

T. 144

Tesis Doctoral en Ciencias Químicas

**PROCESOS DE  
TRANSFERENCIA DE  
ELECTRONES DE  
ESTADOS EXCITADOS  
EN BICAPAS  
LIPÍDICAS.**

Ana Inés Novaira  
Marzo de 2004



CREER ... CREAR ...  
CRECER ...

T. 144



59549

DONACION

Don. : Tesis  
Exp. :  
Inv. N. : 59549

Director de Tesis:

*Dr. Carlos M. Previtali*

Codirector de Tesis:

*Dr. Guillermo G. Montich*

Miembros del Jurado:

*Dra. Juana J. Chessa*

*Dr. Norman A. García*

*Dr. Bruno Maggio*

59549



*A mis padres  
A mi esposo Daniel  
A mi hijo Santiago  
y a los hijos que vendrán*

*Gracias a todos los que colaboraron de una forma u otra en la realización de esta Tesis:*

A Carlos Previtali por dirigirme. Por el tiempo que destinó para enseñarme química y aconsejarme sobre las decisiones de la vida.

A Juan José Cosa por guiarme con su manera tan especial en mis comienzos científicos.

A Guillermo Montich, por colaborar en el inicio de mi carrera doctoral .

A los miembros del jurado Norman García, Bruno Maggio y muy especialmente a Juana Chessa por sus valiosos aportes y sugerencias.

A mi mamá y mi papá, dos personas excepcionales quienes me dieron y me dan lo mejor en todos los aspectos de la vida. A ellos también les agradezco por María Marta y Mercedes, mis queridas y geniales hermanas que siempre están dispuestas a colaborar.

A Daniel, mi esposo. Por apoyarme durante todo este tiempo, por ayudarme en las decisiones difíciles, por aceptarme, y sobre todo por amarme.

A mis amigos y compañeros de la Universidad: Sandra Miskoski, Claudia Rivarola y Mariano Correa por todos los momentos que compartimos, por la ayuda y amistad que siempre me brindaron. A Elisa Milanesio, Martín Broglia, Mariano Bruno, Carlos Suchetti, Patricia Molina, Alicia Biasutti, Lorena Gomez, Ariana Posadaz, Hernán Montejano, Diego Acevedo, Débora Lazzeri, Inés Scalise, Gabriel Planes, Horacio Salavagione, Miguel Gervaldo y Walter Massad con quienes de distinta manera viví momentos agradables y me ayudaron con su alegre presencia cuando lo necesité.

A Graciela Zanini por su amistad y por el lugar que me brindó en la oficina.

A los docentes, no docentes y personal del Dpto. de Química quienes colaboraron en esta etapa de mi formación.

A mis amigas de “fierro” Lucre, Mariela, Pato y Marcela por su apoyo y contención.

A Estela y Tito, mis suegros, por toda la ayuda que me brindaron.

A Mauro y Franco Comelli por su colaboración en la impresión de esta Tesis.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto por haberme facilitado sus instalaciones.

## Resumen

En esta Tesis se estudia el comportamiento fotofísico y fotoquímico del primer estado excitado singlete de antraceno (ANT) con derivados indólicos en vesículas unilaminares y multilaminares de palmitoilfosfatidilcolina (POPC) y dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC).

En primer lugar, se investigaron los procesos de inhibición de ANT y sus derivados por los compuestos indólicos en medio homogéneo para luego facilitar la interpretación de los resultados encontrados en vesículas. En acetonitrilo esta reacción ocurre vía una cinética de transferencia de electrón. En solventes de menor polaridad los resultados pueden ser explicados mediante la formación de exciplejos polares, solamente emisivos cuando el nitrógeno del anillo indólico está sustituido con el grupo metilo. También se observa que la posición de la banda de emisión depende con la polaridad del solvente.

En ambos tipos de vesículas se encontró que la inhibición de ANT por los compuestos indólicos se comporta similarmente a los medios homogéneos. Además, en las vesículas unilaminares se determinó la localización de las distintas moléculas. ANT está localizado en la interfase, mientras que Indol (IN) y 1,2-dimetilindol (DMI) particionan entre el medio acuoso y el vesicular. Se determinaron las constantes de partición usando la dependencia de los espectros de emisión de IN y DMI al variar la concentración de las vesículas. Por otro lado, se encontró que l-triptofano (TRP) y ácido 3-indolacético (IAA) no presentan el fenómeno de partición y se hallarían en la región externa de la interfase vesicular.

En ambos tipos de vesículas, DMI presenta un comportamiento clásico de la ecuación de Stern Volmer mientras que los otros inhibidores exhiben una curvatura hacia abajo. Se determinaron las constantes de velocidad de inhibición ( $k_q$ ) en vesículas unilaminares usando las concentraciones efectivas de los inhibidores en las bicapas. Se encontraron valores de  $k_q$  menores con respecto a los obtenidos en los medios homogéneos posiblemente debido a la alta viscosidad de la bicapa. También se observó la emisión del exciplejo ANT-DMI el cual sensa una polaridad elevada que corresponde a la región de la interfase. A altas concentraciones de DMI éste inhibe tanto la emisión de ANT como la del exciplejo.

Se investigó la transición de fase de vesículas unilaminares "vacías" de DMPC siguiendo su dispersión de luz a diferentes temperaturas. Se encontró la temperatura de transición de fase de este fosfolípido similar a la mostrada en la literatura sin observarse el fenómeno de histéresis térmica. Por otro lado, en las mismas vesículas con ANT se observó histéresis térmica en la emisión de ANT perdiéndose la misma en presencia de DMI.

## Abstract

The photophysic and photochemical behavior of the first excited state of anthracene (ANT) with indolic derivates in unilamellar and multilamellar palmitoyloleoyl phosphatylcholine (POPC) and dimirystoylphosphatylcholine (DMPC) vesicles are studied in this Thesis.

In the first place, the quenching of the excited singlet of ANT and their derived by the indolic compounds were investigated in homogeneous medium in order to facilitate the interpretation of the results found in vesicles. In acetonitrile this reaction occurs via an electron transfer kinetic. In solvents of lower polarity the results can be explained by means of the formation of polar exciplexes, wich are only emissive when the nitrogen of the indolic ring is sustituted with a methyl group. Also, the position of the emission band is solvent dependent.

The quenching of ANT by the indolic compounds behaves in a similar way than the homogeneous media in both types of vesicles. Futhermore, in the unilamellar vesicles the localization of the different molecules was determined. ANT is located at the interface, while Indole (IN) and 1,2-dimethylindole (DMI) suffer a partition process between the water and the vesicular phase. The partition constants were determined using the dependence of the emission spectra of IN and DMI when varying the vesicles concentration. On the other hand, it was found that l-tryptophan (TRP) and indole-3-acetic acid (IAA) do not present the partition phenomenon and they would be in the external region of the vesicular interface.

In both types of vesicles, DMI presents a classic behavior of Stern Volmer's equation, while the other quenchers show a downward curvature. The bimolecular quenching rate constants ( $k_q$ ) were determined in unilamellar vesicles using the effective concentrations of the quenchers at the bilayers. It was found a  $k_q$  value smaller than the obtained in the homogeneous media possibly due to the high viscosity of the bilayer. Also, the exciplex ANT-DMI emission was observed sensing a high polarity of the interface region. To high concentration of DMI the ANT and exciplex emission are inhibited.

The phase transition of "empty" unilamellar vesicles of DMPC was investigated following their scattering at different temperatures. It was found the temperature of transition of this phospholipid similar at the literature without be present the thermal hysteresis phenomenon. On the other hand, in the same vesicles with ANT thermal hysteresis in the emission of the ANT was observed which is lost in the presence of DMI.

**ÍNDICE GENERAL:**

<b>ÍNDICE DE TEMAS.</b>	II
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.</b>	V
<b>ÍNDICE DE TABLAS.</b>	IX
<b>ÍNDICE DE ESQUEMAS.</b>	X
<b>GLOSARIO DE ABREVIATURAS.</b>	XI



**ÍNDICE DE TEMAS**

<b>CAPÍTULO I: OBJETIVOS.</b>	1
<b>CAPÍTULO II: INTRODUCCIÓN.</b>	4
II-1-1- Sistemas organizados. Vesículas.	4
II-1-2- Aplicaciones de las vesículas.	5
II-1-3- Constituyentes químicos de las vesículas. Fosfatidilcolinas.	8
II-1-4- Estabilidad química de las fosfatidilcolinas.	9
II-1-5- Formación de las vesículas.	10
II-1-6- Estructura física de las vesículas.	11
II-1-7- Estabilidad de las vesículas.	12
II-1-8- Fases de la membrana. Temperatura de transición de fase.	13
II-1-9- Características químicas y estructurales de la región de las interfases de las bicapas vesiculares.	15
II-2- Fotofísica y fotoquímica en vesículas.	17
II-3-1- Teoría general de reacciones de transferencia de electrones fotoinducidas.	18
II-3-2- Medios de polaridad relativamente alta.	19
II-3-3-1- Medios no polares y de polaridad relativamente baja.	23
II-3-3-2- Formación y comportamiento de exciplejos. Efecto de la polaridad del medio.	24
II-4- Referencias.	27
<b>CAPÍTULO III: PARTE EXPERIMENTAL.</b>	31
III-1- Materiales.	31
III-2- Medios homogéneos. Preparación de soluciones.	32
III-3- Medios organizados. Preparación de vesículas.	32
III-3-1- Método de extrusión.	33
III-3-1-1- Procedimiento.	34

III-3-1-2-Incorporación de solutos a las vesículas.	35
III-3-2- Método de inyección.	36
III-3-2-1- Procedimiento e incorporación de solutos a las vesículas.	37
III-4- Verificación de la formación de las vesículas.	37
III-5- Medidas experimentales.	39
III-6- Referencias.	41
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	
<b>MEDIOS HOMOGÉNEOS</b>	42
IV-1- Inhibición de fluorescencia de ANT y sus derivados por compuestos indólicos.	42
IV-2- Solvente relativamente polar: acetonitrilo.	44
IV-3-1- Solventes de baja polaridad.	47
IV-3-2- Estudio de los excíplejos formados por diferentes pares de hidrocarburos aromáticos e indoles en n-heptano.	49
IV-3-3- Estudio del efecto de solventes sobre el excíplejo ANT-DMI.	54
IV-3-4- Estudio de la reacción fotoquímica entre los hidrocarburos aromáticos y 3-MIN en n-heptano.	56
IV-3-5- Consideraciones generales del proceso de reacción de ANT y sus derivados por compuestos indólicos en n-heptano.	59
IV-4- Referencias.	62
<b>CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	
<b>MEDIOS ORGANIZADOS.</b>	64
V-1- Inhibición de fluorescencia de ANT por compuestos indólicos en vesículas.	64
V-1-1- Estudio de la inhibición de fluorescencia de ANT por compuestos indólicos en vesículas unilaminares de POPC y DMPC en condiciones estáticas.	64
V-1-2- Estudio de la inhibición de fluorescencia de ANT por compuestos	

indólicos en vesículas unilaminares en condiciones dinámicas.	74
V-1-3- Estudio de la inhibición de fluorescencia de ANT por compuestos indólicos en vesículas multilaminares de POPC.	75
V-2- Distribución de solutos en las vesículas.	77
V-2-1- Antraceno.	78
V-2-2- Derivados indólicos.	84
V-2-2-1- Dimetilindol e Indol.	86
V-2-2-1-1- Determinación de las constantes de partición de DMI e IN.	90
V-2-2-2- Ácido 3-indolacético y L-Triptofano.	100
V-3- Constantes bimoleculares de la velocidad de inhibición de fluorescencia de ANT por los diferentes inhibidores en vesículas unilaminares.	102
V-3-1- Constantes bimoleculares de la velocidad de inhibición de fluorescencia de ANT por DMI y IN considerando las concentraciones efectivas de los inhibidores en las bicapas.	103
V-3-2- Constantes bimoleculares de la velocidad de inhibición de fluorescencia de ANT por TRP y IAA considerando las concentraciones efectivas de los inhibidores en las bicapas.	105
V-4- Estudio del exciplojo polar ANT-DMI en vesículas unilaminares.	106
V-4-1- Estudio de la dependencia de la intensidad de emisión del exciplojo ANT-DMI con la concentración de DMI. Comparación en medio homogéneo y en las vesículas.	112
V-5- Estudio de la emisión en las vesículas de DMPC. Efecto de la temperatura.	117
V-6-Referencias.	124
<b>CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES.</b>	128
VI-1- Medios homogéneos.	128
VI-2- Medios organizados.	128

## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura I. 1: Estructura molecular de POPC.	1
Figura I. 2: Estructura molecular de DMPC.	1
Figura I. 3: Estructura molecular y posiciones 9 y 10 de ANT.	2
Figura I. 4: Estructura molecular y posiciones 1,2 y 3 de IN.	3
Figura II. 1: Estructura de una vesícula unilaminar.	5
Figura II. 2: Estructura molecular general de fosfatidilcolinas.	8
Figura II. 3: Disposición de las cadenas hidrocarbonadas fosfolípídicas. A: conformación <i>anti</i> . B: conformación oblicua.	14
Figura II. 4: Disposición de la cadena hidrocarbonada fosfolípídica con instauración <i>cis</i> .	14
Figura II. 5: Perfil del número de densidad de probabilidad de los grupos del fosfolípido y del agua en función de la distancia del centro hidrocarbonado de la bicapa.	16
Figura III. 1: Fotografía obtenida en el microscopio electrónico de vesículas de POPC preparadas por medio del método de extrusión	38
Figura III. 2: Fotografía obtenida en el microscopio electrónico de vesículas de POPC preparadas por medio del método de inyección.	38
Figura IV. 1: Gráfico de Stern/Volmer para la inhibición de ANT por IN en acetonitrilo en condiciones estáticas.	43
Figura IV. 2: Gráfico de Stern-Volmer para la inhibición de 9,10-DCANT por IN en acetonitrilo en condiciones dinámicas.	44
Figura IV. 3: Logaritmo de las constantes de desactivación bimolecular en función del cambio de energía libre de Gibbs del proceso de transferencia del electrón.	47

Figura IV. 4: Inhibición de fluorescencia de 9-CANT por DMI en n-heptano.	49
Figura IV. 5: Inhibición de fluorescencia de ANT por DMI en n-heptano.	50
Figura IV. 6: Espectros de emisión normalizados de los exciplejos formados por el par ANT-DMI y el par 9-CANT-DMI en n-heptano.	51
Figura IV. 7: Energía del máximo de emisión de los distintos exciplejos en función de la suma de los valores de los potenciales n-heptano.	53
Figura IV. 8: Espectros de emisión normalizados del exciplejo formado por ANT-DMI en diferentes solventes.	54
Figura IV. 9: Fotodecoloración de ANT en presencia de 3-MIN en n-heptano.	57
Figura V. 1: Espectros de inhibición de ANT por DMI en vesículas unilaminares de POPC y formación del exciplejo.	65
Figura V. 2: Espectros de inhibición de ANT por IN en vesículas unilaminares de DMPC en la fase líquido-cristalina.	66
Figura V. 3: Gráficos de Stern-Volmer para la inhibición de la fluorescencia de ANT por DMI (●) en vesículas unilaminares de POPC y por IN (□) vesículas unilaminares de DMPC, en concentraciones analíticas de ambos inhibidores.	67
Figura V. 4: Decaimiento de fluorescencia de ANT codisuelto en vesículas DMPC en la fase líquido-cristalina.	69
Figura V. 5: Gráficos de Stern-Volmer para la inhibición de la fluorescencia de ANT por IAA y TRP en vesículas unilaminares de POPC. En concentraciones analíticas de ambos inhibidores.	71
Figura V. 6: Gráfico de Stern-Volmer modificado para la inhibición de la fluorescencia de ANT por TRP en vesículas unilaminares de POPC. En concentraciones analíticas de TRP	73
Figura V. 7: Espectros de inhibición de ANT por DMI en vesículas multilaminares de POPC y formación del exciplejo.	75
Figura V. 8: Espectros de emisión de fluorescencia de ANT codisuelto en las	

vesículas de POPC a diferentes relaciones POPC/ANT.	79
Figura V. 9: Espectros de emisión de fluorescencia de ANT codisuelto en vesículas de POPC y blanco de vesículas.	80
Figura V. 10: Espectros de emisión de fluorescencia de diferentes concentraciones de ANT en buffer.	81
Figura V. 11: Espectros de emisión de fluorescencia de ANT en diferentes medios.	83
Figura V. 12: Espectros de emisión de fluorescencia de ANT codisuelto en vesículas de POPC Y DMPC.	84
Figura V. 13: Espectros de emisión de fluorescencia de DMI en diferentes medios.	86
Figura V. 14: Espectros de emisión de IN. Efecto del agregado de vesículas de POPC a una solución de IN en buffer.	89
Figura V. 15: Cambio en la intensidad de fluorescencia de DMI a 310 nm en función de [POPC].	94
Figura V. 16: Efecto del agregado de vesículas de DMPC a DMI en buffer. A: fase gel. B: fase líquido-cristalina.	98
Figura V. 17: Efecto del agregado de vesículas de DMPC a IN en buffer. A: fase gel. B: fase líquido-cristalina .	99
Figura V. 18: Espectros de emisión de TRP. Efecto del agregado de vesículas de POPC a una solución de TRP en buffer.	101
Figura V. 19: Espectros de excitación de ANT en presencia de DMI.	107
Figura V. 20: Espectros de emisión del exciplo ANT-DMI en las diferentes vesículas y fases.	108
Figura V. 21: Espectros de emisión normalizados del exciplo ANT-DMI en diferentes medios.	109
Figura V. 22: Gráfico de Stern-Volmer para la inhibición de la fluorescencia de ANT por DMI en n-heptano. Altas concentraciones de DMI.	113

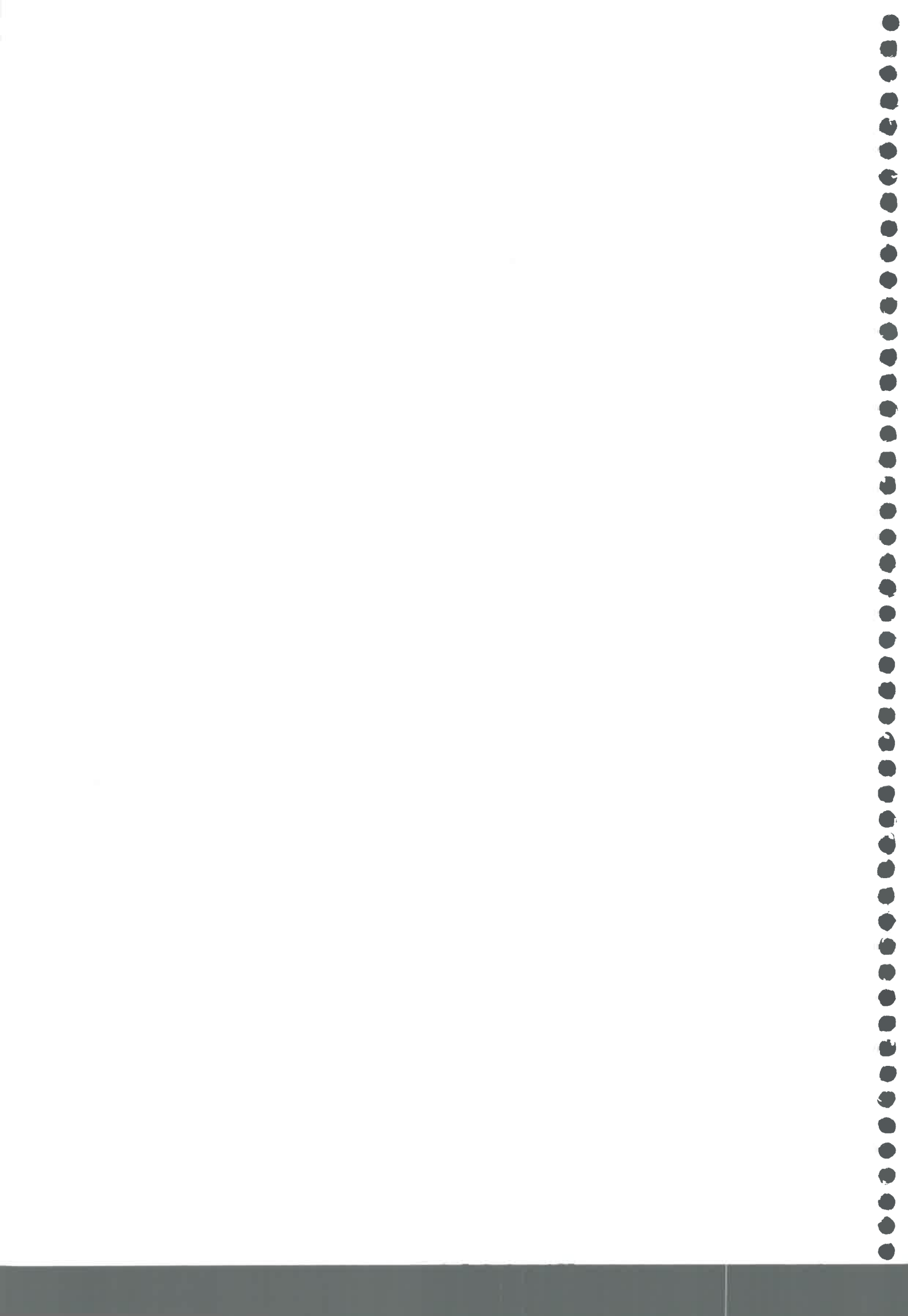
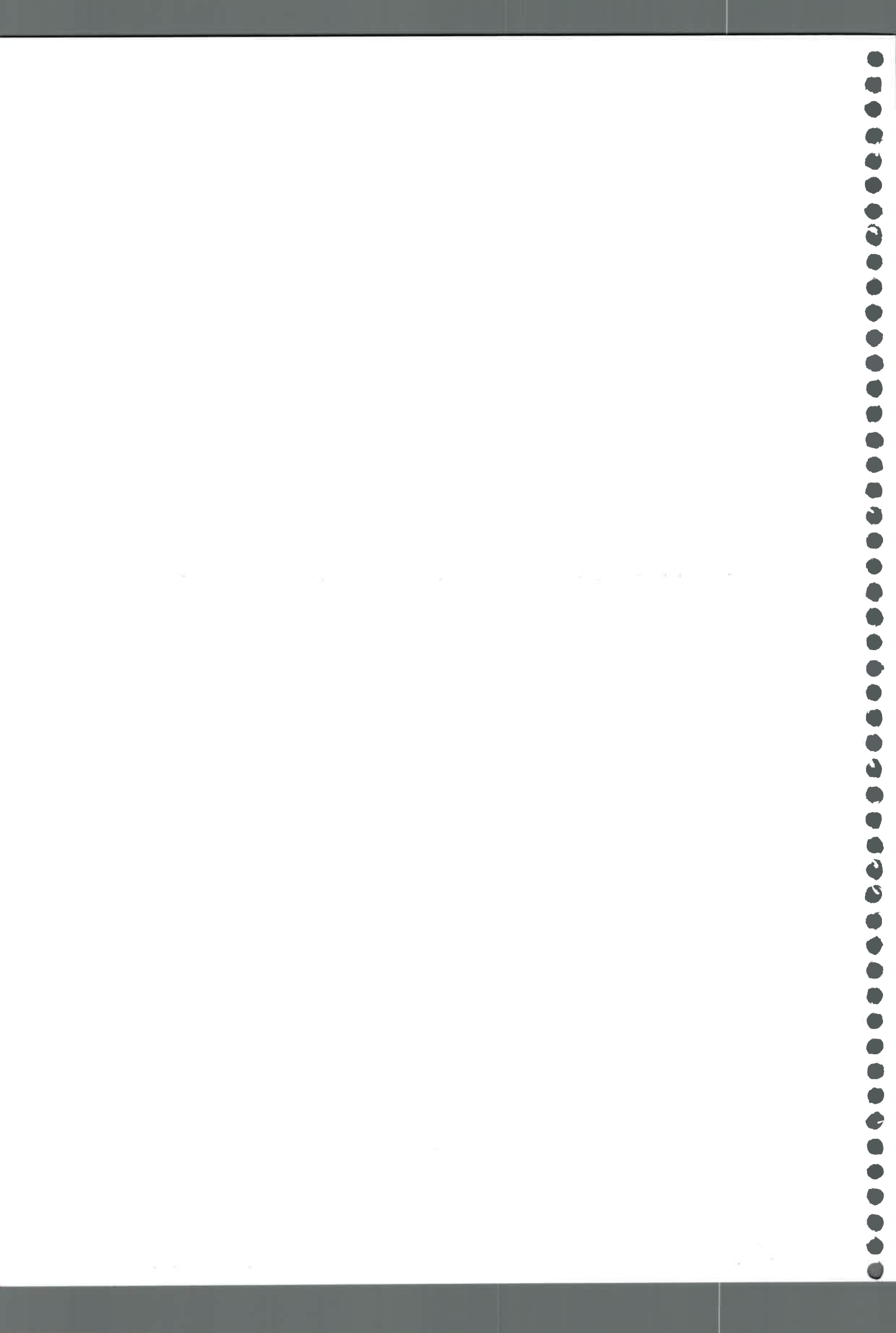


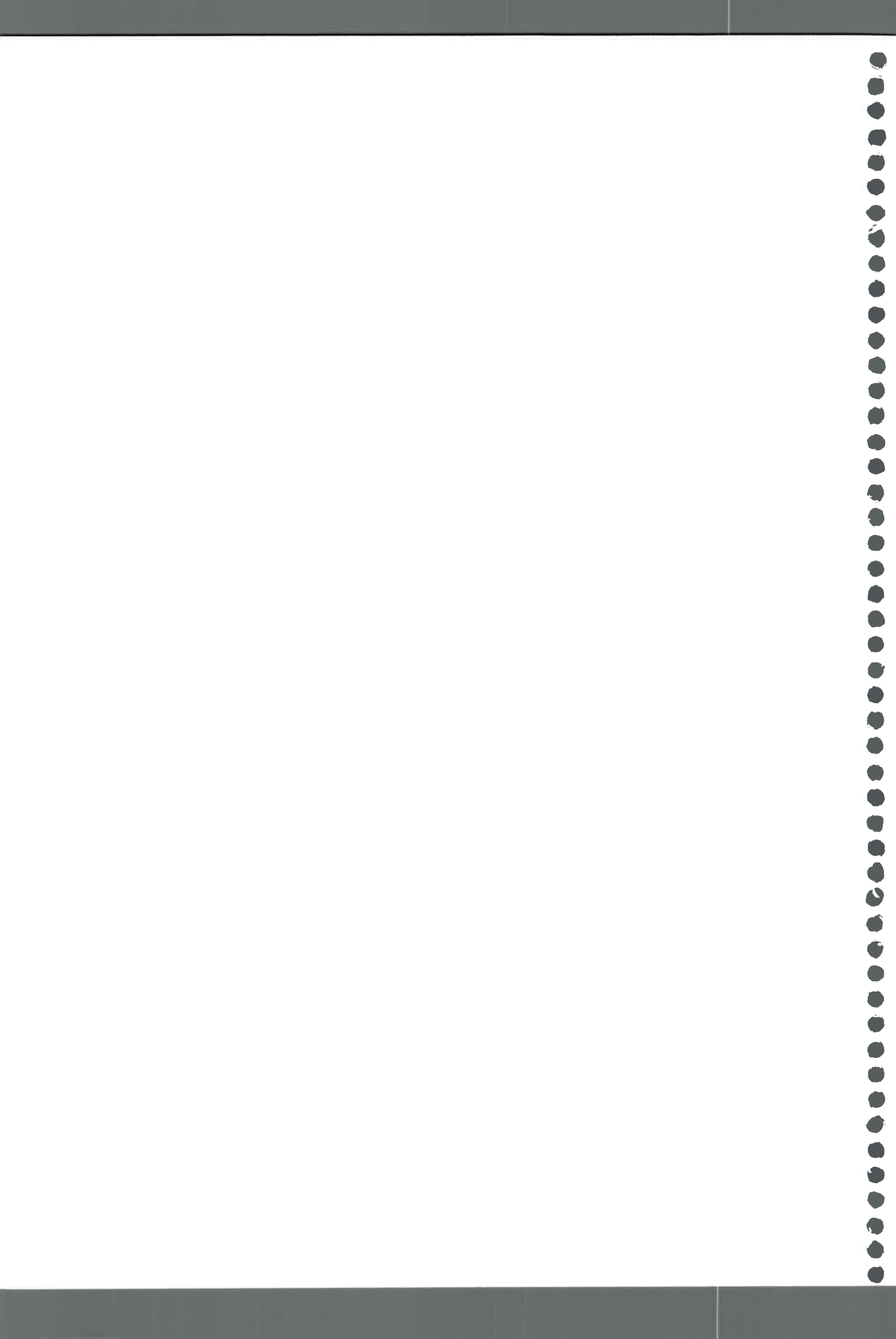
Figura V. 23: Comportamiento de la relación de intensidad del exciplojo con respecto a la intensidad del monómero con la concentración de DMI en n-heptano.	114
Figura V. 24: Comportamiento de la relación de intensidad del exciplojo con respecto a la intensidad del monomero con la concentración de DMI en vesículas de POPC y DMPC.	115
Figura V. 25: Efecto de la temperatura en la dispersión de luz de vesículas de DMPC "vacías".	119
Figura V. 26: Efecto de la temperatura en la intensidad de fluorescencia de ANT en vesículas de DMPC.	120
Figura V. 27: Efecto de la temperatura en la intensidad de fluorescencia. A de ANT. B.del exciplojo ANT-DMI en vesículas de DMPC.	122





**ÍNDICE DE TABLAS.**

Tabla I. 1: Grupos sustituyentes y posiciones para los derivados de ANT.	2
Tabla I. 2: Grupos sustituyentes y posiciones para los derivados de IN.	3
Tabla IV. 1: Constantes bimoleculares de inhibición de fluorescencia en acetonitrilo.	45
Tabla IV. 2: Constantes bimoleculares de inhibición de fluorescencia en n-heptano.	48
Tabla IV. 3: Valores del máximo de emisión de los exciplejos en n-heptano.	52
Tabla IV. 4: Valores de constantes dieléctricas, de los momentos dipolares y del máximo de emisión del exciplejo ANT-DMI en los diferentes medios.	55
Tabla IV. 5: Rendimiento cuántico de la reacción de fotodecoloración de los distintos ANT por 3-MIN.	58
Tabla V. 1: Valores de tiempos de vida media de ANT codisuelto en las vesículas.	68
Tabla V. 2: Constantes bimoleculares de la velocidad de inhibición de fluorescencia de la inhibición de ANT por DMI y IN en vesículas unilaminares de POPC y DMPC.	70
Tabla V. 3: Constantes bimoleculares de la velocidad de inhibición de fluorescencia y fracción de ANT accesible a los inhibidores en vesículas unilaminares de POPC y DMPC.	73
Tabla V. 4: Constantes bimoleculares de la velocidad de inhibición de fluorescencia y fracción de ANT accesible a los inhibidores para la inhibición de ANT en vesículas multilaminares de POPC.	76
Tabla V. 5: Anchos de bandas medios para la emisión de DMI en diferentes medios.	87
Tabla V. 6: Valores de tiempos de vida media de DMI en	



diferentes medios.	87
Tabla V. 7: Constantes de partición para IN y DMI en vesículas unilaminares de POPC y DMPC.	95
Tabla V. 8: Posición de los máximos de emisión y anchos de bandas medios para DMI en vesículas unilaminares de POPC y DMPC.	98
Tabla V. 9: Posición de los máximos de emisión y anchos de bandas medios para IN en vesículas unilaminares de POPC y DMPC.	99
Tabla V. 10: Constantes bimoleculares corregidas de la velocidad de inhibición de fluorescencia de ANT por DMI e IN en vesículas de POPC y DMPC.	104
Tabla V. 11: Valores de constantes dieléctricas y de los momentos dipolares de los solventes y posición del máximo de emisión y emisiones relativas a la emisión en n-heptano del exciploje ANT-DMI.	110

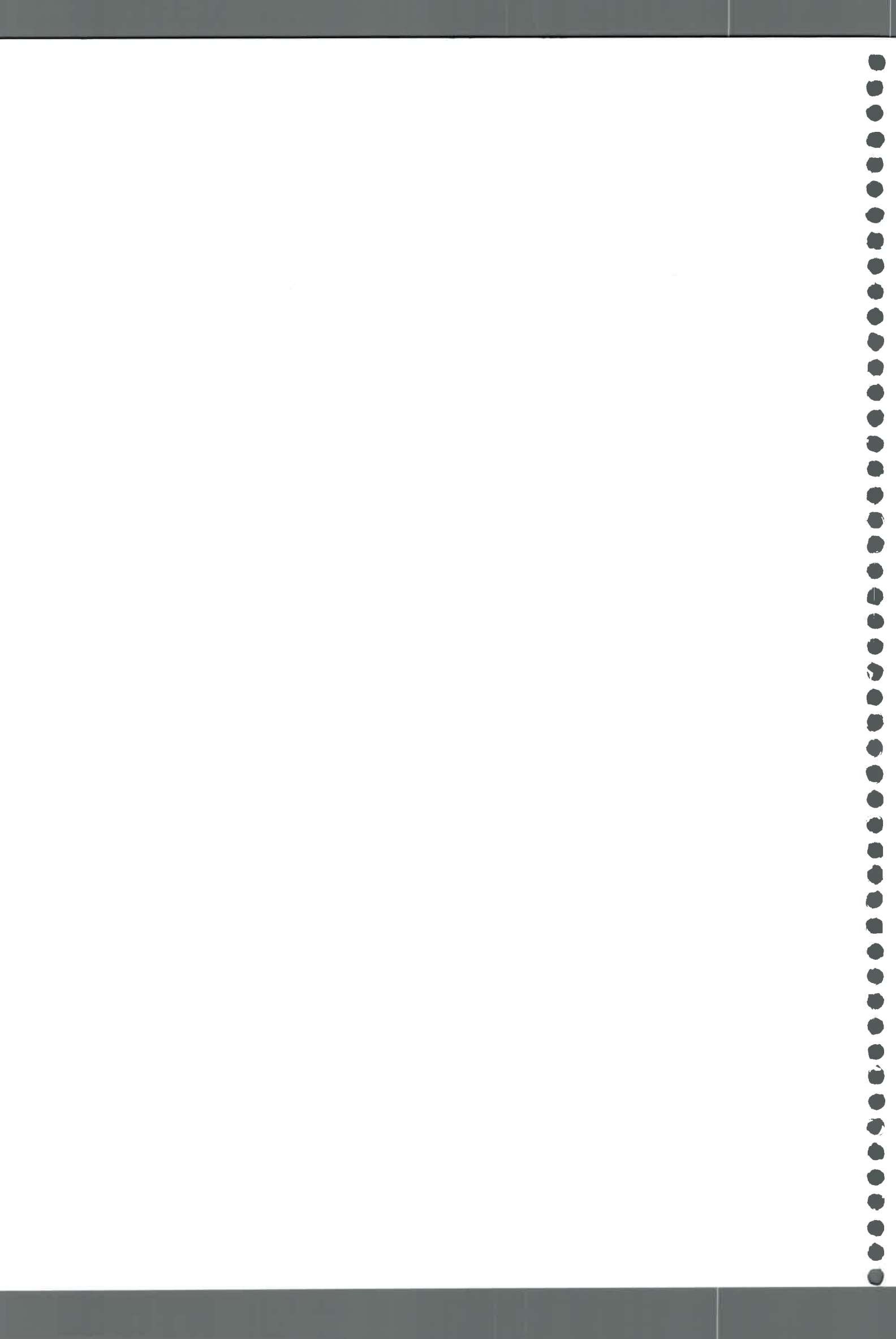
### ÍNDICE DE ESQUEMAS.

Esquema II. 1.	19
Esquema II. 2.	23
Esquema IV. 1.	60
Esquema V.1.	116



## GLOSARIO DE ABREVIATURAS.

1-MIN	1-metilindol
2-MIN	2-metilindol
3-MIN	3-metilindol
9,10-DCANT	9,10-dicianoantraceno
9,10-DMANT	9,10-dimetilantraceno
9-CANT	9-cianoantraceno
9-CANT-DMI	exciplo formado por el par 9-cianoantraceno-dimetilindol
9-MANT	9-metilantraceno
A	aceptor de electrones
ANT	antraceno
ANT-DMI	exciplo formado por el par antraceno-dimetilindol
D	dador de electrones
DMI	1,2-dimetilindol
DMPC	dimiristoilfosfatidilcolina
DOPC	dioleoilfosfatidilcolina
GUV	vesículas unilaminares gigantes
I	intensidad del fluoróforo en presencia del inhibidor
$I_0$	intensidad del fluoróforo en ausencia del inhibidor
$I_{exc}$	intensidad del exciplo
$I_{mon}$	intensidad del monómero
IAA	ácido 3-indolacético
$K$	constante de partición
$k_q$	constante bimolecular de la velocidad de inhibición de fluorescencia
$k_q^b$	constante bimolecular de la velocidad de inhibición de fluorescencia corregida
$k_{SV}$	constante de Stern-Volmer



LUV	vesículas unilaminares grandes
MLV	vesículas multilaminares
POPC	palmitoilfosfatidilcolina
SUV	vesículas unilaminares pequeñas
$\tau$	tiempo de vida media del fluoróforo en presencia del inhibidor
$\tau_0$	tiempo de vida media del fluoróforo en ausencia del inhibidor
$T_f$	temperatura de transición de fase
TRP	l-triptófano



## I. OBJETIVOS

Estudiar el comportamiento fotofísico y fotoquímico de estados excitados de antraceno con derivados indólicos en vesículas de palmitoilfosfatidilcolina (POPC) y dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) unilaminares y multilaminares.

Investigar en particular procesos de transferencia de electrones y la formación de excíplejos, de las moléculas sondas situadas en las distintas regiones de vesículas.

Analizar estas experiencias en sistemas organizados vesiculares, que semejan a las membranas celulares, permiten obtener información sobre la partición y movilidad de las moléculas pequeñas en las diferentes microfases; además de investigar propiedades tales como polaridad y viscosidad en los microentornos de las moléculas sondas y de los inhibidores de fluorescencia. Por otro lado, el estudio de reacciones que involucren a derivados indólicos en las vesículas incluyendo al aminoácido l-triptófano es de particular relevancia debido a su acción y propiedades en sistemas biológicos.

Los fosfolípidos usados para preparar las vesículas fueron: palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC) y dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC). En la Figura I. 1 y en la Figura I. 2 se muestran sus estructuras moleculares.

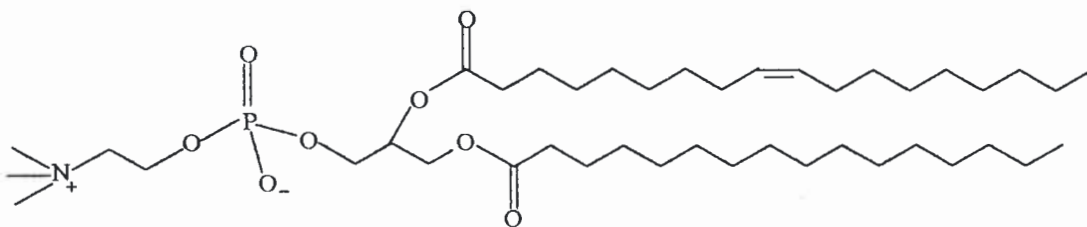


Figura I. 1: Estructura molecular de POPC.

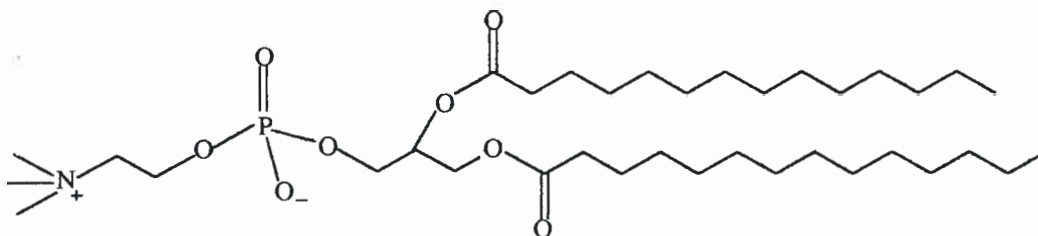


Figura I. 2: Estructura molecular de DMPC.

Los hidrocarburos aromáticos usados como fluoróforos fueron: antraceno (ANT), 9-metilantraceno (9-MANT), 9,10-dimetilantraceno (9,10-DMANT), 9-cianoantraceno (9-CANT) y 9,10-dicianoantraceno (9,10-DCANT). En la Figura siguiente se muestra la estructura y las posiciones 9 y 10 de ANT. Además, en la Tabla I. 1 se indican los grupos sustituyentes y sus posiciones para los derivados de ANT usados en la tesis.

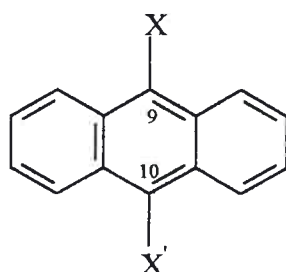


Figura I. 3: Estructura molecular y posiciones 9 y 10 de ANT.

Tabla I. 1: Grupos sustituyentes y posiciones para los derivados de ANT.

Compuesto	X	X'
9-MANT	CH <sub>3</sub>	H
9,10-DMANT	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
9-CANT	CN	H
9,10-DCANT	CN	CN

Los inhibidores de fluorescencia usados fueron: indol (IN), 1,2-dimetilindol (DMI), 1-metilindol (1-MIN), 2-metilindol (2-MIN), 3-metilindol (3-MIN), ácido 3-indolacético (IAA), y el aminoácido l-triptófano (TRP). En la Figura I. 4 se muestra la estructura y las posiciones 1, 2 y 3 de IN. En la Tabla I. 2 se indican los grupos sustituyentes y sus posiciones para los derivados de IN usados.

