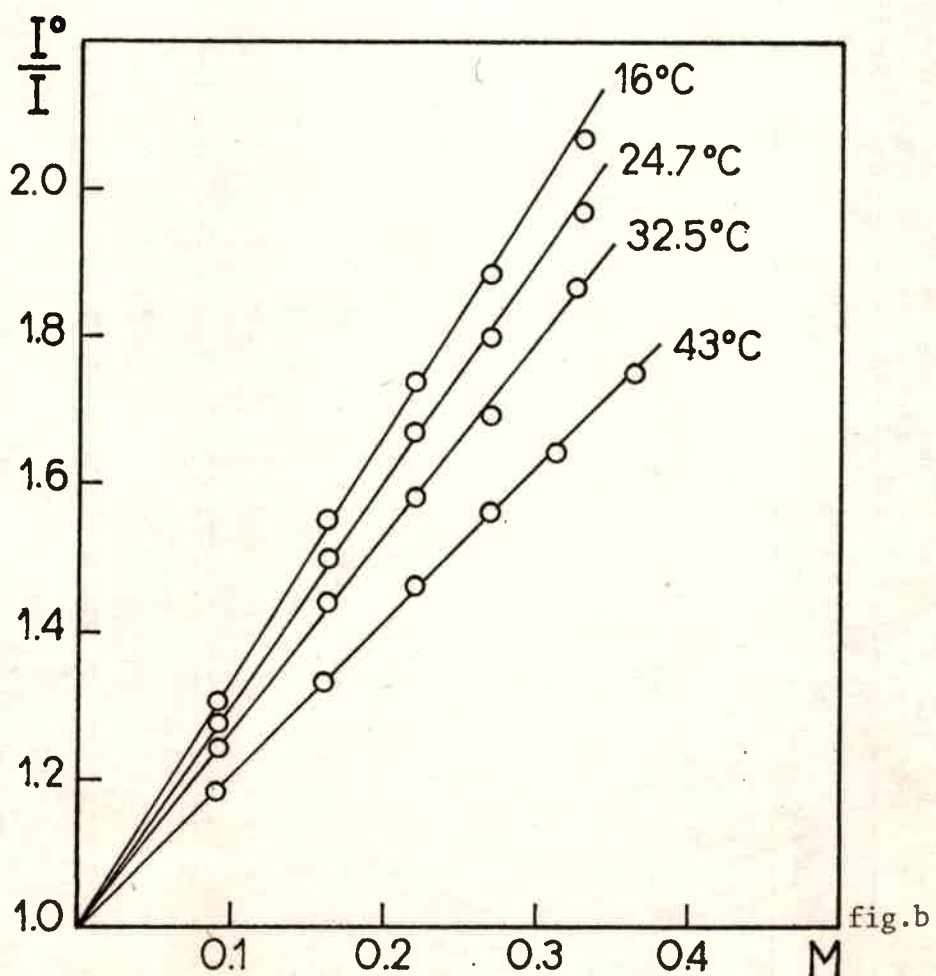
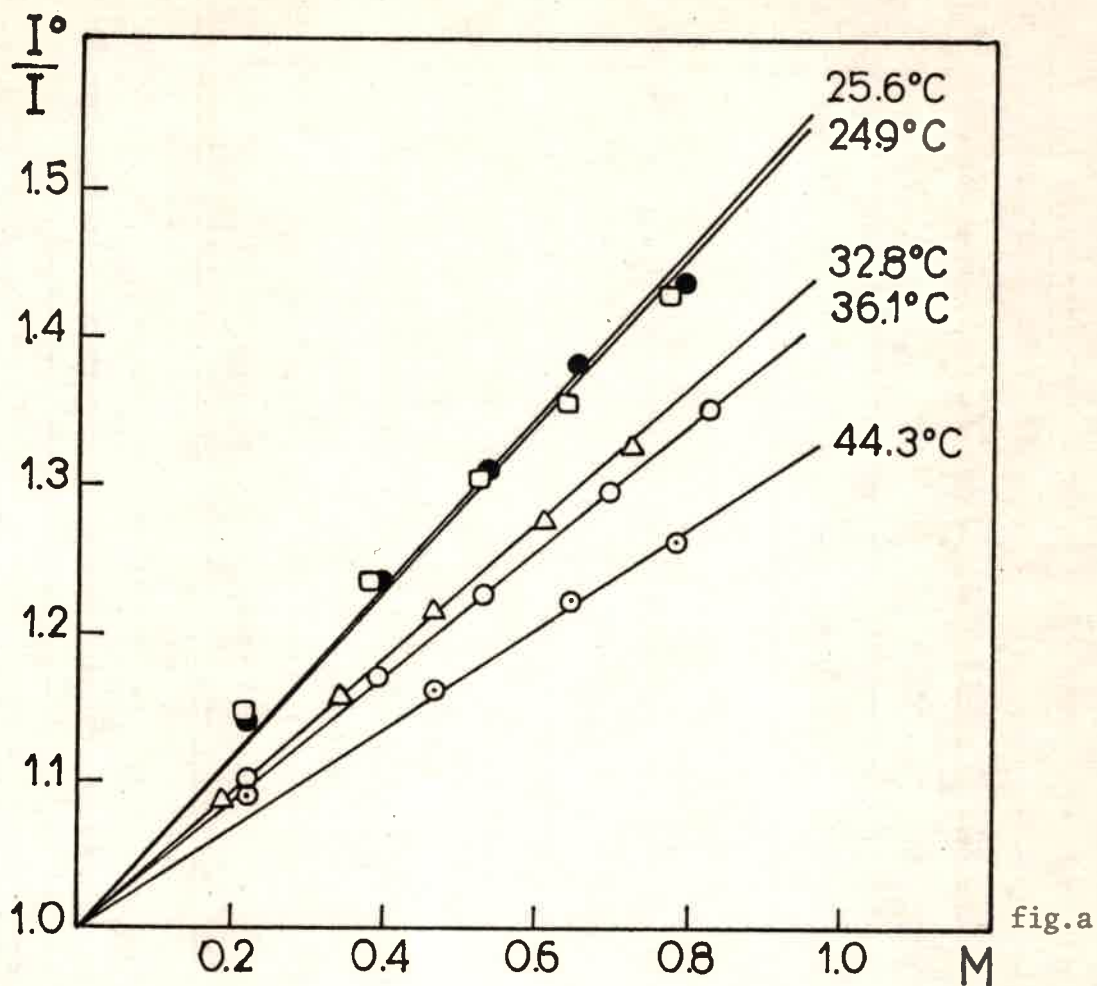


fig.15 a. Efecto de la concentración de Glicina sobre la fluorescencia de Triptamina.

b. Idem para Prolina



M

10

10

10

10

10

10

10

10

10

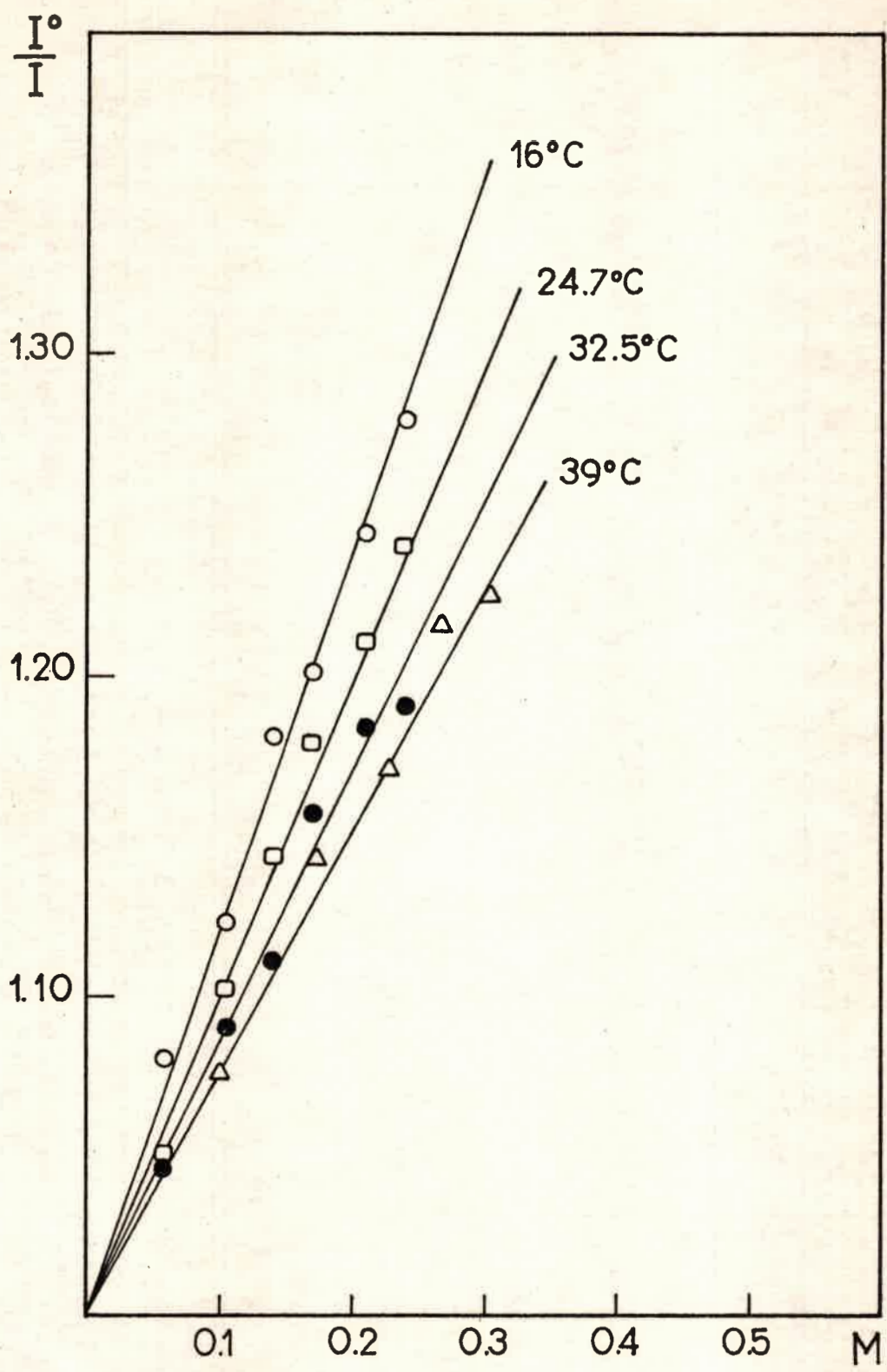
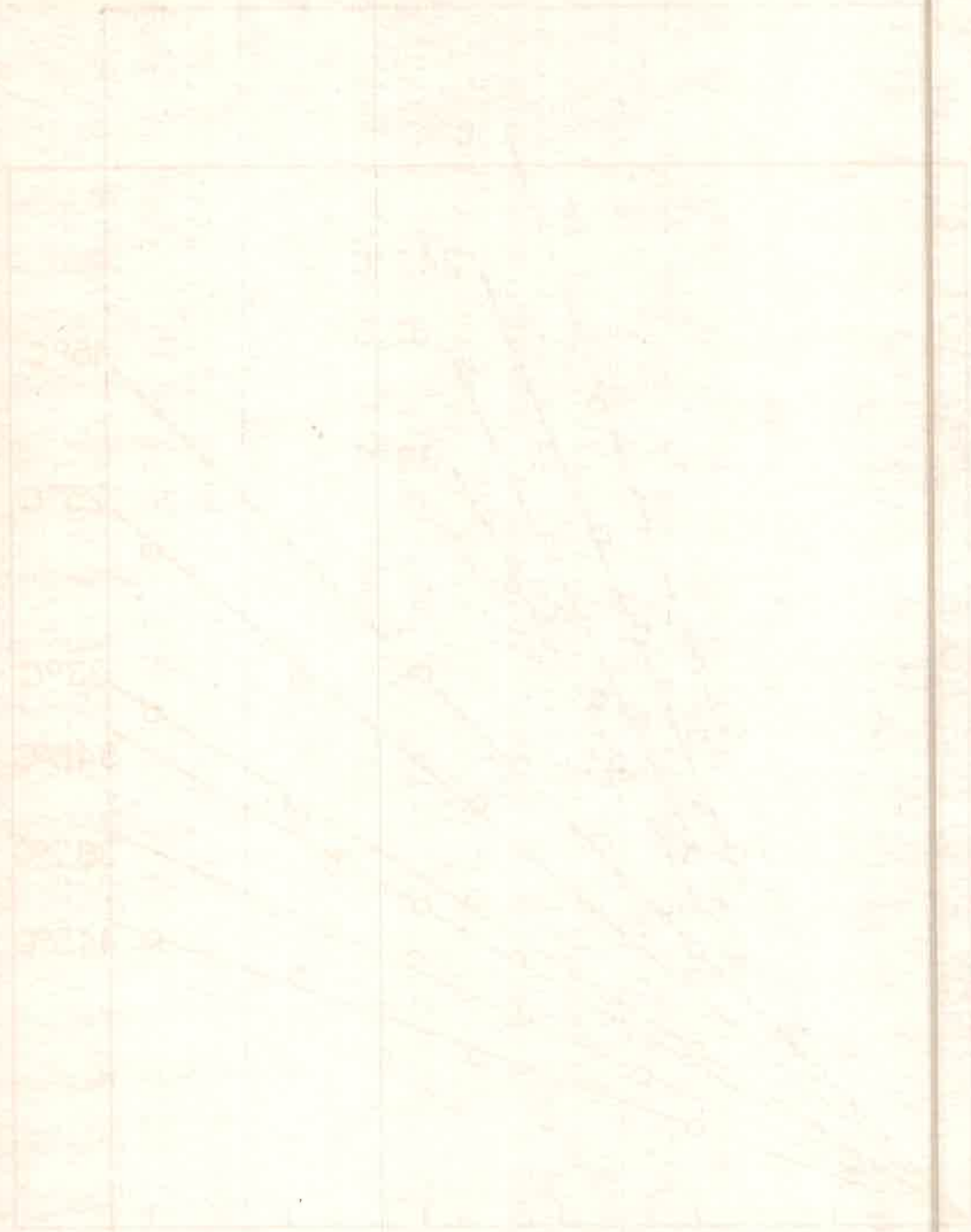


fig.16 Efecto de la concentración de Valina sobre la fluorescencia de Triptamina



Y  
 X

1  
 2  
 3  
 4  
 5  
 6

Handwritten notes or a title, possibly describing the graph or the data represented. The text is faint and difficult to read.

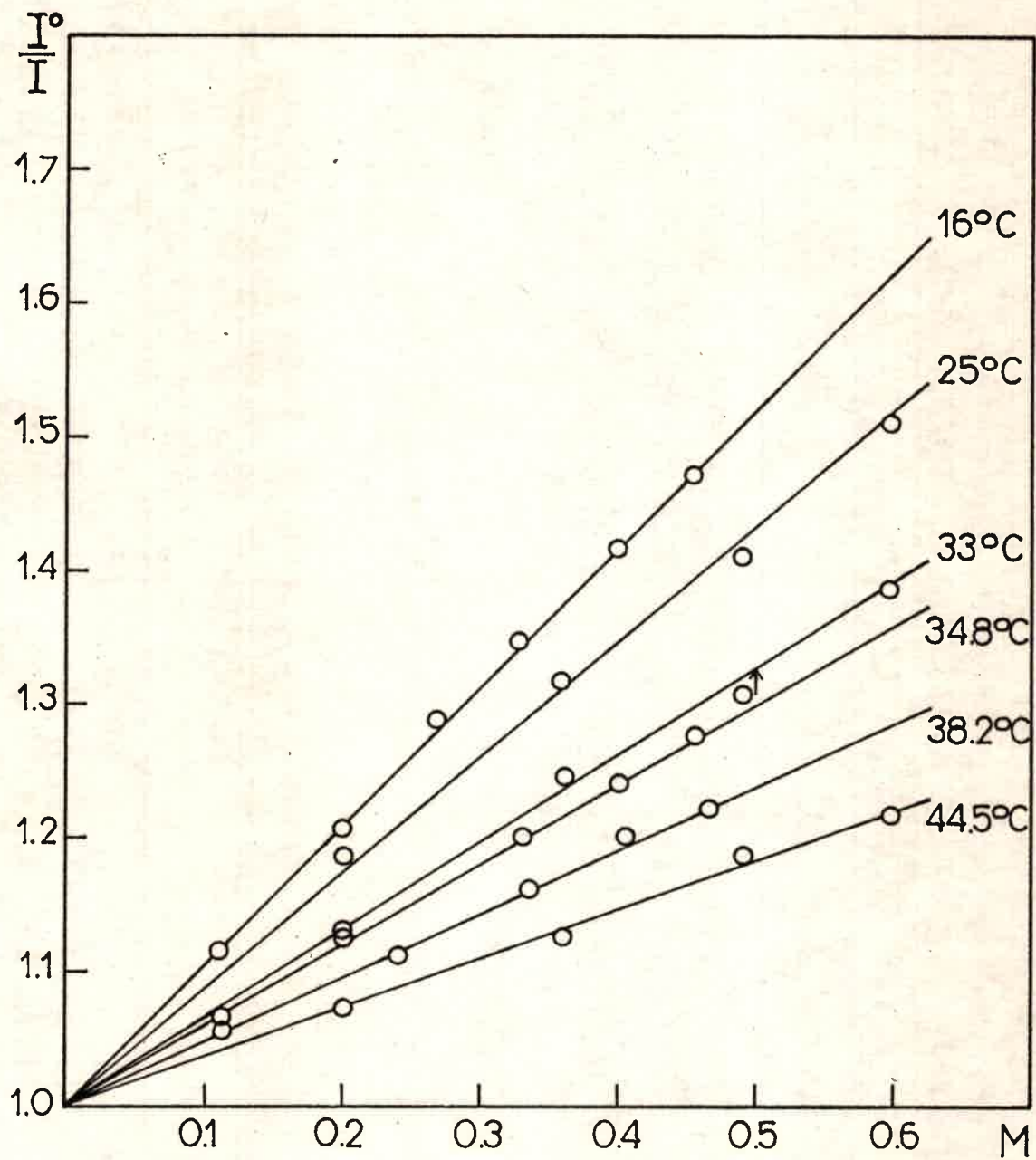


fig.17 Efecto de la concentración de Glicina sobre la fluorescencia de Indol



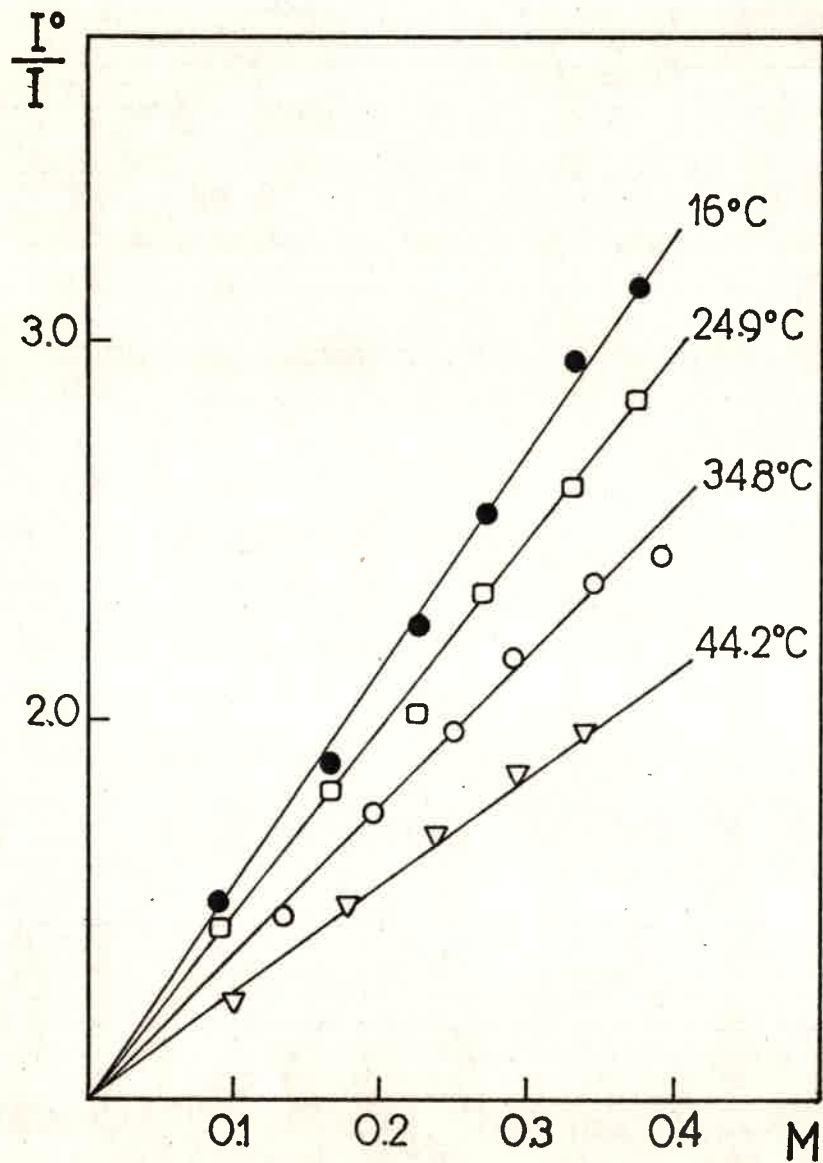
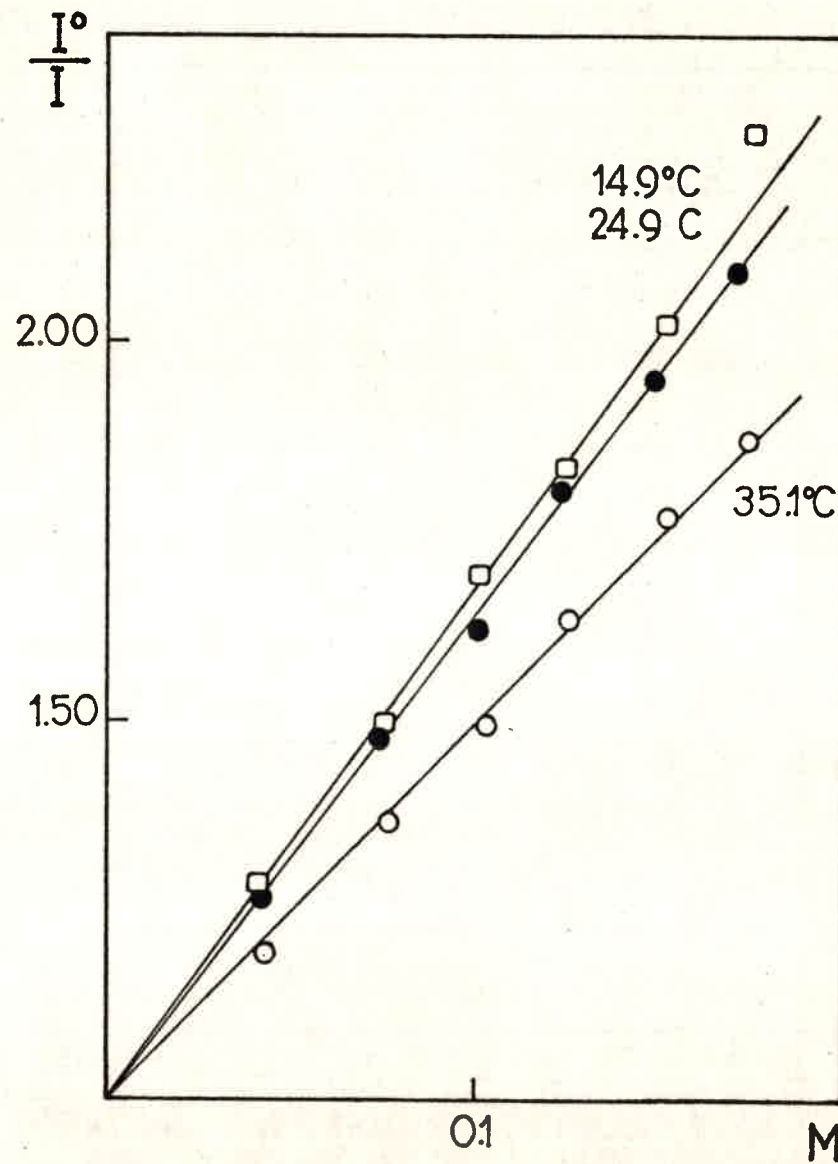
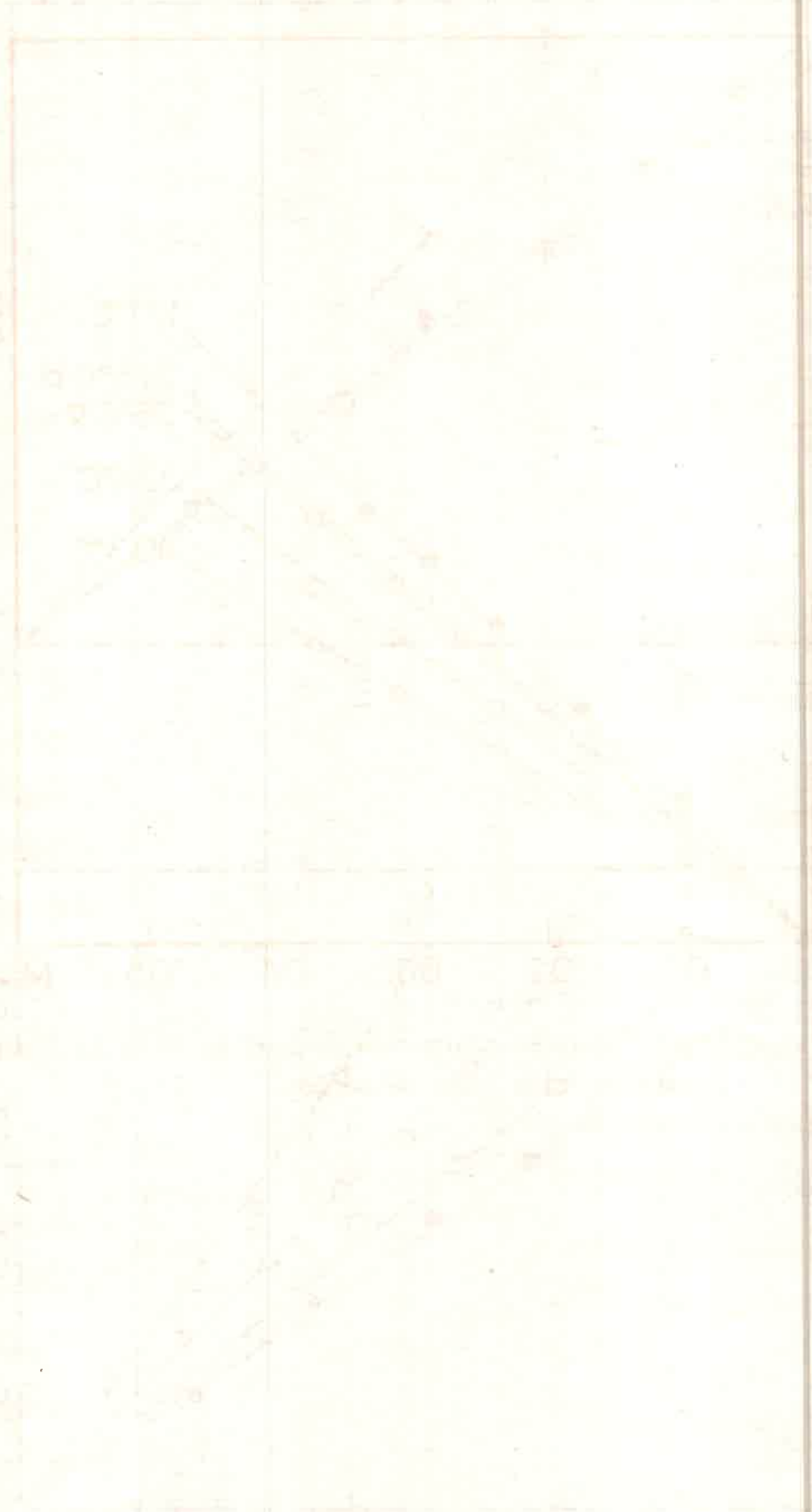


fig.a



figb

fig.18 Efecto de la concentración de Prolina (a) e Hidroxiprolina (b) sobre la fluorescencia de Indol.



