

## **Informe final beca BENTR14**

**Becario: Nicolás Calzetta**

**Directora: Silvia del Valle Alonso**

## Materiales y métodos – Caracterización

### 1. Reactivos

Los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich, salvo en los casos en los que se indique específicamente lo contrario. Los solventes utilizados son de grado de pureza para espectrometría. Las soluciones acuosas se prepararon con agua destilada posteriormente desionizada a  $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$  en un sistema de purificación Milli-Q (Meck Millipore).

La solución madre de merocianina 540 (MC540) se preparó a una concentración de 10-3 M y se conserva a  $-20^\circ\text{C}$  en la oscuridad.

### 2. Fotorreactor

Durante los primeros ensayos realizados para este seminario las fotorreacciones se llevaron a cabo mediante irradiación de soluciones de MC540 10-3 M con diferentes tipos de lámparas.

Para ello, en las etapas iniciales utilizamos irradiación a 254 nm (con lámparas ultravioletas “UV Crosslinker Model 1800 40 W Stratalinker”) o exposición directa con luz blanca mediante el uso de lámparas fluorescentes (8 W “OSRAM Duluxtar miniTwist T2” o 45 W “ALIC LAM7608”) a temperatura ambiente ubicando el tubo de ensayos a una distancia de 6.5 cm de la fuente de luz.

La exposición directa a la luz era detenida cuando se observaba un cambio de la coloración de la solución desde rojo intenso a naranja amarronado (punto final) y la medición del espectro de absorbancia indicaba la desaparición del máximo de absorbancia característico en la región visible del espectro de MC540.

Posteriormente, con el fin de lograr una exposición a la luz se utilizó un dispositivo más eficiente diseñado en el laboratorio para obtener las condiciones experimentales que permitieron una adecuada reproducibilidad de resultados manteniendo bajo control los parámetros más relevantes del proceso.

El reactor utilizado en el laboratorio con el cual se obtuvieron los resultados del presente seminario está representado en la Figura 1.

La configuración de este dispositivo permite la utilización simultánea de dos fuentes de luz ubicadas equidistantemente de la solución de MC540; contando además con un sistema de ventilación para evitar el sobrecalentamiento del sistema.

Figura 1: Fotorreactor. A) Vista general. B) Corte longitudinal.

Referencias: 1: Soporte para sistema de ventilación. 2: Soporte para sistema de iluminación. 3: Tapa. 4: Soporte del reactor. 5: Interruptor de corriente eléctrica. 6: Base. 7: Sistema de ventilación. 8: Lámpara LED “lighting EVER A60 12W”. 9: Lámpara fluorescente “ALIC E27 45 W”. 10: Soporte cristizador.

### 3. Fotorreacción

La solución de MC540 a  $10^{-3}$  M se introduce en cristizador de vidrio y se irradia con luz blanca a temperatura ambiente. La irradiación se detiene cuando el color cambia desde rojo intenso a naranja amarronado (punto final) y la medición del espectro de absorbancia indica la desaparición del máximo de absorbancia característico en la región visible del espectro de MC540.

La concentración total de fotoproductos de merocianina (pMC540) obtenidos se considera la misma que la de MC540 previa a la reacción fotoquímica. Una vez obtenidos los fotoproductos, estos se almacenan a  $-20^{\circ}\text{C}$  en oscuridad.

#### 4. 1 Espectroscopía UV-Visible y fluorescencia

Las soluciones de merocianina 540 (MC540) y los productos de fotorreacciones (pMC540) fueron diluidos por triplicado a una concentración final de  $10^{-5}$  M dado que la MC540 forma agregados a mayores concentraciones, particularmente en solventes polares [Lelkes y Miller, 1980. Ehrenberg y Pevzner, 1993].

Los espectros fueron obtenidos a partir de al menos tres experimentos independientes de la siguiente manera: los espectros UV-Visible se obtuvieron en un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV 1603 (Shimadzu Co. Japón).

Los espectros de emisión de fluorescencia se obtuvieron en un espectrofluorómetro (PONER MARCA) luego de excitación a 475 nm.

#### 4.2 Cinética de fotorreacción

A diferentes tiempos durante la fotorreacción se toman muestras para realizar obtener el espectro UV-Visible. La toma de muestras para este ensayo finaliza al momento en el cual el color cambia desde rojo intenso a naranja amarronado (punto final) y la medición del espectro de absorbancia indicaba la desaparición del máximo de absorbancia característico en la región visible del espectro de MC540.

### 5. Espectroscopía infrarroja (FT-IR)

Los espectros infrarrojos se registraron por triplicado a partir de al menos tres experimentos independientes en un espectrofotómetro multi-reflexión ATR module Shimadzu IR Affinity-1S (Shimadzu Co. Japón).

En todos los casos, los espectros tanto de MC540 como de pMC540, fueron obtenidos con alícuotas de 0.5 ml de las soluciones a una concentración de  $10^{-3}$  M. Las muestras fueron desecadas sobre cristal de ZnSe con pistola de calor a 45 grados de inclinación. Los espectros se registraron con 45 SCANS a una resolución de  $1\text{ cm}^{-1}$ .

Los datos obtenidos fueron normalizados y analizados por IRESolution Software (Shimadzu Co. Japón).

## 6. Espectroscopía de masa

Las soluciones de merocianina 540 (MC540) y fotoproductos (pMC540) fueron diluidos a una concentración final de  $10^{-6}$  M en metanol: ácido acético 0.1 %. Los espectros se obtuvieron de un espectrómetro de masa LCQ Advantage MAX (Thermo Electron Co., USA) por infusión directa, con flujo de gas de 10 L/min, voltaje de cono 4 Kv y temperatura de cono de 250°C. Se midieron espectros entre los 150 a 1300 m/z.

## Materiales y métodos - Citotoxicidad

### 1. Reactivos y soluciones

Los reactivos de uso general se adquieren en Sigma-Aldrich. Las soluciones de tripsina-EDTA 0,5% m:v, L-glutamina 200 mM, el coctel antibiótico-antimicótico (penicilina 10.000 U/ml, estreptomycin 10 mg/ml, anfotericina B 25 g/ml) y el suero fetal bovino son de Gibco (LifeTechnologies, USA).

Los solventes utilizados son de grado de pureza para espectrometría. Las soluciones acuosas se preparan con agua destilada posteriormente desionizada a  $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$  en un sistema de purificación Milli-Q (Meck Millipore Co, USA).

La solución madre de merocianina 540 (MC540) se prepara a una concentración de 10-3 M y se conserva a -20°C en la oscuridad.

Una vez obtenidos los fotoproductos de merocianina 540 (pMC540), estos se almacenan a -20°C en oscuridad. La concentración total de dichos fotoproductos se considera la misma que la de MC540 previa a la reacción fotoquímica.

Las solución Buffer Fosfato, por sus siglas en inglés, PBS (NaCl 130 mM, KCl 2,68 mM, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,76 mM, pH 7,4) se prepara a una concentración final 10 veces mayor a la que posteriormente se utiliza en la manipulación celular.

La solución de cristal violeta 0.1% p/v se prepara en metanol al 20% v:v.

La solución madre 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H- bromuro de tetrazolio (por sus siglas en inglés, MTT) se prepara a una concentración de 5 mg/ml en el medio de crecimiento celular adecuado.

### 2. Cultivo Celular

Los medios de cultivo celulares que se utilizan son el Minimum Essential Media (MEM) con y sin rojo fenol, y el Roswell Park Memorial Institute (RPMI) y se adquieren en Gibco (LifeTechnologies, USA).

Las líneas celulares derivadas de adenocarcinoma colonrectal humano (Caco-2), adenocarcinoma mamario humano (MCF-7) y adenocarcinoma de próstata humano (PC-3) se obtienen de la American Type Culture Collection (ATCC, USA).

## 2.1. Esterilización y técnica aséptica

Todos los materiales de vidrio y plástico termoresistente se esterilizan por calor húmedo a alta presión en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Las pipetas de vidrio se esterilizan por calor seco en estufa a 180°C durante 2 horas.

Todos los materiales descartables como puntas de pipetas, pipetas de plástico, frascos de cultivo celular de poliestireno, entre otros, son utilizados solo una vez. Su descarte se realiza en bolsas de bioseguridad.

Las sustancias termosensibles se esterilizan por filtración con membrana de 0,22 µm (Meck Millipore Co, USA) y aquellas que soportan altas temperaturas, se autoclavan a 121°C durante 20 minutos.

La manipulación de células se realiza en sala de cultivo con nivel de bioseguridad 1 bajo flujo laminar. Todos los materiales que se introducen en la mesa del flujo laminar previamente deben ser rociados con etanol al 70% v:v sobre las superficies externas. Posteriormente se enciende la lámpara UV del flujo laminar durante 15 minutos con el fin de disminuir la carga microbiana de la superficie de trabajo.

Frascos y tubos no deben permanecer abiertos más de lo necesario. Para trasvasar líquidos los frascos se mantienen siempre cerca de la llama del mechero. Las bocas de los frascos y tubos que contienen medios de cultivo se flamean sobre la llama oxidante del mechero inmediatamente después de abrirlos y antes de cerrarlos y, mientras estén abiertos, siempre se mantienen cerca de la llama del mechero.

Además de destruir los microorganismos que se encuentran en la boca de los frascos y tubos, la llama del mechero crea corrientes de convección hacia afuera que disminuyen la chance de contaminación.

## 2.2. Mantenimiento de líneas celulares

Las líneas de adenocarcinomas en monocapa se mantienen en frascos de cultivo celular de poliestireno rectangular estéril de 25 cm<sup>2</sup> o 75 cm<sup>2</sup> (Corning, USA) de acuerdo a los protocolos de ATCC. Las células se incuban a 37°C en estufa con una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. (Bellco Glass In., USA)

En todos los casos, una vez alcanzada la confluencia del 60-90%, el medio de cultivo es descartado y se eliminan las trazas del mismo mediante lavado con Buffer Fosfato PBS. Luego, las células se separan de la superficie del frasco mediante la adición de tripsina-EDTA 0,5% m:v diluida 10 veces en Buffer Fosfato PBS y se incuban a 37°C en estufa. Para eliminar la tripsina, se centrifuga a 2.500 x g durante 10 minutos, el pellet celular resultante se resuspende en medio de crecimiento.

El recuento de células se realiza mediante la técnica de exclusión del colorante azul tripán y recuento en cámara de Neubauer.

### 2.3 Preparación de monocapas celulares

A partir de un cultivo celular en monocapa en un frasco de poliestireno rectangular de 75 cm<sup>2</sup> con una confluencia celular del 85-90% y una vez contabilizada la cantidad de células totales en un hemocitómetro de Neubauer, se realizan diluciones en medio de crecimiento para disponer de una solución final de  $3-6 \cdot 10^4$  células /ml. A partir de esta solución se aliquotean 0,1 ml por pocillo, en placas de microtitulación de 96 pocillos (Greiner Bio-one GmbH, Austria).