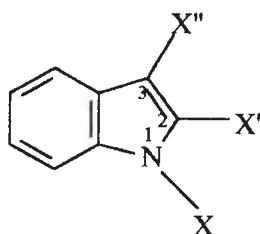


Figura I. 4: Estructura molecular y posiciones 1, 2 y 3 de IN.

Tabla I. 2: Grupos sustituyentes y posiciones para los derivados de IN.

Compuesto	X	X'	X''
DMI	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
1-MIN	CH <sub>3</sub>	H	H
2-MIN	H	CH <sub>3</sub>	H
3-MIN	H	H	CH <sub>3</sub>
IAA	H	H	CH <sub>2</sub> COOH
TRP	H	H	CH <sub>2</sub> CH(NH <sub>2</sub> )COOH

Para poder comprender los procesos de inhibición de ANT por los compuestos indólicos en vesículas es necesario por un lado, tener una cabal comprensión de cómo suceden estos procesos en medios homogéneos y por otro lado, conocer la distribución de las distintas moléculas en estos sistemas organizados. Debido a lo anterior surge la distribución de lo escrito en esta tesis. En la introducción se hace una breve reseña sobre las estructuras organizadas de las vesículas, posteriormente se presentan descripciones concisas sobre el uso de las técnicas fotofísicas y fotoquímicas en estos medios organizados y sobre la teoría general de reacciones de transferencia de electrones fotoinducidas. A continuación, se desarrolla la parte experimental y los resultados. Con respecto a éstos se los presenta y discute en dos capítulos. En el primero se muestra lo encontrado al estudiar la inhibición de fluorescencia de ANT y sus derivados por compuestos indólicos en solventes homogéneos de distinta polaridad. En el capítulo siguiente se describen los resultados obtenidos en los liposomas unilaminares y multilaminares. Por último se muestran las conclusiones.

## II. INTRODUCCIÓN

### II-1-1-Sistemas organizados. Vesículas.

Los sistemas organizados existen debido a las interacciones entre las moléculas que se encuentran dispersas en un determinado medio. Estos sistemas dan origen a la química supramolecular. Se puede hacer una analogía entre la química molecular, la cual está basada en los enlaces covalentes, con la química supramolecular que se fundamenta en las interacciones intermoleculares.

Los sistemas organizados microheterogéneos son heterogéneos a nivel microscópico. Éstos presentan microfases o dominios hidrofóbicos e hidrofílicos separados por interfases con cargas netas o *zwitteriónicas* (los que poseen igual número de cargas positivas que de cargas negativas). En la mayoría de estos sistemas hay un tipo de auto-organización y orden que depende principalmente de la forma de las moléculas anfílicas que los componen. En éstos es posible concentrar reactivos, productos y catalizadores de reacciones químicas en los distintos dominios y en las regiones interfaciales. La naturaleza y las propiedades de estos sistemas fueron estudiados con creciente interés durante los últimos años [1 - 4].

Las vesículas son un tipo de sistema organizado. Éstas son estructuras formadas por bicapas curvadas que atrapan parte del solvente en el que se encuentran dispersas libremente. Cuando las moléculas anfílicas que componen estas estructuras son fosfolípidos naturales las vesículas también reciben el nombre de liposomas, en estos casos el solvente usado es habitualmente agua. En esta tesis se usarán los términos vesícula y liposoma indistintamente. En la Figura II. 1 se muestra la estructura de una vesícula unilaminar. Se observa que se pueden distinguir tres regiones en estos arreglos moleculares:

- i- a región central de la bicapa, formada por las cadenas lipídicas hidrocarbonadas
- ii- as regiones interfaciales, formadas por los grupos polares lipídicos y por moléculas de agua
- iii- dos regiones acuosas, una interna y la otra externa a las vesículas.

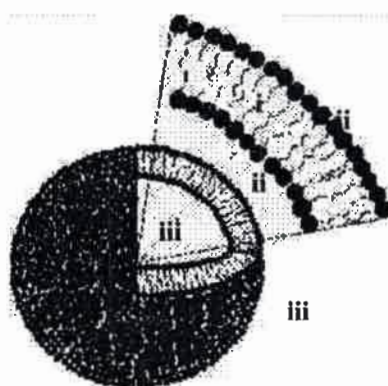


Figura II. 1: Estructura de una vesícula unilaminar. i- región central de la bicapa; ii- regiones interfaciales, iii- regiones acuosas.

Las vesículas pueden estar formadas por varias bicapas concéntricas o por una única bicapa. Las primeras son llamadas vesículas multilaminares mientras que las últimas unilaminares.

Las vesículas lipídicas de mayor interés para su estudio son las unilaminares debido a que representan un modelo sencillo de membranas biológicas por la similitud estructural. Las bicapas son las estructuras biológicas básicas de las membranas celulares. La función clave de éstas es actuar como barrera que separa la célula del exterior y además recubre sus organelas internas. Además, en las bicapas se ubican proteínas que las atraviesan (transmembranales). También es importante considerar que las semejanzas entre las vesículas y las membranas naturales pueden ser incrementadas por medio de modificaciones químicas de los lípidos que las componen.

Cabe acotar que las vesículas pueden ser preparadas a partir de varios tipos de moléculas anfifílicas que no están presentes en la naturaleza. En este trabajo se considerarán solamente las vesículas formadas por fosfolípidos naturales, pero debido al requisito de pureza de éstos para realizar estudios sistemáticos, se utilizarán fosfolípidos naturales pero de origen sintético.

### II-1-2-Aplicaciones de las vesículas.

Pretender resumir todas las posibles aplicaciones de los distintos tipos de vesículas es una difícil tarea. En la siguiente descripción se considerarán solamente los liposomas, o sea las vesículas preparadas por fosfolípidos.

Previo a considerar algunas aplicaciones concretas, se puede decir a modo general que la alta utilidad de estos sistemas es debida principalmente a la capacidad que poseen de encapsular compuestos simples y complejos en los diferentes sitios que presentan. En consecuencia, por un lado, es lógico esperar que los liposomas posean un amplio espectro de aplicaciones y por el otro, que se realicen investigaciones en temas que los involucre. A continuación se describirán algunos de sus usos. Éstos están separados en diferentes áreas, pero a lo largo de la lectura se hará evidente como se relacionan entre sí.

i - Aplicaciones en química: [4, 5]

En esta área los liposomas pueden ser usados por un lado, como modelos en estudios que tienen como objetivos entender y aumentar los conocimientos existentes sobre los fenómenos naturales que ocurren en membranas. Por otro lado, actualmente se están realizando muchos estudios con una aplicación más práctica de los sistemas de membranas. En estas últimas investigaciones el objetivo es lograr, de modo artificial, que la función de los liposomas sea semejante a la de las biomembranas. El objetivo más ambicioso es lograr realizar reacciones similares a la fotosíntesis natural en donde la energía solar se convierte en energía química potencial. Este tipo de reacciones sucede a través de fotosensibilizadores [6] que incorporados en membranas pueden “convertir” fotones en electrones mientras que otras moléculas se transforman, por medio de interacciones moleculares específicas, en señales eléctricas. Para lograr lo anterior se realizan, por ejemplo, estudios sobre el diseño y la síntesis de estructuras complejas que mimetizan las antenas fotosintéticas y se las incorpora en membranas de liposomas [7].

También se están realizando investigaciones sobre el comportamiento de sistemas redox asimétricos en liposomas para aplicarlos tanto en la fotoconversión solar como en el diseño de sistemas de electrónica molecular que pueden ser aplicadas como cables, interruptores eléctricos, transistores o unidades de memoria; en los últimos casos es necesaria la condición de reversibilidad de las reacciones químicas involucradas [8].

ii - Aplicaciones en farmacología y medicina: [3, 4, 9]

Al utilizar una determinada droga en un organismo viviente se origina una situación de compromiso entre su eficacia y los efectos tóxicos que puede producir no solamente su presencia sino también, entre otras cosas, su modo de transporte. Los liposomas constituyen un muy buen sistema de transporte de medicamentos debido a que la biodegradación no genera productos tóxicos, ya que están constituidos por fosfolípidos naturales. Por otro lado, presentan una buena solubilización y además el proceso de preparación y encapsulamiento de las drogas es relativamente fácil. Las principales desventajas que presentaban su uso tales como la estabilidad, el proceso de esterilización y la dificultad de producirlos a gran escala están siendo superadas en la actualidad. Debido a lo anterior, los liposomas son uno de los sistemas de transporte de drogas más estudiados y usados. Sus usos abarcan, entre otros:

- tratamientos de enfermedades infecciosas de origen bacteriano, virósico y fúngico
- transporte de microorganismos muertos o atenuados en vacunas
- transporte de drogas a sitios específicos
- tratamientos en radioterapias y fototerapias contra el cáncer
- transporte de biomoléculas en estudios de ingeniería genética
- formulaciones de cosméticos

No solamente las características anteriores y sus usos hacen que los liposomas sean eficaces transportadores de drogas, sino también que presenten un amplio rango en su forma de administración. Esto es posible debido a que las formulaciones con liposomas son estables en distintos estados físicos como soluciones y dispersiones líquidas, aerosoles, cremas semi sólidas, lociones, geles viscosos, etc.

### iii - Otras aplicaciones: [4]

Debido a la capacidad de encapsulamiento de moléculas que presentan los liposomas y por ser inocuos, se los usa también en la industria alimenticia, por ejemplo en la preparación de quesos, encapsulando enzimas que aceleran la fermentación.

También se los utiliza en la agricultura en la preparación de agroquímicos para mejorar y prolongar su acción. El hecho de que los anteriores se encuentren encapsulados (en vez de libres) hace que más difícil sus lavados de las hojas de las plantas y en consecuencia reduce la cantidad de aplicación de dichos productos.

II-1-3-Constituyentes químicos de las vesículas. Fosfatidilcolinas.

Los fosfolípidos [9] son moléculas que contienen un alcohol polifuncional esterificado con ácidos grasos y con un residuo de ácido fosfórico que puede estar o no esterificado. De acuerdo con el alcohol que posean, se los subdivide en glicerofosfolípidos (cuando el alcohol es glicerol) y en esfingofosfolípidos (cuando el alcohol es esfingosina).

Los glicerofosfolípidos son los fosfolípidos más abundantes y son los principales constituyentes estructurales de las membranas biológicas [9].

En la familia de los glicerofosfolípidos, las fosfatidilcolinas [10] son los fosfolípidos más comunes. Estas moléculas anfífilas están formadas por el esqueleto del glicerol que actúa como eslabón para vincular tres grupos funcionales. En la Figura II. 2 se muestra la estructura molecular general de las fosfatidilcolinas y se indican los átomos de carbono del glicerol.

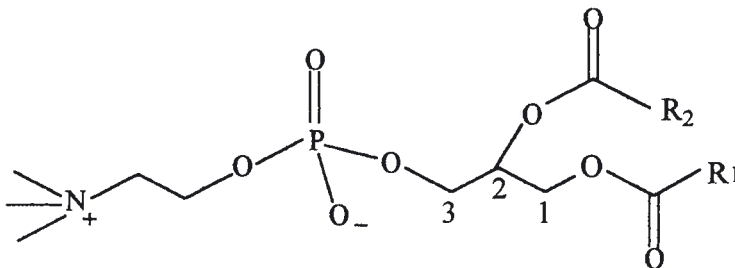


Figura II. 2: Estructura molecular general de fosfatidilcolinas. Se encuentran indicados los átomos de carbono del glicerol.

Los átomos de carbono 1 y 2 del glicerol están esterificados con una cadena hidrofóbica de ácido graso iguales o distintas ( $R_1$  y  $R_2$ ) y en el carbono 3 se encuentra esterificado el ácido fosfórico el cual a su vez también se encuentra esterificado con el grupo colina. El grupo unido al carbono 3 del glicerol es el que le da características hidrofílicas a la molécula. Estas moléculas son *zwitteriónicas* (iones dipolares) al pH fisiológico debido a que el amonio cuaternario de la colina no es ni ácido ni básico y además se encuentra presente la carga negativa proveniente del ácido fosfórico.

Las moléculas de fosfatidilcolinas pueden ser obtenidas a partir de fuentes naturales y por medio de procesos sintéticos. Las de origen natural son extraídas principalmente de la yema del huevo y de la semilla de soja y se las conoce



habitualmente como lecitinas. Las lecitinas son en realidad una mezcla de fosfatidilcolinas formadas por distintos ácidos grasos con diferentes grados de insaturación. En consecuencia se trabaja con fosfatidilcolinas de origen sintético para mantener la pureza de una determinada molécula anfifílica.

Los ácidos grasos de fuentes naturales poseen casi exclusivamente números pares de átomos de carbonos debido a que en la biosíntesis las cadenas se construyen cada dos unidades de átomos de carbono. Además, en este proceso la primera insaturación de éstos ocurre a partir del carbono 9 y es de forma *cis*. Puede haber posteriores insaturaciones tales que estén separadas por un grupo metileno y siempre en la forma *cis*. En la mayoría de los fosfolípidos naturales las cadenas de los ácidos grasos esterificados son diferentes, siendo a menudo el ácido graso esterificado en el carbono 1 del glicerol saturado mientras que el que se encuentra en el carbono 2 es insaturado y generalmente es más largo.

Las fosfatidilcolinas son los fosfolípidos más usados para la preparación de liposomas debido a que su carga neta es cero en un amplio rango de pH y a que químicamente son inertes.

#### II-1-4-Estabilidad química de las fosfatidilcolinas.

Los pasos de degradación más comunes que sufren las fosfatidilcolinas son oxidación e hidrólisis [4]. En general, las cabezas polares son más estables que las colas hidrocarbonadas.

Las cadenas hidrocarbonadas, especialmete las insaturadas pueden sufrir oxidación debida a la presencia de oxígeno. Esta reacción es radicalaria. En la primera etapa es removido un átomo de hidrógeno, así el radical formado es atacado por la molécula de oxígeno y se forman peróxidos como productos intermediarios. Los productos finales son aldehídos, cetonas y ácidos.

La reacción de hidrólisis de los grupos ésteres libera a los ácidos grasos correspondientes. Esta reacción puede estar presente en muchos casos ya que es prácticamente imposible remover todas las moléculas de agua de las muestras de fosfatidilcolinas. Sin embargo esta reacción procede muy lentamente en muestras mantenidas a bajas temperaturas (-15 °C).

Las reacciones de degradación descritas previamente afectan tanto a las moléculas de fosfatidilcolinas libres como a las que forman vesículas, por lo que también son alteradas la integridad y estabilidad química de las vesículas. En consecuencia, los fosfolípidos y las vesículas se deben conservar en condiciones de temperatura, pureza, recipiente y atmósfera apropiados.

#### II-1-5-Formación de las vesículas.

El carácter anfipático de las moléculas de fosfatidilcolina hace que no sean totalmente solubles en agua. En consecuencia dichas moléculas deben acomodarse en el agua de manera que tiendan a disminuir la energía libre del sistema.

La manera en que las moléculas anfipáticas se ubican en un medio acuoso, y la estructura organizada final que se obtiene, depende la forma de las moléculas y de su concentración. El parámetro empírico de empaquetamiento,  $P$ , [3, 4] predice la forma de los agregados en función de la geometría de las moléculas anfipáticas. Dicho parámetro está definido como:  $P = \frac{v}{al}$ , donde  $v$  es el volumen de la molécula,  $a$  es el área de la cabeza polar y  $l$  es la longitud de la(s) cadena(s) hidrocarbonada(s). Para moléculas anfipáticas de una sola cadena hidrocarbonada (como por ejemplo los detergentes) la cabeza polar es relativamente grande con respecto a la parte no polar siendo el valor de  $P$  próximo a 0,5. En estos casos se puede considerar que la forma de estas moléculas es un cono invertido. Estas moléculas forman micelas directas cuando son disueltas en un solvente acuoso. Por otro lado, las moléculas anfipáticas con dos cadenas hidrocarbonadas, como es el caso de las moléculas de fosfatidilcolinas, poseen un volumen molecular grande tal que el parámetro  $P$  es próximo a la unidad y presentan una forma molecular global cilíndrica. Estos compuestos forman, a bajas concentraciones, bicapas. Lo anterior es debido a que la doble cadena de ácidos grasos le da a la molécula una forma más apropiada para agregarse formando bicapas que micelas. En esta doble capa las regiones hidrofóbicas están protegidas del medio acuoso, mientras que las regiones hidrofílicas están en contacto con el agua. Los extremos de esta bicapa tienden a eliminar las interacciones desfavorables doblando la lámina formada sobre sí misma y de este modo obtener una vesícula cerrada.

Se puede resumir que al disolver la mayoría de las fosfatidilcolinas en un medio acuoso, forman espontáneamente estructuras que poseen varias bicapas lipídicas o membranas concéntricas de diferentes tamaños llamadas vesículas multilaminares. Posteriormente es necesario entregar energía al medio para obtener estructuras unilaminares de tamaño relativamente homogéneo. El método de preparación de vesículas unilaminares utilizadas en este trabajo se describirá con detalle en la Sección de la Parte Experimental.

#### II-1-6-Estructura física de las vesículas.

Las vesículas y los liposomas son caracterizados por su tamaño y forma [2, 3]. El rango del tamaño que pueden presentar es muy amplio. Las vesículas más pequeñas que se pueden obtener están determinadas por la máxima proximidad que pueden soportar las cabezas polares de las moléculas anfílicas y por el empaquetamiento que presentan, y por otro lado, por el aumento de la curvatura especialmente de la monocapa interna. Mientras que en el otro extremo, los liposomas más grandes son visibles bajo microscopio con un diámetro próximo a las dimensiones de las células vivientes. En las primeras, debido al pequeño diámetro que presentan, no se puede despreciar el espesor de la bicapa con respecto al diámetro. Estos liposomas presentan características diferentes al resto, como por ejemplo el comportamiento de fase de la membrana, la deformabilidad y la estabilidad. Algunas de estas características serán descritas posteriormente.

Estas estructuras pueden estar formadas, como ya se indicó, por una única bicapa (unilaminares) o por múltiple bicapas concéntricas (multilaminares). Debido a lo anterior y a que las vesículas de diferentes tamaños requieren distintos métodos de preparación es común encontrar en la literatura la siguiente forma de agruparlas:

- Vesículas multilaminares (M.L.V.). Usualmente consisten en una población de vesículas en un amplio rango de tamaño (100 - 1000 nm), generalmente formadas por cinco o más bicapas concéntricas.
- Vesículas unilaminares pequeñas (S.U.V.). Éstas son las que se encuentran en el límite de menor tamaño posible. Este límite varía con las condiciones del medio de fuerza iónica y con la composición del lípido de la molécula anfipática. Para las vesículas de

fosfatidilcolinas el tamaño está comprendido entre 20 a 50 nm. Estas poblaciones son altamente homogéneas en términos de tamaños. La distribución de los fosfolípidos en estas organizaciones es de 1/3 en la parte interna y 2/3 en la monocapa externa por razones geométricas.

- Vesículas unilaminares grandes (L.U.V.). El diámetro de éstas está comprendido entre 50 a 500 nm. La distribución de los fosfolípidos aquí es tal que la mitad de las moléculas se distribuyen en cada monocapa.

- Vesículas unilaminares gigantes (G.U.V.). El diámetro de éstas está comprendido entre 10 a 500  $\mu\text{m}$ .

Debido a que las vesículas pueden ser uni o multilaminares, el concepto del número de agregación de las moléculas anfílicas que las forman es posible determinarlo por medio de cálculos geométricos solamente para las vesículas unilaminares. Para conocer el número de agregación de las vesículas unilaminares grandes es necesario conocer la superficie de la vesícula y la de cada molécula anfílica que la forma.

#### II-1-7-Estabilidad de las vesículas.

Al análisis de la estabilidad de las vesículas hay que realizarlo en función de que su aplicación sea a corto o a largo plazo y además si se les ha agregado algún(os) soluto(s). En la Sección 1-4 de este capítulo se consideró la estabilidad desde el punto de vista químico teniendo en cuenta las distintas maneras de degradación de los fosfolípidos. Aquí se describirá como la estabilidad es afectada principalmente desde un enfoque físico.

El problema de la estabilidad física es algo más complicado que la química debido a que afecta la distribución de tamaño y la "laminaridad" de las vesículas, el grado de encapsulación y la asociación con otros liposomas. La forma más simple de evitar estos problemas es, cuando sea posible, preparar las vesículas y utilizarlas inmediatamente sin mantenerlas guardadas. En las situaciones en la que el uso no es inmediato o que es necesario que sean estables en el tiempo (como, por ejemplo, en las aplicaciones farmacéuticas), se ha encontrado [4] que mantenidas en solución y bajo las condiciones adecuadas son estables por años. Claramente, en estos casos se utilizan

solventes estériles, se optimiza la composición de las membranas y la fuerza iónica con el agregado de agentes antioxidantes y quelantes, se mantienen a pH adecuado y a bajas temperaturas. Por otro lado, los liposomas con cargas superficiales netas y en medios con fuerza iónica considerable también muestran alta estabilidad [2, 4]. Lo anterior es debido a que las moléculas de agua próximas a las cabezas polares se encuentran polarizadas y producen una interacción repulsiva cuando se aproximan entre sí las vesículas evitando que se produzca fusión de las membranas. En forma general, se puede decir que las vesículas pequeñas son las más inestables debido a que por la alta curvatura que presentan tienden a incorporar a la monocapa externa moléculas de distintas clases para disminuir la tensión.

#### II-1-8-Fases de la membrana. Temperatura de transición de fase.

Las bicapas lipídicas de las vesículas pueden presentar distintos estados físicos o fases [3, 4]. La presencia de las diferentes fases está sujeta a la concentración del fosfolípido y a la organización en la posición y orientación de las colas hidrocarbonadas de las moléculas de los lípidos y de sus cabezas polares. La transición de fase más importante que presentan las membranas de las vesículas es el cambio de fase gel a la líquido-cristalina. La temperatura a la que ocurre esta transición es llamada temperatura de transición de fase,  $T_f$ .

Cuando una vesícula se encuentra por debajo de su  $T_f$  y se la calienta, las cadenas hidrocarbonadas altamente empaquetadas en la fase gel adquieren energía térmica y comienzan a moverse de modo que cuando se llega a la  $T_f$  se produce la transición a la fase líquido-cristalina, tal que en este último estado el movimiento individual de las moléculas es mayor. Es necesario considerar como es la conformación de las cadenas hidrocarbonadas en cada fase debida a la rotación de los enlaces carbono-carbono (C-C). Para las cadenas saturadas, la conformación más estable es la *anti* [2, 3, 11]. Cuando todos los enlaces se encuentran en esta conformación las cadenas están totalmente extendidas. La otra conformación, de mayor energía debido a la proximidad de los grupos metilenos, que pueden adoptar los enlaces C-C es la forma oblicua la que le produce un quiebre a la cadena que tiende a expandir el volumen ocupado por ésta. En la Figura II. 3 se muestra la disposición que adoptan los diferentes conformeros de las

cadenas hidrocarbonadas en esquemas que representan fosfatidilcolinas totalmente saturadas.

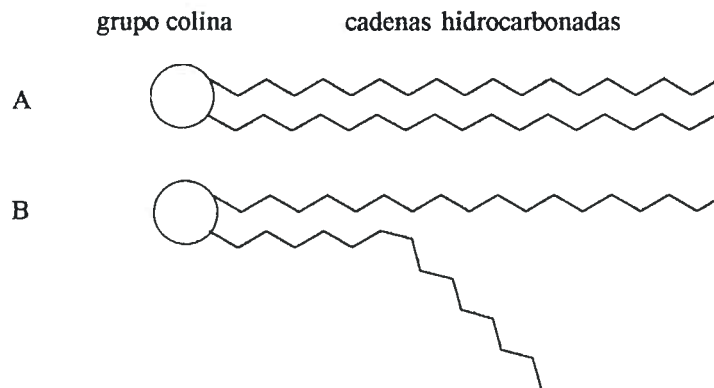


Figura II. 3: Disposición de las cadenas hidrocarbonadas fosfolípídicas. A: totalmente conformación *anti*. B: conformación oblicua entre carbonos 7-8 de la cadena inferior, el resto conformación *anti*.

Cuando las vesículas se encuentran en la fase gel las cadenas están mayormente en forma *anti*, mientras que cuando estos medios organizados están en la fase líquido-cristalina cada cadena presenta quiebres debido a la presencia de enlaces con la conformación oblicua. Por otro lado, cuando las cadenas son insaturadas del tipo *cis*, existe permanentemente un quiebre del tipo que provoca la conformación transitoria oblicua. En la Figura II. 4 se observa el ordenamiento que adopta la cadena hidrocarbonada con la instauración *cis*. Así, el doble enlace C-C produce un efecto similar que el de la conformación oblicua de aumentar el volumen ocupado por las cadenas y así disminuir las interacciones atractivas entre las cadenas hidrocarbonadas.

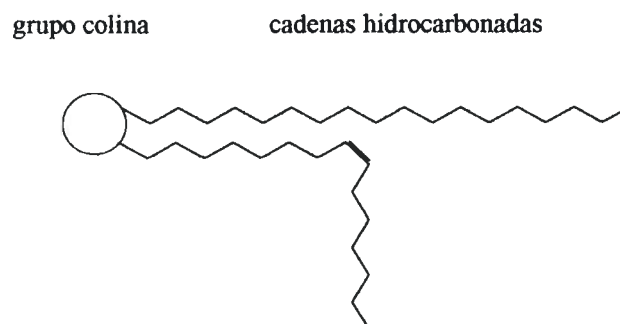


Figura II. 4: Disposición de la cadena hidrocarbonada fosfolípídica con instauración *cis*.



La temperatura en la que ocurre la transición de fase es propia de la naturaleza del fosfolípido que forma la vesícula. Debido a lo explicado previamente, el largo de las cadenas de los ácidos grasos y su insaturación del tipo *cis* influyen notablemente en la  $T_f$  de la vesícula formada. Esto es porque varía la magnitud de las interacciones atractivas de van der Waals [12] entre las cadenas hidrocarbonadas intra e intermoleculares. Claramente un aumento en el largo de las cadenas incrementa esta interacción. Mientras que la presencia de insaturaciones provocan un quiebre en las cadenas, lo que originan una disminución en las interacciones atractivas.

Generalmente las membranas biológicas celulares no presentan transición de fase. Sin embargo, ésta es una importante característica de las vesículas que permite tener un mayor manejo sobre sus propiedades de fluidez, permeabilidad, agregación e interacción con moléculas de interés biológico y proteínas.

#### II-1-9- Características químicas y estructurales de la región de las interfases de las bicapas lipídicas.

En contraste con el centro hidrofóbico de las bicapas, la región de la interfase presenta un ambiente químico complejo y heterogéneo. Para el caso de las vesículas preparadas con fosfatidilcolinas, la región de la interfase representa una alta proporción del espesor total de las bicapas. Para realizar cualquier tipo de estudio en bicapas es necesario considerar la complejidad de esta región [13 - 17].

White y Wimley [14, 18] estudiaron por medio de la técnica de difracción de rayos X y neutrones la estructura de la bicapas de vesículas unilaminares grandes en la fase líquida-cristalina de dioleoilfosfatidicolina (DOPC), fosfatidilcolina compuesta por dos cadenas iguales de 18 átomos de carbono con una insaturación *cis* entre los átomos de carbono 9 y 10. La precisión de las distancias que mide este tipo de experimento es muy alta y el error está comprendido entre 0,02 - 0,5 Å. Ellos determinaron la distribución promediada de los principales grupos estructurales del fosfolípido y de moléculas de agua a través de la bicapa. En la

Figura II. 5 se muestra el perfil del número de densidad de probabilidad de los grupos del fosfolípido y del agua en función de la distancia del centro hidrocarbonado de la bicapa.

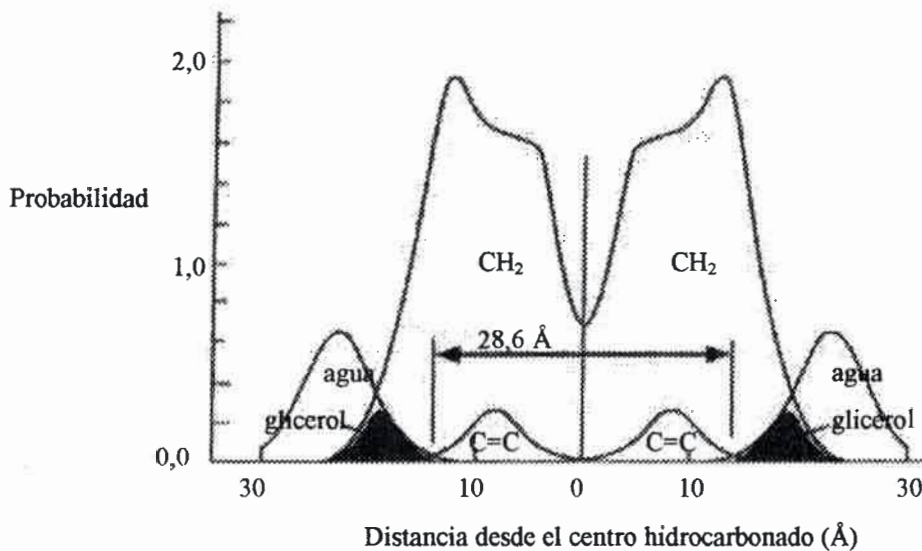


Figura II. 5: Perfil del número de densidad de probabilidad de los grupos del fosfolípido y del agua en función de la distancia del centro hidrocarbonado de la bicapa. Adaptado de referencia [18].

Las distribuciones obtenidas son gaussianas y corresponden a las densidades de probabilidad de las proyecciones promediadas en el tiempo de los movimientos tridimensionales de los grupos en un eje perpendicular al plano de la bicapa. Además, el área de cada gaussiana corresponde al número de grupos funcionales en el fosfolípido. La distribución total de los grupos metilenos es la suma de tres gaussianas y la distribución del agua corresponde al agua de hidratación de las cabezas polares. En primer lugar, estos autores encontraron que la estructura de la bicapa es totalmente simétrica significando que cada monocapa es la imagen especular de la otra. Por otro lado, los resultados indican que las bicapas pueden ser divididas en una región de corazón hidrocarbonada, indicada en la figura con la doble flecha, y en dos regiones que limitan a la primera denominadas como interfases. Esta división está realizada en función de la distribución de las moléculas de agua de hidratación. La región hidrocarbonada y las dos regiones interfaciales sumadas poseen similar ancho de alrededor 30 Å. Así, las interfases corresponden a la mitad del ancho total de la bicapa. Esto enfatiza el hecho de que las bicapas no deben ser consideradas simplemente como una región hidrocarbonada que separa dos fases acuosas. Por otro lado los resultados indican que las regiones que corresponden a los glicerol se superponen



completamente con las que corresponden al agua y con las colas de las regiones que corresponden a los grupos metilenos. También, estos autores encontraron que en el centro del corazón hidrocarbonado está presente una marcada disminución en el perfil de densidad que corresponde a los grupos metilenos, mostrando la finalización de una monocapa y el comienzo de la otra y además una superposición entre éstas. También es importante considerar que debido al movimiento térmico existe un pequeño, pero significativo, solapamiento entre las distribuciones de las moléculas de agua y las correspondientes a los dobles enlaces C-C.

Según estos resultados se puede concluir que la región más compleja de la bicapa es la zona de la interfase. En el análisis de la misma no sólo es importante considerar que ésta es químicamente heterogénea, sino también que es una región en la que existen fuertes cambios de polaridad en distancias muy pequeñas [15].

Los resultados encontrados por estos autores [14] pueden ser considerados como una guía para el análisis químico y estructural de las vesículas de fosfatidilcolinas usadas en este trabajo.

## II-2-Fotofísica y fotoquímica en vesículas.

Todos los procesos fotofísicos y fotoquímicos comienzan con la absorción de luz de una determinada especie. Si la especie de interés se encuentra en una dispersión de vesículas es posible por medio del uso de las técnicas fotofísicas y fotoquímicas realizar estudios sobre su ubicación y su comportamiento en estos medios organizados.

Las técnicas anteriores se basan en el uso de moléculas pruebas o sondas que al absorber la radiación visible o ultravioleta (UV) abandonan el estado fundamental, para ocupar estados electrónicamente excitados, y posteriormente siguen distintas vías de decaimiento. La intensidad de emisión de fluorescencia o tiempo de vida ( $\tau$ ) de estas sondas son sensibles al microambiente que las rodea o pueden ser modificados por el agregado de otra especie. Cuando la especie agregada produce una disminución en la intensidad de emisión o en el tiempo de vida se produce lo que se denomina inhibición de fluorescencia.

Las técnicas basadas en el uso del fenómeno de fluorescencia son empleadas en el estudio de la caracterización de los sistemas organizados microheterogéneos como

por ejemplo micelas directas [19 -21], micelas inversas [22 - 24] y vesículas [5, 25, 26]. Por medio de estas técnicas es posible investigar las propiedades estacionarias y dinámicas de los sistemas anteriores usando el conocimiento existente sobre el comportamiento de las moléculas sondas en diferentes microentornos.

Por otro lado, otra razón para investigar los procesos fotofísicos y fotoquímicos en vesículas, es la posibilidad de estudiar reacciones de estados excitados en microambientes novedosos y similares a las membranas biológicas.

Por último, para interpretar a los resultados de las experiencias realizadas en presencia de las vesículas o liposomas, es necesario poseer previamente un completo conocimiento sobre la distribución de las diferentes moléculas (sondas fluorescentes o inhibidores de fluorescencia) en los distintos sitios de solubilización que ofrecen estos sistemas organizados. También, es posible por medio de las técnicas fotoquímicas obtener los conocimientos antes mencionados.

Una de las vías reactivas que pueden seguir los estados excitados de las moléculas pruebas es la transferencia de electrones. Un aspecto complementario de las reacciones de transferencia de electrones es la formación de complejos de transferencia de carga en estados excitados (exciplejos) [27]. En la bibliografía se encuentran investigaciones sobre la formación de exciplejos en vesículas [28-30]. Es interesante estudiar a los exciplejos en estos medios organizados ya que por medio de sus comportamientos se pueden inferir propiedades del microentorno. Por ejemplo estas especies han sido empleadas con éxito para sensar los diferentes microambientes de micelas inversas [31, 32].

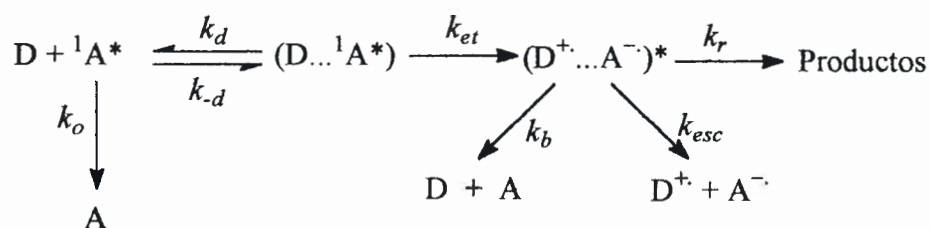
### II-3-1-Teoría general de reacciones de transferencia de electrones fotoinducidas.

En las reacciones bimoleculares de transferencia de electrones fotoinducidas en solución uno o ambos reactivos están en estados electrónicos excitados debido a la absorción de luz. Así, el dador (D) y/o el aceptor (A) de electrones están en estado electrónico excitado. El mecanismo de reacción que pueden seguir las reacciones de transferencia de electrón fotoinducidas depende, entre otros factores, de la polaridad del medio de reacción. Así, reacciones de estados excitados que en solventes de polaridad relativamente alta llevan a una desactivación por transferencia de electrones con

separación efectiva de cargas, en solventes de bajas polaridades muchas veces producen excíplejos caracterizados por una nueva banda fluorescente.

### II-3-2-Medios de polaridad relativamente alta.

El mecanismo de reacción que pueden seguir las reacciones de transferencia de electrón fotoinducidas en los medios polares se muestra en el Esquema II.1.



Esquema II.1

La especie excitada en el primer estado electrónico singlete  ${}^1\text{A}^*$  puede sufrir diferentes procesos. Parte de la población de  ${}^1\text{A}^*$  decae al estado fundamental con una constante de velocidad  $k_o$ . Por otro lado,  ${}^1\text{A}^*$  y D difunden, de manera reversible, para formar el complejo precursor  $(\text{D}\dots\text{A}^*)$ . Siendo el valor de la constante de velocidad para este proceso,  $k_d$ , el valor máximo límite controlado por la difusión en cada medio y por la temperatura. Posteriormente este complejo sufre un proceso de reorganización interna que permite que ocurra la transferencia de electrón que involucra además a la caja de solvente que lo rodea. La constante de velocidad para este proceso es  $k_{et}$ . De este modo se forma el complejo sucesor  $(\text{D}^+\dots\text{A}^-)^*$  en el que la transferencia del electrón tuvo lugar. A continuación esta especie puede seguir diferentes procesos. Por un lado, su formación puede ser una etapa reversible tal que se produzca la reducción de la molécula inicialmente dadora del electrón y la posterior separación de las especies iniciales D y A, la constante de velocidad de esta etapa está representada en el Esquema II.1 como  $k_b$ . Otra vía de escape que le puede suceder a este complejo sucesor es la separación de los iones radicales formados tal que se puedan considerar como especies libres, en el Esquema II.1 la constante de velocidad de esta vía es  $k_{esc}$ . Por último las especies que forman este complejo pueden reaccionar químicamente y así formar productos, la constante de velocidad de esta vía está representada en dicho Esquema

como  $k_r$ .

Si se realiza un análisis en condiciones de estado estacionario para el complejo precursor del Esquema II.1, se obtiene la expresión para la constante observada de la velocidad de la transferencia del electrón. Para este tipo de reacciones de transferencia de electrón fotoinducidas se denomina generalmente a la constante observada como constante de inhibición o desactivación de fluorescencia y se la representa como  $k_q$ .

$$\text{Ecuación II. 1} \quad k_q = \frac{k_d k_{et}}{k_{-d} + k_{et}}$$

La Ecuación II. 1 puede ser reordenada como sigue:

$$\text{Ecuación II. 2} \quad \frac{1}{k_q} = \frac{1}{k_d} + \frac{1}{K_D k_{et}}$$

Donde  $k_d$  es la constante de velocidad difusional y puede ser estimada con alto grado de confianza;  $K_D$  es la constante de equilibrio para la formación del complejo precursor igual a  $k_d / k_{-d}$ . Para especies neutras,  $K_D$  depende de la distancia entre el parador-aceptor ( $r_{DA}$ ) en el complejo precursor, donde éstos se suponen como esferas de radios  $r_D$  y  $r_A$ , siendo  $r_{DA} = r_D + r_A$ . Usualmente su valor está comprendido en el rango 0,5 - 0,8 M<sup>-1</sup> [33]. Por lo expresado se podría conocer el valor de  $k_{et}$  a partir de la Ecuación II. 2 usando el valor observado experimentalmente de  $k_q$  a partir de los gráficos de Stern-Volmer [34].

A partir de la teoría clásica de Marcus del estado de transición, la constante de velocidad de transferencia del electrón,  $k_{et}$ , puede ser escrita de la siguiente manera [35]:

$$\text{Ecuación II. 3} \quad k_{et} = \kappa \nu_\eta \exp(-\Delta G^\ddagger / RT)$$

donde:

$\kappa$  es el coeficiente de transmisión electrónico o factor electrónico (señala la probabilidad de ocurrencia de una reacción) y en el tratamiento clásico es considerado como unitario, lo que significa que la reacción es adiabática porque la interacción electrónica entre el reactivo y el estado de transición es relativamente alta.

$\nu_n$  es el factor de frecuencia de pasaje (movimiento nuclear) a través del estado de transición (D...A\*)<sup>#</sup>, usualmente su valor está comprendido entre  $10^{12}$  y  $10^{13}$  s<sup>-1</sup>.

R y T son la constante universal de los gases y la temperatura absoluta respectivamente.

$\Delta G^\#$  es el cambio de Energía Libre de Gibbs de activación para el proceso de la transferencia del electrón que de acuerdo a la teoría clásica de Marcus para la transferencia del electrón [35] y está dada por:

$$\text{Ecuación II. 4} \quad \Delta G^\# = \frac{\lambda}{4} \left[ 1 + \frac{\Delta G^0}{\lambda} \right]^2$$

donde  $\Delta G^0$  es el cambio total de la Energía Libre de Gibbs para el proceso de transferencia del electrón.

$\lambda$  es la energía de reorganización, y se define como el cambio de Energía de Gibbs necesario para provocar la distorsión de los reactivos hasta la configuración de equilibrio de los productos, pero sin que se produzca la transferencia electrónica. Esta energía de reorganización posee dos contribuciones:

$$\text{Ecuación II. 5} \quad \lambda = \lambda_{\text{int}} + \lambda_{\text{ext}}$$

El término de contribución de la reorganización interna  $\lambda_{\text{int}}$  surge de los cambios estructurales entre las configuraciones en el equilibrio de los reactivos y productos. El otro término de contribución externa  $\lambda_{\text{ext}}$ , es también llamado energía de reorganización del solvente dado, que surge por las diferencias entre la orientación y polarización de las moléculas del solvente.  $\lambda_{\text{ext}}$  es el de mayor peso en la energía de reorganización total para una reacción de transferencia de electrón entre moléculas orgánicas rígidas. Si el solvente es tratado como un dieléctrico continuo y además si se suponen formas esféricas para los reactivos  $\lambda_{\text{ext}}$  puede ser evaluado de la siguiente manera [35]:

$$\text{Ecuación II. 6} \quad \lambda_{\text{ext}} = e^2 \left( \frac{1}{2r_D} + \frac{1}{2r_A} - \frac{1}{r_{DA}} \right) \left[ \frac{1}{\epsilon_{op}} - \frac{1}{\epsilon_s} \right]$$

donde  $\epsilon_{op}$  y  $\epsilon_s$  son las constantes dieléctrica óptica y estática del medio respectivamente y  $r_{DA}$  es la suma de los radios moleculares de los reactantes.

