

Tesis Doctoral

Desarrollo y aplicación biológica de materiales para liberación molecular

Zayat, Leonardo Martín

2008

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Zayat, Leonardo Martín. (2008). Desarrollo y aplicación biológica de materiales para liberación molecular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Zayat, Leonardo Martín. "Desarrollo y aplicación biológica de materiales para liberación molecular". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2008.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



**Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física**

**DESARROLLO Y APLICACIÓN BIOLÓGICA
DE MATERIALES PARA LIBERACIÓN MOLECULAR**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el Área Química Inorgánica, Analítica y Química Física

Lic. Leonardo Martín Zayat

Director de Tesis: Dr. Roberto Etchenique

Consejero de Estudios: Dr. Fernando Battaglini

Buenos Aires, 2008

Desarrollo y aplicación biológica de materiales para liberación molecular.

En este trabajo se describe la síntesis y caracterización de complejos polipiridínicos de rutenio para su utilización como compuestos enjaulados en experimentos neurofisiológicos. Los compuestos de coordinación sintetizados contienen neurotransmisores como serotonina o GABA, los cuales pueden ser liberados mediante la aplicación de pulsos de luz visible en régimen de un fotón o de luz infrarroja en régimen de dos fotones. El neurotransmisor liberado actúa sobre receptores de membrana simulando un estímulo natural, como se demuestra en pruebas biológicas realizadas en ovocitos de rana o rebanadas de cerebro de ratón. Con la presentación de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ se reporta por primera vez la existencia de un compuesto enjaulado capaz efectuar la liberación de GABA mediante la absorción de un fotón de luz visible o de dos fotones de luz infrarroja. La liberación en régimen de dos fotones ocurre con una resolución espacial tal que permite estimular receptores GABAérgicos con precisión de sinapsis individual.

Palabras clave:

compuesto enjaulado – compuesto de coordinación – rutenio – bipyridina – serotonina – GABA – dos fotones

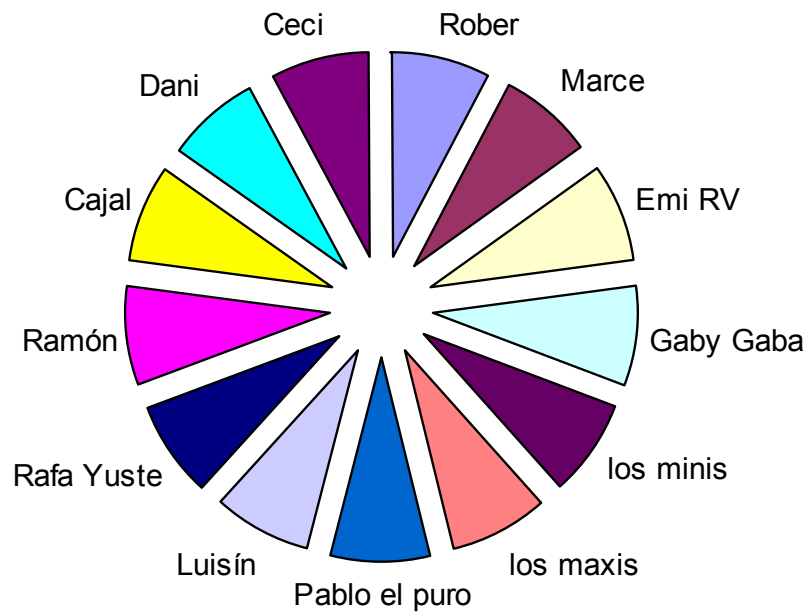
Development and biological application of materials for molecular release.

This work describes the synthesis and characterization of ruthenium polypyridine complexes as caged compounds for neurophysiological experiments. The synthesized caged compounds contain neurotransmitters like serotonin or GABA, which can be released by means of one-photon visible light or two-photon infrared light pulses. The released neurotransmitter acts upon membrane receptors emulating a natural stimulus, as is shown in biological tests conducted on frog oocytes or mouse brain slices. With the introduction of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$, a caged compound capable of one-photon visible light or two-photon infrared light absorption induced GABA photorelease is reported for the first time. Two-photon release occurs with a spatial resolution high enough to stimulate living neurons GABAergic receptors with single synapse precision.

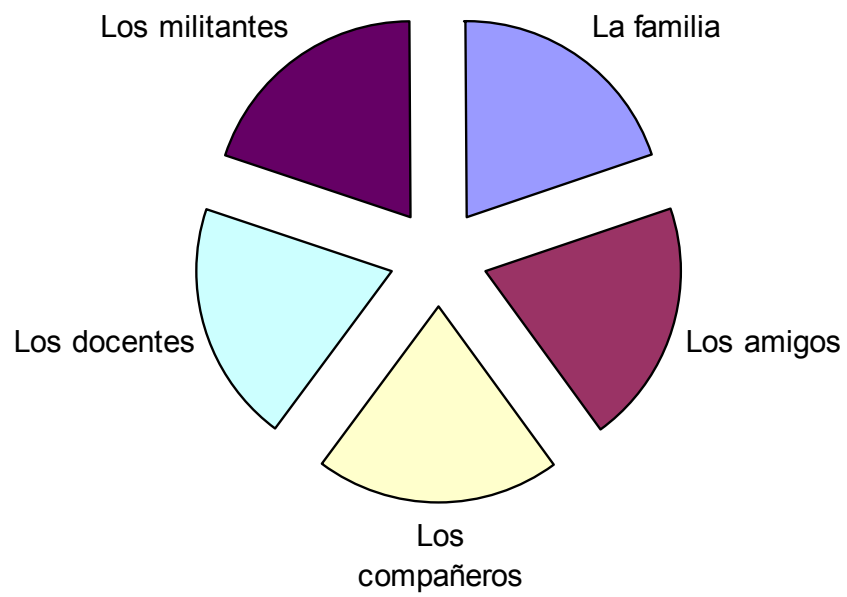
Keywords:

caged compound – coordination compound – ruthenium – bipyridine – serotonin – GABA – two photon

Agradezco a



Dedicada a



Índice

Capítulo 1 Introducción	1-6
1.1 Compuestos enjaulados.....	1-6
1.2 Compuestos de coordinación.....	1-12
1.3 Fotoquímica de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Y})]^{n+}$	1-21
Capítulo 2 Materiales y métodos	2-27
2.1 Síntesis.....	2-27
2.2 Absorción, fluorescencia, RMN y electroquímica.....	2-29
2.3 Preparación de ARN, ovocitos y electrofisiología.....	2-30
2.4 Preparación de rodajas de ratón y electrofisiología.....	2-31
2.5 Desenjaulado de GABA en rodajas.....	2-32
Capítulo 3 Resultados	3-35
3.1 Compuestos enjaulados de tipo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{RNH}_2)_2]^{n+}$	3-35
3.2 Compuestos enjaulados de tipo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{RNH}_2]^{n+}$	3-51
3.3 Liberación en dos fotones.....	3-57
3.4 Resultados biológicos en un fotón.....	3-60
3.5 Resultados biológicos en dos fotones.....	3-66
Capítulo 4 Discusión y conclusiones	4-72
Capítulo 5 Índice de figuras	5-87
Capítulo 6 Índice de tablas	6-91
Capítulo 7 Índice de citas	7-92
Capítulo 8 Trabajos publicados	8-99

Capítulo 1 Introducción

1.1 Compuestos enjaulados

En 1971, Richard Fork publicó en el revista *Science* un trabajo titulado “*Laser Stimulation of Nerve Cells in Aplysia*”.^[1] En este trabajo pionero, Fork describió la estimulación por láser de neuronas en el ganglio abdominal de *Aplysia californica*, señalando que “La capacidad de activar células individuales sin impalarlas podría proveer una técnica de barrido rápida y altamente útil para el mapeo de conexiones entre células”. La Figura 1.1 es una reproducción del arreglo experimental utilizado por Fork, tal como fue publicado en su trabajo original. La idea inicial de combinar electrofisiología tradicional con métodos ópticos de estimulación fue posteriormente adoptada y perfeccionada por numerosos investigadores dando origen al estudio, desarrollo y aplicación de los compuestos enjaulados.

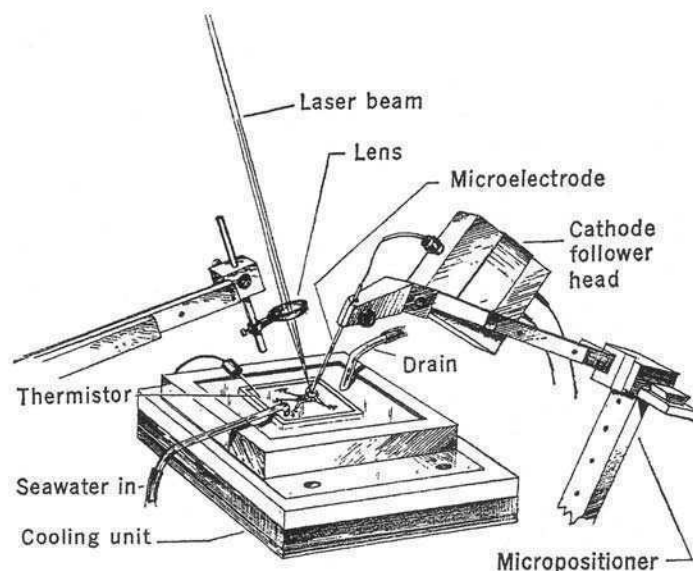


Figura 1.1 Arreglo experimental del trabajo de Fork. La lente está montada sobre un micromanipulador que permite barrer el haz a través del ganglio y controlar el foco vertical.

Los compuestos enjaulados son dispositivos moleculares formados por dos fragmentos. Uno de ellos es una biomolécula que posee una determinada actividad biológica mientras que el otro es un grupo protector que se une al primero inactivándolo reversiblemente. Mediante un estímulo lumínico, la unión entre ambos fragmentos se rompe y la biomolécula se libera, recuperando su actividad. Este proceso es caricaturizado en la Figura 1.2. Los compuestos enjaulados se utilizan en experimentos biológicos para generar concentraciones efectivas de una sustancia dada en un punto determinado del espacio y del tiempo.

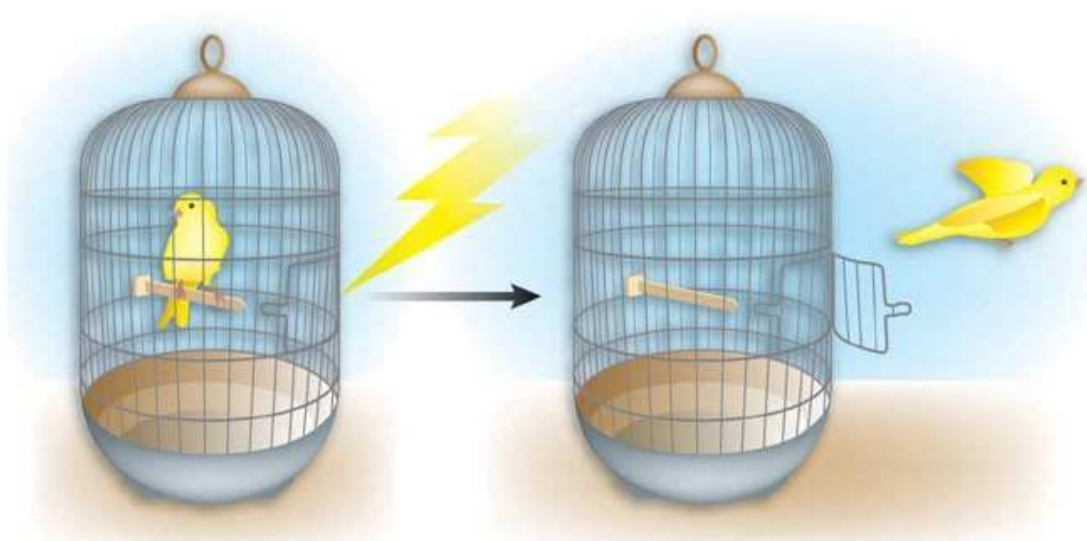


Figura 1.2 Apertura de jaula mediante la absorción de luz y liberación de la especie bioactiva atrapada. Adaptado de Haydon y Ellis Davies.^[2]

Las primeras caracterizaciones que se conocen sobre compuestos enjaulados datan de principios de la década del 70.^[3] En esos años, distintos grupos lograron proteger grupos carboxilo con fragmentos fotorremovibles. Al año 1978 corresponde la primera utilización de compuestos activables con luz en sistemas biológicos.^[4] En experimentos de fisiología de la contracción muscular, se utilizaron compuestos enjaulados fotoliberadores de ATP como el de la Figura 1.3.

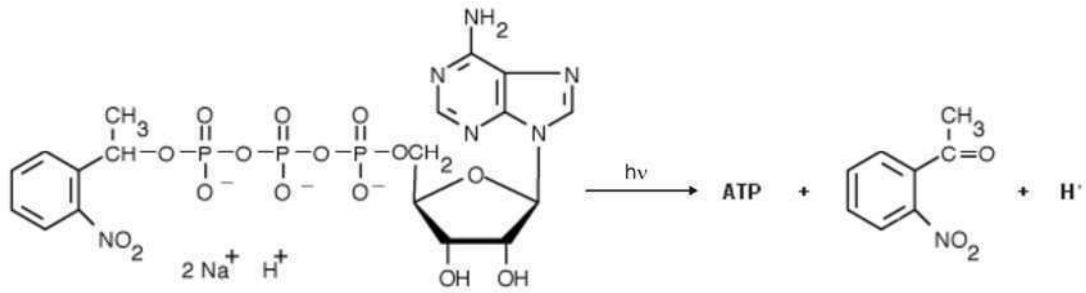


Figura 1.3 Esquema de reacción de fotólisis para ATP enjaulado

Los primeros experimentos en los que se estimularon receptores celulares a partir de la liberación de moléculas bioactivas datan de mediados de la década del 80.^[5] A 1990 corresponde la primera protección de carboxilatos biológicamente relevantes como algunos aminoácidos y neurotransmisores.^[6] A partir de ese momento la síntesis y utilización de compuestos enjaulados se amplió y diversificó.^[7-10] Se obtuvieron compuestos liberadores de aspartato, glutamato, glicina, ácido γ -aminobutírico (GABA), ATP, AMP, IP₃, ácidos nucleicos y sus análogos.^[11-19] Prácticamente la totalidad de estos compuestos se valen de las propiedades de los sustituyentes 2-nitrobencilo, 2-nitrofenetilo y sus derivados como grupos protectores fotolábiles. Estos grupos absorben luz de longitud de onda menor a los 350 nm con eficiencias cuánticas que van desde 0.1 a 0.6. Si bien estos grupos protectores poseen propiedades que pudieron ser aprovechadas en distintas aplicaciones experimentales, presentan algunas desventajas que limitan o dificultan su uso y que hasta la fecha no pudieron ser superadas. Primero, la energía de los fotones necesarios para producir la fotoliberación corresponde a luz ultravioleta, que puede comprometer la integridad de los tejidos celulares sobre los que se aplica. Al mismo tiempo, muchos de los compuestos que presentan estos grupos protectores son inestables en solución acuosa, por lo que presentan descomposición prematura y actividad biológica en ausencia de luz.

Muchas veces se ha hecho foco en estudios que explotan las ventajas en el dominio del tiempo que proveen los compuestos enjaulados. Al permitir superar la barrera temporal que establecen los procesos difusionales, se han podido medir constantes cinéticas del orden de los microsegundos en diversos sistemas biológicos. Algunas áreas de la fisiología en las que se ha aplicado el uso de compuestos enjaulados incluyen la contracción muscular, la función de canales iónicos, la neurotransmisión y el mapeo de receptores.^[20-25]

Con el correr de los años, no sólo se han perfeccionado químicamente los compuestos enjaulados sino que también se han buscado alternativas instrumentales que permitan sacar el máximo provecho de la técnica de liberación por pulsos de luz. Por lo general este tipo de mejoras han estado asociadas a modificaciones en la microscopia con la que se realizan los experimentos, logrando velocidades de barrido más altas o mayor resolución espacial de liberación.^[26-28] Sin dudas, uno de los hitos más relevantes en este sentido ha sido la incorporación de la microscopía de dos fotones a la experimentación con compuestos enjaulados.^[29]

Los métodos tradicionales de estimulación óptica sufren algunos inconvenientes que limitan su desempeño en experimentos sobre preparaciones biológicas. En primer lugar, la luz UV utilizada para provocar el desenjaulado sufre desviaciones (dispersión) al atravesar un tejido biológico, generando un desenfoque del haz que impide que la fotoliberación alcance la resolución espacial permitida por el límite de difracción. En segundo lugar, la dependencia lineal que existe entre la intensidad de la luz y la absorción hace que la liberación sea apreciable no sólo en el punto focal sino también en los conos de luz generados por la luz incidente arriba y debajo de este punto.

El uso de la microscopía de dos fotones provee soluciones para las limitaciones que presenta la microscopía convencional de un fotón. Este tipo de excitación depende de que dos fotones IR sean absorbidos casi simultáneamente por la molécula fotorreactiva, resultando en una dependencia cuadrática de la absorción con la intensidad de la luz. La absorción de dos fotones IR produce un estado excitado similar al que se alcanza luego de la absorción de un fotón del doble de la energía. La dependencia de la absorción con el cuadrado de la intensidad de la luz es la base para la alta localización de la liberación por dos fotones. Debido a esta naturaleza no lineal de la excitación, el espacio donde ocurre la absorción y fotoliberación queda limitado al volumen focal, generalmente menor a $1\mu\text{m}^3$. Por otro lado, los fotones de baja energía atraviesan el tejido biológico sin ser desviados y sufriendo una baja absorción lo cual además de no perjudicar la resolución espacial, minimiza la posibilidad de producir fotodaño.