100  
 200  
 300  
 400  
 500  
 600  
 700  
 800  
 900  
 1000  
 1100  
 1200  
 1300  
 1400  
 1500  
 1600  
 1700  
 1800  
 1900  
 2000  
 2100  
 2200  
 2300  
 2400  
 2500  
 2600  
 2700  
 2800  
 2900  
 3000  
 3100  
 3200  
 3300  
 3400  
 3500  
 3600  
 3700  
 3800  
 3900  
 4000  
 4100  
 4200  
 4300  
 4400  
 4500  
 4600  
 4700  
 4800  
 4900  
 5000  
 5100  
 5200  
 5300  
 5400  
 5500  
 5600  
 5700  
 5800  
 5900  
 6000  
 6100  
 6200  
 6300  
 6400  
 6500  
 6600  
 6700  
 6800  
 6900  
 7000  
 7100  
 7200  
 7300  
 7400  
 7500  
 7600  
 7700  
 7800  
 7900  
 8000  
 8100  
 8200  
 8300  
 8400  
 8500  
 8600  
 8700  
 8800  
 8900  
 9000  
 9100  
 9200  
 9300  
 9400  
 9500  
 9600  
 9700  
 9800  
 9900  
 10000

100  
 200  
 300  
 400  
 500  
 600  
 700  
 800  
 900  
 1000  
 1100  
 1200  
 1300  
 1400  
 1500  
 1600  
 1700  
 1800  
 1900  
 2000  
 2100  
 2200  
 2300  
 2400  
 2500  
 2600  
 2700  
 2800  
 2900  
 3000  
 3100  
 3200  
 3300  
 3400  
 3500  
 3600  
 3700  
 3800  
 3900  
 4000  
 4100  
 4200  
 4300  
 4400  
 4500  
 4600  
 4700  
 4800  
 4900  
 5000  
 5100  
 5200  
 5300  
 5400  
 5500  
 5600  
 5700  
 5800  
 5900  
 6000  
 6100  
 6200  
 6300  
 6400  
 6500  
 6600  
 6700  
 6800  
 6900  
 7000  
 7100  
 7200  
 7300  
 7400  
 7500  
 7600  
 7700  
 7800  
 7900  
 8000  
 8100  
 8200  
 8300  
 8400  
 8500  
 8600  
 8700  
 8800  
 8900  
 9000  
 9100  
 9200  
 9300  
 9400  
 9500  
 9600  
 9700  
 9800  
 9900  
 10000

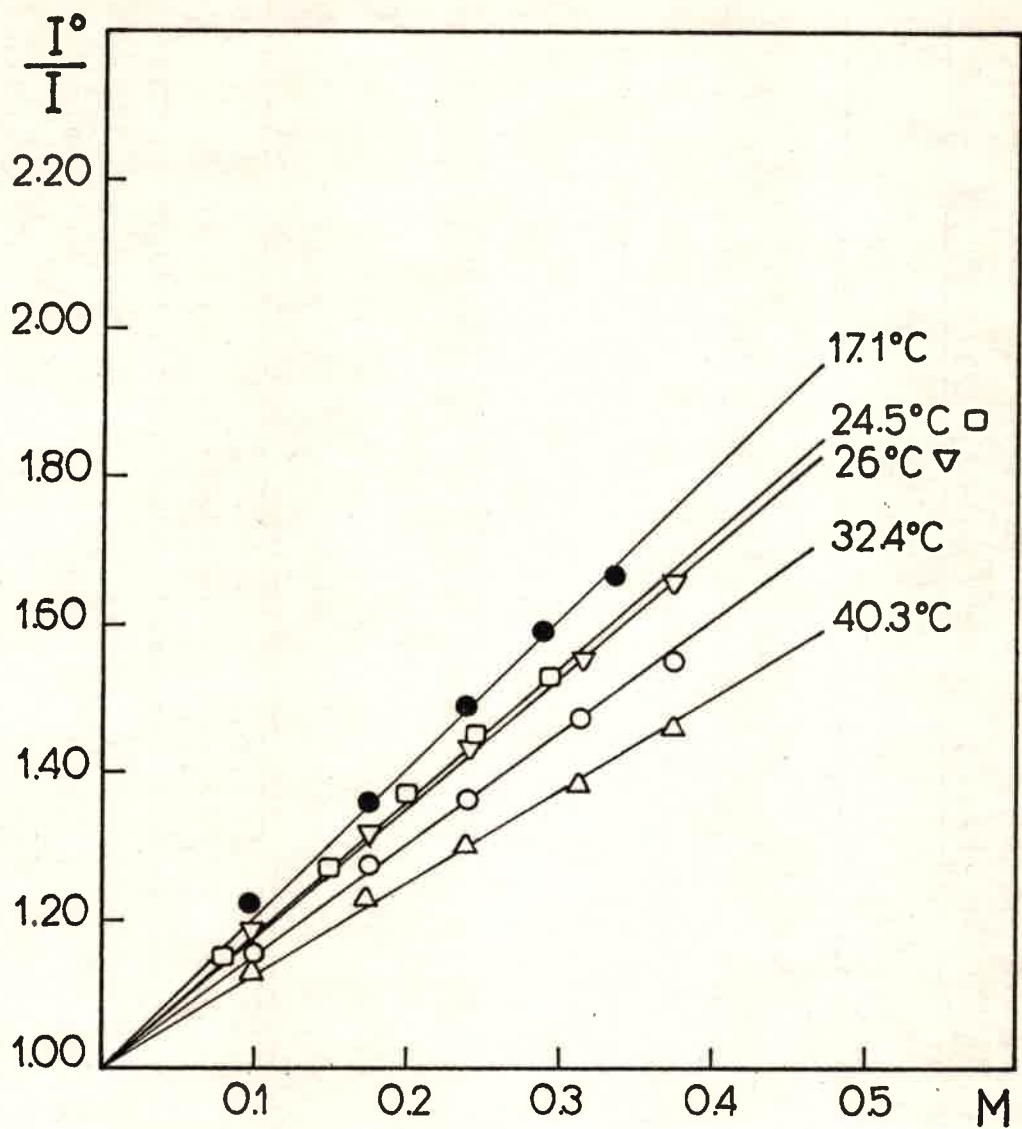


fig.19 Efecto de la concentración de Alanina sobre la fluorescencia de ácido Indol-3-acético.



Handwritten text on the right side of the page, possibly a title or description of the graph. The text is faint and difficult to read, but it appears to be written in a cursive or semi-cursive style. It might be a name or a set of coordinates.

Handwritten text at the bottom of the page, possibly a signature or a date. The text is very faint and difficult to read, but it appears to be written in a cursive or semi-cursive style. It might be a name or a date.

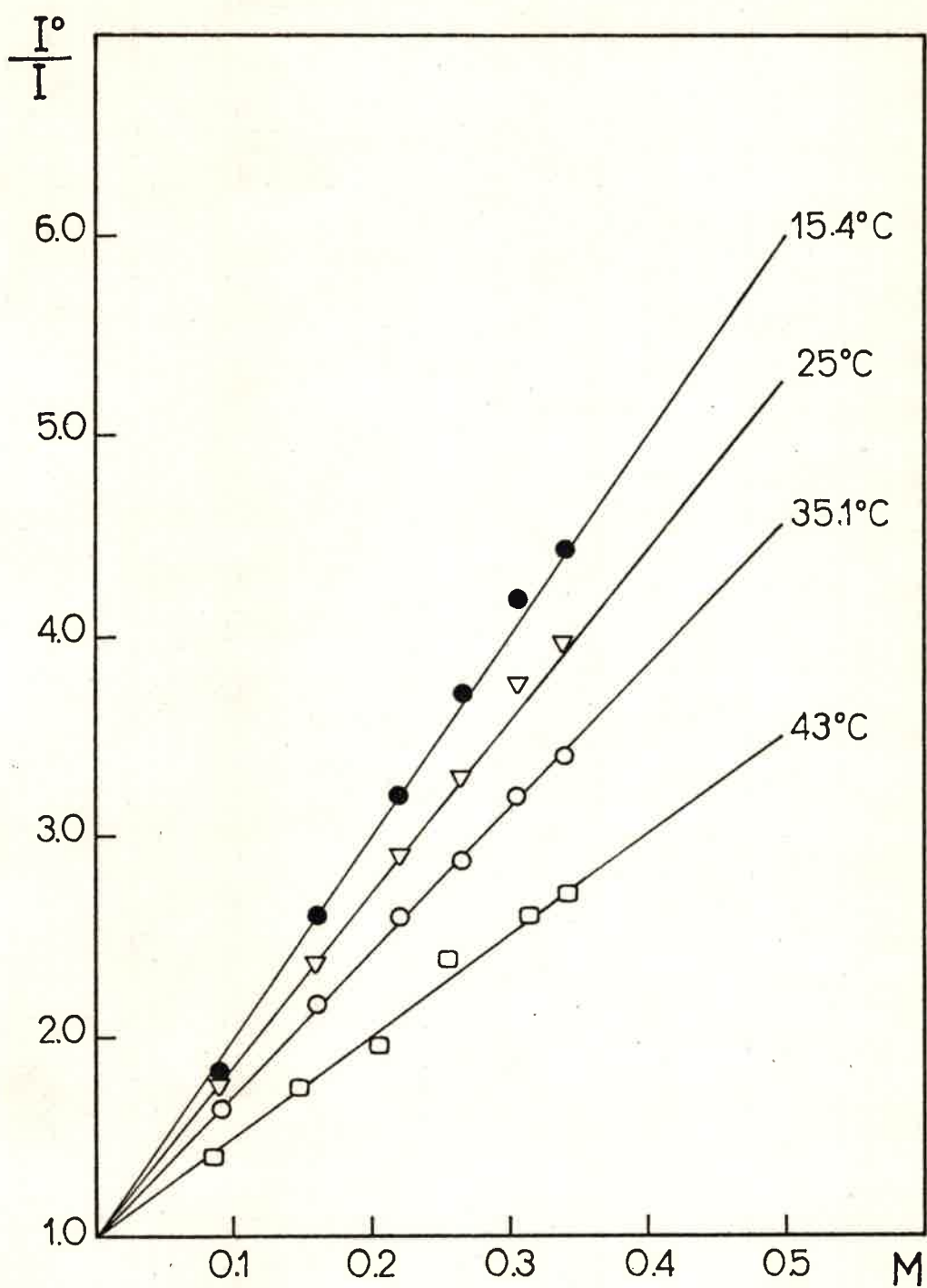


fig.20 Efecto de la concentración de Prolina sobre la fluorescencia de ácido Indol-3-acético.

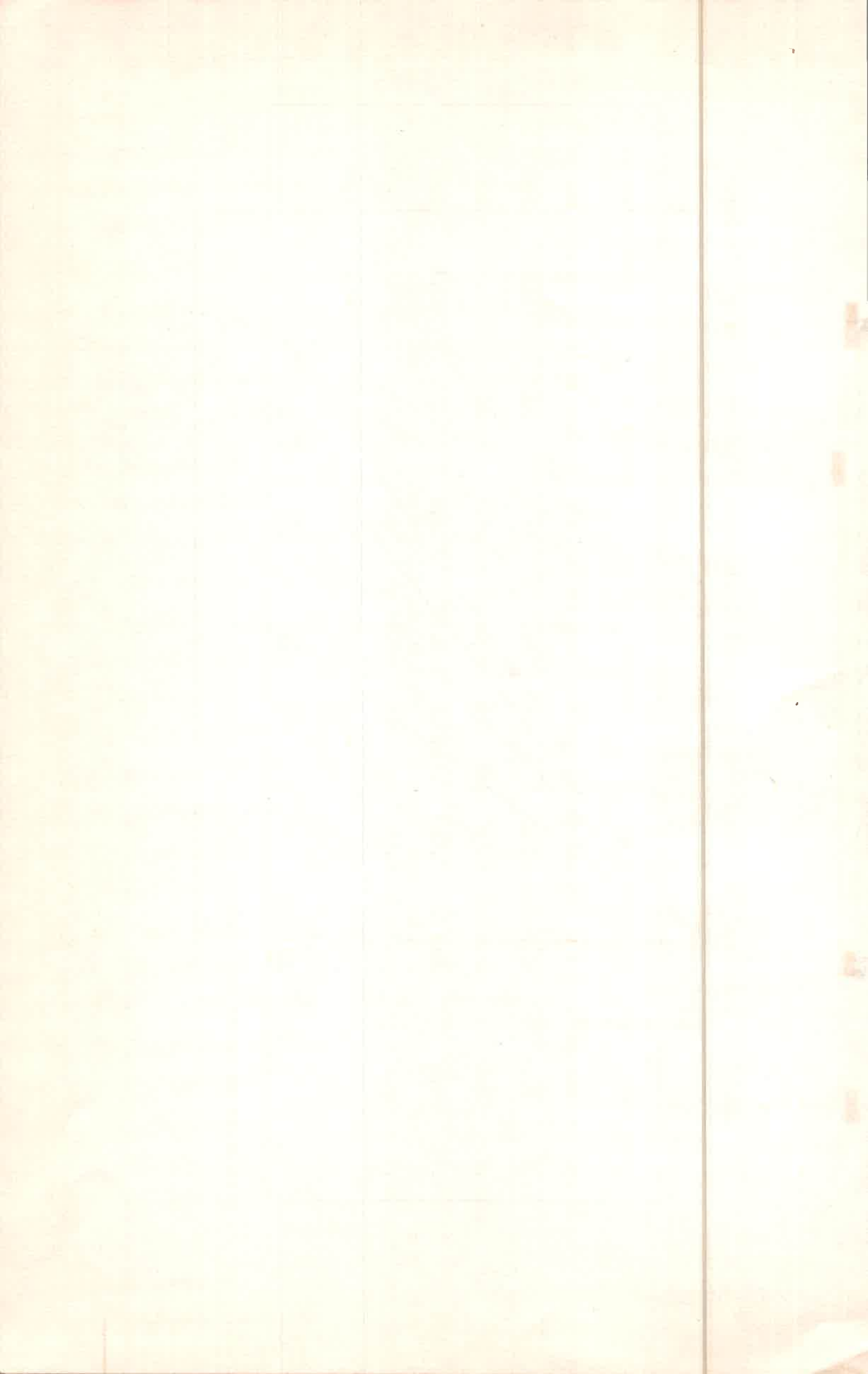


TABLA VII. Constantes de Stern-Volmer (Ksv) para el quenching de fluorescencia de Triptófano por varios AAa a distintas temperaturas.

GLICINA		ALANINA		VALINA		PROLINA		HIDROXIPROLINA	
t°C	Ksv (M <sup>-1</sup> )	t°C	Ksv (M <sup>-1</sup> )	t°C	Ksv (M <sup>-1</sup> )	t°C	Ksv (M <sup>-1</sup> )	t°C	Ksv (M <sup>-1</sup> )
16,0	0,26	15,7	0,23	16,5	0,57	16,0	1,64	10,9	2,60
25,8	0,19	24,9	0,18	25,0	0,52	24,5	1,32	16,6	2,60
36,1	0,11	25,8	0,15	25,7	0,49	25,0	1,26	25,4	2,60
44,0	0,07	29,5	0,14	34,0	0,31	33,0	1,06	35,0	2,36
		33,3	0,12	44,0	0,26	44,0	0,81	44,2	1,98
		38,0	0,10						

El error en Ksv es de  $\pm 0,04$

1870

1871

1872

1873

1874

1875

1876

1877

1878

TABLA VIII. Constantes de Stern-Volmer (Ksv) para el quenching de fluorescencia de Triptamina por varios AAa a distintas temperaturas.

GLICINA		ALANINA		VALINA		PROLINA		HIDROXIPROLINA	
t°C	Ksv (M <sup>-1</sup> )	t°C	Ksv (M <sup>-1</sup> )	t°C	Ksv (M <sup>-1</sup> )	t°C	Ksv (M <sup>-1</sup> )	t°C	Ksv (M <sup>-1</sup> )
25,0	0,55	16,3	0,58	16,0	1,19	16,0	3,28	10,0	5,08
25,6	0,57	16,6	0,62	24,7	1,00	24,7	2,95	15,5	5,16
32,8	0,45	23,7	0,56	32,5	0,86	32,5	2,58	24,5	5,08
36,1	0,42	24,4	0,53	39,0	0,75	43,0	2,04	24,8	5,14
44,3	0,34	34,3	0,49					35,0	4,76
		45,1	0,33					44,7	3,85

El error en Ksv es de  $\pm 0,04$

1870  
1871  
1872  
1873  
1874  
1875  
1876  
1877  
1878  
1879  
1880  
1881  
1882  
1883  
1884  
1885  
1886  
1887  
1888  
1889  
1890  
1891  
1892  
1893  
1894  
1895  
1896  
1897  
1898  
1899  
1900

1901  
1902  
1903  
1904  
1905  
1906  
1907  
1908  
1909  
1910  
1911  
1912  
1913  
1914  
1915  
1916  
1917  
1918  
1919  
1920  
1921  
1922  
1923  
1924  
1925  
1926  
1927  
1928  
1929  
1930

1931  
1932  
1933  
1934  
1935  
1936  
1937  
1938  
1939  
1940  
1941  
1942  
1943  
1944  
1945  
1946  
1947  
1948  
1949  
1950  
1951  
1952  
1953  
1954  
1955  
1956  
1957  
1958  
1959  
1960

1961  
1962  
1963  
1964  
1965  
1966  
1967  
1968  
1969  
1970  
1971  
1972  
1973  
1974  
1975  
1976  
1977  
1978  
1979  
1980  
1981  
1982  
1983  
1984  
1985  
1986  
1987  
1988  
1989  
1990

1991  
1992  
1993  
1994  
1995  
1996  
1997  
1998  
1999  
2000  
2001  
2002  
2003  
2004  
2005  
2006  
2007  
2008  
2009  
2010  
2011  
2012  
2013  
2014  
2015  
2016  
2017  
2018  
2019  
2020

2021  
2022  
2023  
2024  
2025  
2026  
2027  
2028  
2029  
2030  
2031  
2032  
2033  
2034  
2035  
2036  
2037  
2038  
2039  
2040  
2041  
2042  
2043  
2044  
2045  
2046  
2047  
2048  
2049  
2050

TABLA IX. Constantes de Stern-Volmer (Ksv) para el quenching de fluorescencia de Indol por varios AAa a distintas temperaturas.

GLICINA		ALANINA		VALINA		PROLINA		HIDROXIPROLINA	
t°C	Ksv (M <sup>-1</sup> )	t°C	Ksv (M <sup>-1</sup> )	t°C	Ksv (M <sup>-1</sup> )	t°C	Ksv (M <sup>-1</sup> )	t°C	Ksv (M <sup>-1</sup> )
16,0	1,04	16,0	1,00	15,5	1,65	16,0	5,67	15,0	6,72
24,9	0,86	24,9	0,77	25,0	1,40	25,0	4,94	25,0	6,41
25,0	0,86	25,0	0,76	31,1	1,15	34,8	3,90	35,0	4,94
33,0	0,65	30,5	0,63	36,8	0,93	44,2	2,80		
34,8	0,60	34,0	0,55	44,0	0,71				
38,2	0,47								
44,5	0,37								

El error en Ksv es de  $\pm 0,04$

1851  
1852  
1853  
1854  
1855  
1856  
1857  
1858  
1859  
1860  
1861  
1862  
1863  
1864  
1865  
1866  
1867  
1868  
1869  
1870  
1871  
1872  
1873  
1874  
1875  
1876  
1877  
1878  
1879  
1880  
1881  
1882  
1883  
1884  
1885  
1886  
1887  
1888  
1889  
1890  
1891  
1892  
1893  
1894  
1895  
1896  
1897  
1898  
1899  
1900

Year	Jan	Feb	Mar	Apr	May	June	July	Aug	Sept	Oct	Nov	Dec
1851												
1852												
1853												
1854												
1855												
1856												
1857												
1858												
1859												
1860												
1861												
1862												
1863												
1864												
1865												
1866												
1867												
1868												
1869												
1870												
1871												
1872												
1873												
1874												
1875												
1876												
1877												
1878												
1879												
1880												
1881												
1882												
1883												
1884												
1885												
1886												
1887												
1888												
1889												
1890												
1891												
1892												
1893												
1894												
1895												
1896												
1897												
1898												
1899												
1900												

1851  
1852  
1853  
1854  
1855  
1856  
1857  
1858  
1859  
1860  
1861  
1862  
1863  
1864  
1865  
1866  
1867  
1868  
1869  
1870  
1871  
1872  
1873  
1874  
1875  
1876  
1877  
1878  
1879  
1880  
1881  
1882  
1883  
1884  
1885  
1886  
1887  
1888  
1889  
1890  
1891  
1892  
1893  
1894  
1895  
1896  
1897  
1898  
1899  
1900

TABLA X. Constantes de Stern-Volmer (Ksv) para el quenching de fluorescencia de ácido In dol-3-acético por varios AAa a distintas temperaturas.