Según Rehm y Weller [36]  $\Delta G^0$  puede ser calculado a partir de parámetros energéticos obtenidos experimentalmente según la siguiente expresión:

$$\text{Ecuación II. 7} \quad \Delta G^0 = E_{(D/D^*)} + E_{(A/A^-)} - E_0^0 + \frac{Z_D Z_A}{\epsilon_s r_{DA}}$$

donde:

$E_{(D/D^*)}$  y  $E_{(A/A^-)}$  representan los potenciales de oxidación del dador y de reducción del aceptor respectivamente en sus estados fundamentales. La suma de estas cantidades es debida a que se consideran los valores absolutos de los potenciales para evitar confusiones originadas por las distintas convenciones sobre signos de los potenciales.

Los potenciales redox se definen como magnitudes termodinámicas reversibles. Los valores que se usan en la práctica obtenidos de diversos métodos tales como: potenciales medidos en fase gaseosa, potencial de pico ( $E_p$ ), potencial de medio pico ( $E_{p/2}$ ) y potencial de media onda ( $E_{1/2}$ ) medido por voltametría cíclica. Se sabe que [37] el potencial de media onda es una buena aproximación para el potencial estandar. La aproximación anterior no es posible utilizarla para todos los compuestos ya que para un número importante de moléculas orgánicas la condición de reversibilidad no se alcanza al realizar las medidas. La imposibilidad de realizar la medida reversible del potencial de media onda es debido a las reacciones de descomposición que sufren algunos compuestos posteriormente al intercambio electrónico sobre la superficie del electrodo. Cuando se presenta este inconveniente, solamente es posible de determinar el potencial pico y el potencial de medio pico. Por otro lado en los casos que se pueden medir tanto el potencial de media onda y el potencial de medio pico se observa que éstos son muy similares [37]. Además, los valores de los datos anteriores dependen de las condiciones experimentales en que se miden, en consecuencia es común encontrar en la literatura reportados datos de potenciales diferentes para un mismo compuesto.

$E_0^0$  es la energía del estado electrónico excitado de la especie que absorbe la luz. Si la multiplicidad del estado excitado es singlete  $E_0^0$  se obtiene a partir de la posición

espectral de la banda de menor energía del espectro de excitación y/o banda de mayor energía del espectro de fluorescencia.

$\frac{Z_D Z_A}{\epsilon_s r_{DA}}$  representa a la energía Coulombica involucrada para formar un par

iónico de cargas  $Z_D$  y  $Z_A$  en un medio con constante dieléctrica estática  $\epsilon$  a la distancia  $r_{DA}$  al acercar a D y A desde el infinito hasta la distancia adecuada para la transferencia del electrón.

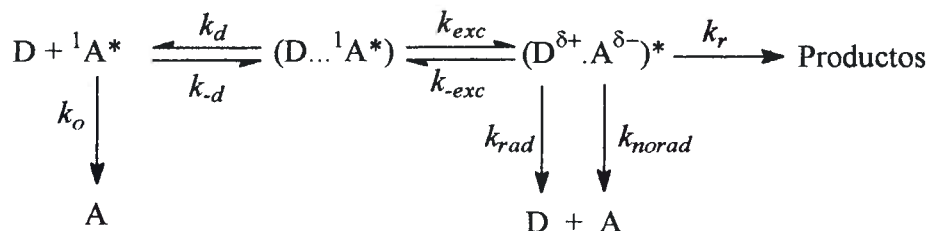
Al reemplazar a  $\Delta G^\ddagger$  en la Ecuación II. 3 se obtiene:

Ecuación II. 8 
$$k_{et} = \kappa v_n \exp\left(-\frac{\lambda}{4RT} \left[1 + \frac{\Delta G^0}{\lambda}\right]^2\right)$$

El desarrollo teórico previo es de gran utilidad ya que se puede usar la ecuación clásica de Marcus, Ecuación II. 3, para calcular el valor de  $k_{et}$  y así poder determinar teóricamente la constante de velocidad observada  $k_q$ . Posteriormente se ajustan los resultados experimentales de  $k_q$  con los obtenidos teóricamente. Si se obtiene un buen ajuste implica que se verifica que el mecanismo propuesto, de transferencia del electrón, es muy probable que sea el que sigue la reacción fotoinducida.

II-3-3-1-Medios no polares y de polaridad relativamente baja.

En el Esquema II.2 se muestra el comportamiento que presenta una especie excitada en el primer estado electrónico singlete y un inhibidor en medios de polaridad relativamente baja. En este Esquema se muestra la formación y desactivación del exciplexo.



Esquema II.2

Del mismo modo que en los medios polares la especie excitada,  $^1A^*$ , puede seguir diferentes procesos. Parte de su población decae al estado fundamental con una constante de velocidad  $k_o$ . Por otro lado, las especies D y  $^1A^*$  difunden reversiblemente y se encuentran formando el complejo precursor o de encuentro. Los pasos anteriores de difusión están representados por medio de las constantes de velocidad  $k_d$  y  $k_{-d}$ . Este complejo forma, reversiblemente, al exciplexo representado como  $(D^{\delta+} \cdot A^{\delta-})^*$ . Las constantes de velocidad de estos pasos están representadas con  $k_{exc}$  y  $k_{-exc}$ . El exciplexo puede seguir diferentes vías de desactivación como se observa en el Esquema II.2. Por un lado puede sufrir una reacción química y formar productos, donde la constante de velocidad de esta etapa está representada por  $k_r$ . Por otro lado se puede producir la desactivación en forma radiativa y observar su emisión y liberar a las especies D y A en sus estados electrónicos fundamentales. Por último, el otro modo de desactivación es no radiativo y se produce entregando energía al medio obteniéndose también las especies D y A en sus estados electrónicos fundamentales. Las constantes de velocidad de los pasos anteriores están simbolizadas en el Esquema II.2 como  $k_{rad}$  y  $k_{norad}$  respectivamente.

#### II-3-3-2-Formación y comportamiento de exciplejos. Efecto de la polaridad del medio.

El término exciplexo surge de la contracción de la expresión complejo-excitado ya que está formado por la asociación de dos especies diferentes, una en su estado electrónico excitado y la otra en su estado electrónico fundamental. Estas especies pueden pertenecer a una misma molécula (exciplejos intramoleculares) o a dos moléculas diferentes (exciplejos intermoleculares).

La observación experimental más directa de la presencia de un exciplexo es la comparación del espectro de emisión de la especie emisiva en el primer estado singlete ( $^1A^*$ ) sola y en con el agregado del inhibidor (D) [38, 39]. La adición de D al medio presenta dos efectos notables. Se observa que a medida que la fluorescencia de  $^1A^*$  es inhibida, aparece una nueva banda de fluorescencia sin estructura fina a menor energía con respecto a la emisión de  $^1A^*$ . Además se observa que la intensidad de emisión de la nueva banda depende de la cantidad presente de D en el medio. Por lo expresado previamente, se puede deducir que la nueva banda de fluorescencia es debida a la emisión de una especie excitada formada por  $^1A^*$  y D. Se sabe [38, 39, 40] que el estado



fundamental de los exciplejos es repulsivo, solamente el estado excitado presenta un mínimo definido en su curva de energía potencial. El hecho anterior provoca que la banda de emisión de este tipo de especies excitadas no presente estructura fina.

La formación del exciplejo implica que el complejo precursor, en el que las especies están separadas por moléculas del solvente alrededor de 7 Å o más y presentan orientaciones al azar entre sí, sufren un reordenamiento y se aproximan con una geometría específica. En los exciplejos formados por dos moléculas aromáticas, como sucede con el par D y A formado por derivados de indoles y antracenos usados en esta tesis, los planos de éstas se acercan en forma paralela hasta lograr una distancia mínima de alrededor de 3,5 Å, lo que corresponde a la distancia de contacto de van der Waals [27]. Este tipo de disposición geométrica habitualmente es llamada forma "sandwich" del exciplejo [27, 38]. En consecuencia, estas especies excitadas presentan generalmente una estequiometría definida de 1:1.

Se pueden estudiar algunas características de los exciplejos a partir del análisis de sus espectros de absorción por medio de técnicas de *laser flash* [41]. Estos espectros de absorción generalmente reflejan la presencia de diferentes transiciones. La originada por el par  $A^-$  y  $D^+$ , debida a la transferencia del electrón, y la transición causada por  $D^*A$  o  $DA^*$ , causada por la reversibilidad de la transferencia del electrón. Las absorciones observadas correspondientes a las diferentes especies proveen una evidencia directa que en el menor estado singlete excitado de los exciplejos hay presente, por un lado, una considerable interacción de transferencia de carga (que origina la absorción de  $A^-$  y  $D^+$ ) y por otro lado estados excitados localizados (observándose la absorción de  $D^*A$  o  $DA^*$ ) [38, 40].

Según los resultados anteriores los exciplejos son especies polares, de modo que la polaridad del solvente afectará al grado de la transferencia de carga que presenten. Este estado excitado, con transferencia de carga, se estabiliza con el aumento de la polaridad del medio tal que la velocidad de la disociación del exciplejo en las especies libres iónicas-radicalarias ( $D^+$  y  $A^-$ ) aumenta. En solventes de alta polaridad, como acetonitrilo y dimetilformamida, se encontraron por medio de estudios de *laser flash*, espectros de absorción de los iones-radicales libres para pares D y A que forman exciplejos en medios de menor polaridad [38, 42]. En consecuencia, el efecto de la

disminución en la emisión del exciplejo, en solventes de mediana y alta polaridad, es hasta el extremo en que ésta no es más detectable sino que produce directamente la formación de las especies libres  $D^+$  y  $A^-$ . Debido a lo anterior, a medida que aumenta la polaridad del medio se observa que la emisión del exciplejo se corre a menor energía debido a la estabilización de la transferencia de carga y además se encuentra una disminución en la emisión, causada por el aumento de la vía de desactivación no radiativa de la disociación en las especies libres iónicas-radicalarias.

Como esta especie excitada no existe en el estado fundamental, la evidencia directa de su formación es obtenida a partir de su desactivación radiativa. Por otro lado, los exciplejos pueden formarse y no necesariamente ser especies emisivas. En estos casos lo que sucede es que el exciplejo disipa su energía por medio de desactivaciones no radiativas, tal que la suma de las constantes de estas vías sea lo suficientemente alta para que su tiempo de vida sea corto y así no observar su emisión. En muchos casos, es necesario postular la existencia de exciplejos no emisivos para poder explicar los resultados experimentales [39, 43, 44].

II-4-Referencias:

- [1] J. H. Fendler, *Membrane mimetic chemistry*, Jhon Wiley, New York, 1982.
- [2] R. Gennis, *Biomembranes, molecular structures and functions*, Spinger, New York, 1989. Capítulo 2.
- [3] R.R.C. New, *Liposomes. A practical approach*, Oxford University Press Inc., New York, 1997.
- [4] D.D. Lasic, *Liposomes: from physics to applications*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1995.
- [5] J.R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Kluver Academic, New York. 2nd Ed., 1999. Capítulo 9.
- [6] G.J. Kavarnos, *Fundamentals of photoinduced electron transfer*, VCH Publishers, Inc, New York, 1993.
- [7] E. Mariño-Ochoa, R. Palacios, G. Kodis, A.N. Macpherson, T. Gillbro, D. Gust, T.A. Moore, A.L. Moore, *High-efficiency energy transfer from carotenoids to a phthalocyanine in an artificial photosynthetic antenna*, Photochem. Photobiol., 76, (2002), 116.
- [8] S.V. Lyman, R.F. Khairutdinov, V.A. Soldatenkova, J.K. Hurst, *N-alkylcyanopyridinium-mediated photoinduced charge separation across dihexadecyl phosphate vesicle membranes*, J. Phys. Chem. B 102, (1998), 2811.
- [9] R. K. Murray, *Bioquímica de Harper*, 22° Ed., El Manual Moderno, México, 1992. Capítulo 16.
- [10] H. Hauser, I. Pascher, R. H. Pearson, S. Sundell, *Preferred conformation and molecular packing of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine*, Biochim. Biophys. Acta, 650, (1981), 21.
- [11] R. Morrison, R. Boyd, *Química Orgánica*, 5° Ed. AWL, México, 1998.
- [12] C. Reichardt, *Solvents and solvent effects in organic Chemistry*, 2° Ed. VCH, Germany, 1990.
- [13] R.E. Jacobs, S. H. White, *The nature of the hydrophobic binding of small peptides at the bilayer interface: implications for the insertion of transbilayer helices*, Biochemistry 28, (1989), 3421.
- [14] M.C. Wiener, S.H. White, *Structure of a fluid dioleoylphosphatidylcholine bilayer*

determined by joint refinement of X-ray and neutron diffraction data. III. Complete structure, *Biophys. J.* 61, (1992), 434.

[15] S.H. White, W.C. Wimley, *Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces*, *Biochim. Biophys. Acta* 1376, (1998), 339.

[16] Wai-Ming Yau, W. C. Wimley, K. Gawrisch, S. H. White, *The preference of tryptophan for membrane interfaces*, *Biochemistry* 37, (1998), 14713.

[17] M.R.R. de Planque, J.A.W. Kruijtzter, R.M.J. Liskamp, D. Marsh, D.V. Greathouse, R.E. Koeppe II, B. de Kruijff, J.A. Killian, *Different membrane anchoring positions of tryptophan and lysine in synthetic transmembrane  $\alpha$ -helical peptides*, *The Biol. Chem.*, 274, (1999), 20839.

[18] D. F. Evans, H. Wennerström, *The colloidal domain. Where physics, chemistry, biology and technology meet*, VCH, United States, 1994. Capítulo 6.

[19] M.V. Encinas, E.A. Lissi, *Deactivation of pyrene fluorescence by indole in micellar solutions*, *Photochem. Photobiol.* 42, (1985), 491.

[20] M.V. Encinas, E.A. Lissi, *Quenching of pyrene fluorescence by tryptophan in micellar solutions*, *Photochem. Photobiol.* 44, (1986), 579.

[21] S.G. Bertolotti, M. del V. Bohorquez, J.J. Cosa, N.A. García, C.M. Previtali, *Micellar effect on the fluorescence quenching of indolic compounds by aminoacids*, *Photochem. Photobiol.* 46, (1987), 331.

[22] E.A. Lissi, M.V. Encinas, S.G. Bertolotti, J.J. Cosa, C.M. Previtali, *Fluorescence quenching of indolic compounds in reverse micelles of AOT*, *Photochem. and Photobiol.* 51, (1990), 53.

[23] M.S. Altamirano, C.D. Borsarelli, J.J. Cosa, C.M. Previtali, *Influence of polarity and viscosity of the micellar interface on the fluorescence quenching of pyrenic compounds by indole derivatives in AOT reverse micelles solutions*, *J. Colloid Interface Sci.* 79, (1998), 390.

[24] B. Sengupta, J. Guharay, P. K. Sengupta, *Luminiscence behaviour of 5-hydroxyindole in different environments*, *Spectrochim. Acta A* 56, (2000), 1213.

[25] K. Kalyanasundaram, *Photochemistry in microheterogeneous systems*, Academic Press, INC, New York, 1987. Capítulo 6.

[26] E. Abuin, E.A. Lissi, *Fluorescence quenching in the study of micellar and*

- vesicular systems*, Bol. Soc. Chil. Quím. 42, (1997), 113.
- [27] J.A. Baltrop, J.D. Coyle, *Principles of photochemistry*, J. Wiley & Sons, New York, 1978. Capítulo 4.
- [28] Y. Waka, N. Mataga and F. Tanaja, *Behavior of heteroexcimer systems in single bilayer liposomes* Photochem. Photobiol., 32, (1980), 335.
- [29] K. Kano, H. Kawazumi, T. Ogawa, *Fluorescence quenching of pyrene and pyrendecanoic acid by various kinds of N,N-dialkylanilines in dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes*, Chem. Phys. Letters, 74, (1980), 511.
- [30] N.L. Vekshin, *Exciplexes of pyrene with indole and diethylaniline in liposomes and biomembranes*, Anal. Chem. Acta, 227, (1989), 267.
- [31] C.D. Borsarelli, J.J. Cosa, C.M. Previtali, *Exciplex formation between pyrene derivatives and N,N'-dimethylaniline in aerosol-OT reversed micelles*, Langmuir 8, (1992), 1070.
- [32] C.D. Borsarelli, J.J. Cosa, C.M. Previtali, *The interface effect on the properties of exciplexes formed between pyrene derivatives and N,N'-dimethylaniline in reversed micelles*, Langmuir 9, (1993), 2895.
- [33] F. Meeus, M. Van der Auweraer and F.C. De Schryver, J. Am. Chem. Soc. 102 (1980) 4017.
- [34] J.R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Kluwer Academic, New York. 2nd Ed., 1999. Capítulo 8.
- [35] R.A. Marcus and N. Sutin, *Electron transfer in chemistry and biology*, Biochim. Biophys. Acta, 811 (1985) 265.
- [36] D. Rehm, A. Weller, *Kinetics of fluorescence quenching by electron and H-atom transfer*, Isr. J. Chem. 8, (1970), 259.
- [37] P. Jacques, D. Burget, X. Allonas, *On the quantitative appraisal of the free energy change  $\Delta G_{et}$  in photoinduced electron transfer*, New J. Chem., 20, (1996), 933.
- [38] E.L. Wehry, *Modern fluorescence spectroscopy*, Tomo 2, Plenum Press, New York, 1976. Capítulo 8.
- [39] J.B. Birks, *Photophysics of aromatic molecules*, Ed. Wiley/Interscience, London, 1976. Capítulos 7 y 9.
- [40] Z.R. Grabowski, *Electron transfer and the structural changes in the excited state*,

Pure & Appl. Chem. 64, (1992), 1249.

[41] J.A. Baltrop, J.D. Coyle, *Principles of photochemistry*, J. Wiley & Sons, New York, 1978. Capítulo 5.

[42] K.H. Grellmann, A.R. Watkins, A. Weller, *The electron transfer mechanisms of fluorescence quenching in polar solvents. Dicyanobenzene as quencher*, Phys. Chem., 76, (1972), 469.

[43] V.N. Grosso, C.A. Chesta, C.M. Previtali, *Evidence for nonemissive exciplexes in the singlet quenching of polycyclic aromatic hydrocarbons by polychlorobenzenes in cyclohexane*, Photochem. Photobiol. A, 118, (1998), 157.

[44] M.G. Kuzmin, *Exciplex mechanism of the fluorescence quenching in polar media*, Pure & Appl. Chem. 65, (1993), 1653.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### III-1-Materiales.

Los fosfolípidos usados para preparar las vesículas fueron: palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC) y dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), ambos de Avanti Polar Lipids. Estos fosfolípidos se mantuvieron guardados a bajas temperaturas (-15° C), disueltos en una mezcla cloroformo:metanol 2:1 en un recipiente de vidrio y en atmósfera de nitrógeno hasta como máximo seis meses. En la Figura I. 1 y en la Figura I. 2 se muestran sus estructuras moleculares.

Los hidrocarburos aromáticos usados como fluoróforos fueron: antraceno (ANT), 9-metilantraceno (9-MANT), 9,10-dimetilantraceno (9,10-DMANT), 9-cianoantraceno (9-CANT) y 9,10-dicianoantraceno (9,10-DCANT), todos Aldrich. Se usaron sin purificación adicional corroborando que sus propiedades fotofísicas coincidieran con las reportadas en literatura. En la Figura I. 3 se muestra la estructura molecular de ANT y sus posiciones 9 y 10.

Los inhibidores de fluorescencia usados fueron: indol (IN), 1,2-dimetilindol (DMI) y 3-metilindol (3-MI), todos Sigma y purificados por recristalización. 1-metilindol (1-MI), Aldrich, fue purificado por destilación fraccionada en atmósfera de nitrógeno. Ácido 3-indolacético (IAA), Aldrich, y el aminoácido 1-triptófano (TRP), Sigma, se usaron sin purificación adicional. En la Figura I. 4 se muestra la estructura molecular de IN y sus posiciones 1, 2 y 3.

Los solventes usados fueron: cloroformo, metanol, etanol, n-heptano, ciclohexano, acetato de etilo, acetona y acetonitrilo, todos Sintorgan de grado HPLC.

Se trabajó con soluciones frescas de buffer acuoso a pH=7,4, 0,01 M de fosfato preparado con fosfato diácido de potasio, CarloErba, e hidróxido de sodio, Ciccarelli, y 0,15 M cloruro de sodio, Ciccarelli. Todas las soluciones acuosas fueron preparadas con agua ultrapura obtenida por ósmosis inversa por medio de un equipo LABCONCO modelo 90901-01.

### III-2-Medios homogéneos. Preparación de soluciones.

Se prepararon soluciones *stock* de ANT y sus derivados en los diferentes solventes del orden de 10 mM.

Para realizar las medidas de inhibición de fluorescencia se diluyó a las soluciones *stock* tal que las concentraciones de los fluoróforos fuesen próximas a  $5 \times 10^{-5}$  M de modo que las absorbancias máximas no superaran a 0,2. A las soluciones previas se las fraccionó en dos. Una fracción fue usada para disolver al inhibidor. Posteriormente la solución del inhibidor fue agregada, en porciones de volúmenes conocidos, a 2,0 ml de la otra fracción. Al trabajar de este modo no se varía la concentración del fluoróforo a medida de que se agrega el inhibidor. Se trabajó con soluciones frescas de los inhibidores. Las concentraciones de estas soluciones variaron dependiendo de las eficiencias de inhibición de los compuestos indólicos frente a cada fluoróforo. El rango de concentración usado fue entre 0,1 mM a 0,1 M.

### III-3- Medios organizados. Preparación de vesículas.

Las moléculas anfifílicas no son totalmente solubles en agua por lo que no forman soluciones sino dispersiones coloidales. Cuando se agregan al agua anfífilos con forma cilíndrica, como es el caso de las fosfatidilcolinas POPC y DMPC, y en bajas concentraciones forman espontáneamente estructuras que poseen varias bicapas lipídicas o membranas concéntricas que corresponden a las vesículas multilaminares [1, 2]. El rango de tamaño de estas estructuras es amplio y pueden llegar a medir varios  $\mu\text{m}$  de diámetro, mientras el espesor de las membranas es relativamente homogéneo de alrededor de 4 nm [1].

Para realizar estudios sistemáticos que involucren, por ejemplo, la distribución de solutos en las vesículas, es conveniente utilizar en las experiencias una población de vesículas unilaminares y de tamaño homogéneo.

Las vesículas deben ser preparadas a una temperatura mayor a su temperatura de transición de fase,  $T_f$ , del estado gel al líquido-cristalino del fosfolípido [1] por lo que es necesario controlar la temperatura de la dispersión coloidal. La  $T_f$  de las vesículas preparadas con POPC es de  $-2$  °C [3] y la correspondiente a las vesículas de DMPC es



de 24 °C [4]. Debido a lo anterior, para la preparación de las vesículas de DMPC se termostatóizó alrededor de 40 °C.

En todas las dispersiones de vesículas se trabajó con buffer acuoso a pH 7,4 y con una fuerza iónica dada por cloruro de sodio 0,15 M. El hecho de usar un medio con alta fuerza iónica es para minimizar las interacciones intervesículas.

### III-3-1-Método de extrusión.

La extrusión de soluciones de fosfolípidos en agua es un modo de convertir preparaciones de vesículas multilaminares de tamaños heterógeneos y grandes, formadas por agitación manual y/o con vortex, en una población de vesículas unilaminares de determinados tamaños. Esta técnica [1, 5] se basa en hacer pasar la dispersión acuosa de los fosfolípidos, bajo alta presión, a través de membranas de policarbonato con poros de tamaño definido. Los poros de las membranas son realizados por medio de la combinación de técnicas de LASER y de grabado químico. Inicialmente, las vesículas multilaminares son más grandes que los poros de modo que se rompen en el proceso de extrusión y emergen posteriormente de la membrana de tamaño menor que el inicial. Repetidas extrusiones tienden a disminuir el número de láminas y alrededor de la décima extrusión casi todas las estructuras son unilaminares. Después de realizar varios pasajes a través de las membranas, se obtiene una población de vesículas unilaminares de diámetro igual o algo menor al de los poros de las membranas. En realidad no está totalmente comprendido [2] el mecanismo por el que se forman las estructuras unilaminares.

Esta técnica de preparación de vesículas presenta varias ventajas con respecto a las estructuras obtenidas: [5]

- están libres de solventes orgánicos
- son de tamaño y estructura relativamente homogéneos
- son unilaminares
- son capaces de contener grandes volúmenes en su interior

Se prepararon vesículas unilaminares grandes mediante esta técnica. Se trabajó con un equipo de extrusión comercial, LiposoFast <sup>TM</sup> [5]. Este equipo consta de un armazón simétrico en el que se soportan fijamente las membranas de policarbonato. En

cada extremo del armazón se ubica una jeringa Hamilton con una capacidad de 500  $\mu$ l. Debido al pequeño volumen contenido, el equipo se maneja fácilmente, ejerciéndose manualmente la presión necesaria para extruir la suspensión de vesículas multilaminares depositada en una de las jeringas.

#### III-3-1-1-Procedimiento.

Se disolvió una cantidad conocida de fosfolípido en una mezcla cloroformo:metanol 2:1, en un tubo de vidrio de fondo cónico de 2 cm de diámetro interno y de aproximadamente 10 ml de capacidad. Se evaporó la mezcla de solventes con flujo de  $N_2$  dejando una fina película del fosfolípido depositada sobre el cono. Luego se quitaron las últimas trazas de solventes en una bomba de vacío (2 hs.).

Una vez seca la capa de fosfolípido se removió completamente de las paredes del vidrio con agregado del buffer y con agitación vigorosa con vortex. Para romper las posibles formaciones de aglomerados de fosfolípidos y aumentar la eficiencia de encapsulamiento se congeló la dispersión acuosa en nitrógeno líquido y se descongeló en un baño de 20 °C, este procedimiento se realizó cinco veces consecutivas [6]. De este modo se obtuvo una dispersión lechosa de vesículas multilamelares grandes y de diferentes tamaños.

Por último se hizo pasar esta dispersión por el equipo de extrusión 21 veces. Lo anterior es debido a que es conveniente extruir a la dispersión de las vesículas un número de veces impar para reducir las posibilidades de contaminación debida a partículas grandes presentes en el material de partida [5].

Como resultado se obtuvo una dispersión de vesículas lipídicas unilaminares grandes de tamaño relativamente homogéneo de 100 nm de diámetro, siendo la concentración final de los fosfolípidos en las dispersiones de las vesículas alrededor de  $5 \times 10^{-4} M$ .

Es posible conocer el número de agregación de estas vesículas, como ya se indicó en la Sección II-1-6-, por medio de cálculos basados en conceptos geométricos. Por un lado se sabe que las vesículas preparadas poseen 100 nm de diámetro y por el otro lado se puede considerar que el área molecular de los fosfolípidos POPC y DMPC son

similares de alrededor de  $0,50 \text{ nm}^2$  [7]. Además de lo anterior, se supone que el número de moléculas de fosfolípido de cada capa de la vesícula es igual. Esta suposición es correcta ya que el espesor de la bicapa de las vesículas unilaminares grandes es despreciable frente al diámetro de la vesícula. Esto provoca que la curvatura sea baja y que las moléculas anfífilas se distribuyan en cantidades iguales en la capa externa y en la interna. Por lo expuesto se calculó que el número de agregación de las vesículas es de alrededor de 125.000.

### III-3-1-2-Incorporación de solutos a las vesículas.

#### - Fluoróforo:

Se partió de una solución concentrada de ANT en etanol la cual se la codisolvió con la solución del fosfolípido en la mezcla cloroformo:metanol, previo a la evaporación bajo nitrógeno. Posteriormente se continuó con los pasos ya descritos. Si no se indica lo contrario la relación fosfolípido/fluoróforo usada fue de 100/1.

#### - Derivados indólicos:

En las experiencias de inhibición de fluorescencia se partió de 2 o 3 ml de una dispersión de vesículas con ANT codisolto. Posteriormente se agregaron los derivados indólicos de la siguiente manera:

- DMI: se lo disolvió en etanol con una concentración de alrededor 70 mM y se inyectó como máximo 15  $\mu\text{l}$  de esta solución.

- IN: se lo disolvió en en buffer con una concentración del orden de 6 mM y se inyectó alrededor de 1,5 ml. En estas experiencias la emisión de ANT fue corregida por la dilución.

- TRP y IAA: se los disolvió en la dispersión de vesículas con una concentración aproximadamente 30 mM y se inyectó alrededor de 2,5 ml. La dispersión vesicular contiene ANT para no afectar la concentración de este último.

En las medidas de tiempos de vida media de IN y DMI en las vesículas éstos se codisolviaron con los fosfolípidos del mismo modo que se explicó previamente para ANT.

En las experiencias de determinación de las constantes de partición para IN y DMI se siguió el cambio de fluorescencia, a una longitud de onda fija, del derivado indólico disuelto en el buffer con el agregado de vesículas. Estas medidas fueron realizadas por duplicado o triplicado. Se mantuvo constante la absorción de luz del derivado indólico a medida de que se agregó las vesículas. Para ello se igualaron las absorciones, a la longitud de onda de excitación, del compuesto indólico en el buffer y en las vesículas. Se trabajó con concentraciones de los indoles en el rango 50 - 100  $\mu\text{M}$ . Cada derivado indólico fue inyectado a las vesículas posteriormente a su preparación. Dichas vesículas fueron preparadas en ausencia de ANT debido a que se considera que la presencia de éste último en la relación fosfolípido/ANT 100/1 no debería afectar a la partición de los compuestos indólicos. Para interpretar los resultados se supuso que existen solamente dos poblaciones de derivado indólico que emiten: la que se encuentra incorporada a las vesículas y la que está en el buffer acuoso.

En el estudio del efecto de la temperatura en la emisión de ANT y del excipiente ANT-DMI en vesículas de DMPC se partió de 2 o 3 ml de una dispersión de vesículas con ANT codisuelto y se le agregó como máximo 15  $\mu\text{l}$  de DMI disuelto en etanol con una concentración de alrededor 70 mM.

### III-3-2-Método de inyección.

También se prepararon vesículas por medio del método de inyección lenta de una solución etanólica de los fosfolípidos al buffer acuoso. [8] Este procedimiento no degrada al fosfolípido. Se sabe [8] que un porcentaje de etanol en la solución menor que el 8% V/V no afecta el tamaño de las vesículas.

Se construyó en el Departamento de Química de la U.N.R.C. un equipo para realizar la inyección. Dicho equipo es accionado mecánicamente con un motor eléctrico regulable y permite una inyección lenta de 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  o 25  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Para tal fin se usaron jeringas Hamilton, con émbolo de teflon, de distintos volúmenes. La inyección se realizó a un vaso cilíndrico de 2 cm de diámetro, rodeado por una camisa para termostatar, y a una profundidad de 1 cm con respecto a la superficie libre del líquido. Se mantuvo agitación constante en la solución acuosa durante la inyección.

#### III-3-2-1- Procedimiento e incorporación de solutos a las vesículas.

En todos los casos se codisolvió el fosfolípido con el fluoróforo en etanol y se agitó con un vortex para asegurar una correcta mezcla. Se realizó la inyección a un volumen conocido de la solución acuosa en la temperatura requerida y con agitación constante.

En las experiencias de inhibición de fluorescencia los derivados indólicos fueron agregados del mismo modo que ya fue descrito cuando se explicó el incorporado de éstos a las vesículas preparadas por el método de extrusión.

#### III-4- Verificación de la formación de las vesículas.

La técnica de microscopía electrónica de tinción negativa es un método útil para determinar la distribución de tamaño de las vesículas y además proveer la información si son uni o multilaminares. Por medio de esta técnica microscópica se caracterizaron a las vesículas preparadas por los diferentes métodos. Se fotografiaron las muestras de las vesículas en el microscopio electrónico del IIFIVE INTA (ciudad de Córdoba).

Se tomaron fotografías de la dispersión de las vesículas en el buffer utilizando las metodologías clásicas de tinción negativa. [1] Las fotografías revelaron que las vesículas preparadas por el método de extrusión son unilaminares y de tamaño relativamente homogéneo de 100 nm de diámetro. Por otro lado se encontró que las vesículas preparadas por el método de inyección son multilaminares y de tamaño heterogéneo. En las Figuras siguientes se muestran las fotografías obtenidas para cada situación.





Figura III. 1: Vesículas de POPC preparadas por medio del método de extrusión con membranas de policarbonato con poros de 100 nm de diámetro. Fotografía obtenida en el microscopio electrónico usando técnicas de tinción negativa. Escala: 50 nm 



Figura III. 2: Vesículas de POPC preparadas por medio del método de inyección. Fotografía obtenida en el microscopio electrónico usando técnicas de tinción negativa. Escala: 50 nm 

### III-5- Medidas experimentales.

Las técnicas experimentales empleadas incluyeron espectroscopía de absorción UV-visible y de emisión de fluorescencia en condiciones estacionarias (midiendo intensidades) y dinámicas (midiendo tiempos de vida de fluorescencia). En todos los casos se usaron celdas de 1 cm de paso óptico y de 4 ml de capacidad.

El instrumento usado para la espectroscopía de absorción fue un espectrofotómetro UV2401 Shimadzu.

Las medidas del rendimiento cuántico de las reacciones de fotodecoloración en los medios homogéneos fueron realizadas mediante el uso del actinómetro Aberchrome 540 [9, 10]. Las experiencias de fotólisis continua se realizaron con una lámpara de Xenon de 150 W acoplada a un monocromador (Photon Technology International). La longitud de onda de irradiación fue seleccionada tal que coincidiera, en cada caso, con el máximo de la banda de absorción UV de menor energía de cada ANT.

La absorbancia de ANT y sus derivados no superó a 0,2 en las experiencias de inhibición de fluorescencia tanto en los medios homogéneos como en los organizados. En las experiencias de determinación de las constantes de partición en los medios vesiculares de IN y DMI se trabajó con iguales absorbancias de los derivados indólicos tanto en el buffer como en el medio organizado. Dichas absorbancias no superaron a 0,5.

Las medidas de fluorescencia en estado estacionario se realizaron en un espectrofluorómetro Spex FluoroMax. La longitud de onda de excitación de ANT y sus derivados fue en el máximo de la segunda banda de absorción y la de los derivados indólicos a 280 nm. La abertura del haz de excitación y de emisión fue variada en cada medida dentro del rango de 0,5 a 1,0 mm. Se consideró que la abertura del haz de excitación fuera la menor posible para evitar que se fotolise el fluoróforo. Los espectros de emisión y excitación fueron tomados en intervalos de 0,5 nm con un tiempo de integración de 0,5 segundos lo que permite obtener una buena resolución de éstos.

Las medidas de absorción y emisión realizadas en las dispersiones vesiculares fueron corregidas sustrayendo la absorción y la fluorescencia respectivamente de las vesículas en ausencia de ANT.

Las medidas de los tiempos de vida de fluorescencia se realizaron usando la técnica de conteo de fotón único [11] en un equipo Edinburgh Instrument OB900. Dicho equipo utiliza como criterios de ajuste de los resultados obtenidos por medio del análisis de cuadrados mínimos a dos parámetros: el valor de chi cuadrado reducido,  $\chi_v^2$ , y al gráfico de los residuos pesados [11]. En el caso de un buen ajuste el valor de chi cuadrado reducido debe ser cercano a la unidad. Con respecto al parámetro de ajuste de los residuos pesados, se encuentra que éste es bueno cuando el gráfico de los residuos en función de los canales se distribuyen al azar alrededor de cero.

En los medios homogéneos se realizaron las medidas en condiciones deoxigenadas, burbujeando  $N_2$ , mientras que en las dispersiones de las vesículas se trabajó en presencia de  $O_2$ .

Las medidas de inhibición de fluorescencia, de determinación de los tiempos de vida y de determinación de las constantes de partición para IN y DMI se las realizó a temperatura constante, termostalizando en la temperatura deseada y con agitación continua. En las experiencias en que se analizó el efecto de la variación de la temperatura, se midió esta magnitud en el contenido de la celda usando un termómetro digital en punta. Para realizar las experiencias tanto a temperatura constante como variable se usó un termostato con circulación continua de agua.



III-6- Referencias.

- [1] R.R.C. New, *Liposomes. A Practical Approach*, Oxford University Press Inc., New York, 1997. Capítulos 1 y 3.
- [2] D.D. Lasic, *Liposomes: From Physics to Applications*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1995. Capítulo 4
- [3] D. Marsh, *Handbook of Lipid Bilayers*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1990.
- [4] K. Kalyanasundaram, *Photochemistry in Microheterogeneous Systems*, Academic Press, INC, New York, 1987. Capítulo 6.
- [5] R.C. MacDonald, R.I. MacDonald, B.Ph.M. Menco, K. Takeshita, N.K. Subbarao, L. Hu, *Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1061, (1991), 297-303.
- [6] L.D. Mayer, M.J. Hope, P.R. Cullis, A.S. Janoff, *Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles*, *Biochim. Biophys. Acta*, 817, (1985), 193-196.
- [7] R.Gennis, *Biomembranes, molecular structures and functions*, Springer, New York, 1989. Capítulo 2.
- [8] J.M.H. Kremer, M.W.J.v.d. Esker, C. Pathmamanoharan, P.H. Wiersema. *Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method*. *Biochemistry* 16, (1977), 3932-3935.
- [9] P. Boule, J. F. Pilichowski, *Comments about the use of Aberchrome<sup>TM</sup> 540 in chemical actinimetry*, *Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 71 (1993) 51-53
- [10] C.D.Borsarelli, H.A.Montejano, J.J.Cosa, C.M.Previtali, *Medium effects on the photochemical reaction between pyrene and indole. A laser flash photolysis study*, *Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 91 (1995) 13.
- [11] D. Phillips, D.V. O'Connor, *Time correlated single photon counting*, Ed. Academic Press, New York, 1984.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. MEDIOS HOMOGÉNEOS

### IV-1-Inhibición de fluorescencia de ANT y sus derivados por compuestos indólicos.

Se realizó el estudio de la inhibición de fluorescencia de ANT y sus derivados sustituidos en las posiciones 9 y 10 por medio de compuestos indólicos en solventes polar y no polar. El objetivo de realizar el estudio en solventes con diferentes polaridades es analizar cómo el mecanismo de inhibición de fluorescencia es afectado por esta propiedad de los medios de reacción.

Se determinaron las constantes bimoleculares de la velocidad de inhibición de fluorescencia ( $k_q$ ) experimentalmente en condiciones dinámicas y/o estáticas utilizando la Ecuación de Stern-Volmer [1]:

$$\text{Ecuación IV. 1} \quad \frac{\tau_0}{\tau} = \frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0 [\text{Inhibidor}]$$

Donde  $\tau_0$  y  $\tau$  son los tiempos de vida de fluorescencia en ausencia y presencia del inhibidor respectivamente. Del mismo modo,  $I_0$  e  $I$  indican las intensidades de fluorescencia en ausencia y presencia del inhibidor respectivamente.  $k_q$  es la constante bimolecular de la velocidad de inhibición de fluorescencia. La igualdad  $\frac{\tau_0}{\tau} = \frac{I_0}{I}$  de la Ecuación IV.1 es válida solamente en los casos en que la inhibición únicamente ocurre de manera colisional [1]. El gráfico de estas relaciones en función de la concentración molar del inhibidor da como resultado una recta. A partir del valor de la pendiente se obtiene a  $k_q$ . Dichos gráficos son llamados habitualmente gráficos de Stern-Volmer.

En las experiencias realizadas las relaciones de  $I_0/I$  y de  $\tau_0/\tau$  fueron como máximo de alrededor de 3. En estas condiciones se obtienen gráficos de Stern-Volmer lineales indicando que la inhibición es provocada solamente en forma dinámica [1]. Las experiencias de inhibición de fluorescencia se realizaron en atmósfera de  $N_2$ .

En la Figura IV. 1 y en la Figura IV. 2 se muestran ejemplos de los gráficos de Stern-Volmer obtenidos para la inhibición de ANT y de 9,1-DCANT por IN medidos en condiciones estáticas y dinámicas respectivamente.

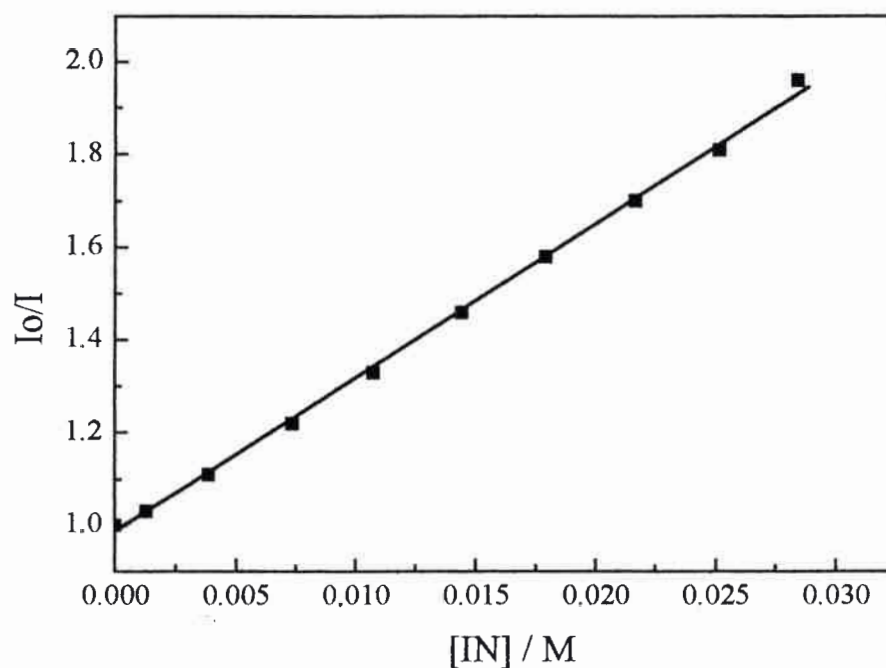


Figura IV. 1: Gráfico de Stern-Volmer para la inhibición de ANT por IN en acetonitrilo en condiciones estáticas.