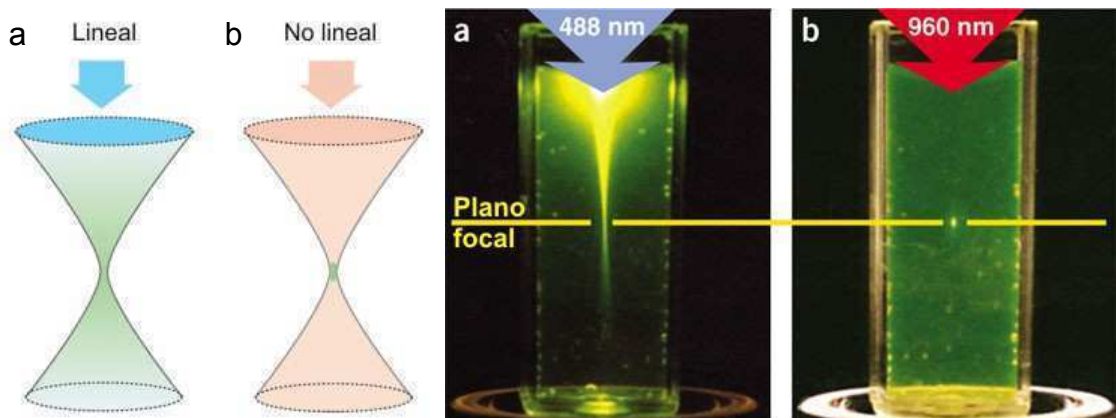


Figura 1.4 Diferencias entre la excitación por un fotón (a) y la excitación por dos fotones (b). Adaptado de Helmchen y Denk^[30] y Zipfel, Williams y Webb.^[31]

La Figura 1.4 ilustra las diferencias entre la excitación por uno y dos fotones. El uso de la microscopía de dos fotones combinada con la estimulación con compuestos enjaulados permitió el mapeo funcional de receptores colinérgicos con alta resolución espacial.^[32] Asimismo, el desenjaulado por dos fotones de glutamato ha sido utilizado exitosamente para estimular sinapsis individuales, como se esquematiza en la Figura 1.5, provocando respuestas que se asemejan a las corrientes postsinápticas miniatura.^[33, 34]

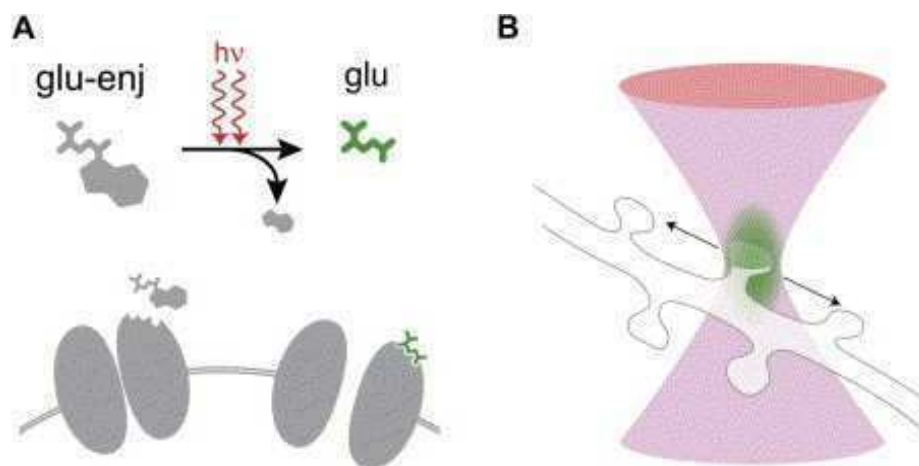


Figura 1.5 A) Esquema de la reacción de fotoliberación de glutamato por absorción de dos fotones. B) Ilustración de la liberación por dos fotones sobre una sinapsis individual. Adaptado de Judkewitz, Roth y Häusser.^[35]

El campo de investigación sobre compuestos enjaulados surgió hace más de 35 años y hoy continúa en pleno desarrollo, como lo demuestra la publicación varias revisiones recientes sobre el tema.^[36-38] Este desarrollo se basa tanto en la aplicación de nuevas fuentes de luz y sistemas de microscopía como en la síntesis de nuevos compuestos cada vez más eficaces.

1.2 Compuestos de coordinación

Tradicionalmente, el ión complejo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ ha sido estudiado como dispositivo para convertir radiación electromagnética en energía química. Entre las propiedades fotofísicas que respaldan esta exploración se encuentran su intensa absorción en el rango de luz visible, su elevada eficiencia de población de los estados excitados reactivos y su estabilidad frente a la descomposición térmica y fotoquímica. La estabilidad fotoquímica no está dada por la ausencia de rutas de fotosustitución sino por la eficiente recaptura de grupos salientes que sufren los ligandos con dos puntos de unión al rutenio como la bipyridina. Así, mientras que el rendimiento cuántico de fotosustitución de bpy por agua en solución acuosa para $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ es aproximadamente de $0,2 \times 10^{-4}$, para el complejo homólogo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{py}_2]^{2+}$ (py = piridina) se acerca a 0,3.^[39]

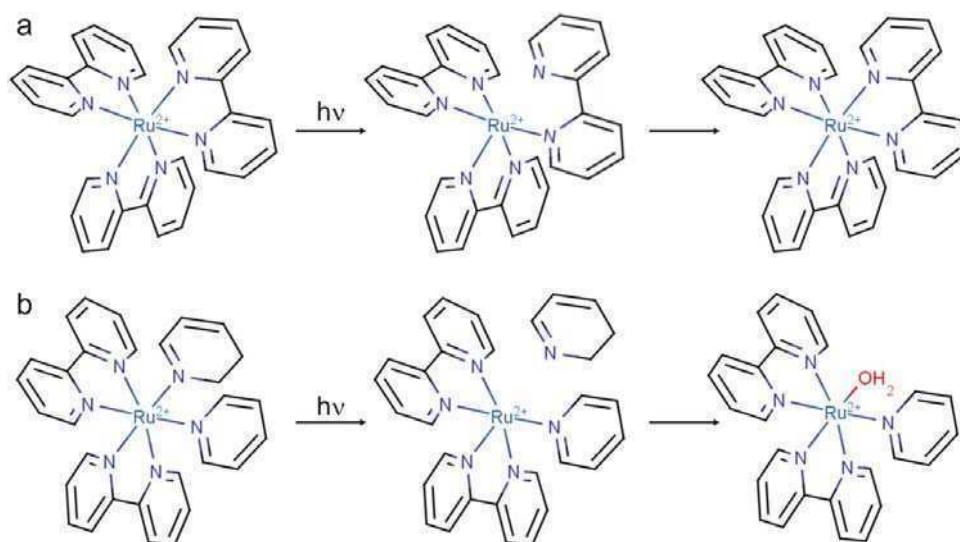


Figura 1.6 Fotólisis en agua de a) $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ y b) $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{py}_2]^{2+}$

Los compuestos de coordinación como $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ están constituidos por un átomo metálico central alrededor del cual se disponen una serie de ligandos. El enlace entre el centro metálico y los ligandos se da a través de uniones de coordinación, en las que el ligando aporta la mayor parte de la densidad electrónica. Como simplificación, se suele decir que el ligando aporta el par de electrones que constituyen el enlace coordinado. Para que el enlace puedan establecerse, el ligando debe ser capaz de donar densidad electrónica sobre el metal. En la Figura 1.7 se muestran algunos ligandos de frecuente aparición en la química de coordinación del rutenio. La cantidad de puntos de unión al metal conduce a que sean llamados ligandos monodentados, bidentados, etc.

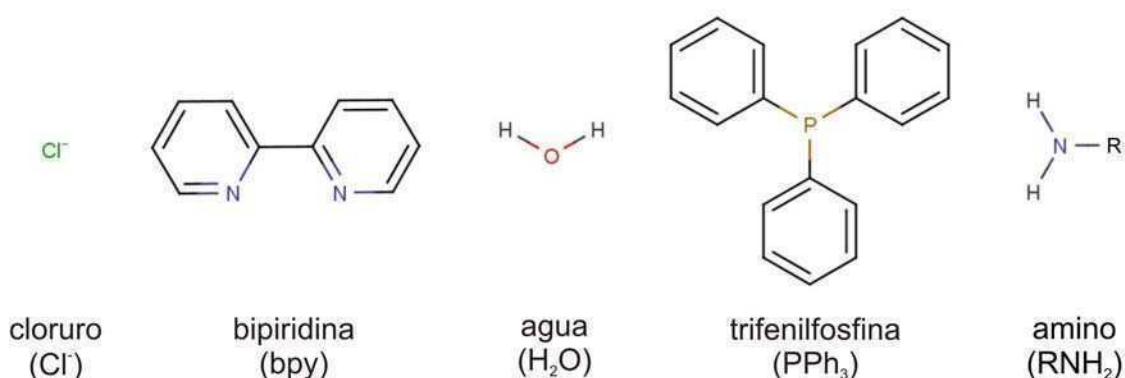


Figura 1.7 Algunos ligandos comunes en compuestos de coordinación

El átomo metálico determina tanto el número de uniones que es capaz de establecer con los ligandos, conocido como número de coordinación, como la disposición estructural de los mismos en el espacio. El número de coordinación más común para el Ru^{2+} es seis y su geometría característica la octaédrica, en la que los átomos de los ligandos que participan de la unión se ubican aproximadamente en los vértices de un poliedro regular de ocho caras. Para compuestos con tres ligandos bidentados como $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ esta disposición produce dos enantiómeros pero no

admite isómeros geométricos. Los compuestos con dos ligandos bidentados y dos ligandos monodentados sí presentan isomería óptica. El compuesto $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ muestra dos posibles configuraciones. En la configuración *cis*, una molécula de agua se encuentra adyacente a la otra, mientras que en la configuración *trans* ambas moléculas de agua se encuentran separadas por un ángulo de 180° . La configuración más estable térmicamente es la *cis*, mientras que la *trans* puede alcanzarse por fotólisis en medio acuoso.^[40]

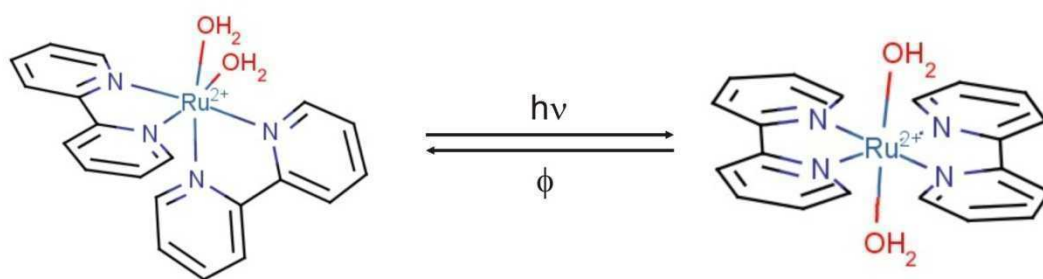


Figura 1.8 Isómeros *cis*- y *trans*- del compuesto $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$

El rutenio es un metal de transición correspondiente al grupo VIII, bloque d, cuya configuración electrónica es $[\text{Kr}] 4d^7 5s^1$. Cuando se presenta como Ru^{2+} , conserva 6 electrones ubicados en los orbitales d. Las bipyridinas son moléculas sin absorción propia en el rango visible, con orbitales donores σ localizados en los átomos de nitrógeno y orbitales donores π y aceptores π^* localizados en los anillos aromáticos. Al establecerse la unión de coordinación, el rutenio acepta densidad electrónica proveniente de los orbitales σ de las bipyridinas, mientras que las bipyridinas a su vez aceptan densidad electrónica proveniente del metal en sus orbitales π^* vacíos. Cuando forman $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$, la interacción entre ambos da lugar a la aparición de niveles de energía y transiciones electrónicas asociadas, según se indica en la Figura 1.9.

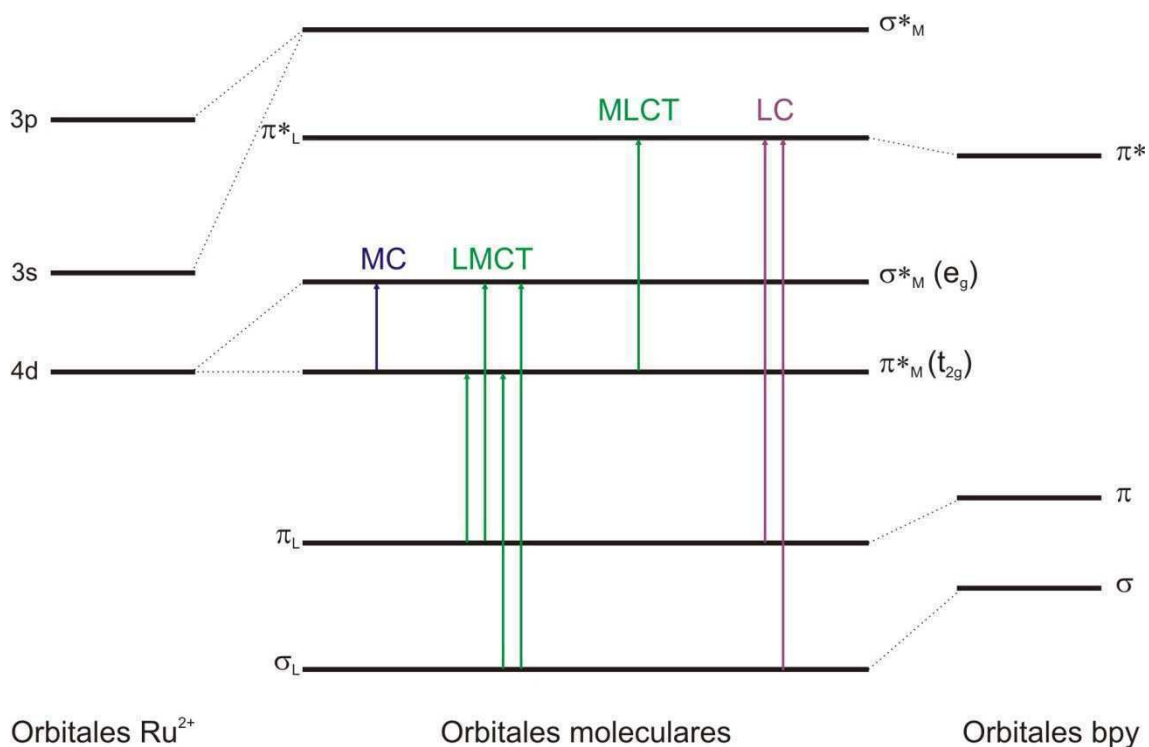


Figura 1.9 Diagrama simplificado de los niveles de energía correspondientes a $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$

En el esquema, cada orbital molecular está marcado de acuerdo a si está localizado predominantemente sobre el metal (M) o sobre los ligandos (L). Los orbitales moleculares σ de menor energía, que resultan de la combinación de orbitales del metal y los ligandos de simetría adecuada, están marcados como L debido a que reciben una mayor contribución de parte de orbitales σ del ligando. Los orbitales d , que en el rutenio aislado no poseen diferencia de energía, se separan en dos grupos de carácter M al combinarse con los orbitales de los ligandos. Los orbitales e_g son de mayor energía ya que determinan uniones σ que apuntan directamente hacia los ligandos, mientras que los t_{2g} forman uniones π . Ambos grupos están marcados como M ya que son de carácter eminentemente metálico.

En la configuración electrónica correspondiente al estado basal de compuestos piridínicos de Ru^{2+} los orbitales σ_L y π_L y π^*_M están completos, mientras que los orbitales de mayor energía se encuentran vacíos. La absorción de luz y los procesos de óxido-reducción cambian la ocupación de los orbitales moleculares dando lugar a nuevos estados electrónicos. Las transiciones que conducen a estos estados excitados pueden clasificarse según la localización de los orbitales moleculares involucrados. De esta forma, surgen tres tipos fundamentales de transiciones que se señalan a continuación:

- a. Transiciones entre orbitales moleculares localizados principalmente en el átomo metálico. Los orbitales moleculares de este tipo son aquellos que derivan de los orbitales d del metal. Estas transiciones son conocidas como centradas en metal (MC), de campo ligante (LF) o transiciones $d-d$.
- b. Transiciones entre orbitales moleculares localizados principalmente en los ligandos. Estas transiciones involucran orbitales que prácticamente no se ven afectados por la coordinación al metal. Se conocen como transiciones centradas en ligando (LC) o transiciones intra-ligando (IL).
- c. Transiciones entre orbitales moleculares de diferente localización. Estas transiciones causan el desplazamiento de carga electrónica desde los ligandos hacia el metal o viceversa, por lo que se denominan transiciones de transferencia de carga (CT) o transiciones de transferencia electrónica. Según el sentido de la transición, pueden distinguirse transiciones de transferencia de carga de ligando a metal (LMCT) o de metal a ligando (MLCT).

Una solución acuosa de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ posee el espectro de absorción electrónica que se muestra en la Figura 1.10. Las bandas de absorción que aparecen en el espectro se originan en las transiciones hacia los estados excitados del compuesto descritas más arriba. Las bandas de alta energía a 185 nm y 285 nm han sido asignadas a transiciones $\pi\text{-}\pi^*$ centradas en los ligandos por comparación con el espectro de la bipyridina libre. Las bandas que aparecen a 238 nm y 250 nm y la banda de absorción de luz visible a 452 nm corresponden a transiciones $d\text{-}\pi^*$ de tipo MLCT. Los hombros a 322 nm y 344 nm podrían corresponder a transiciones centradas en el metal. La absorción en estas bandas es débil debido a que las transiciones $d\text{-}d$ están prohibidas por reglas de selección.^[41]

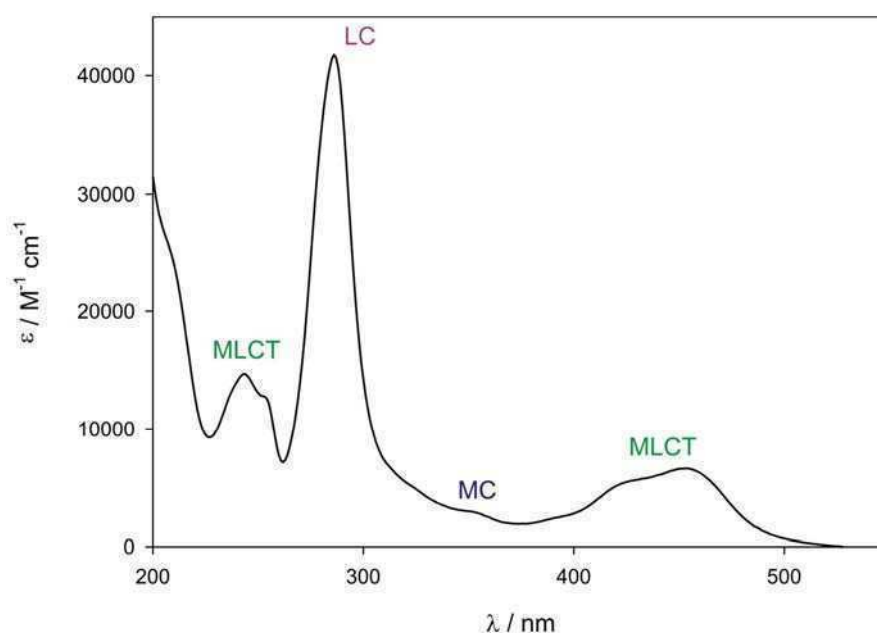


Figura 1.10 Espectro de absorción en agua de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$

Todos los estados excitados son potenciales agentes redox debido a que la absorción de luz coloca un electrón en un nivel de energía más alto en el que está más débilmente unido y al mismo tiempo provoca la aparición de un “hueco” en el nivel inferior. Debido a que los estados excitados de alta energía de los compuestos de coordinación se relajan velozmente por caminos no radiativos, sólo el estado excitado más bajo puede desempeñar un rol en procesos redox bimoleculares o de luminiscencia.^[42] El estado excitado más bajo para $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ corresponde a la transición MLCT que se ubica en la región de luz visible. Por este motivo, las diferentes rutas asociadas a este estado –que también puede alcanzarse por procesos multifotónicos–^[43] han sido las más estudiadas a lo largo de los años.

La absorción de luz a través de la transición $d\pi(\text{Ru})-\pi^*(\text{bpy})$ conduce a la población de un estado MLCT de carácter esencialmente singlete que antes de 1 ps decae térmicamente a un estado MLCT triplete.^[44] La emisión desde este triplete se ubica alrededor de los 600 nm.^[45] A bajas temperaturas, el decaimiento al estado fundamental se da por vías de relajación radiativa y no radiativa desde el estado triplete. Cuando la temperatura aumenta aparecen caminos de decaimiento alternativos que reducen el tiempo de vida de los estados excitados. Estos mecanismos es dependientes de la temperatura fueron atribuidos al cruce a un estado $d-d$ no observable espectroscópicamente.^[42, 46]

Para complejos de rutenio que contienen solo dos bipyridinas como $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{py})_2]^{2+}$, se ha informado que los tiempos de vida de la luminiscencia varían mucho menos con el cambio de temperatura, lo que ha conducido a sugerir que la población del estado $d-d$ podría ocurrir directamente desde el estado MLCT singlete luego de la excitación inicial.^[47, 48]

El cruce al estado excitado $d-d$ involucra la promoción de un electrón de no-unión a un orbital σ de anti-unión.^[49] Este estado, que puede escribirse como $(d\pi)^5(d\sigma^*)^1$, posee una conformación fuertemente distorsionada con respecto a la geometría del estado basal por lo que tiende a decaer muy rápidamente por vías no radiativas que incluyen procesos de fotosustitución. La sustitución ocurre por un mecanismo disociativo sin dependencia del grupo entrante y con constantes cinéticas superiores a 10^5 s^{-1} .^[39] La Figura 1.11 ilustra los estados excitados y caminos de decaimiento mencionados.