GLICINA		ALANINA		VALINA		PROLINA		HIDROXIPROLINA	
t°C	Ksv (M <sup>-1</sup> )	t°C	Ksv (M <sup>-1</sup> )	t°C	Ksv (M <sup>-1</sup> )	t°C	Ksv (M <sup>-1</sup> )	t°C	Ksv (M <sup>-1</sup> )
18,0	2,72	17,1	2,02	16,2	3,53	15,4	10,00	15,2	10,30
25,7	2,21	24,5	1,81	23,7	2,98	25,0	8,60	24,5	10,28
32,5	1,90	26,0	1,76	25,0	3,07	35,1	7,14	26,0	10,50
34,4	1,87	32,4	1,52	33,0	2,61	43,0	5,04	34,0	8,42
45,0	1,19	40,3	1,25	44,2	1,94			45,0	6,87
				45,0	1,47				

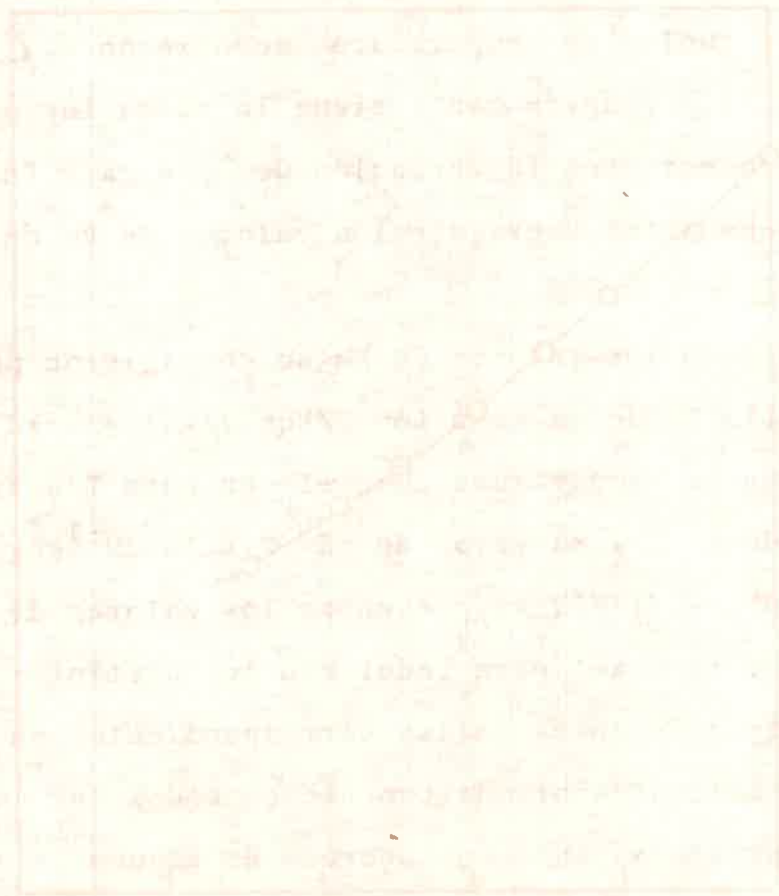
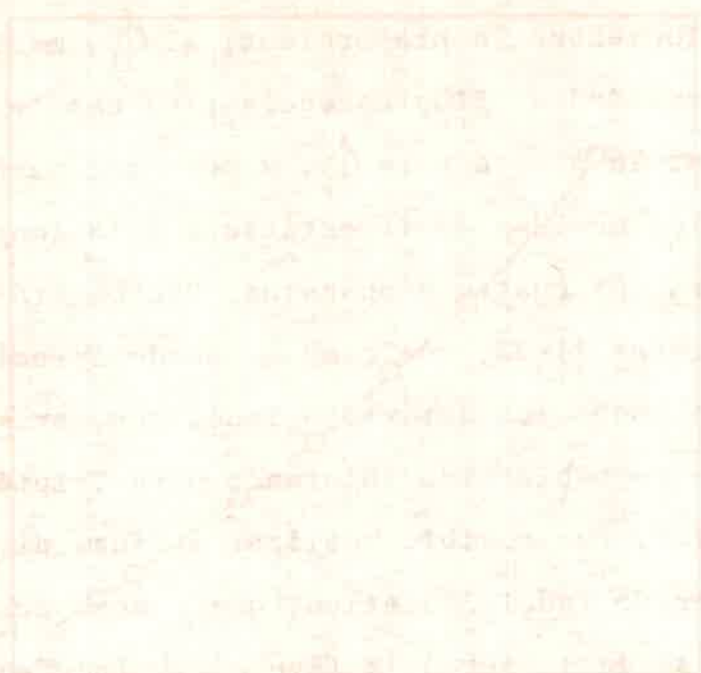
El error en Ksv es de  $\pm 0,04$

tensidad de fluorescencia proporcional al  $\Phi_f$ , midiendo la dependencia de la intensidad de fluorescencia ( $I_f$ ) con la temperatura, podemos averiguar lo propio para  $\Phi_f$ , y por ende para  $\zeta_0$ . Así es como se realizaron medidas de  $I_f$  estáticas a la longitud de onda máxima vs T, para los cuatro compuestos. Dichos gráficos se presentan en las figuras 21-22, que como se puede apreciar, son bastantes similares para todos los derivados indólicos, existiendo concordancia con lo que ya había sido informado para Triptófano e Indol por diversos autores. Fue posible realizar medidas directas de  $\zeta_0$  vs T para Indol y ácido Indol-3-acético, que a modo de comparación con las estáticas se muestran en la figura 22. Indudablemente pese al error involucrado en las medidas dinámicas existe un buen acuerdo con las estáticas. Sin embargo se utilizaron sólo los resultados de las medidas estáticas, para conocer la dependencia de  $\zeta_0$  con la temperatura, por ser más precisas que las dinámicas. Una vez obtenido el gráfico de  $I_f$  vs T en valores porcentuales se pudo averiguar el  $\zeta_0$  a cualquier temperatura, conociendo el  $\zeta_0$  a 25°C y suponiendo que su variación con T sigue la misma ley que  $I_f$  vs T.

Conociendo entonces la variación de  $\zeta_0$  de cada Indol con la temperatura nos permitió averiguar los valores de  $kq$  en el rango de T estudiado.

Por otro lado los valores de  $kq$  se corrigieron por efectos difusionales utilizando la ecuación  $1/kq = 1/kq' + 1/kd$  suponiendo que  $kd$  varía con la temperatura como el cociente  $T/\eta$  usando los valores de tablas de  $\eta$ <sup>65</sup> y el valor de  $kd = 9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  a 25°C.

En las tablas XI-XIV se presentan los valores de  $kq$  y  $kq'$ . Las variaciones de  $kq$  o  $kq'$  para Indol con los distintos aminoácidos son marcadamente diferentes de las correspondientes en Ksv. Mientras que, éstas últimas sistemáticamente en todos los casos disminuía con la temperatura,  $kq$  o  $kq'$  decrece en algunos sistemas y en otros aumenta.



100  
 80  
 60  
 40  
 20  
 0

0  
 20  
 40  
 60  
 80  
 100

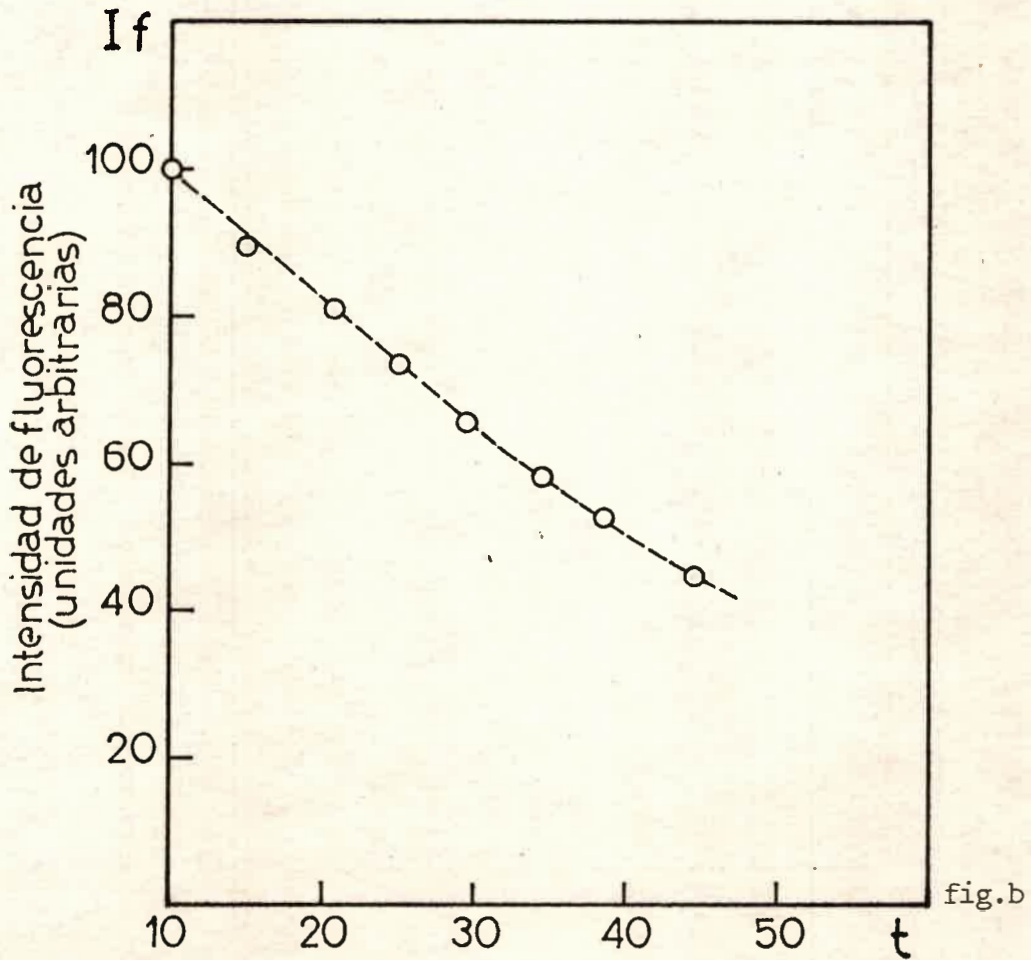
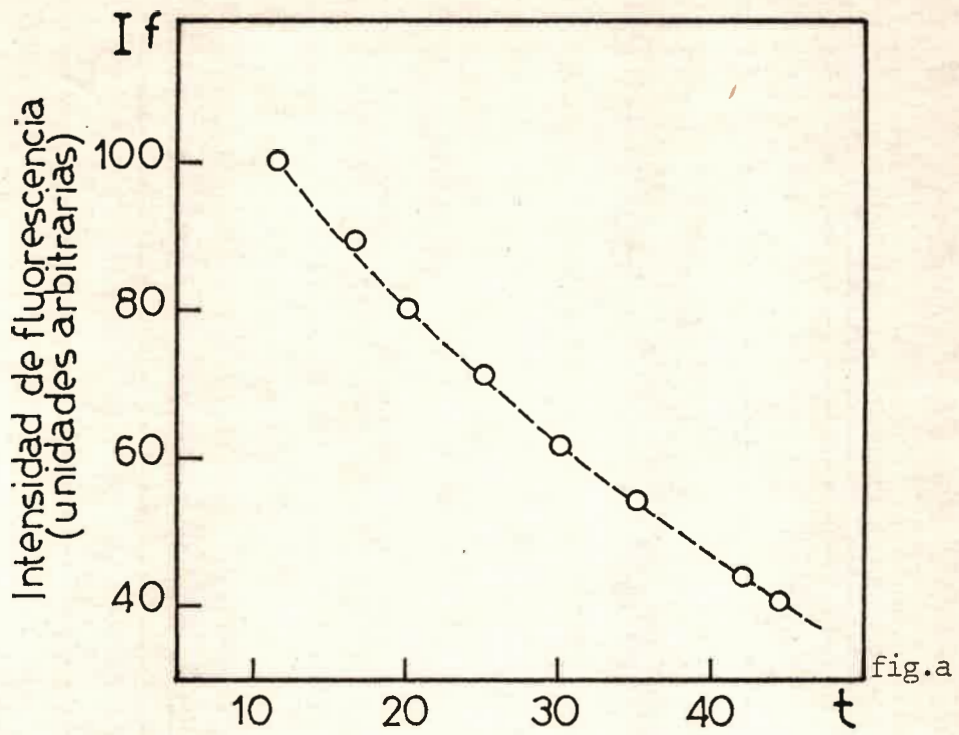


fig.21 Dependencia de la intensidad de fluorescencia con la temperatura de Triptófano (a) y de Triptamina (b).



Graphs showing the relationship between Time and Temperature for two different conditions.

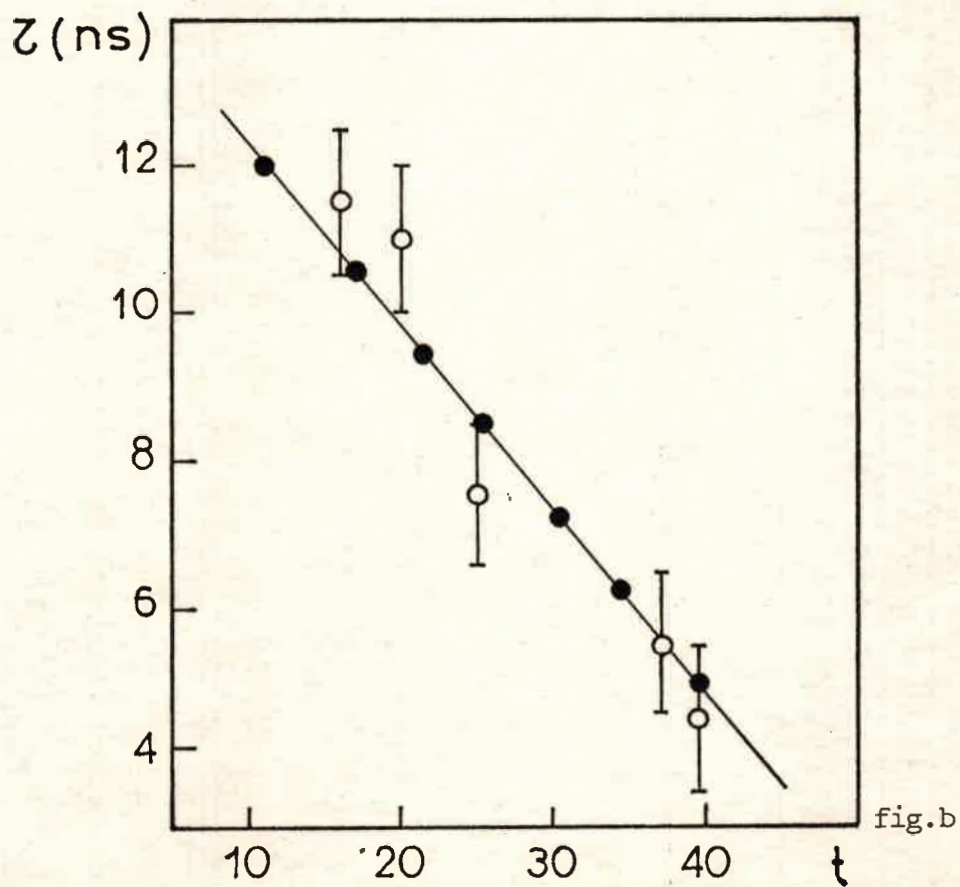
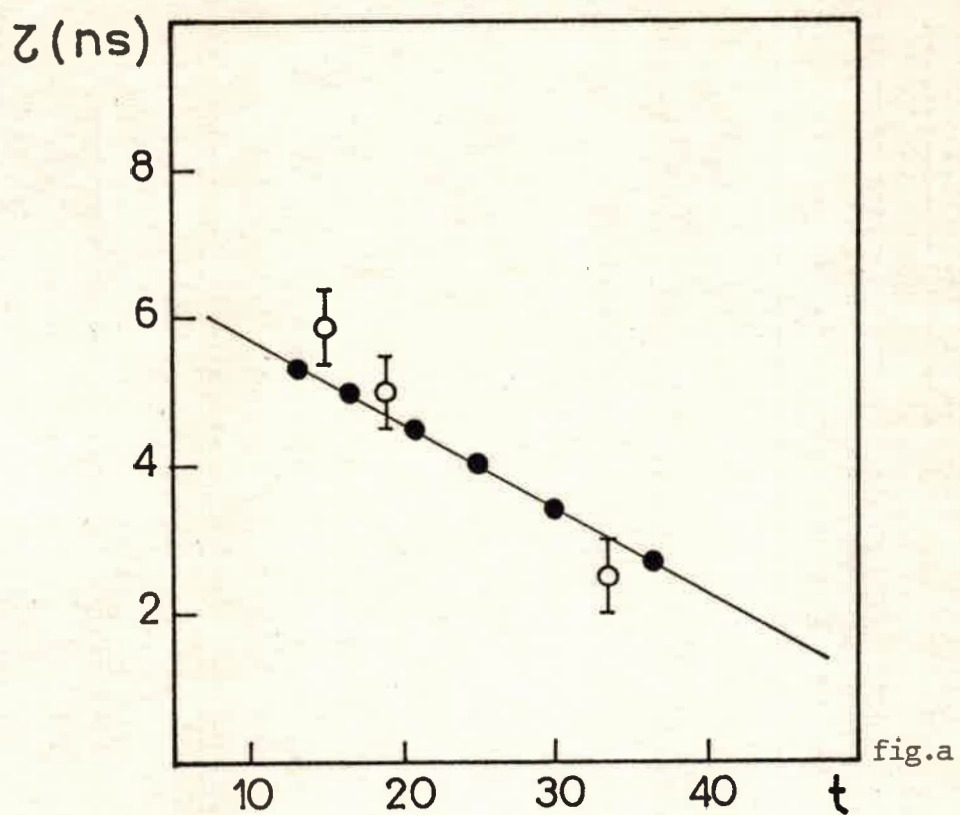


fig.22 Dependencia de  $Z$  con la temperatura por medidas estáticas (●) y dinámicas (○) de Indol (a) e Indol Acético (b)

Handwritten text at the top of the page, possibly a title or header, which is mostly illegible due to fading and bleed-through.



Handwritten text at the bottom of the page, likely a footer or a concluding note, which is mostly illegible due to fading and bleed-through.

TABLA XI. Constantes de velocidad (  $kq$  y  $kq'$  x  $10^{-8} \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  ) para el quenching de fluorescencia de Triptófano por varios AAa a distintas temperaturas.

GLICINA			ALANINA			VALINA			PROLINA			HIDROXIPROLINA		
t°C	kq	kq'	t°C	kq	kq'	t°C	kq	kq'	t°C	kq	kq'	t°C	kq	kq'
16,0	0,67	0,67	15,7	0,59	0,60	16,5	1,52	1,55	16,0	4,30	4,58	10,9	6,07	6,75
25,8	0,65	0,65	25,0	0,61	0,61	25,0	1,72	1,75	24,5	4,34	4,56	16,6	6,90	7,62
36,1	0,48	0,49	25,8	0,53	0,53	25,7	1,66	1,69	25,0	4,22	4,43	25,4	8,66	9,57
44,0	0,43	0,43	29,5	0,53	0,53	34,0	1,31	1,32	33,0	4,37	4,55	35,0	10,24	11,24
			33,3	0,51	0,51	44,0	1,49	1,50	44,0	4,62	4,76	44,2	11,25	12,22
			38,0	0,50	0,50									

El error en kq es del ±5%



TABLA XII. Constantes de velocidad ( $kq$  y  $kq'$   $\times 10^{-8} \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ ) para el quenching de fluorescencia de Triptamina por varios AAa a distintas temperaturas.

GLICINA			ALANINA			VALINA			PROLINA			HIDROXIPROLINA.		
t°C	kq	kq'	t°C	kq	kq'	t°C	kq	kq'	t°C	kq	kq'	t°C	kq	kq'
25,0	1,07	1,08	16,3	0,92	0,93	16,0	1,87	1,92	16,0	5,17	5,58	10,0	7,14	8,13
25,6	1,10	1,11	16,6	0,99	1,01	24,7	1,89	1,94	24,7	5,60	5,97	15,5	8,05	9,11
32,8	1,06	1,07	23,7	1,04	1,05	32,5	1,98	2,00	32,5	5,96	6,30	24,5	9,78	10,97
36,1	1,06	1,07	24,4	1,00	1,00	39,0	2,08	2,11	43,0	6,24	6,53	24,8	9,75	10,94
44,3	1,06	1,07	34,3	1,19	1,20							35,0	11,80	13,15
			45,1	1,07	1,08							44,7	12,30	13,46

El error en kq es del  $\pm 5\%$ .

1870  
1871  
1872  
1873  
1874  
1875  
1876  
1877  
1878  
1879  
1880  
1881  
1882  
1883  
1884  
1885  
1886  
1887  
1888  
1889  
1890  
1891  
1892  
1893  
1894  
1895  
1896  
1897  
1898  
1899  
1900

TABLA XIII. Constantes de velocidad ( $kq$  y  $kq'$  x  $10^{-8} \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ ) para el quenching de fluorescencia de Indol por varios AAa a distintas temperaturas.

GLICINA			ALANINA			VALINA			PROLINA			HIDROXIPROLINA		
t°C	kq	kq'	t°C	kq	kq'	t°C	kq	kq'	t°C	kq	kq'	t°C	kq	kq'
16,0	2,06	2,13	16,0	1,98	2,04	15,5	3,23	3,38	16,0	11,23	13,37	15,0	13,05	16,14
24,9	2,17	2,22	24,9	1,92	1,96	25,0	3,50	3,64	25,0	12,35	14,30	25,0	16,00	19,49
25,0	2,15	2,21	25,0	1,89	1,93	31,1	3,44	3,55	34,8	13,73	15,60	35,1	17,40	20,48
33,0	2,12	2,16	30,5	1,88	1,91	36,8	3,52	3,63	44,2	13,72	15,20			
34,8	2,13	2,17	34,0	1,88	1,92	44,0	3,50	3,59						
38,2	1,86	1,88												
44,5	1,80	1,82												

Error en kq  $\pm$  5%

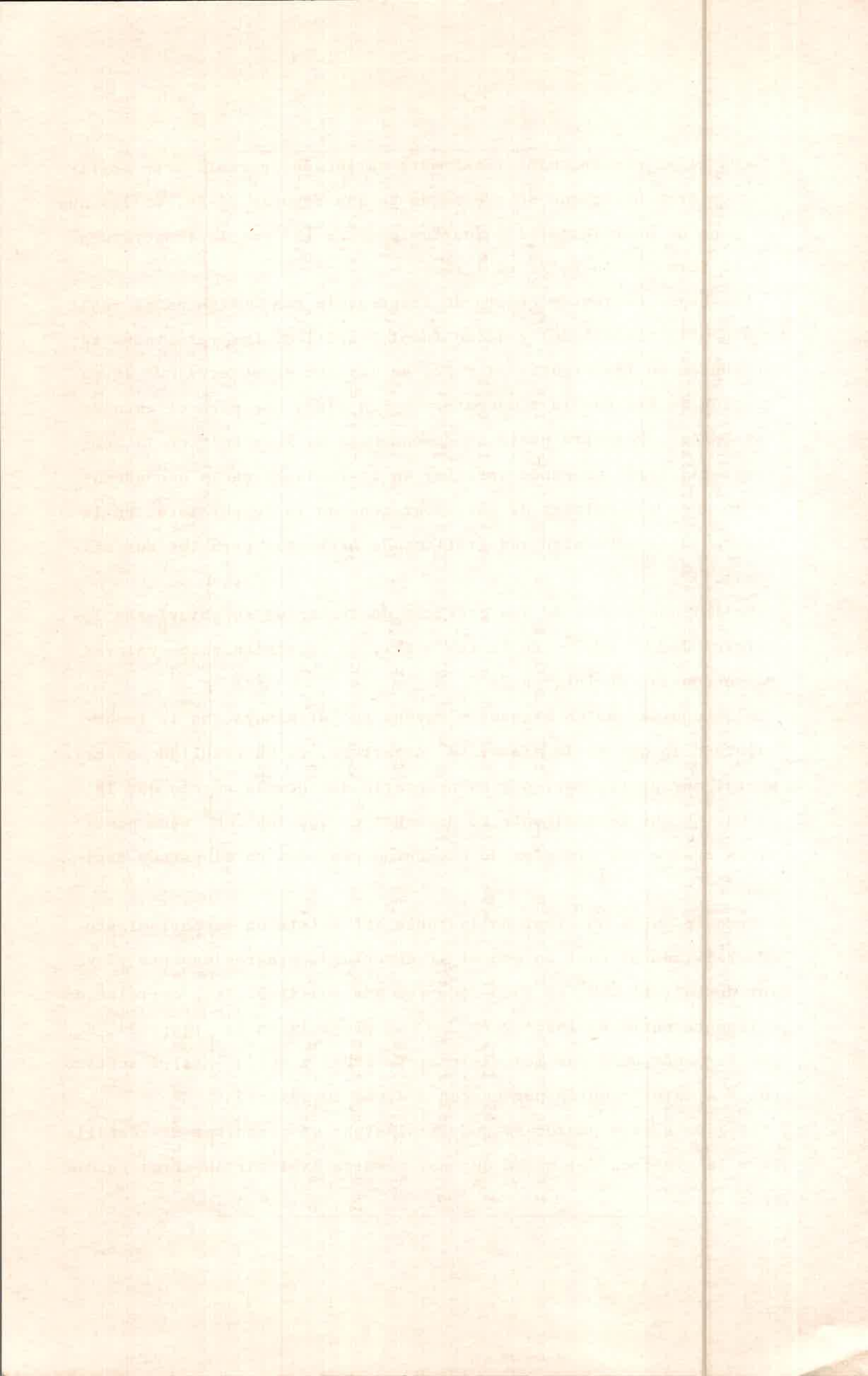
The first thing I noticed when I stepped  
 out of the plane was the fresh air. It  
 felt like a warm blanket after a long  
 winter. The sun was shining brightly,  
 and the birds were chirping happily.  
 I took a deep breath and smiled. This  
 was my chance to start a new life.  
 I had heard so much about this place,  
 and now I was here. I felt like I had  
 found a new home. I was going to  
 make the most of this opportunity.  
 I was going to live my life to the  
 fullest. I was going to be happy.