Anteriormente se han realizado estudios [2, 3] de la inhibición de fluorescencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos por moléculas donoras de electrones en su estado fundamental en soluciones de diferentes solventes orgánicos. Encinas y otros [2] investigaron la inhibición ANT por IN y sus derivados metilados en varios solventes. En acetonitrilo observaron que la correlación de las constantes de inhibición con el potencial de oxidación de los derivados indólicos se ajusta a un mecanismo de transferencia de electrón de los compuestos indólicos hacia ANT. Además, por medio de medidas de *laser flash* [4] encontraron que cuando los indoles están sustituidos en el átomo de N por grupos metilos se observa la formación de los iones radicales  $IN^+$  y  $ANT^-$  corroborando así el modelo de transferencia de un electrón.

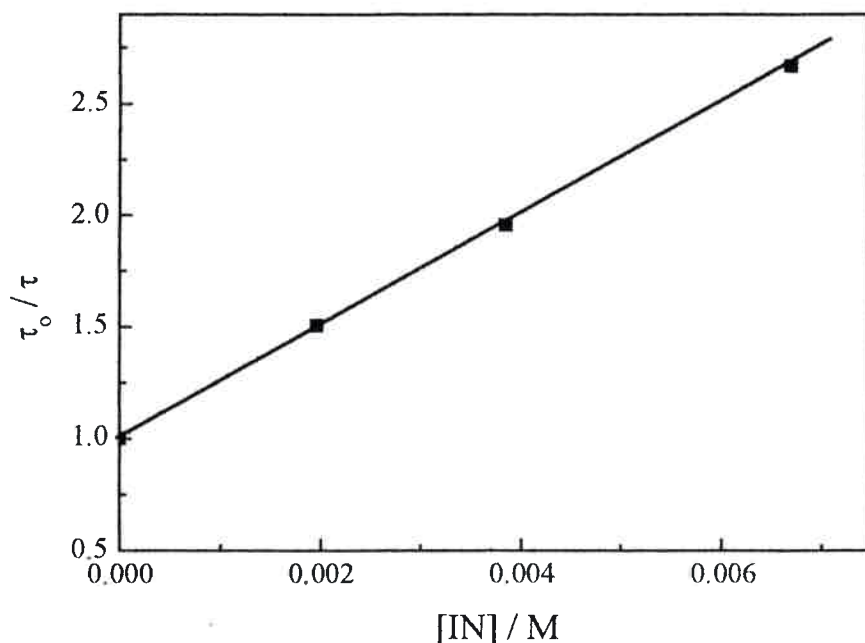


Figura IV. 2: Gráfico de Stern-Volmer para la inhibición de 9,10-DCANT por IN en acetonitrilo en condiciones dinámicas.

#### IV-2-Solvente relativamente polar: acetonitrilo.

Los valores de  $k_q$  obtenidos para la desactivación del estado primer Singlete de los distintos antracenos por derivados indólicos en acetonitrilo están mostrados en la Tabla IV. 1. En esta Tabla también se muestran entre paréntesis los valores de los potenciales de oxidación de los compuestos indólicos y de reducción para los diferentes fluoróforos. Para los derivados indólicos los valores de los potenciales fueron calculados del siguiente modo: se utilizó el valor del potencial de IN en agua *versus* el electrodo normal de hidrógeno medido por medio de voltametría cíclica igual a 0,97 V [5]. Para los derivados metil sustituidos se consideraron los valores obtenidos de medidas cinéticas de radiólisis por pulso y se los normalizó al potencial de IN mostrado anteriormente, [5, 6] posteriormente se los refirió al electrodo de calomel saturado agregando 0,241 V [7].

Para ANT y sus derivados se usaron los potenciales de media onda de reducción de los estados fundamentales en N,N-dimetilformamida *versus* el electrodo de calomel saturado [8]. El valor del potencial usado para 9-MANT fue medido relativo a un electrodo de referencia de mercurio y se lo refirió al electrodo de calomel saturado sustrayendo 0,55 V [8].

Tabla IV. 1: Constantes bimoleculares de inhibición de fluorescencia ( $k_q$ ) en acetonitrilo medidas a 25°C. En unidades  $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

	IN (1,21 V)	1-MIN (1,20 V)	DMI (1,09 V)	2-MIN (1,07 V)	3-MIN (1,04 V)
ANT (1,95 V)	5,6	5,6	14,0	14,7 <sup>(a)</sup>	26,0
9-MANT (1,97 V)	0,80	0,65	8,9	9,3	16,0
9,10-DMANT	0,04	0,16	2,0		5,6
9-CANT (1,58 V)	26,0	21,0			30,9
9,10-DCANT (0,98 V)	25,0	22,0			24,0

<sup>(a)</sup> referencia [2]

Un análisis cualitativo de los resultados experimentales indica que la inhibición de los distintos antracenos aumenta, los valores de  $k_q$  aumentan, a medida que disminuyen los valores de los potenciales de oxidación de los indoles. Además, se observa que los inhibidores que poseen similares potenciales de oxidación producen la inhibición prácticamente con la misma  $k_q$ ; como por ejemplo IN y 1-MIN frente a ANT o el DMI y 2-MIN frente a 9-MANT. Se puede realizar un análisis equivalente al interpretar los resultados variando los diferentes fluoróforos y dejando fijo al inhibidor; claramente se evidencia que a medida que aumenta la capacidad aceptora del electrón de los diferentes ANT, debido a la presencia de los distintos sustituyentes, la constante de velocidad aumenta. Por ejemplo en el caso de los cianoantracenos, que poseen un grupo sustituyente con propiedad atractora de electrones, se llega al límite difusional del valor de  $k_q$  de  $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [8] para este solvente. Por otro lado, el valor de la constante de velocidad de los metilantracenos disminuye debido al efecto dador de electrones hacia la estructura aromática que poseen los grupos metilos.

Para realizar un análisis cuantitativo de los valores de la Tabla IV.1 es necesario considerar la teoría general de reacciones de transferencia de electrones fotoinducidas en medios de alta polaridad. Dicha teoría fue resumida en el Capítulo II, Sección 3-1.

En la Figura IV. 3 se muestra el gráfico del logaritmo de los valores de  $k_q$ , en acetonitrilo mostrados en la Tabla IV.1 en función del cambio total de energía libre del proceso de transferencia del electrón,  $\Delta G^0$ . En la Ecuación II.7 se indicó como se calcula  $\Delta G^0$  a partir de parámetros energéticos obtenidos experimentalmente.

La línea sólida de la Figura IV. 3 corresponde al ajuste de los resultados experimentales realizado según el modelo de transferencia del electrón. A esta línea se la calculó por medio de las ecuaciones de la teoría general de reacciones de transferencia de electrones fotoinducidas en medios polares, Ecuaciones 1-8 del Capítulo II, Sección 3-1. Para realizar dicho ajuste se usaron valores extraídos de la bibliografía para las diferentes magnitudes. El valor de la constante de velocidad difusional para acetonitrilo,  $k_d$  que se encuentra en las Ecuaciones II.1 y II.2, se lo consideró igual a  $2,5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [8]. El producto del factor electrónico y el factor de frecuencia de pasaje a través del estado de transición,  $\kappa \nu_n$ , de la Ecuación II.3 se lo tomó igual a  $1 \times 10^{13} \text{ s}^{-1}$  para el solvente acetonitrilo [9]. Se usó un valor para la energía de reorganización,  $\lambda$ , de la Ecuación II.4 igual a 0,90 eV para dicho solvente [9]. Por último, para calcular el cambio total de energía libre del proceso de transferencia del electrón,  $\Delta G^0$ , expresado en la Ecuación II.7 se usaron los valores de los potenciales de oxidación de los indoles y ANT que figuran en la Tabla IV. 1. Se consideró el valor del término de la energía coulombica de la ecuación antes nombrada igual a  $-0,05 \text{ eV}$ , tomando una distancia de separación de 0,8 nm [10,] y una constante dieléctrica de 35,9 a 25 °C para acetonitrilo [9].

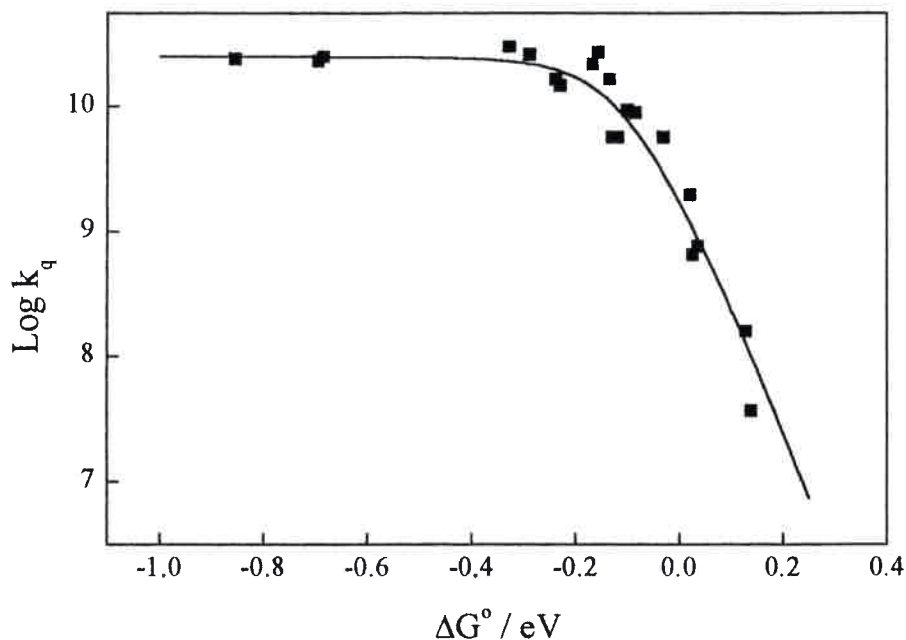


Figura IV. 3: Logaritmo de las constantes de desactivación bimolecular,  $k_q$ , en función del cambio de energía libre de Gibbs del proceso de transferencia del electrón,  $\Delta G^\circ$ . Línea sólida calculada a partir de la teoría general de reacciones de transferencia de electrones fotoinducidas, (Ecuaciones II.2-II.8, Sección II-3-1).

En la Figura IV. 3 se observa que los valores de las constantes de desactivación de los antracenos por los derivados indólicos en el solvente acetonitrilo siguen una cinética de transferencia del electrón. Dicha etapa inicial del mecanismo de reacción está indicada en el Esquema II.1.

#### IV-3-1-Solventes de baja polaridad.

En n-heptano se realizaron las mismas experiencias de inhibición de fluorescencia que en acetonitrilo. Además, se estudió la inhibición de distintos antracenos por derivados indólicos metilados en la posición 1 (sobre el átomo de N) en n-heptano y en otros solventes de baja polaridad. En la Tabla IV. 2 se muestran los valores de las constantes de inhibición obtenidas.







Tabla IV. 2: Constantes bimoleculares de inhibición de fluorescencia ( $k_q$ ) en n-heptano a 25°C. En unidades  $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

	IN (1.21 V)	1-MIN (1.20 V)	DMI (1.09 V)	2- MIN (1.07 V)	3- MIN (1.04 V)
ANT	10,6	0,63	4,3 <sup>(a)</sup>	13,9 <sup>(a)</sup>	16,0
9-MANT	0,57	0,09			10,0
9,10-DMANT		0,07			3,5
9-CANT	28,8	16,6	21,3	21,4	26,9
9,10-DCANT	28,3	24,5	23,1	25,0	28,2

<sup>(a)</sup> referencia [2]

Se encuentra que las constantes de velocidad  $k_q$  son del mismo orden que en el solvente polar, acetonitrilo. Se observa que para un dado derivado indólico los valores de  $k_q$  aumentan con la capacidad aceptora de los diferentes hidrocarburos aromáticos. Sin embargo, mientras que en acetonitrilo los valores de  $k_q$  para indol y 1-metilindol son muy parecidos, en este solvente los valores de las  $k_q$  difieren notablemente siendo mucho menor para el compuesto metilado.

En la Figura IV. 4 se muestra la inhibición de fluorescencia de 9-CANT por DMI en n-heptano. Es importante notar que el agregado de DMI provoca dos efectos. Por un lado disminuye la emisión de fluorescencia de 9-CANT y por el otro lado se observa la presencia de una nueva banda emisiva a menor energía que la emisión del fluoróforo. Además, se observa un punto isoemisivo. Los hechos anteriores son característicos de la formación del exciplexo emisivo. La emisión del exciplexo en n-heptano se observa solamente al estudiar la inhibición de los antracenos por los derivados indólicos sustituidos en el nitrógeno por grupos metilos, N-metilindoles, ya que cuando se usan los inhibidores que presentan la unión nitrógeno-hidrógeno no aparece una nueva banda de emisión.

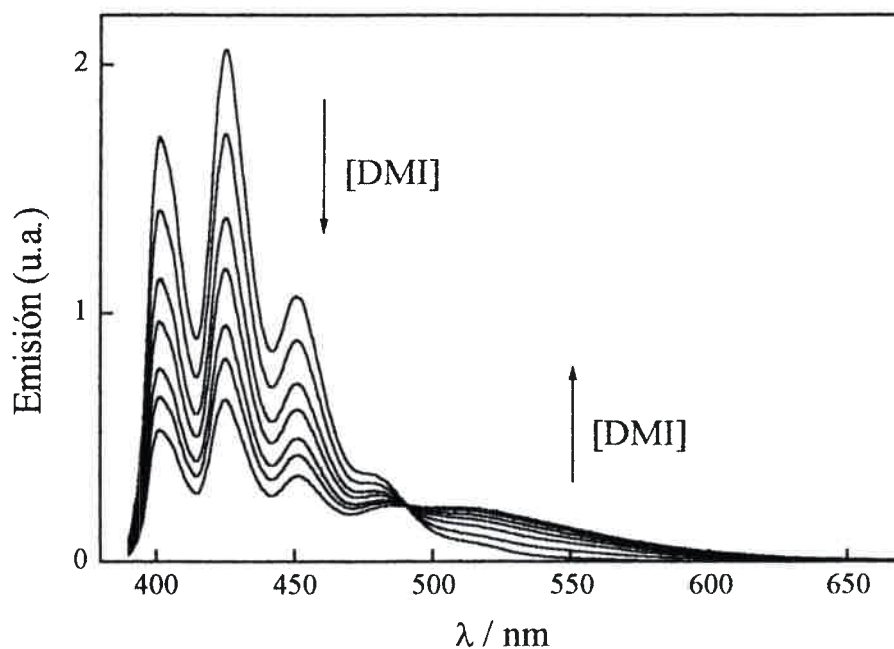


Figura IV. 4: Inhibición de fluorescencia de 9-CANT por DMI en n-heptano. [DMI] = 0; 0,65; 1,6; 2,5; 3,8; 5,0; 6,8 mM.  $\lambda$  exc.: 340 nm.

Además de la formación de los excíplejos emisivos en presencia de los inhibidores sustituidos sobre el átomo de nitrógeno, se observa en la Tabla IV.2 que los valores de  $k_q$  correspondientes a éstos son menores, en la mayoría de los casos, que los correspondientes para el resto de los inhibidores.

#### IV-3-2-Estudio de los excíplejos formados por diferentes pares de hidrocarburos aromáticos e indoles en n-heptano.

En la sección anterior se indicó que al estudiar la inhibición de los antracenos por los derivados indólicos se observa la emisión del excíplejo solamente cuando los inhibidores están sustituidos en el átomo de nitrógeno por grupos metilos. En esta sección se describirá el comportamiento de excíplejos formados en n-heptano por distintos pares de fluoróforo-inhibidor.

En la Figura IV. 4 se muestra la inhibición de fluorescencia de 9-CANT por DMI en n-heptano y la formación del excíplejo. En la Figura IV. 5 se muestra la inhibición de fluorescencia de ANT por DMI en n-heptano.

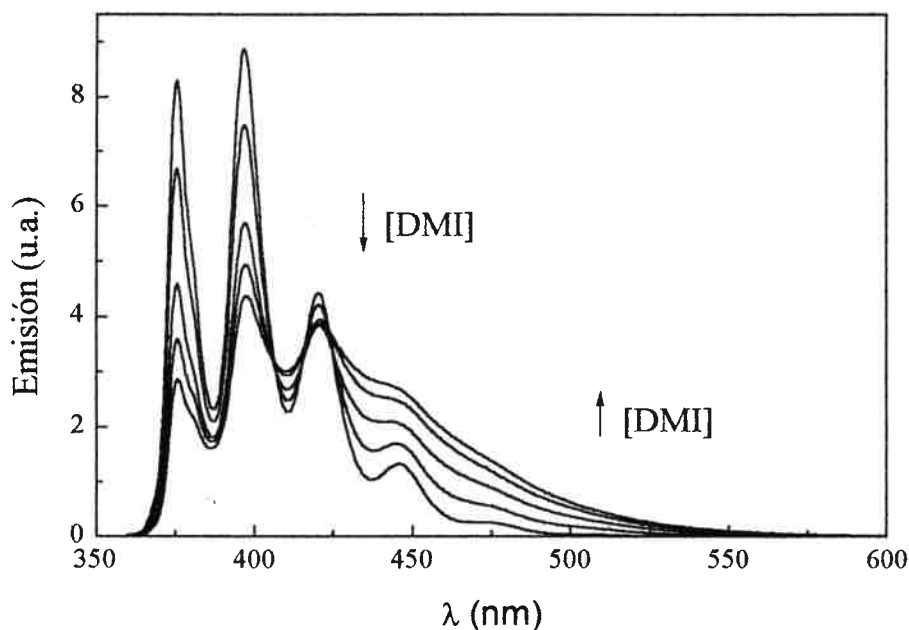


Figura IV. 5: Inhibición de fluorescencia de ANT por DMI en n-heptano.  $[DMI] = 0; 0,016; 0,056; 0,084; 0,112$  M.  $\lambda$  exc.: 340 nm.

Al comparar la emisión de los excíplejos formados por el par 9-CANT-DMI y por el par ANT-DMI se observa que la posición de éstos depende del par de fluoróforo-inhibidor.

Para analizar la ubicación del espectro de emisión de los excíplejos es necesario conocer sus espectros de emisión. Dichos espectros se obtienen mediante el siguiente procedimiento: en una longitud de onda que emita solamente el hidrocarburo aromático se normaliza el espectro de emisión del fluoróforo con el máximo agregado de inhibidor con el espectro del fluoróforo en ausencia de éste. Luego se realiza la substracción entre estos espectros tal que la diferencia corresponde al espectro del excíplejo. Para realizar el procedimiento anterior se supone que a la longitud de onda correspondiente al máximo de la primera banda de emisión del fluoróforo el excíplejo no emite.

En la Figura IV. 6 se muestran los espectros de emisión normalizados de los exciplejos formados por el par ANT-DMI y por el par 9-CANT-DMI en n-heptano. Dichos espectros fueron obtenidos mediante el procedimiento descrito anteriormente.

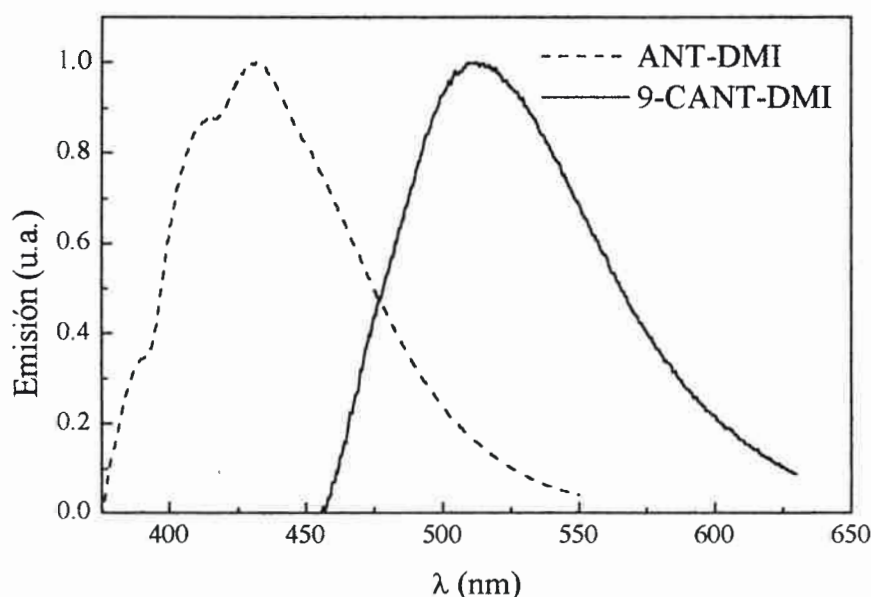


Figura IV. 6: Espectros de emisión normalizados de los exciplejos formados por el par ANT-DMI y el par 9-CANT-DMI en n-heptano.

El espectro de emisión ANT-DMI en la Figura IV. 6 presenta una aparente estructura vibracional que no es compatible con la emisión típica de los exciplejos. Este efecto ha sido observado en otros casos [11] en donde el espectro de emisión del exciplejo se obtuvo del mismo modo que el descrito en este trabajo y además está parcialmente sumergido por la emisión del fluoróforo. El origen de esta estructura vibracional no es claro, Donckt y otros [11] lo atribuyen a un pequeño ensanchamiento en los picos de emisión del fluoróforo en presencia del inhibidor. Aunque lo más probable es que la causa de la presencia de esta estructura fina sea un artefacto introducido por el procedimiento matemático empleado para obtener el espectro del exciplejo.

En la Tabla IV. 3 se muestran los valores de los máximos de emisión de los exciplejos formados por diferentes pares de fluoróforo-inhibidor en n-heptano. Estos

datos se obtuvieron a partir de los espectros de emisión de cada exciplexo. Además se incluyen en la Tabla los valores de los potenciales de media onda de oxidación y de reducción de los indoles [5, 6, 7] y de los antracenos [1] respectivamente.

Tabla IV. 3: Valores del máximo de emisión de los exciplexos en nm y  $\text{cm}^{-1}$ , en n-heptano.

	1-MIN (1,20 V)		DMI (1,09 V)	
	nm	$\text{cm}^{-1}$	nm	$\text{cm}^{-1}$
ANT (1,95 V)	425	23529	431	23202
9-CANT (1,58 V)	497	20121	513	19493
9,10-DCANT (0,98 V)	570	17544	595	16807

Se observa que la posición de la emisión del exciplexo se corre al rojo a medida de que se estabiliza la transferencia de carga de esta especie excitada. La estabilización de carga depende tanto de la identidad del fluoróforo como de la del inhibidor. Por un lado es afectada por la capacidad aceptora del electrón de los fluoróforos, y por el otro por la capacidad donora del electrón de los inhibidores. Es notable como la presencia del grupo ciano como sustituyente en el fluoróforo estabiliza la transferencia de carga y en consecuencia la emisión de los exciplexos aparece a mayor longitud de onda. Este comportamiento de la posición de la emisión de estas especies es típico para los exciplexos polares.

Se sabe que la frecuencia del máximo de emisión del exciplexo correlaciona cualitativamente con las propiedades donoras-aceptoras de electrón del par dador-aceptor respectivamente [12]. La energía correspondiente al máximo de emisión de fluorescencia del exciplexo es próxima al valor absoluto de la suma de los valores de los potenciales de media onda de oxidación y de reducción tal como se muestra en la Ecuación IV. 2.

Ecuación IV. 2 
$$\nu^{\text{max}} = -[E_{1/2}(A \rightarrow A^-) + E_{1/2}(D \rightarrow D^+)] + \Delta$$

Donde  $\nu^{\max}$  corresponde a la frecuencia del máximo de emisión del exciplexo.  $E_{1/2}(A \rightarrow A^-)$  es el potencial de media onda de reducción y  $E_{1/2}(D \rightarrow D^+)$  es el potencial de media onda de oxidación.  $\Delta$  es una constante mucho menor con respecto a la energía correspondiente a la frecuencia del máximo de emisión del exciplexo, en muchos casos su valor está comprendido en el rango  $500 \pm 250 \text{ cm}^{-1}$  [12].

En la Figura IV. 7 se muestra la relación de energía del máximo de emisión de los distintos exciplexos  $\nu^{\max}$  en función de la suma de los valores de los potenciales de media onda de oxidación de los compuestos indólicos y de reducción de ANT y sus derivados.

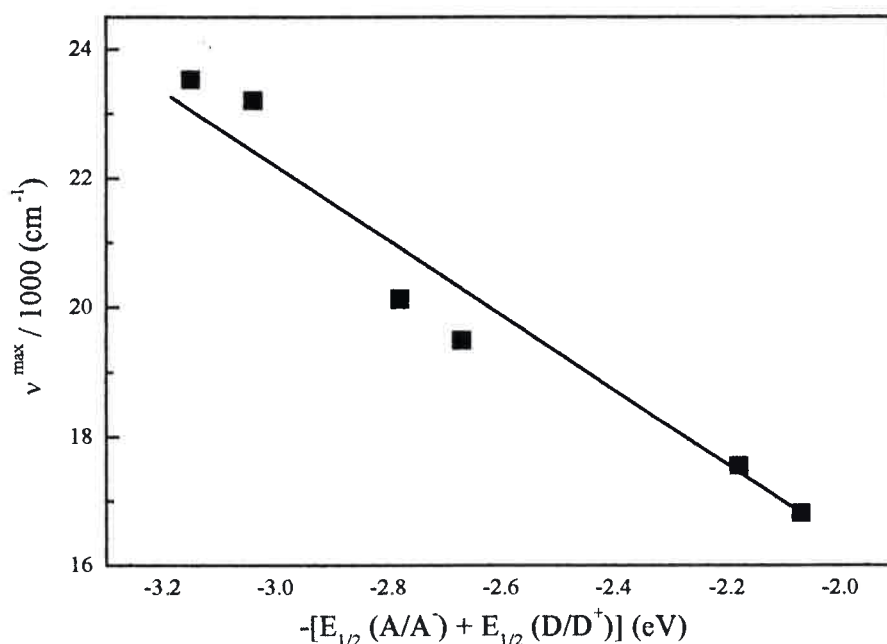


Figura IV. 7: Energía del máximo de emisión de los distintos exciplexos en función de la suma de suma de los valores de los potenciales de media onda de oxidación de los compuestos indólicos y de reducción de ANT y sus derivados en n-heptano.

En esta Figura se observa que la correlación lineal de dichas magnitudes es buena a pesar de que los datos espectroscópicos y electroquímicos fueron obtenidos en

diferentes solventes. Estos resultados implicarían que los excíplejos formados presentan un estado de transferencia de carga “puro” o sea ( $A^{\cdot-}D^+$ )\*.

#### IV-3-3-Estudio del efecto de solventes sobre el excíplejo ANT-DMI.

Como los excíplejos formados son polares la posición y la intensidad de sus emisiones dependen tanto de la identidad del par fluoróforo-inhibidor como de la polaridad del medio en que se forman. A causa de lo anterior se estudió la manera en que esta característica del medio afecta a la emisión del excíplejo del par ANT-DMI. Se trabajó con solventes no polares y de polaridades intermedias. Específicamente se usaron: n-heptano, ciclohexano, acetato de etilo y acetona. En la Figura IV. 8 se muestran los espectros de emisión normalizados de dicho excíplejo en n-heptano, acetato de etilo y acetona. El espectro del excíplejo en ciclohexano coincide con el encontrado en n-heptano. Estos espectros fueron obtenidos como se explicó previamente en la Sección IV-1-2-2.

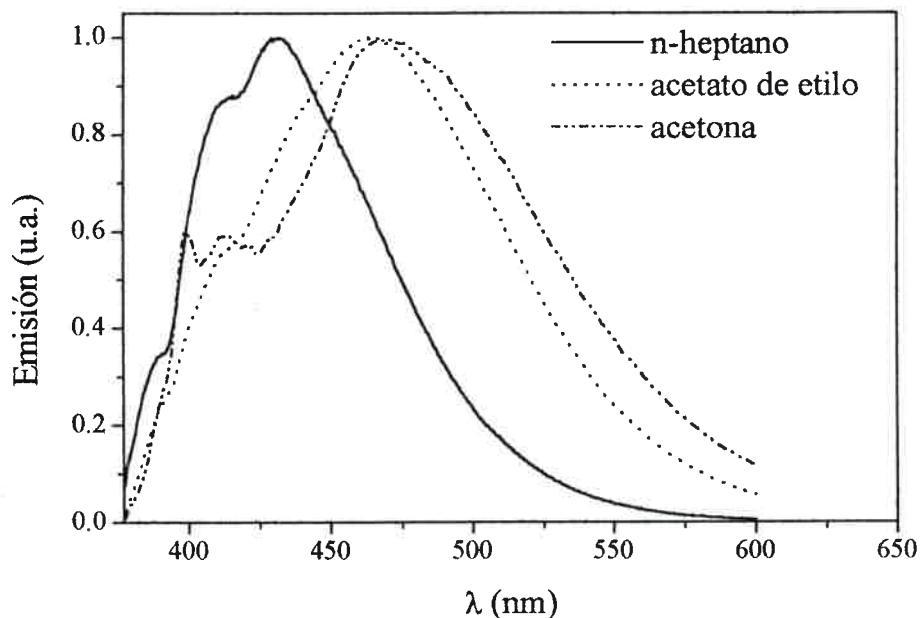


Figura IV. 8: Espectros de emisión normalizados del excíplejo formado por ANT-DMI en diferentes solventes.  $\lambda$  exc.: 340 nm.

Previamente se indicó que la estructura fina que presentan los espectros de emisión de los exciplejos son debidas probablemente a un artificio introducido en el procedimiento empleado para obtener estos espectros.

En esta Figura se manifiesta claramente el comportamiento que presenta la posición de la emisión del exciplejo con la polaridad del medio. Se observa como el espectro de emisión se corre al rojo a medida de que se estabiliza la transferencia de carga con el aumento de la polaridad.

Es importante notar que la intensidad de emisión de los exciplejos polares depende de la polaridad del medio, ya que a medida de que ésta aumenta disminuye su emisión.

En la Tabla IV. 4 se muestran los valores de las longitudes de onda del máximo de emisión del exciplejo ANT-DMI en los distintos solventes, además figuran la constante dieléctrica (permitividad relativa) y el momento dipolar de cada solvente.

Tabla IV. 4: Valores de constantes dieléctricas ( $\epsilon$ ), de los momentos dipolares ( $\mu$ ) en Debye y del máximo de emisión ( $\lambda_{\max}$ ) en nm del exciplejo formado entre ANT-DMI en los diferentes medios.

Solventes	$\epsilon$	$\mu$	$\lambda_{\max}$
n-heptano	1.92	0.0	431
ciclohexano	2.02	0.0	430
acetato de etilo	6.05	1.83	463
acetona	20.56	2.70	470

Esta propiedad que presentan los exciplejos polares, con respecto a la dependencia de la posición del máximo de emisión con la polaridad del medio, puede ser utilizada para determinar la polaridad del microentorno de un determinado exciplejo polar en un medio en el que esta magnitud se desconozca.

Dado que uno de los objetivos principales de este trabajo es estudiar algunas propiedades de los medios organizados vesiculares, se utilizará el hecho anterior para inferir la polaridad del microambiente en donde se forma el exciplejo ANT-DMI en vesículas grandes unilaminares de fosfolípidos POPC y DMPC. Como se discute en el siguiente capítulo.



IV-3-4- Estudio de la reacción fotoquímica entre los hidrocarburos aromáticos y 3-MIN en n-heptano.

Se encontró que cuando se ilumina una solución de ANT en presencia de 3-MIN, en la longitud de onda correspondiente a la banda de menor energía de absorción de ANT, se observa una disminución en su espectro de absorción sin presentar otro cambio notorio. Bajo condiciones similares de iluminación en ausencia de 3-MIN no se detecta este cambio en la absorción. Se investigó el efecto de los grupos sustituyentes en las posiciones 9 y 10 del ANT en la reacción fotoquímica frente a 3-MIN en n-heptano. Este tipo de procesos es llamado comunmente como reacción de fotodecoloración debido a la disminución de la absorción.

Encinas y otros [2] estudiaron la reacción fotoquímica entre ANT y compuestos indólicos en solventes de diferentes polaridades. Ellos encontraron que estas reacciones solamente son producidas en presencia de los derivados indólicos no sustituidos en el átomo de nitrógeno. Además, estos autores observaron que la eficiencia de esta fotorreacción es sensible a la polaridad de los solventes, tal que a mayor polaridad menor eficiencia.

En la Figura IV. 9 se muestra como varían los espectros de absorción de ANT cuando son irradiados en presencia de 3-MIN. La longitud de onda de irradiación usada en este caso es de 356 nm. Los tiempos de irradiación en segundos que corresponden a cada espectro de absorción están indicados en dicha Figura.

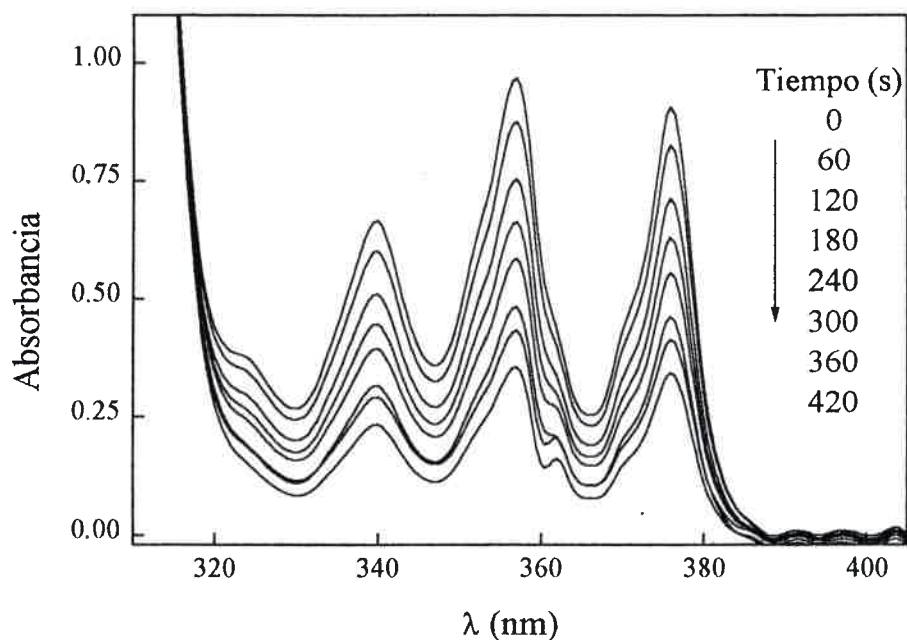


Figura IV. 9: Fotodecoloración de ANT en presencia de 3-MIN en n-heptano.  $\lambda$  irradi.: 356 nm, [3-MIN] = 0,052 M.

Se estudió el rendimiento cuántico de las reacciones de fotodecoloración,  $\Phi_r$ , de ANT y sus derivados por 3-MIN en n-heptano. Para trabajar en condiciones tales que los valores de  $\Phi_r$  sean cantidades comparables entre los diferentes antracenos es necesario que éstos presenten igual fracción de inhibición del primer estado excitado singlete por 3-MIN. Por otro lado, como el rendimiento cuántico de las reacciones de fotodecoloración aumenta proporcionalmente con la fracción del fluoróforo de estado singlete inhibida [2], se trabajó con concentraciones de 3-MIN que corresponden a una relación de  $I_0/I$  elevada, de alrededor de nueve. En la Tabla IV. 5 figuran los resultados de los rendimientos cuánticos encontrados para los distintos antracenos.

Los resultados encontrados muestran que la eficiencia de la fotodecoloración es altamente susceptible al número y a la naturaleza de los sustituyentes en el hidrocarburo aromático. Se observa que el rendimiento cuántico disminuye cuando las posiciones 9 ó 9 y 10 de los derivados del ANT están sustituidas.

Tabla IV. 5: Rendimiento cuántico de la reacción de fotodecoloración de los distintos ANT por 3-MIN en n-heptano a 25°C.

Sonda	$\Phi_r$
ANT	0,37
9-MANT	0,28
9,10-DMANT	0,14
9-CANT	0,19
9,10-DCANT	0,018

La dependencia de los valores de  $\Phi_r$  con el número y tipo de sustituyentes se puede explicar como debida a dos factores.

En primer lugar, debido a que esta reacción solamente ocurre en presencia de derivados indólicos que presenten la unión nitrógeno-hidrógeno, se puede considerar que la ruptura del enlace N-H debe estar involucrada en el proceso fotoquímico. Al ocurrir la ruptura homolítica de este enlace, ocurriría la adición de un radical H $\cdot$  a las posiciones 9 y 10 de ANT y sus derivados. Esto rompería la estructura aromática provocando que la absorción típica de las bandas de los anillos aromáticos conjugados disminuyan. Debido a lo explicado anteriormente, cuando las posiciones 9 ó 9 y 10 están sustituidas el ataque radicalario es menos efectivo y la fotodecoloración disminuye.

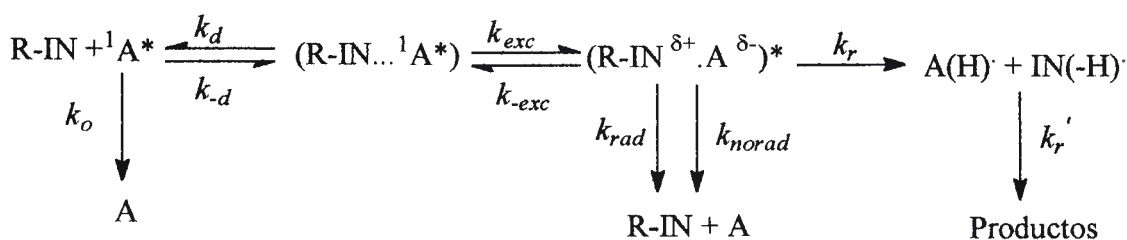
En segundo lugar, es evidente en los resultados mostrados en la Tabla IV. 5 que el rendimiento cuántico de la reacción de fotodecoloración depende de las características de la capacidad aceptora de electrones de los grupos sustituyentes de los antracenos. Se encuentra que para los cianoantracenos  $\Phi_r$  es menor que para los correspondientes metilantracenos. Esto es causado por la mayor capacidad aceptora de electrones de los sustituyentes cianos con respecto a los metilos. En la siguiente sección se explicará esto con mayor detalle.

IV-3-5- Consideraciones generales del proceso de reacción de ANT y sus derivados por compuestos indólicos en n-heptano.

Debido a los resultados mostrados se puede considerar que la reacción de inhibición de fluorescencia de ANT y sus derivados por los compuestos indólicos en n-heptano sigue un mecanismo de reacción distinto que en acetonitrilo. Por ejemplo, una de las diferencias encontradas es que en el solvente polar, ver en la Tabla IV. 1, los valores de las constantes bimoleculares de inhibición de fluorescencia para IN y 1-MIN son muy parecidos debido a que sus potenciales de oxidación son prácticamente iguales. En cambio en n-heptano, ver en la Tabla IV. 2, los valores de las constantes bimoleculares de inhibición de fluorescencia no presentan la misma tendencia que en el solvente polar. En n-heptano se encuentra que los valores de dichas constantes son menores para los derivados indólicos metilados sobre el átomo de nitrógeno.

Por otro lado, se observa en n-heptano la formación de un excíplejo emisivo polar en la reacción de inhibición de fluorescencia de ANT y sus derivados solamente en presencia de los indoles sustituidos con metilo sobre el átomo de nitrógeno. Además, se encuentra que en este solvente ocurre una reacción de fotodecoloración de ANT y sus derivados en presencia de 3-MIN. Esta reacción fotoquímica ya había sido observada previamente. Encinas y otros [2] encontraron que los valores de  $kq$  para la desactivación de ANT por diferentes compuestos indólicos con la unión N-H presente en n-heptano son muy altos. Ellos explicaron este hecho debido a la alta reactividad del átomo de H del enlace N-H, y atribuyeron que la abstracción de este átomo de H es prácticamente la única vía de desactivación en el proceso de inhibición de ANT en medios de baja polaridad. Por otro lado, Lissi y otros [13] sugirieron que la desactivación del estado singlete de ANT por dietilhidroxilamina en benceno es producida mediante un mecanismo de radicales libres que involucra la transferencia directa de un átomo de hidrógeno.

Las observaciones anteriores sobre la reacción de inhibición de fluorescencia en n-heptano pueden ser explicadas mediante el mecanismo de reacción mostrado en el Esquema IV.1:



Esquema IV. 1

En el Esquema anterior se representan a los hidrocarburos aromáticos excitados como  ${}^1\text{A}^*$  y a los derivados indólicos como R-IN. Las diferentes constantes de velocidad tienen el mismo significado que en el Esquema II.2 de la Sección II-3-2. Para los compuestos indólicos sustituidos en el átomo de nitrógeno R- representa al radical metilo y para los compuestos indólicos no sustituidos en dicho átomo R- representa al átomo de hidrógeno:

En los casos en que R- es el grupo metilo se forma el exciplejo y se observa su emisión. En cambio, cuando R- es hidrógeno el exciplejo presenta una nueva ruta rápida de desactivación y la pérdida de su emisión. Este exciplejo no emisivo provoca el aumento en el valor de  $kq$ . Esta vía de desactivación, propia de los indoles no sustituidos en el átomo de nitrógeno, se explicó en la Sección IV.1-2-4- como debida al proceso rápido de la ruptura homolítica del enlace N-H y a la posterior transferencia del radical hidrógeno a la molécula del hidrocarburo [2, 13]. Por lo tanto las especies que forman al exciplejo sufren una reacción química obteniéndose de este modo las especies intermedias radicalarias  $\text{A(H)}\cdot$  y  $\text{IN(-H)}\cdot$ , la constante de velocidad de esta vía está representada en el Esquema IV.1 como  $k_r$ .