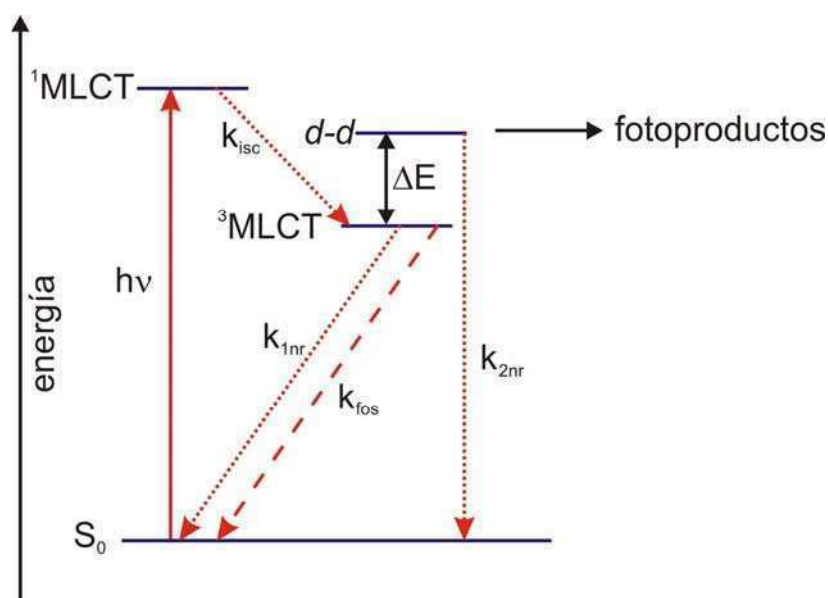


Figura 1.11 Diagrama de los estados excitados de baja energía en $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$

Es de esperar que cuanto menor sea la diferencia de energía entre los estados $^3\text{MLCT}$ y $d-d$, mayor sea la participación de este último en los procesos de relajación del estado excitado, con la consiguiente reducción de los tiempos de luminiscencia y el incremento de las tasas de fotodescomposición. Las posiciones relativas de los estados excitados $^3\text{MLCT}$ y $d-d$ dependen de la combinación de ligandos en la esfera de coordinación y de su capacidad de modificar la densidad electrónica sobre el rutenio.^[50]

Históricamente, la mayor parte de las investigaciones alrededor de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ estuvieron dedicadas a eliminar o minimizar la participación de los estados $d-d$ en las vías de relajación, con el objetivo de prolongar la vida media de los estados excitados capaces de participar en reacciones bimoleculares fotoinducidas. Esta búsqueda provocó la acumulación de un gran cuerpo de información sobre la fotoquímica de las polipiridinas de rutenio. Todo el conocimiento reunido con el propósito de lograr compuestos más fotoestables también puede ser utilizado con el fin de diseñar compuestos enjaulados de alto rendimiento de fotoliberación.

1.3 Fotoquímica de $[Ru(bpy)_2(X)(Y)]^{n+}$

Muchos de los estudios de fotosustitución en polipiridinas de rutenio fueron hechos en compuestos de tipo $[Ru(bpy)_2(X)(Y)]^{n+}$, ya que la pérdida de los ligandos monodentados permite realizar un mejor seguimiento del proceso fotoquímico. En estos compuestos, las bipyridinas son los ligandos cromofóricos debido a que originan la banda MLCT de baja energía que da color a los complejos. Los ligandos monodentados X e Y modifican la posición de esta banda de acuerdo a su carácter neto donador o aceptor de electrones, aunque sin alterar la naturaleza del estado excitado. En este contexto, la banda MLCT actúa como transición espectadora de la interacción entre el rutenio y los ligandos monodentados. Los ligandos aceptores, que reducen la densidad electrónica sobre el metal, provocan un corrimiento de la banda MLCT a longitudes de onda más cortas. Este corrimiento ha sido explicado por la estabilización de los orbitales d del metal y un aumento resultante en la separación de los orbitales $d\pi(Ru)-\pi^*(bpy)$.^[51]

La denominada serie espectroquímica refleja las propiedades donadoras-aceptoras de los distintos ligandos.^[50] La coordinación de un anión donador como Cl^- baja la energía de la transferencia de carga desde el rutenio hacia las bipyridinas. El reemplazo de Cl^- por el ligando menos donador H_2O conduce a un corrimiento de la banda MLCT hacia el azul.^[46] Ligandos neutros pero más básicos que el agua como NH_3 dejan la banda en un lugar intermedio. Por otro lado, buenos ligandos π aceptores como CH_3CN o PPh_3 estabilizan los orbitales $d\pi(Ru)$ por retrodonación π sin estabilizar los orbitales $\pi^*(bpy)$, por lo que conducen a un mayor salto de energía entre los estados basal y excitado, de modo que la transición ocurre a menor longitud de onda.^[47, 52, 53]

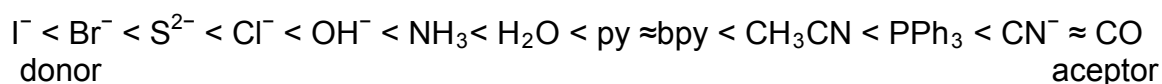


Figura 1.12 Algunos ligandos de la serie espectroquímica

De manera consistente con esta interpretación, a medida que el carácter aceptor del ligando aumenta también se observa el aumento en el potencial de oxidación de la cupla $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$. Esto ocurre debido a que un entorno deficiente en electrones produce la estabilización relativa del estado Ru^{II} sobre el estado Ru^{III} .^[54] El corrimiento de la banda MLCT también influye sobre el rendimiento cuántico de fotosustitución. La correlación establecida muestra que cuanto mayor es la energía de la transición, más alta es la tasa de fotoliberación de los ligandos monodentados.^[55] A partir de esta observación se ha postulado que la desestabilización de los estados Ru^{+3} conduce a una reducción de la energía necesaria para alcanzar el estado excitado *d-d*, el cual se puebla más eficientemente favoreciendo las rutas de relajación disociativas.

A continuación, se muestran algunos resultados de trabajos que analizaron la influencia de los ligandos monodentados en el comportamiento fotofísico y fotoquímico de compuestos piridínicos de rutenio. En un estudio se utilizaron diversos ligandos de la serie espectroquímica para obtener compuestos de la forma $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Y})]^{n+}$. Algunos de estos ligandos se representan en la Figura 1.13.

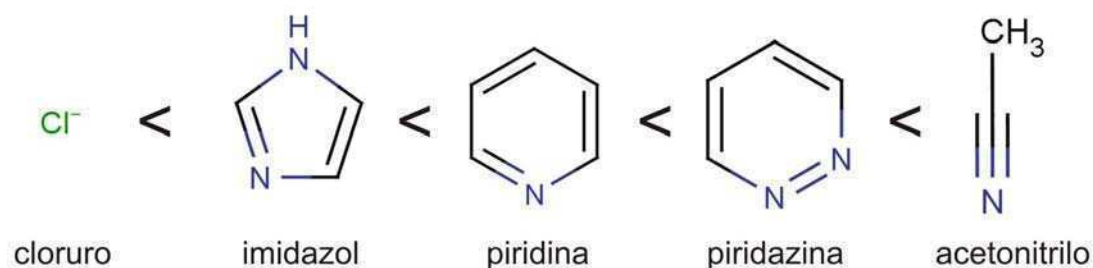


Figura 1.13 Ligandos en orden de electro-acepción creciente.

Los datos obtenidos, consignados en la Tabla 1-1, dieron lugar a las correlaciones de la Figura 1.14 y la Figura 1.15.

Tabla 1-1. Posiciones de la banda MLCT, potenciales de oxidación y rendimientos cuánticos de fotólisis para los compuestos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Y})]^{n+}$. Adaptado de Pinnick y Durham.^[55]

	XY	$\lambda_{\text{MLCT}} / \text{nm}^a$	$E_{1/2} / \text{V}^b$	ϕ_{lib}^a
1	(piridina)(Cl)	505	0.79	0.04
2	(4-acetilpiridina)(Cl)	495	0.82	0.07
3	(imidazol) ₂	488	1.02	0.001
4	(N-metilimidazol) ₂	483	0.94	0.001
5	(CH ₃ CN)(Cl)	481	0.86	0.12
6	(piridina) ₂	454	1.3	0.2
7	(4-acetilpiridina) ₂	442	1.45	0.29
8	(3-iodopiridina) ₂	442	1.36	0.24
9	(piridazina) ₂	440	1.42	0.06
10	(CH ₃ CN) ₂	426	1.44	0.31

^aDeterminado en diclorometano. ^bDeterminado en acetonitrilo vs. SSCE.

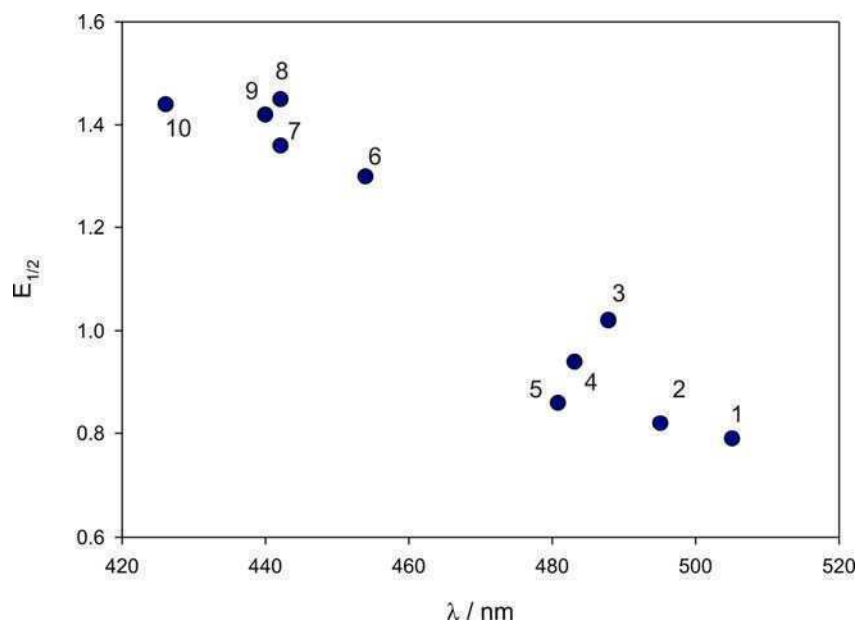


Figura 1.14 Correlación de la longitud de onda de la banda MLCT con el potencial $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$ para $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Y})]^{n+}$. Adaptado de Pinnick y Durham.^[55]

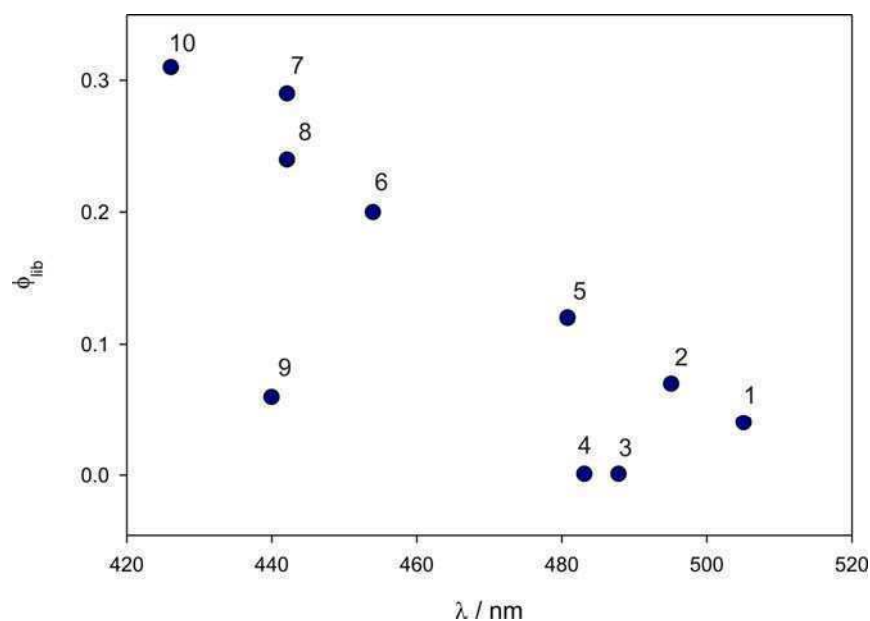


Figura 1.15 Correlación de la longitud de onda de la banda MLCT con el rendimiento cuántico de fotoliberación para $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Y})]^{n+}$. Adaptado de Pinnick y Durham.^[55]

Para un mismo ligando como la piridina, estos efectos dependen de los sustituyentes más o menos dadores de electrones que se incorporen al anillo aromático. Si los sustituyentes son dadores de electrones, se enriquece la densidad electrónica sobre el anillo y se aumenta la disponibilidad del par libre del nitrógeno piridínico incrementando la carga negativa sobre el rutenio. La Figura 1.16 muestra las estructuras de 4 piridinas sustituidas en orden de electro-acepción creciente.

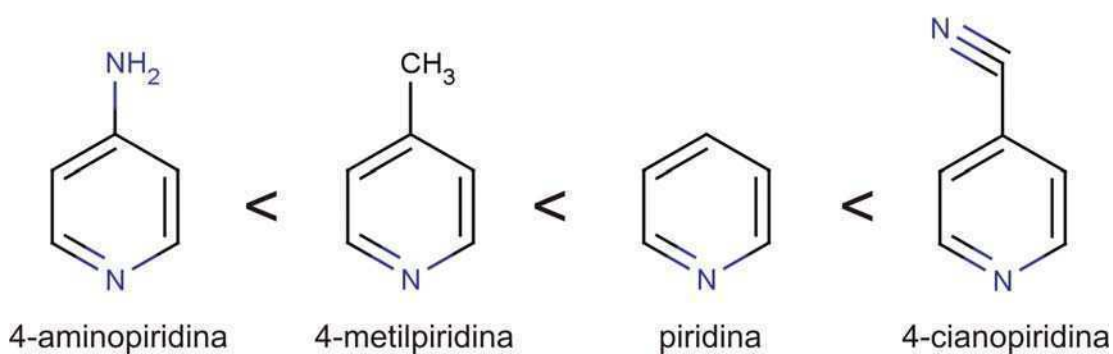


Figura 1.16 Piridinas con distintos sustituyentes en orden de electro-acepción creciente.

Estos ligandos han sido utilizados en complejos de la forma $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Cl})]^+$ para estudiar las variaciones del comportamiento fotoquímico a lo largo de la serie.^[56] Los resultados obtenidos son resumidos en la Tabla 1-2 y representados en las Figura 1.17 y Figura 1.18.

Tabla 1-2. Posiciones de la banda MLCT, potenciales de oxidación rendimientos cuánticos de fotólisis para los compuestos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Cl})]^+$. Adaptado de Ershov et al.^[56]

	X	$\lambda_{\text{MLCT}} / \text{nm}^{\text{a}}$	$E_{1/2} / \text{V}^{\text{b}}$	$\phi_{\text{lib}}^{\text{a}}$
1	4-aminopiridina	516	0.67	0.0036
2	4-metilpiridina	504	0.75	0.002
3	piridina	500	0.77	0.051
4	4-cianopiridina	486	0.85	0.18

^aDeterminado en acetonitrilo. ^bDeterminado en acetonitrilo vs. SSCE.

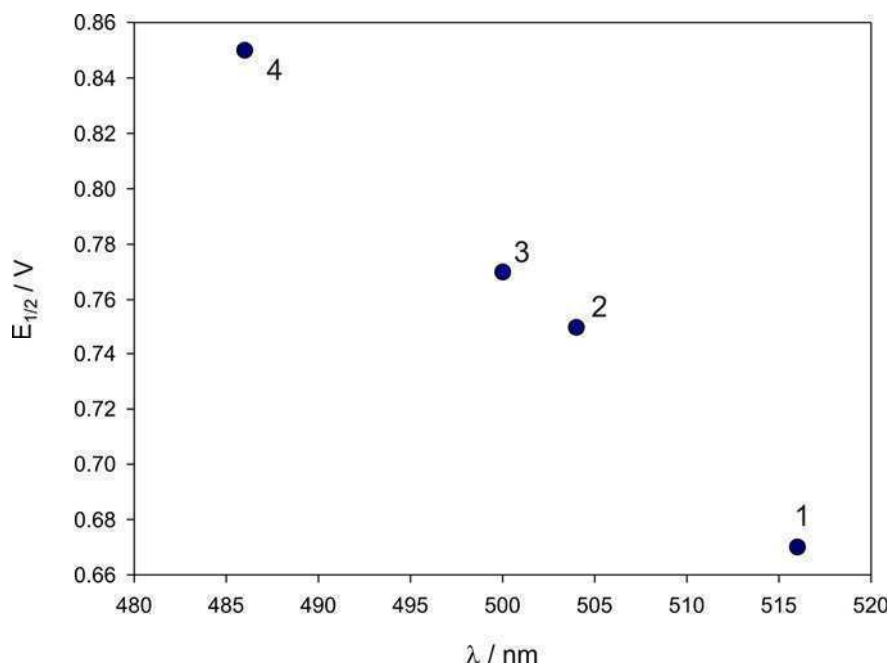


Figura 1.17 Correlación de la longitud de onda de la banda MLCT con el potencial $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$ para $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Cl})]^+$. Adaptado de Ershov et al.^[56]

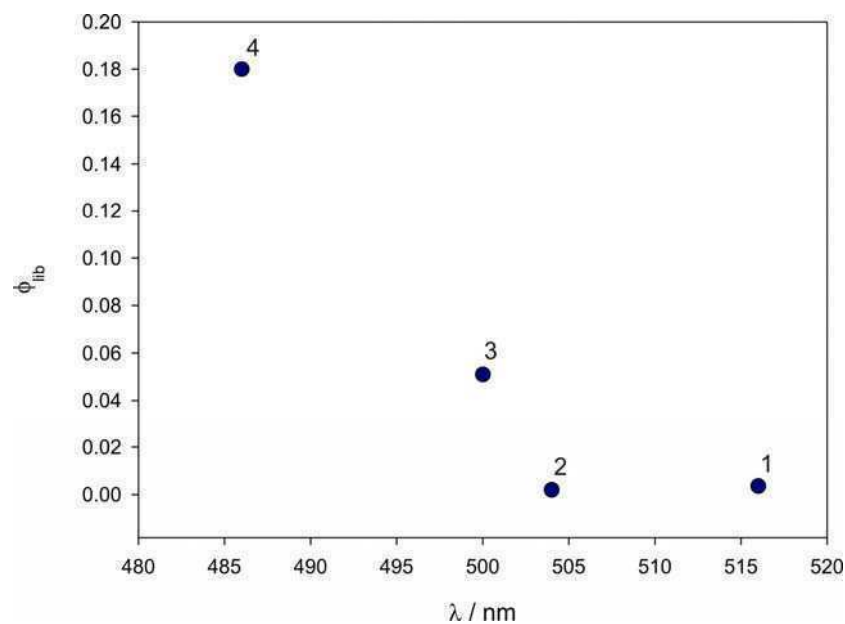


Figura 1.18 Correlación de la longitud de onda de la banda MLCT con el rendimiento cuántico de fotoliberación para $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Cl})]^+$. Adaptado de Ershov et al.^[56]

En resumen, la presencia en la esfera de coordinación del rutenio de ligandos monodentados aceptores traslada la banda MLCT a mayores energías, aumenta el potencial de oxidación de la cupla $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$ y eleva el rendimiento cuántico de fotosustitución. La manipulación de estas variables sugiere un amplio espectro de posibilidades para la utilización de compuestos de coordinación en el desarrollo de nuevos materiales para la fotoliberación de moléculas de interés biológico.