I was going to live my life to the  
 fullest. I was going to be happy. I  
 was going to make the most of this  
 opportunity. I was going to live my  
 life to the fullest. I was going to be  
 happy. I was going to make the most  
 of this opportunity. I was going to  
 live my life to the fullest. I was  
 going to be happy. I was going to  
 make the most of this opportunity.

TABLA XIV. Constantes de velocidad ( $kq$  y  $kq'$  x  $10^{-8} \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ ) para el quenching de fluorescencia de ácido Indol-3-acético por varios AAa a distintas temperaturas.

GLICINA			ALANINA			VALINA			PROLINA			HIDROXIPROLINA		
t°C	kq	kq'	t°C	kq	kq'	t°C	kq	kq'	t°C	kq	kq'	t°C	kq	kq'
18,0	2,63	2,73	17,1	1,91	1,96	16,2	3,26	3,42	15,4	9,12	10,51	15,0	9,30	10,76
25,7	2,57	2,65	24,5	2,08	2,13	23,7	3,29	3,42	25,0	9,88	11,10	24,5	11,74	13,52
32,5	2,80	2,88	26,0	2,10	2,14	25,0	3,53	3,67	35,1	11,54	12,83	26,0	12,57	14,55
34,4	2,96	3,04	32,4	2,24	2,28	33,0	3,92	4,07	43,0	11,75	12,85	34,0	13,10	14,82
45,0	2,95	3,00	40,3	2,57	2,62	44,2	4,66	4,82				45,0	16,97	19,25
						45,0	3,62	3,70						

Error en kq  $\pm$  5%



Con el objeto de cuantificar esta variación se realizaron gráficos de Arrhenius, que se presentan en las figuras 23-30, en las que se pone de manifiesto el comportamiento de  $kq'$  con la temperatura en la forma de  $\ln kq'/T$  vs  $1/T$ .

Las experiencias de efecto de temperatura con  $\beta$  Alanina se realizaron utilizando Indol y ácido Indol-3-acético. Los resultados se presentan en las figuras 31 y 32, en las que se observa que la variación de  $K_{sv}$  con la temperatura es la misma que para el caso de los  $\alpha$  AAa.. Por otra parte la dependencia de  $kq$  y  $kq'$  con la temperatura, según se puede apreciar en la tabla XV en la que además se incluyo los valores de  $K_{sv}$ , decrecen con la temperatura. En la figura 33 se presentan los gráficos de Arrhenius para los dos sistemas.

De las pendientes de los gráficos de Arrhenius se obtuvieron los valores de  $\Delta H^\ddagger$  y  $\Delta S^\ddagger$ . En la tabla XVI, se presentan estos valores junto con los de  $\ln kq'$  a 25°C.

El hecho de que en algunos sistemas  $kq'$  disminuya con la temperatura o lo que es lo mismo,  $\Delta H^\ddagger$  negativos, es un resultado experimental muy particular, que es necesario destacarlo puesto que la situación que generalmente se presenta es que los  $\Delta H^\ddagger$  sean positivos cuando los procesos de quenching proceden en el estado excitado.

Como se puede observar en la tabla XVI existe un comportamiento generalizado el cual es que al ir aumentando progresivamente el valor de  $kq'$ , el  $\Delta H^\ddagger$  se hace cada vez más positivo. Esta correlación existente entre el  $\ln kq'$  y el  $\Delta H^\ddagger$  se presenta en la figura 34. Según se puede observar los sistemas de Indol y ácido Indol-3-acético con  $\beta$  Alanina también pertenecen a dicha correlación.

Llegado a este punto, se podría plantear un mecanismo más detallado y la cinética del mismo que nos permita explicar nuestros resultados.

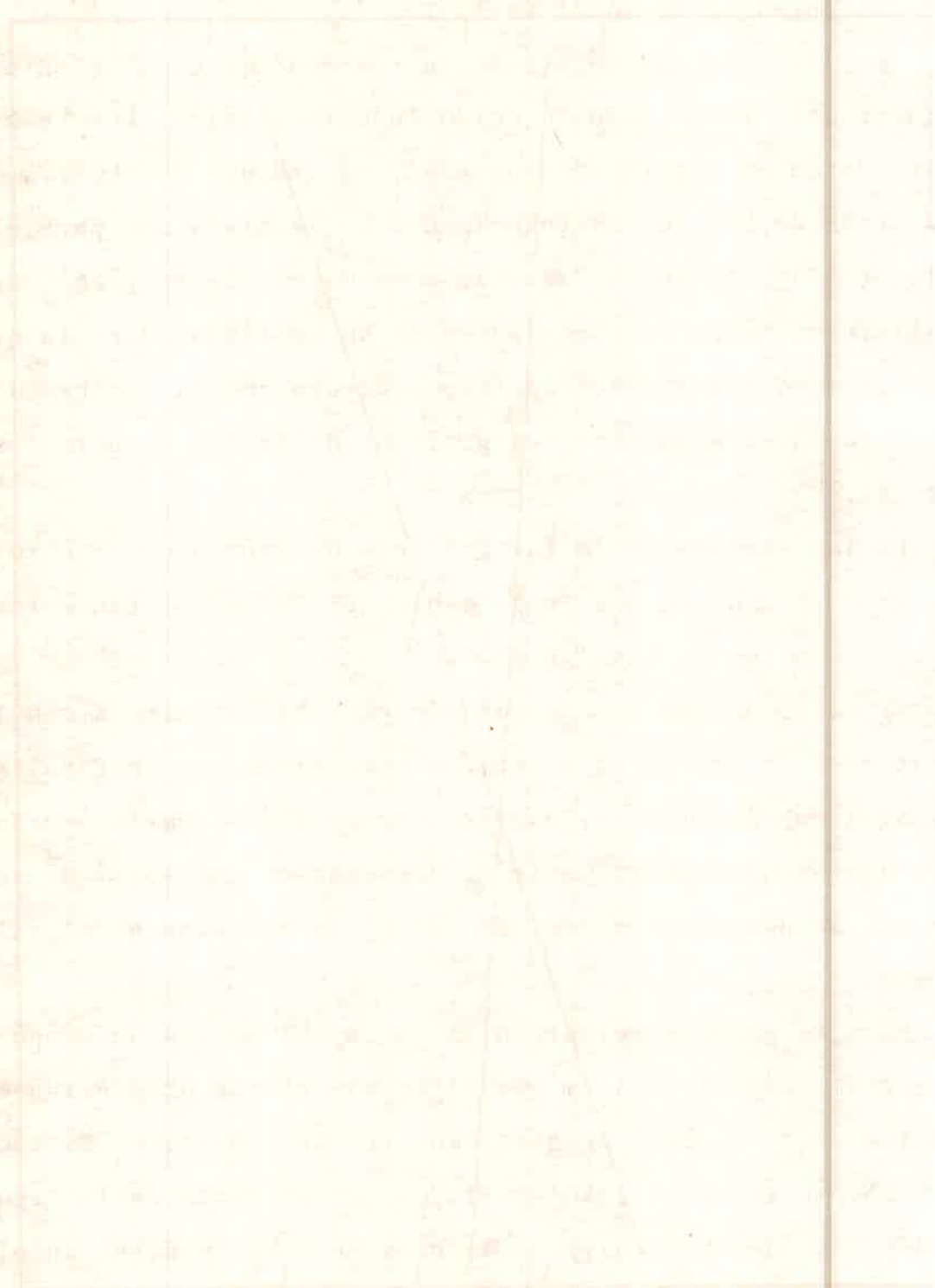


Fig. 10

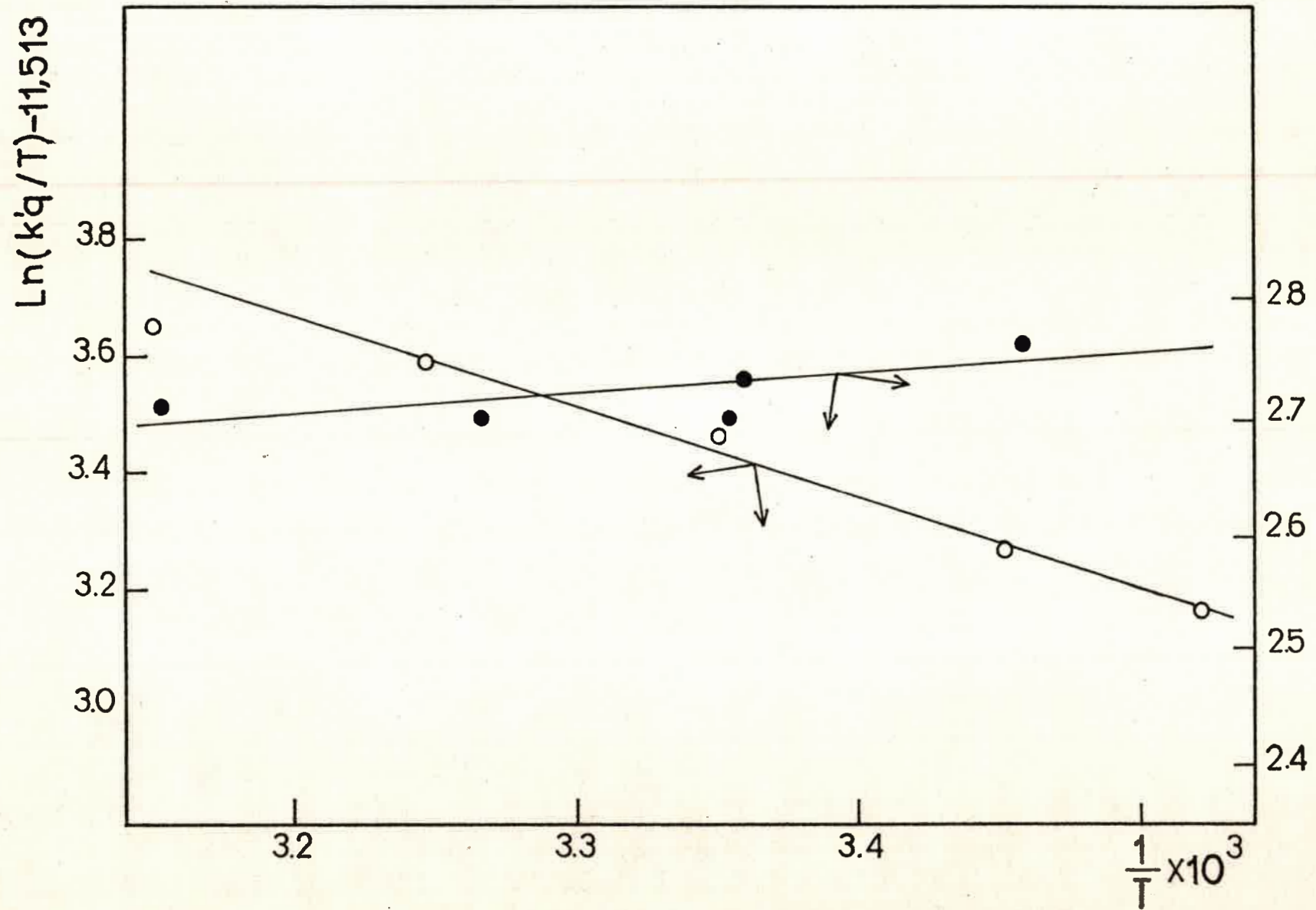


fig.23 Gráficos de  $\ln(kq'/T)$  vs  $1/T$  para el quenching de fluorescencia de Triptófano por:

○ Hidroxiprolina; ● Prolina.

PROBLEM 8

1. The following data were obtained from a test of a beam of rectangular cross-section. The beam was supported as shown in the figure.

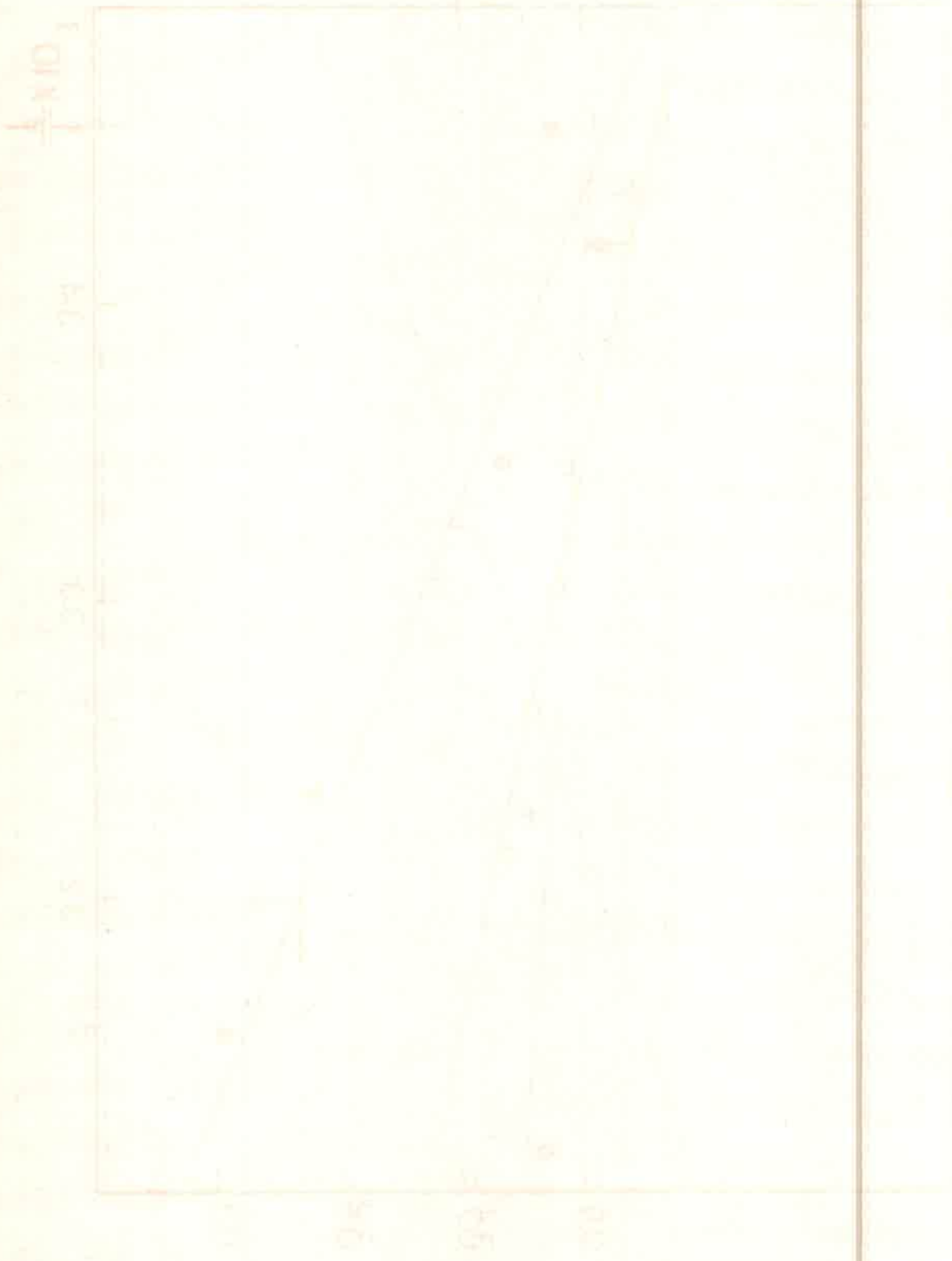


FIGURE 8-1

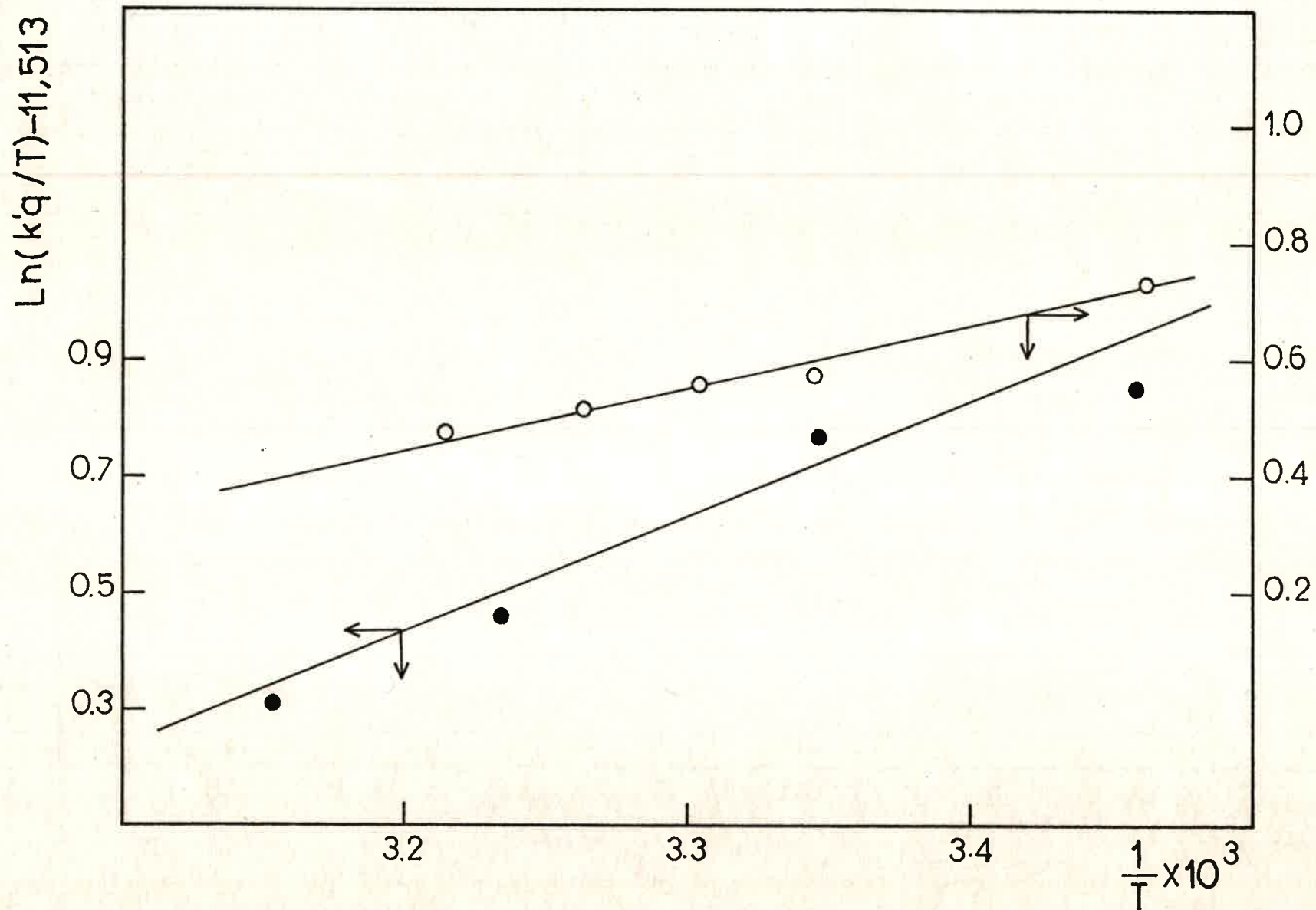


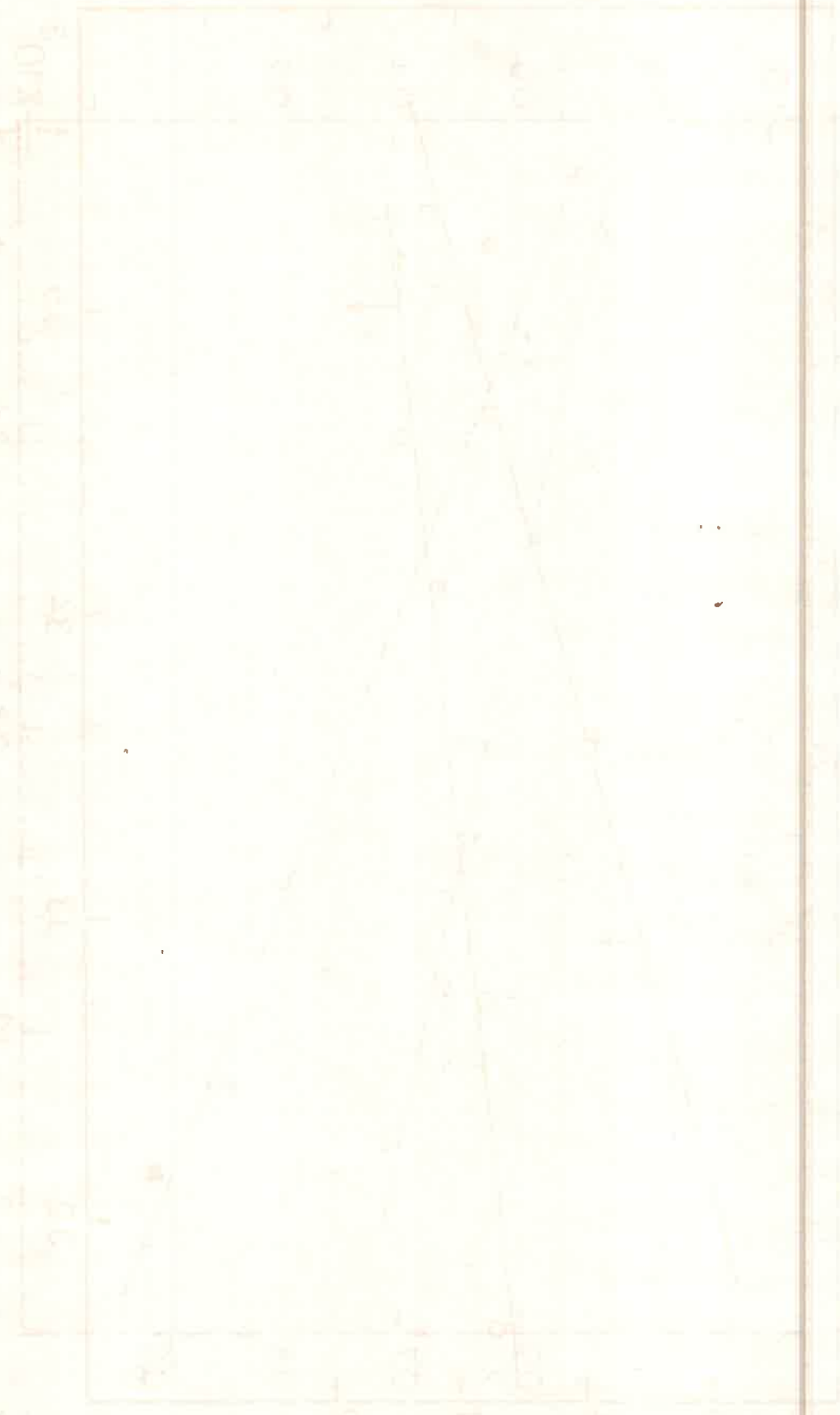
fig.24 Gráficos de  $\text{Ln}(kq'/T)$  vs  $1/T$  para el quenching de fluorescencia de Triptófano por:  
● Glicina; ○ Alanina.