En la sección anterior se describió la reacción fotoquímica entre los hidrocarburos aromáticos y 3-MIN en n-heptano. Se mostró los valores de los rendimientos cuánticos de la reacción de fotodecoloración de los distintos ANT por 3-MIN en la Tabla IV. 5. Se indicó que las diferencias encontradas en los valores de los rendimientos cuánticos son debidas a dos causas. La primera, explicada previamente es originada por la sustitución de las posiciones 9 ó 9 y 10 de los antracenos. Para entender el hecho de que para los cianoantracenos el rendimiento cuántico de la reacción de fotodecoloración es menor que para los correspondientes metilantracenos es necesario

considerar el Esquema IV.1. Como ya se explicó, se encuentra que la desactivación de los derivados del ANT en presencia de 3-MIN siguen la ruta de desactivación de la formación del exciplexo no emisor con la posterior ruptura homolítica del enlace N-H y transferencia del radical hidrógeno a la molécula del hidrocarburo. En la presencia de esta vía de escape  $k_r$  es mucho mayor que  $k_{rad}$  y en consecuencia no se observa la emisión del exciplexo. Los exciplexos no emisivos formados por 3-MIN y los cianoantracenos están en un nivel de energía menor que los exciplexos correspondientes a los metilantracenos debido a la estabilización de la carga originada por la mayor capacidad aceptora de electrones del grupo sustituyente ciano. Considerando los niveles energéticos de estos exciplexos no emisivos y la ley de diferencia de energía [14], se explica que el decaimiento no radiativo de estos intermediarios excitados al estado fundamental compita en mayor proporción con la vía de la reacción fotoquímica en el caso de los antracenos sustituidos con el grupo ciano. Esta mayor competencia es la que provoca la disminución del rendimiento cuántico de la reacción de fotodecoloración para los cianoantracenos.

IV-4-Referencias.

- [1] Joseph R. Lakowicz. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Ed. Kluwer Academic, New York. 2nd Ed. 1999. Capítulo 8.
- [2] M.V. Encinas, C.M. Previtali, S. Bertolotti, *Anthracene singlet quenching by indoles in media of different polarities: mechanism and chemical photoreaction*, J. Chem. Soc. Faraday Trans., 92, (1996), 17.
- [3] H.A. Montejano, J.J. Cosa, H.A. Garrera, C.M. Previtali, *Solvent effects on the photoinduced electron transfer reaction between excited singlet pyrene and indole*, Photochem. Photobiol. A: Chem., 86, (1995), 115.
- [4] J.A. Baltrop, J.D. Coyle, *Principles of photochemistry*, Jhon Wiley & Sons, New York, 1978. Capítulo 5.
- [5] G. Merényi, J. Lind, X. Shen, *Electron transfer from indoles, phenol and sulfite to chlorine dioxide*, J. Phys. Chem. 92, (1988), 134.
- [6] S. V. Jovanovic, S. Steenken, *Substituent effects on the spectral, acid-base, and redox properties of indolyl radicals: a pulse radiolysis study*, J. Phys. Chem. 96, (1992), 6674.
- [7] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical methods. Fundamentals and applications*, Jhon Wiley & Sons, New York, 1980. Capítulo 2.
- [8] S. L. Murov, I. Carmichael and G. L. Hug, *Handbook of Photochemistry*, 2nd. ed., Marcel Dekker, New York, 1993
- [9] G. J. Kavarno, *Fundamentals of Photoinduced Electron Transfer*, VCH, New York, 1993.
- [10] F. Meeus, M. Van der Auweraer, F.C. De Schryver, *Thermodynamic and kinetic aspects of the intermolecular exciplex formation between 2-methylnaphthalene and aliphatic amines*, J. Am. Chem. Soc. 102, (1980), 4017.
- [11] E. Vander Donckt, D. Liétaer, M. Matagne, *Quenching by dimethylmercury of 1,2-benzanthracene fluorescence via an exciplex*, J. Chem. Soc. Faraday Trans. II 69, (1973), 322.
- [12] E.L. Wehry, *Modern fluorescence spectroscopy*, Tomo 2, Plenum Press, New York, 1976. Capítulo 8.
- [13] E.A. Lissi, M. A. Rubio, M. Fuentealba, J. Photochem., 37, (1987), 205

[14] J.A. Baltrop, J. D. Coyle, *Principles of photochemistry*, J. Wiley & Sons, New York. 1978. Capítulo 3.



## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### MEDIOS ORGANIZADOS.

#### V-1-Inhibición de fluorescencia de ANT por compuestos indólicos en vesículas.

Se realizó el estudio de la inhibición de fluorescencia de ANT por compuestos indólicos en vesículas. Los compuestos indólicos usados fueron: 1,2-dimetilindol (DMI), indol (IN), l-triptofano (TRP) y ácido 3-indolacético (IAA).

El objetivo de realizar dicho estudio es analizar cómo el mecanismo de inhibición de fluorescencia es afectado por el tipo de vesículas, unilaminares o multilaminares, por el estado de fase y por la identidad de los fosfolípidos que las constituyen. Para la preparación de las vesículas se usaron los fosfolípidos palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC) y dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC). Estos fosfolípidos presentan diferentes temperatura de transición de fase,  $T_f$ , del estado gel al líquido-cristalino [1, 2]. La  $T_f$  de las vesículas preparadas con POPC es de  $-22\text{ }^\circ\text{C}$  [3] y la correspondiente a las vesículas de DMPC es de  $24\text{ }^\circ\text{C}$  [4]. Por lo tanto, es posible analizar los efectos del cambio de fase de las vesículas de DMPC en un rango de temperatura fácilmente accesible en las condiciones experimentales.

Al igual que en los medios homogéneos, se determinaron experimentalmente las constantes bimoleculares de la velocidad de inhibición de fluorescencia ( $k_q$ ) a partir de los gráficos de Stern-Volmer de  $I_0/I$  en función de la concentración analítica del derivado indólico tal como se explicó en la Sección IV-1 [5], donde  $I_0$  e  $I$  son las intensidades de la primera banda vibrónica de ANT a 380 nm en ausencia y presencia del inhibidor respectivamente. En estas experiencias, al igual que en los medios homogéneos, se llegó a valores de la relación  $I_0/I$  menores que 3.

#### V-1-1-Estudio de la inhibición de fluorescencia de ANT por compuestos indólicos en vesículas unilaminares de POPC y DMPC en condiciones estáticas.

En la Figura V. 1 se muestra como la emisión de ANT es inhibida por el agregado de DMI en vesículas unilaminares de POPC. En esta Figura además se puede

Faint text line in the upper left quadrant.

Faint text line in the upper right quadrant.

Faint text line in the middle left quadrant.

Faint text line in the middle right quadrant.



observar la formación del excíplejo ANT-DMI. El excíplejo formado por este par fluoróforo-inhibidor también fue encontrado en los medios homogéneos de polaridad baja o intermedia tal como se describe en la Sección IV-1-2-2. El sentido de las flechas indica que a medida de que se agrega DMI la intensidad de la emisión de ANT disminuye y la intensidad de la emisión del excíplejo aumenta. El gráfico inserto en la Figura V. 1 corresponde a la ampliación de los espectros de emisión de ANT en el rango de las longitudes de onda correspondientes a la emisión del excíplejo.

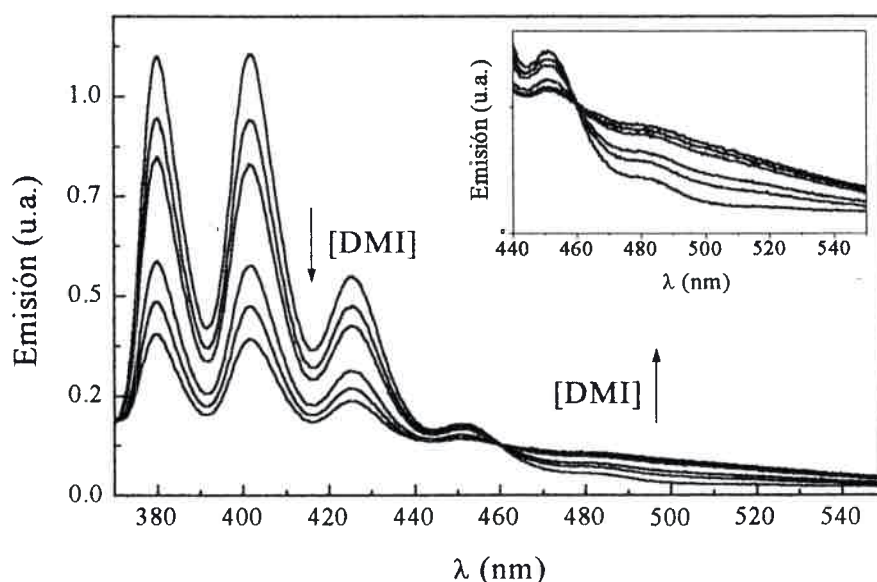


Figura V. 1: Espectros de inhibición de ANT por DMI en vesículas unilaminares de POPC y formación del excíplejo. El gráfico inserto: corresponde a la ampliación de los espectros de emisión de ANT en el rango de las longitudes de onda correspondientes a la emisión del excíplejo. Temperatura ambiente.  $[POPC] = 2.30 \times 10^{-4} \text{ M}$ ,  $[DMI]$  analíticas = 0; 0,059; 0,12; 0,33; 0,50; 0,68 mM.  $\lambda$  exc.: 340 nm.

En la Figura V. 2 se muestra la inhibición de ANT por IN en vesículas unilaminares de DMPC en la fase líquido-cristalina. Los espectros de inhibición de ANT por IAA y TRP son similares a los encontrados para la inhibición de este fluoróforo provocada por IN, o sea que no se observa la formación del excíplejo emisor.

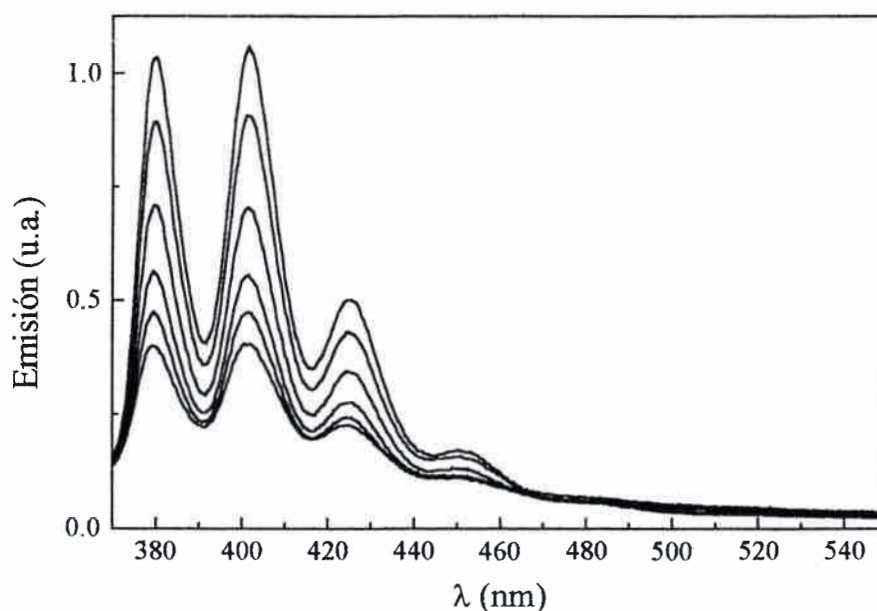


Figura V. 2: Espectros de inhibición de ANT por IN en vesículas unilaminares de DMPC en la fase líquido-cristalina, temperatura 35,2 °C. [DMPC] =  $1,87 \times 10^{-4}$  M, [IN] analíticas = 0; 0,241 0,768; 2,04; 3,68; 6,75 mM.  $\lambda$  exc.: 340 nm.

Al analizar el fenómeno de inhibición de fluorescencia en estos medios organizados es necesario considerar que las moléculas de las diferentes especies pueden particionar entre los distintos microentornos y en consecuencia presentar concentraciones locales efectivas diferentes a las analíticas. En la Figura V. 3 se muestran los gráficos de Stern-Volmer correspondientes a las Figuras anteriores usando las concentraciones analíticas de los inhibidores. Posteriormente, en la Sección V-3-1, se analizará el comportamiento de estos inhibidores con respecto a la partición y se presentarán los gráficos de Stern-Volmer corregidos por las concentraciones efectivas.

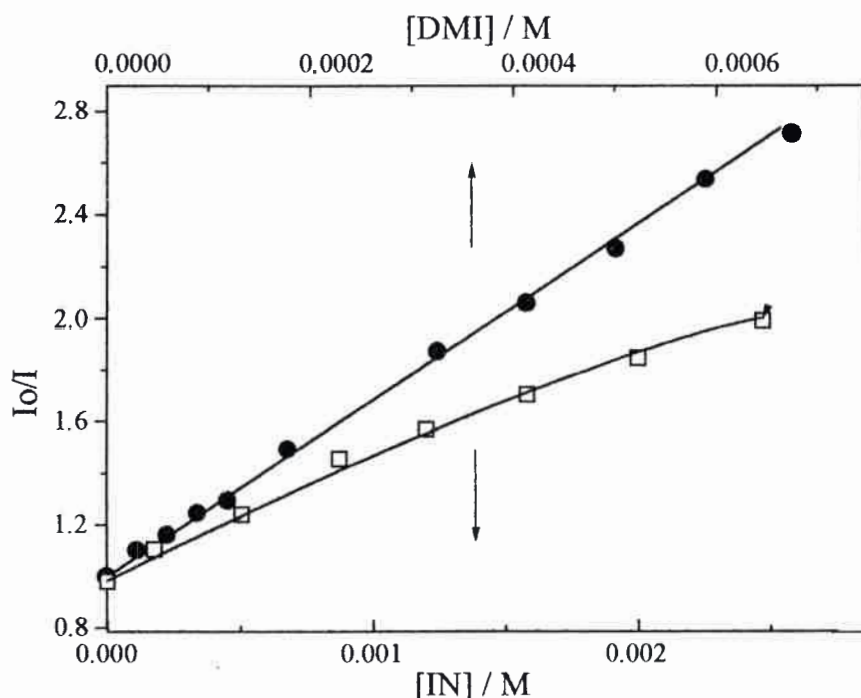


Figura V. 3: Gráficos de Stern-Volmer para la inhibición de la fluorescencia de ANT por DMI (●) y por IN (□), en concentraciones analíticas de ambos inhibidores.  $\lambda$  exc.: 340 nm en ambos casos. Inhibición provocada por DMI en vesículas unilaminares de POPC, temperatura ambiente. Inhibición provocada por IN en vesículas unilaminares de DMPC, temperatura 35,2 °C.

Se observa en la Figura V. 3 que la inhibición provocada por DMI presenta un comportamiento clásico de la ecuación de Stern-Volmer. Mientras que en la inhibición causada por IN exhibe una curvatura hacia abajo. Esta curvatura puede ser explicada por dos motivos. En primer lugar se podría considerar que ANT presenta una fracción inaccesible a IN debido a que como este último es más polar al particionar se ubicaría en una región de la interfase de mayor polaridad que el fluoróforo. Este comportamiento no se observaría para DMI ya que los dos sustituyentes metilos provocan una mayor hidrofobicidad que hace que se ubique en regiones de menor polaridad que IN de modo que todas las moléculas de ANT le sean igualmente accesibles. Posteriormente, en la Sección 2-2-1-1 de este Capítulo se describirán detalladamente resultados que indican que DMI sensa un microentorno diferente con respecto a IN lo que le permitiría al

inhibidor dimetilado acceder a todas las moléculas de ANT y provocar la desactivación con un comportamiento clásico de la ecuación de Stern-Volmer. La otra causa que provocaría la curvatura es que este inhibidor es menos eficiente que DMI tal como se observa al comparar sus concentraciones; DMI eje horizontal superior e IN eje horizontal inferior de la Figura V. 3. El hecho de que en las experiencias de inhibición sea necesario agregar mayor cantidad de IN podría estar alterando la estructura de las vesículas afectando a la distribución del fluoróforo y del inhibidor. Esta modificación en las estructuras podría causar una disminución en la eficiencia de la inhibición con la consecuente curvatura hacia abajo.

Para calcular los valores de las constantes bimoleculares de la velocidad de inhibición de fluorescencia,  $k_q$ , en las vesículas es necesario conocer el valor del tiempo de vida de ANT en cada caso. En la Figura V. 4 se muestra la medida del decaimiento de fluorescencia de ANT en vesículas DMPC en la fase líquido-cristalina a la relación DMPC/ANT 100/1. Este decaimiento fue medido por medio de la técnica de conteo de fotón único [6]. Se usaron como criterios de ajuste del análisis de cuadrados mínimos [6] de la medida anterior al valor de chi cuadrado reducido,  $\chi_v^2$ , de 1,2 y al gráfico de los residuos pesados (ver en el Capítulo III en la Sección 5). En la Tabla V. 1 se muestran los valores del tiempo de vida medio de ANT codisuelto en las dispersiones de las vesículas equilibradas en aire.

Tabla V. 1: Valores de tiempos de vida media ( $\tau$ ) en ns de ANT codisuelto en las vesículas. Temperatura (T) indicada en cada caso en °C. Dispersiones equilibradas en aire.

Medio	$\tau$	T
POPC/ANT 100/1	3,8	25,0
DMPC/ANT 100/1	3,9	35,4
DMPC/ANT 100/1	3,6	15,5

Debido a que el error estimado de los tiempos de vida media en estas

dispersiones es de  $\pm 0,1$  ns, se puede considerar que ANT presenta prácticamente el mismo  $\tau$  en la fase líquido-cristalina de las vesículas de ambos fosfolípidos.

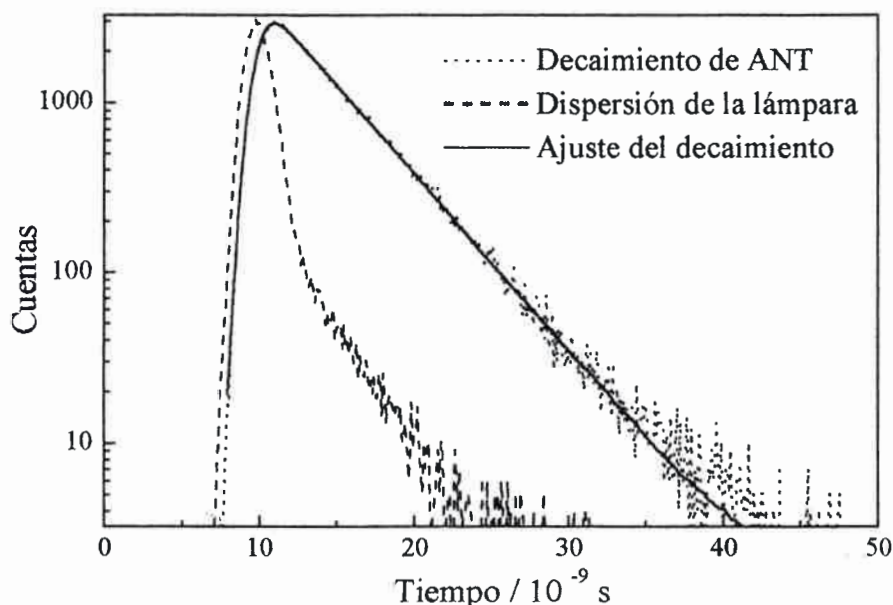


Figura V. 4: Decaimiento de fluorescencia de ANT codisuelto en vesículas DMPC en la fase líquido-cristalina a la relación molar DMPC/ANT 100/1.  $[DMPC] = 5.06 \times 10^{-4}$  M.  $\lambda$  exc.: 343 nm y  $\lambda$  emis.: 483 nm. Temperatura 34,5 °C. Dispersión equilibrada en aire. Ajuste del decaimiento: monoexponencial con  $\tau$  igual a 3,9 ns.

En la Tabla V. 2 se muestran los valores de las constantes bimoleculares de la velocidad de inhibición de fluorescencia,  $k_q$ , correspondientes a DMI y a IN. Para encontrar el valor de  $k_q$  de la inhibición provocada por IN se trabajó con la pendiente inicial del gráfico de Stern-Volmer de la Figura V. 3.

Los valores mostrados corresponden al promedio de tres mediciones realizadas con concentraciones iguales de fosfolípidos y sus errores correspondientes caen en un rango de aproximadamente  $\pm 10$  %. Se observa que los valores de  $k_q$  mostrados en la Tabla V. 2 son mucho mayores que los encontrados para la inhibición de ANT por IN y DMI en los medios homogéneos polar y no polar, ver Tablas en el Capítulo IV en las Secciones 2 y 3-1; siendo también mucho mayor que el valor del límite difusional correspondiente en cada medio como por ejemplo de  $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  en acetonitrilo [7].

Por otro lado, se encuentra que la tendencia de los valores de las constantes para la inhibición por IN y DMI en las vesículas es la misma que presentan dichas inhibiciones en el solvente polar acetonitrilo. Además, se observa que para DMI el estado de fase de las vesículas afecta a los valores de las constantes, siendo la tendencia observada tal que  $k_q$  es mayor en el estado de fase líquido-cristalino, en tanto que para IN no se observan estos cambios.

Tabla V. 2: Constantes bimoleculares de la velocidad de inhibición de fluorescencia ( $k_q$ ) de la inhibición de ANT por DMI y IN en vesículas unilaminares de POPC y DMPC, en unidades de  $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Entre paréntesis se indica la temperatura de cada experiencia.

Inhibidor	POPC		DMPC
	Fase líq-crist.	Fase gel	Fase líq-crist.
DMI	680 (Temp. ambiente)	850 (15,9 °C)	1260 (35,3 °C)
IN	190 (Temp. ambiente)	165 (15,4 °C)	180 (35,2 °C)

En la Figura V. 5 se muestran los gráficos de Stern-Volmer correspondientes a la inhibición de ANT por IAA y TRP en las vesículas unilaminares de POPC. Se encuentra que estos inhibidores se comportan de manera similar. Se observa claramente que ambos exhiben una curvatura hacia abajo en el gráfico de Stern-Volmer.

Para encontrar el valor de  $k_q$  de la inhibición provocada por IAA y TRP se interpretó que la curvatura de los gráficos es debida a que no todo el fluoróforo es accesible a los inhibidores [5]. En estos casos, en que no todo el fluoróforo es accesible a los inhibidores, los datos de la relación de las intensidades en función de la concentración de los inhibidores deben ser analizados considerando dos fracciones de fluoróforo: una accesible y la otra inaccesible a los inhibidores.





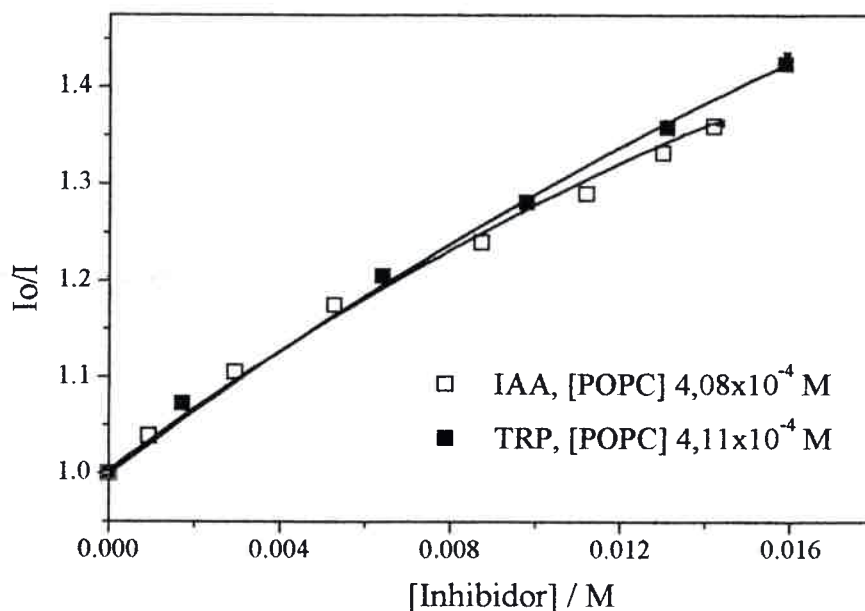


Figura V. 5: Gráficos de Stern-Volmer para la inhibición de la fluorescencia de ANT por IAA y TRP en vesículas unilaminares de POPC. En concentraciones analíticas de ambos inhibidores.  $\lambda$  ex.: 358 nm en ambos casos.

La intensidad total de fluorescencia en ausencia del inhibidor es:

$$\text{Ecuación V. 1} \quad I_0 = I_{0 \text{ acc}} + I_{0 \text{ inacc}}$$

Donde  $I_{0 \text{ acc}}$  es la intensidad de fluorescencia correspondiente a la fracción de fluoróforo accesible al inhibidor y  $I_{0 \text{ inacc}}$  es la intensidad de fluorescencia correspondiente a la fracción de fluoróforo inaccesible al inhibidor.

En presencia del inhibidor se afecta solamente la intensidad de fluorescencia de la fracción accesible la cual varía según la ecuación de Stern-Volmer, en consecuencia la intensidad total es igual a:

$$\text{Ecuación V. 2} \quad I = \frac{I_{0 \text{ acc}}}{1 + k_{sv} [In]} + I_{0 \text{ inacc}}$$

donde  $k_{sv}$  es la constante de Stern-Volmer de la fracción accesible igual al producto de  $k_q$  (de la fracción accesible) y  $\tau_0$  del fluoróforo y  $[In]$  es la concentración analítica del

inhibidor. Realizando la resta de estas ecuaciones se llega a:

$$\text{Ecuación V. 3} \quad \Delta I = I_0 - I = I_{0acc} \left( \frac{k_{SV}[In]}{1 + k_{SV}[In]} \right)$$

La inversión de la ecuación anterior seguida por la división de la Ecuación V. 1 da la siguiente relación [5]:

$$\text{Ecuación V. 4} \quad \frac{I_0}{\Delta I} = \frac{1}{Xk_{SV}[In]} + \frac{1}{X}$$

donde  $X$  es la fracción de ANT accesible al inhibidor definida como  $\frac{I_{0acc}}{I_{0acc} + I_{in0acc}}$ .

A partir del gráfico de la Ecuación V. 4 de  $\frac{I_0}{\Delta I}$  vs  $[In]^{-1}$  se obtienen los datos de  $k_{SV}$  y  $X$ . En la Figura V. 6 se muestra el gráfico de la Ecuación V. 4 para la inhibición de ANT por TRP en vesículas unilaminares de POPC mostrados previamente en la Figura V. 5.

En la Tabla V. 3 se muestran los resultados de las constantes bimoleculares de la velocidad de inhibición,  $k_q$  y  $X$  obtenidos para los diferentes derivados indólicos en las vesículas de POPC en la fase líquido-cristalina y de DMPC en las fases gel y líquido-cristalina. Las magnitudes de  $k_q$  fueron calculadas a partir de los valores de  $k_{SV}$  obtenidos en el ajuste no lineal del gráfico de la Ecuación V. 4.

Se observa que los valores de  $k_q$  mostrados en la Tabla V. 3 son menores que los encontrados para la inhibición de ANT por IN y DMI en este tipo de vesículas. Por otro lado, TRP y IAA se comportan de manera similar frente a ANT tanto en su capacidad como inhibidores como en la fracción de ANT que pueden inhibir. Además se encuentra que los valores de la fracción de ANT accesible para éstos son de alrededor de 0,5. Esto podría explicarse considerando que los inhibidores se agregan posteriormente a la preparación de las vesículas unilaminares (ver Sección III-3-1-2 en la que se explica la incorporación de solutos a las vesículas unilaminares) y permanecen ubicados solamente en la interfase externa de éstas, únicamente pueden inhibir a las moléculas de ANT ubicadas en la monocapa externa de estos sistemas organizados. Si se supone una distribución uniforme de ANT entre las bicapas de estas vesículas, es correcto considerar que alrededor de la mitad de su población pueda ser inhibida.

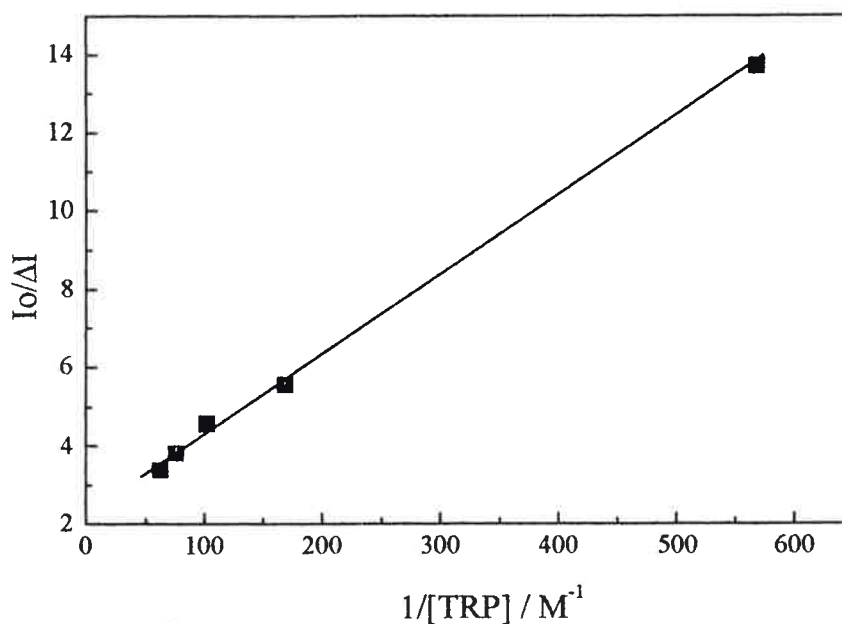


Figura V. 6: Gráfico de Stern-Volmer modificado (ver Ecuación V. 4) para la inhibición de la fluorescencia de ANT por TRP en vesículas unilaminares de POPC. En concentraciones analíticas de TRP.  $\lambda$  ex.: 358 nm. A partir del ajuste se obtienen los datos de  $K_{SV}$  y  $X$ .

Tabla V. 3: Constantes bimoleculares de la velocidad de inhibición de fluorescencia, ( $k_q$ ) en unidades de  $10^9 M^{-1} s^{-1}$  y fracción de ANT accesible a los inhibidores ( $X$ ) en vesículas unilaminares de POPC y DMPC.

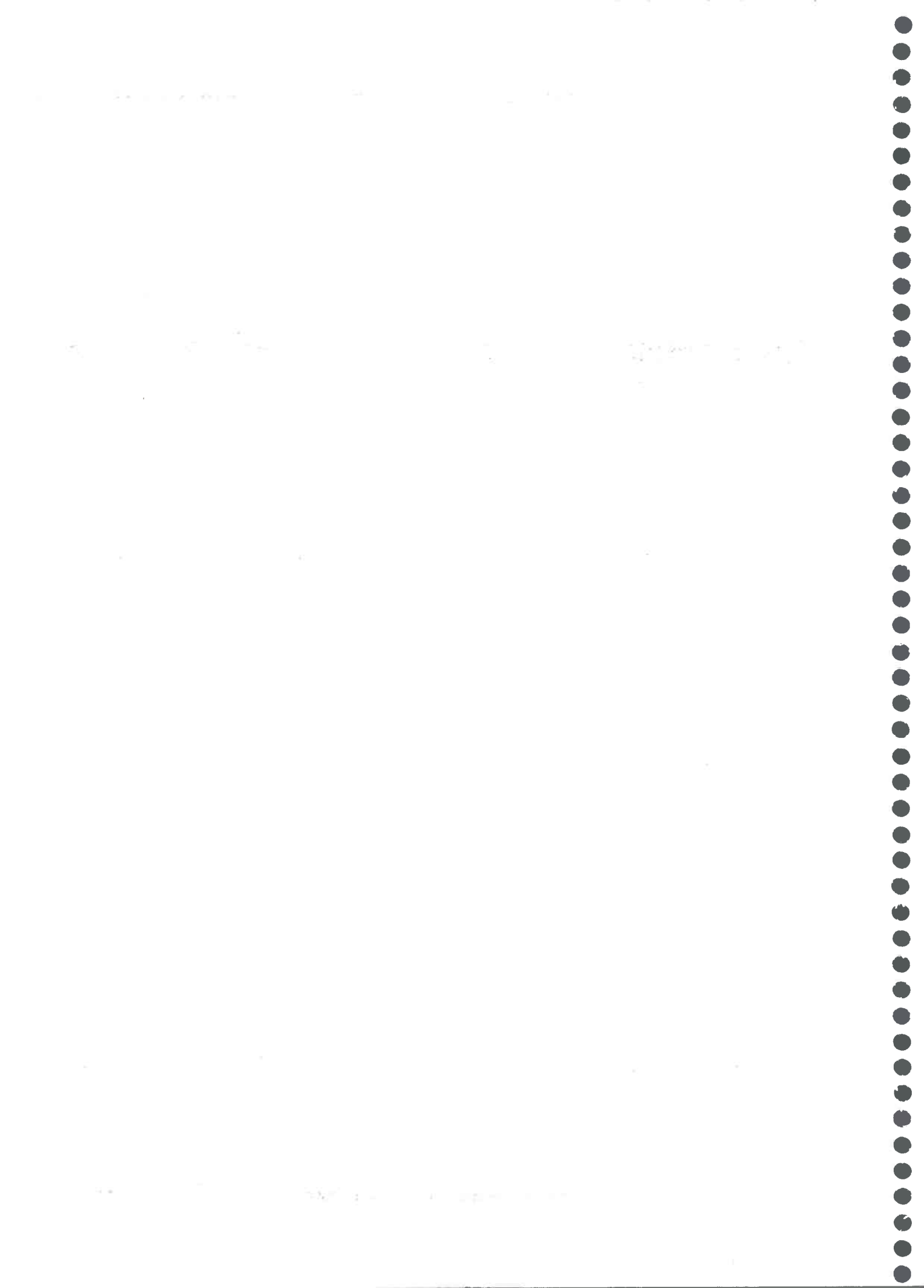
Inhibidor	POPC		DMPC			
	Fase líq-crist. (Temp. ambiente)		Fase gel (14,0 °C)		Fase líq-crist. (37,3 °C)	
	$k_q$	$X$	$k_q$	$X$	$k_q$	$X$
TRP	29,6	0,44	48,7	0,65	45,0	0,62
IAA	28,2	0,43				

Con respecto al efecto del cambio de fase de las bicapas, solamente estudiado para TRP, se observa que el estado de fase no afecta al valor de  $k_q$ .

#### V-1-2-Estudio de la inhibición de fluorescencia de ANT por compuestos indólicos en vesículas unilaminares en condiciones dinámicas.

Para completar el estudio de la inhibición de fluorescencia de ANT en las bicapas lipídicas unilaminar es se realizaron medidas de fluorescencia resueltas en el tiempo. Dichas experiencias no pudieron ser analizadas con éxito debido a que los ajustes de los datos son multiexponenciales [8] sin presentar una tendencia determinada lo que complica hacer una correcta interpretación física. Por otro lado, se intentó analizar dichos datos por medio del modelo de distribuciones de tiempos de vida [8]. Este último modelo es utilizado para estudiar situaciones en las que no se esperan encontrar un número discreto de tiempos de decaimiento, sino una distribución de los tiempos de decaimiento; tal como es el análisis de una experiencia de inhibición de fluorescencia en vesículas. Lo anterior es debido a que cuando el fluoróforo y el inhibidor se encuentran en alguna región de las vesículas, se originan diferentes microentornos lo que provoca que la distribución de los tiempos de decaimientos se extienda. Tampoco, por medio de este modelo de distribución se encontraron resultados con sentido físico.

Con respecto al análisis de los datos de emisión resuelta en el tiempo en vesículas es de interés considerar los resultados y las conclusiones de Ladokhin y otros [9]. Ellos estudiaron las componentes de los tiempos de vida de TRP en agua y las correspondientes a IN en una mezcla agua:glicerol 3:2 V/V a 10 °C. El objetivo de ese trabajo fue corroborar que la interpretación de la heterogeneidad de los tiempos de vida de fluorescencia en membranas no es simple. Encontraron por medio de espectros de decaimiento asociados obtenidos por medio del modelo de análisis global [8] que ambos compuestos presentan resultados similares: dos componentes de los tiempos de vida para cada uno, en los que el mayor  $\tau$  posee mayor amplitud a lo largo del espectro. Para el caso de TRP no es novedoso encontrar este tipo de resultados y se lo explica debido a la presencia de distintas formas de conformeros. Lo novedoso es que IN, que no puede presentarse en distintos rotámeros, presenta igual resultado que TRP en la mezcla



agua:glicerol 3:2 V/V a 10 °C. La explicación de estos autores es que la relajación estructural del ambiente que rodea a IN puede producir un decaimiento complejo de la fluorescencia. Además, estos autores [9] compararon los resultados encontrados con el análisis de difracción de rayos X con modelos estructurales obtenidos en sus laboratorios. A pesar de este estudio exhaustivo, ellos consideran que el significado de las componentes individuales de los decaimientos en péptidos en membranas y proteínas es ambiguo.

#### V-1-3-Inhibición de fluorescencia de ANT por compuestos indólicos en vesículas multilaminares de POPC.

En la Figura V. 7 se muestra la inhibición provocada por DMI en vesículas multilaminares de POPC.

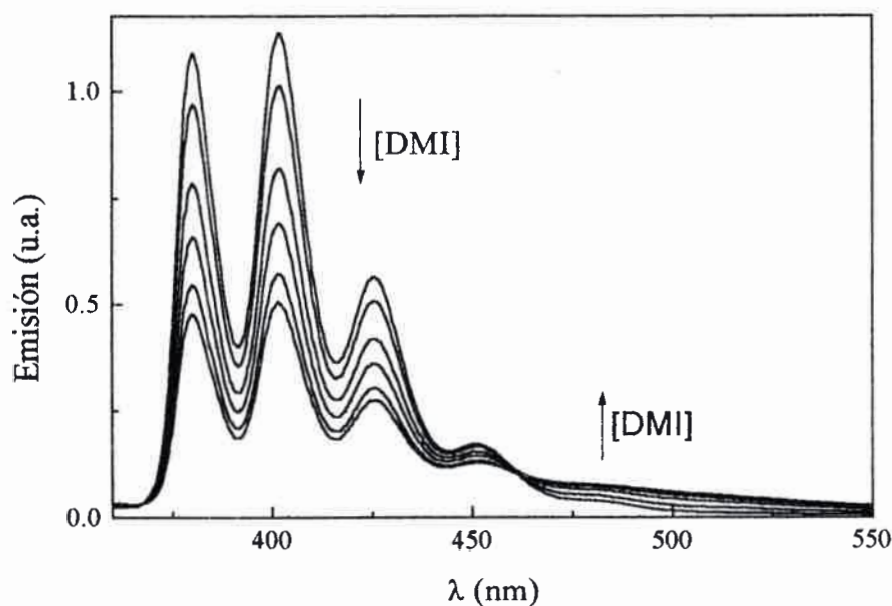


Figura V. 7: Espectros de inhibición de ANT por DMI en vesículas multilaminares de POPC y formación del excíplejo. [POPC] =  $5,81 \times 10^{-4}$  M, [DMI] analíticas = 0; 0,040; 0,12; 0,20; 0,28; 0,35 mM. Temperatura ambiente.  $\lambda$  exc.: 340 nm.

Este estudio se realizó para analizar como afecta la estructura multilaminar a la reacción bimolecular y a la formación del excíplejo.

Tanto en el ejemplo mostrado anteriormente, como las experiencias de inhibición de ANT por IN, IAA y TRP en las vesículas multilaminares se observa el mismo comportamiento que en las vesículas unilaminares. Los gráficos de Stern-Volmer para cada inhibidor siguen las mismas tendencias que las encontradas antes. En consecuencia el análisis de los resultados obtenidos en las vesículas multilaminares para cada inhibidor es el mismo que en las vesículas unilaminares, tal como fue descrito en la Sección anterior.

En la Tabla V. 4 se muestran los resultados de las constantes bimoleculares de la velocidad de inhibición de fluorescencia y de la fracción de ANT accesible a los inhibidores para la inhibición de ANT en vesículas multilaminares de POPC. Para llegar a los valores de esta Tabla fue necesario medir el tiempo de vida de ANT en las vesículas multilaminares de POPC y se obtuvo el mismo ajuste monoexponencial que en las vesículas unilaminares con un tiempo de vida ( $\tau_0$ ) igual a 3,80 ns.

Tabla V. 4: Constantes bimoleculares de la velocidad de inhibición de fluorescencia ( $k_q$ ) y fracción de ANT accesible a los inhibidores ( $X$ ) para la inhibición de ANT en vesículas multilaminares de POPC a temperatura ambiente, en unidades de  $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

Inhibidor	$k_q$	$X$
DMI	800	1
IN	184 <sup>a</sup>	1
IAA	23,7	0,20
TRP	21,1	0,27

<sup>a</sup> calculado a partir de la pendiente inicial del gráfico de Stern-Volmer

Se encuentra que los valores de las constantes bimoleculares de la velocidad de inhibición de fluorescencia de ANT en las vesículas multilaminares de POPC son



similares a los encontrados en las vesículas unilaminares de POPC y DMPC mostrados en la Tabla V. 2 y en la Tabla V. 3.

Lo que difiere con respecto a lo encontrado en las vesículas unilaminares son los valores de las fracciones de ANT accesibles a IAA y TRP. Se observa que estos inhibidores continúan comportándose de manera similar entre ellos, pero que las fracciones de ANT accesible a éstos son menores que las encontradas en las experiencias en las vesículas unilaminares. Esto es debido a que durante el proceso de preparación de las vesículas multilaminares ANT queda distribuido tanto en la bicapa externa como en las internas, de las múltiples bicapas concéntricas, ver Sección III-3-2-1 en la que se explica la incorporación de solutos a las vesículas multilaminares. Debido a esta distribución del fluoróforo, y a que los inhibidores se agregan posterior a la preparación de las vesículas y permanecen ubicados solamente en la interfase externa de éstas, IAA y TRP solamente pueden inhibir a una menor fracción de ANT.