Capítulo 2 Materiales y métodos

2.1 Síntesis.

Todos los reactivos fueron obtenidos comercialmente y usados sin purificaciones adicionales. $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$ fue sintetizado de acuerdo a la literatura.^[52] Todas las síntesis fueron hechas degaseando las soluciones con N_2 antes de calentar, para evitar la oxidación de los complejos acuos de Rutenio.

$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L})_2](\text{PF}_6)_2$ para $\text{L} =$ tiramina, triptamina o serotonina (5HT). Se suspendieron 100 mg de $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$ en 10 mL de agua destilada, se burbujeó N_2 durante 15 minutos y la suspensión fue calentada a 80 °C hasta disolución completa. La formación del complejo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ fue determinada por su banda a 480 nm.^[40] Luego de la formación del complejo di-acuo, se agregaron 10 equivalentes del ligandos disueltos en una mínima cantidad de etanol, manteniendo la temperatura de la solución a 80 °C hasta que no se observaran mas cambios en el espectro de absorción UV-Vis medido a pH 12. La solución fue filtrada para remover cualquier particular insoluble y una vez enfriada fue precipitada con solución saturada de NH_4PF_6 . El precipitado fue lavado tres veces con agua fría.

$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L})_2]\text{Cl}_2$ for $\text{L} =$ tiramina, triptamina o serotonina (5HT). La sal de PF_6^- fue disuelta en una mínima cantidad de acetona. Se agregaron gotas de cloruro de tetrabutilamonio saturado en acetona hasta lograr la precipitación total de la sal de cloruro. El precipitado fue lavado tres veces con acetona y secado. RMN (D_2O): $\text{L} =$ Tiramina ^1H δ 1.92 (m, 2H), 2.28 (m, 2H), 2.45 (m, 4H), 3.07 (t, 2H), 3.19 (t, 2H), 6.68 (d, 4H), 6.73 (d, 4H), 7.05 (t, 2H), 7.47 (d, 2H), 7.68 (t, 2H), 7.75 (t, 2H), 8.13 (t, 2H),

8.24 (d, 2H), 8.39 (d, 2H), 8.66 (d, 2H). RMN (D_2O): L = Triptamina 1H δ 2.02 (m, 2H), 2.37 (m, 2H), 2.75 (dt, 4H), 3.05 (t, 2H), 3.12 (t, 2H), 7.02 (s, 2H), 7.04 (t, 2H), 7.12 (m, 4H), 7.39 (m, 4H), 7.42 (t, 2H), 7.56 (d, 2H), 7.73 (t, 2H), 7.94 (t, 2H), 8.03 (d, 2H), 8.06 (d, 2H), 8.49 (d, 2H). RMN (D_2O): L = Serotonina 1H δ 1.91 (m, 2H), 2.41 (m, 2H), 2.62 (m, 4H), 2.88 (t, 2H), 3.13 (t, 2H), 6.31 (s, 2H), 6.85 (dd, 2H), 6.90 (s, 2H), 6.94 (t, 2H), 7.29 (d, 2H), 7.33 (d, 2H), 7.46 (t, 2H), 7.61 (t, 2H), 7.85 (d, 2H), 7.87 (d, 2H), 7.91 (t, 2H), 8.54 (d, 2H).

[Ru(bpy)₂(GABAH)₂](PF₆)₂. Se siguió el procedimiento anterior, pero la precipitación se logró usando HPF₆ 60% en agua, y dejando la suspensión en hielo durante una hora. No se hicieron cambios de ión adicionales. RMN (D_2O): 1H δ 1.65 (m, 4H), 1.85 (m, 2H), 2.03 (m, 2H), 2.17 (t, 4H), 3.12 (t, <1H), 3.27 (t, <1H), 7.20 (t, 2H), 7.66 (d, 2H), 7.88 (t, 2H), 7.93 (t, 2H), 8.29 (t, 2H), 8.42 (d, 2H), 8.62 (d, 2H), 9.16 (d, 2H).

[Ru(bpy)₂PPh₃Cl]Cl. Se disolvieron 682 mg de Ru(bpy)₂Cl₂ en 45 ml de metanol. A esta solución, se agregaron 410 mg de trifenilfosfina agitándose la mezcla hasta disolución completa. Luego se agregaron 20 mL de agua y se calentó la solución a reflujo por dos horas. Cuando se detuvo la reacción, la solución fue secada por evaporación rotatoria. El sólido fue resuspendido en 50 mL de acetona, lo que primero provocó la disolución de [Ru(bpy)₂PPh₃Cl]⁺ y luego la precipitación de [Ru(bpy)₂PPh₃Cl]Cl. La solución se mantuvo a 0 °C por una hora antes de ser filtrada. El sólido rojo fue lavado con tres porciones de acetona y una de éter etílico y secado. RMN (D_2O): 1H δ 6.84 (t, 1H), 7.19 (m, 6H), 7.24 (t, 1H), 7.25 (d, 1H), 7.29 (d, 1H), 7.31 (m, 3H), 7.33 (t, 1H), 7.39 (m, 6H), 7.43 (t, 1H), 7.73 (t, 1H), 7.99 (t, 1H), 8.12 (t, 1H), 8.35 (d, 1H), 8.45 (d, 1H), 8.56 (d, 1H), 8.62 (d, 1H), 9.22 (dd, 2H).

[Ru(bpy)₂PPh₃GABA]PF₆. Se disolvieron 110 mg de [Ru(bpy)₂PPh₃Cl]Cl en 10 mL de agua. La mezcla se calentó a 80 °C por media hora para formar [Ru(bpy)₂PPh₃H₂O]²⁺. Luego se agregaron 455 mg de GABA y 4.4 mL de solución acuosa de NaOH 1M. Se continuó calentando durante 3 horas antes de precipitar el complejo en hielo con 0.8 mL de KPF₆ 1M y centrifugarlo en un tubo de ensayo. El sólido fue resuspendido en 3 mL de agua y centrifugado 2 veces más antes de ser llevado a sequedad. Para una mayor pureza se puede recurrir a una columna de filtración cargada con DEAE-Sephadex A-25 a pH 9. RMN (D₂O): ¹H δ 1.33 (m, 1H), 1.43 (m, 1H), 1.49 (m, 1H), 1.78 (t, 2H), 1.82 (m, 1H), 3.16 (t, 1H), 3.55 (t, 1H), 7.15 (t, 1H), 7.21 (m, 6H), 7.27 (t, 1H), 7.33 (m, 6J), 7.37 (t, 1H), 7.42 (d, 1H), 7.49 (m, 3H), 7.6 (t, 1H), 7.85 (t, 1H), 7.9 (d, 1H), 8.01 (t, 1H), 8.02 (d, 1H), 8.13 (d, 1H), 8.22 (t, 1H), 8.52 (d, 1H), 8.62 (d, 1H), 8.71 (d, 1H), 9.14 (d, 1H).

2.2 Absorción, fluorescencia, RMN y electroquímica.

Los espectros UV-Vis fueron adquiridos con un espectrofotómetro de arreglo de diodos HP8452A (Hewlett-Packard). Las irradiaciones para el cálculo de la eficiencia cuántica de liberación fueron hechas con un LED LXHL-LR3C de 455 nm (Luxeon Star LEDs). La potencia de la luz fue medida en una fotólisis de prueba usando [Ru(bpy)₂(py)₂]²⁺ como patrón, considerando una eficiencia cuántica de fotosustitución de 0.26.^[55] Los gráficos de fotoconversión fueron ajustados con una exponencial función exponencial de dos parámetros $y=a*(1-\exp(-b*x))$. Los rendimientos cuánticos fueron obtenidos como $a*b$.

Los espectros de RMN se obtuvieron con equipos Bruker Avance II 500 y AC-200. Las mediciones de fluorescencia se hicieron con un espectrofluorómetro Quantamaster (Photon Technology International). Los voltagramas se realizaron en CH₃CN/ 0.1M TBAPF₆ utilizando un potencióstato de tres electrodos basado en un amplificador operacional TL071 en configuración corriente-voltaje^[57] y un *software* de adquisición escrito en QB 4.5. Se usó como electrodo de trabajo un alambre de Pt de 500 µm de diámetro.

2.3 Preparación de ARN, ovocitos y electrofisiología

Como molde para sintetizar ARNc se utilizó un ADNc humano de la subunidad ρ1 del receptor GABA_C, clonado en el vector pBS (SK⁻) (Promega) de transcripción *in vitro*. Se prepararon soluciones de ARNc (0,1 a 0,3 ng nL⁻¹) en agua libre de ARNasa y se guardaron a -70 °C. Se utilizaron ovocitos de *Xenopus laevis* (Nasco) de etapas V y VI para la expresión de ARNc. El aislamiento y mantenimiento de los ovocitos se llevó a cabo según la literatura.^[58] Brevemente, las ranas fueron anestesiadas con ácido etil-éster-3-amino benzoico (1 g mL⁻¹) y los ovarios fueron quirúrgicamente removidos. Los ovarios fueron incubados con colagenasa (200 unidades mL⁻¹) durante 50 minutos a temperatura ambiente y los ovocitos aislados fueron mantenidos en incubación a 17 °C en medio Barth de pH 7,4 con (en mM): 88 NaCl; 0.33 Ca(NO₃)₂; 0.41 CaCl₂; 1 KCl; 0.82 MgSO₄; 2.4 NaHCO₃; 10 HEPES y 0.1 mg mL⁻¹ gentamicina. Un día después, cada ovocito fue manualmente microinyectado.

Pasados de 3 a 7 días de inyectados los ovocitos, se realizaron registros de fijación de voltaje con dos electrodos con un amplificador Axoclamp 2B (Molecular Devices). Se hicieron electrodos de registro de vidrio con un estirador Narishige PB-7 y se cargaron con KCl 3 M. Los valores de resistencia fueron aproximadamente de 1 M Ω . El potencial de fijación fue establecido en -70 mV, y los trazos de las corrientes fueron adquiridos mediante una interfase digital, almacenando los datos en una computadora con el *software* AXOTAPE (Molecular Devices). Los ovocitos fueron colocados en una cámara de 100 μ L conteniendo solución Ringer de rana a pH 7 (en mM): 115 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂ y 5 HEPES. El compuesto fue disuelto en esta solución y aplicado a través del sistema de perfusión. Los pulsos de luz visibles fueron generados con una lámpara halógena tungsteno cuarzo y dirigidos mediante una fibra óptica. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente.

2.4 Preparación de rodajas de ratón y electrofisiología

Se prepararon rodajas coronales de corteza visual de ratón de 350 μ m de espesor usando un vibratomo Leica VT1000 a partir de ratones C57BL/6 de 14 días. Composición de la solución de corte (en mM): 27 NaHCO₃, 1.5 NaH₂PO₄, 222 Sacarosa, 2.6 KCl, 3 MgSO₄ y 0.5 CaCl₂. Las rodajas fueron incubadas a 32 °C por 30 minutos y luego mantenidas a temperatura ambiente por lo menos 30 minutos antes de ser transferidas a la cámara de registro, bañada en fluido cerebro-espinal artificial (*ACSF* en inglés) a pH 7,4, temperatura ambiente y saturado con 95% O₂ y 5% CO₂. Composición del *ACSF* (en mM): 126 NaCl, 3 KCl, 2 MgSO₄, 2 CaCl₂, 1.1 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃ y 10 dextrosa. Salvo en los registros de fijación de corriente se agregó 2 μ M TTX, 10 μ M NBQX y 20 μ M APV. Se utilizaron electrodos de célula entera (*whole cell*) de 5 a 7 M Ω . Todos los registros de fijación de voltaje, exceptuando el de la Figura 3.26

fueron realizados con solución intracelular de pH 7,25 y (en mM): 115 Cs-metanosulfonato, 20 CsCl, 10 HEPES, 2.5 MgCl₂, 4 Na₂-ATP, 0.4 Na-GTP, 10 Na₂-fosfocreatina, 0.6 EGTA, y 0.1 Alexa Fluor 594. El registro de la Figura 3.26 fue hecho con solución intracelular de pH 7,25 y (en mM): 135 K-methylsulfate, 10 KCl, 10 HEPES, 5 NaCl, 2.5 Mg-ATP, 0.3 Na-GTP, and 0.1 Alexa Fluor 594. Salvo indicación en contrario, los registros de fijación de voltaje se hicieron manteniendo el potencial de membrana en 0 mV. Para los registros de fijación de corriente no se agregaron drogas al ACSF, y se utilizó solución intracelular de pH 7,25 y (en mM): 128 K-metilsulfato, 10 HEPES, 4 MgCl₂, 4 Na-ATP, 0.4 Na-GTP, 10 Na-fosfocreatina, 3 ácido ascórbico y 0.1 Alexa Fluor 594.

Se realizaron registros de neuronas piramidales de capa 2/3 utilizando amplificadores Multiclamp 700B (Molecular Devices). Las señales fueron adquiridas a través de una placa Nacional Instruments PCI 6259 con software Matlab y C++ programado a medida. Todos los análisis se hicieron con *software* basado en Matlab.

2.5 Desenjaulado de GABA en rodajas

Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio de barrido láser de dos fotones construido a medida en base al sistema Olympus FV-500 (FV-500 montado junto a un microscopio BX50WI con un objetivo de inmersión 60x y 0.9AN) y un láser Ti:safiro (Chameleon Ultra, Coherent). La fluorescencia fue detectada desde arriba con un PMT Hamamatsu H7422-P40 conectado a un preamplificador Hamamatsu C7319 y un amplificador Hamamatsu 5113, cuya salida fue conectada al sistema Fluoview.

Para los experimentos de un fotón, [Ru(bpy)₂PPh₃GABA]PF₆ fue agregado al baño en una concentración de 50μM. Los mIPSCs fueron registrados a 0 mV con

solución intracelular de Cs^+ . Los mIPSCs evocados por sacarosa fueron registrados durante los 2 s posteriores a la aplicación de un *puff* de sacarosa 1M de 50 ms realizado con una pipeta colocada en la superficie de la rebanada, a $20\mu\text{m}$ del soma. Para los experimentos de dos fotones, el compuesto se aplicó localmente a través de una pipeta de vidrio ($0,5\text{-}3\text{ m}\Omega$, $3\text{-}4\text{ mm}$ de diámetro, $0,2\text{-}1\text{ psi}$) cargada con una solución $1,6\text{ mM}$ en *ACSF*. La pipeta de aplicación fue posicionada en la superficie de la rodaja, a $10 - 20\ \mu\text{m}$ de distancia del soma de la neurona diana.

La fuente de luz para el desenjaulado por dos fotones fue el láser Ti:Sa, mientras que para el desenjalulado por un fotón se utilizó un láser DPSS de 473 nm (BLM-300 con modulación analógica, Extreme Lasers). Las imágenes del soma fueron adquiridas con el *software* Fluoview 5 en el modo de barrido XY y zoom digital de 9x o 10x. Se utilizó luz de excitación de 950 nm para evitar la liberación de GABA. Un punto de desenjaulado perisomático fue seleccionado con el modo de barrido puntual. El *software* de electrofisiología gatilló los barridos puntuales con pulsos de 5V por medio del modulo TIEMPO del Fluoview. Para la liberación por dos fotones, la duración del pulso de láser fue controlada desde el *software* de electrofisiología mediante pulsos de voltaje enviados a una celda Pockel's cell (controlador Conoptics 275 y modulador 350-160 E. O.) a través de electrónica a medida. Para la liberación por un fotón la duración del pulso fue controlada desde el *software* de electrofisiología mediante pulsos de voltaje enviados a un circuito hecho a medida conectado a la fuente de alimentación del láser azul. La automatización de los ensayos fue dirigida por el *software* de electrofisiología a través del Procesador de Protocolos de Fluoview, con un intervalo inter-ensayo de 5 segundos.

Como el compuesto enjaulado es sensible a la luz, todos los experimentos se realizaron en condiciones de iluminación mínima. Los monitores fueron cubiertos con dos capas de filtros rojos Rosco #27. Para establecer el acceso a las células, se sometió el preparado a una iluminación oblicua con un filtro pasa-banda IR sobre el diafragma de campo del microscopio. La visualización se hizo con una cámara CCD (Supercircuits PC34C) conectada a un monitor blanco y negro Sony PVM-137. Todos los experimentos se hicieron a temperatura ambiente (22-25 °C).

Capítulo 3 Resultados

3.1 Compuestos enjaulados de tipo $[Ru(bpy)_2(RNH_2)_2]^{n+}$

Se sintetizaron los compuestos $[Ru(bpy)_2(Tir)_2]^{2+}$, $[Ru(bpy)_2(Trip)_2]^{2+}$ y $[Ru(bpy)_2(5HT)_2]^{2+}$ y $Ru(bpy)_2(GABA)_2$. La identidad de los productos fue verificada por espectroscopía 1H RMN, registrando en cada caso el espectro correspondiente a los ligandos libres. Todas las señales presentes en los espectros de RMN de los compuestos sintetizados tienen su contrapartida en las señales de los complejos de partida y cada uno de los ligandos libres. La ausencia de señales nuevas no asignables permite afirmar que las reacciones de síntesis no generan productos secundarios o que se degrade la naturaleza de los ligandos biológicos.

La Figura 3.5 corresponde a los espectros 1H RMN de Tiramina libre y el complejo $[Ru(bpy)_2(Tir)_2]^{2+}$, realizados en agua deuterada. En el espectro del ligando libre se observan las señales provenientes del anillo aromático y la de los metilenos **B** y **C**. La señal perteneciente al alcohol fenólico no se observa debido a que el protón es intercambiado por deuterio. En el espectro del compuesto de coordinación, la región aromática contiene las señales de las bipyridinas y las de los protones aromáticos de la Tiramina. La presencia 4 tripletes y 4 dobletes asignables a las bipyridinas indica que ambas son químicamente equivalentes confirmando que se trata de un complejo de tipo $[Ru(bpy)_2(L)_2]^{2+}$.