① 11/10/24

② 11/10/24

③ 11/10/24

④ 11/10/24



11/10/24

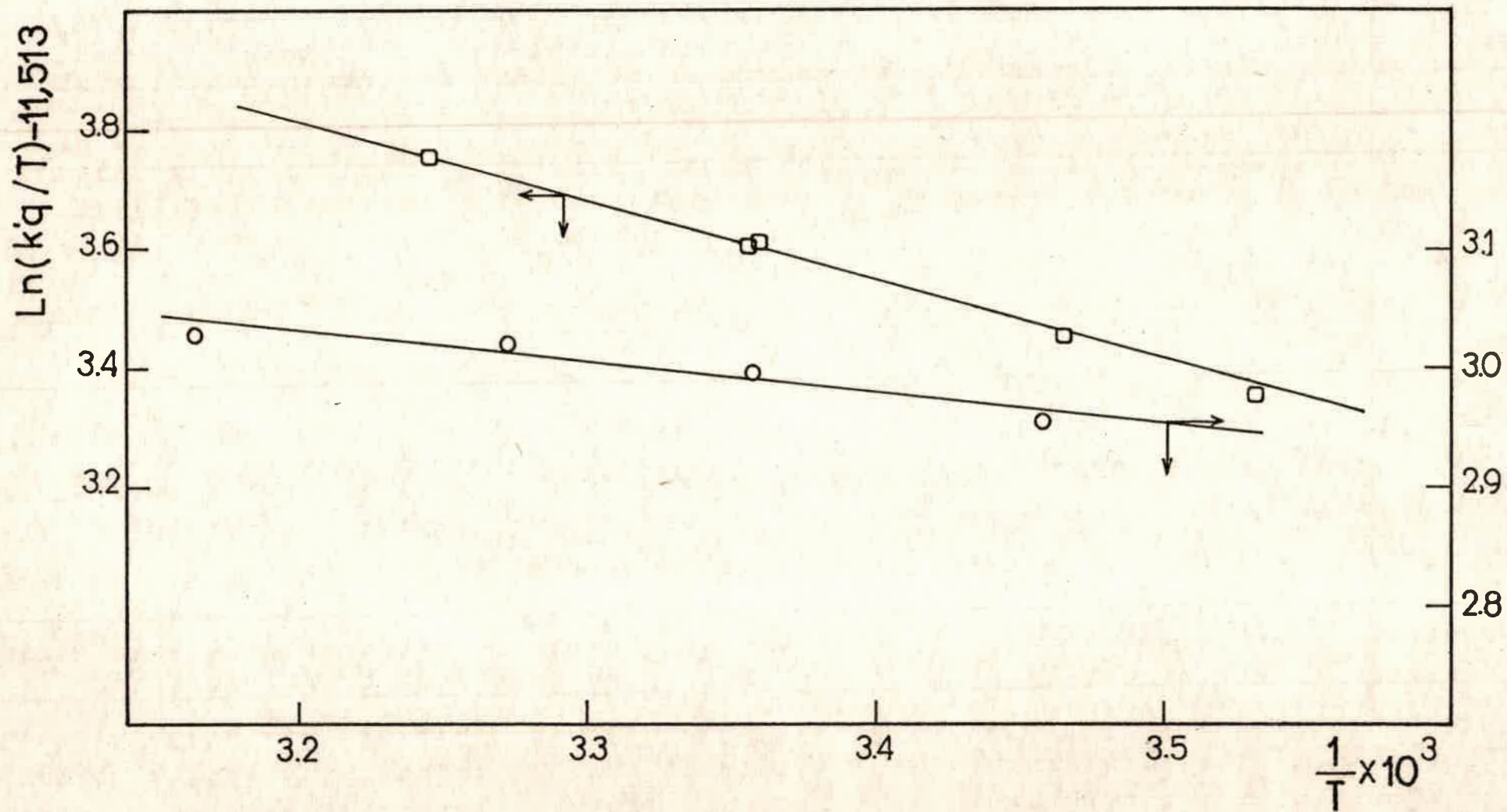
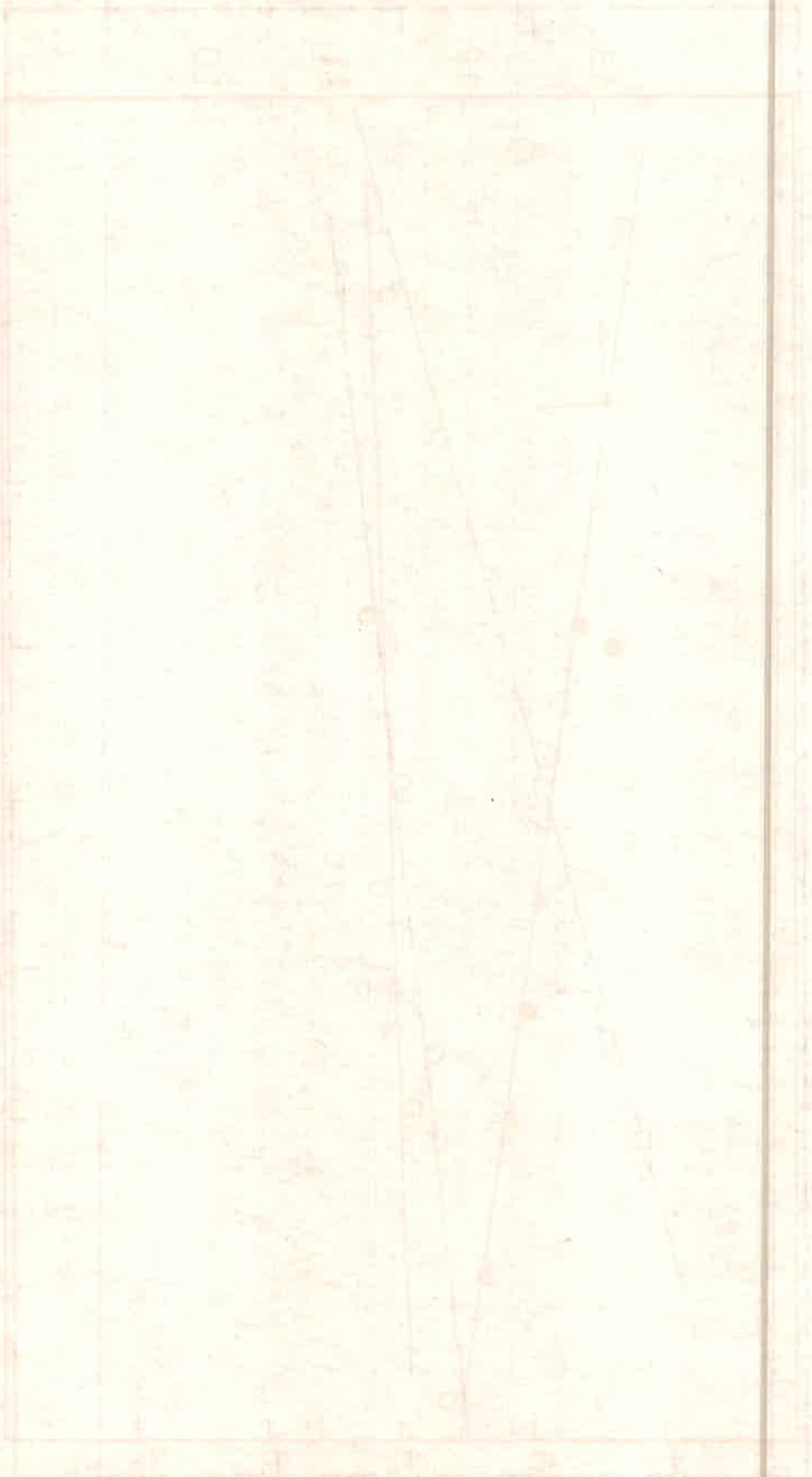


fig.25 Gráficos de  $\ln(kq'/T)$  vs  $1/T$  para el quenching de fluorescencia de Triptamina por:  
□ Hidroxiprolina; ○ Prolina.

Handwritten text, possibly a title or reference number, located at the top of the page.

Handwritten text, possibly a date or location, located below the title.

Handwritten text, possibly a scale or measurement, located in the upper right quadrant.



Handwritten text, possibly a signature or date, located at the bottom of the page.

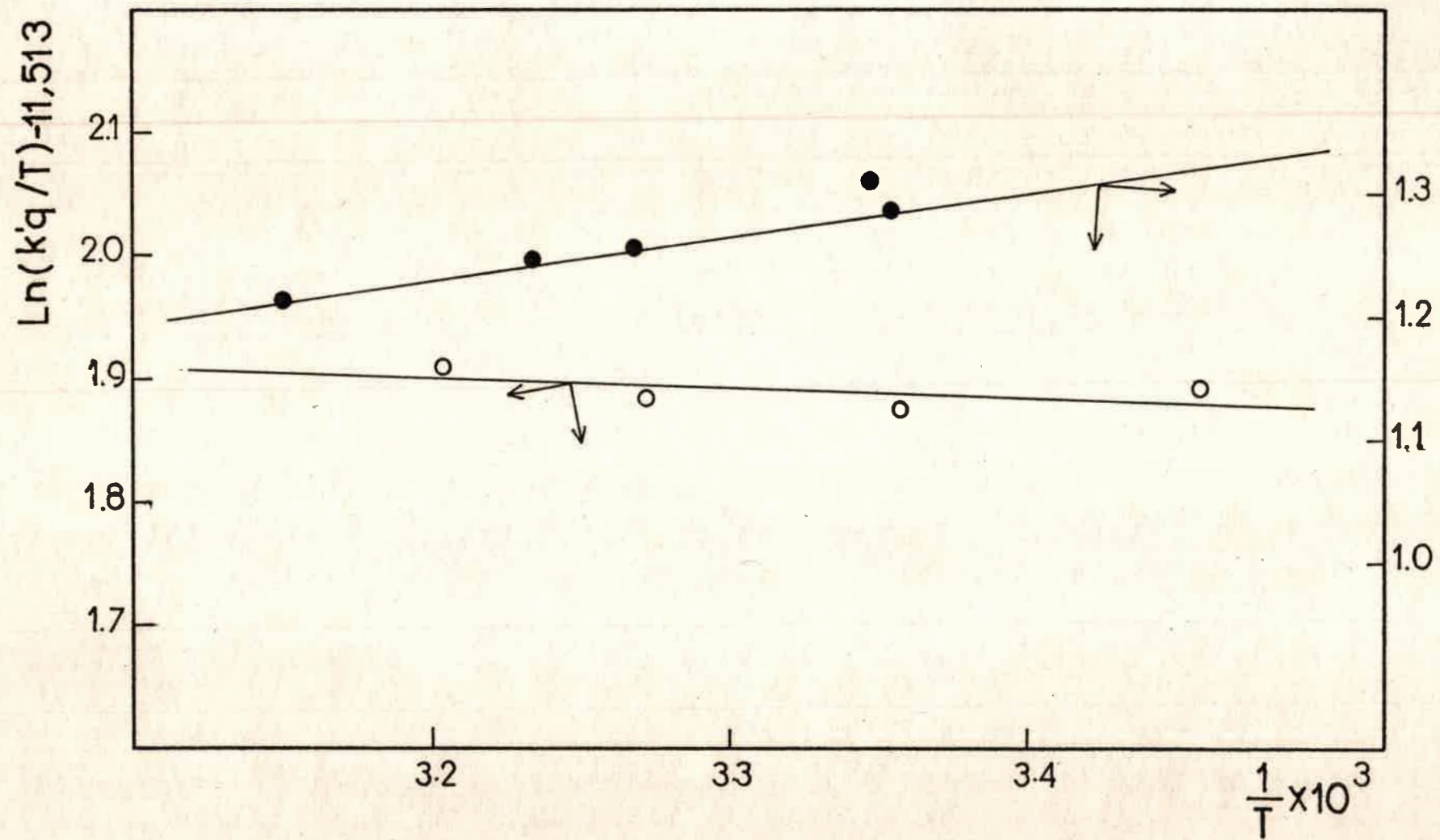


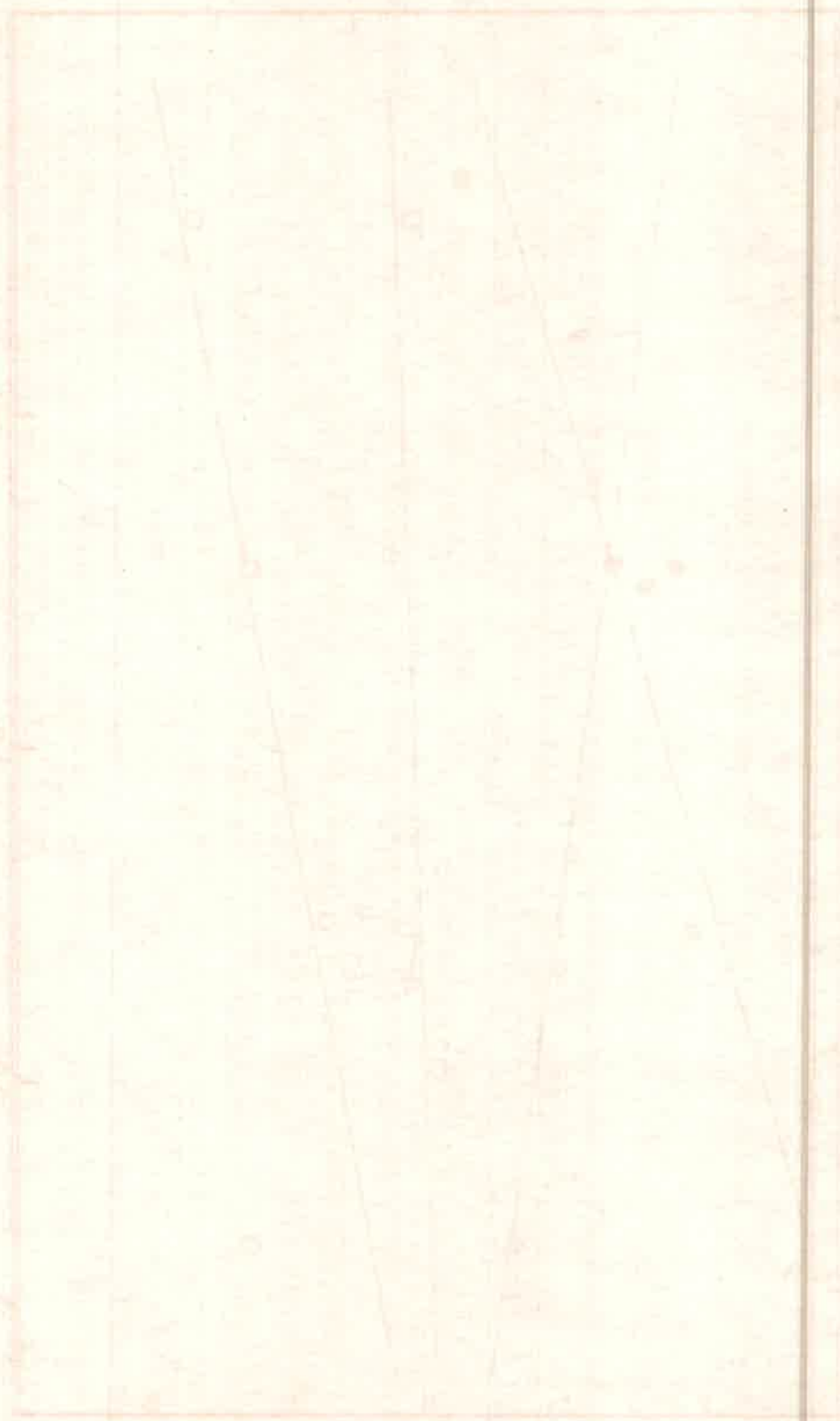
fig.26 Gráficos de  $\ln(k'q/T)$  vs  $1/T$  para el quenching de fluorescencia de Triptamina por:

● Glicina; ○ Valina.

Handwritten text at the top of the page, possibly a title or header.

Handwritten text in the upper middle section of the page.

Handwritten text in the middle section of the page.



Handwritten text at the bottom of the page, possibly a caption or conclusion.

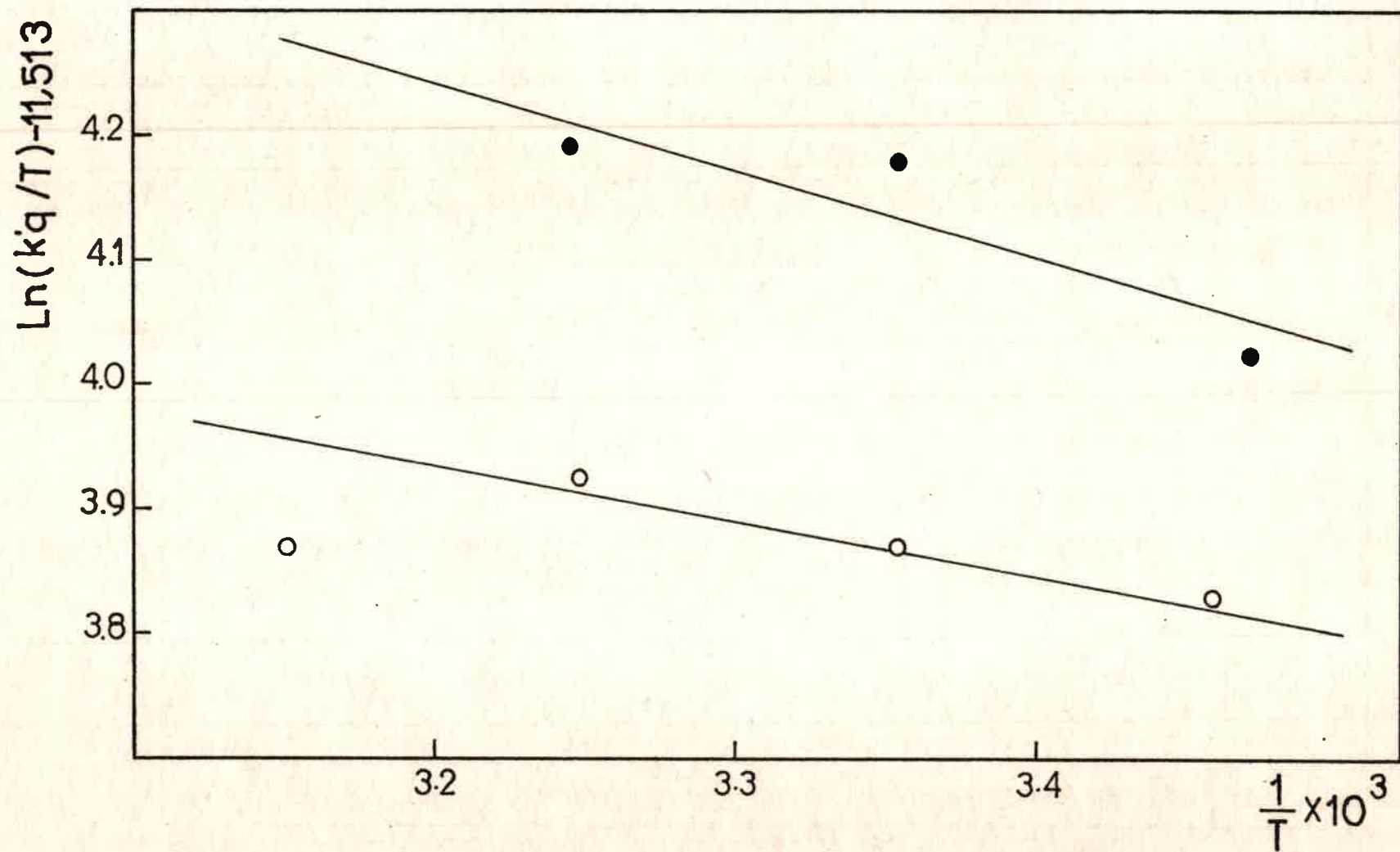


fig.27 Gráficos de  $\ln(k'q/T)$  vs  $1/T$  para el quenching de fluorescencia de Indol por:

● Hidroxiprolina; ○ Prolina.



$C_1 \times \frac{1}{T}$   
 $AC$

$AC$   
 point of contact

$AC$   
 point of contact

100  
 100

100  
 100

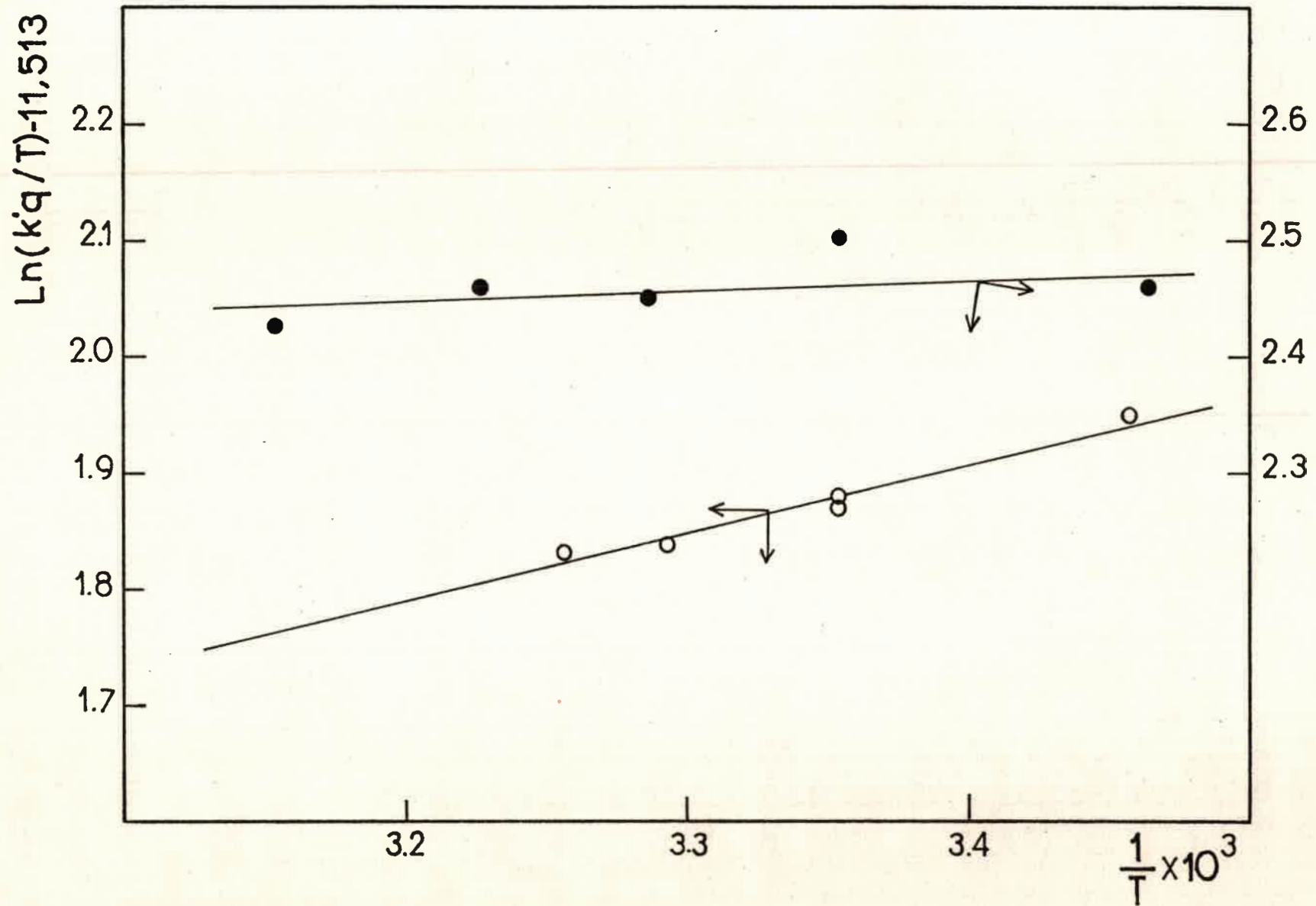


fig.28 Gráficos de  $\ln(kq'/T)$  vs  $1/T$  para el quenching de fluorescencia de Indol por:

○ Alanina; ● Valina



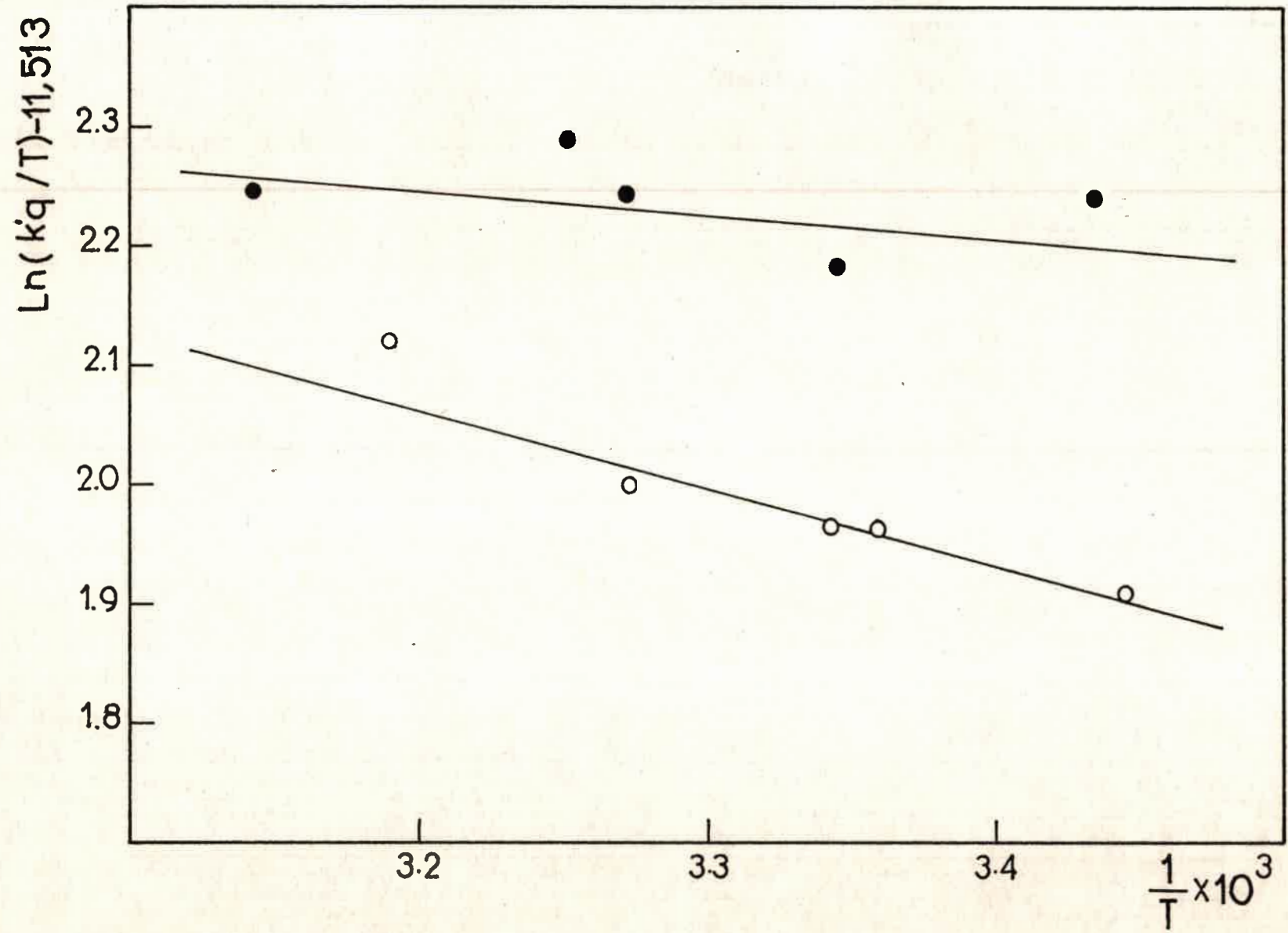


fig. 29 Gráficos de  $\ln(kq'/T)$  vs  $1/T$  para el quenching de fluorescencia de ácido Indol-3-acético por:  
○ Alanina; ● Glicina

The following table shows the results of the experiment. The first column gives the number of trials, the second column the number of correct responses, and the third column the percentage of correct responses.