#### V-2-Distribución de solutos en las vesículas.

Como puede verse en las Tablas V. 1 a V.3 los valores de  $k_q$  obtenidos usando las concentraciones analíticas de los inhibidores, son mucho mayores que los correspondientes en los medios homogéneos. Además, otro hecho que indica diferente comportamiento en los medios organizados con respecto a los homogéneos es la curvatura que presentan los gráfico de Stern-Volmer para la inhibición de ANT por IN y DMI tal como se muestra en la Figura V. 3. Estas diferencias son causadas, principalmente, por la compartimentalización de ANT y de los inhibidores, que origina que las concentraciones locales de estas especies en las vesículas sean mayores que sus concentraciones analíticas. Por otro lado, como la tendencia que presentan los valores de  $k_q$  de IN y DMI en las vesículas (uni y multilaminares) es la misma que la encontrada en el medio homogéneo polar se puede considerar que el fenómeno de la inhibición de ANT ocurre en una región de las vesículas de polaridad relativamente alta.

Estos hechos implican que, para realizar el estudio de la inhibición de fluorescencia de ANT por compuestos indólicos en las vesículas es necesario poseer primero una cabal comprensión sobre la distribución de las distintas moléculas en estos

medios organizados. Posteriormente, las concentraciones deben ser corregidas de modo que se consideren las concentraciones locales efectivas en las vesículas.

Para realizar el estudio de la distribución de los distintos solutos es conveniente trabajar con sistemas organizados que no presenten un alto grado de posibles sitios de solubilización y además que sean reproducibles en sus preparaciones. Solamente las vesículas unilaminares, y no las multilaminares, presentan sistemas organizados adecuados para realizar diferentes tipos de estudios sistemáticos. En consecuencia, se analizará la distribución de las diferentes especies solamente en las vesículas unilaminares preparadas mediante el método de extrusión, ver Sección III-3-1-1 y III-3-1-2 en la que se explica el procedimiento de preparación y la incorporación de solutos respectivamente.

El análisis de la distribución de las diferentes moléculas en las vesículas unilaminares de POPC y DMPC se realizó por medio de espectros de emisión de fluorescencia y medidas de tiempos de vida media.

#### V-2-1-Antraceno

Se estudió la emisión de ANT codisuelto en las vesículas a diferentes relaciones fosfolípido/ANT. En la Figura V. 8 se muestran los espectros de emisión de ANT a diferentes relaciones de concentraciones molares analíticas del fosfolípido POPC con respecto a ANT. Dichos espectros están normalizados en el máximo de la segunda banda de emisión en 401,5 nm. En esta Figura se observa que el comportamiento de ANT a la relación 10/1 es diferente que a las relaciones 100/1 y 500/1. La principal alteración que ocurre es la atenuación del espectro a menores longitudes de onda a la relación 10/1 ya que la emisión de fluorescencia de esta región es absorbida por el mismo fluoróforo. Este efecto es notable para ANT debido a que sus espectros de emisión y absorción presentan un solapamiento significativo [10]. En los casos, en donde hay presente mayor proporción de fosfolípido, los espectros de ANT no varían con el aumento de la concentración vesículas. En estas situaciones ANT se encuentra en las vesículas y no presenta efecto de filtro interno.

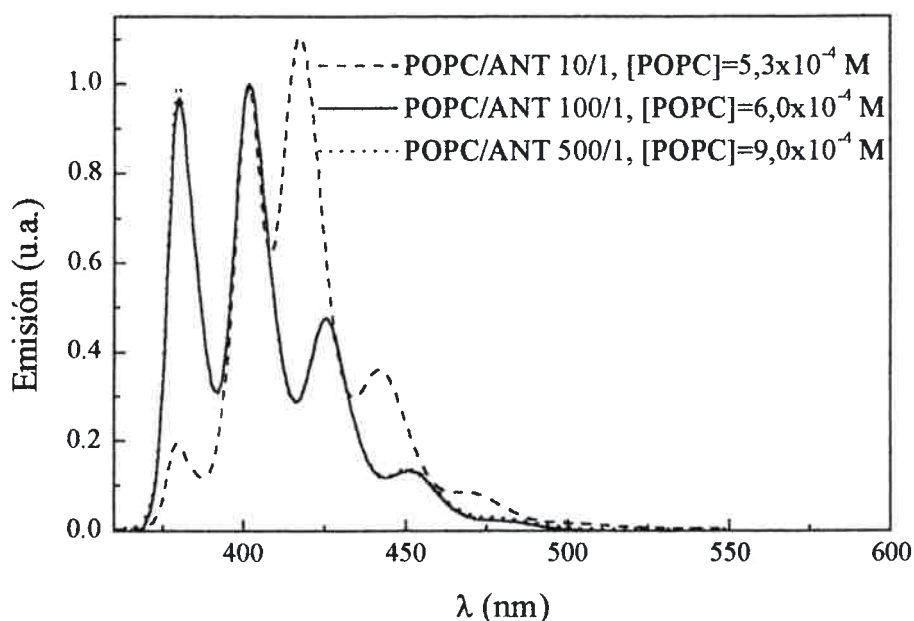


Figura V. 8: Espectros de emisión de fluorescencia de ANT codisuelto en las vesículas de POPC a diferentes relaciones POPC/ANT.  $\lambda$  exc.: 340 nm. Los espectros están normalizados en 401,5 nm.

Debido a los resultados anteriores, todas las experiencias se realizaron a una relación fosfolípido/ANT de 100/1 a no ser que se indique lo contrario.

En la Figura V. 9 se muestran los espectros de emisión de ANT codisuelto en las vesículas a la relación POPC/ANT 100/1 y del blanco del medio organizado en las mismas condiciones experimentales. La emisión de las vesículas “vacías” probablemente es debida a impurezas del fosfolípido. Por lo anterior las experiencias de emisión de fluorescencia en vesículas se realizaron restando el blanco correspondiente.

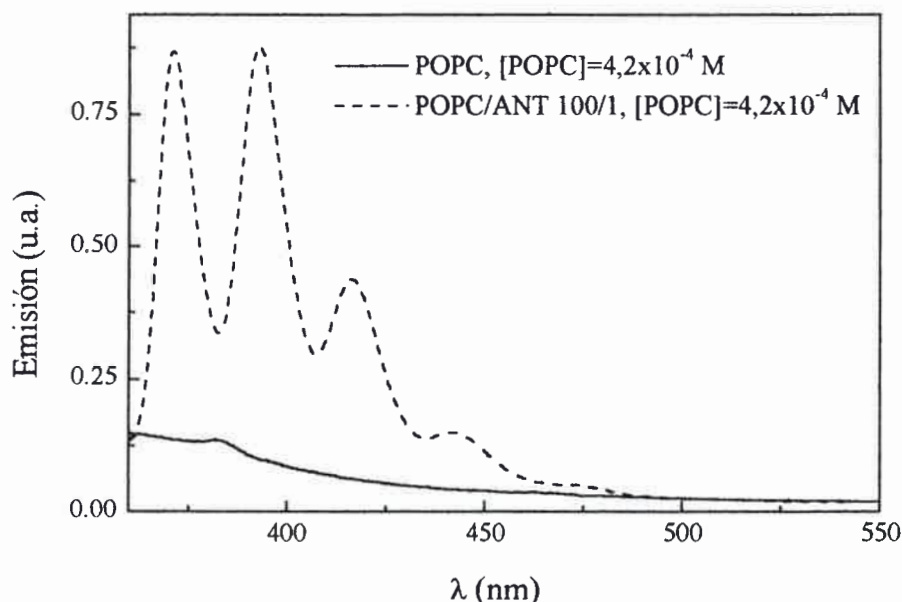


Figura V. 9: Espectros de emisión de fluorescencia de ANT codisuelto en vesículas de POPC y blanco de vesículas. Relación POPC/ANT: 100/1.  $\lambda$  ecx.: 340 nm.

Por otro lado, se estudió la emisión de ANT en la solución del buffer en ausencia de fosfolípido a igual y menores concentraciones analíticas. Se encontró que es distinta a la que se obtiene en presencia de las vesículas. Este hecho sería debido principalmente a la agregación de las moléculas aromáticas en el medio homogéneo agua. En la Figura V. 10 se muestran los cambios en la emisión en el buffer de diferentes concentraciones de ANT. Se observa que las relaciones de intensidad de los picos varía con la concentración indicando de este modo que los cambios son debidos a la agregación y al efecto de filtro interno de ANT. A estas soluciones de ANT en el buffer se les realizaron además medidas de tiempos de vida media de fluorescencia y las curvas obtenidas no corresponden a un decaimiento monoexponencial. Esto, también estaría indicando la agregación de las moléculas de ANT debido a que este compuesto presenta valores de tiempos de vida media monoexponenciales en los medios homogéneos que lo solubilizan totalmente.

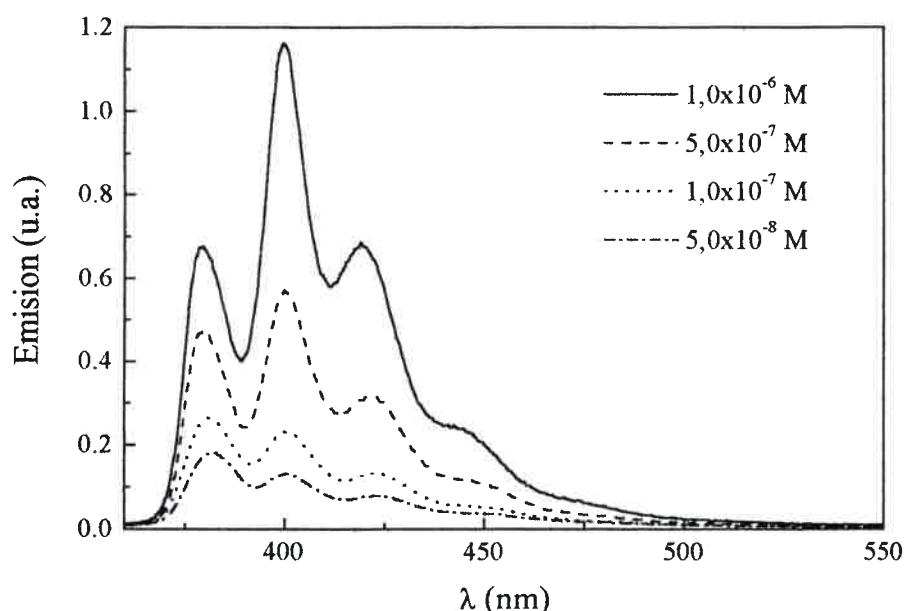


Figura V. 10: Espectros de emisión de fluorescencia de diferentes concentraciones de ANT en buffer.  $\lambda$  exc.: 340 nm.

Al analizar el comportamiento de la emisión de ANT en ausencia y presencia de las vesículas, ver Figura V. 8 y Figura V. 10, se observa:

-en el buffer y en la relación fosfolípido/ANT 10/1 está presente el fenómeno de filtro interno.

-la emisión es igual en las relaciones fosfolípido/ANT de 100/1 y de 500/1 con la concentración de fosfolípido del orden de 0,1 mM. Por lo tanto se puede suponer que el compuesto aromático está totalmente solubilizado en la fase de la membrana y que no presenta filtro interno. Además, la emisión de ANT en presencia de las vesículas es similar a la encontrada en medios en los que se solubiliza totalmente.

Para determinar la ubicación del fluoróforo en las distintas regiones de la bicapa se comparó la emisión de fluorescencia de ANT en vesículas con la observada en medios homogéneos de diferentes constante dieléctrica. Se trabajó con n-heptano, etanol, mezcla agua:etanol 2:1 y en vesículas de POPC y DMPC. En la Figura V. 11 se muestran los

espectros de emisión de fluorescencia de ANT normalizados en la banda de emisión de alrededor de 400 nm en diferentes medios y en la Figura V. 12 se comparan las emisiones de ANT en las vesículas de POPC y DMPC a diferentes temperaturas. En la Figura V. 11 se observa que los espectros se corren al rojo al aumentar la polaridad del medio y que el ancho de banda y la relación pico a valle son similares en las vesículas de POPC y en los solventes alcohólicos. Por otro lado, el efecto más notable es el mayor corrimiento al rojo del espectro en las vesículas con respecto a los otros medios, incluso la mezcla agua:etanol 2:1. Dado que para la mezcla anterior la constante dieléctrica a temperatura ambiente es cercana a 60 [11], se podría concluir que ANT en las vesículas de POPC sensa una región de polaridad relativamente alta. Usualmente se considera [12] que la constante dieléctrica de las aumenta desde 2 hasta 80 desde la región central de la bicapa hasta las regiones de las cabezas polares de las glicerofosfatidilcolinas hidratadas respectivamente. Lo anterior estaría indicando que ANT en las vesículas, se ubicaría próximo a la interfase vesícula-agua y/o en una región de la bicapa con un alto contenido de agua. Yau y otros [13] sugieren que la ubicación de moléculas aromáticas en bicapas de POPC queda determinada en gran medida por sus estructuras de electrones  $\pi$  y por el momento cuadrupolar asociado ya que éstos favorecen a que el compuesto permanezca en un microambiente electrostáticamente complejo, como lo es la interfase, y por otro lado la forma rígida limita el acceso a la zona hidrocarbonada de la bicapa por causas entrópicas.

1000000000

1000000000

1000000000

1000000000

1000000000

1000000000

1000000000

1000000000



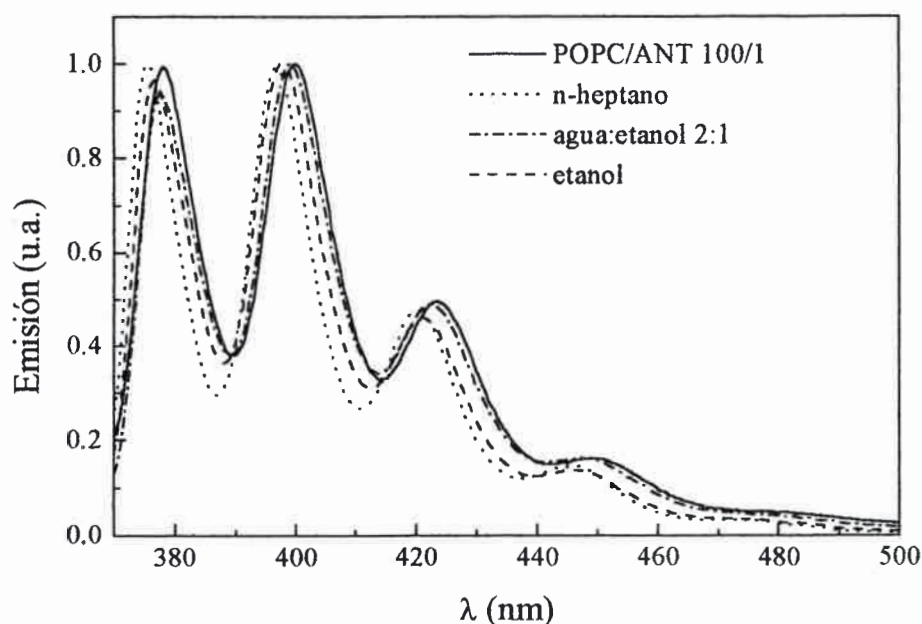


Figura V. 11: Espectros de emisión de fluorescencia de ANT en diferentes medios. [ANT] codisuelto en vesíc. =  $5,00 \times 10^{-6}$  M, [ANT] en n-hept. =  $4,5 \times 10^{-5}$  M, [ANT] en agua:etanol 2:1 =  $3 \times 10^{-7}$  M, [ANT] en etanol =  $6,4 \times 10^{-4}$  M,  $\lambda$  exc.: 340 nm. Los espectros están normalizados en la banda de emisión de alrededor de 400 nm.

En la Figura V. 12 se observa que las posiciones de los máximos de emisión de ANT es muy similar en las vesículas de POPC en la fase líquido-cristalina (22°C) y DMPC en las fases gel (15,9°C) y líquido-cristalina (33,7°C) [14]. De este modo la polaridad que sensa ANT en las diferentes vesículas es semejante indicando que se encuentra ubicado en la misma región de la bicapa tanto en fase gel como en fase líquido-cristalina. Estos resultados coinciden con los encontrados por Lianos y otros [15]. Ellos estudiaron la emisión de naftaleno en vesículas unilaminares de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) a 25°C en la fase gel y a 45°C en la fase líquido-cristalina y hallaron que el hidrocarburo sensa prácticamente iguales micropolaridades en ambos casos y que estas emisiones coinciden con las observadas cuando se usa dioxano como solvente. Estos autores consideran que este comportamiento es común para hidrocarburos aromáticos relativamente pequeños ya que pueden penetrar a la zona no polar de la bicapa tanto en



la fase líquido-cristalina como en la fase gel.

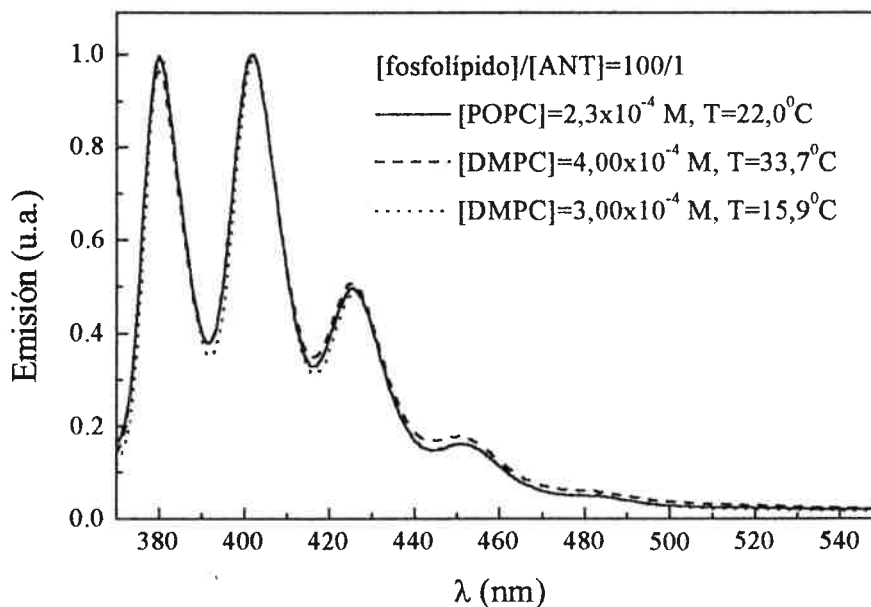


Figura V. 12: Espectros de emisión de fluorescencia de ANT codisuelto en vesículas de POPC Y DMPC. Relación fosfolípidos/ANT 100/1.  $\lambda$  exc.: 340 nm. Los espectros están normalizados.

Otro hecho que apoyaría la suposición sobre una localización relativamente homogénea de ANT en las vesículas es el tipo de decaimiento de la fluorescencia observado. En la Figura V. 4 y en la Tabla V. 1 se mostró que el decaimiento de fluorescencia de ANT en vesículas a la relación fosfolípido/ANT 100/1 presenta un decaimiento monoexponencial. Lo anterior indicaría que ANT presenta una única componente en su decaimiento porque sensa un microentorno relativamente homogéneo.

#### V-2-2-Derivados indólicos

Los compuestos indólicos usados como inhibidores de fluorescencia fueron: IN, DMI, IAA y TRP, en el Capítulo III en la Sección 1 se encuentran las estructuras de dichos compuestos.

La ubicación de los compuestos indólicos en la dispersión de las vesículas

Faint vertical text on the left side, possibly a page number or margin.



depende de sus sustituyentes y de la carga neta que poseen al pH del buffer acuoso. IN y DMI son los compuestos menos polares y con carga neta cero. Mientras que en las condiciones de trabajo, a pH 7,4, el aminoácido TRP se encuentra en equilibrio entre su forma *zwitterionica* y aniónica, estando un 97% presente en la forma *zwitterionica* [16] y el ácido IAA está disociado en más del 99% ya que el valor de  $pK_a$  es de 4,8 [17]. Por lo tanto estos últimos son los derivados indólicos más polares.

Se sabe que el espectro de emisión de compuestos indólicos presenta una marcada dependencia con la polaridad del microentorno, tal que a medida de que ésta aumenta la emisión se corre al rojo. Esta sensibilidad se debe a que estos compuestos poseen dos estados singlete excitados denotados habitualmente como  $^1L_a$  y  $^1L_b$  muy próximos [18, 19]. La posición energética relativa de ambos estados depende de la polaridad del medio. El estado  $^1L_a$  es el más sensible a la polaridad, ya que éste involucra al átomo de nitrógeno del núcleo indólico, mientras que  $^1L_b$  prácticamente no presenta dependencia con dicha característica del medio. En consecuencia de este comportamiento el estado emisor (el de menor energía según la regla de Kasha [20]) va a depender de cuan polar sea el entorno que rodea a estos compuestos. En medios no polares el estado  $^1L_b$  es el que presenta menor energía, en consecuencia es el estado emisor. Por otro lado, cuando aumenta la polaridad disminuye la energía del estado  $^1L_a$  de modo que se transforma en el estado fluorescente obviamente a menor energía que  $^1L_b$ . Además de observarse corrimiento en la posición del espectro de fluorescencia, se encuentra que en los medios no polares (hidrocarburos) la emisión presenta estructura fina que se pierde con el aumento de la polaridad del medio. La presencia de la emisión no estructurada es atribuida [19] a la capacidad de formar interacciones puente hidrógeno con el solvente.

El comportamiento recién descrito, que presenta la emisión de los derivados indólicos en función de la polaridad del medio, puede ser una herramienta útil para determinar la ubicación de compuestos indólicos en sistemas microheterogéneos [19]. Por lo tanto, se utilizó esta propiedad de los derivados indólicos para establecer sus ubicaciones en las vesículas.

V-2-2-1-Dimetilindol e Indol.

En la Figura V. 13 se muestra la emisión de DMI en medios homogéneos y codisuelto en vesículas unilaminares de POPC (en la Sección III-3-1-2 se describe el procedimiento de codisolución). En vesículas unilaminares de DMPC, este derivado indólico, presenta un comportamiento similar que en las de POPC. Es importante notar que además del corrimiento del máximo de emisión, el ancho del espectro en presencia de vesículas es mayor que en los solventes puros. En la Tabla V. 5 se muestran los valores de los anchos de banda medios en los distintos sistemas. Es evidente que en las vesículas es mayor que en los medios homogéneos; esto indica una distribución no uniforme de DMI en el medio organizado debida a una partición entre las vesículas y el medio acuoso.

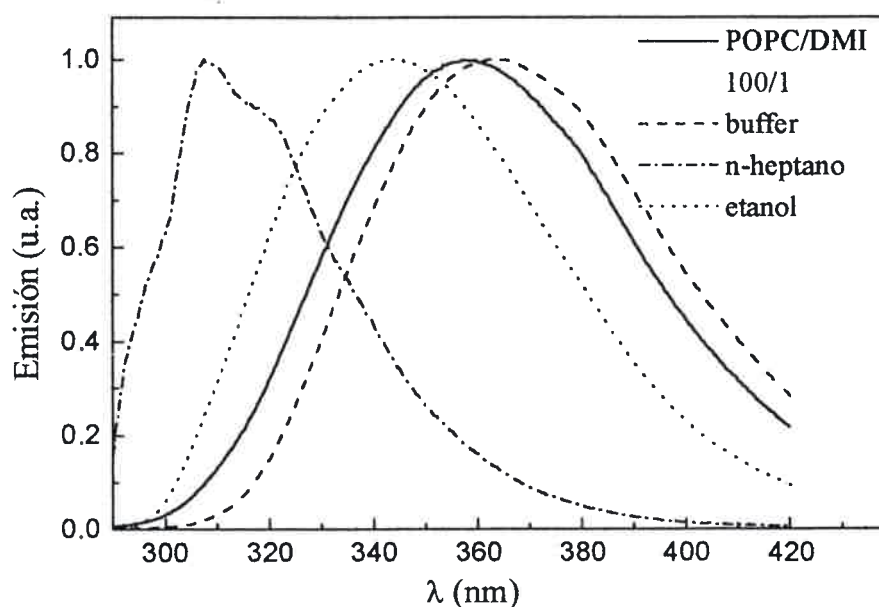


Figura V. 13: Espectros de emisión de fluorescencia de DMI en diferentes medios. [DMI] codisuelto en vesíc.= $4,00 \times 10^{-6}$  M, [DMI] en buffer=  $2,5 \times 10^{-5}$  M, [DMI] en n-hept.=  $4,3 \times 10^{-6}$  M, [DMI] en etanol=  $4,8 \times 10^{-5}$  M,  $\lambda$  ecx.: 280 nm.

Tabla V. 5: Anchos de bandas medios ( $\Delta\nu$ ) en  $\text{cm}^{-1}$  para la emisión de DMI en diferentes medios.

Medio	$\Delta\nu$
n-heptano	4070
etanol	5400
buffer pH = 7,4	5190
POPC/DMI 100/1	5920

Otro hecho que indicaría la partición de DMI en el medio organizado es el ajuste de los decaimientos de fluorescencia obtenidos en medios homogéneos y codisuelto en las vesículas. En la Tabla V. 6 se muestran estos resultados.

Tabla V. 6: Valores de tiempos de vida media ( $\tau$ ) en ns de DMI en diferentes medios.

Medio	$\tau$
n-heptano	2.8
etanol	4.9
acetonitrilo	4.2
POPC/DMI 100/10	$\tau_1 = 5.2$ (78%) $\tau_2 = 3.2$ (22%)

Se observa que en los medios homogéneos DMI presenta una caída monoexponencial mientras que en las vesículas el decaimiento no es monoexponencial necesitando al menos dos tiempos de vida para su ajuste. Esto podría indicar además de la partición, una posible ubicación no homogénea del derivado indólico en las bicapas; ya que diferentes tiempos de vida media corresponderían a moléculas de DMI localizadas en distintos lugares [9]. Los porcentajes mostrados junto a las distintas componentes de los tiempos de vida media, en las vesículas unilaminares de POPC, representan a la fracción de emisión correspondiente a cada especie con respecto a la emisión total. IN presenta

un comportamiento similar al de DMI con respecto a los anchos de bandas medios y al ajuste mono y biexponencial de los tiempos de vida media tanto en los medios homogéneos como en los organizados.

Existen en literatura antecedentes sobre la distribución no uniforme de especies en vesículas. Por ejemplo, Jacobs y otros [21] estudiaron la distribución del péptido Ala-Trp-Ala con el grupo amino terminal libre y el grupo carboxílico esterificado con el grupo *tert*-butilo en membranas fosfolípídicas de dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) preparadas por el método de sonicación. El extremo del amino cargado actúa como sitio de anclaje a la interfase lípido/agua, mientras que la esterificación del otro extremo aumenta la solubilidad en el medio no acuoso. Estos autores encontraron por medio de la técnica de difracción de neutrones que el tripéptido, con el residuo TRP deuterado, se ubica en distintas regiones de la bicapa. Mayormente, el 83%, se sitúa en la región más externa de la bicapa próximo a los grupos fosfatos mientras que el resto se encuentra en una zona más interna localizado entre el límite de la región polar y las cadenas hidrocarbonadas.

Además de los comportamientos anteriores de DMI e IN se encontró para ambos compuestos que en presencia de las vesículas la posición del máximo del espectro de fluorescencia depende de la concentración del fosfolípido. En la Figura V. 14 se muestra como la posición del espectro de IN en buffer varía con el agregado de volúmenes conocidos de vesículas de POPC; en la Sección III-3-1-2 se explica como se agregan las vesículas al buffer.

Se sabe que en sistemas de micelas inversas de bis-(2-hetishexil)sulfosuccinato de sodio (AOT)/heptano/agua DMI está disuelto en la fase orgánica [22]. Por otro lado, con respecto a las estructuras de estos compuestos, se conoce [13] que la presencia del átomo de hidrógeno unido al nitrógeno del heterociclo, y en consecuencia la capacidad de intervenir en la formación de interacciones de puente hidrógeno, no afectan en gran medida la ubicación de estos compuestos en membranas de POPC.

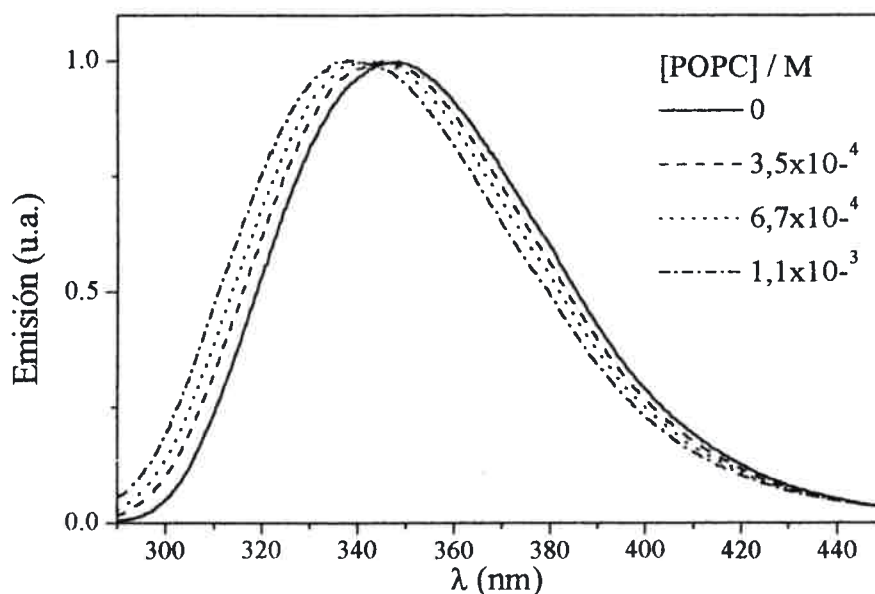


Figura V. 14: Espectros de emisión de IN. Efecto del agregado de vesículas de POPC a una solución de IN en buffer.  $[IN]=4,7 \times 10^{-6}$  M.  $\lambda$  exc.: 280 nm. Los espectros están normalizados.

Yau y otros [13] estudiaron la ubicación de los residuos del aminoácido TRP de proteínas transmembrales en vesículas unilaminares grandes de POPC. Encontraron que este residuo de aminoácido presenta una notable preferencia por la ubicación en la interfase de las membranas. Además investigaron si la presencia del hidrógeno unido al grupo imino es una de las causas principales de esta ubicación predilecta. Trabajaron con derivados indólicos que presentaran o no la unión N-H siendo los compuestos usados: IN, N-metilindol y 3-metilindol. Los dos primeros poseen similares coeficientes de partición agua-bicapa. Observaron que las diferentes moléculas residen en la vecindad de los grupos glicerol y que la penetración a la zona hidrocarbonada de la bicapa no se incrementa al estar ausente la interacción puente hidrógeno. Además de la interacción puente hidrógeno es necesario considerar la aromaticidad que presentan estos derivados indólicos. En el análisis de la distribución de ANT se explicó como la ubicación de las moléculas aromáticas en bicapas de POPC queda determinada en gran medida por las estructuras electrónicas de este tipo de moléculas y por la forma molecular rígida; en

consecuencia las moléculas aromáticas se ubican en la región de la interfase de las vesículas [13].

Debido a lo anterior se podría esperar que IN y DMI particionen y se distribuyan en las vesículas en las regiones más polares de la bicapa correspondientes a la interfase. Esto se verifica en los espectros de emisión de DMI mostrados en la Figura V. 13 ya que la posición del espectro en las vesículas de POPC es intermedia entre los solventes homogéneos de etanol y buffer acuoso. La posición de la emisión se encuentra a menor energía (mayor longitud de onda) con respecto a n-heptano indicando así que DMI sensa una mayor polaridad que la que presenta la zona hidrocarbonada de la bicapa.

#### V-2-2-1-1-Determinación de las constantes de partición de DMI y IN.

Debido al comportamiento de partición que presentan DMI y IN en los medios organizados, es necesario determinar el valor de sus constantes de partición,  $K$ , para poder establecer sus concentraciones efectivas en la bicapa. Conocer estas constantes es fundamental para interpretar los resultados de inhibición de fluorescencia de ANT por IN y DMI en estos medios organizados.

Los valores de las constantes de partición se pueden determinar a partir de los cambios en la intensidad de fluorescencia del compuesto indólico, a una dada longitud de onda, en función del agregado de vesículas de fosfolípido. En bibliografía se encuentran varios trabajos que determinan de este modo constantes de partición en vesículas o sistemas organizados [23 -28].

Se puede considerar la distribución de los derivados indólicos entre la bicapa y la fase acuosa en términos de la constante de partición definida en función de las concentraciones como:

$$\text{Ecuación V. 5} \quad K = \frac{C_b}{C_a}$$

donde  $C$  representa a la concentración del derivado indólico y los subíndices  $b$  y  $a$  representan la bicapa y al agua respectivamente.

Por otro lado, se puede definir a la fracción del compuesto indólico ( $in$ ) en la bicapa vesicular,  $f_b$ , como:



Ecuación V. 6 
$$f_b = \frac{n_b}{n_t}$$

donde  $n_b$  es el número de moles de *in* en la bicapa y  $n_t$  es el número de moles de *in* total. Esta fracción se puede relacionar con la intensidad de fluorescencia considerando los valores extremos de  $f_b$  de la siguiente manera:

$f_b = 0$  implica:  $I = I_a$  siendo  $I_a$  la intensidad de fluorescencia a una dada longitud de onda cuando todo el *in* está en el medio acuoso.

$f_b = 1$  implica:  $I = I_b$  siendo  $I_b$  la intensidad de fluorescencia cuando todo el *in* está en la bicapa lipídica.

Por otro lado se define:

Ecuación V. 7 
$$\Delta I = I - I_a$$

donde  $\Delta I$  es el cambio en la intensidad de fluorescencia del compuesto indólico en presencia de las vesículas ( $I$ ) a una dada longitud de onda, con respecto al valor de la intensidad de fluorescencia en la solución acuosa del buffer en ausencia del fosfolípido ( $I_a$ ).

Ecuación V. 8 
$$\Delta I_{max} = I_b - I_a$$

donde  $\Delta I_{max}$  es el cambio máximo en la intensidad de fluorescencia a una dada longitud de onda que ocurriría cuando todo el compuesto indólico esté disuelto en la bicapa.

En base a lo anterior y suponiendo una correspondencia directa entre  $f_b$  y  $\Delta I$  se llega a:

Ecuación V. 9 
$$f_b = \frac{\Delta I}{\Delta I_{max}}$$

La constante de partición en términos de concentración se puede escribir como:

Ecuación V. 10 
$$K = \frac{C_b}{C_a} = \frac{n_b V_a}{V_b n_a}$$

donde  $n$  representa al número de moles del compuesto indólico y  $V$  al volumen.

Dividiendo a la ecuación anterior por el número de moles totales se llega a:

$$\text{Ecuación V. 11} \quad K = \frac{f_b}{f_a} \gamma^{-1}$$

donde  $f_b$  es la fracción en la bicapa y  $f_a$  es la fracción en el agua, siendo la fracción de volumen de la bicapa  $\gamma$  igual a:

$$\text{Ecuación V. 12} \quad \gamma = \frac{V_b}{V_a} = [fos] V_{fos}^M$$

con  $[fos]$  igual a la concentración molar del fosfolípido y  $V_{fos}^M$  el volumen molar parcial del fosfolípido expresado en litros.

Expresando en la Ecuación V. 11 a  $f_a$  en función de  $f_b$  y despejando se llega a:

$$\text{Ecuación V. 13} \quad f_b = \frac{K\gamma}{1 + K\gamma}$$

A partir de las Ecuaciones V.9 a V.13 se obtiene:

$$\text{Ecuación V. 14} \quad \Delta I = \frac{\Delta I_{max} K [fos] V_{fos}^M}{1 + K [fos] V_{fos}^M}$$

La Ecuación V. 14 implica una curva con comportamiento de saturación para  $\Delta I$  vs.  $[fos]$ . A partir de un ajuste no lineal de cuadrados mínimos se puede conocer el producto  $K V_{fos}^M$  y usando el valor de  $V_{fos}^M$  de bibliografía se puede determinar  $K$ .  $V_{fos}^M$  se lo toma como igual a  $0,7 \text{ L mol}^{-1}$ , siendo éste un valor típico para fosfolípidos al considerar la densidad de la fase de la membrana igual a la del agua. [29] Otro modo de obtener  $V_{fos}^M$  es a partir del volumen de una molécula del fosfolípido, siendo para POPC  $1300 \text{ \AA}^3$  [30] correspondiendo así un  $V_{fos}^M$  de  $0,78 \text{ L mol}^{-1}$ . Al considerar cualquiera de los valores anteriores de  $V_{fos}^M$  se supone que todo el volumen de la bicapa es accesible para la partición de los inhibidores.

Como ya se explicó, en el Capítulo III en la Sección 3-1-2, experimentalmente se siguió el cambio de fluorescencia a una longitud de onda fija del derivado indólico disuelto en el buffer con el agregado de vesículas. Se mantuvo constante la absorción de luz del derivado indólico a medida de que se agregó la dispersión de las vesículas igualando las absorciones, a la longitud de onda de excitación, del compuesto indólico en el buffer y en las vesículas. Cada derivado indólico fue agregado a las vesículas posteriormente a su preparación tal como se describe detalladamente en el Capítulo III en la Sección 3-1-2.

Se consideró que solamente hay dos poblaciones diferentes del compuesto indólico que emiten: la acuosa y la ubicada en la vesícula. El análisis se realizó a la longitud de onda de emisión de 310 nm dado que en esta longitud de onda la emisión de la población acuosa es menor que la de la unida a la vesícula tal como se observa en Figura V. 14.

En la Figura V. 15 se muestra el gráfico  $\Delta I$  en función de la concentración molar del fosfolípido,  $[fos]$ , para DMI en vesículas unilaminares de POPC a 28 °C. La línea sólida de esta Figura corresponde al ajuste de los datos experimentales mediante la Ecuación V. 14. Como se describió previamente, se observa que la tendencia que presentan los resultados corresponde a un comportamiento de saturación, aunque solamente es alcanzada experimentalmente la porción inicial de esta curva.

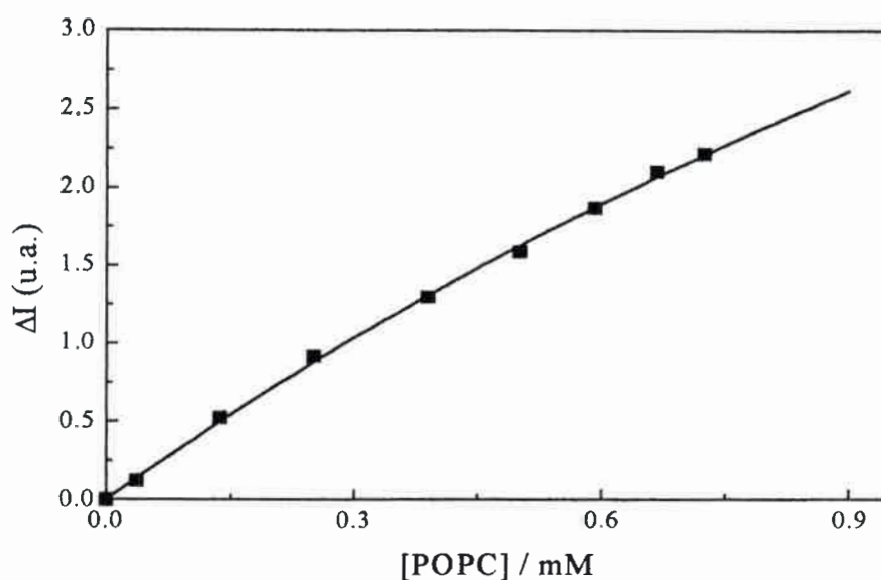


Figura V. 15: Cambio en la intensidad de fluorescencia de DMI a 310 nm en función de [POPC]. [DMI] = 68  $\mu$ M. La línea sólida corresponde al ajuste de los datos experimentales mediante la Ecuación V. 14.

En la Tabla V. 7 se muestran los valores de las constantes de partición obtenidos según el ajuste no lineal de los resultados experimentales del gráfico del cambio en la intensidad de fluorescencia del derivado indólico a 310 nm en función de la concentración de fosfolípido mediante la Ecuación V. 14. Se determinaron  $K$  para IN y DMI en las vesículas de POPC en fase líquido-cristalina y en las vesículas de DMPC en las fases gel y líquido-cristalina. Debido a que la temperatura de transición de fase de POPC es de  $-22$  °C [3] no se determinó el valor de  $K$  para IN y DMI en la fase gel de las vesículas de este fosfolípido. La constante de partición de ambos derivados en la fase gel de DMPC es muy baja al extremo de que para IN no se puede determinar su valor por medio de este método.

Tabla V. 7: Constantes de partición ( $K$ ) para IN y DMI en vesículas unilaminares de POPC y DMPC.