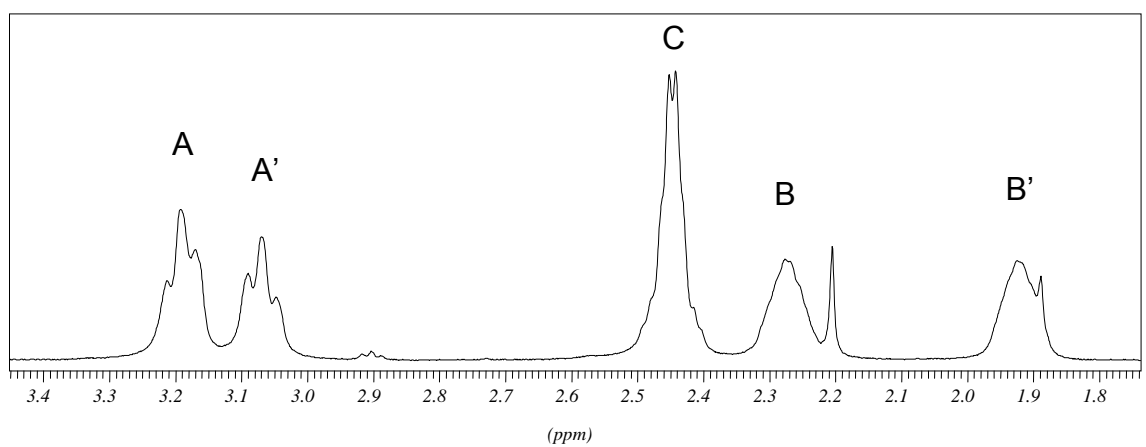
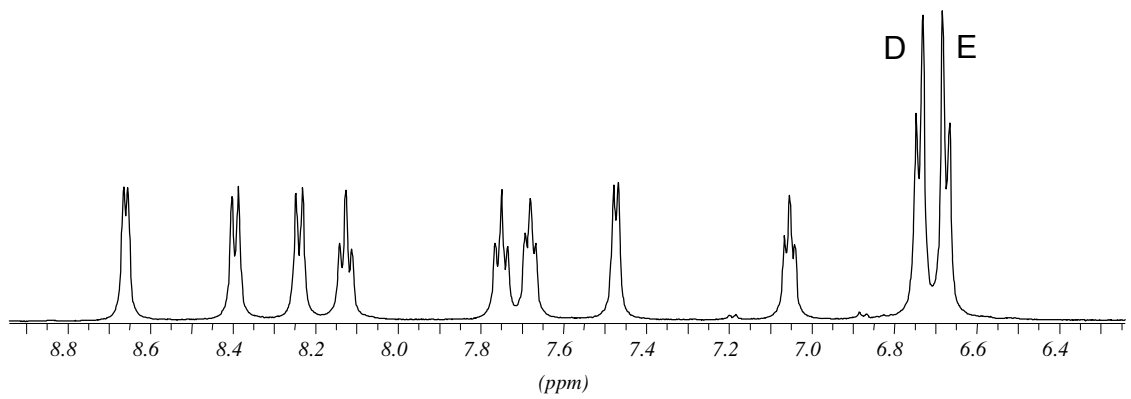
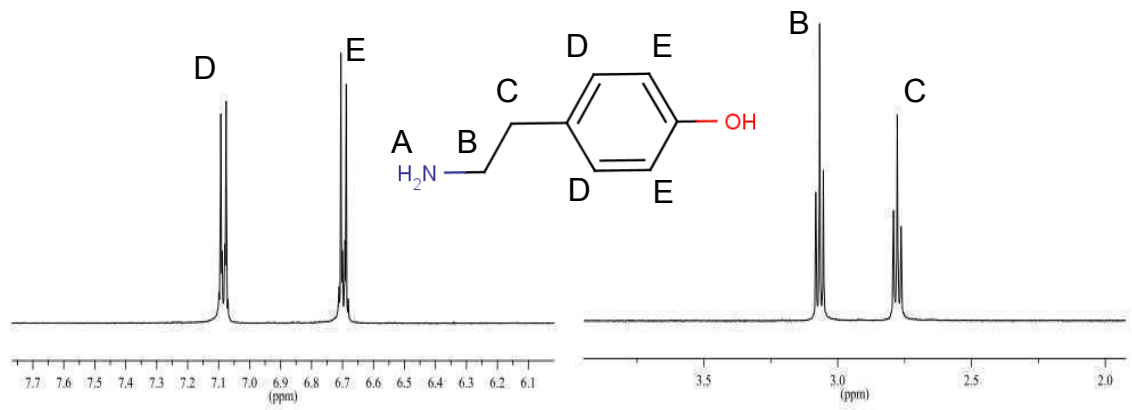


Figura 3.1 Espectro de ¹H RMN de tiramina y [Ru(bpy)₂(Tir)₂]²⁺ en D₂O

En la región alifática aparecen las señales correspondientes a Tiramina coordinada al rutenio. Se observa la aparición de dos señales nuevas, ausentes en el espectro del ligando libre, la manifestación de un desdoblamiento de señales provenientes de protones que en la Tiramina libre son equivalentes y un corrimiento a campos más altos para todas las señales. Las dos señales nuevas son asignadas a los protones **A** del grupo amino. La aparición de estas señales sugiere que la coordinación ocurre a través del grupo amino, ya que una vez coordinado el mismo compromete su par libre de electrones de tal manera que deja estar disponible para la protonación, impidiendo el intercambio por deuterios provenientes del solvente. Si la síntesis se realiza directamente en agua deuterada, el intercambio ocurre con anterioridad a la coordinación, por lo que las señales correspondientes al grupo amino no aparecen en el espectro. La región alifática del espectro de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(5\text{HT})_2]^{2+}$ sintetizado en agua deuterada dentro del tubo de RMN se muestra en la Figura 3.2. Los tripletes a 3.15 y 3.35 corresponden a los metilenos **B** y **C** de un exceso de serotonina no coordinada.

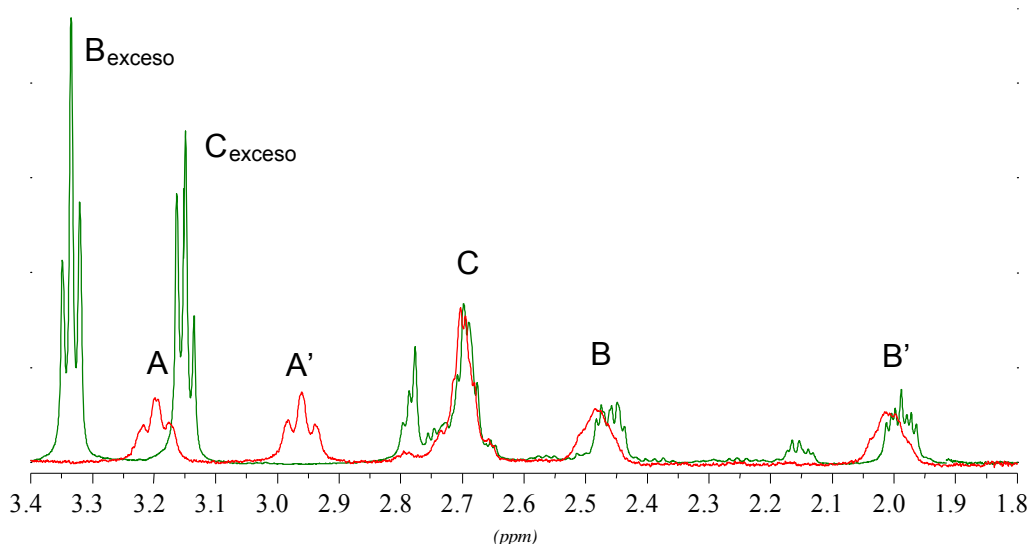


Figura 3.2 Región alifática de los espectros de ^1H RMN en D_2O del compuesto $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(5\text{HT})_2]^{2+}$ sintetizado en H_2O (trazo rojo) o en D_2O (trazo verde)

El fenómeno de desdoblamiento se adjudica a la restricción que impone la coordinación al movimiento de los protones. Es de esperar que la magnitud este efecto disminuya a medida que aumenta la distancia hacia el rutenio. En el complejo, la señal que presenta un desdoblamiento mayor corresponde al metileno **B**, más cercano a la unión de coordinación, mientras que la señal restante pertenece al metileno **C**. Además, al producirse la coordinación se produce una alteración de las propiedades del entorno químico de los ligandos, provocada por la influencia del centro metálico. En este caso, se observa que las señales de la Tiramina coordinada sufren un desplazamiento hacia campos más altos en comparación con la posición de las señales de Tiramina libre, evidenciando un mayor grado de apantallamiento producto de la coordinación.

La Figura 3.3 y la Figura 3.4 corresponden respectivamente a los espectros ^1H RMN de los complejos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Trip})_2]^{2+}$ y $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(5\text{HT})_2]^{2+}$. En el espectro de la Triptamina libre se observa la señal correspondiente a la amina primaria debido a que el mismo fue realizado en acetona. La señal de la amina secundaria aparece alrededor de 10 ppm y no se muestra por claridad. El espectro de la serotonina libre, en cambio, fue realizado en agua, por lo que no se observan las señales de los protones intercambiables. Las asignaciones del resto de las señales en estos complejos se realizaron según las mismas interpretaciones establecidas para $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Tir})_2]^{2+}$.

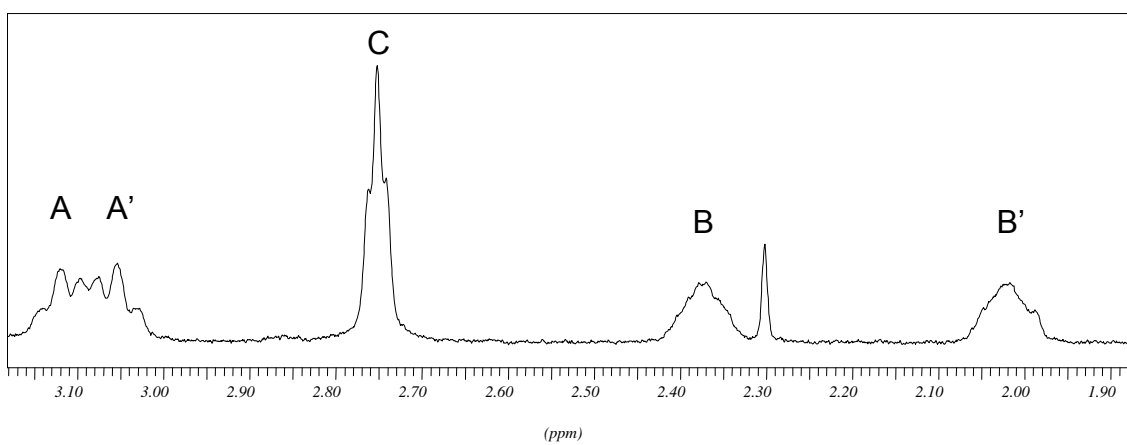
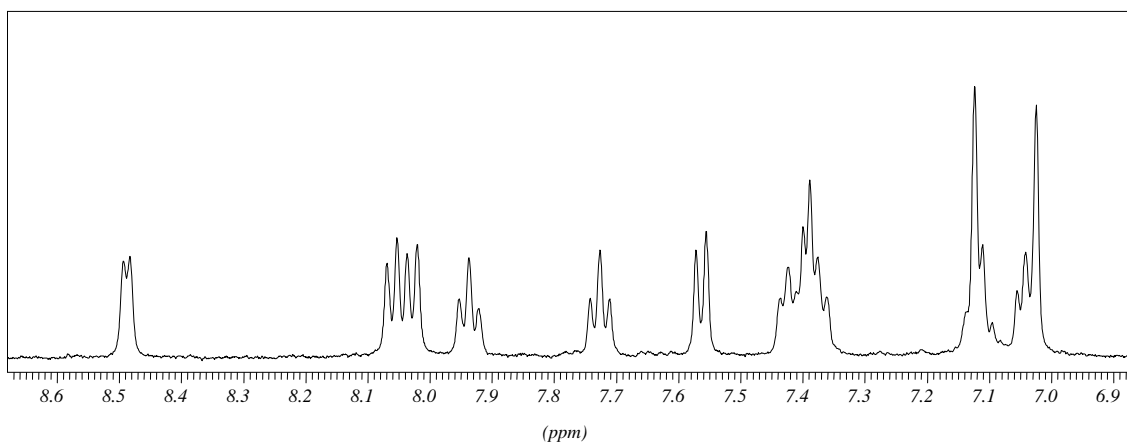
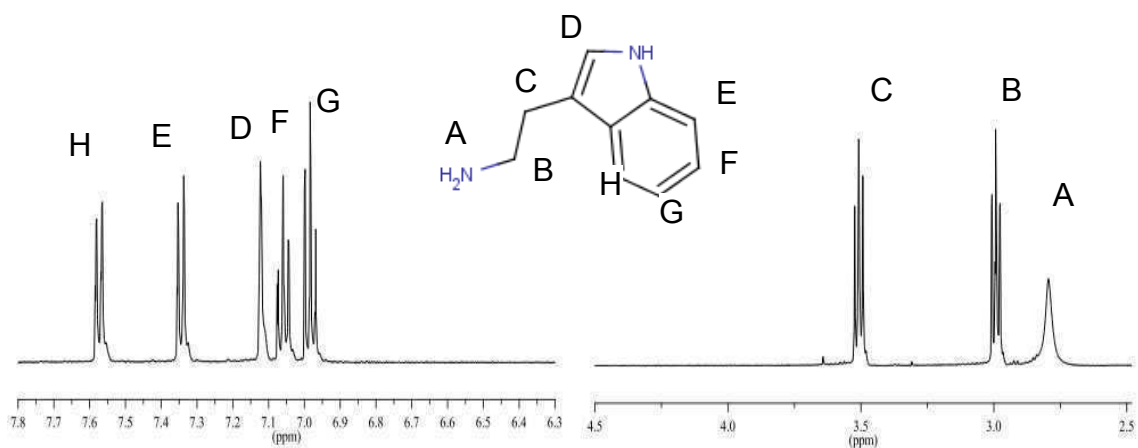


Figura 3.3 Espectro de ¹H RMN de triptamina en acetona-d⁶ y [Ru(bpy)₂(Trip)₂]²⁺ en D₂O

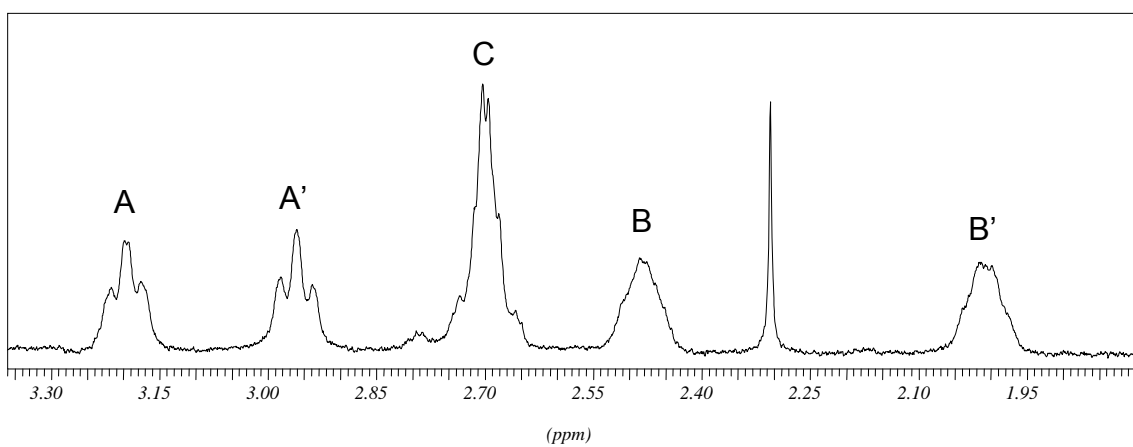
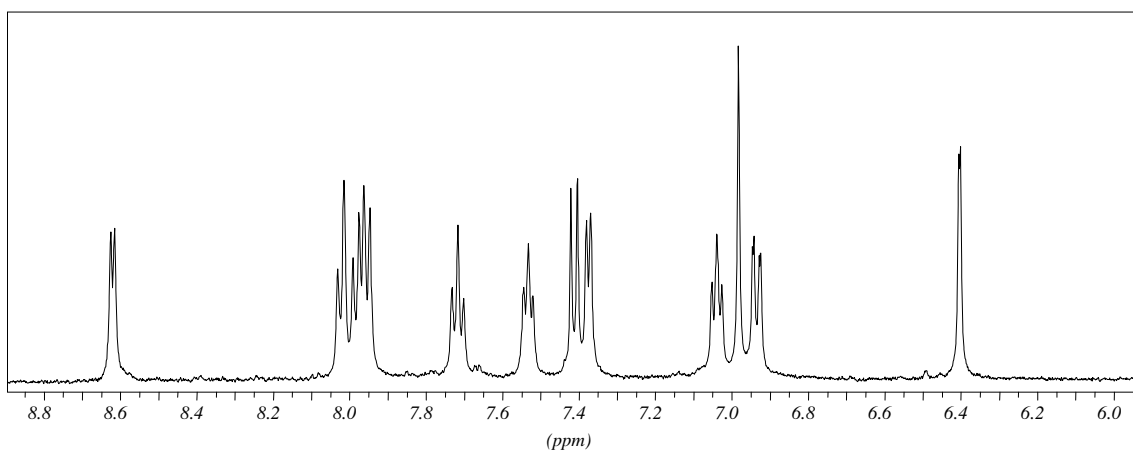
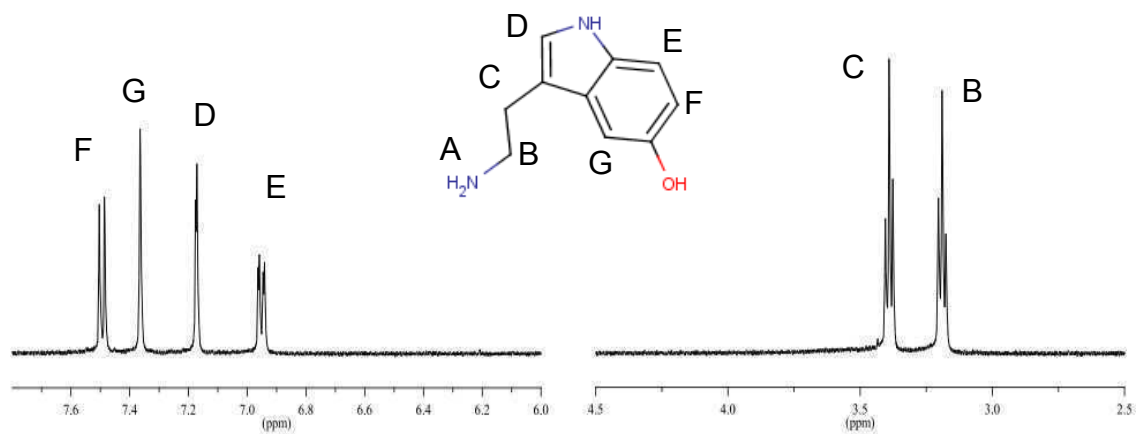


Figura 3.4 Espectro de ¹H RMN de [Ru(bpy)₂(5HT)₂]²⁺ en D₂O

El complejo $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{GABA})_2$ presenta algunas diferencias con respecto a los anteriores, y es por este motivo que sus propiedades se describen por separado. La Figura 3.5 contiene los espectros ^1H RMN de GABA libre y del compuesto de coordinación. Para la molécula de GABA libre se observan las señales correspondientes a cada uno de sus tres metilenos. Los protones pertenecientes al grupo amino no se observan debido a que se intercambian por deuterios que provienen del solvente.

En el espectro del compuesto de coordinación, la región aromática contiene únicamente las 8 señales de las bipyridinas. En la región alifática, y a diferencia de lo que ocurre con el resto de los complejos, las señales del grupo amino no aparecen. Si bien esto podría deberse a que la coordinación ocurre a través del grupo carboxilo, esta posibilidad fue descartada debido a que en las mismas condiciones de síntesis complejos de ácido butanoico u otros ácidos carboxílicos fueron imposibles de obtener. La ausencia de las señales del grupo amino es atribuible entonces a la existencia de un equilibrio entre la forma coordinada y el GABA libre, del que puede ser responsable la repulsión entre los grupos carboxilos. La salida temporaria del GABA del enlace coordinado podría aumentar el grado de disponibilidad del par de electrones libre para la protonación.

El grado de desdoblamiento que muestran las señales alifáticas permite completar la asignación. La señal de mayor desdoblamiento corresponde al metileno **B**, más cercano al lugar de la unión. La señal con desdoblamiento intermedio pertenece al metileno **C**, y la señal que no presenta desdoblamiento corresponde al metileno más lejano **D**.