Luego de 24 horas de incubación a 37°C se agrega la MC540 ó los pMC540 a la concentración final según el ensayo a realizar.

## 3. Ensayos de citotoxicidad

La viabilidad celular se determina después de transcurridas las 4, 24 y 48 horas de exposición continua a la MC540 o pMC540 a una concentración final de 40, 80 y 120 µg/ml (70, 140 y 210 µM) por pocillo. Para cada dosis, el ensayo se realiza por sextuplicado a cada uno de los tiempos mencionados y se determina la viabilidad celular de acuerdo a los métodos colorimétricos que se describen en las próximas secciones. Las lecturas de absorbancia se realizan en un lector de placas de microtitulación (Asys UVM 340 Microplate Reader. Biochrom LTd., UK)

### 3.1 Método colorimétrico por cristal violeta

Luego del tiempo de incubación, se descarta el medio condicionado por inversión y se eliminan las trazas del mismo mediante lavado con buffer fosfato PBS. Posteriormente se agrega 0,2 ml por pocillo de solución de cristal violeta y se incuba durante 30 minutos a 37°C. Finalmente se descarta la solución por inversión y luego de lavar con PBS se agregan 0,2 ml de ácido acético al 30% v:v para liberar el cristal violeta asociado a las membranas. Finalmente, se mide en lector de placas de microtitulación (Asys UVM 340 Microplate Reader. Biochrom LTd., UK) a 530 nm. Los pasos anteriores se realizaron de acuerdo al protocolo modificado de [Saotome, 1989].

### 3.2 Método colorimétrico por MTT

Una vez finalizado el tiempo de incubación se descarta el medio condicionado por inversión y se lavan las trazas de éste mediante lavado con PBS. Posteriormente se adicionan 0,1 ml de la solución de MTT y se incuba a 37°C entre 1 hora y media a 3 horas. La incubación se detiene en momento que, bajo el microscopio (NIKON Eclipse TS100) se observan cristales de coloración púrpura en el interior de las células. Finalmente, se descarta la solución de MTT por inversión y se agrega 0,2 ml de

Dimetilsulfóxido (DMSO). Se registra la absorbancia a 570 nm en lector de microplacas de ELISA (Asys UVM 340 Microplate Reader. Biochrom LTd., UK). Los pasos anteriores se realizaron de acuerdo al protocolo modificado de [Mosmann, 1983].

La curva de dosis-respuesta se obtiene por el método colorimétrico de MTT (ver sección anterior) utilizando concentraciones crecientes de 0 a 200  $\mu\text{g/ml}$  (0 a 350  $\mu\text{M}$ ) de pMC540 con un incremento de 20  $\mu\text{g/ml}$  (35  $\mu\text{M}$ ) por exposición continua de las células a esta sustancia durante 4, 24 y 48 horas. La absorbancia de la placa de microtitulación se registra a 570 nm.

### 3.3 Método colorimétrico por LDH (viabilidad)

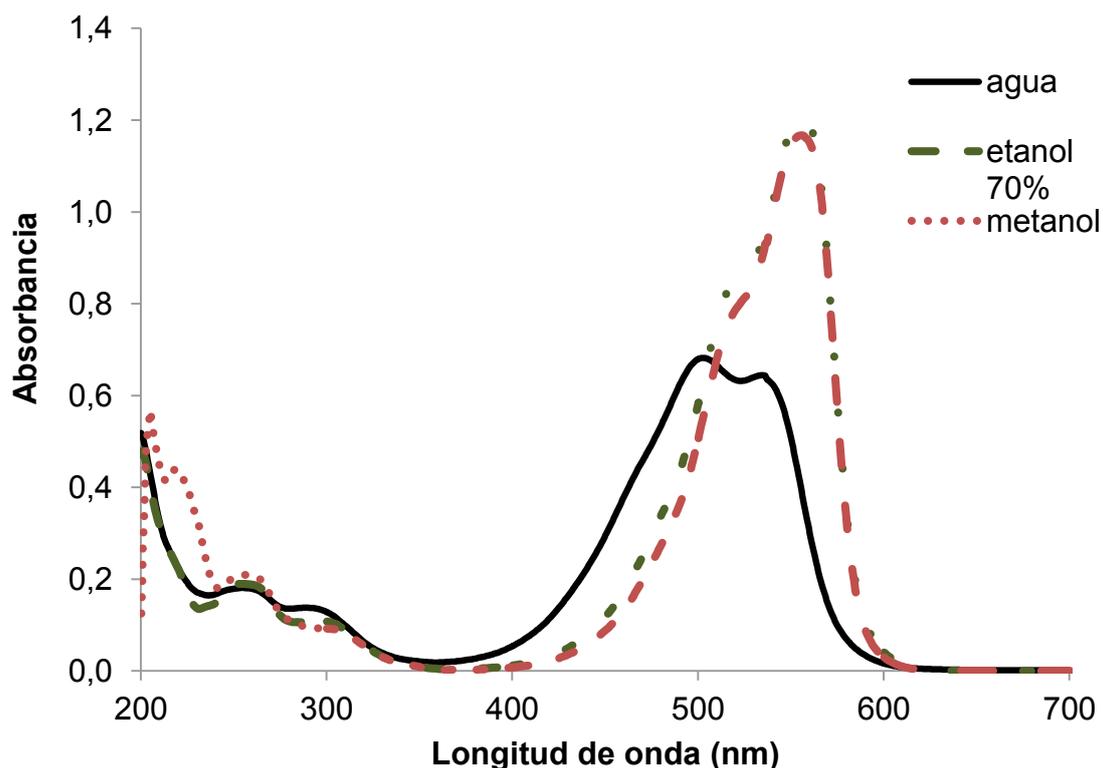
Una vez transcurrido el tiempo necesario se agrega 10  $\mu\text{l}$  del control positivo, solución de lisis (triton 9% (v:v)) aportado por el kit de detección de LDH (Promega, USA). Luego de incubar por 15 minutos a estufa a 37°C se toman 50  $\mu\text{l}$  del medio condicionado y agregan 50  $\mu\text{l}$  de la solución assay buffer (lactato 109 mM, NAD<sup>+</sup> 3.34 mM, diaforasa 2.17 U/ml, buffer Tris 3.05 mM, HEPES 30 mM, NaCl 10 mM y rezasorim 0.35 mM) aportado por el mismo kit [Patent US 6,982,152 B2]. Se incuba nuevamente a 37°C durante 30 minutos y agrega 50  $\mu\text{l}$  de la solución stop solution (Ácido acético 1M). Finalmente se mide la absorbancia a 490 nm mediante un lector de placas de ELISA (Asys UVM 340 Microplate Reader. Biochrom LTd., UK).

## Resultados – Caracterización

### Espectrometría UV-Visible

La merocianina 540 (MC540) se preparó como solución madre a una concentración de  $10^{-3}$  M a temperatura ambiente en agua, etanol 70% (v:v) y metanol; posteriormente en todos los casos se diluyó a  $10^{-5}$  M para determinar espectrofotométricamente la concentración de acuerdo a la ley de Lambert-Beer.

En la **Figura 1** se muestran los espectros de absorción en el rango UV-Visible para la MC540 en los tres solventes. Como puede verse en la figura, el espectro de la solución acuosa de MC540 difiere sustancialmente respecto de los espectros obtenidos en solventes menos polares. Cada espectro muestra un máximo de absorbancia ( $\lambda_{\text{max}}$ ) junto con un hombro a mayor longitud de onda en el caso de la solución acuosa de MC540 y a menor longitud de onda para la MC540 en etanol 70% y metanol. Algunos autores atribuyen estas diferencias a la formación de dímeros o incluso agregados de mayor orden, este fenómeno ocurre principalmente en solventes polares [West and Pearce 1965, Byers 1976, Lelkes y Miller 1980, Mandari 1999 y Ehremberg 1992].



**Figura 1:** Espectro de absorción de la merocianina (MC540) en agua, etanol 70% (v:v) y metanol. En todos los casos, la MC540 se preparó como solución madre a una concentración de  $10^{-3}$  M a temperatura ambiente y, posteriormente, se diluyó a una concentración final de  $10^{-5}$  M para realizar determinaciones espectrofotométricas.

En la **Tabla 1** se muestran los parámetros espectroscópicos obtenidos experimentalmente. Es importante destacar que se observa un corrimiento batocrómico de los máximos de absorción concomitante a la disminución de la constante dieléctrica del solvente en el cual se encuentra disuelta la MC540. Este fenómeno de solvatocromismos ha sido extensamente estudiado por diversos autores; nuestros valores experimentales coinciden con los reportados principalmente por [Lelkes & Miller, 1980](#).