The results show that the percentage of correct responses increases with the number of trials. This is due to the fact that the subject becomes more familiar with the task as the number of trials increases.

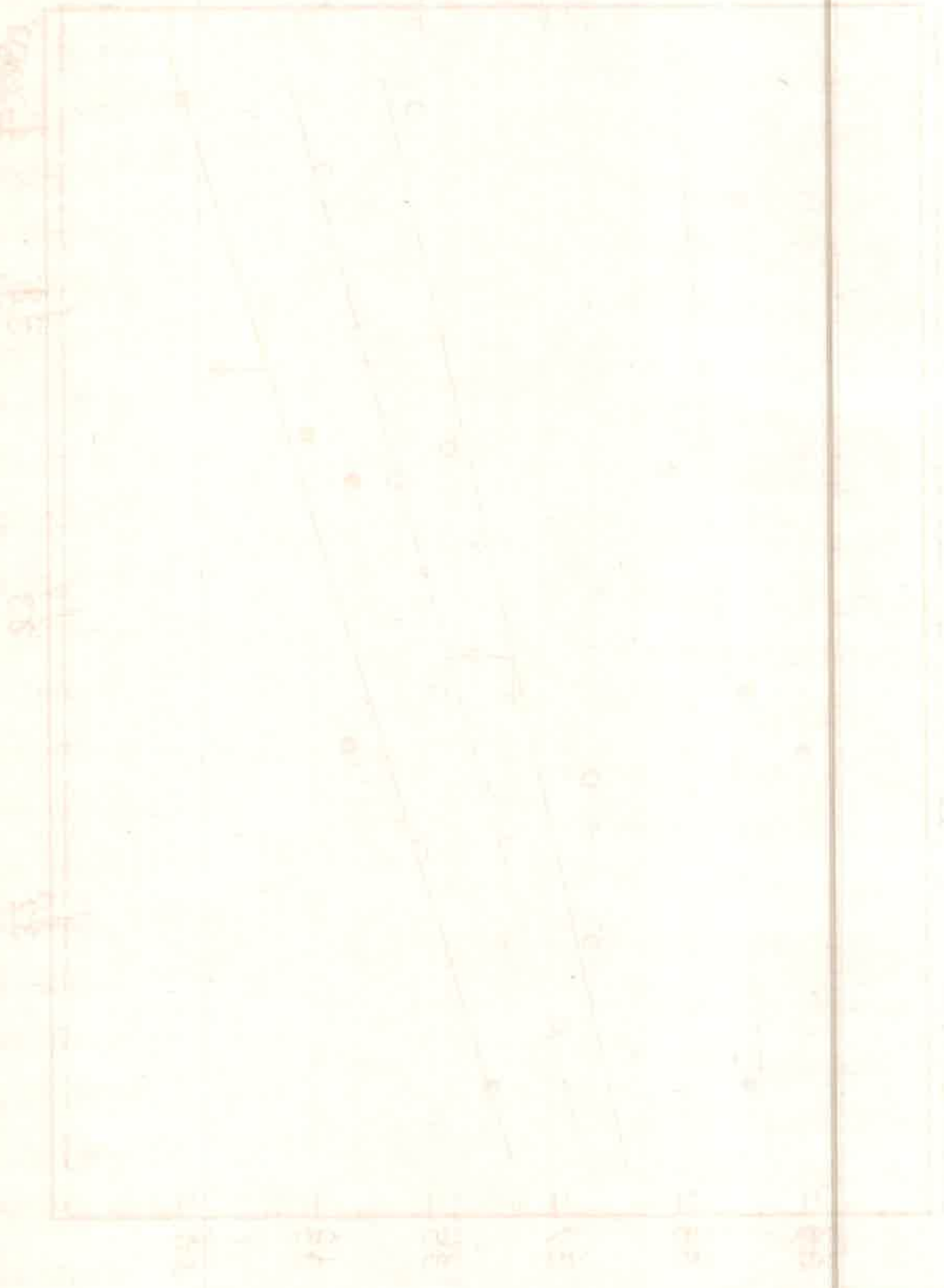


Figure 1

PERCENTAGE OF CORRECT RESPONSES

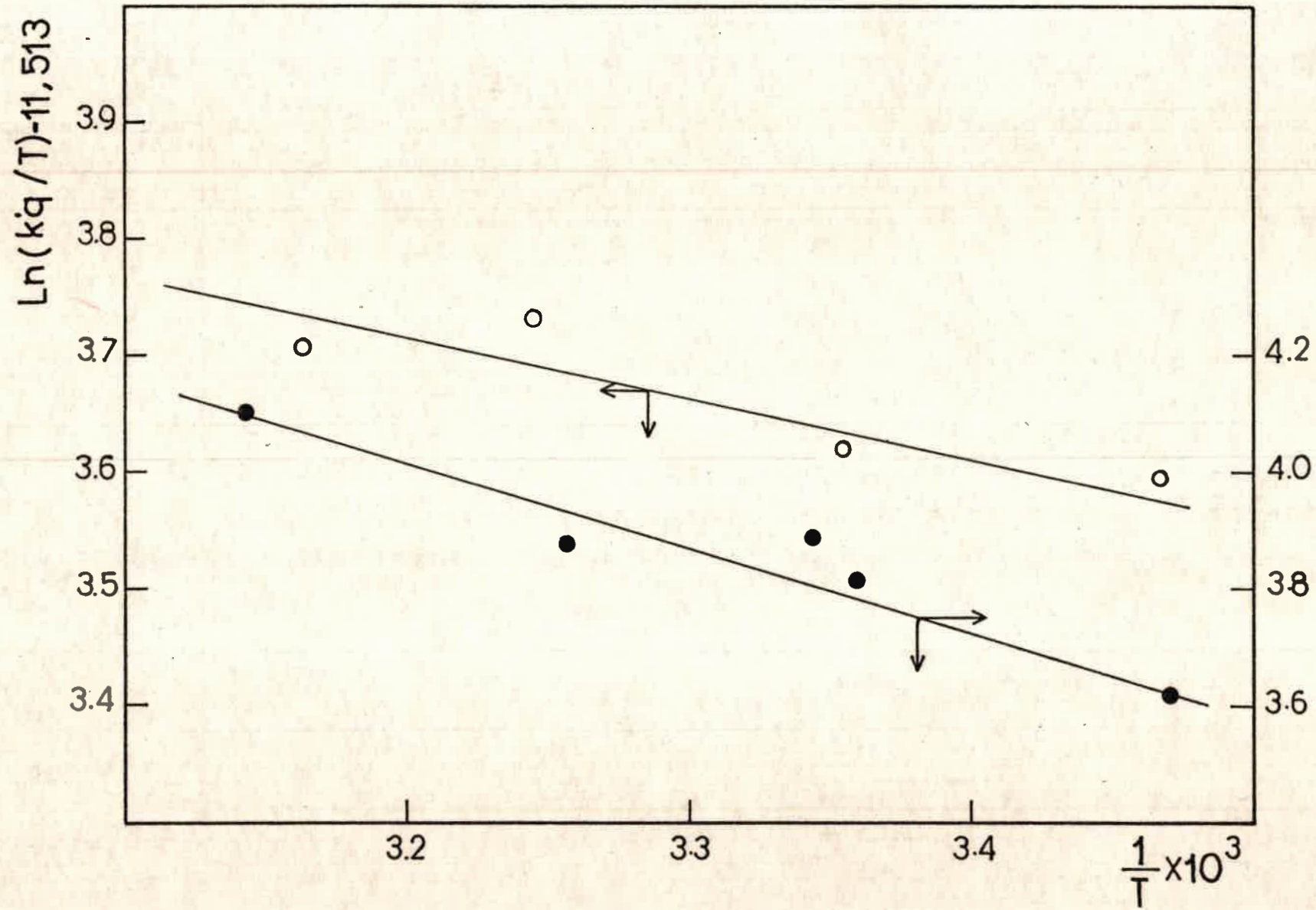


fig.30 Gráficos de  $\ln(kq'/T)$  vs  $1/T$  para el quenching de fluorescencia de ácido Indol-3-acético por:  
● Hidroxiprolina; ○ Prolina

11-1



CO<sub>2</sub>

3000

4000

5000

10 20 30 40 50

10 20 30 40 50

11-1

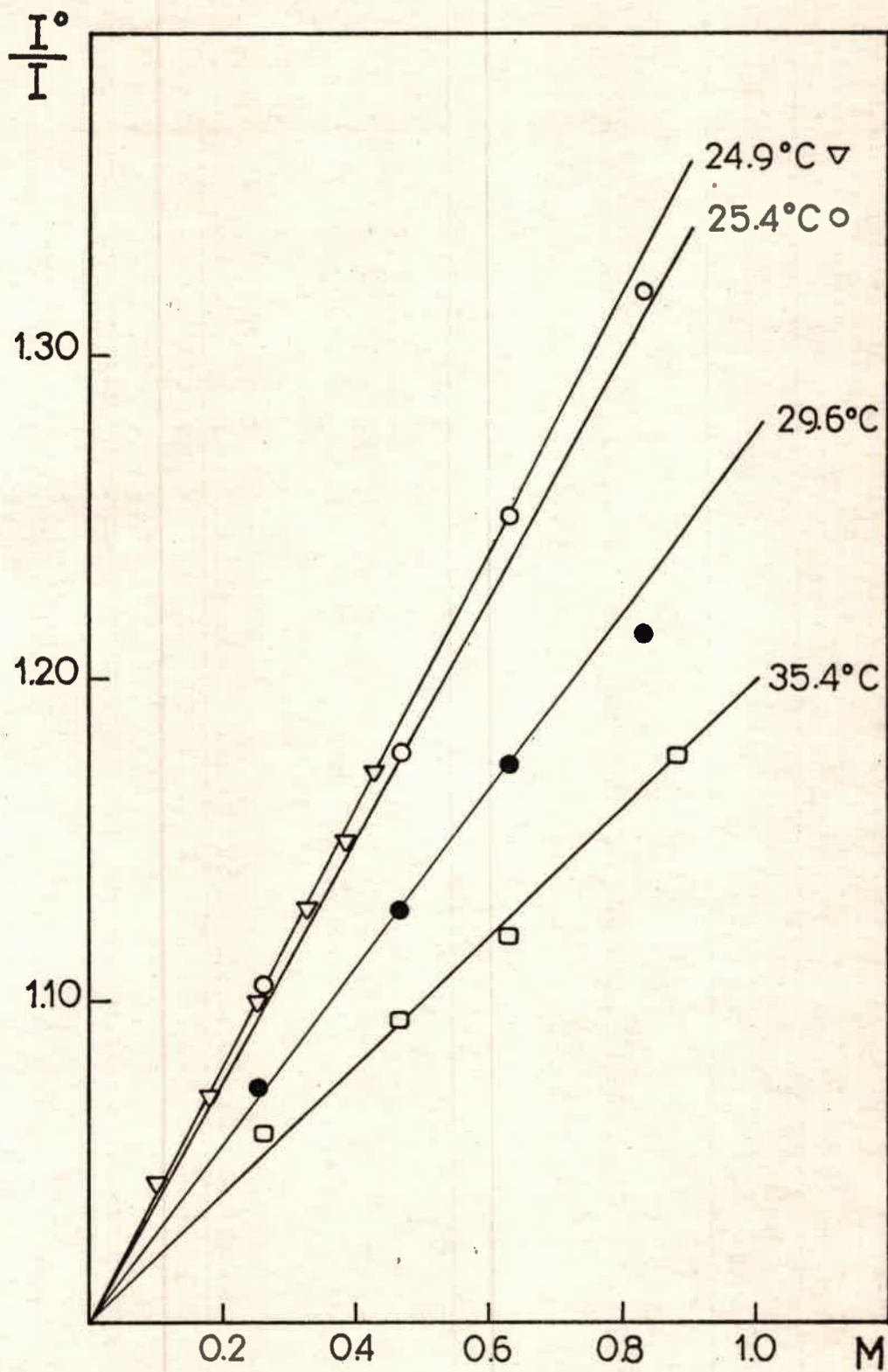


fig.31 Efecto de la concentración de  $\beta$  Alanina sobre la fluorescencia de Indol.

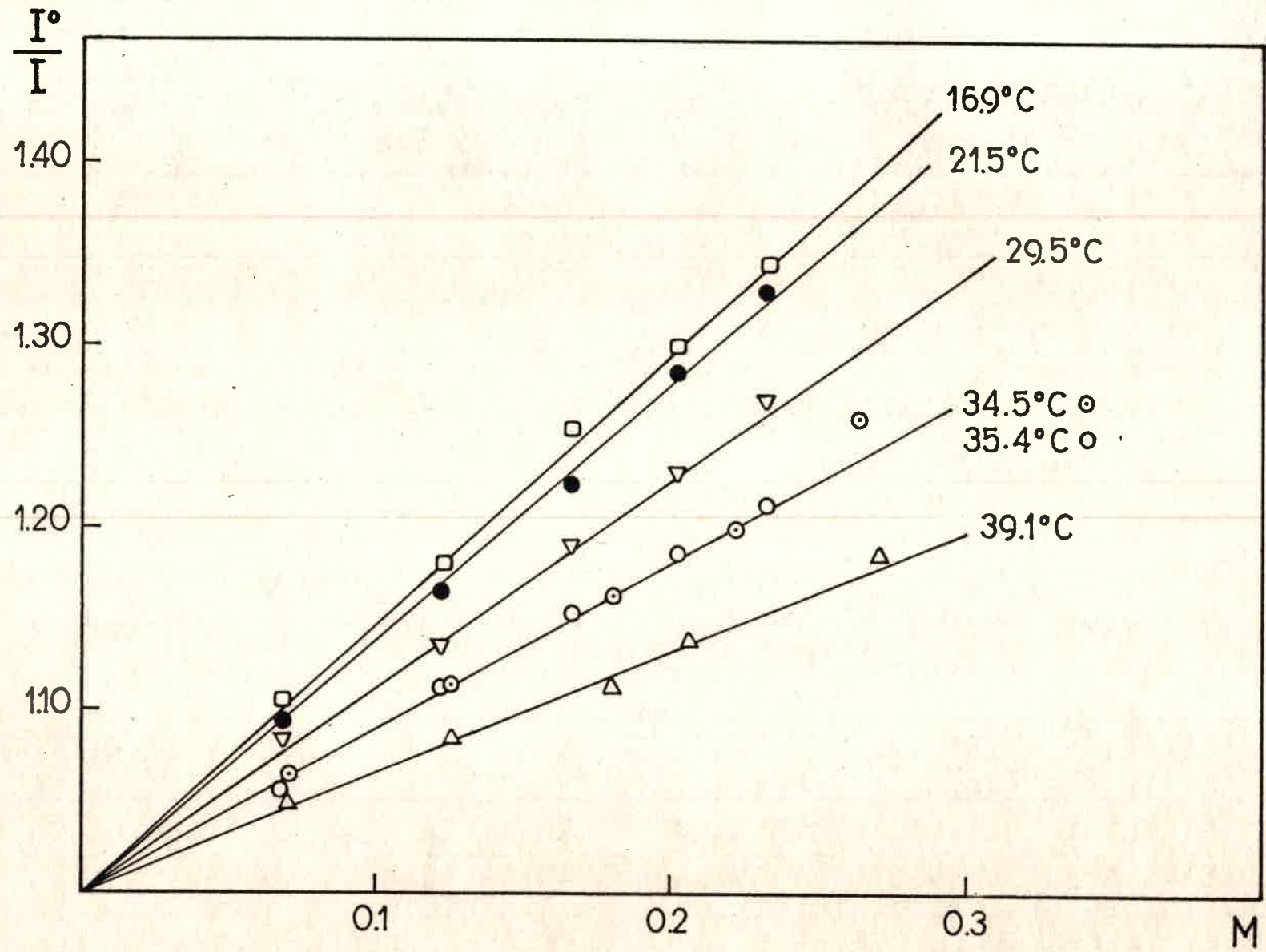


fig.32 Efecto de la concentración de  $\beta$  Alanina sobre la fluorescencia de ácido Indol-3-acético.

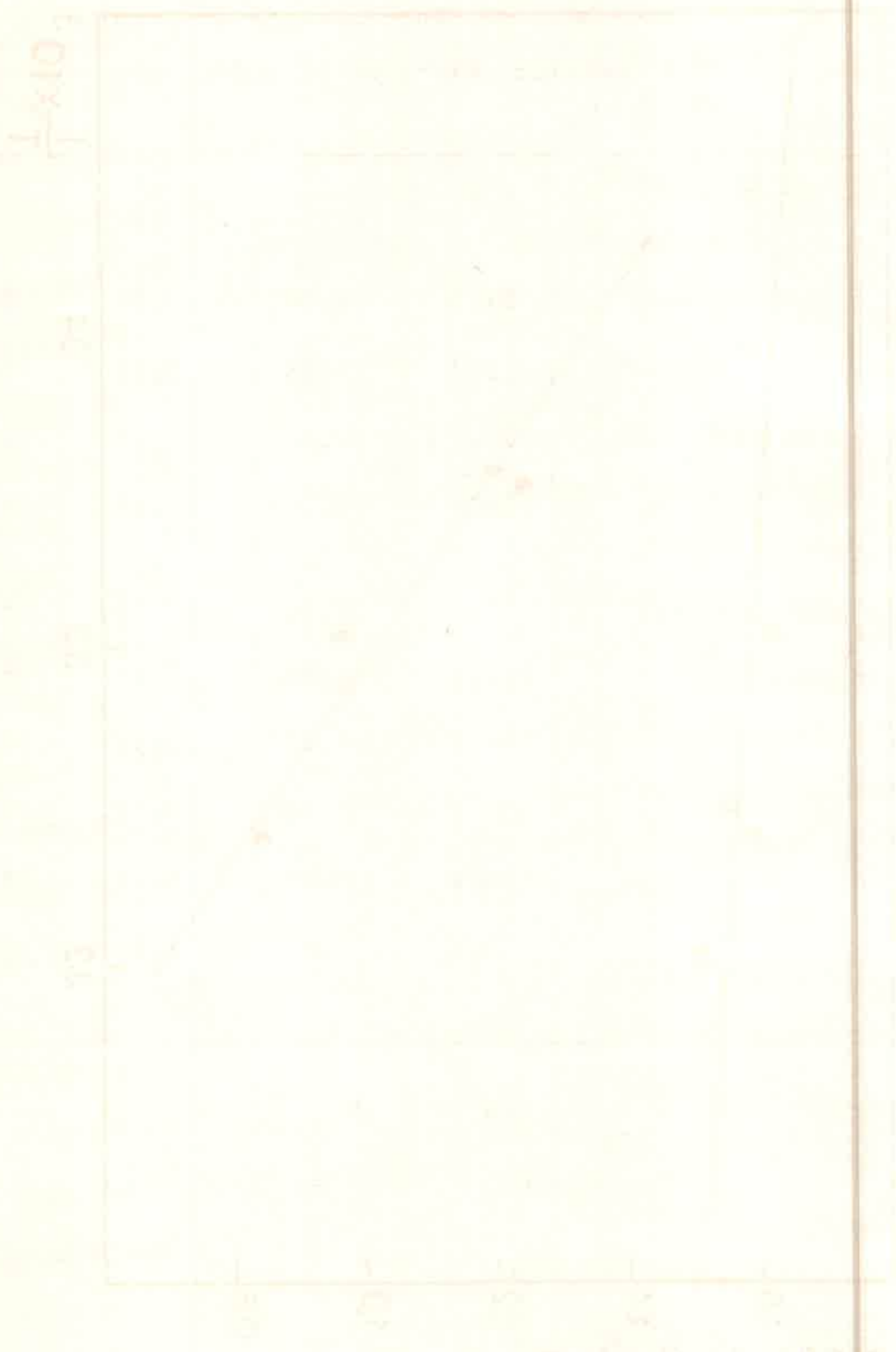
TABLA XV. Constantes de Stern-Volmer ( $K_{sv} M^{-1}$ ) y constantes de velocidad ( $k_q$  y  $k_q' \times 10^{-8} M^{-1} \text{seg}^{-1}$ ) para el quenching de fluorescencia de Indol y ácido Indol-3- acético por  $\beta$  alanina a distintas temperaturas.

INDOL	t°C	Ksv	kq	kq'
	24,9	0,39	0,98	0,99
	25,4	0,38	0,95	1,04
	29,6	0,27	0,79	0,79
	35,4	0,20	0,70	0,70
INDOL ACETICO	16,9	1,49	1,40	1,43
	21,5	1,39	1,47	1,44
	29,5	1,13	1,50	1,54
	34,5	0,90	1,49	1,50
	35,4	0,90	1,49	1,50
	39,1	0,69	1,32	1,33

Error en Ksv  $\pm$  0,04 y en kq  $\pm$  5%

5710 1001-100000 (1) 1000 100000

100000 min 100000 for 100000 100000 100000 100000 100000 100000 100000 100000 100000 100000



100000 100000 100000 100000 100000 100000 100000 100000 100000 100000

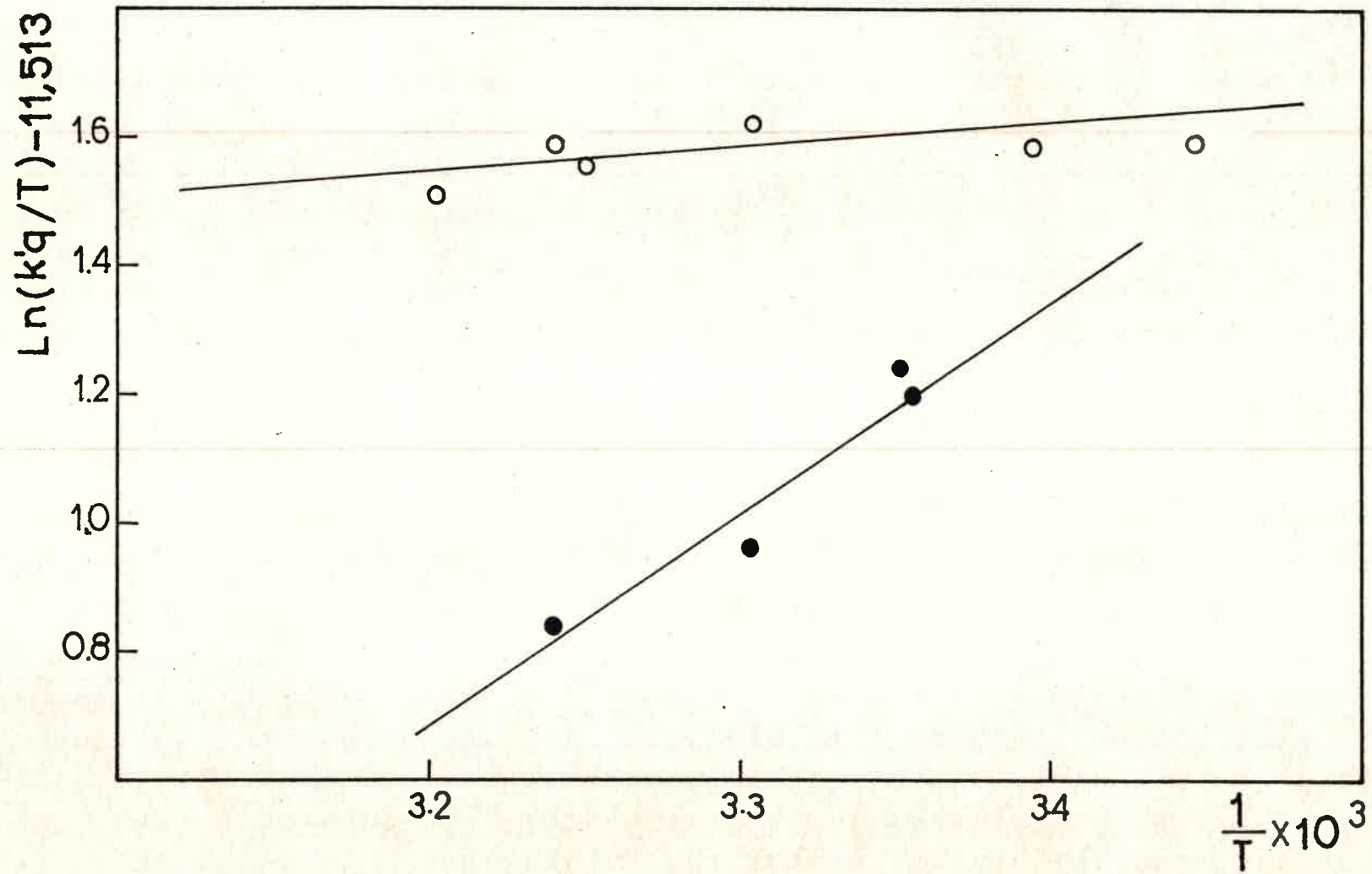


fig.33 Gráficos de  $\ln(k'q/T)$  vs  $1/T$  para el quenching de fluorescencia de Indol (●) y de ácido Indol-3-acético (○) por  $\beta$  Alanina.