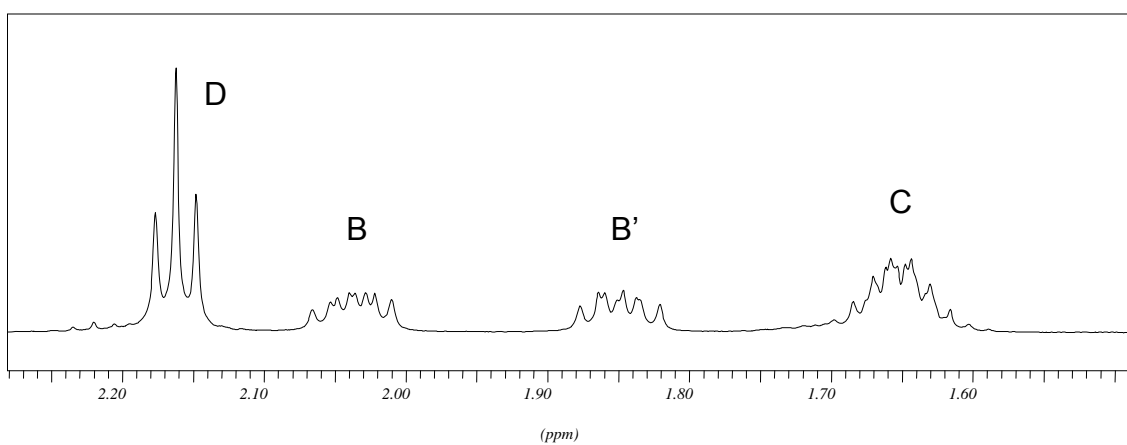
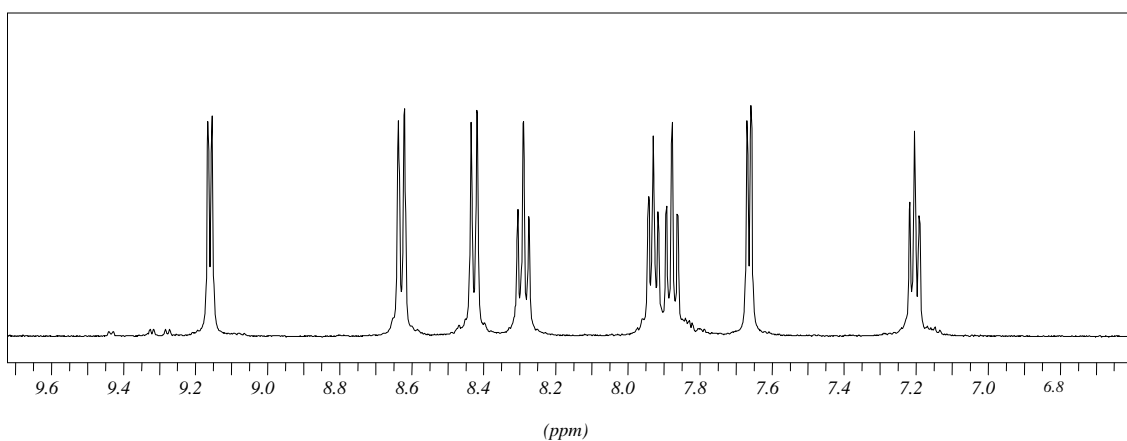
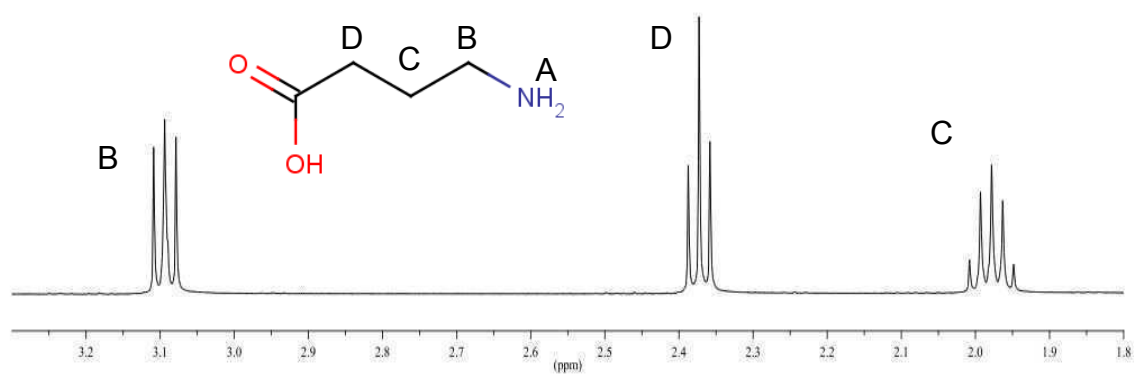


Figura 3.5 Espectro de ¹H RMN de GABA y Ru(bpy)₂(GABA)₂ en D₂O

Los resultados de los experimentos de fotólisis realizados sobre los tubos de RMN muestran que los únicos productos de fotorreacción son el compuesto monosustituído y el ligando monodentado libre, en relación 1:1, sin que se detecte la aparición de productos secundarios. A continuación se muestra un experimento de fotólisis parcial para el compuesto $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Tir})_2]^{2+}$ en el que se tomaron espectros antes, inmediatamente después y 30 minutos después de ocurrida la fotorreacción.

La región aromática se muestra en la Figura 3.6. Allí se observa que la fotólisis provoca que a las 8 señales aromáticas correspondientes a los protones bipyridínicos se agreguen dos nuevos juegos de señales de distinta intensidad. El juego de señales de mayor intensidad perdura en el tiempo y es atribuible a las 16 señales correspondientes al producto monosustituído asimétrico *cis*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Tir})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$. El juego de señales de menor intensidad desaparece a los 30 minutos de ocurrida la reacción, indicando que su origen corresponde un producto térmicamente inestable, probablemente *trans*- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Tir})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$.

La Figura 3.7 corresponde a la región alifática para el mismo experimento de fotólisis parcial. Junto con la disminución en la intensidad de las señales del compuesto bisustituído, en el espectro intermedio se observa la aparición de las señales correspondientes al compuesto monosustituído y también las del ligando libre. Luego de 30 minutos se observa la desaparición de las señales de los protones del grupo amino en el compuesto $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Tir})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$. Esto muestra que el compuesto monosustituído es susceptible de sufrir el intercambio de los protones del grupo amino por deuterios, mientras que el bisustituído no lo es, al menos en el lapso de tiempo observado.

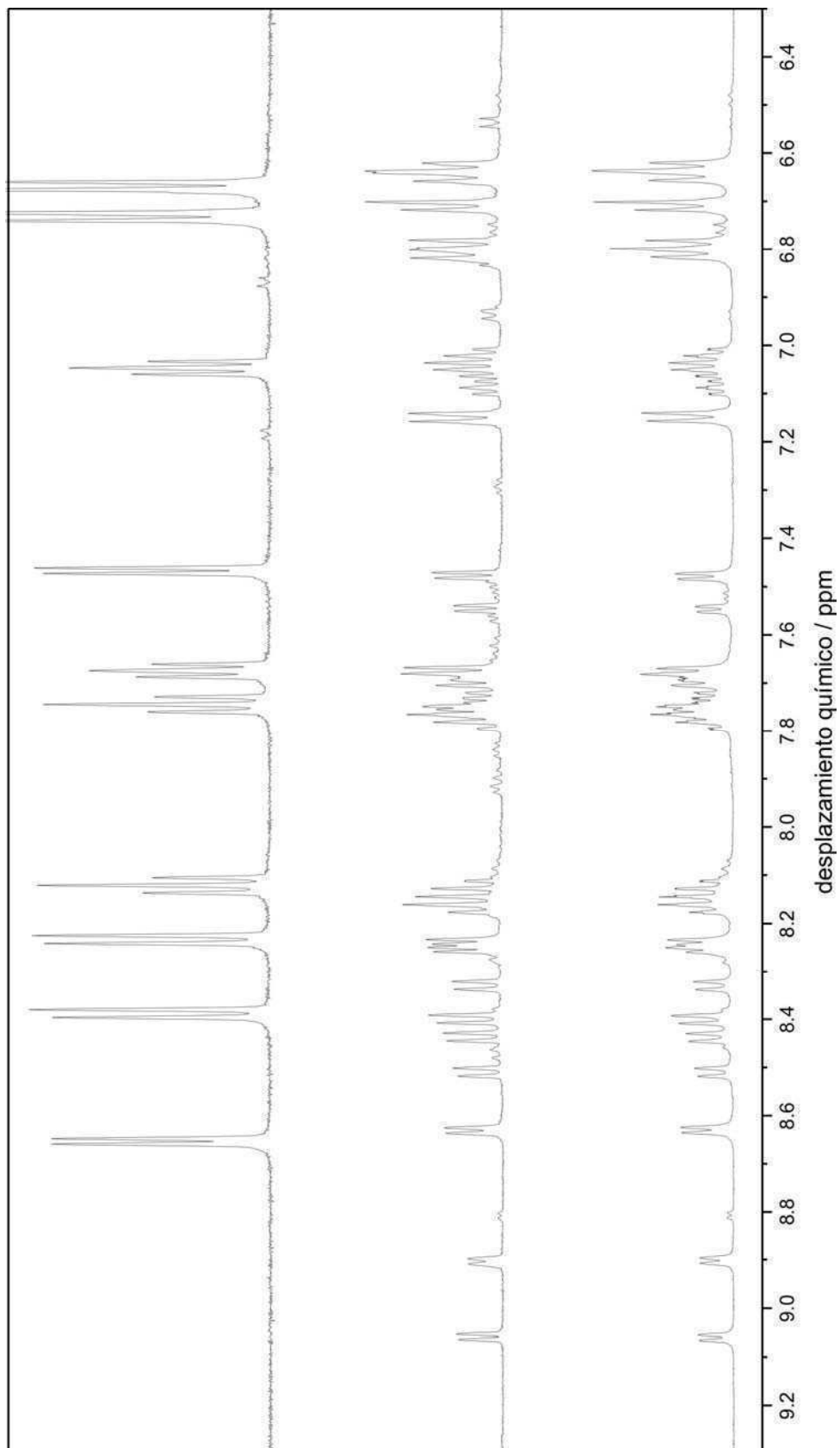


Figura 3.6 Región aromática de espectros de ¹H RMN para fotólisis parcial de [Ru(bpy)₂(Tir)₂]²⁺. Se observan el compuesto de partida (trazo superior) y los productos medidos inmediatamente (trazo intermedio) o 30 minutos después (trazo inferior) de la fotólisis.

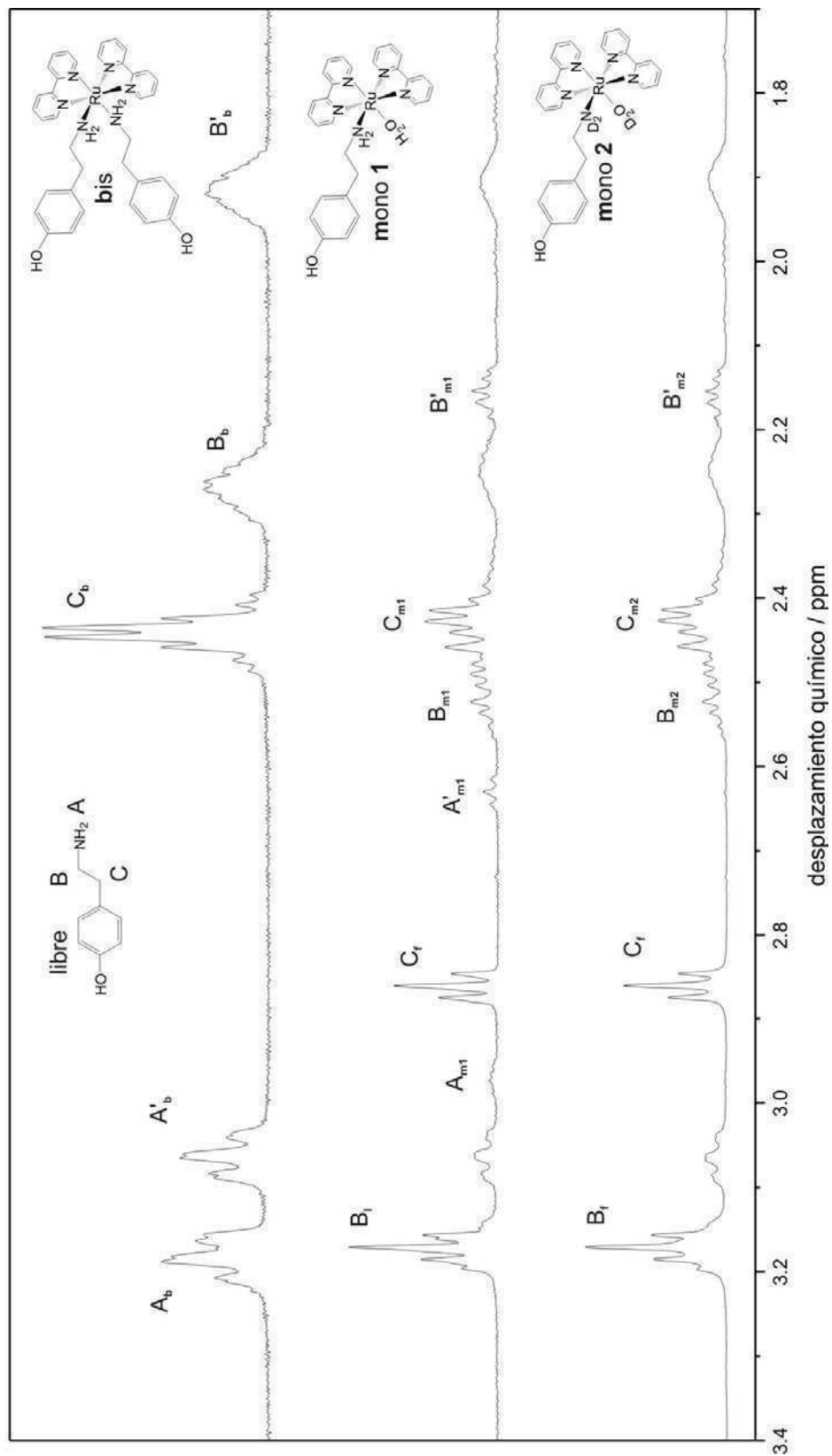


Figura 3.7 Región alifática de espectros de ^1H RMN para un experimento de fotólisis de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Tir})_2]^{2+}$. En la figura se observan el compuesto de partida (trazo superior) y los productos de la reacción medidos inmediatamente (trazo intermedio) o 30 minutos después (trazo inferior) de ocurrida la fotólisis.

El comportamiento electroquímico de los compuestos sintetizados fue estudiado mediante voltametría cíclica. Se obtuvieron los potenciales de óxido-reducción para la cupla $\text{Ru}^{+2}/\text{Ru}^{3+}$, que coincidieron con los esperados para compuestos de este tipo.^[59, 60] Las distintas bandas de oxidación corresponden a formas del complejo que sufren la oxidación del grupo amino a imina o nitrilo.^[61] Los resultados se muestran en la Figura 3.8 y son resumidos en la Tabla 3-1. La escasa reversibilidad puede deberse a las oxidaciones de los ligandos que impiden a los electrones regresar al electrodo.

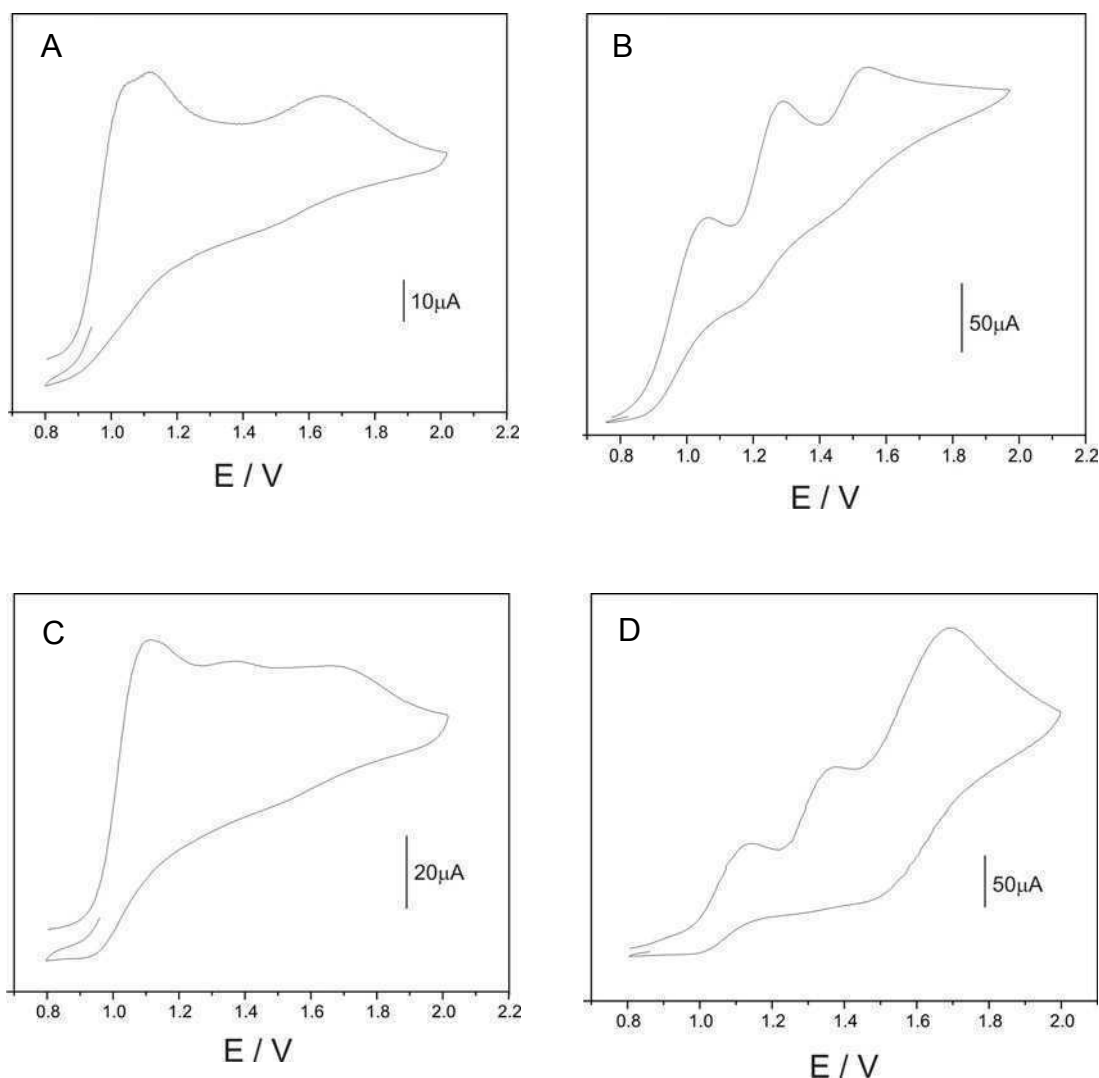


Figura 3.8 Voltagramas realizados a los compuestos (A) $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Tir})_2](\text{PF}_6)_2$, (B) $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Trip})_2](\text{PF}_6)_2$, (C) $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(5\text{HT})_2](\text{PF}_6)_2$ y (D) $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{GABAH})_2](\text{PF}_6)_2$ Soluciones en CH_3CN con TBAPF_6 100mM a 298 K. Valores vs. SSCE. $dE/dt = 100 \text{ mV/s}$.

Tabla 3-1. Potenciales de óxido-reducción para los compuestos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{RNH}_2)_2]^{n+}$.

	$E_{1/2} / \text{V}^a$		
	1 ^{era}	2 ^{da}	3 ^{era}
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Tir})_2]^{2+}$	1.10	1.38p	1.69p
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{GABA})_2]^{2+}$	1.06p	1.25	1.55p
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Trip})_2]^{2+}$	1.11p	1.36p	1.67p
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{5HT})_2]^{2+}$	1.03p	1.11p	1.64p

^a Soluciones en CH_3CN con TBAPF_6 100mM a 298 K. Valores vs. SSCE. $dE/dt = 100 \text{ mV/s}$. Cuando la reversibilidad es pobre, se reportan potenciales pico (p).

Los estudios de las propiedades de emisión mostraron que los compuestos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}_2]^{2+}$ presentan fluorescencia, aunque débil. Los compuestos monosustituídos, en cambio no mostraron fluorescencia alguna, sugiriendo que el estado MLCT decae completamente de forma no radiativa, posiblemente por medio de vibraciones acopladas a solvente a través del ligando acuo. La Figura 3.9 muestra el cambio en la fluorescencia de una solución de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Tir})_2]^{2+}$ a medida que progresa la fotólisis.