**Tabla 1:** Solvatocromismo de la MC540 en el rango UV-Visible.

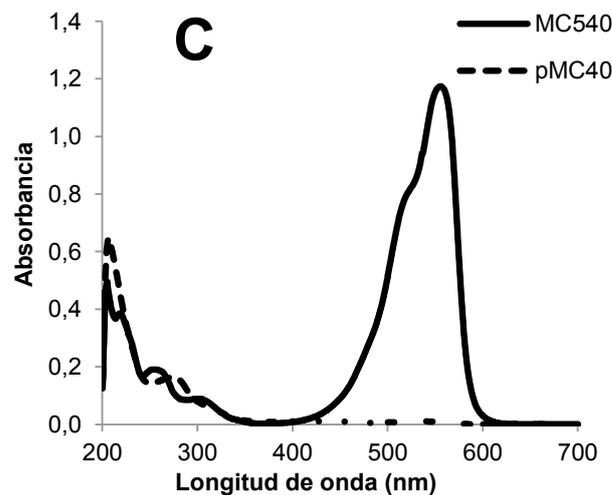
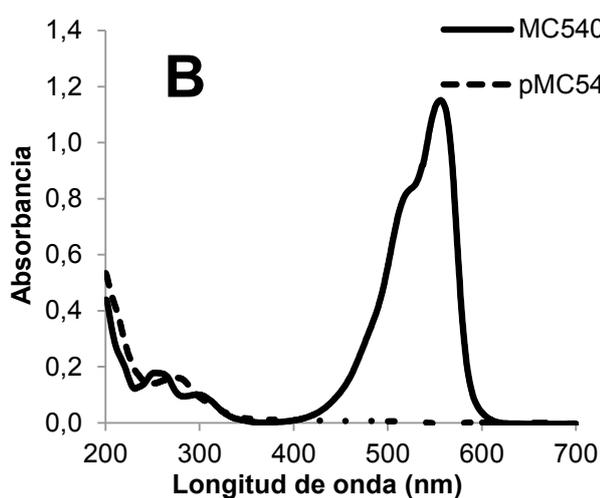
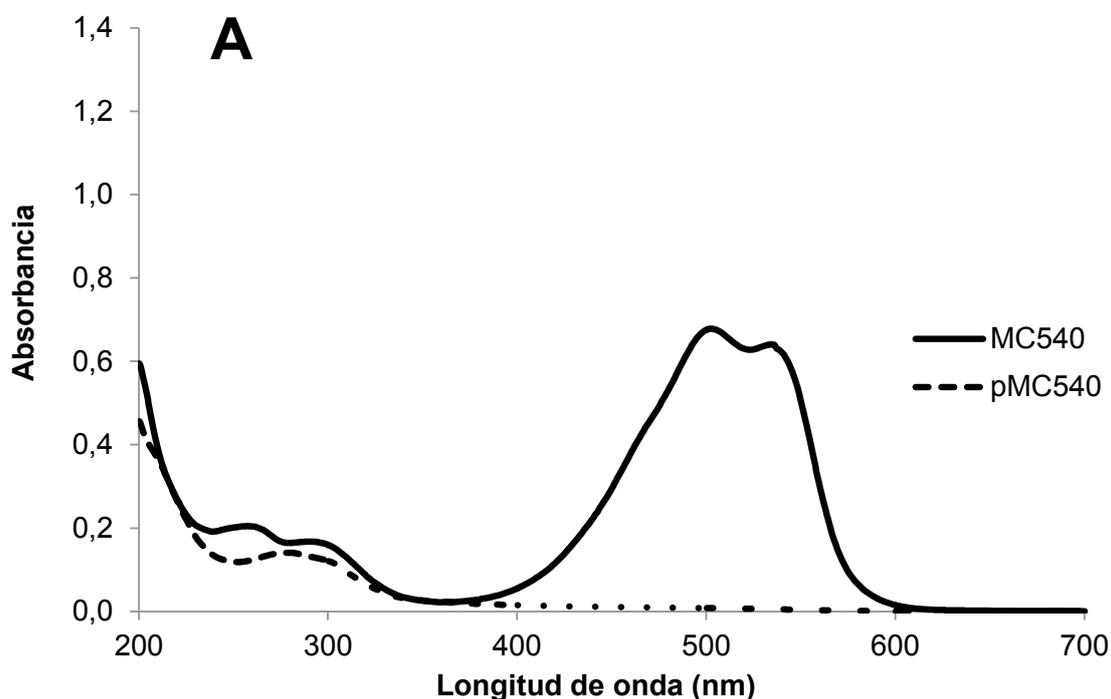
Solvente	Constante dieléctrica $D$ [a 25°C] <sup>a</sup>	Coefficiente de extinción molar $\epsilon$ [ $10^5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ] <sup>b</sup>	Máximo/s de absorbancia $\lambda_{\text{max}}$ [nm] <sup>c</sup>
Agua	78,5	0,59	503 y 534
Etanol 70% (v:v)	40	1,21	555

<sup>a</sup> Valores de constantes dieléctricas [Lelkes and Miller, 1980]

<sup>b</sup> Coeficientes de extinción molar dentro de un error experimental de  $\pm 5\%$

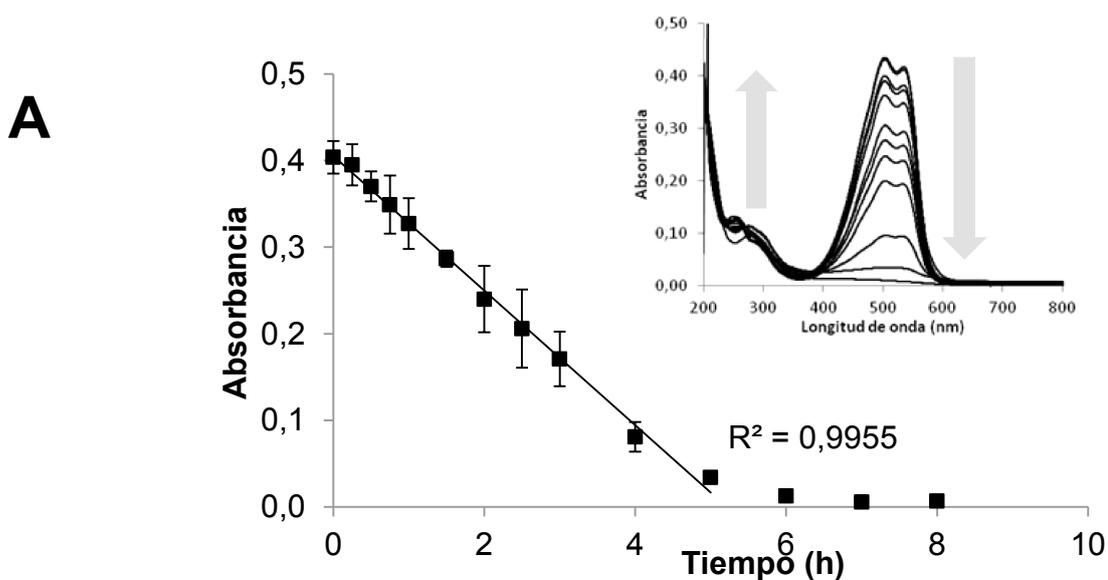
<sup>c</sup>  $\lambda_{\max}$  valores obtenidos con una reproducibilidad experimental de  $\pm 2$  nm

La irradiación de las soluciones de MC540 con luz blanca durante al menos 6 horas resulta en un cambio en el color de la solución que va desde el rojo oscuro al amarillo anaranjado. Una medición cuantitativa de este cambio resulta evidente en el espectro UV-Visible ya que el mismo, muestra la ausencia de los máximos de absorbanza característicos en la región visible luego de la irradiación (**Figura 2**)



**Figura 2:** Espectros de absorbancia de soluciones de merocianina 540 antes (MC540), y después (pMC540) de la irradiación en: **A)** agua, **B)** etanol 70% (v:v) y **C)** metanol. La MC540 ( $10^{-3}$  M) fue irradiada con luz blanca a temperatura ambiente hasta su reacción completa. Se diluyó a  $10^{-5}$  M para las mediciones ópticas.

Esta reacción fotoquímica es un fenómeno irreversible y se evidencia como la disminución progresiva del máximo de absorbancia durante la irradiación de MC540. Los perfiles cinéticos obtenidos por irradiación directa con luz blanca de las soluciones de MC540 se muestran en la **Figura 3**.



**Figura 3:** Variación de absorbancia en: **A)** agua (534 nm), durante el proceso de fotorreacción. MC540 ( $10^{-3}$  M) fue irradiada hasta la desaparición del máximo de absorbancia. Alícuotas de las soluciones de MC540 fueron tomadas a diferentes tiempos y diluidas hasta concentración final de  $10^{-5}$  M para las determinaciones espectrofotométricas.

Para cada caso, el ensayo consistió en determinar la progresiva disminución del máximo de absorbancia característico durante el periodo de irradiación. Los resultados sugieren claramente que la fotorreacción de la MC540 depende de la polaridad del solvente en el que se encuentra preparada la solución.

Como se puede apreciar en la **Figura 3**, la fotorreacción más veloz es cuando la MC540 se encuentra en agua (cinética de orden 0). En la mezcla etanol 70 % (v:v) resulta difícil determinar el orden de reacción (cinética de orden mixto). En cambio, en el caso en el que la MC540 se encuentra en metanol, la disminución del máximo de absorbancia sigue claramente una cinética de orden 1 (**Tabla 2**). Según [Hippler, 2003](#), todas las merocianinas tienen un orden de fotorreacción de 1, sin embargo, una gran proporción de dímeros en una solución podría plantear un aparente orden 0. En nuestras condiciones, esto explicaría porque observamos un orden de reacción 0 cuando la fotorreacción ocurre en merocianinas 540 disueltas en agua, y porque se observa un orden mixto en etanol 70%.

**Tabla 2:** Efectos del solvente en la fotorreacción de la MC540.

Solvente	Constante dieléctrica D [a 25°C] <sup>a</sup>	Velocidad de reacción Orden 0 K [M·seg <sup>-1</sup> ] <sup>b</sup>	Velocidad de reacción Orden 1 K [seg <sup>-1</sup> ] <sup>b</sup>	Tiempo de vida media t <sub>1/2</sub> [h]
Agua	78,5	5.10 <sup>-8</sup> M·seg <sup>-1</sup>	-	2,75 hs
Etanol 70% (v:v)	40	3.10 <sup>-8</sup> M·seg <sup>-1</sup>	7.10 <sup>-5</sup> seg <sup>-1</sup>	5,33 hs (orden 0) y 2,71 hs (orden 1)
Metanol	32,6	-	4.10 <sup>-5</sup> seg <sup>-1</sup>	4,81 hs

<sup>a</sup> valores de constante dieléctrica reportados por [Lelkes and Miller, 1980]

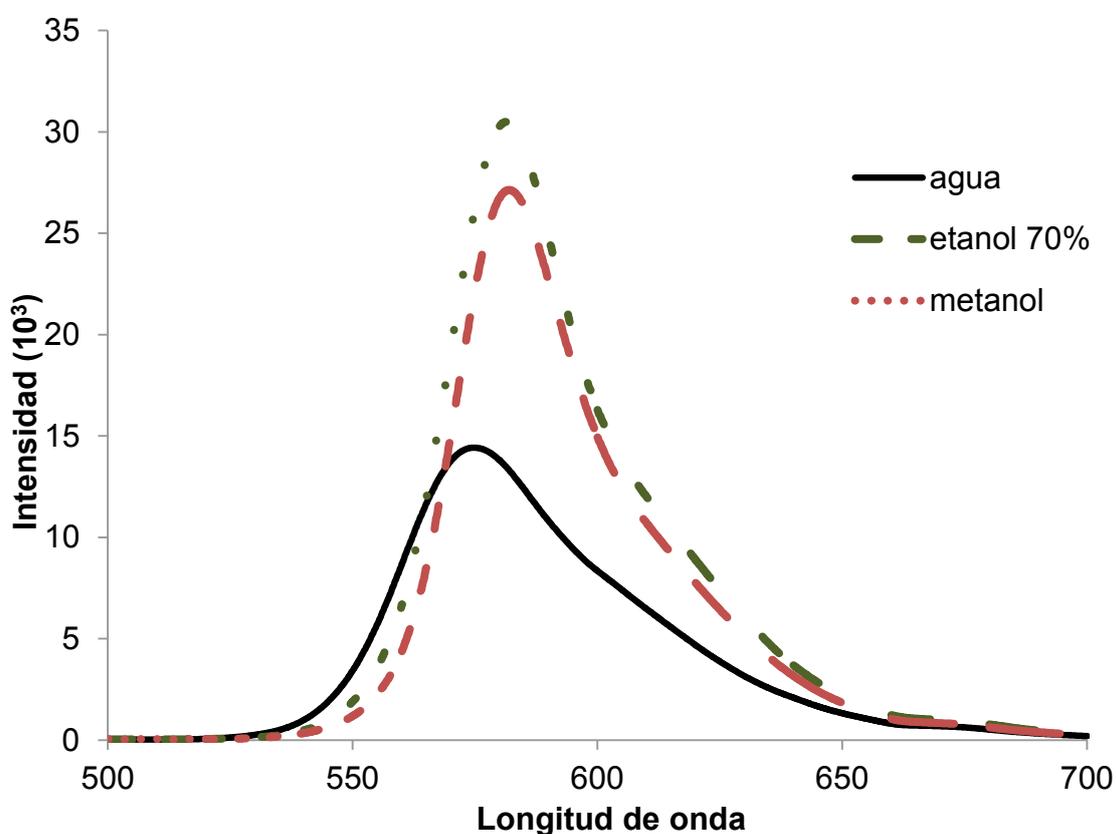
<sup>b</sup> valores de velocidad tienen una reproducibilidad experimental de ± 2 nm.