The following table shows the results of the experiment. The first column is the time taken for the reaction to occur, the second column is the volume of gas produced, and the third column is the rate of reaction.

Time (s)	Volume of Gas (cm <sup>3</sup> )	Rate of Reaction (cm <sup>3</sup> /s)
0	0	0
10	10	1.0
20	20	1.0
30	30	1.0
40	40	1.0
50	50	1.0
60	60	1.0
70	70	1.0
80	80	1.0
90	90	1.0
100	100	1.0

The graph shows that the rate of reaction is constant throughout the experiment. This is because the volume of gas produced increases linearly with time.

TABLA XVI. Parametros de activación para la constante de velocidad bimolecular corregida(kq')  
 ( $\Delta H^\ddagger$  en cal mol<sup>-1</sup> ,  $\Delta S^\ddagger$  en u.e. a 25°C) y los valores de lnkq' a 25°C.

	TRIPTOFANO			TRIPTAMINA			INDOL			INDOL ACETICO		
	Lnkq'	$\Delta H^\ddagger$	$\Delta S^\ddagger$	Lnkq'	$\Delta H^\ddagger$	$\Delta S^\ddagger$	Lnkq'	$\Delta H^\ddagger$	$\Delta S^\ddagger$	Lnkq'	$\Delta H^\ddagger$	$\Delta S^\ddagger$
Glicina	17,94	-3800	-35,6	18,49	-729	-24,3	19,20	-1751	-26,3	19,42	790	-17,3
Alanina	17,82	-2254	-30,7	18,45	-396	-23,2	19,09	-1154	-24,5	19,17	1306	-16,1
Valina	18,91	-1048	-24,5	19,09	141	-20,1	19,67	-165	-20,0	19,69	1119	-15,7
Prolina	19,94	-356	-20,0	20,19	495	-16,8	21,07	934	-13,5	20,84	1039	-13,6
Hidroxiprolina	20,64	3059	-7,3	20,80	2605	-8,5	21,34	1367	-11,6	21,00	2887	-7,1
$\beta$ Alanina							18,40	-1657	-27,6	18,80	-131	-21,6

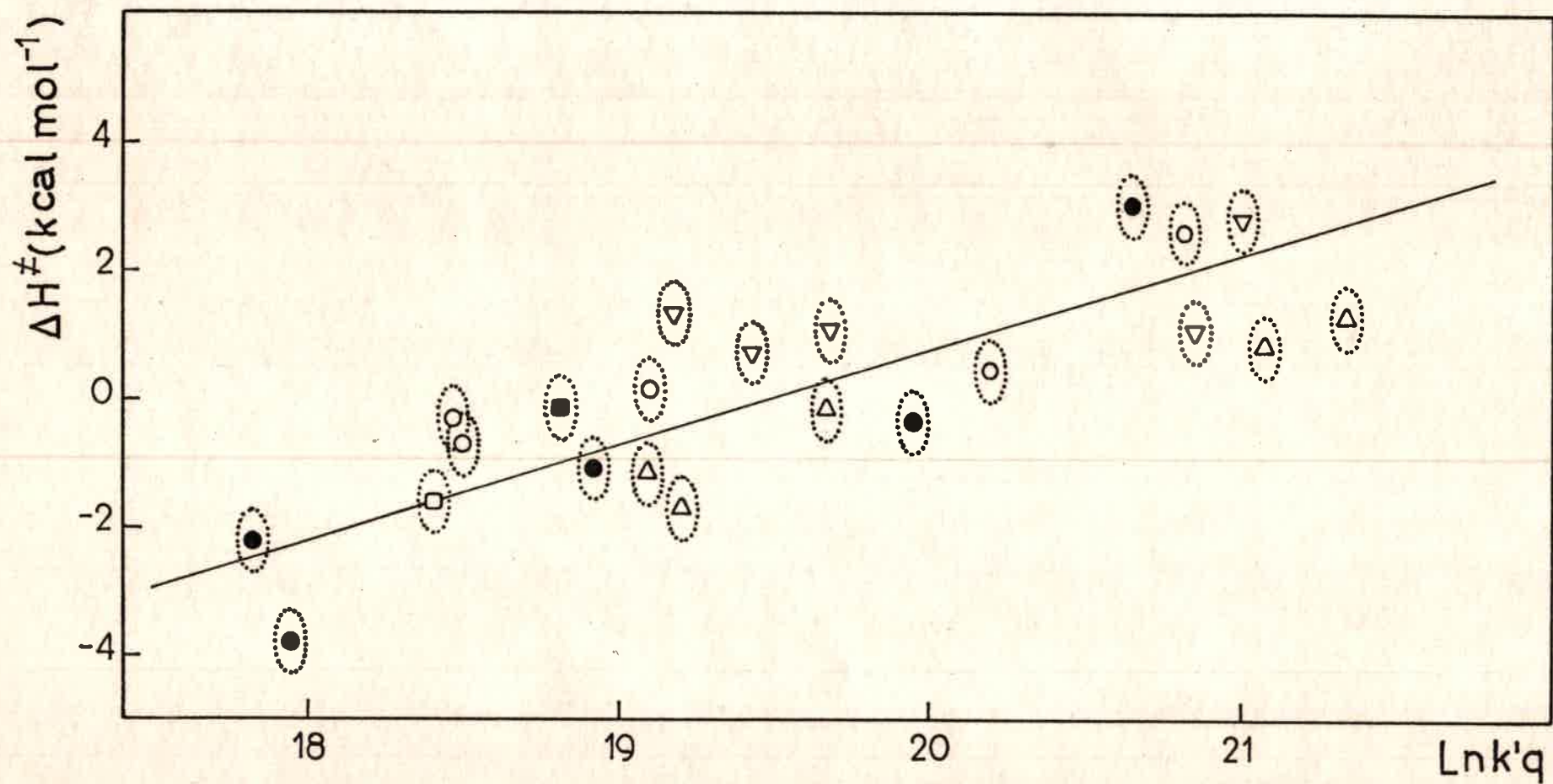
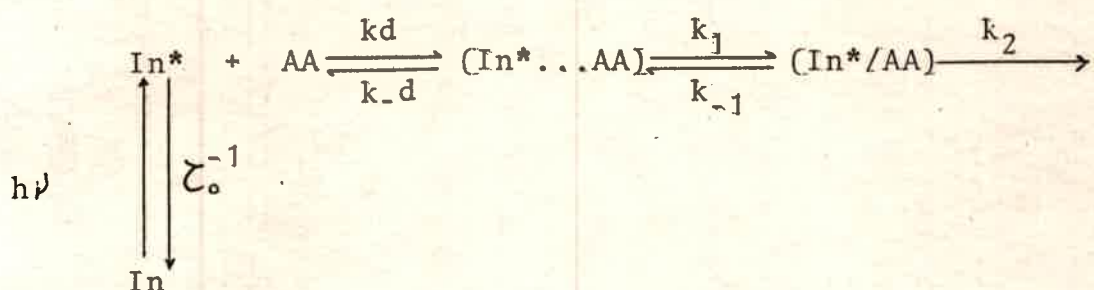


fig.34 Correlación entre  $\Delta H^\ddagger$  y  $\text{Ln}k'q$ . ● Triptófano; ○ Triptamina; △ Indol; ▽ Indol Acético.  
 □ Sistema Indol- $\beta$ Alanina; ■ Sistema Indol Acético- $\beta$ Alanina  
 Las elipses indican el error en  $\Delta H^\ddagger \pm 1$  Kcal/mol y en  $\Delta S^\ddagger \pm 0,1$  u.e.

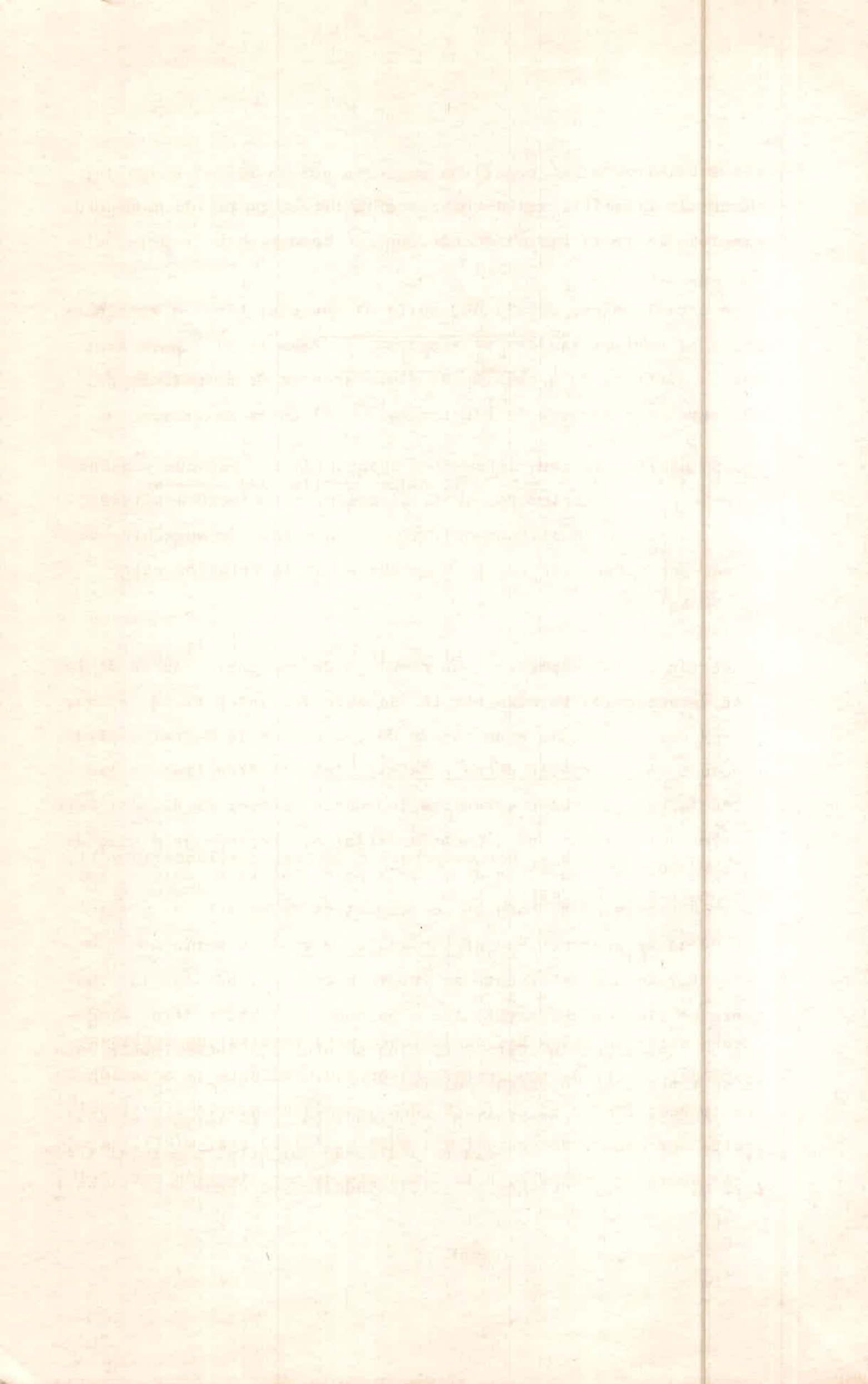
Los valores de  $\Delta H^\ddagger$  negativos sugieren que en alguna etapa del mecanismo debería estar involucrada la formación de algún tipo de complejo entre el derivado indólico excitado y el aminoácido alifático.

Un mecanismo más detallado, sería el que escribimos a continuación, el cual es similar al propuesto por Rehm et al.<sup>68</sup> para explicar la cinética de quenching de fluorescencia de aromáticos polinucleares por donores de electrones en solventes polares:



donde  $[\text{In}^* \dots \text{AA}]$  representa un complejo de encuentro dentro de la caja de solvente, formado por la difusión del  $\text{In}^*$  y el AA, el que posteriormente relaja a un estado de transferencia de carga para concluir en la especie denominada excíplejo  $(\text{In}^*/\text{AA})$  cuando las moléculas del solvente están reagrupadas alrededor de él. Así este intermediario tiene una geometría definida, ocupando un mínimo de energía en una superficie de energía potencial en el estado excitado. Por otra parte como en los espectros de emisión en presencia de AA no aparecen nuevas bandas, el excíplejo sería no fluorescente. Esto posiblemente se explique considerando que la constante de fluorescencia ( $k_f$ ) tiene poco peso frente a otros procesos de desactivación. Esta situación se presenta generalmente cuando se trabaja en solventes polares.<sup>69</sup>

De acuerdo a la correlación encontrada entre el  $\ln k_q'$  y el  $\text{pK}_a$  del AA, el excíplejo estaría estabilizado por total o parcial transferencia de carga, siendo el anillo indólico el donador y el carboxi



lato del AAa el aceptor.

Haciendo un análisis cinético, se obtiene la expresión para la constante de quenching observada ( $kq_{obs}$ ) la cual es:

$$kq_{obs} = \frac{kd}{1 + \frac{k-d}{k_1} + \frac{k-d}{k_2} \frac{k-1}{k_1}} \quad 18$$

Según manifestamos en diferentes oportunidades, hay que separar de la  $kq_{obs}$  la contribución de la difusión, para luego analizar lo que sucede en un sistema mediante la constante de quenching controlada por activación ( $kq'$ ). Recordemos que la relación entre  $kq_{obs}$  y  $kq'$  es:

$$1/kq_{obs} = 1/kd + 1/kq' \quad 14$$

Así, reordenando la ecuación 18, se obtiene:

$$\frac{1}{kq_{obs}} = \frac{1}{kd} + \frac{1 + k_{-1}/k_2}{K_D k_1} \quad 19$$

Siendo  $K_D = kd / k_{-d}$ . Por comparación de las ecuaciones 19 y 14, la expresión de  $kq'$  es:

$$kq' = (kd / k_{-d}) k_1 \frac{k_2}{k_2 + k_{-1}} \quad 20$$

Ahora estarían dadas las condiciones para realizar un análisis acerca del efecto de temperatura observado, mediante la ecuación 20.

En la ecuación 20 el cociente  $kd/k_{-d}$  según un modelo difusional<sup>64</sup> resulta ser aproximadamente igual a  $\left[8R^3 N_A / 1000\right] \exp(-w/RT)$ , siendo  $N_A$  el número de Avogadro,  $R$  la distancia de aproximación entre el

derivado indólico y el AAa en el complejo de encuentro y  $w$  la energía de estabilización en dicho complejo. Suponiendo que el valor de  $R$  es de aproximadamente  $0,4\text{nm}$  y  $w$  igual a cero, el cociente  $k_d/k_{-d}$  tiene un valor cercano a  $0,3$ . Quiere decir entonces que  $K_D$  resulta ser independiente de la temperatura y así no influye en el efecto de temperatura observado.

Las dos situaciones extremas que se pueden presentar en cuanto a la eficiencia de quenching son las siguientes:

i) Si  $k_{-1} \gg k_2$ , significa que la eficiencia de quenching es baja, de manera que la ecuación 20 se reduce a:

$$kq' = 0,3 \frac{k_1}{k_{-1}} k_2 \quad 20.a$$

De acuerdo a la ecuación 20.a la entalpía de activación experimental ( $\Delta H^\ddagger$ ) sería:

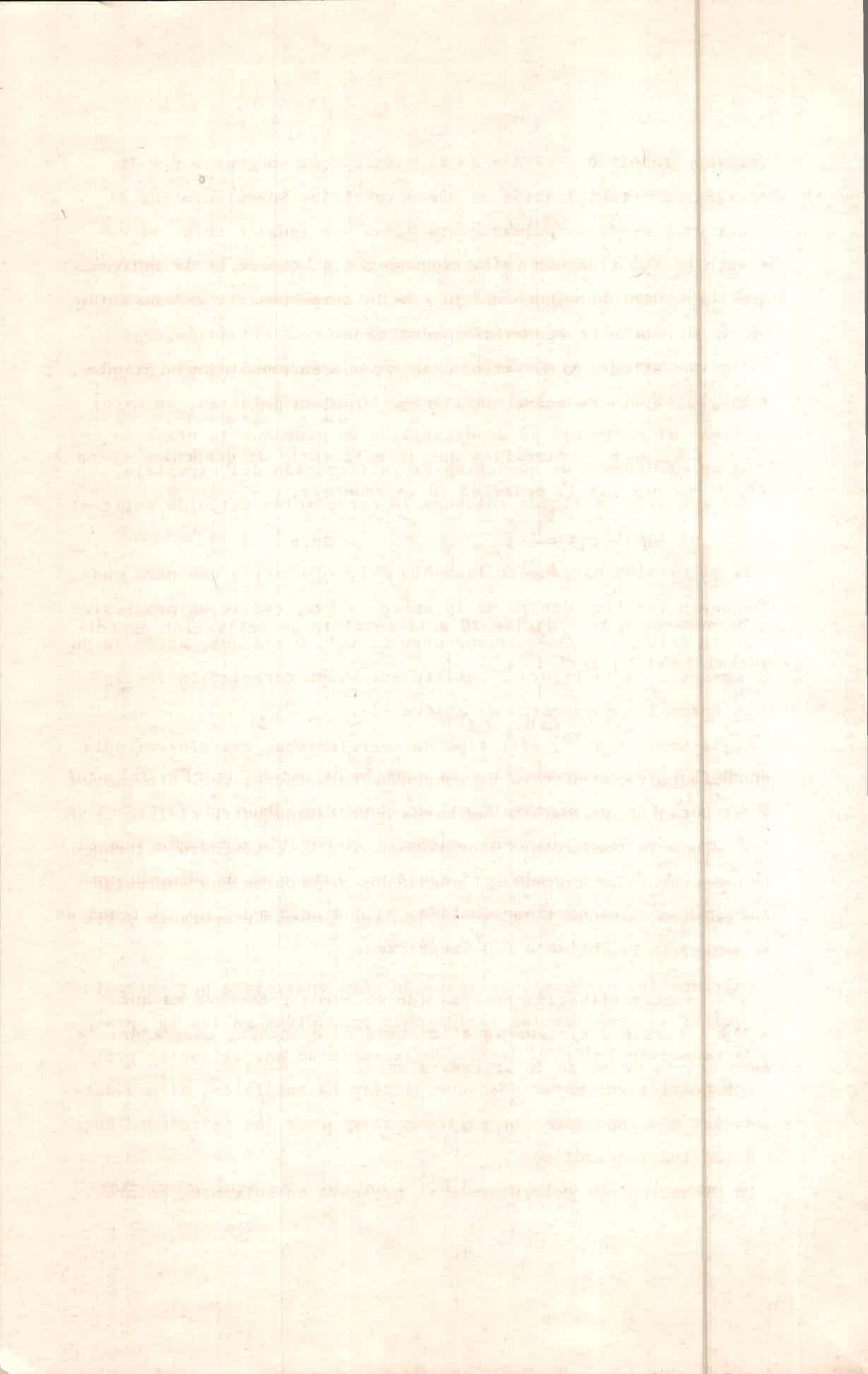
$$\Delta H^\ddagger = \Delta H_1 + \Delta H_2^\ddagger \quad 21$$

donde  $\Delta H_1$  correspondería a la energía de estabilización del excíplejo y  $\Delta H_2^\ddagger$  al proceso final de quenching. Dado que  $\Delta H_1$  se espera que sea menor que cero, entonces si resulta ser mayor que el  $\Delta H_2^\ddagger$ , el  $\Delta H^\ddagger$  observado será negativo. Esto está de acuerdo con nuestros resultados experimentales ya que para aquellos sistemas de  $kq$  pequeñas se obtienen  $\Delta H^\ddagger$  negativos.

ii) La otra situación extrema que se puede presentar es que  $k_2 \gg k_{-1}$ , vale decir que la eficiencia de quenching es grande, de modo que la ecuación 20 se reduce a:

$$kq' = 0,3 k_1 \quad 20.b$$

De acuerdo a la ecuación 20.b, la entalpía de activación expe-



rimental sería:

$$\Delta H^\ddagger = \Delta H_1^\ddagger$$

22

o sea que el  $\Delta H^\ddagger$  observado correspondería a la energía de activación para la formación del exciplego y sería positivo. Nuestros resultados experimentales se encuadran dentro de esta situación, puesto que para aquellos sistemas de constantes de quenching más grandes,  $k_2 \gg k_{-1}$ , se obtienen  $\Delta H^\ddagger$  positivos. En otras palabras, en estos sistemas el exciplego se desestabiliza de modo que la etapa de control en el proceso de quenching es la formación del exciplego.

Así quedaría explicada entonces la correlación obtenida entre el  $\Delta H^\ddagger$  y el  $\ln kq'$ .

Si se examina nuevamente la tabla XVI, se observa que para cada compuesto indólico dentro de la serie de AAa, existe un progresivo aumento del  $\Delta H^\ddagger$  y  $\Delta S^\ddagger$  al aumentar la  $kq'$ , o sea que, según se puede observar en la figura 35 existe una buena correlación isocinética entre los parámetros de activación.

Según Krug et al<sup>70</sup>, este tipo de correlaciones energía-entropía pueden surgir por efectos de compensación estadísticos. Sin embargo el hecho de que exista una buena correlación entre el  $\ln kq'$  y el  $\Delta H^\ddagger$  y que la temperatura isocinética, 229°K, esté fuera del rango de temperatura experimental, son buenos argumentos que sustentan que existen factores extratermodinámicos que están operando sobre un mecanismo común.

En todos los sistemas, la reacción está controlada por entropía ya que si se comparan las variaciones producidas en las  $kq$  para cada compuesto indólico dentro de la serie de AA, el factor pre-exponencial tiene mayor peso que el término entálpico, siendo éste cada vez más importante en sistemas tales como los correspondientes a ácido Indol-3-acético.

La situación que generalmente se presenta en solventes polares,

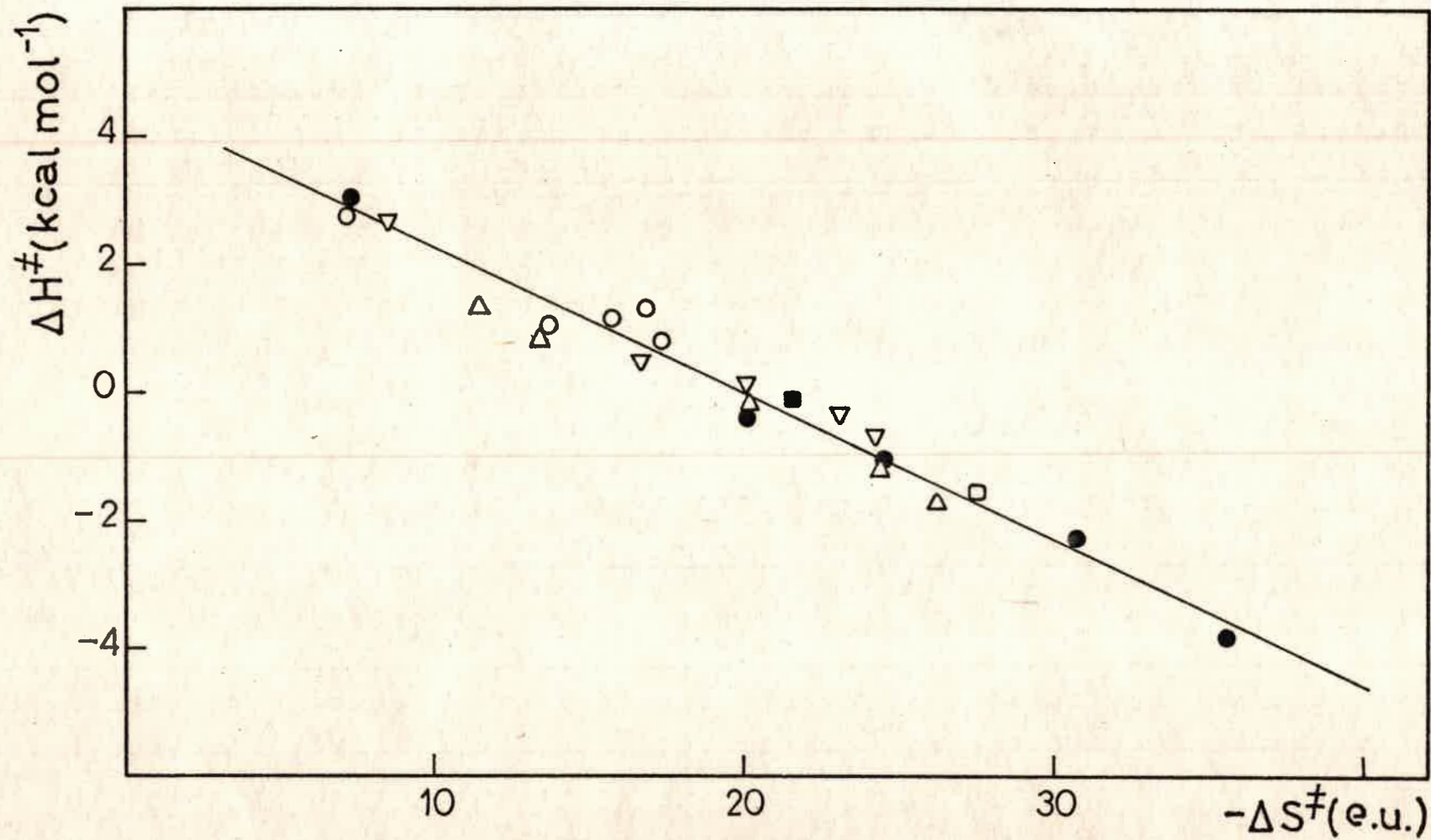


fig.35 Correlación entre  $\Delta H^\ddagger$  y  $\Delta S^\ddagger$ . ● Triptófano; ▽ Triptamina; △ Indol; ○ Indol Acético.