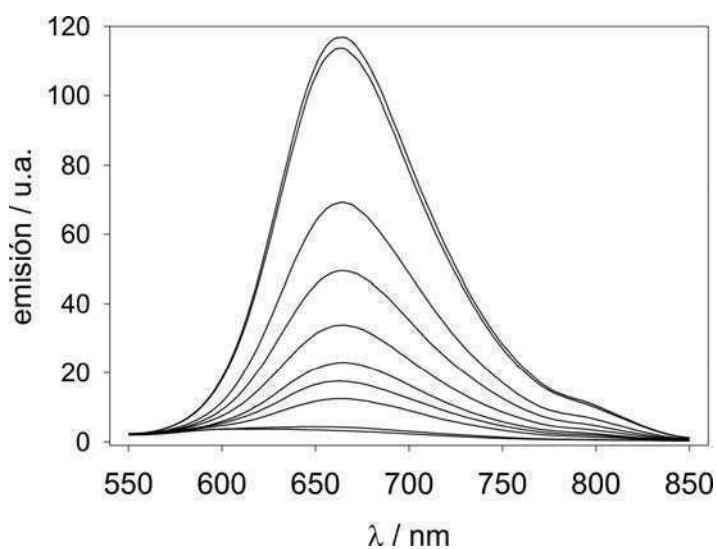


Figura 3.9 Fluorescencia de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Tir})_2]^{2+}$ en agua a pH 7 a diferentes tiempos de irradiación. Excitación a 450 nm.

Los espectros de absorción y emisión en solución acuosa de cada complejo se muestran en la Figura 3.10. Los parámetros de emisión fueron volcados a la Tabla 3-2.

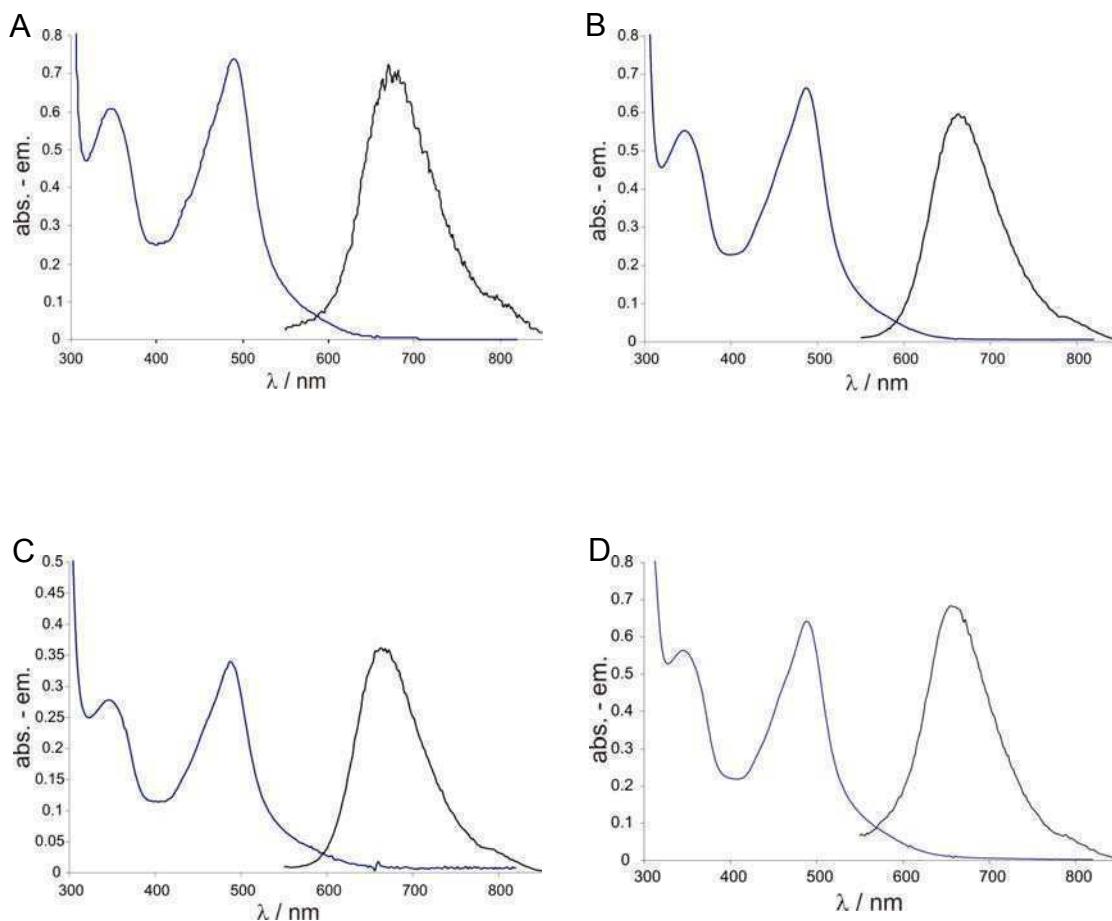


Figura 3.10 Espectros de absorción (trazo negro) y emisión (trazo azul) de $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{GABA})_2$ (A), $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Tir})_2]^{2+}$ (B), $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Trip})_2]^{2+}$ (C) y $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(5\text{HT})_2]^{2+}$ (D).

Tabla 3-2. Longitudes de onda de absorción, emisión y eficiencia cuántica de emisión en agua a 293K para compuestos de tipo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{RNH}_2)_2]^{2+}$

	$\lambda_{\text{MLCT}} / \text{nm}$	$\lambda_{\text{em}} / \text{nm}$	ϕ_{em}
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Tir})_2]^{2+}$	488	664	1.9×10^{-3}
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Trip})_2]^{2+}$	488	666	1.8×10^{-3}

$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(5\text{HT})_2]^{2+}$	488	662	1.7×10^{-3}
$\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{GABA})_2$	488	674	1.5×10^{-3}

Para determinar la eficiencia cuántica de fotoliberación de los ligandos en solución acuosa se registraron series de espectros de absorción UV-visible de cada uno de los complejos bajo irradiación continua en cubeta a 450 nm. Los espectros de absorción de los compuestos sintetizados mostraron que la banda MLCT se ubica en los 488 nm. La existencia de puntos isobésticos en los espectros de irradiación muestra que los compuestos monosustituídos no sufren descomposición. Los espectros finales de los complejos bis y mono sustituidos son casi idénticos en solución acuosa a pH neutro debido a la similitud como ligandos del RNH_2 y H_2O . Si se aumenta el pH de la solución, el acuo-complejo pierde un protón y se convierte en $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L})(\text{OH})]^+$. Esta especie presenta un espectro corrido al rojo que es más fácilmente diferenciable del compuesto bisustituído.

Mientras que la Figura 3.12 muestra la colección de espectros obtenida para $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Tir})_2]^{2+}$ a pH 7, la Figura 3.13 lo hace para la fotólisis a pH 12. Los recuadros muestran las curvas de fotoconversión obtenidas en cada caso.

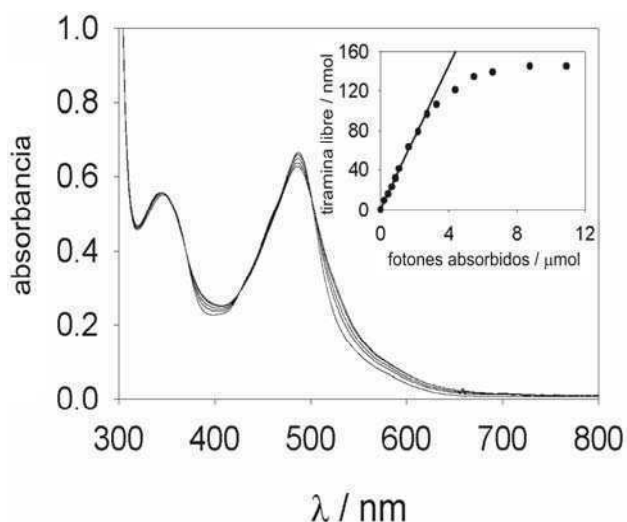


Figura 3.11 Series de espectros de absorción para la fotólisis de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Tir})_2]^{2+}$ a pH 7. El recuadro muestra el grado de fotoconversión.

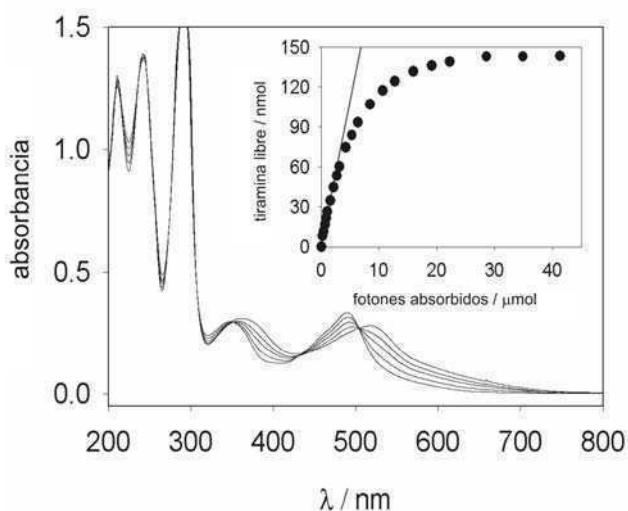


Figura 3.12 Series de espectros de absorción para la fotólisis de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Tir})_2]^{2+}$ a pH 12. El recuadro muestra el grado de fotoconversión.

Los parámetros de absorción y eficiencia cuántica de fotoliberación para cada uno de los compuestos figuran en la Tabla 3-3. La similitud en los valores es consistente con el hecho de que todos los complejos presentan los mismos grupos en sus esferas de coordinación, con máximos de absorción para la banda MLCT y cuplas $\text{Ru}^{2+}/\text{Ru}^{3+}$ similares. El rendimiento cuántico de fotoliberación es levemente dependiente del pH.

Tabla 3-3. Longitudes de onda de absorción, coeficientes de absorptividad molar y de eficiencia cuántica de fotoliberación para compuestos de tipo $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{RNH}_2)_2]^{n+}$ en H_2O a 293 K.

	λ_{MLCT}	$\epsilon_{\text{máx}} / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$\phi_{\text{lib}} \text{ pH } 7$	$\phi_{\text{lib}} \text{ pH } 12$
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Tir})_2]^{2+}$	488	8940	0.028	0.016
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Trip})_2]^{2+}$	488	9720	0.018	0.016
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(5\text{HT})_2]^{2+}$	488	9880	0.023	sd
$\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{GABA})_2$	488	8955	0.036	0.032

3.2 Compuestos enjaulados de tipo $[Ru(bpy)_2PPh_3RNH_2]^{n+}$

En la Figura 3.13 se reproduce el espectro de 1H RMN del compuesto $[Ru(bpy)_2PPh_3GABA]^+$. A diferencia de los compuestos anteriores, la presencia de la trifenilfosfina como ligando rompe la simetría del complejo y hace que los protones de ambas bipiridinas se diferencien. Así, en la región aromática del espectro aparecen 16 señales de bipiridina en lugar de las 8 que aparecían en los complejos de tipo $[Ru(bpy)_2L_2]^{2+}$. Además, aparecen señales adicionales originadas en los grupos fenilo de la trifenilfosfina. En la región alifática se distinguen las señales características del GABA coordinado, observándose en este caso y a diferencia de lo que sucedía con el compuesto bisustituído, las señales de los protones del grupo amino.

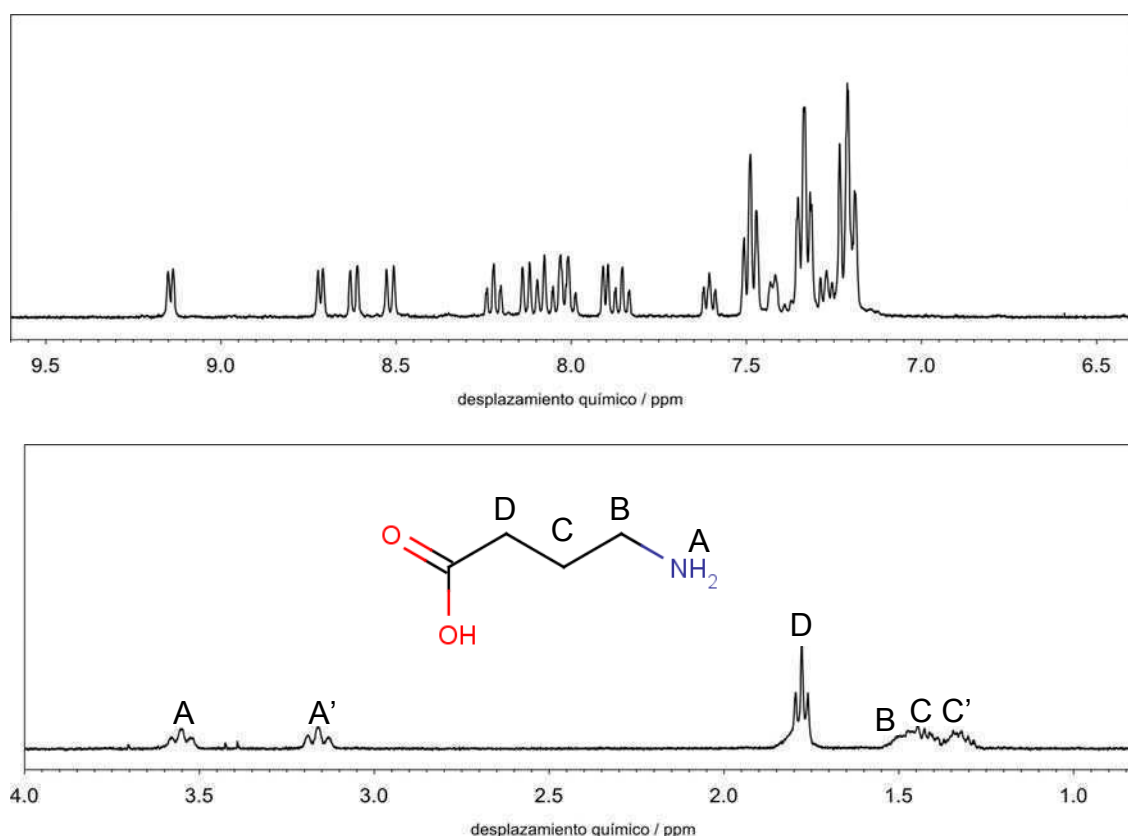


Figura 3.13 Espectro 1H RMN de $[Ru(bpy)_2PPh_3GABA]^+$ en D_2O .

El hecho de que aparezcan estas señales hace suponer que la unión GABA-Ru es más estable en este complejo que en $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{GABA})_2]$, posiblemente debido a que el fuerte carácter π aceptor de la PPh_3 genera una deficiencia electrónica sobre el metal que es compensada por el par libre del grupo amino coordinado. Una vez obtenido el espectro de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$, se realizó un experimento de fotólisis parcial dentro del tubo de RMN para registrar el espectro correspondiente a los productos de la fotorreacción. Por último se adicionó GABA al tubo y se obtuvo un nuevo espectro. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 3.14.

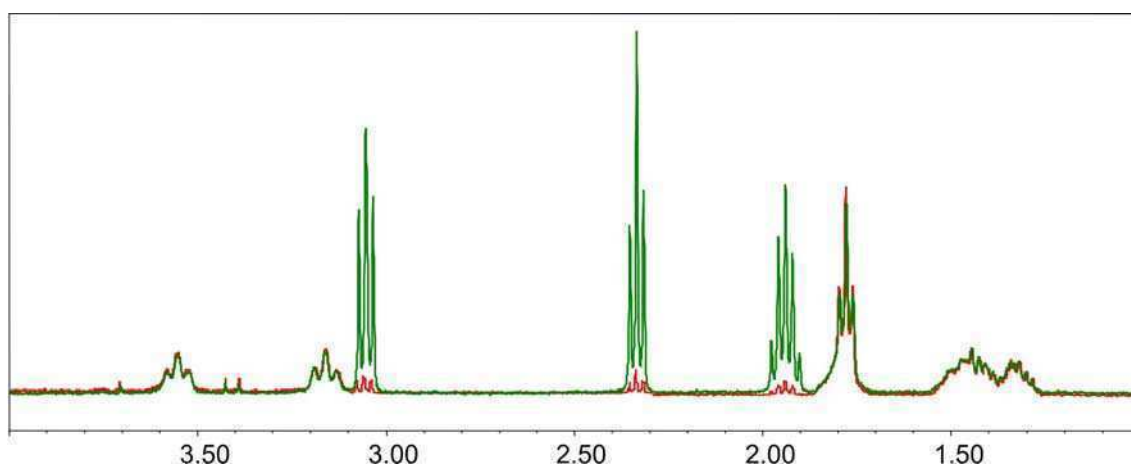


Figura 3.14 Espectros ^1H RMN en D_2O correspondientes a la fotólisis parcial de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ (trazo rojo) y al agregado de GABA (trazo verde).

Utilizando la misma estrategia de fotólisis dentro del tubo de RMN se sometió una solución de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ a pasos consecutivos de medición-irradiación hasta lograr la conversión completa en $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{H}_2\text{O}]^{2+}$. Los resultados de este experimento constan en la Figura 3.15. En la región alifática se observa la desaparición progresiva de las señales de GABA coordinado y la aparición concomitante de las señales de GABA libre. La región aromática muestra la aparición de las señales correspondientes a $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{H}_2\text{O}]^{2+}$.

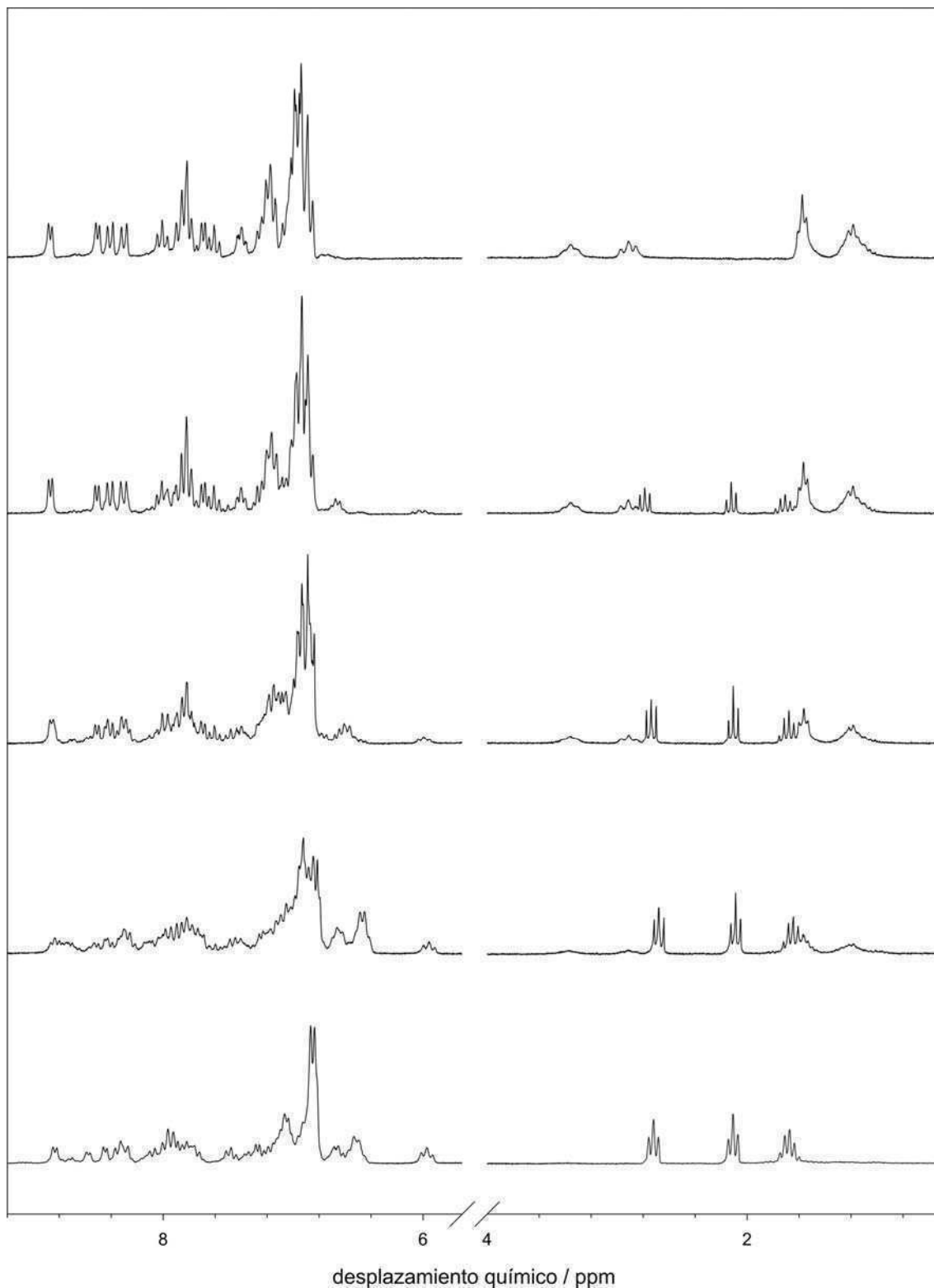


Figura 3.15 Espectros de ^1H RMN 200 en D_2O correspondientes a un experimento de fotólisis exhaustiva de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$. En el trazo superior, todo el GABA se encuentra coordinado al Ru^{2+} , mientras que el trazo inferior se encuentra libre en su totalidad.