De acuerdo a los resultados expuestos aquí, podemos concluir que existe una correlación positiva entre la velocidad de degradación y la polaridad creciente del solvente. Estos resultados son consistentes con las observaciones generales de las merocianinas en diversos solventes propuestas expuestas por [Bilski, 1999](#) y [Kozhinova, 2007](#) los cuales afirman que la fotorreacción es dependiente del solvente, en parte porque el estado agregado de las merocianinas aumenta la velocidad de reacción ya que mejoran sus rendimientos de estado triplete.

### Espectrometría de fluorescencia

De manera similar a lo observado en los espectros de absorción; la emisión de fluorescencia de la MC540 muestra un corrimiento batocrómico de sus máximos en función de la polaridad decreciente del solvente en el cual se encuentran disuelta la merocianina (**Figura 4**) pero, en contraste con el pronunciado corrimiento hacia menores longitudes de onda observado en la absorción, los espectros de emisión de MC540 producen un corrimiento menor al disminuir la polaridad del solvente (**Tabla 3**). Estos resultados son consistentes con las observaciones publicadas por otros autores [*Párkányi, 1996 y Cunderlikova and Sikurova, 2001*].

**Figura 4:** Espectros de emisión de fluorescencia de la MC540 ( $10^{-5}$  M). Las



determinaciones se realizaron con una excitación de 475 nm.

**Tabla 1:** Espectrometría de la Merocianina 540

Solvente	Constante Dieléctrica $D$ [a 25°C] <sup>a</sup>	Coefficiente de extinción molar $\epsilon$ [ $10^5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ] <sup>b</sup>	$\lambda_{\text{max}}$ [nm] <sup>c</sup>	$\lambda_{\text{em}}$ [nm] <sup>d</sup>
Agua	78,5	0,59	534	574
Etanol 70% (v:v)	40	1,12	555	581
Metanol	32,6	1,31	556	582

<sup>a</sup> Valores de constantes dieléctricas [Lelkes and Miller, 1980]

<sup>b</sup> Coeficientes de extinción molar dentro de un error experimental de  $\pm 5\%$

<sup>c</sup>  $\lambda_{\text{max}}$  valores obtenidos con una reproducibilidad experimental de  $\pm 2 \text{ nm}$

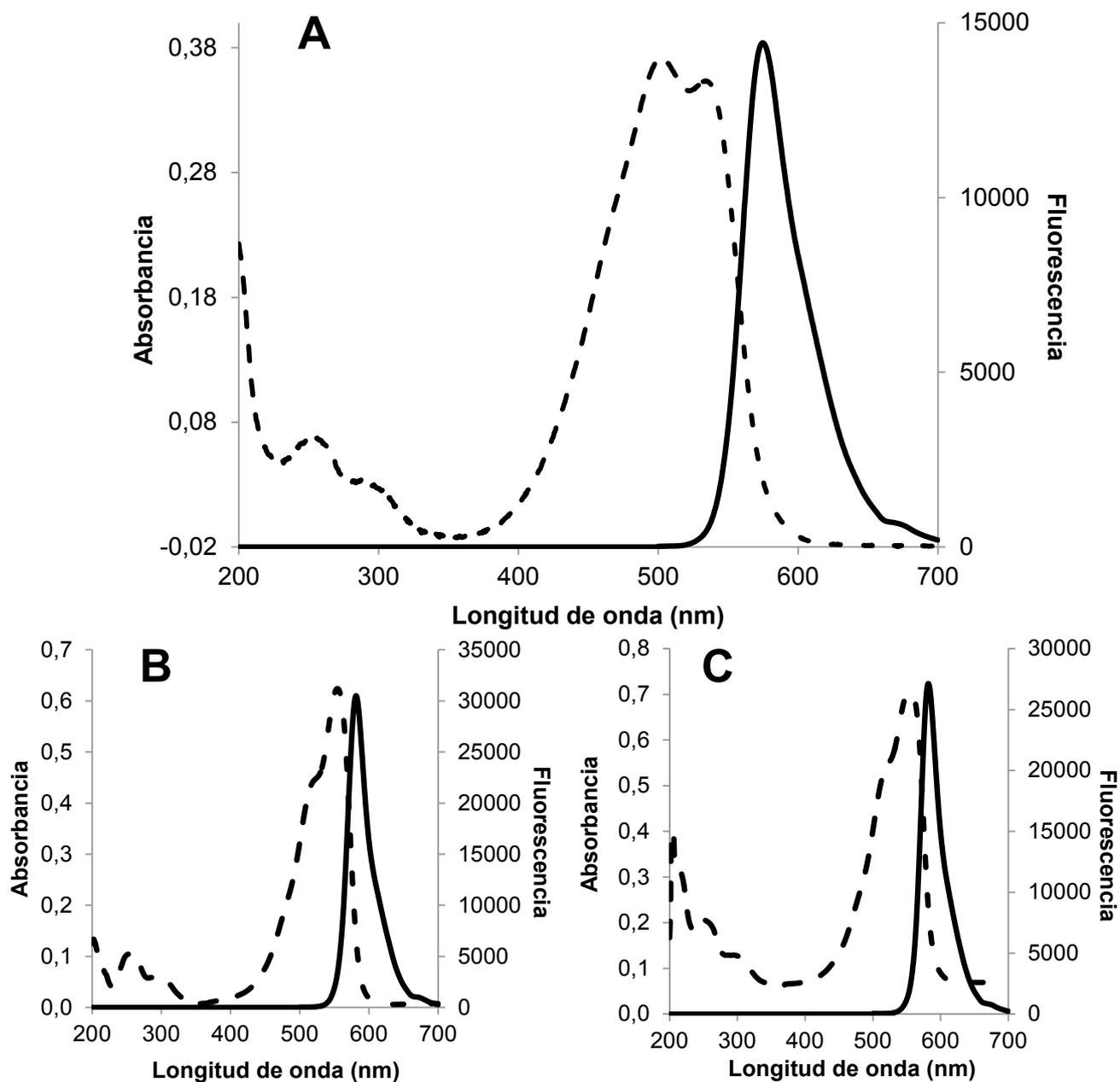
<sup>d</sup>  $\lambda_{\text{em}}$  valores obtenidos con una excitación a 475 nm y reproducibilidad experimental de  $\pm 1 \text{ nm}$

Asimismo, a muy bajas concentraciones de MC540 hemos observado un único pico de emisión de fluorescencia cuando las excitaciones se llevaron a cabo sobre cada banda del espectro de absorción de la MC540 en cada solvente (datos mostrados).

De acuerdo a la bibliografía, este resultado en principio nos permitiría inferir la presencia de una única especie fluorescente de merocianina que se corresponde con los monómeros de MC540 [Párkányi, 1996 y Sikurova, 1997].

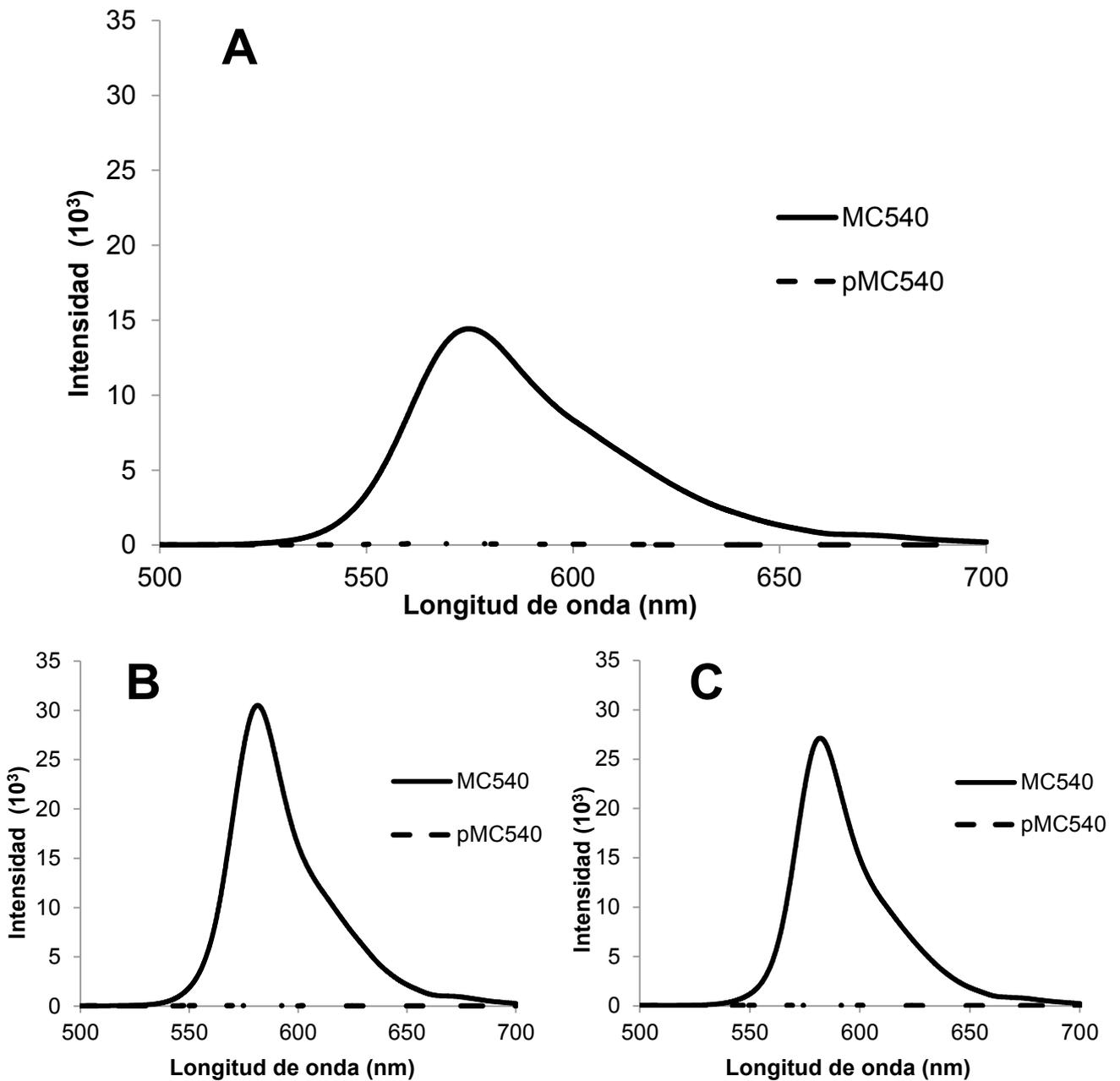
Como se observa en la **Figura 5**, los espectros de emisión de fluorescencia de la MC540 muestran una simetría especular muy pobre con la banda de menor energía de su respectivo espectro de absorción, este fenómeno es particularmente más pronunciado cuando la MC540 se encuentra en solución acuosa.