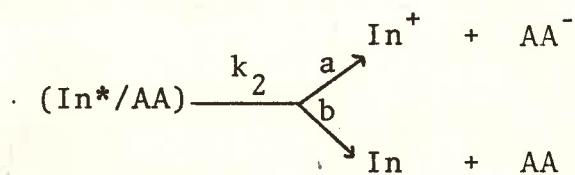
□ Sistema Indol-β Alanina; ■ Sistema Indol Acético-β Alanina

según ya mencionamos, es que no se observe fluorescencia del exciplojo ya que en este medio puede estar presente otra vía de decaimiento como es la formación de iones.<sup>69</sup> En el mecanismo que operaría en nuestros sistemas, la etapa que corresponde a  $k_2$  sería la que conduciría, como en el mecanismo de Rehm et al<sup>68</sup>, a la formación de iones si hubiera una completa transferencia de carga. Una experiencia clave para corroborar si en nuestros sistemas están presentes los iones correspondientes, sería realizar flash fotólisis de los derivados indólicos en presencia y ausencia de AAa.

71

Nosotros no disponíamos de tales medios, sin embargo Previtali realizó dichas experiencias de Indol en presencia y ausencia de diferentes AAa. El autor mide los rendimientos cuánticos de triplete ( $\Phi_T$ ), rendimiento cuántico de fotoionización ( $\Phi_{Ie^-}$ ) y rendimientos cuánticos de la formación de Indol catión radical ( $\Phi_{In^+}$ ) en presencia de Glicina, Prolina e Hidroxiprolina y en ausencia de ellos. Una observación muy importante es que, los  $\Phi_T$ ,  $\Phi_{Ie^-}$  y  $\Phi_f$  se reducen por el mismo factor en presencia de los AAa, pero el  $\Phi_{In^+}$  en el caso de Prolina e Hidroxiprolina es más grande de lo que pudiera esperarse si la única fuente de catión radical Indol ( $In^+$ ) es la fotoionización desde el estado singlete.

Las vías posibles de decaimiento del exciplojo serían:



El autor encuentra que para el caso de Glicina, que es el AAa con el cual se obtienen valores de  $k_q$  más pequeñas, no hay indicios de que transcurra el paso a del esquema anterior. De todas maneras para los otros dos AAa, si bien existe este camino de desactivación su contribución es pequeña. Una explicación razonable es que el pa

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.

Faint, illegible text at the bottom of the page, possibly bleed-through or a separate section.

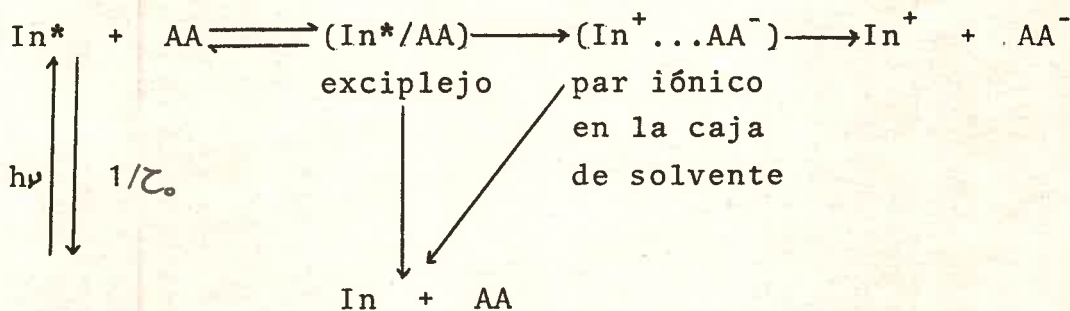
so a tenga peso pero que se produzca una rápida recombinación de los iones o bien exista otro paso que no involucra una transferencia de electrones.

Lo que quedaría por analizar es que si nuestros resultados guardan alguna relación con el mecanismo de quenching intramolecular en el Triptófano a pH 7. Nosotros pensamos que el mecanismo que está presente en la interacción entre el anillo indólico excitado y los AAa desde el punto de vista intermolecular es el mismo que en el caso del intramolecular. La base para esta conclusión es que nuestras evidencias experimentales conducen a posturas similares a las de Fleming et al<sup>38</sup> y Ricci et al<sup>37</sup> según ya hemos discutido.

Por último las conclusiones de este trabajo son:

El mecanismo de interacción entre los derivados indólicos y los AAa sería de transferencia de carga desde el anillo indólico excitado al carboxilato del aminoácido.

Sería muy interesante continuar las experiencias de flash fotólisis de Indol con el resto de los AAa estudiados, y con los otros derivados indólicos, para conocer cuales son los sistemas que participan en una transferencia de carga total, pues según ya presentamos, existe evidencia de que en algunos casos está involucrada la formación de iones en el proceso de quenching<sup>71</sup>. De todos modos en aquellos sistemas en los cuales existiría transferencia de carga total un mecanismo alternativo es el que escribimos a continuación:



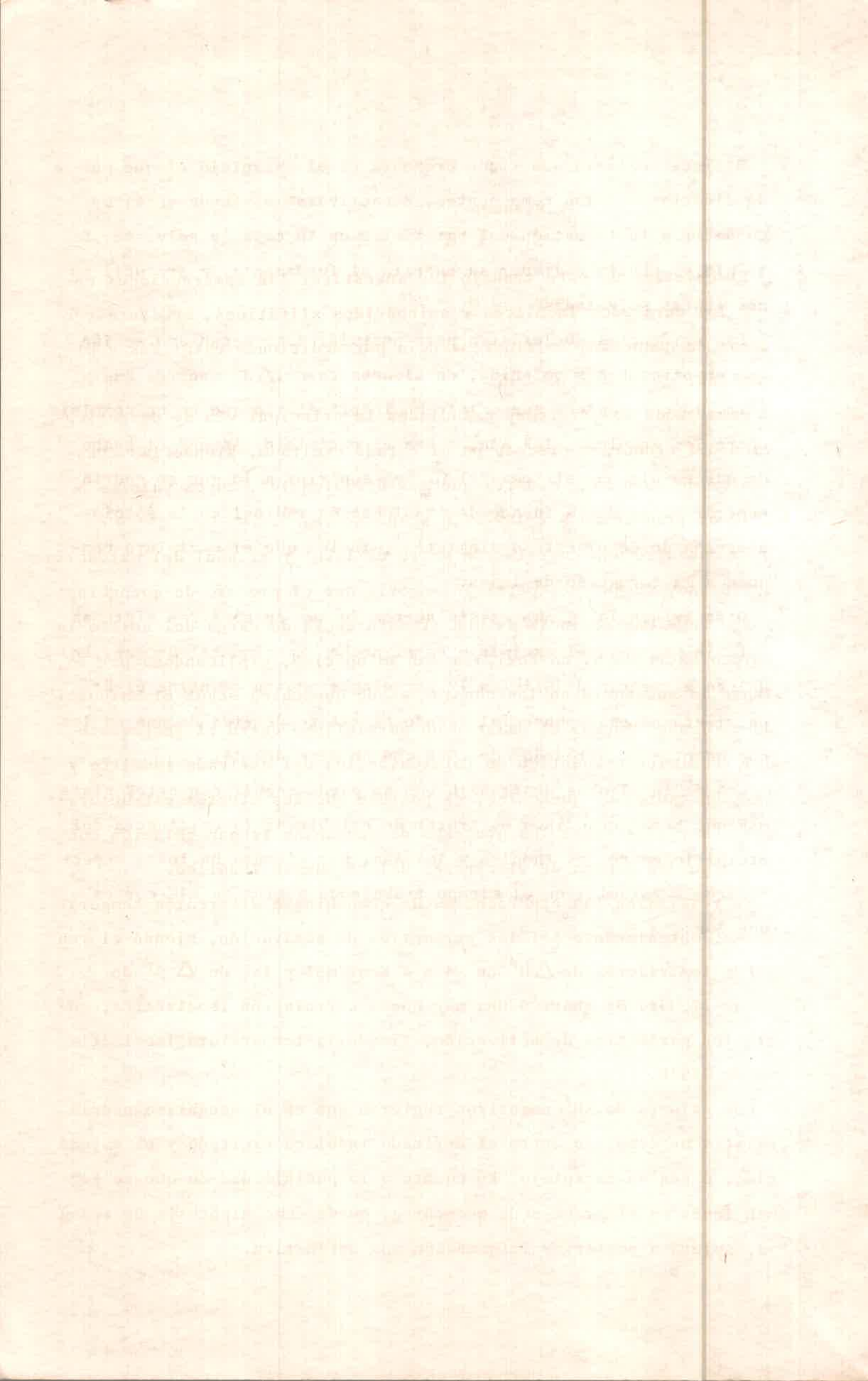
Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page. The text is arranged in several paragraphs and is difficult to decipher due to its low contrast and blurriness.

El intermediario que sigue presente es el exciplejo el que puede disociarse a sus componentes, desactivarse al fundamental o conducir a la formación del par iónico en la caja de solvente. Este último podría degradar su energía al fundamental o producir iones libres solvatados.

Las evidencias que existen para postular este mecanismo serían que nosotros hemos obtenido, en algunos casos,  $\Delta H^\ddagger$  menores que cero, lo que sugiere que existe un intermediario que es un complejo entre los Indoles y los AAa, o sea el exciplejo. Además el hecho de que en algunos sistemas el  $\Phi_{\text{Indol}^+}$  sea superior a lo que se podría esperar si la única fuente de Indol catión radical es la fotoionización desde el estado singlete<sup>71</sup>, indica que el exciplejo conduce a la formación de iones.

Otra evidencia<sup>72</sup>, que existe acerca de que en nuestros sistemas estaría presente el exciplejo es el hecho experimental de que, Indol en presencia de Glicina 1M por single photon counting el decaimiento no es exponencial siendo el tiempo de vida de una de las componentes de alrededor de 20ns con un peso del 1%.

Una de las líneas de trabajo que se puede seguir con estos sistemas que hemos estudiado es tratar de establecer la existencia del exciplejo entre los Indoles y los AAa, por ejemplo haciendo espectroscopía resuelta en el tiempo trabajando a tiempos más cortos que 20ns.



#### IV. Resumen

El objetivo de este trabajo fue investigar las interacciones entre los derivados indólicos y aminoácidos alifáticos, mediante técnicas de quenching de fluorescencia por mediciones estáticas y dinámicas.

Para todos los sistemas estudiados la principal vía de desactivación del cromóforo procede en el estado excitado, siendo las constantes de quenching menores que las difusionales, cuyos valores a 25°C oscilan entre  $6 \times 10^6$  -  $1,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ .

Se encontró una correlación entre el  $\ln k_q'$  y el  $pK_a1$  del aminoácido alifático, lo que nos permitió sugerir que el proceso de quenching surge como consecuencia de una transferencia de carga del anillo indólico excitado al carboxilato del aminoácido, explicándose por lo tanto la secuencia en las constantes de quenching según el aminoácido empleado. Además al existir un paralelismo entre el incremento del rendimiento cuántico de fotoionización del derivado indólico y las constantes de quenching, es posible que los efectos estructurales observados sobre los procesos de quenching tengan relación con la capacidad donora de electrones del compuesto indólico.

Se realizaron las experiencias de quenching a diferentes temperaturas, obteniéndose así los parámetros de activación, siendo el rango de los valores de  $\Delta H^\ddagger$  de -4 a 4 Kcal/mol y las de  $\Delta S^\ddagger$  de -7 a -37 u.e. Se observó una muy buena correlación isocinética, entre los parámetros de activación, siendo la temperatura isocinética de 229°K.

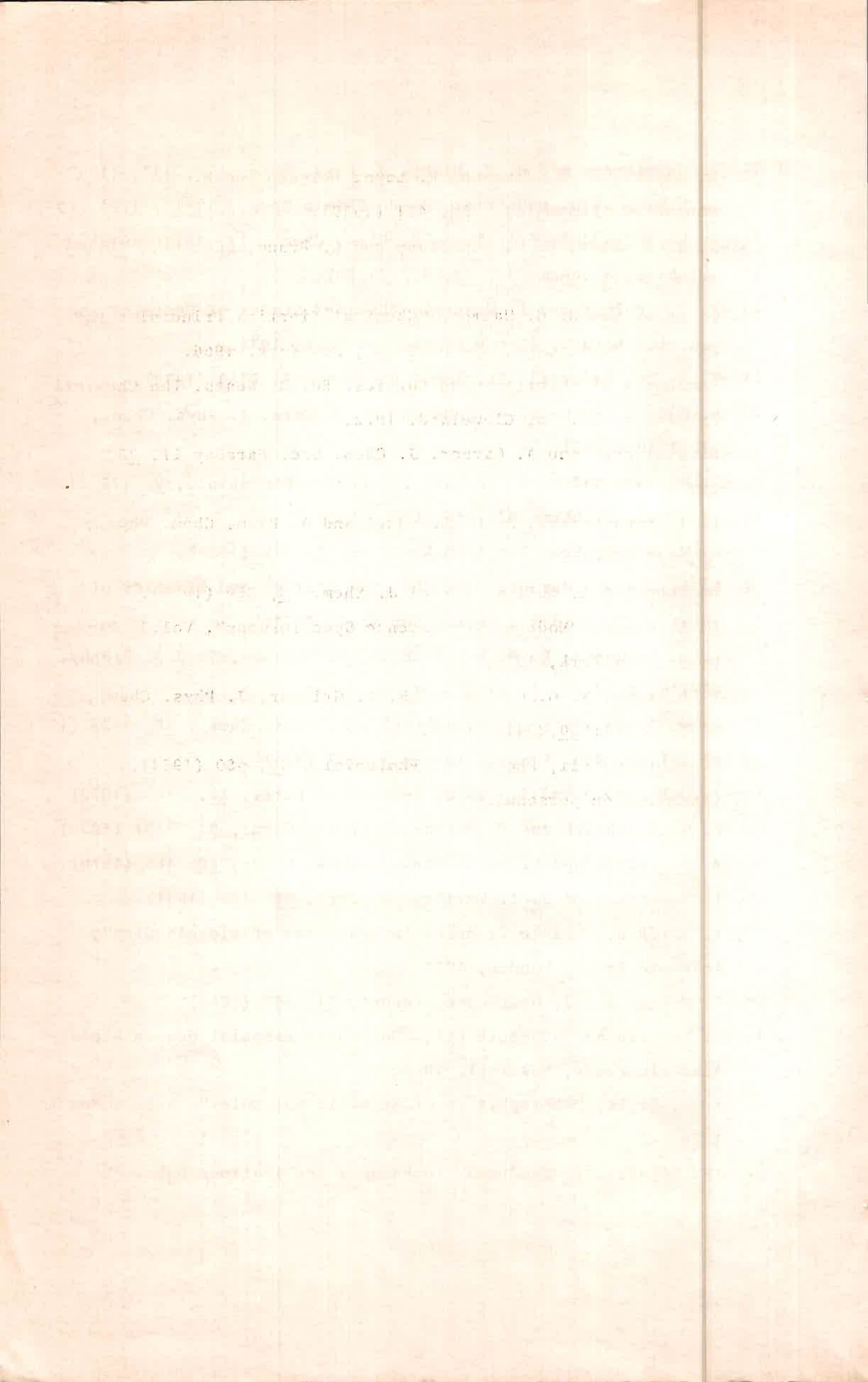
Los valores de  $\Delta H^\ddagger$  negativos sugieren que en el mecanismo podría existir un complejo entre el derivado indólico excitado y el aminoácido, o sea un exciplexo. En cuanto a la posibilidad de que se formen iones en el proceso de quenching, queda como hipótesis de trabajo, sujeta a posterior información más definitiva.

## REFERENCIAS

- 1.-S. V. Konev, "Fluorescence and Phosphorescence of Proteins and Nucleic Acids", Plenum Press, New York, 1967.
- 2.-J. R. Lakowiks, "Principles of Fluorescence Spectroscopy", Plenum Press, New York, 1983.
- 3.-R. Santus, M. Bazin and M. Aubailly, Rev. Chem. Intermed., 3, 231 (1980).
- 4.-N. A. García, Tesis Ph D., Universidad Nacional de Río Cuarto, 1981.
- 5.-N. A. García y C. M. Previtali, Anales Asoc. Quim. Argentina, 70, 19 (1982).
- 6.-C. M. Previtali y N. A. García, Anales Asoc. Quim. Argentina, 71, 31 (1983).
- 7.-F. W. Teale, G. Weber, Biochem. J., 65, 476 (1957).
- 8.-B. L. Van Duuren, J. Org. Chem., 26, 2954 (1961).
- 9.-R. W. Cowgill, Biochem. Biophys. Acta, 133, 6 (1967).
- 10.-M. S. Walker, T. W. Bednar and R. Lumry, J. Chem. Phys., 45, 3455 (1966); 47, 1020 (1967).
- 11.-M. V. Hershberger, R. Lumry and R. Verrall, Photochem. Photobiol., 33, 609 (1981).
- 12.-G. Szabo and D. M. Rayner, Can. J. Chem., 102, 554 (1980).
- 13.-R. Meech, D. Phillips and A. G. Lee, Chem. Phys., 80, 317 (1983).
- 14.-E. Lippert, Z. Elektrichem., 61, 962 (1957).
- 15.-J. Barltrop and J. Coyle, "Principles of Photochemistry", Wiley, New York, 1978.
- 16.-J. A. Gally and G. M. Edelman, Biochim. Biophys. Acta, 60, 499 (1962).
- 17.-E. P. Kirby and R. F. Steiner, J. Phys. Chem., 74, 4480 (1970).

- 18.-M. S. Walker, T. W. Bednar, R. Lumry and F. Humphries, Photochem. Photobiol., 14, 147 (1971).
- 19.-J. Feitelson, Photochem. Photobiol., 13, 87 (1971).
- 20.-T. R. Hopkins and R. Lumry, Photochem. Photobiol., 15, 555 (1972).
- 21.-R. Klein and I. Tatischeff, Chem. Phys. Letters, 51, 333 (1977).
- 22.-J. Einsinger and G. Navon, J. Chem. Phys., 50, 2069 (1969).
- 23.-I. Weinryb and R. F. Steiner, Biochem. J., 7, 2488 (1968).
- 24.-R. J. Robbins, G. R. Fleming, G. S. Beddard, G. W. Robinson, P. J. Thistlethwaite and G. J. Woolfe, J. Am. Chem. Soc. 102, 6271 (1980).
- 25.-D. V. Bent and E. Hayon, J. Am. Chem. Soc., 97, 2612 (1975).
- 26.-F. D. Bryant, R. Santus and L. I. Grossweiner, J. Phys. Chem., 79, 2711 (1975).
- 27.-L. I. Grossweiner and H. L. Joschek, Advan. Chem. Ser., 50, 279 (1965).
- 28.-R. Klein, I. Tatischeff, M. Bazin and R. Santus, J. Phys. Chem., 85, 670 (1981).
- 29.-J. Zechner, G. Kohler, N. Getoff, I. Tatischeff and R. Klein, Photochem. Photobiol., 34, 163 (1981).
- 30.-I. Tatischeff and R. Klein, Excited States Biol. Mol., Proc. Int. Conf. 1974. Pub. 1976
- 31.-I. Tatischeff and R. Klein, Photochem. Photobiol., 22, 229 (1975).
- 32.-J. Feitelson, Israel J. of Chem., 8, 241 (1970).
- 33.-M. C. Chang, J. W. Petrich, D. B. Mac Donald and G. R. Fleming, J. Am. Chem. Soc., 105, 3819 (1983).
- 34.-T. R. Hopkins, and R. Lumry, Biophys. J., 9, A 216 (1969).
- 35.-R. W. Ricci, Photochem. Photobio., 12, 67 (1970).
- 36.-R. W. Cowgill, Arch. Biochem. Biophys., 100, 36 (1963).
- 37.-R. Ricci and J. M. Nesta, J. Phys. Chem., 80, 974 (1976).
- 38.-J. W. Petrich, M. C. Chang, D. B. Mac Donald and G. R. Fleming, J. Am. Chem. Soc., 105, 3824 (1983).

- 39.-R. F. Steiner and E. P. Kirby, *J. Phys. Chem.*, 73, 4130 (1969).
- 40.-J. Schang et G. Laustriat, *J. de Chimie Phys.*, 11-12, 1291 (1975).
- 41.-N. Lasser and J. Feitelson, *J. Phys. Chem.*, 77, 1011 (1973).
- 42.-A. White, *Biochem. J.*, 71, 217 (1959).
- 43.-R. F. Steiner and I. Weinryb, "Excited States of Proteins and Nucleic Acids", Plenum Press, New York, 1971.
- 44.-W. B. De Lauder and Ph. Wahl, *Biochem.*, 9, 2750 (1970).
- 45.-E. Gudgin, R. Lopez Delgado and W. R. Ware, *J. Phys. Chem.*, 87, 1559 (1983).
- 46.-P. S. Song and W. E. Kurtin, *Photochem. Photobiol.*, 9, 175 (1969).
- 47.-J. Demas, *J. Chem. Ed.*, 53, 657 (1976).
- 48.-R. M. Noyes, *Pro. Reaction Kinetics*, 1, 129 (1961).
- 49.-E. A. Moelwyn Hughes, "The Chemical Statics and Kinetics of Solutions", Academic Press, New York, 1971.
- 50.-T. L. Bushueva, E. P. Busel and E. A. Burtein, *Studid. Biophy*, Berlin, Band 52, 1, 41 (1975).
- 51.-R. W. Ricci and K. B. Kilichowski, *J. Phys. Chem.*, 78, 1953 (1974).
- 52.-A. Weller, *Pro. React. Kinet.*, 1, 187 (1961).
- 53.-J. Guttenplan and S. Cohen, *Tetrahedron Lett.*, 22, 2165 (1972).
- 54.-P. M. Froehlich and K. Nelson, *J. Phys. Chem.*, 82, 2401 (1978).
- 55.-M. R. Eftink and C. A. Ghiron, *J. Phys. Chem.*, 80, 486 (1976).
- 56.-I. M. Frank and S. I. Vavilov, *Z. Phys.*, 69, 100 (1931).
- 57.-M. Slifkin, "Charge Transfer Interactions of Biomolecules", Academic Press, London, 1971.
- 58.-F. Mooney and J. Heathcote, *Lancet*, 11, 397 (1967).
- 59.-M. Slifkin and J. Heathcote, "Molecular Associations in Biology", Academic Press, New York, 1968.
- 60.-J. B. Birks, "Photophysics of Aromatic molecules", Wiley, New York, 1970.
- 61.-TRW Fluorometry Handbook. Techniques Applications Data.



- 62.-B. Alpert, D. M. Jameson, R. Lopez Delgado and R. Schooley, Photochem. Photobiol., 30, 471 (1979).
- 63.-J. B. A. Ross, K. W. Rousslang and L. Brand, Biochem., 20, 4361 (1981).
- 64.-I. Andur and G. G. Hammes, "Chemical Kinetics Principles and Selected Topic", Mc Graw Hill Co., New York, 1966.
- 65.-Handboock of Chemistry and Physics. Ed. R. Weats, The Chemical Rubber Co. Ed. 53, Cleveland, 1972.
- 66.-F. Wilkinson and A. Garner, J. Chem. Soc. Faraday II, 73, 222 (1977).
- 67.-L. I. Grossweiner, A. M. Brendzel and A. Blum, Chem. Phys., 57, 147 (1981).
- 68.-D. Rehm and A. Weller, Israel J. Chem., 8, 259 (1970).
- 69.-E. L. Wehry, "Modern Fluorescence Spectroscopy", Vol.2, Plenum press, New York, 1976.
- 70.-R. R. Krug, W. G. Hunter and R. A. Grieger, J. Phys. Chem., 80, 2335 (1976); 80,2341 (1976).
- 71.-C. M. Previtali, Photochem. Photobiol., 40, 689 (1984).
- 72.-Comunicación personal.



U.N.R.C.  
Biblioteca Central



25442

25442