Derivado indólico	POPC		DMPC
	Fase líquida	Fase gel	Fase líquida
IN	430 (34,0°C)	--	500 (34,1°C)
DMI	490 (28,0°C)	270 (15,1°C)	1360 (33,0°C)

Los resultados se obtuvieron mediante experiencias realizadas por duplicado o triplicado. En todas las determinaciones el grado de incerteza en la medida del valor de  $K$  es relativamente alto, por lo que el error llega a ser en algunos casos una cantidad considerable de aproximadamente el 20%. La causa principal de estas incertezas es debida a la cantidad limitada de fosfolípido con que se puede trabajar en la etapa de la preparación de las vesículas con el equipo de extrusión utilizado. Ya se indicó que los datos experimentales de la Figura V. 15 cubren solamente la porción inicial de la curva de saturación correspondiente al ajuste mediante la Ecuación V. 14. Lo anterior introduce incerteza en la determinación de los parámetros de  $\Delta I_{max}$  y del producto  $K V_{fos}^M$  y en consecuencia en precisar el valor de  $K$  para cada situación. Sin embargo, se encontró que el valor obtenido de  $K$  para IN en las vesículas de POPC en la fase líquido-cristalina es similar a datos de bibliografía determinados por otros métodos. Wimley y otros [30] determinaron la constante de partición para IN en vesículas de POPC extruídas de 100 nm de diámetro en fase líquido-cristalina. Estos autores utilizaron técnicas experimentales de HPLC y diálisis. Dicha constante fue definida en función de las fracciones molares del compuesto indólico en la bicapa y en el buffer acuoso de la siguiente manera [31]:

$$\text{Ecuación V. 15} \quad K_x = \frac{X_b}{X_a}$$

donde  $X$  representa a la fracción molar del inhibidor y los subíndices  $b$  y  $a$  representan a la bicapa y al agua respectivamente.

Reemplazando por los moles de inhibidor en la bicapa ( $n_b$ ), los moles de

fosfolípido ( $n_{fos}$ ), los moles de inhibidor en el agua ( $n_a$ ) y los moles de agua ( $n_w$ ) se obtiene:

$$\text{Ecuación V. 16} \quad K_x = \frac{\frac{n_b}{n_b + n_{fos}}}{\frac{n_a}{n_a + n_w}}$$

considerando que:  $n_a \ll n_w$  y  $n_b \ll n_{fos}$  y dividiendo por  $K$  se llega a:

$$\text{Ecuación V. 17} \quad \frac{K_x}{K} = \frac{n_w}{n_{fos}} \gamma$$

reemplazando a  $\gamma$  con:

$$\gamma = \frac{V_b}{V_w} = \frac{n_{fos} V_{fos}^M}{n_w V_w^M}$$

se obtiene la siguiente relación entre  $K_x$  y  $K$ :

$$\text{Ecuación V. 18} \quad \frac{K_x}{K} = \frac{V_{fos}^M}{V_w^M} = \frac{0,7 \text{Lmol}^{-1}}{0,018 \text{Lmol}^{-1}} = 38,9$$

El valor de la constante definida en función de las fracciones molares,  $K_x$ , obtenido para IN por estos autores fue de  $2 \times 10^4$  lo que implicaría un valor de la constante definida en términos de concentración,  $K$ , de alrededor de 500. Comparando este valor con el hallado en esta tesis (ver Tabla V. 7), basado en técnicas de fluorescencia, se demuestra la utilidad del método empleado para determinar constantes de partición.

Parece haber una tendencia en los resultados mostrados en la Tabla V. 7. Se observa que los compuestos indólicos presentan una mayor constante de partición en la fase líquido-cristalina que en la fase gel de las vesículas. Esta tendencia en los valores de  $K$  en las diferentes fases puede ser debida principalmente al efecto del cambio de estructura de la bicapa más que a la dependencia con la temperatura de la partición a un sitio específico. Se puede considerar que el empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas más flexible en la fase líquido-cristalina facilita la partición de los indoles [23]. También se encuentra que IN presenta menor partición que DMI en todos



los casos; estos resultados pueden ser debidos a las diferencias estructurales entre los dos compuestos ya que DMI es el más hidrofóbico. Con respecto a los resultados encontrados para IN en la fase líquida de ambos fosfolípidos se observa que parece comportarse igual independientemente de la estructura del fosfolípido. Mientras que DMI particiona más en la fase líquido-cristalina de las vesículas de DMPC que en las de POPC, siendo para el primer caso el valor de  $K$  claramente mayor que para el resto de los casos estudiados.

El análisis cuantitativo anterior se realizó a partir de los gráficos del cambio en la intensidad de fluorescencia del derivado indólico disuelto en el buffer en función de la concentración de fosfolípido a 310 nm. Otro modo de obtener datos sobre el comportamiento de partición de los indoles es a partir de sus espectros. En la Figura V. 16 y en la Figura V. 17 se muestra como los espectros de DMI y de IN respectivamente disueltos en el buffer varían con el agregado de la dispersión de vesículas de DMPC. En ambas figuras se observa el corrimiento y además la variación del ancho de banda medio de dichos espectros. Los espectros están normalizados para visualizar mejor dichos efectos.

En la Tabla V. 8 y en la Tabla V. 9 se muestran los valores de los máximos de emisión y de los anchos de banda medios para DMI y IN respectivamente disueltos en el buffer con diferentes agregados de los fosfolípidos. En dichas tablas se presentan los valores para las distintas fases de las vesículas de DMPC.

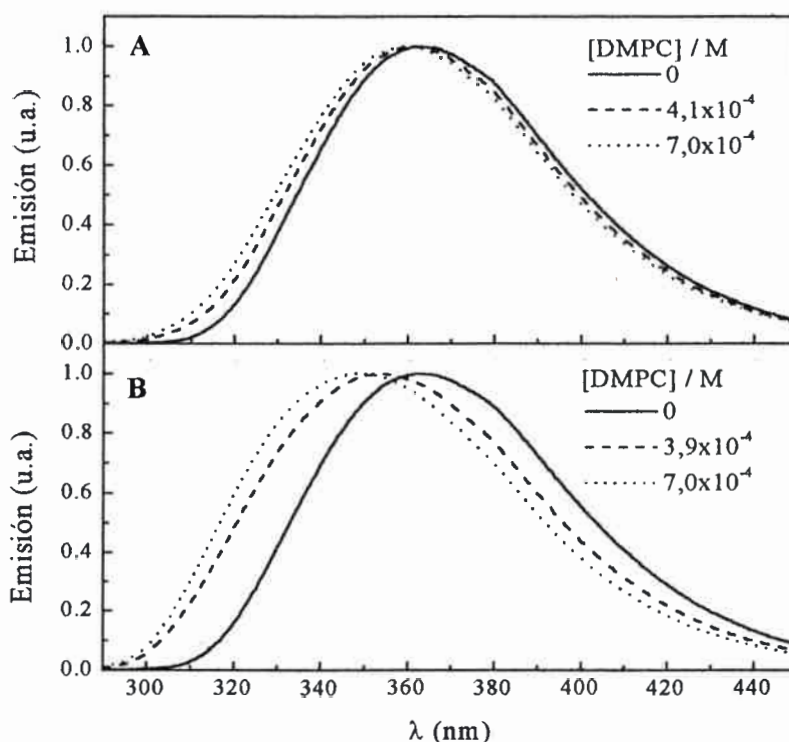


Figura V. 16: Efecto del agregado de vesículas de DMPC a DMI en buffer. A: fase gel, temperatura: 15,1 °C. B: fase líquido-cristalina, temperatura: 33,0 °C. [DMI] =  $9,4 \times 10^{-5}$  M para ambas experiencias.  $\lambda$  exc.: 280 nm. Los espectros están normalizados.

Tabla V. 8: Posición de los máximos de emisión ( $\nu$ ) y anchos de bandas medios ( $\Delta\bar{\nu}$ ) en  $\text{cm}^{-1}$  para DMI en vesículas unilaminares, [POPC] y [DMPC] en M.

POPC			DMPC					
Fase líq-crist. (28,0°C)			Fase gel (15,1°C)			Fase líq-crist. (33,0°C)		
[POPC]	$\nu$	$\Delta\bar{\nu}$	[DMPC]	$\nu$	$\Delta\bar{\nu}$	[DMPC]	$\nu$	$\Delta\bar{\nu}$
0	27472	4913	0	27624	4957	0	27548	5247
$3.90 \times 10^{-4}$	27972	5439	$3.90 \times 10^{-4}$	27700	5135	$4.05 \times 10^{-4}$	28249	5900
$7.25 \times 10^{-4}$	28249	5578	$7.00 \times 10^{-4}$	27778	5313	$7.02 \times 10^{-4}$	28612	6003



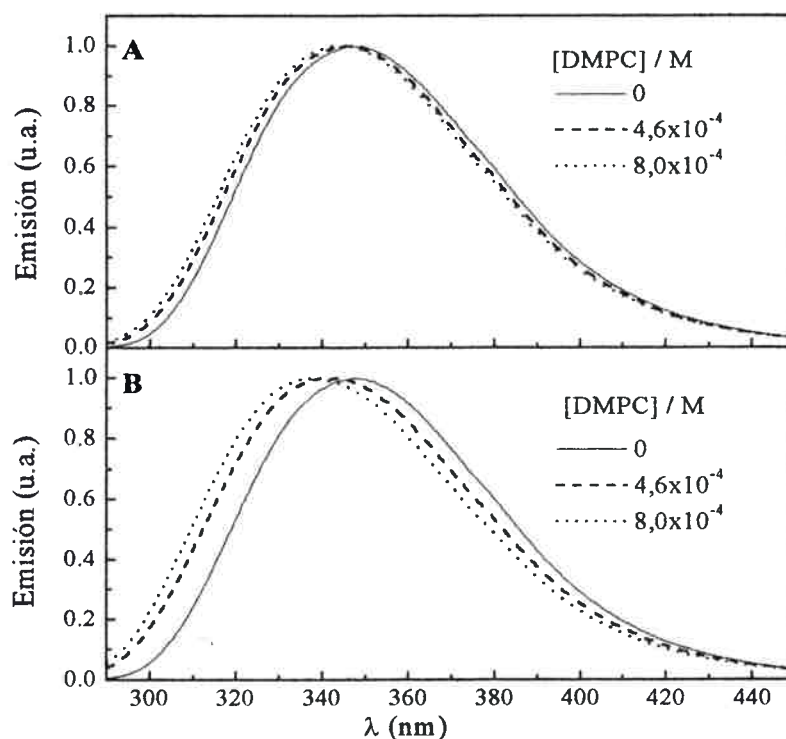


Figura V. 17: Efecto del agregado de vesículas de DMPC a IN en buffer. A: fase gel, temperatura: 15,2 °C,  $[IN] = 9,0 \times 10^{-5}$  M. B: fase líquido-cristalina, temperatura: 34,1 °C,  $[IN] = 5,7 \times 10^{-5}$  M.  $\lambda$  exc.: 280 nm. Los espectros están normalizados.

Tabla V. 9: Posición de los máximos de emisión ( $\nu$ ) y anchos de bandas medios ( $\Delta\bar{\nu}$ ) en  $\text{cm}^{-1}$  para IN en vesículas unilaminares, [POPC] y [DMPC] en M.

POPC			DMPC					
Fase liq-crist. (34,0°C)			Fase gel (15,2°C)			Fase liq-crist. (34,1°C)		
[POPC]	$\nu$	$\Delta\bar{\nu}$	[DMPC]	$\nu$	$\Delta\bar{\nu}$	[DMPC]	$\nu$	$\Delta\bar{\nu}$
0	28860	5408	0	28777	5325	0	28694	5408
$2.57 \times 10^{-4}$	28902	5520	$4.60 \times 10^{-4}$	28818	5454	$4.58 \times 10^{-4}$	29326	5822
$4.30 \times 10^{-4}$	29070	5602	$8.03 \times 10^{-3}$	28902	5536	$8.13 \times 10^{-3}$	29499	5960

En las Tablas anteriores se corrobora que el corrimiento del máximo de emisión es mayor en la fase líquido-cristalina para ambos compuestos. También se encuentra que IN presenta menor sensibilidad al corrimiento en ambas fases con respecto a DMI. Por otro lado, con respecto al ancho de banda medio se observa para DMI que en todos los casos es mayor en la fase líquido-cristalina de las vesículas de POPC y DMPC que en la fase gel de las vesículas de POPC. Para el caso de IN se encuentra que el ancho de banda medio es superior en la fase líquido-cristalina de las vesículas de DMPC, mientras que en las vesículas de POPC presenta un comportamiento similar que a las vesículas de DMPC en la fase gel. Un mayor aumento del ancho de banda medio con el agregado de vesículas indica que DMI al particionar sensa un microentorno diferente con respecto a IN. Debido a lo anterior se puede considerar que IN presenta, en todos los casos, una distribución más uniforme que DMI.

#### V-2-2-2-Ácido 3-indolacético y L-Triptofano

Éstos son los derivados indólicos más solubles en el medio acuoso y presentan diferente comportamiento frente a las vesículas en comparación con IN y DMI. Se encontró que los espectros de emisión de IAA y TRP son prácticamente iguales en el buffer y en presencia de diferentes concentraciones de vesículas. Con el agregado de la dispersión de vesículas a una solución de TRP en buffer solamente se observa un pequeño ensanchamiento en los espectros de emisión. En la Figura V. 18 se muestra como los espectros normalizados coinciden la fluorescencia de TRP en el buffer y a distintas relaciones POPC/TRP.

Estos resultados indicarían que TRP y IAA no particionan entre el medio acuoso y las bicapas o que en caso de estar asociados con la bicapa se ubicarían en una región de alta polaridad del medio organizado, probablemente en la zona externa de la interfase.

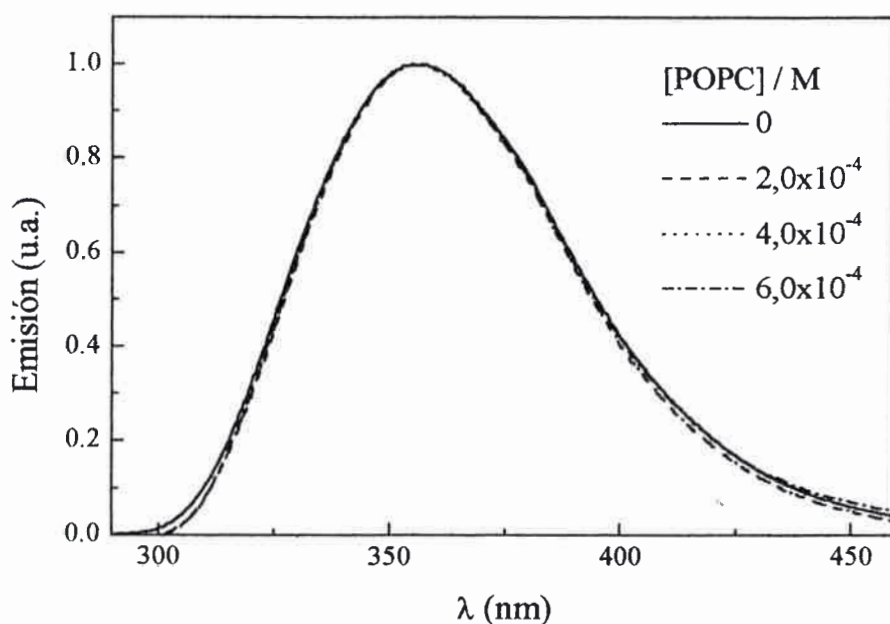


Figura V. 18: Espectros de emisión de TRP. Efecto del agregado de vesículas de POPC a una solución de TRP en buffer. [TRP] = 0,20 mM.  $\lambda$  exc.: 280 nm. Los espectros están normalizados.

Esta ubicación de TRP en las vesículas de fosfatidilcolina estaría de acuerdo con los resultados encontrados en el estudio de la ubicación de los residuos de este aminoácido de algunas proteínas transmembranales realizados en bicapas fosfolipídicas. Se ha observado que para algunas de las proteínas de este tipo, cuyas estructuras tridimensionales son conocidas, los residuos de TRP se ubican principalmente en las regiones superficiales de las membranas [13, 32, 33]. Por ejemplo, en la estructura del canal de potasio de *Streptomyces lividans* se observa que en las regiones expuestas al exterior de la bicapa se encuentran principalmente residuos indólicos provenientes del TRP [32]. Esta preferencia en la ubicación de TRP en las proteínas transmembranales sugiere que este aminoácido juega un rol importante en el anclaje de estas estructuras organizadas en las membranas biológicas y en sus funciones. Por otro lado, Abel y otros [32] estudiaron la posible intervención de este residuo de aminoácido en el anclaje de proteínas transmembranales en las zonas de las interfases. Para ello analizaron la

estabilidad de vesículas preparadas por moléculas anfipáticas tal que la región polar estuviese formada por el grupo indólico. Encontraron que los compuestos N- o 3-alquilindoles con cadenas alquílicas a partir de diez átomos de carbono lineales y saturadas forman vesículas estables. Este resultado permitiría corroborar la estabilidad del grupo indólico del aminoácido TRP en la región de la interfase de las membranas naturales y en las preparadas mediante diferentes fosfatidilcolinas.

Gómez y otros [27] encontraron que TRP particiona en vesículas unilaminares preparadas mediante el método de sonicación. Éstas fueron hechas con fosfolípidos *zwitterionicos* y negativos a pH 7,4, por medio de distintas proporciones de los lípidos dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dimiristoilfosfatidilguadina (DMPG) y dimiristoilfosfatidico (DMPA). Observaron que TRP particiona y que permanece en un microambiente polar próximo a la interfase lípido-agua.

La diferencia con respecto al comportamiento de la partición de TRP, entre el estudio citado en la referencia [27] y el desarrollado en este trabajo de tesis, es debido fundamentalmente al tipo de vesículas usadas en cada caso. Estos autores trabajaron con vesículas unilaminares pequeñas (S.U.V.) preparadas mediante el método de sonicación en cambio las bicapas que se utilizan en este trabajo son, como ya se explicó, unilaminares grandes (L.U.V.). Se sabe que las S.U.V. son muy pequeñas, presentando como máximo alrededor de 50 nm de diámetro con una alta curvatura. Estas vesículas unilaminares pequeñas son muy inestables debido a que este tipo de preparación involucra un agregado alto de energía. En consecuencia el método de sonicación es el mejor método de preparación de bicapas para que incorporen materiales para los que, por razones cinéticas o termodinámicas, la asociación es muy baja [1]. Según lo anterior, como las vesículas pequeñas son estructuras más inestables que las grandes la partición de moléculas pequeñas, como es el caso de TRP, es favorecida frente a las estructuras L.U.V.

### V-3-Constantes bimoleculares de la velocidad de inhibición de fluorescencia de ANT por los diferentes inhibidores en vesículas unilaminares.

Para analizar los resultados de la inhibición de fluorescencia de ANT en las

bicapas lipídicas en condiciones estáticas, se considerará dos situaciones diferentes. Por un lado la inhibición debida a los derivados indólicos que presentan partición vesícula-agua y por otro lado la causada por los inhibidores más hidrofílicos que no particionan.

V-3-1-Constantes bimoleculares de la velocidad de inhibición de fluorescencia de ANT por DMI y IN considerando las concentraciones efectivas de los inhibidores en las bicapas.

Al comenzar este Capítulo, en la Sección 1-1, se mostraron los espectros de fluorescencia de ANT en presencia de DMI e IN y los gráficos correspondientes de Stern-Volmer usando las concentraciones analíticas de cada inhibidor. También se presentaron los valores de las constantes bimoleculares de la velocidad de inhibición de fluorescencia,  $k_q$ , obtenidos a partir de las concentraciones analíticas de los inhibidores.

En esta Sección se recalculan las constantes bimoleculares de inhibición de fluorescencia con las concentraciones locales efectivas de los inhibidores en las bicapas.

Como fue explicado previamente, en la Sección 1-1 de este Capítulo, se trabajó a bajas concentraciones iniciales de IN debido a dos causas. Por un lado, por las posibles modificaciones estructurales que pueden sufrir las vesículas a altas concentraciones del inhibidor. Por el otro lado, las relaciones fosfolípido/IN iniciales de la experiencia de inhibición son similares a las usadas para determinar las constantes de partición correspondientes. A mayores concentraciones dado que IN afectaría la estructura de las vesículas no sería correcto considerar el valor de la constante de partición determinado previamente (ver Sección 2-2-1-1 de este Capítulo) debido a que se estarían saturando los sitios de las vesículas en los que se pueden asociar las moléculas del inhibidor.

Para conocer las concentraciones locales efectivas de DMI e IN en las vesículas es necesario saber el volumen total de la bicapa lipídica vesicular presente en el medio. Un modo de obtener dichas cantidades, sin necesidad de conocer los valores del volumen de la bicapa por vesícula y el número de vesículas totales, es expresar a la constante de partición,  $K$ , usando a la fracción de volumen de la bicapa fosfolipídica  $\gamma$  (definido en la Ecuación V. 12) de la siguiente manera:

100

100

100

100

100

100



$$\text{Ecuación V. 19} \quad K = \frac{C_b}{C_a} = \frac{C_b}{C_{tot} - C_b \gamma}$$

Donde  $C$  representa las concentraciones del inhibidor, los subíndices  $b$  y  $a$  representan la bicapa vesicular y al agua respectivamente y el subíndice  $tot$  representa la concentración analítica. Para llegar a la expresión anterior se desprecia el volumen de la bicapa frente al volumen del agua.

Si se despeja la concentración del inhibidor en la bicapa,  $C_b$ , de la ecuación anterior queda:

$$\text{Ecuación V. 20} \quad C_b = \frac{K C_{tot}}{1 + K \gamma}$$

Estos valores de concentración del inhibidor en la bicapa permiten determinar las constantes de bimoleculares de la velocidad de inhibición de ANT por DMI y IN corregidas por las concentraciones efectivas locales de los inhibidores,  $k_q^b$ . En la Tabla V. 10 se muestran los valores de  $k_q^b$  correspondientes a las  $k_q$  mostradas en la Tabla V. 2.

Tabla V. 10: Constantes bimoleculares corregidas, ( $k_q^b$ ), de la velocidad de inhibición de fluorescencia de ANT por DMI y IN en vesículas de POPC y DMPC, en unidades de  $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

Inhibidor	POPC		DMPC
	Fase líq-crist.	Fase gel	Fase líq-crist.
DMI	1,50	3,13	1,26
IN	0,50	1,0 <sup>a</sup>	0,39

<sup>a</sup> valor estimado (ver el texto siguiente)

Debido a que no se pudo determinar el valor de la constante de partición para IN en las vesículas de DMPC en la fase gel no es posible conocer a la magnitud de  $k_q^b$  correspondiente. El valor que figura en la Tabla V. 10 se lo estimó considerando que la relación de  $k_q^b$  para DMI con respecto a  $k_q^b$  para IN es relativamente constante en las

vesículas de POPC y de DMPC en la fase líquido-cristalina. Por otro lado, la relación de las  $k_q^b$  para DMI con respecto a IN en las vesículas es algo mayor a la misma relación de las  $k_q$  en el solvente homogéneo acetonitrilo (ver en la Tabla IV.1).

Por otro lado, es importante observar que cuando se consideran las concentraciones locales efectivas de DMI e IN en las vesículas unilaminares, se encuentra en todos los casos que las constantes bimoleculares de inhibición son menores que en los medios homogéneos. La causa de esta diferencia es debida principalmente al efecto que provoca el mayor orden del microentorno en el que ocurren las reacciones de inhibición ya que éstas tienen lugar en la región de la interfase de las bicapas. Como se describió en el Capítulo II en la Sección 1-9, en la interfase polar de la bicapa se encuentran los grupos glicerol y carbonilo. Además se sabe que hay un alto contenido de agua, [12, 13, 34] que están limitadas en su movimiento y causan un aumento de viscosidad del medio. La explicación anterior, sobre como son afectados los valores de  $k_q$  debido a las características del sitio de las vesículas en el que ocurren las reacciones de inhibición, estaría de acuerdo con la distribución del fluoróforo y de DMI e IN en las regiones polares de la bicapa.

#### V-3-2-Constantes bimoleculares de la velocidad de inhibición de fluorescencia de ANT por TRP y IAA considerando las concentraciones efectivas de los inhibidores en las bicapas.

En la Figura V. 5 se mostraron los gráficos de Stern-Volmer para la inhibición de ANT por TRP y IAA en las vesículas de POPC. En dicha figura se observa que, para ambos inhibidores, dichos gráficos presentan una curvatura hacia abajo. Este comportamiento también se encuentra en las distintas fases de las vesículas de DMPC.

Los resultados mostrados en la Sección 2-2-2 de este Capítulo indican que TRP y IAA no particionan entre el medio acuoso y las bicapas o que en caso de hacerlo se ubican en la zona externa de la interfase. Los valores de las constantes bimoleculares de la velocidad de inhibición de fluorescencia de ANT por estos inhibidores mostrados en la Tabla V. 3 no necesitan ser corregidos por sus concentraciones efectivas en las bicapas, ya que éstas coincidirían con las concentraciones analíticas.



De todos modos se encuentra que para IAA y TRP los valores de  $k_q$  en las vesículas son mayores que el límite difusional en agua de  $6,2 \text{ seg}^{-1}$  [7]. Esto podría ser debido a dos causas. Por un lado a una contribución estática de inhibición de fluorescencia y por otro a un aumento local de concentración de los inhibidores próximo a la interfase donde se encuentra el fluoróforo [13]. De esta manera, las constantes de velocidad resultarían sobreestimadas al considerar la concentración analítica de los derivados indólicos. La presencia de la contribución estática de la inhibición provocaría una desviación positiva en los gráficos de  $I_0/I$  vs. la concentración de los inhibidores [5]. En la Figura V. 5, donde se grafican dichas magnitudes, no se observan estos efectos debido a que como no todo el ANT es accesible, los gráficos presentan una desviación negativa y no es posible determinar la presencia de los fenómenos que provocarían la sobrestimación de dichos valores.

#### V-4- Estudio del exciplexo polar ANT-DMI en vesículas unilaminares.

En la Figura V. 2 se muestra la inhibición de la emisión de ANT por el agregado de DMI en vesículas unilaminares de POPC. Se observa que el agregado de DMI además de inhibir la fluorescencia de ANT origina una nueva banda de emisión a mayores longitudes de onda del espectro del fluoróforo, esta nueva banda es atribuida al exciplexo emisoro ANT-DMI. La emisión de este exciplexo también se observa en las diferentes fases de las vesículas de DMPC.

En la Figura V. 19 se muestran los espectros de excitación normalizados de ANT y de la nueva banda de emisión, dichos espectros se obtuvieron fijando la longitud de onda de emisión a 402 nm y 522 nm respectivamente. Como estos espectros de excitación son muy similares y además se ajustan correctamente con el espectro de absorción de ANT queda corroborado que es correcto atribuir esta nueva banda emisiva a la emisión del exciplexo formado por ANT excitado y DMI. Cuando se usa el resto de los derivados indólicos para estudiar la inhibición de la fluorescencia de ANT no se observa la formación de exciplejos.

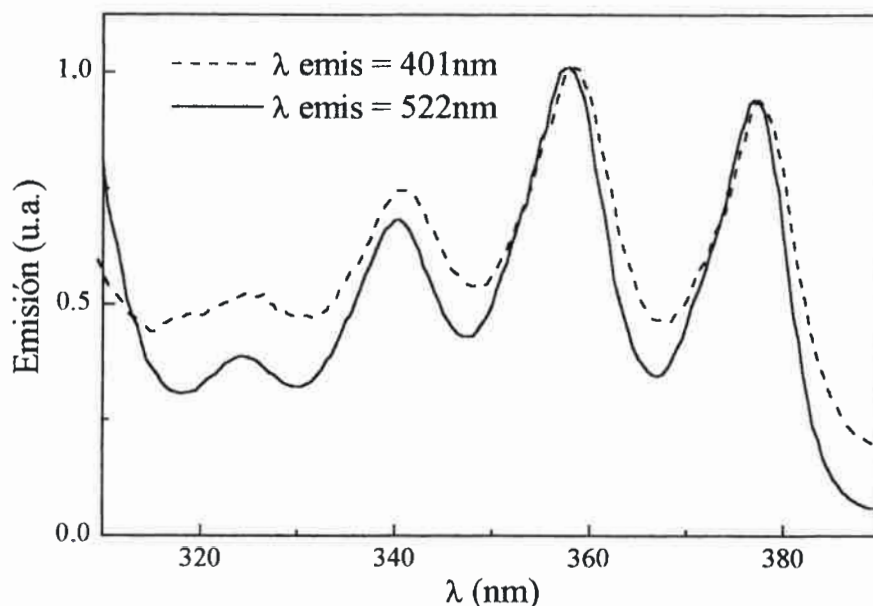


Figura V. 19: Espectros de excitación de ANT en presencia de DMI. Longitudes de onda de emisión a 402 nm y 522 nm.

Este exciplexo emisor formado por ANT y DMI también se encuentra en medios homogéneos de polaridades relativamente bajas. En el Capítulo IV en la Sección 3-1 se explicó que los derivados del ANT y los compuestos indólicos metilados en el átomo de nitrógeno forman exciplexos emisivos en solventes de polaridad baja e intermedia. También se mostró que estos exciplexos poseen un gran momento dipolar ya que la posición del máximo de emisión depende de la polaridad del medio y presenta un corrimiento al rojo a medida que ésta aumenta debido a la estabilización del estado de transferencia de carga.

Para estudiar al exciplexo ANT-DMI en las vesículas se realizaron medidas de fluorescencia resueltas en el tiempo. Dichas experiencias no presentaron resultados claros debido a que la emisión del exciplexo es muy débil y además es muy difícil de separar experimentalmente de la emisión de ANT.

En la Figura V. 20 se muestran los espectros de emisión del exciplexo ANT-DMI en las vesículas de POPC y de DMPC, tanto en la fase gel como en la líquido-cristalina. Estos espectros fueron obtenidos mediante el mismo procedimiento que el usado en los

medios homogéneos, tal como fue explicado en el Capítulo IV en la Sección 3-1. Al igual que en los medios homogéneos, en las vesículas el espectro de esta especie presenta una aparente estructura vibracional. La causa que provocaría esta anomalía en la emisión ya fue discutida en el Capítulo y en la Sección indicados anteriormente. En esta figura se observa que los espectros son prácticamente iguales en las vesículas de los distintos fosfolípidos y en las diferentes fases, presentando un máximo de emisión alrededor de 475 nm. Esto indica que el exciploje ANT-DMI sensa un microentorno con similares características en todos los casos.

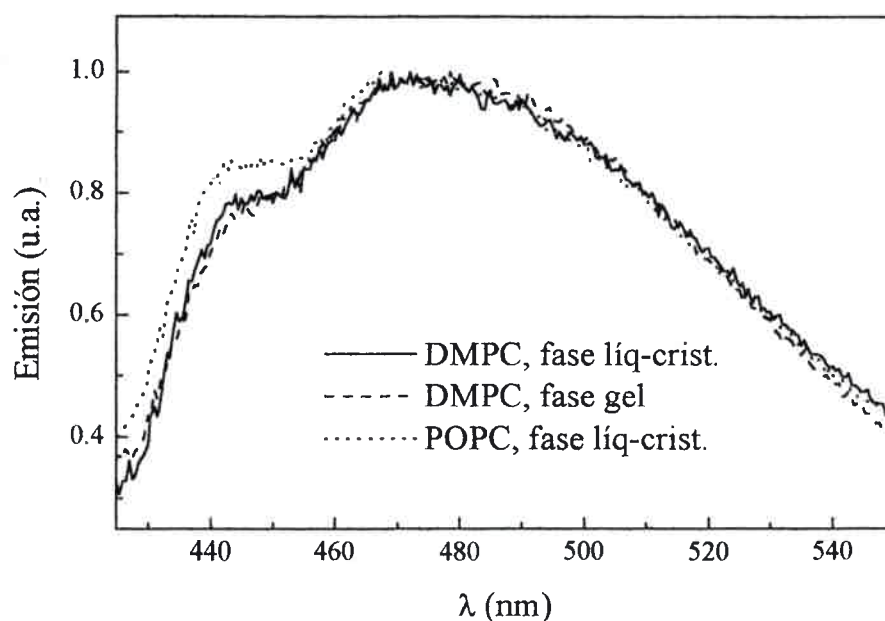


Figura V. 20: Espectros de emisión del exciploje ANT-DMI en las diferentes vesículas y fases. Los espectros están normalizados.

Se analizó el comportamiento del exciploje en las vesículas con respecto a los medios homogéneos. Por un lado se comparó la posición del máximo de emisión del exciploje ANT-DMI en las vesículas con respecto a dicha emisión en los medios homogéneos. En la Figura V. 21 se muestra la emisión normalizada del exciploje en las

vesículas unilaminares de POPC y en los medios homogéneos. Al analizar esta figura se encuentra que la posición del máximo de emisión en las vesículas aparece más al rojo con respecto a los solventes homogéneos. Esto estaría indicando que este excíplejo se forma en las vesículas en un microentorno de polaridad relativamente alta.

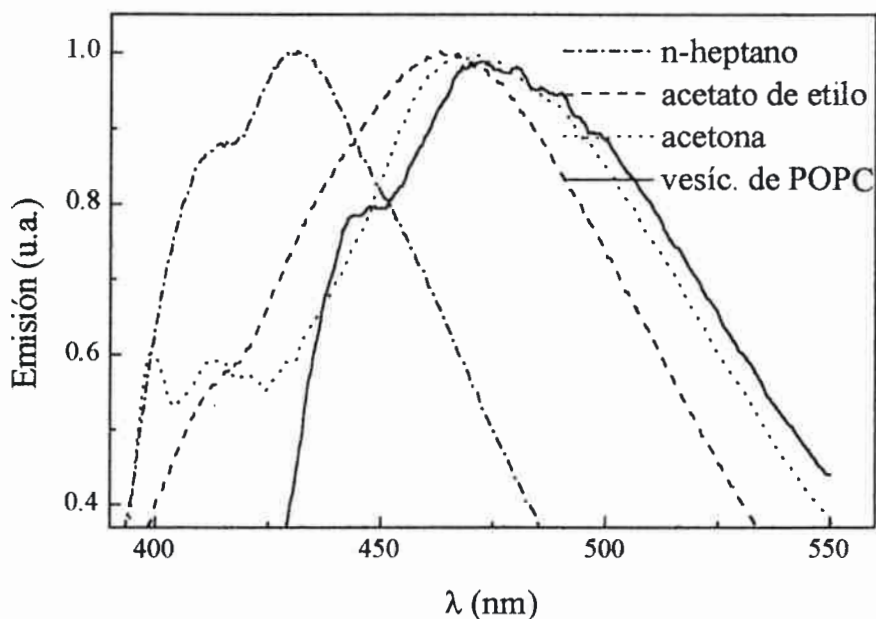


Figura V. 21: Espectros de emisión normalizados del excíplejo ANT-DMI en diferentes medios. POPC/ANT 100/1,  $[POPC] = 4.50 \times 10^{-4} M$ .

Por otro lado, se analizó la emisión relativa del excíplejo ANT-DMI en los diferentes medios con respecto a dicha emisión en n-heptano. Para independizar a la emisión del excíplejo del agregado de inhibidor se dividió la intensidad del máximo de emisión del excíplejo (a una determinada concentración del inhibidor) con la relación  $I_o/I$  alcanzada a la misma concentración de inhibidor y a la misma longitud de onda del máximo. Posteriormente, se normalizaron los cocientes con respecto al valor obtenido en n-heptano. Obviamente, se encontró que a medida que aumenta la polaridad del entorno la emisión de esta especie disminuye debido a que se incrementa la vía de desactivación no radiativa de transferencia de carga [35].

Para facilitar la interpretación de estos resultados en la Tabla V. 11 figuran en

primer lugar propiedades de los solventes homogéneos y en segundo lugar magnitudes referidas al exciploje ANT-DMI: los valores de las constantes dieléctricas ( $\epsilon$ ) y de los momentos dipolares ( $\mu$ ) y la posición del máximo de emisión en nm y las emisiones relativas a la emisión en n-heptano ( $h\nu_{rel. exc.}$ ).

Tabla V. 11: Valores de constantes dieléctricas ( $\epsilon$ ) y de los momentos dipolares ( $\mu$ ) en Debye de los solventes y posición del máximo de emisión ( $\lambda_{max}$ ) en nm y emisiones relativas a la emisión en n-heptano del exciploje ANT-DMI.

Solvente	$\epsilon$	$\mu$	$\lambda_{max}$	$h\nu_{rel. exc.}$
n-heptano	1,92	0,0	431	1
ciclohexano	2,02	0,0	430	0,97
acetato de etilo	6,05	1,83	463	0,91
acetona	20,56	2,70	470	0,17
vesic. POPC			$\geq 470$	0,02

Al comparar la posición del máximo de emisión del exciploje ANT-DMI en las vesículas con la posición del máximo de emisión de los espectros correspondientes en los medios homogéneos, se observa que esta especie excitada parece que sensa en el medio organizado un microentorno con una polaridad mayor que la de acetona. Dicho resultado es sorprendente ya que en los medios homogéneos con constantes dieléctricas mayores que acetona no se observa la emisión del exciploje.

En relación a los análisis de los rendimientos de emisión relativos a la emisión en n-heptano se refleja que con el aumento de la polaridad del medio el cociente disminuye debido al incremento de la vía de desactivación no radiativa indicada anteriormente.

Los hechos anteriores son consecuencia de una misma causa. Éstos son debidos a la estabilización de la transferencia de carga en el exciploje debida al aumento de la polaridad del entorno, produciendo así el corrimiento al rojo de la emisión y la separación de los iones.

Con respecto al alto valor de polaridad del microentorno que sensa el exciploje en las vesículas no es tan sorprendente si se considera la ubicación en el medio organizado de las moléculas que lo forman. Cuando se estudió la distribución de ANT y

DMI en las vesículas se encontró que ambos se encuentran en la zona polar de la interfase con abundante contenido de agua con movilidad altamente reducida. Estas moléculas de agua sin libertad total de movimiento presentan una constante dieléctrica menor que la del agua pura, pero así mismo en la interfase determinan un microentorno de polaridad intermedia [27].

La formación del exciplejo en las vesículas y la posición de su máximo de emisión se podrían explicar debido al orden impuesto en el medio organizado. Debido a las restricciones orientacionales y de movimiento, provocadas por la bicapa, se favorece la formación del exciplejo de modo tal que éste no se podría observar en un medio de similar polaridad y de menor viscosidad. Por lo explicado anteriormente la eficiencia en la formación del exciplejo se vería afectada por el tipo de fase, gel o líquido-cristalino, en la que se encuentra la vesícula; resultados sobre este aspecto se discutirán con detalle más adelante en este Capítulo en la Sección 4-1.

Existen pocos antecedentes sobre el estudio de la formación de exciplejos en este tipo de medio organizado. Waka y otros [36] investigaron la formación de exciplejos en la fase gel de vesículas de DMPC sonicadas. Ellos observaron una emisión muy débil de un exciplejo al inhibir derivados del pireno por dimetilanilina y además estimaron la micropolaridad de la región de la membrana en donde se encuentra el exciplejo, relativamente alta, con una constante dieléctrica alrededor de 10. Kano y otros [37, 38] trabajaron con pireno y con el ácido pirendecanoico como fluoróforos y con varias aminas aromáticas como inhibidores y también observaron la formación del exciplejo en vesículas sonicadas de DPPC tanto en la fase gel como la líquida-cristalina. Estos autores no sólo estudiaron el comportamiento de exciplejos intermoleculares en vesículas sino también el exciplejo intramolecular pireno-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-N,N,dimetilanilina en vesículas sonicadas de DPPC [39]. Como la emisión de este exciplejo es sensible tanto a la viscosidad como a la polaridad del medio [39], estos autores investigaron la micropolaridad del interior hidrofóbico de micelas directas e inversas y en vesículas sonicadas de DPPC. Los resultados que encontraron indican que la micropolaridad del interior de la bicapa lipídica de las vesículas es considerablemente menor que la de las micelas directas.

V-4-1-Estudio de la dependencia de la intensidad de emisión del exciploje ANT-DMI con la concentración de DMI. Comparación en medio homogéneo y en las vesículas.

Se estudió la intensidad de emisión del exciploje con el agregado del inhibidor en n-heptano y en las vesículas. Para que este análisis sea comparable en los distintos medios es necesario que las concentraciones del inhibidor sean similares en la bicapa y en el medio homogéneo. Se consideró la concentración de DMI efectiva en las vesículas a partir de la constante de partición y del volumen de la bicapa del mismo modo que para el cálculo de las constantes bimoleculares corregidas,  $k_q^b$ , discutido en este Capítulo en la Sección 3-1. Como consecuencia de la compartimentalización del medio se encuentra que la concentración de DMI en la bicapa es superior que las concentraciones usadas en las mismas experiencias en medios homogéneos cuando se llega a una relación de  $I_0/I$  de alrededor de 3 (correspondientes a los resultados mostrados en el Capítulo IV). Debido a lo anterior, es necesario estudiar la inhibición de ANT por DMI en n-heptano usando concentraciones de DMI mayor que para el resto de las experiencias en medios homogéneos ya mostradas. En esta Sección se muestran inicialmente los resultados obtenidos en n-heptano y posteriormente se analizan los datos encontrados en el medio organizado para poder cotejar el comportamiento del exciploje en ambos medios.

En la Figura V. 22 se muestra el gráfico de Stern-Volmer para la inhibición de la fluorescencia de ANT por DMI en n-heptano llegando a concentraciones del inhibidor similares a las concentraciones locales de DMI en las vesículas.

Se analizó si en la experiencia anterior ANT y DMI presentan interacciones de transferencia de carga en el estado fundamental [40]. Como no se observó la presencia de este tipo de especies, el comportamiento de pérdida de linealidad que presenta el gráfico de Stern-Volmer de la Figura V. 22 se puede considerar que es debido a la presencia de una componente de inhibición estática de ANT a altas concentraciones de DMI [5].