Estas diferencias espectrales son atribuibles a la alta polarizabilidad de la MC540 en agua, la cual permite la formación de dímeros de merocianina no fluorescentes incluso a muy bajas concentraciones de MC540 [Cunderlikova and Sikurova, 2001, Verkman 1987 y Dressten 1978].



**Figura 5:** Espectro de absorción (- - -) y emisión de fluorescencia (-----) de MC540 ( $10^{-5}$  M) en **A)** agua, **B)** etanol 70% (v:v) y **C)** metanol.

Como se ilustra en la **Figura 6**, en todos los casos no se observa emisión de fluorescencia luego de la irradiación de las soluciones de MC540 con luz blanca.



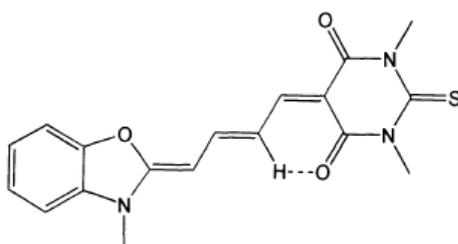
**Figura 6:** Espectros de emisión de fluorescencia de la merocianina 540 antes (MC540) y después (pMC540) de la irradiación con luz blanca. MC540 ( $10^{-3}$  M) disuelta en **A)** agua, **B)** etanol 70% v:v y **C)** metanol fue irradiada durante más de 5 horas a temperatura ambiente y diluida luego a una concentración final de  $10^{-5}$  M para las determinaciones ópticas. Las determinaciones se realizaron con una excitación de 475 nm.

## Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier

Considerando hasta aquí los resultados de las espectrometrías UV-Visible y de fluorescencia obtenidos planteamos como hipótesis preliminar que la irradiación directa de la MC540 con luz blanca resulta en la formación de nuestros compuestos.

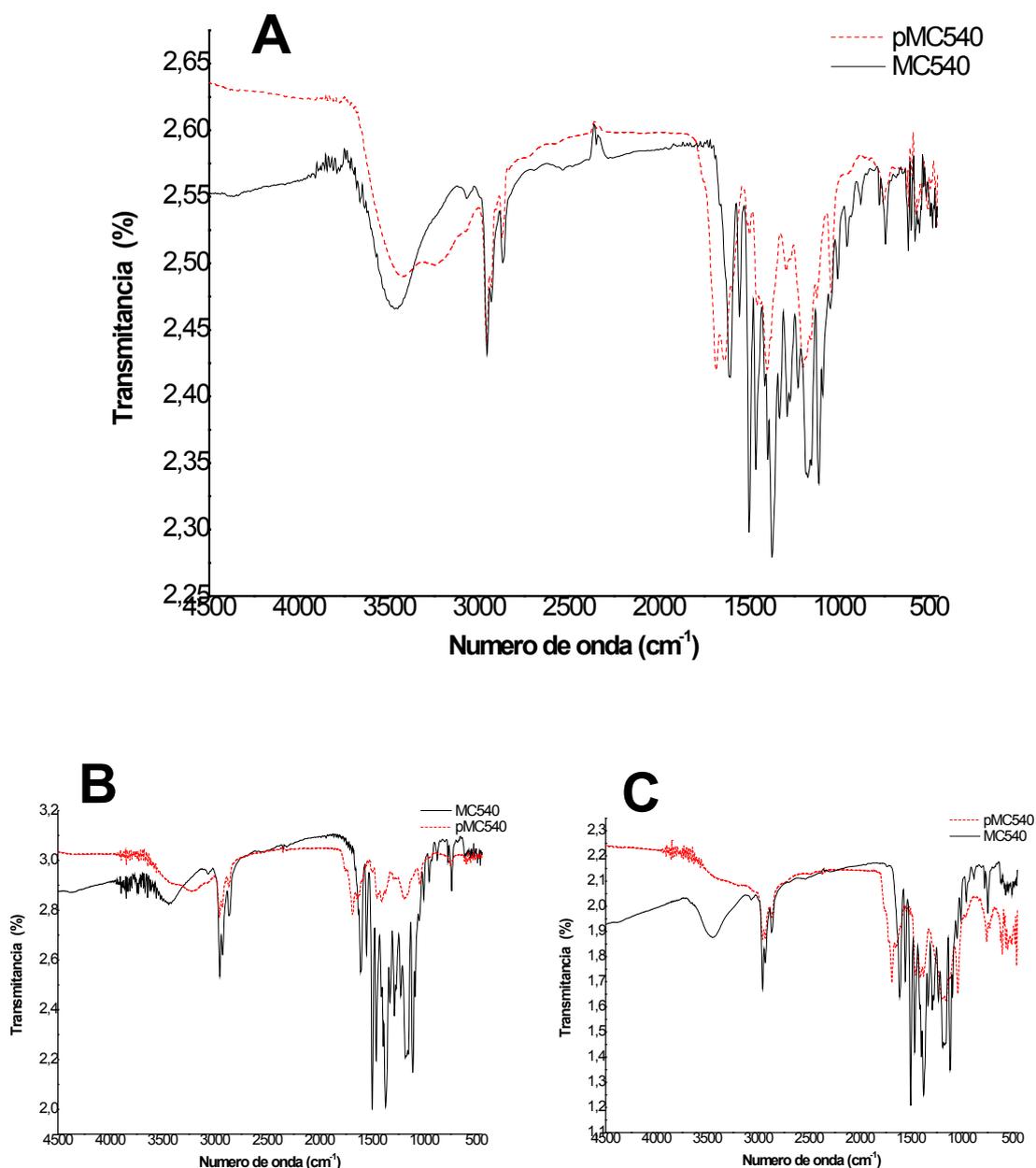
Para verificar esta hipótesis comparamos los espectros infrarrojos por transformadas de Fourier (FT-IR) de la MC540 antes y luego de su irradiación con luz blanca.

A pesar de que los espectros FT-IR de MC540 proporcionan poca información discernible debido a que las frecuencias vibracionales de los grupos funcionales se encuentran muy próximas entre sí [Kulinich and Ishchenko, 2009]. Se sabe que en la configuración basal de la MC540 sus grupos funcionales principales se encuentran en proporción *trans*, por lo cual, los grupos carbonilos del tiobarbitúrico son coplanares con el puente de polieno, estando bien posicionados para formar un puente hidrógeno intramolecular (**Figura 7**). Esto, en el caso de la MC540, se evidencia por la presencia de un ancho pico a  $3400\text{ cm}^{-1}$  [Benniston, 1994].



**Figura 7:** Puente hidrogeno de la MC540 en conformación *trans*.

Los espectros infrarrojos de los pMC540 muestran que esta banda ancha característica de la MC540 ya no es visible después de la irradiación con luz. Esto sugiere una ruptura del puente de polieno o una modificación conformacional de los átomos en cuestión mediada por un proceso oxidativo de los dobles enlaces del puente de polieno (**Figura 8**).



**Figura 8:** Espectros infrarrojos de merocianina 540 ( $10^{-3}$  M) diluida en **A)** agua, **B)** etanol 70% (v:v) y **C)** metanol, antes y luego de la fotorreacción (pMC540).

Un análisis más exhaustivo de estos espectros infiere la presencia de resonancia en la región de número de onda intermedia ( $1000$  a  $1600$   $\text{cm}^{-1}$ ) de MC540. Esto se debe a la estructura electrónica de la molécula en la que se establece una transferencia de carga intramolecular a través del puente de polieno entre el grupo benzoxasola (dador de electrones) y el grupo tiobarbitúrico (aceptor de electrones). De acuerdo con [Benniston y Gulliya, 1994](#) cada átomo de carbono del puente de polieno posee un

carácter parcial de doble enlace, tal como se espera para las formas zwitteriónicas resonantes de la MC540 que se forman por la transferencia electrónica entre el átomo de nitrógeno de la benzoxazola y uno de los grupos carbonilos del tiobarbitúrico.

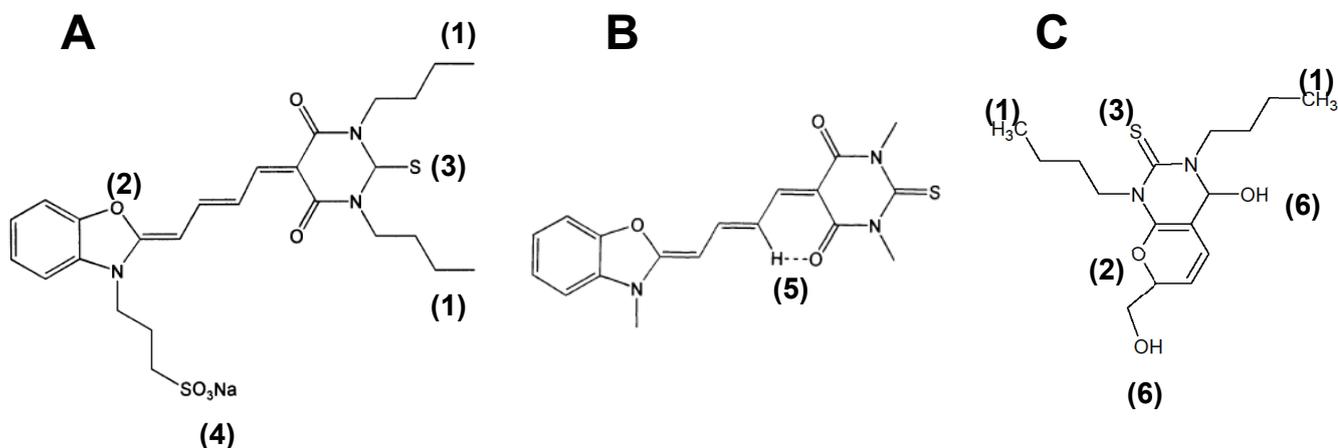
Sin embargo, como se puede apreciar en la **Figura 8**, los espectros de pMC540 pierden esta complejidad, desplazando esta señal a la región entre 1675 a 1700  $\text{cm}^{-1}$ , lo cual sugiere que MC540 sufrió una eventual ruptura oxidativa o reordenamiento de los átomos de forma tal que no se establece el fenómeno de transferencia de carga intramolecular.

En la **Tabla 3** se indican las asignaciones de los grupos funcionales en la MC540 y pMC540.

Si observamos los resultados obtenidos para los fotoproductos en metanol podemos ver que carece de las señales atribuidas a los grupos funcionales oxidrilo y sulfonato. Esto nos estaría indicando que se forman productos diferentes de acuerdo al tipo de solvente.

**Tabla 3:** Relacion entre la MC540 y los pMC540 segun sus numeros de ondas y grupos funcionales en relacion a sus diluciones en agua, etanol 70% (v:v) o metanol, no analizados hasta el momento. Se señalan los grupos funcionales en las imagenes inferiores de la tabla (**Figura 9**).

	Grupo funcional	Solvente		
		Agua	Etanol 70%	Metanol
<b>MC540</b>	Carbonos alifáticos (1)	2933-2956	2929-2956	2931-2956
	Éter (2)	1166	1166	1166
	Sulfuro (3)	1112	1112	1114
	Sulfonato (4)	742	742	744
	Oxidrilo intramolecular (5)	3402	3402	3402
<b>pMC540</b>	Carbonos alifáticos (1)	2931-2958	2933-2958	2931-2958
	Éter (2)	1157	1159	1157
	Sulfuro (3)	1124	1126	1126
	Sulfonato (4)	754	756	-
	Oxidrilo (6)	3240-3420	3240-3420	-



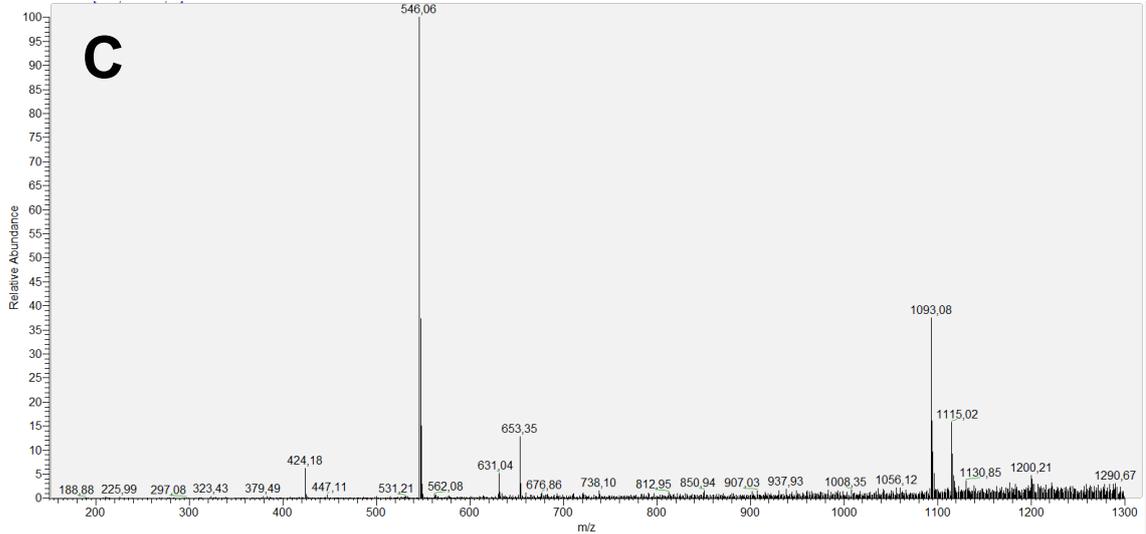
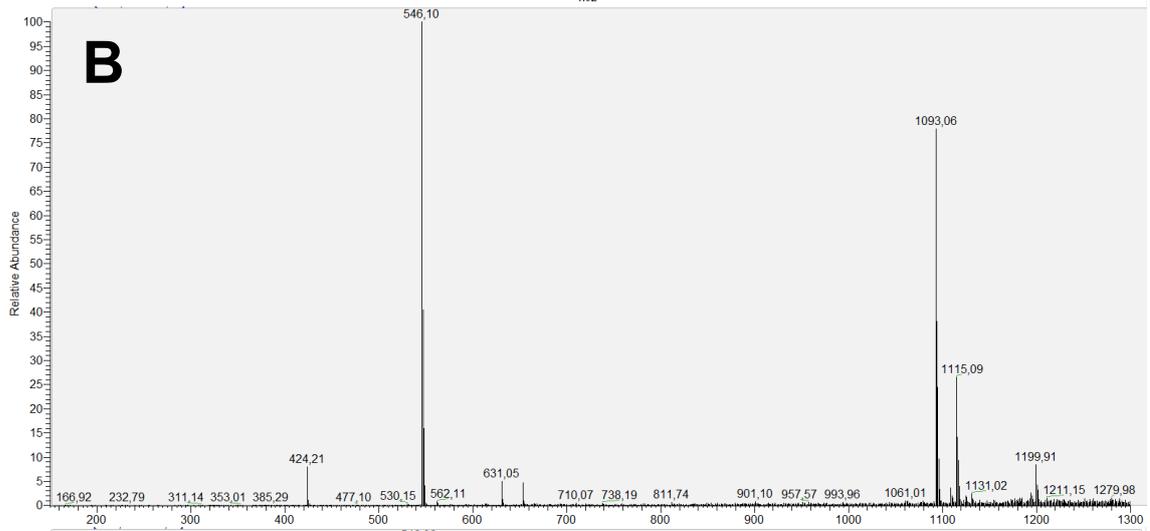
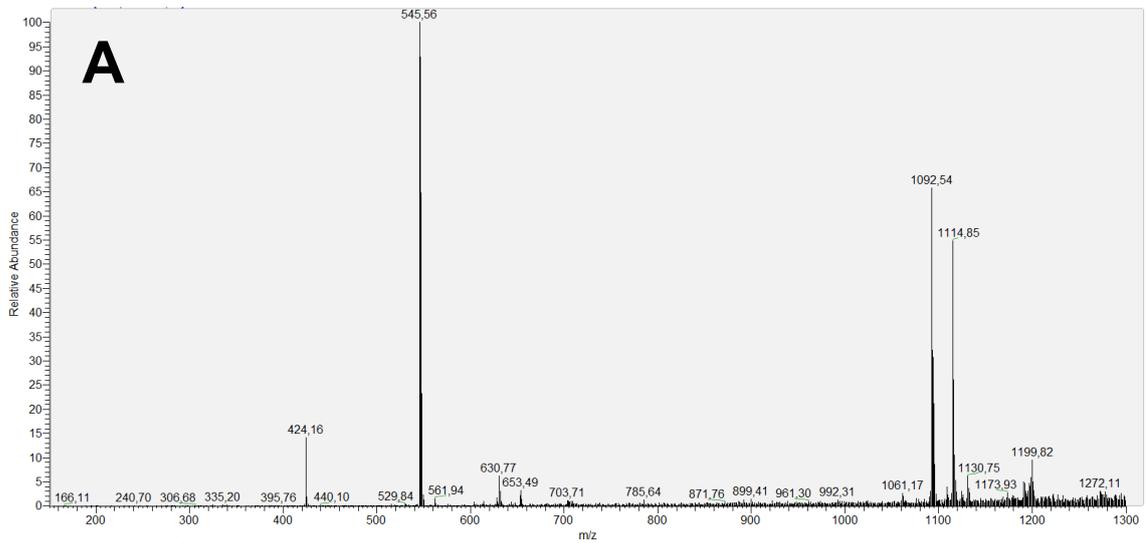
**Figura 9:** Representaciones de las moléculas de **A)** MC540, **B)** MC540 con puente hidrogeno intramolecular y **C)** uno de los fotoproductos postulados en el capítulo siguiente. No se señala el grupo sulfonato en C) debido a que pertenece a otro de los pMC540 que proponemos.

### Espectroscopía de masas

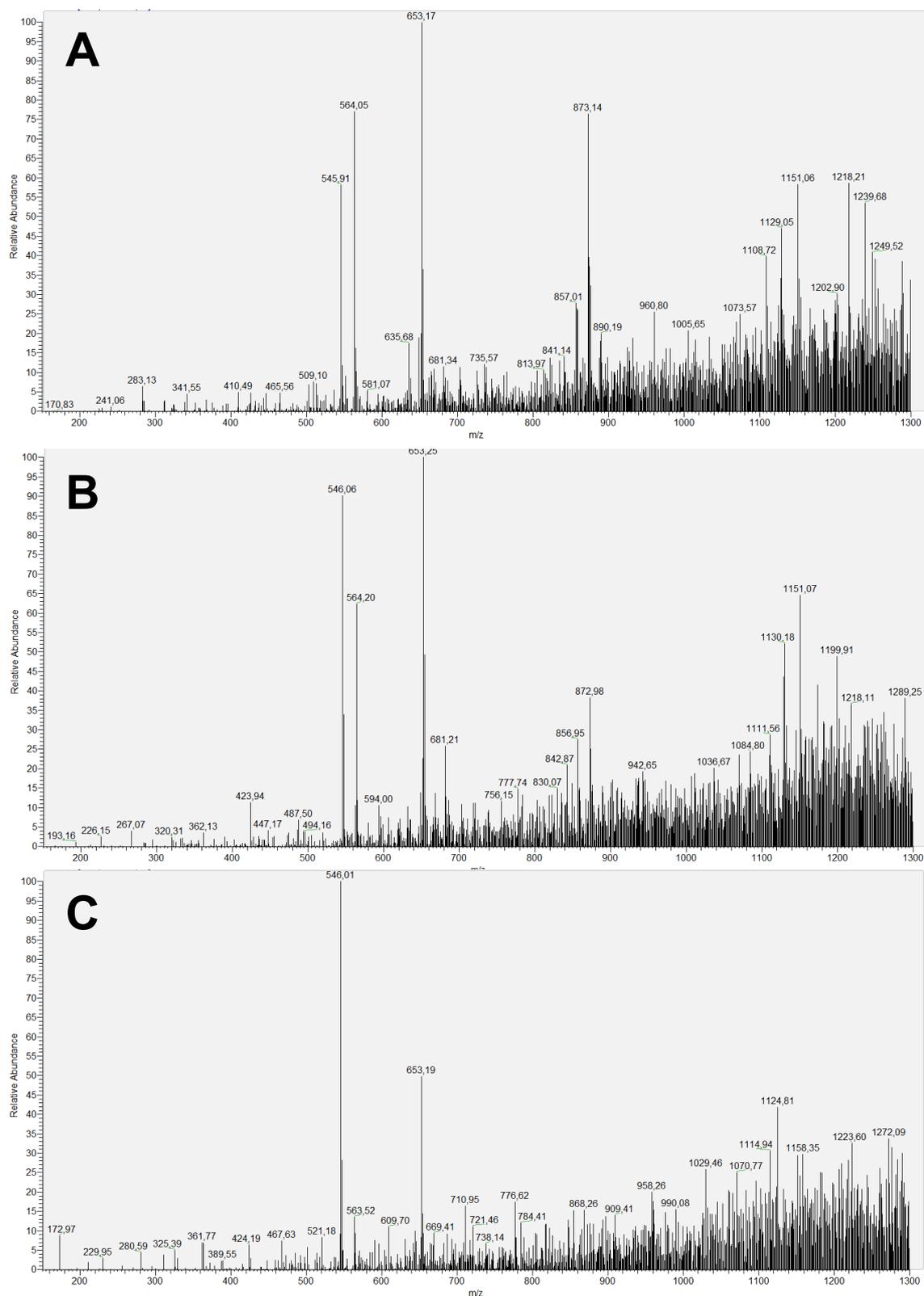
En base a los resultados expuestos de caracterización, nuestra hipótesis sugiere que la irradiación con luz blanca modifica químicamente a la MC540. Para identificar estas modificaciones se realizó una espectroscopia de masas.