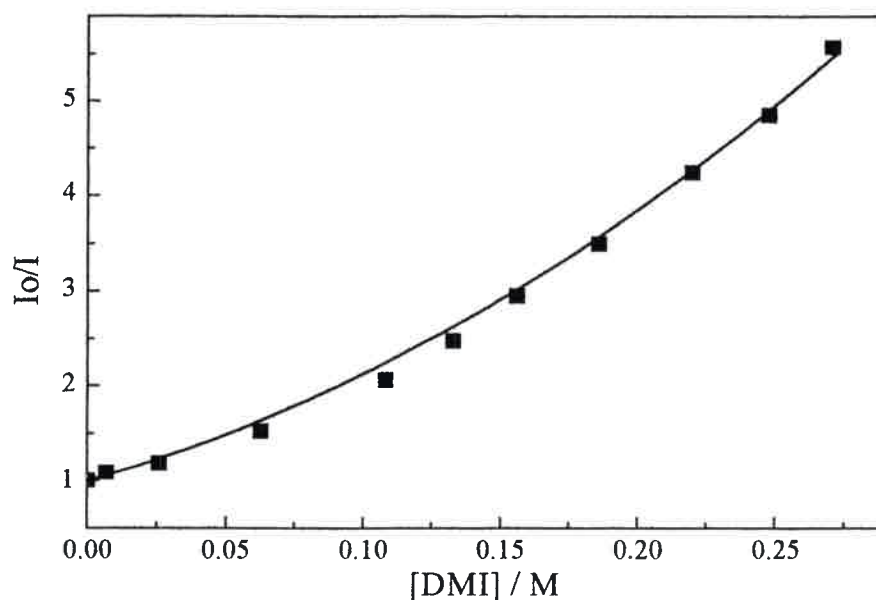


Figura V. 22: Gráfico de Stern-Volmer para la inhibición de la fluorescencia de ANT por DMI en n-heptano. Altas concentraciones de DMI.

El análisis del comportamiento de la emisión del excíplejo con respecto a la concentración de DMI se realizó siguiendo el cambio de la relación de la intensidad del excíplejo ANT-DMI, ( $I_{exc}$ ), con la intensidad del monómero ANT, ( $I_{mon}$ ). Se sabe [40, 41] que la relación anterior, ( $I_{exc} / I_{mon}$ ), presenta un comportamiento lineal con la concentración del inhibidor cuando este último está involucrado solamente en el proceso de inhibición del fluoróforo y la posterior formación del excíplejo. En la Figura V. 23 se muestra el comportamiento de la relación  $I_{exc} / I_{mon}$  en n-heptano y en la Figura V. 24 los resultados de dicha experiencia en las vesículas de POPC en la fase líquido-cristalina y en las de DMPC en las fases gel y líquido-cristalina.



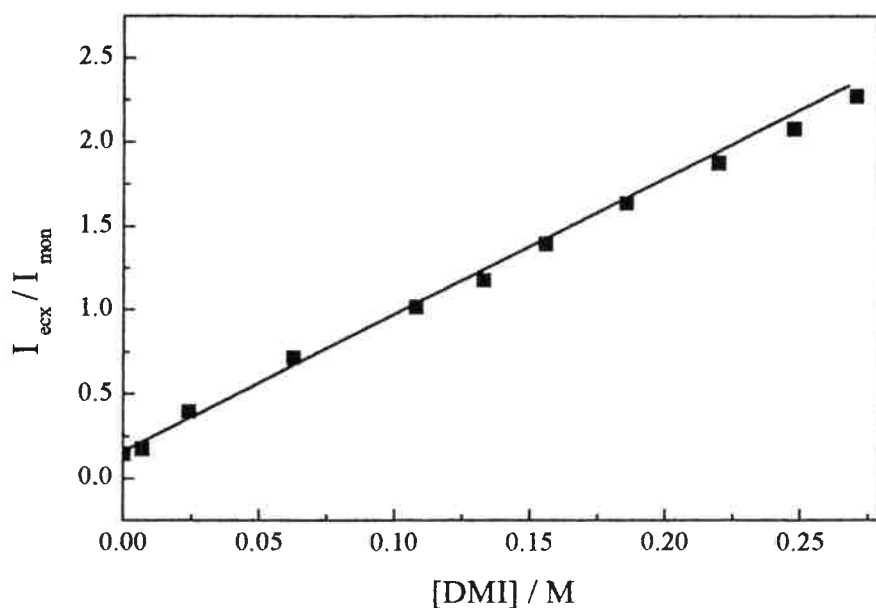


Figura V. 23: Comportamiento de la relación de intensidad del exciplojo con respecto a la intensidad del monómero ( $I_{exc} / I_{mon}$ ) con la concentración de DMI en n-heptano.

El hecho más notable que se observa al comparar la Figura V. 23 y la Figura V. 24 es que el comportamiento de la relación de las emisiones del exciplojo y del monómero con el agregado de inhibidor es diferente en los medios organizados con respecto a n-heptano. Por un lado, en el medio homogéneo se encuentra que la relación  $I_{exc} / I_{mon}$  presenta un comportamiento lineal con la concentración de DMI, indicando que la intensidad de emisión del exciplojo aumenta a medida de que se incrementa la cantidad de inhibidor presente. Por el otro lado, en las vesículas se halla una conducta diferente. En la Figura V. 24 se observa que en estos medios organizados, tanto en la fase gel como en la líquido-cristalina, la relación  $I_{exc} / I_{mon}$  no es lineal con la concentración del inhibidor. Se encuentra en todos los casos que el gráfico de  $I_{exc} / I_{mon}$  vs. la concentración de DMI se curva hacia abajo. Esta desviación de la linealidad es debida a que la  $I_{exc}$  disminuye con la concentración del inhibidor. Lo previo implica que en el medio organizado a medida de que se avanza con la inhibición de ANT por DMI y se forma el exciplojo emisivo, esta nueva especie llega a una instancia en la que también

comienza a ser inhibida.

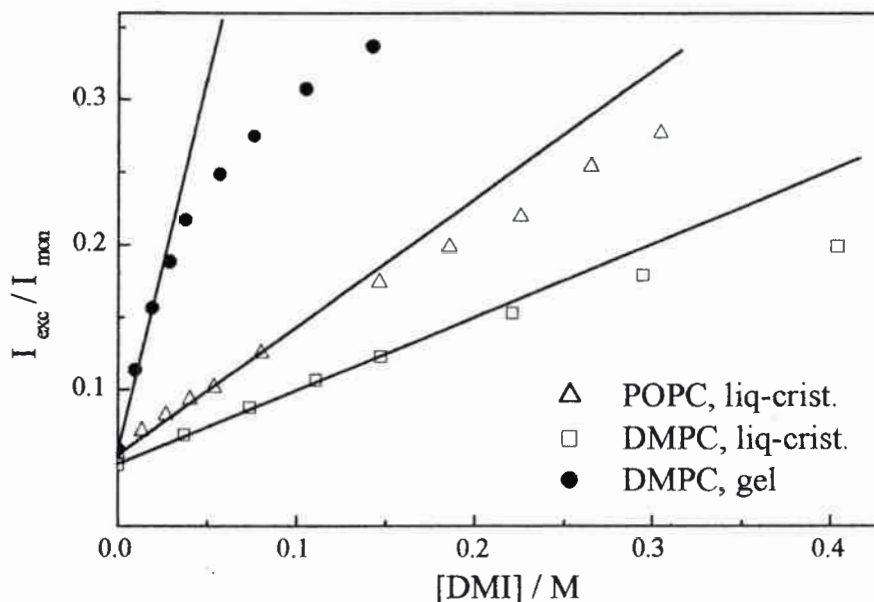
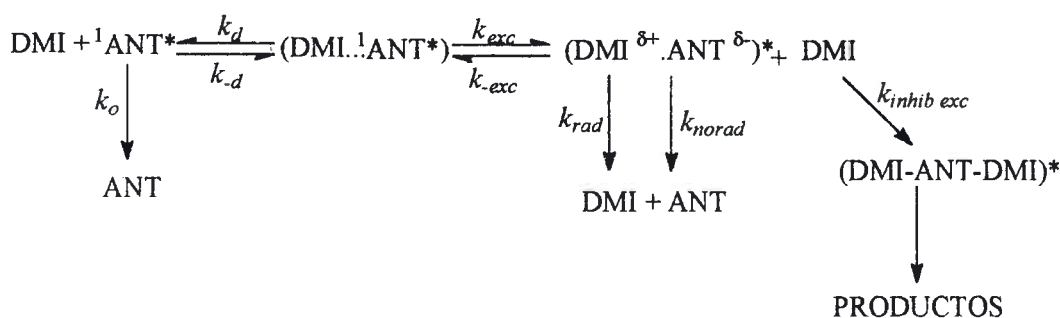


Figura V. 24: Comportamiento de la relación de intensidad del excíplejo con respecto a la intensidad del monómero,  $I_{exc} / I_{mon}$ , con la concentración de DMI en vesículas de POPC y DMPC, fosfolípido/ANT 100/1.

La inhibición del excíplejo es una de las posibles vías de desactivación que éste puede sufrir. Puede ser provocada por el mismo inhibidor del fluoróforo, como se observa en la Figura V. 24, o por otra molécula diferente. En bibliografía se encuentran estudios [41, 42] sobre el comportamiento de la emisión de excíplejos con el agregado de inhibidores. Van y otros [41] estudiaron en ciclohexano la cinética de desactivación de excíplejos polares formados por diferentes naftalenos como fluoróforos y trietilamina ( $Et_3N$ ) y metilpiperidina como inhibidores. Ellos encontraron en las distintas experiencias que los agregados iniciales de los inhibidores disminuyen la emisión del fluoróforo y aumentan la emisión de los excíplejos hasta que se llega a las situaciones en las que el aumento de la concentración de los inhibidores produce la inhibición de los excíplejos. Por otro lado, Wehry [42] encontró que el excíplejo ANT-N,N-dietilanilina en benceno es inhibido sólo por compuestos que presentan la propiedad de ser aceptores de

electrones. Los resultados anteriores se pueden explicar mediante la formación de un complejo excitado entre el exciplejo y el inhibidor llamado exciplejo ternario. Debido a que estas especies excitadas son inhibidas selectivamente por dadores o aceptores de electrones y no por ambos [42], se puede considerar que son debidas a interacciones de transferencia de carga. Considerando lo anterior se puede conjeturar que si el inhibidor es aceptor de electrones va a interactuar con el extremo del exciplejo rico en electrones.

Según los antecedentes anteriores, los resultados mostrados en la Figura V. 24 se los puede interpretar como debidos a que la inhibición del exciplejo ANT-DMI en las vesículas sería causada por la formación del exciplejo ternario (DMI-ANT-DMI)\*. El mecanismo de reacción que explicaría lo anterior se muestra en el Esquema V.1.



Esquema V.1

En el esquema anterior se representan las distintas vías de desactivación de  ${}^1\text{ANT}^*$  y del exciplejo representado como  $(\text{DMI}^{\delta+} \cdots \text{ANT}^{\delta-})^*$ . Todas las constantes de velocidad tienen el mismo significado que en el Esquema II.2 de la Sección II-3-2 y  $k_{inhib\ exc}$  corresponde a la constante de la etapa de inhibición del exciplejo por DMI.

Es importante destacar que en la Figura V. 24 se evidencia como la relación  $I_{exc} / I_{mon}$  presenta tanto un mayor crecimiento como un mayor consumo en las vesículas de DMPC en la fase gel. Se observa que hay una mayor emisión del exciplejo en las vesículas en fase gel que en la fase líquido-cristalina. El hecho anterior implicaría que las restricciones de movimiento impuestas por la bicapa favorecerían la emisión del exciplejo ya que la mayor viscosidad del microentorno hace que esta especie emisiva viva más. La

causa que provocaría el mayor consumo del exciplejo con el agregado de DMI en la fase gel de DMPC con respecto a las líquido-cristalina de ambos fosfolípidos podría ser debida a que como el exciplejo vive más en las vesículas en fase gel reaccionaría con DMI a menores concentraciones de éste último. El hecho anterior implicaría que el factor que regiría esta reacción sería tiempo de vida del exciplejo más que la capacidad de movilidad de las especies en las distintas fases de las vesículas.

El comportamiento diferente en los medios homogéneos y microheterogéneos puede deberse a la imposición de orden y la restricción de movimiento de las distintas especies en las vesículas. Estos hechos provocarían que el exciplejo formado en la región de la interfase de los medios organizados quede más expuesto a DMI que con respecto al mismo exciplejo en el medio homogéneo, de modo que solamente es posible observar la inhibición del exciplejo en las vesículas.

#### V-5- Estudio de la emisión en las vesículas de DMPC. Efecto de la temperatura.

En el Capítulo II en la Sección 1-8 se explicó que este tipo de medios organizados presenta diferentes fases en su estructura en función de la temperatura. El cambio estructural más importante es el pasaje de la fase compacta gel a la fase líquido-cristalina donde, en esta última, es mayor el movimiento de las moléculas individuales de los fosfolípidos. La temperatura a la que ocurre este cambio es llamada temperatura de transición de fase, ( $T_f$ ). Se sabe que [1] el valor de  $T_f$  que presentan las vesículas depende principalmente de la longitud y del grado de insaturación (del tipo *cis* para fosfolípidos naturales) de las cadenas hidrocarbonadas lineales. A medida de que las cadenas del fosfolípido aumentan su longitud necesitan mayor energía térmica para cambiar de la fase gel a la líquida-cristalina. Por otro lado el efecto que produce la insaturación del tipo *cis* es disminuir el grado de empaquetamiento entre las cadenas hidrocarbonadas y así debilitar las interacciones entre éstas causando de este modo la disminución de la  $T_f$ . Por ejemplo la fosfatidilcolina de huevo (lecitina de huevo) está formada por una mezcla de fosfolípidos con cadenas de distintos largos y con diferentes grados de insaturación, las vesículas preparadas con esta lecitina poseen muy bajas temperaturas de  $T_f$  comprendidas entre  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En cambio, la  $T_f$  de membranas

preparadas con una fosfatidilcolina con el esqueleto del glicerol esterificado con dos cadenas del ácido graso esteárico (de 18 átomos de carbono y saturado) presenta un valor mucho más elevado de  $T_f$  mayor de 55 °C [1].

El fosfolípido DMPC está compuesto por dos cadenas de ácido graso mirístico, formadas por catorce átomos de carbono, esterificadas en las posiciones 1 y 2 del esqueleto del glicerol, (su estructura se encuentra en el Capítulo I). Como éste es un ácido graso saturado y sin ramificaciones, la interacción y el empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas en la molécula del fosfolípido es alto. Cuando las moléculas de este fosfolípido forman vesículas presentan interacciones intra e intermoleculares considerables. En consecuencia las vesículas formadas por el fosfolípido DMPC necesitan relativamente alta energía térmica para cambiar su estado de la fase gel a la líquido-cristalina. El valor de  $T_f$  en este caso es de 24 °C [4]. Por consiguiente se puede analizar el efecto del cambio de fase del estado gel a líquido-cristalino de estas membranas en rangos de temperaturas accesibles fácilmente en el laboratorio.

Existe en literatura estudios sobre el efecto de la temperatura en vesículas. Por ejemplo, Kano y otros [39] estudiaron el efecto de la temperatura sobre la movilidad de pireno-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-N,N,dimetilanilina para lograr la formación del excíplejo intramolecular en vesículas de DPPC. Así, estos autores observaron el cambio de la emisión del monómero y del excíplejo con la temperatura y analizando la variación de la relación de intensidad del excíplejo con la intensidad del monómero, pudieron determinar la temperatura de transición de fase de los liposomas.

En esta tesis se estudió el efecto del cambio de temperatura sobre la emisión de fluorescencia de ANT en ausencia y presencia de DMI en las vesículas de DMPC. Se siguió la variación de la emisión de ANT a 380 nm y la del excíplejo ANT-DMI a 472 nm en un rango de alrededor de 10 °C por debajo y por encima de  $T_f$ . Las experiencias se efectuaron en dos etapas: primeramente se elevó (disminuyó) la temperatura y posteriormente se la disminuyó (elevó) retornando al valor inicial. Lo anterior se realizó para estudiar el fenómeno de histéresis térmica [43], es decir si la  $T_f$  del fosfolípido durante el enfriamiento (calentamiento) difiere con el calentamiento (enfriamiento).

En todos los casos las condiciones experimentales fueron las mismas, se trabajó termostatazando con circulación continua de agua y se midió la temperatura en el

contenido de la celda usando un termómetro digital en punta. Cuando el contenido de la celda llegó a la temperatura deseada se tomó el espectro de emisión. En todos los casos se realizaron medidas por duplicado encontrándose similares resultados.

Para interpretar estas medidas fue necesario investigar el comportamiento de las vesículas “vacías” en función de la temperatura. Este estudio fue realizado analizando el cambio de la dispersión de la luz de excitación a 500 nm. En la Figura V. 25 se muestra la dispersión de luz normalizada de las vesículas “vacías”. Se puede observar un cambio brusco en la medida de dispersión en función de la temperatura con un punto de inflexión próximo a 24 °C tanto en la etapa de aumento o de disminución de la temperatura. El punto de inflexión corresponde a la  $T_f$  de las vesículas de DMPC. En este experimento se encuentra que las dos etapas de la medida, primero el aumento de temperatura y segundo su disminución, o viceversa (figura no mostrada), dispersan la luz prácticamente de igual manera no observándose el fenómeno de histéresis térmica.

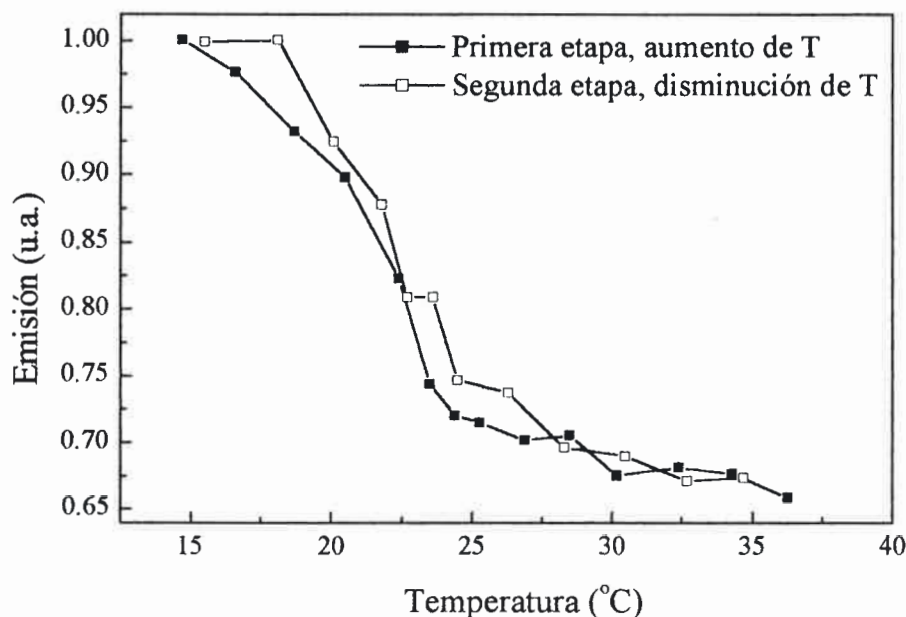


Figura V. 25: Efecto de la temperatura en la dispersión de luz de vesículas de DMPC “vacías”. Longitud de onda de excitación y emisión: 500 nm.  $[DMPC] = 3,78 \times 10^{-4}$  M

En la Figura V. 26 se observa el efecto de la temperatura en la intensidad de

fluorescencia de ANT medido a 380 nm.

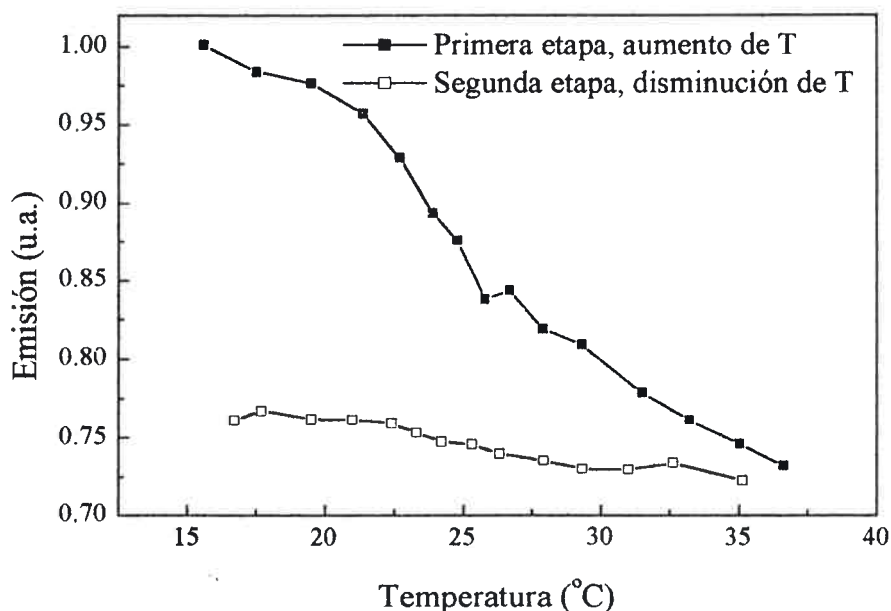


Figura V. 26: Efecto de la temperatura en la intensidad de fluorescencia de ANT a 380 nm en vesículas de DMPC. DMPC/ANT 100/1,  $[DMPC] = 3,76 \times 10^{-4}$  M.

En esta experiencia las emisiones correspondientes a la primera etapa (aumento de temperatura) y a la segunda etapa (disminución de la temperatura) son diferentes. Se comprobó que esta diferencia no es provocada por el corrimiento de los espectros de ANT con el cambio de temperatura. En consecuencia, en esta experiencia se observa el fenómeno de histéresis térmico. Este fenómeno podría ser debido a una transformación estructural de la bicapa no reversible al menos en la escala de tiempo del experimento. En la literatura existen antecedentes [44, 45] sobre la presencia del fenómeno de histéresis térmico en vesículas cuando se les agrega alta concentración de alcoholes de cadena corta (1 a 2 M). Este efecto se observa en las transiciones de la fase gel a la líquido-cristalina de vesículas de fosfatidilcolinas y no en las de fosfatidiletanolaminas [44]. Rowe [44] ha sugerido que la irreversibilidad termodinámica observada estaría correlacionada con la inducción a una estructura resultante del entrecruzamiento de las moléculas de los fosfolípidos enfrentados de cada monocapa (*interdigitación*) de los

liposomas. Con respecto a los liposomas *interdigitados* se sabe que [2] las moléculas inductoras de este tipo de estructura son pequeños anfifilos que pueden desplazar moléculas de agua de hidratación de la cabeza polar del fosfolípido pero que no pueden penetrar profundamente a la bicapa. En consecuencia de lo anterior, la *interdigitación* no explicaría el fenómeno de histeresis térmico en las experiencias de esta tesis ya que ANT no se lo podría considerar como un pequeño anfifilo y además porque se encuentra presente en bajas concentraciones (del orden mM). Según el desarrollo anterior a este nivel de la investigación no es posible dar una explicación clara sobre este hecho.

Por otro lado, en la Figura V. 26 se observa en ambas etapas que a medida de que aumenta la temperatura disminuye la emisión de la fluorescencia debido al incremento de los procesos de relajación no radiativos como es el comportamiento general en los medios homogéneos. Por último se encuentra, tanto en la etapa del aumento como en la disminución de la temperatura, una tendencia en el cambio de la curvatura alrededor de 24 °C próximo a la temperatura de  $T_f$ .

En la Figura V. 27 se muestra la experiencia en la que se encuentran presentes en las vesículas ANT y DMI. En consecuencia se puede analizar el efecto del cambio de temperatura tanto en la emisión de ANT como en la emisión correspondiente al exciplojo ANT-DMI. El rango de temperatura estudiado en este caso es mayor, llegando a menores temperaturas con respecto a las experiencias mostradas en la Figura V. 25 y en la Figura V. 26. La causa de estudiar las emisiones a temperaturas menores es debida a que en el rango entre 15 °C y 35 °C no se observan cambios en las emisiones que indiquen la temperatura de transición de fase de las vesículas.

La influencia que provoca el efecto de la temperatura sobre la partición de DMI en las vesículas no se la considera en el análisis de estos resultados; en consecuencia se supone que la concentración de DMI en las vesículas permanece constante. Lo anterior se fundamenta en que como en la Figura V. 27 prácticamente no se observa el fenómeno de histéresis térmica, es lógico considerar que la concentración de DMI permanece constante en las vesículas.



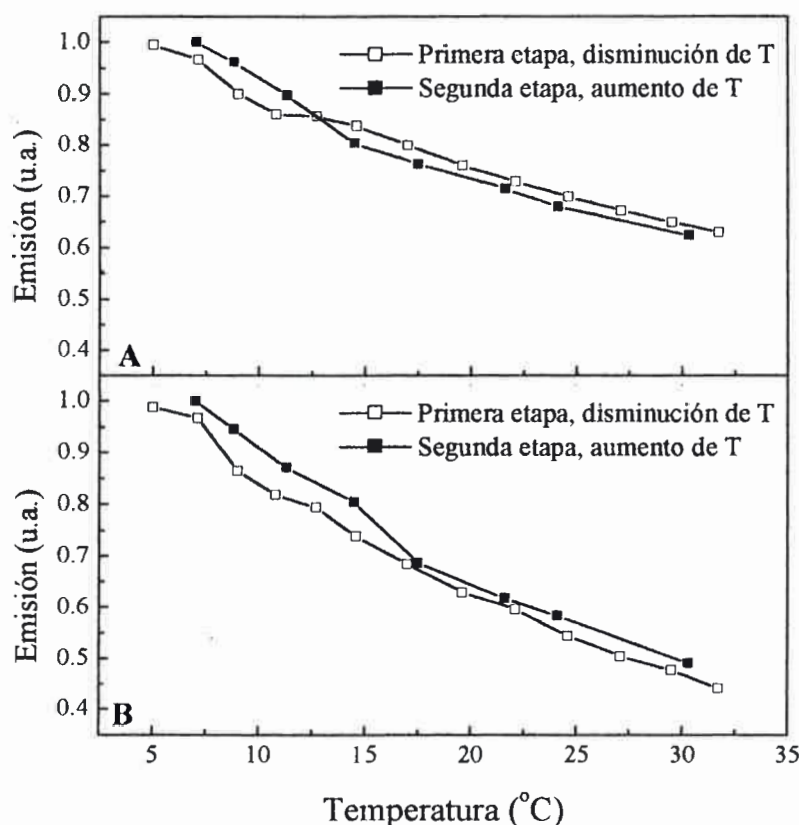


Figura V. 27: Efecto de la temperatura en la intensidad de fluorescencia. A de ANT,  $\lambda$  emis.: 380 nm y B del excíplejo ANT-DMI,  $\lambda$  emis.: 472 nm, en vesículas de DMPC. DMPC/ANT 100/1, [DMPC] =  $5,03 \times 10^{-4}$  M, [DMI] analítica =  $5,59 \times 10^{-4}$  M.

La emisión correspondiente a ANT a 380 nm es diferente al comportamiento que presenta ANT en ausencia del inhibidor. Los resultados mostrados en la Figura V. 27 indican que la presencia de ANT y DMI en las vesículas provoca un efecto de corrimiento de la  $T_f$  a menores valores. La disminución de la  $T_f$  provocaría que en el rango de temperatura estudiado no se observe el punto de inflexión. Las vesículas no cambiarían su estado o fase y no se observaría el fenómeno de histéresis térmica. Una posible causa sería que la presencia de DMI ubicado en la región de la interfase de las vesículas estaría alterando la posición de los esqueletos del glicerol. De este modo, las moléculas de los fosfolípidos estarían algo más distanciadas entre sí tal que la interacción

entre las colas hidrocarbonadas de los ácidos esterificados se debilitarían y en consecuencia disminuiría la  $T_f$ . Existen en la literatura antecedentes sobre la perturbación de la  $T_f$  de vesículas debido a la presencia de pequeñas moléculas no anfipáticas [1]. Habitualmente se atribuye este efecto a la intercalación de los solutos entre las diferentes regiones de las moléculas de los fosfolípidos. Esta ubicación depende de las interacciones específicas entre los solutos y las distintas regiones de la membrana. Así, se puede considerar que los solutos en las bicapas originan “defectos” debilitando de este modo las interacciones entre las regiones no polares provocando la disminución de  $T_f$ .

En la Figura V. 27 se observa en la etapa de disminución de temperatura, tanto en la emisión de ANT como la del exciplojo, que parecería insinuarse un salto alrededor de 8°C que indicaría nueva  $T_f$ .

Al comparar las emisiones obtenidas en función de la temperatura para ANT y para el exciplojo ANT-DMI se observa cualitativamente que ambos sensan el mismo efecto; pero para el caso del exciplojo se encuentra que la variación de la intensidad de emisión presenta mayor sensibilidad al cambio de la temperatura. Lo anterior podría ser debido a que el aumento de la temperatura afecta más a la emisión del exciplojo que a la de ANT; ya que al poseer más energía térmica ANT\* y DMI es más difícil que formen el exciplojo.

V-6-Referencias.

- [1] R.R.C. New, *Liposomes. A practical approach*, Oxford University Press Inc., New York, 1997.
- [2] D.D. Lasic, *Liposomes: from physics to applications*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1995.
- [3] *Handbook of Lipid Bilayers*, D. Marsh, CRC Press, Boca Raton, FL, 1990.
- [4] K. Kalyanasundaram, *Photochemistry in Microheterogeneous Systems*, Academic Press, INC, New York, 1987. Capítulo 6.
- [5] J.R. Lakowicz. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Ed. Kluwer Academic, New York. 2nd Ed., 1999. Capítulo 8.
- [6] D.V. O'Connor, D. Phillips. *Time-correlated single photon counting*. Ed. Academic Press. 1984.
- [7] S.L. Murov, I. Carmichael and G.L. Hug, *Handbook of Photochemistry*, 2nd. ed., Marcel Dekker, New York, 1993.
- [8] J.R. Lakowicz. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Ed. Kluwer Academic, New York. 2nd Ed., 1999. Capítulo 4.
- [9] A.S. Ladokhin, H. White, *Alphas and Taus of tryptophan in membranes*, *Biophys. J.*, 81, (2001), 1825.
- [10] J.R. Lakowicz. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Ed. Kluwer Academic, New York. 2nd Ed. 1999. Capítulo 2.
- [11] G. Åkerlöf, *Dielectric constants of some organic solvent-water mixtures at various temperatures*, *J. Am. Chem. Soc.* 54, (1932), 4125.
- [12] R. Gennis. *Biomembranes, molecular structures and function*, Ed. Springer Verlag. New York, 1989. Capítulo 7.
- [13] W. Yau, W.C. Wimley, K. Gawrisch, S. H. White, *The preference of tryptophan for membrane interfaces*, *Biochemistry* 37, (1998) 14713.
- [14] R.R.C. New. *Liposomes: a practical approach*. Oxford University Press. 4th Ed. 1997. Capítulo 1.
- [15] P. Lianos, A.K. Mukhopadhyay, S. Georghiou, *Microenvironment of aromatic hydrocarbons employed as fluorescent probes of liposomes*, *Photochem. Photobiol.* 32

(1980) 415.

[16] S.H. Pine, J.B. Hendrickson, D.J. Cram, G.S. Hammond, *Química Orgánica*, Ed. McGraw-Hill, México, 1988. Capítulo 16.

[17] *Handbook of Chemistry and Physics 44<sup>TH</sup>*, C.D. Hodgman, The Chemical Rubber Publishing Company, Ohio, 1961.

[18] K.D. Ashby, K. Das, J.W. Petrich, *The effect of micelles on the steady-state and time resolved fluorescence of indole, 1-methylindole, and 3-methylindole in aqueous media*, Anal. Chem. 69, (1997), 1925.

[19] J.R. Lakowicz. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Ed. Kluwer Academic, New York. 2nd Ed. 1999. Capítulo 16.

[20] J. A. Baltrop and J.D. Coyle, *Principles of photochemistry*, Ed. Jhon Wiley & Sons, 1978. Capítulo 3.

[21] R.E. Jacobs, S. H. White, *The nature of the hydrophobic binding of small peptides at the bilayer interface: implications for the insertion of transbilayer helices*, Biochemistry 28, (1989), 3421.

[22] S.G. Bertolotti, J.J. Cosa, C.M. Previtali, M.V. Encinas, E.A. Lissi, *Fluorescence quenching of indolic compounds in reverse micelles of AOT*, Photochem. Photobiol. 51, (1990), 53.

[23] P.M. Nassar, L.E. Almeida, M. Tabak, *Binding of dipyrromethole to phospholipid vesicles: a fluorescence study*, Biochim. Biophys. Acta 1328, (1997), 140.

[24] Z.Huang, R. P. Haugland, *Partition coefficients of fluorescent probes with phospholipid membranes* Biochem. Biophys. Res. Comm. 181 (1991), 166.

[25] M.K. Jain, J. Rogers, L. Simpson, L.M. Gierasch, *Effect of tryptophan derivatives on the phase properties of bilayers*. Biochim. Biophys. Acta, 816, (1985), 153.

[26] J. Zeng, P. Lee-Gau Chong, *Effect of ethanol-induced lipid interdigitation on the membrane solubility of prodan, acdan, and laurdan*, Biophys. J. 68, (1995), 567.

[27] C.M.Gómez, A. Codoñer, A. Campos, C. Abad, *Thermodynamic study of small hydrophobic ions at the water-lipid interface*, J. Colloid Interface Sci. 251, (2002), 172.

[28] M. Kepczynski, R.P. Pandian, K.M. Smith, B. Ehrenberg, *Do liposome binding constants of porphyrins correlate with their measured and predicted partitioning*

- between octanol and water?*, Photochem. and Photobiol., 76(2), (2002), 127.
- [29] J.R. Lakowicz. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Ed. Kluwer Academic, New York. 2nd Ed. 1999. Capítulo 9.
- [30] W.C. Wimley, S.H. White, *Membrane partitioning: Distinguishing bilayer effects from hydrophobic effects*. Biochemistry, 32, (1993), 6307.
- [31] E. Abuin, E. Lissi, *Fluorescence quenching in the study of micellar and vesicular systems*. Bol. Soc. Chil. Quím., 42 (1997), 113.
- [32] E. Abel, S. L. De Wall, W. B. Edwards, S. Lalitha, D. F. Covey, G. W. Gokel, *Formation of stable vesicles from N- or 3-Alkylindoles: Possible Evidence for Tryptophan as a membrane anchor in proteins*. J. Org. Chem. 65, (2000), 5901.
- [33] M.R.R. de Planque, J.A.W. Kruijtzter, R.M.J. Liskamp, D. Marsh, D.V. Greathouse, R.E. Koeppe II, B.de Kruijff, J.A. Killian, *Different membrane anchoring positions of tryptophan and lysine in synthetic transmembrane  $\alpha$ -helical peptides*, Biol. Chem., 274, (1999), 20839.
- [34] S. H. White, W. C. Wimley, *Hydrophobic interactions of peptides with membrane interfaces*, Biochim. Biophys. Acta 1376, (1998), 339.
- [35] J. A. Baltrop and J.D. Coyle, *Principles of photochemistry*, Ed. J. Wiley & Sons, (1978). Capítulo 4.
- [36] Y. Waka, N. Mataga, F. Tanaka, *Behavior of heteroexcimer systems in single bilayer liposomes*, Photochem. and Photobiol. 32, (1980), 335.
- [37] K. Kano, H. Kawazumi, T. Ogawa, J. Sunamoto, *Fluorescence quenching of pyrene and pyrene decanoic acid by various kinds of N,N-dialkylanilines in dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes*, Chem. Phys. Letters, 74, (1980), 511.
- [38] K. Kano, H. Kawazumi, T. Ogawa, J. Sunamoto, *Fluorescence quenching in liposomal membranes. Exciplex as a probe for investigating artificial lipid membrane properties*, J. Phys. Chem. 85, (1981), 2204.
- [39] K. Kano, H. Goto, T. Ogawa, *Solvent effects on fluorescence of intramolecular heteroexcimer system and its use for investigating polarity of microscopic environment*, Chem. Letters, (1981), 653.
- [40] J. B. Birks, *Photophysics of aromatic molecules*, Wiley-Interscience, London,

(1970). Capítulo 9.

[41] S-P. Van, G. S. Hammond, *Amine quenching of aromatic fluorescence and fluorescent exciplexes*, J. Am. Chem. Soc., 100, (1978), 3895.

[42] E.I. Wehry, *Modern fluorescence spectroscopy*, Plenum Press, New York, 1976. Tomo 2, capítulo 8.

[43] K. N. Barton, M. M. Buhr, J. S. Ballantyne, *Effects of urea and trimethylamine N-oxide on fluidity of liposomes and membranes of an elasmobranch*, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 276, (1999), 397.

[44] E.S. Rowe, *Thermodynamic reversibility of phase transitions. Specific effects of alcohols on phosphatidylcholines*, Biochim. Biophys. Acta 813, (1985), 321.

[45] F. Zhang, E.S. Rowe, *Titration calorimetric and differential scanning calorimetric studies of the interactions of n-butanol with several phases of dipalmitoylphosphatidylcholine*, Biochemistry 31, (1992), 2005.

## VI. CONCLUSIONES

### VI-1-Medios homogéneos.

Las reacciones de inhibición de fluorescencia de ANT y sus derivados por los compuestos indólicos en medios homogéneos siguen diferentes mecanismos según la polaridad del medio:

-En medio relativamente polar, acetonitrilo, la reacción ocurre vía una cinética de transferencia de electrón.

-En medios de menor polaridad los resultados pueden ser explicados mediante la formación de exciplejos polares. La forma del decaimiento del exciplejo es dependiente de la sustitución sobre el átomo de nitrógeno del anillo indólico. Cuando está sustituido con el grupo metilo se observa su emisión; mientras que para los indoles que presentan la unión N-H no se observa la emisión de esta especie excitada. Con respecto a las constantes de velocidad bimoleculares de inhibición de fluorescencia se encontró que son mayores para los indoles que presentan la unión N-H con respecto a los derivados indólicos metil sustituidos. Por otro lado, los compuestos indólicos que poseen la unión N-H reaccionan fotoquímicamente con ANT y sus derivados. Los comportamientos anteriores pueden ser explicados considerando que ocurre una reacción fotoquímica rápida de transferencia del átomo de hidrógeno de la unión N-H como una ruta alternativa para el decaimiento no emisivo del exciplejo.

### VI-2-Medios organizados.

La reacción de inhibición de fluorescencia de ANT por los inhibidores DMI, IN, TRP y IAA se comporta de manera similar tanto en las vesículas unilaminares como en las multilaminares.

Con respecto a los valores de las constantes bimoleculares de velocidad de inhibición de fluorescencia, calculados usando la concentración analítica de los inhibidores, son mayores en los dos tipos de vesículas que en los medios homogéneos. Solamente DMI presenta un comportamiento clásico de la ecuación de Stern Volmer.

Estos hechos son debidos principalmente a la compartimentalización de los distintos compuestos en los medios organizados.

Con respecto a la compartimentalización de las especies en las vesículas unilaminares de POPC y DMPC se puede establecer lo siguiente:

-ANT está homogéneamente localizado en una región de la interfase relativamente polar y sensa prácticamente la misma micropolaridad en los distintos estados de fase de las vesículas.

-Los inhibidores hidrofóbicos, IN y DMI presentan partición a las vesículas. El estado de fase de la bicapa de las vesículas afecta la partición, presentando ambos mayor partición en la fase líquido-cristalina que en la fase gel. IN presenta menor partición y una distribución más uniforme que DMI.

-Los inhibidores TRP y IAA se hallarían en la región externa de la interfase de las vesículas. Esta ubicación de TRP en las vesículas de POPC y DMPC estaría de acuerdo con los resultados encontrados en el estudio de la ubicación de los residuos de este aminoácido de algunas proteínas transmembranales realizados en vesículas fosfolipídicas grandes.

Al analizar los valores de las constantes bimoleculares de velocidad de inhibición de fluorescencia, considerando las concentraciones reales de los inhibidores en las vesículas se observa:

-Para IN y DMI tanto en la fase gel como en la líquido-cristalina son menores que en los medios homogéneos debido a la mayor viscosidad del medio organizado. Además, considerando la alta micropolaridad sensada por el fluoróforo y estos inhibidores la reacción bimolecular de inhibición ocurriría en las bicapas mediante un mecanismo de reacción de transferencia de electrón al igual que en el solvente polar acetonitrilo.

-Para IAA y TRP se encuentra que los valores de dichas constantes son mayores que el límite difusional en agua.

En el estudio de la inhibición de ANT por DMI en las diferentes vesículas se observó la emisión del exciplexo al igual que en los medios homogéneos de baja e intermedia polaridad. El espectro de emisión de esta especie excitada es prácticamente el mismo en las vesículas de POPC y de DMPC, tanto en la fase gel como en la líquido-



crystalina. Este exciplojo sensa una región de alta polaridad de la bicapa y puede formarse en este microentorno debido al orden impuesto por el medio organizado. Por otro lado, esta polaridad no es sorprendente si se considera la ubicación en este medio organizado de las moléculas que lo forman.

DMI a altas concentraciones inhibe tanto la emisión de ANT como la del exciplojo. Este comportamiento que solamente se observa en las vesículas es debido nuevamente a la imposición de orden y la restricción de movimiento de las distintas especies.

Con respecto al estudio del efecto del cambio de fase gel a líquido-cristalino o viceversa en las vesículas de DMPC, se encontró que tanto la dispersión de las vesículas “vacías” como la emisión de ANT son afectadas por el cambio de fase. Cuando se analiza la emisión de las diferentes especies se encuentra que disminuyen con el aumento de la temperatura debido al incremento de los procesos de relajación no radiativos como es el comportamiento general en los medios homogéneos. La dispersión de las vesículas “vacías” no presenta el fenómeno de histéresis térmica, mientras que la emisión de ANT si lo hace. Por otro lado, cuando se encuentra presente DMI no se observa claramente en las emisiones de ANT y del exciplojo la transición de fase de las vesículas y en consecuencia estas medidas no muestran el fenómeno de histéresis. En estas experiencias el comportamiento de la emisión de ANT es similar a la del exciplojo evidenciándose en esta última mayor sensibilidad al cambio de temperatura.



U.N.R.C.  
Biblioteca Centrali



59549

59549