Los espectros de MC540 diluida en agua, etanol 70% (v:v) y metanol se representan en la **Figura 10**. El primer pico, con una relación masa/carga ( $m/z$ ) de 545, es asignado a la especie aniónica de la MC540 (es decir, sin el catión Na<sup>+</sup>). Los picos de  $m/z$  de 1092 y 1114 corresponden a dimeros de MC540 sin y con catión Na<sup>+</sup>, respectivamente.

En la **Figura 11** se muestran los espectros de los fotoproductos. En agua y etanol 70%, se observa la aparición de 9 picos adicionales con una abundancia relativa mayor al 30% respecto de los espectros de MC540. Estos difieren del espectro en metanol, ya que se observa la presencia de una especie con  $m/z$  de 564, correspondiente a una molécula de MC540 que adquiere 19 unidades de  $m/z$  que no está presente en metanol. En los 3 casos, el pico con 545 corresponde a trazas de MC540 que no reaccionaron.



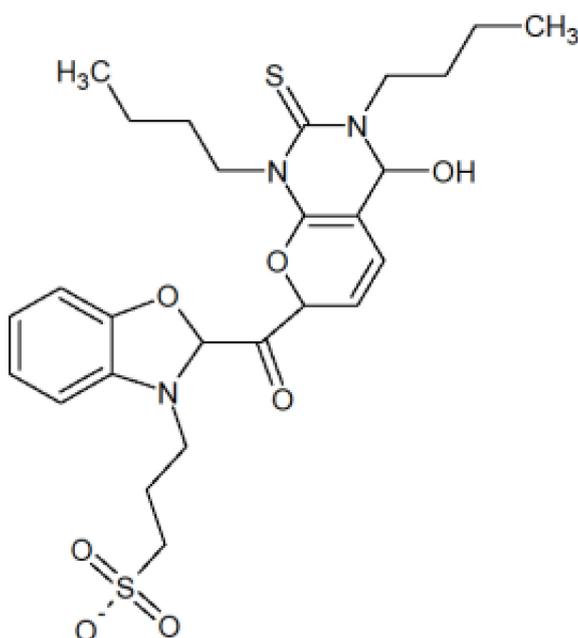
**Figura 10:** Espectros de masa de MC540 ( $10^{-3}$  M) diluida en **A)** agua, **B)** etanol 70% (v:v) y **C)** metanol. Posteriormente, se diluyó a una concentración final de  $10^{-6}$  M con metanol:fórmico 0.1 % para realizar determinaciones espectrofotométricas.



**Figura 11:** Espectros de masa de pMC540 ( $10^{-3}$  M) diluida en **A)** agua, **B)** etanol 70% (v:v) y **C)** metanol. Posteriormente, se diluyó a una concentración final de  $10^{-6}$  M con metanol: fórmico 0.1 % para realizar determinaciones espectrofotométricas.

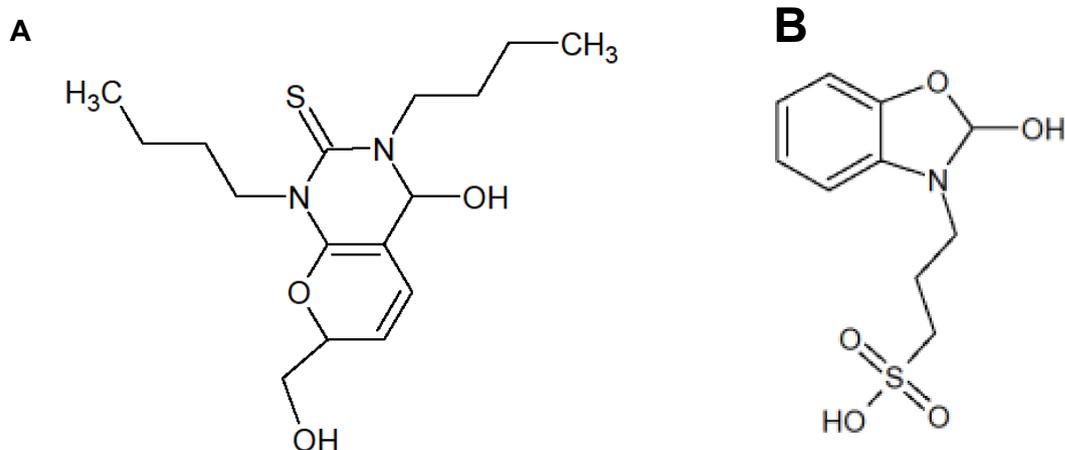
De acuerdo a la bibliografía, se sabe que las merocianinas en presencia de luz blanca forman espiropiranos por la reacción de ciclación interna entre un carbonilo del tiobarbitúrico y un carbono interno del puente de polieno [Daziano, 2011, Takayanagi, 1996, Futami, 2002, Macuil, 2006, Nordin, 2013], y por otro lado, también se sabe que en el caso particular de la MC540, los carbonos del puente de polieno son susceptibles a fotooxidarse por la irradiación misma [Franck, 1991].

En base a estas consideraciones postulamos que el pico de 564  $m/z$  se corresponde la forma espiropiránica de la MC540 (**Figura 12**).



**Figura 12:** Posible espiropirano formado por la ciclación de la merocianina 540 en presencia de luz blanca.

También, creemos que la posterior oxidación de este espiropirano generaría una ruptura del mismo, dando como resultado, una especie cuyo peso molecular sería de 326 g/mol y otra de 240 g/mol (**Figura 13**).



**Figura 13:** Posibles productos generados por la fractura de *2,3-dihidro-4H-pirano [2,3-d]pirimidina-2-tiona* y **B)** 3-(2-hidroxi-1,3-benzoxazol-3(2H)-yl)propano-1-acido sulfónico.

Llamaremos en adelante a la estructura A con el nombre de hidroxiespiropirano y a la B con el de meroxazola.

Los picos de  $m/z$  mayores a 600, estarían asociados a agregados y combinaciones que se forman entre las especies mencionadas anteriormente (**Tabla 4**).

En el caso del metanol, este resultado es consistente con nuestras determinaciones por FT-IR y nos permite concluir que los fotoproductos obtenidos en este solvente son diferentes a los obtenidos en agua y en etanol 70%.

**Tabla 4:** Combinaciones entre las especies espiropirano, merocianina 540 y hidroxiespiropirano en función de los picos de masas observados.

<i>m/z</i>	Combinación de especies
653	Hidroxiespiropirano + Hidroxiespiropirano
873	Hidroxiespiropirano + Merocianina
890	Hidroxiespiropirano + Espiropirano
1108	Merocianina + Espiropirano
1129	Espiropirano + Espiropirano
1151	Espiropirano + Espiropirano + Na <sup>+</sup>
1218	Espiropirano + Hidroxiespiropirano + Hidroxiespiropirano
1239	Espiropirano + Hidroxiespiropirano + Hidroxiespiropirano + Na <sup>+</sup>
1249	Merocianina + Hidroxiespiropirano + Hidroxiespiropirano + Na <sup>+</sup> + Na <sup>+</sup>

## Resultados – Citotoxicidad

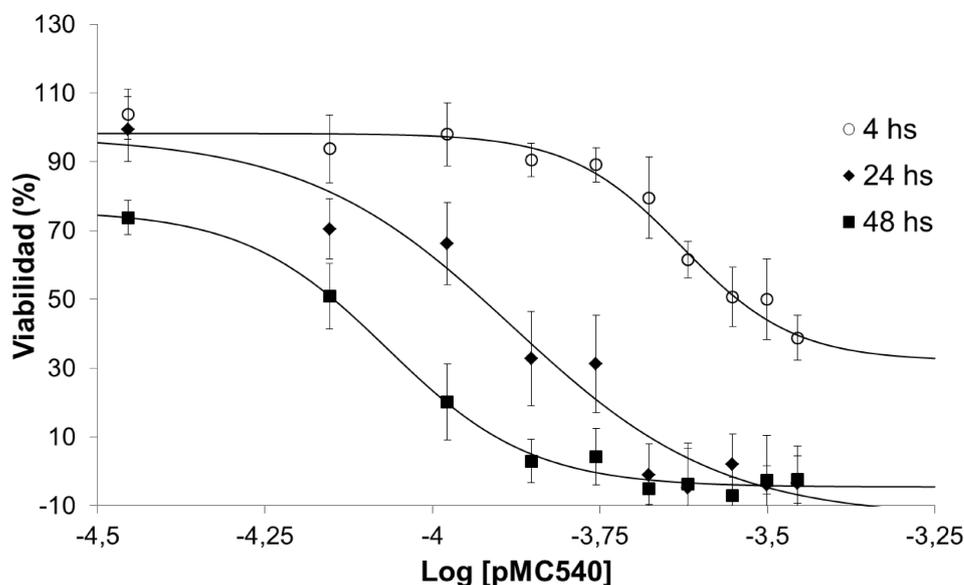
### Curva dosis respuesta

En los años 1990s [Gulliya, 1994](#) realizó una serie de ensayos en condiciones diferentes a las presentadas en este trabajo en donde se caracterizaron y evaluaron la capacidad citotóxica de los fotoproductos de MC540.

[Gulliya, 1994](#), evaluó la viabilidad celular de una línea de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) en presencia de los fotoproductos producidos en metanol, etanol 70% y etanol 10% en sus condiciones experimentales distintas al presente trabajo.

Con el objetivo de determinar la viabilidad en presencia de nuestros fotoproductos (producidos en nuestras condiciones), realizamos una curva de dosis-respuesta en la línea celular MCF-7 para definir la dosis óptima 50 a diferentes tiempos, y poder fijar las concentraciones a utilizar en futuros ensayos de viabilidad.

La curva dosis respuesta de pMC540, realizada por el método de MTT, se puede ver en la **Figura 1**.



**Figura 1:** Curva dosis-respuesta en línea MCF-7, obtenida a partir del método de MTT, de pMC540 producidos a partir de una solución de MC540 en agua ( $10^{-3}$  M). Las concentraciones varían de 0 a 350  $\mu$ M con una variación de 35  $\mu$ M entre cada valor. Se realizó la curva para las 4, 24 y 48 hs de exposición a la droga.

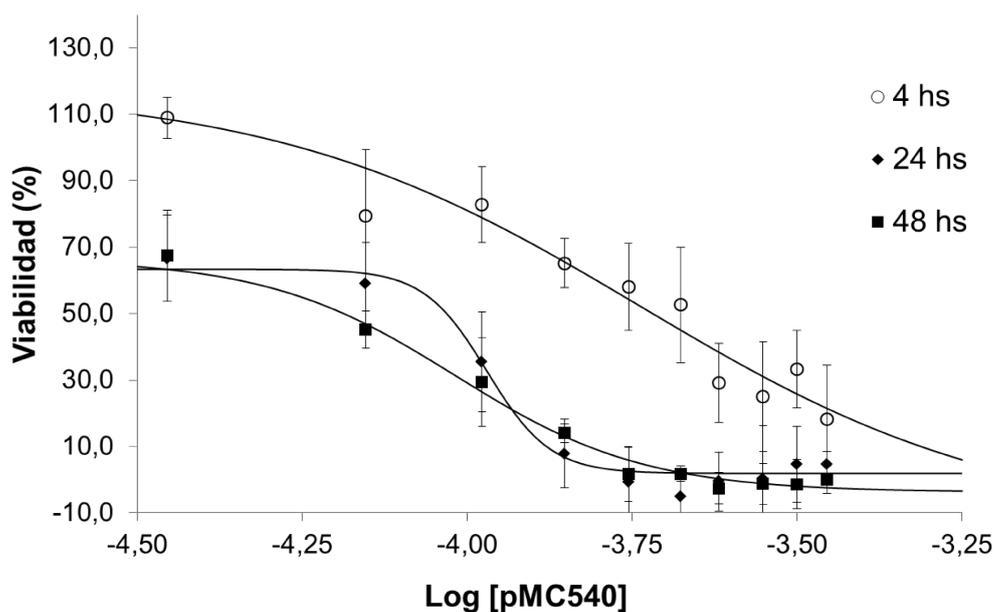
Podemos ver un decaimiento de la viabilidad celular a medida que aumenta la concentración de los pMC540 y el tiempo de exposición a los mismos. Siendo las concentraciones de 227  $\mu$ M (130  $\mu$ g/ml), 128  $\mu$ M (73  $\mu$ g/ml) y 82  $\mu$ M (47  $\mu$ g/ml), las asignadas a la dosis óptima 50 (DO 50) para las 4, 24 y 48 hs respectivamente. Si bien [Gulliya, 1994](#) no realizó una curva dosis respuesta, podemos asegurar que en nuestras condiciones se obtiene un mayor valor de muerte celular cuando comparamos con las concentraciones de pMC540 utilizadas por Gulliya.

En base a las DO 50 calculadas, decidimos realizar los ensayos de viabilidad con los puntos correspondientes a los 70  $\mu$ M (40  $\mu$ g/ml), 140  $\mu$ M (80  $\mu$ g/ml) y 210  $\mu$ M (120  $\mu$ g/ml) de droga para un posterior análisis de viabilidad en otras líneas celulares no caracterizadas previamente.

Para definir cuál de las líneas celulares serían buenas candidatas al uso de los pMC540 como generadores de citotoxicidad, se realizó un ensayo de viabilidad por el método de cristal violeta.

Pudimos ver que en todas las líneas celulares, la MC540 no es citotóxica, mientras que los pMC540 son citotóxicos de una manera tiempo- y concentración-dependiente solo en las líneas de MCF-7 y PC-3. En tanto, la línea derivada de adenocarcinoma de colon (Caco-2) no es susceptible al tratamiento con los fotoproductos de la merocianina 540.

Siendo que PC-3 resultó ser susceptible a pMC540 realizamos una determinación de la dosis óptima 50 de tratamiento. (**Figura 2**).



**Figura 2:** Curva dosis-respuesta en línea PC-3, obtenida a partir del método de MTT, de pMC540 producidos a partir de una solución de MC540 en agua ( $10^{-3}$  M). Las concentraciones varían de 0 a 350  $\mu$ M con una variación de 35  $\mu$ M entre cada valor. Se realizó la curva para las 4, 24 y 48 hs de exposición a la droga.

En este caso, podemos ver nuevamente un decaimiento de la viabilidad celular a medida que aumenta la concentración de los pMC540 y el tiempo de exposición a los mismos. Siendo las concentraciones de 176  $\mu$ M (101  $\mu$ g/ml), 103  $\mu$ M (59  $\mu$ g/ml) y 93  $\mu$ M (53  $\mu$ g/ml), las asignadas a la dosis óptima 50 (DO 50) para las 4, 24 y 48 hs respectivamente.

Para confirmar la capacidad citotóxica de los pMC540, y tener una aproximación de su forma de ataque se complementó al análisis de viabilidad por cristal violeta, la

determinación de actividad metabólica por el método de MTT y el de determinación de LDH (lactato deshidrogenasa) en solución. Por otro lado, para aproximarnos a horarios acordes a tratamientos de este índole, se redujeron los tiempos de exposición a la droga a de 24, 48 y 72 hs a 4, 24 y 48 hs.

Pudimos ver que en todos los casos la citotoxicidad es tiempo- y concentración-dependiente, mientras que en la línea de adenocarcinoma de próstata, el tratamiento es más.

Por otro lado, cabe aclarar que las mediciones de viabilidad aportadas por el método de LDH, son significativamente inferiores a las de MTT, y aún más, a las de cristal violeta. Estos datos nos permiten formular hipótesis sobre el modo en el cual actúan los pMC540 al momento de atacar a una línea celular susceptible al tratamiento.

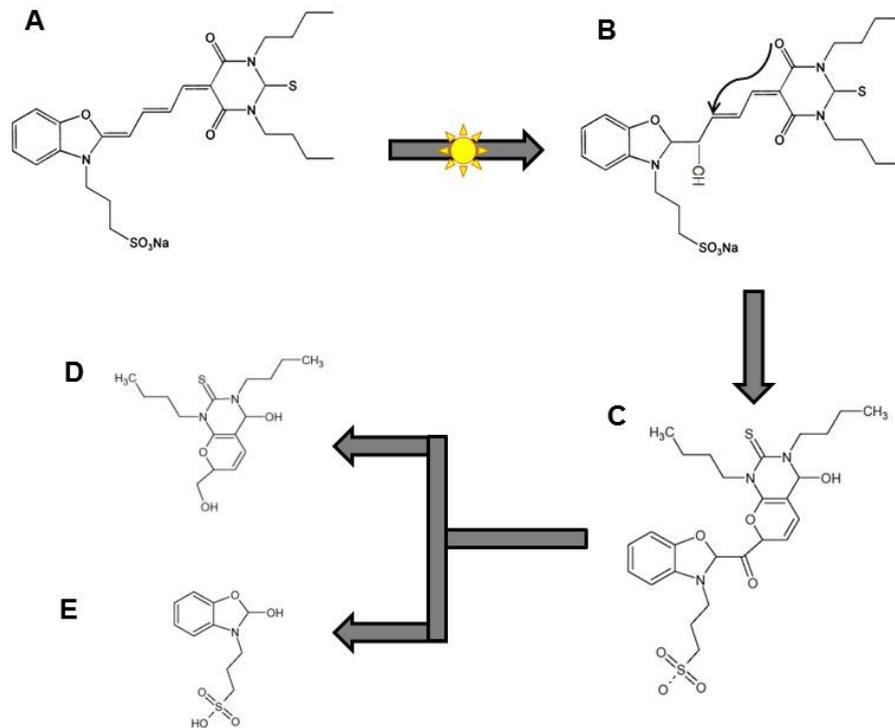
## **Conclusión**

Nuestros resultados en la caracterización de la MC540 se correlacionan solo parcialmente con los publicados hasta la actualidad. En nuestro caso, los picos máximos de absorción de esta molécula y sus fotoproductos son los mismos que los reportados, sin embargo, los picos de los espectros del infrarrojo no lo son. Por otro lado, un análisis de fluorescencia y de espectrometría de masas permitió obtener una mayor cantidad de información necesaria para hipotetizar el mecanismo de ruptura de la MC540 y las estructuras que adoptan los fotoproductos una vez generados.

En primer lugar, estamos en condiciones de afirmar que los fotoproductos generados en las soluciones de MC540 diluidas en metanol son diferentes a los generados en agua y etanol 70%, principalmente las diferencias se evidencian entre los picos de los espectros de infrarrojo y masas. Esto nos permite diferenciarnos de una gran cantidad de publicaciones que realizan la fotorreacción en metanol.

En cuanto a las modificaciones químicas que se generan en dicha fotorreacción, se puede decir que la pérdida de la gran estructura resonante dentro de la molécula de MC540 al momento de fotorreaccionar se ve representada por la eliminación del pico de absorbancia en la región del visible, por la disminución de picos en la zona del infrarrojo entre los 1000 a 1600  $\text{cm}^{-1}$  y por último, por la pérdida de su capacidad de fluorescer. En base a estos resultados, junto con los picos de los espectros de masas, proponemos que en nuestras condiciones la fotorreacción se realiza como se indica en la **Figura 1**.

A continuación, se plantea la reacción de generación de fotoproductos para fotorreacciones de MC540 en agua. En primer lugar, se plantea que en presencia de luz blanca la MC540 (**A**) se excita a un nivel de energía superior: parte de esa energía



**Figura 1:** Modelo de fotorreacción de la MC540 en nuestras condiciones de laboratorio.

En resumen, estamos en presencia de una reacción de oxidación entre las cuales se generan una gran cantidad de especies intermedias, en otras palabras, los denominados pMC540 no están constituidos solo por un producto específico, sino por una mezcla de moléculas.

En segundo lugar, el análisis de citotoxicidad nos permite asegurar que si bien la MC540 no resulta citotóxica para ninguna de las líneas celulares evaluadas, los pMC540 sí resultaron serlo en las líneas de PC-3 y MCF-7; dicha propiedad, es tiempo y concentración dependiente de la droga. En primer lugar, podemos decir que PC-3 es la línea más susceptible al tratamiento, sin embargo, en todos los casos, en los análisis comparativos entre las técnicas de MTT, LDH y Cristal Violeta, se puede ver que la viabilidad medida desde la técnica de LDH es menor que la medida desde MTT y menor aún que por la técnica de cristal violeta. Esto nos permite hipotetizar, por la forma en la cual actúa cada medición, que la droga puede estar generando una

inestabilidad de membrana tal que finalice por su desestructuración, ultimando en muerte celular. Creemos que por la estructura de los pMC540, y en base a que se conoce que la MC540 tiene una gran predisposición a unirse a membranas, los fotoproductos pueden unirse a las mismas con gran facilidad.

Otra hipótesis que evaluamos es en la cual creemos que los fotoproductos podrían estar ingresando al interior citoplasmático de la célula, y estar interaccionando con los complejos “respirosomas” de las membranas internas de las mitocondrias, lo cual produciría un aumento en las especies reactivas de oxígeno del propio ciclo de respiración celular, que finalizarían por una inducción de especies reactivas de oxígeno, la cual induciría una apoptosis celular. Comparativamente entre las dos hipótesis, podemos decir que la primera sería mucho más inflamatoria y virulenta que la segunda, la cual involucra un mecanismo de muerte celular programada, y no una necrosis con liberación del material citoplasmático al medio. En términos de tratamiento, sería mucho más beneficioso que se cumpla con el segundo apartado.