Se realizó una voltametría cíclica para conocer el valor de la cupla $\text{Ru}^{+2}/\text{Ru}^{3+}$. Al igual que con los compuestos bisustituídos, el voltagrama mostró tres picos de oxidación de escasa reversibilidad, como se ve en la Figura 3.16. El primer pico corresponde a la oxidación del rutenio coordinado a GABA. Los picos subsiguientes se atribuyen a compuestos que contienen los productos de la oxidación de la unión N-C en el grupo amino. Nuevamente, estas oxidaciones en los ligandos explican la escasa reversibilidad obtenida. Los valores de las ondas de oxidación fueron volcados en la Tabla 3-4.

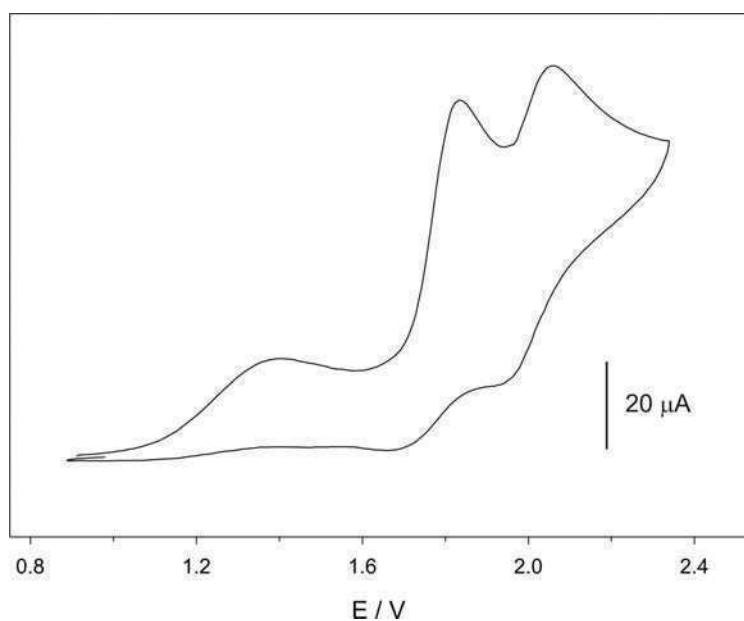


Figura 3.16 Voltagrama del compuesto $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$. Solución en CH_3CN con TBAPF_6 100mM a 298 K. Valores vs. SSCE. $dE/dt = 200 \text{ mV/s}$.

Tabla 3-4. Potenciales de óxido-reducción para $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$. Solución en CH_3CN con TBAPF_6 100mM a 298 K. Valores vs. SSCE. $dE/dt = 200 \text{ mV/s}$. Se reportan potenciales pico.

	E_p / V		
	1 ^{era}	2 ^{da}	3 ^{era}
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$	1.41	1.83	2.06

La eficiencia cuántica de fotoliberación para $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ se obtuvo del mismo modo que para los compuestos de tipo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}_2]^{2+}$. Los resultados obtenidos a pH 7 y 12 se muestran respectivamente en la Figura 3.17 y la Figura 3.18.

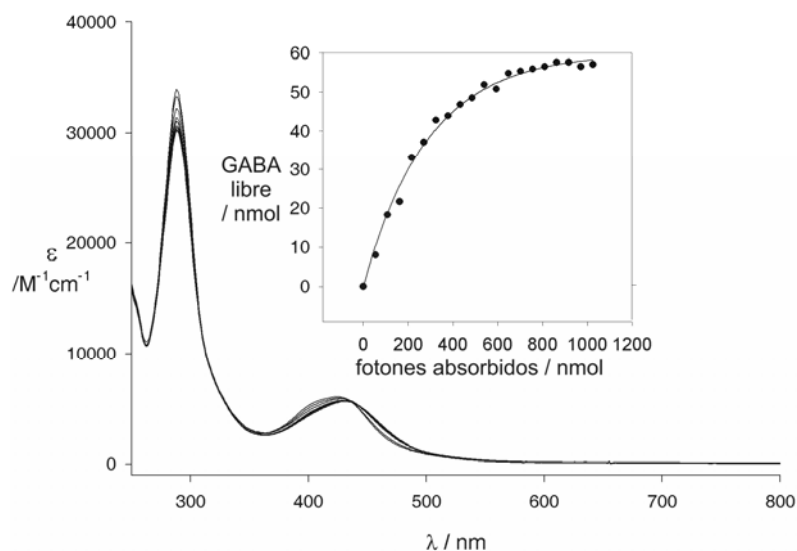


Figura 3.17 Series de espectros de absorción para la fotólisis de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ a pH 12. El recuadro muestra el grado de fotoconversión.

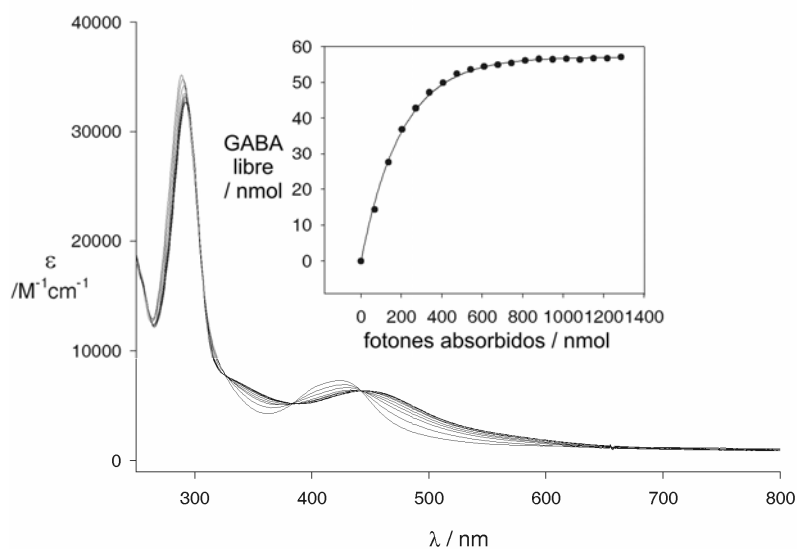


Figura 3.18 Series de espectros de absorción para la fotólisis de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ a pH 12. El recuadro muestra el grado de fotoconversión.

Los parámetros de absorción y eficiencia cuántica de fotoliberación para $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ fueron dispuestos en la Tabla 3-5. El corrimiento de la banda de absorción MLCT a menores longitudes de onda es consistente con el mayor carácter π aceptor de la trifenilfosfina con respecto a la segunda amina presente en los compuestos de tipo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{RNH}_2)_2]^{n+}$. Este desplazamiento se ve acompañado de un incremento en la eficiencia cuántica de fotoliberación.

Tabla 3-5. Longitud de onda de absorción, coeficiente de absorptividad molar y de eficiencia cuántica de fotoliberación para $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ en H_2O a 293 K.

	λ_{MLCT} nm	$\epsilon_{\text{máx}}$ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	ϕ_{lib} pH 7	ϕ_{lib} pH 12
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$	424	6400	0.21	0.29

3.3 Liberación en dos fotones

Se realizaron diversas pruebas para evaluar la capacidad de los compuestos enjaulados de base metálica de experimentar excitación y fotoliberación en modo de absorción de dos fotones. De manera preliminar, una solución de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{AP})_2]^{2+}$ fue irradiada con un láser IR pulsado de 750 nm enfocado por medio de un objetivo aproximadamente en el centro de una cubeta UV-Vis. La Figura 3.19 muestra que la fluorescencia obtenida a partir de esta irradiación ocurre únicamente en el volumen focal, indicando que la misma es producto de un fenómeno de absorción en régimen de dos fotones.

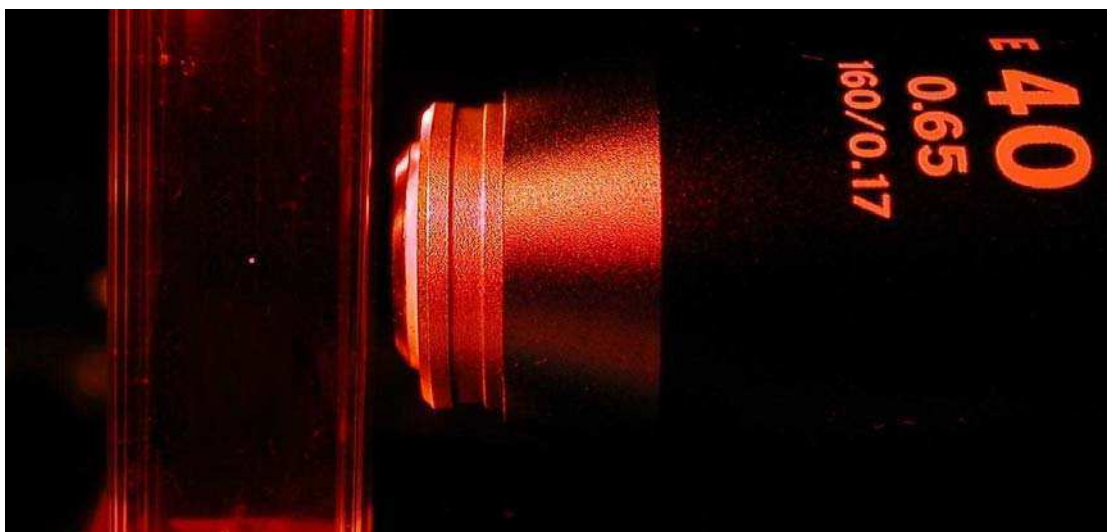


Figura 3.19 Fluorescencia de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{AP})_2]^{2+}$ en dos fotones con excitación a 750 nm.

En la Figura 3.20 pueden observarse los espectros de fluorescencia de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{AP})_2]^{2+}$ producidos por excitación de un fotón o de dos fotones. La emisión a 660 nm obtenida con irradiación a 480 y 750 nm da cuenta de que en ambos casos se alcanza el estado emisor característico de los complejos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}_2]^{2+}$.

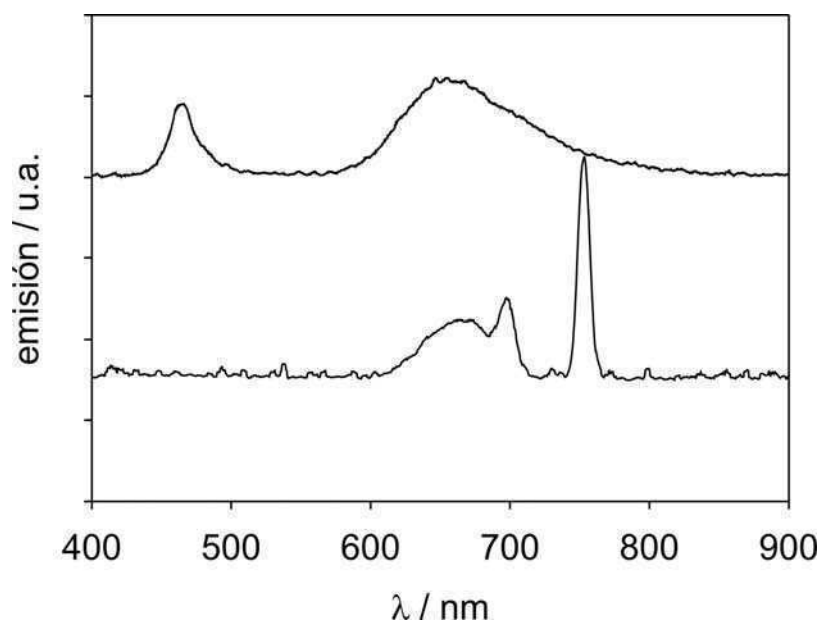


Figura 3.20 Espectros de fluorescencia de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{AP})_2]^{2+}$ en solución acuosa. Excitación a 480 nm (trazo superior) y a 750 nm (trazo inferior). Fluorescencia espuria del láser a 690 nm.

Como fluorescencia no implica fotólisis, se tomaron espectros de absorción de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{AP})_2]^{2+}$ antes y después de la irradiación. La Figura 3.21 muestra los resultados obtenidos al irradiar una muestra con lámpara de xenón a 365 nm o con láser enfocado de alta intensidad a 740 nm.

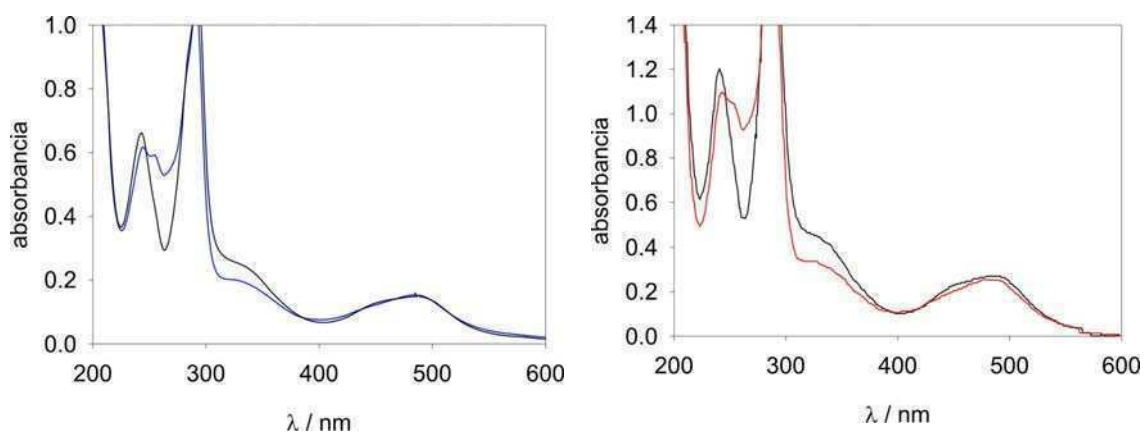


Figura 3.21 Espectros absorción de soluciones de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{AP})_2]^{2+}$ antes (trazos negros) y después de la irradiación con luz de 365 nm (trazo azul) o de 740 nm (trazo rojo).

Los espectros de absorción obtenidos luego de irradiar la muestra a ambas longitudes de onda son comparables entre si y equivalentes al correspondiente a $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{AP})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ obtenido por irradiación a 473 nm.^[62] Con el objetivo de verificar que la descomposición se debiera efectivamente de un proceso de dos fotones, el láser fue desenfocado manteniendo igual potencia promedio. En estas condiciones, no se registraron cambios en el espectro de absorción. La irradiación a 950 nm tampoco mostró actividad fotolítica en las condiciones de ensayo. Como prueba directa de la fotoliberación de 4AP por excitación de dos fotones se tomaron espectros de ^1H RMN de soluciones de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{AP})_2]^{2+}$ irradiadas y sin irradiar. Para confirmar la naturaleza del producto de reacción se agregó 4AP libre como estándar interno. La Figura 3.22 contiene los resultados de este experimento.

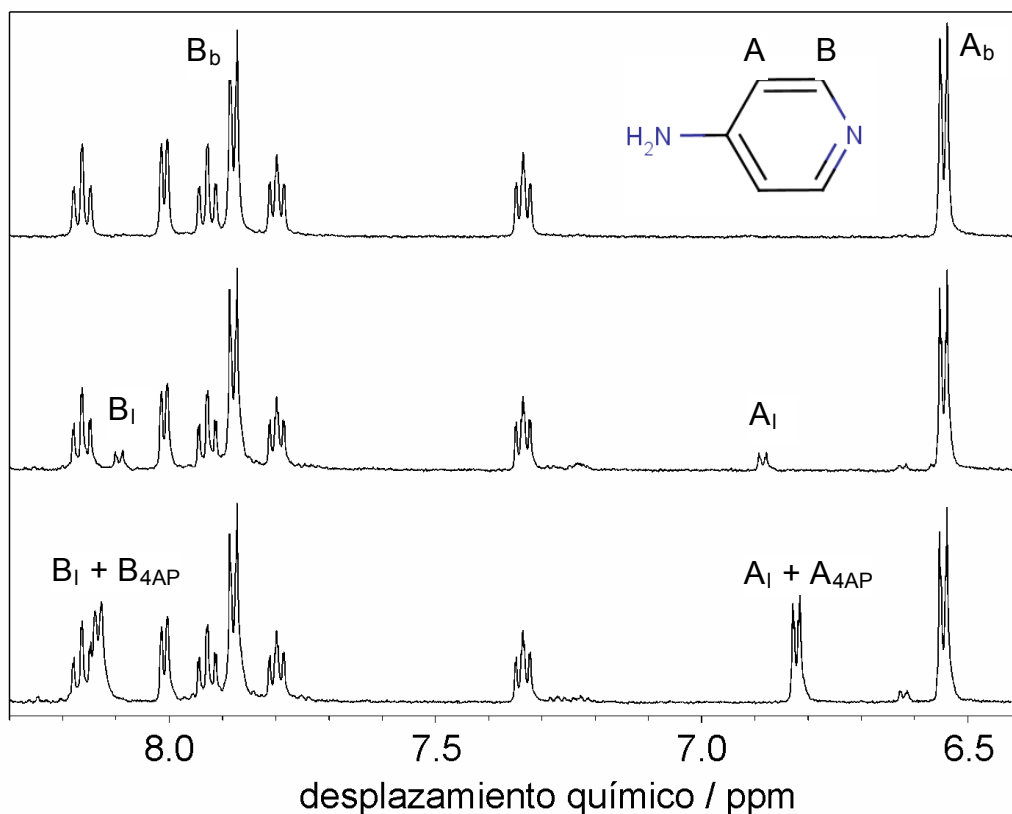


Figura 3.22 Espectro ^1H RMN en D_2O de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{AP})_2]^{2+}$ antes (trazo superior) y después (trazo intermedio) de la irradiación a 740 nm. Una vez obtenidos los fotoproductos se agregó 4AP sólida al tubo de RMN y se registró un último espectro (trazo inferior).

3.4 Resultados biológicos en un fotón

Para comenzar a estudiar el valor biológico de la fotoliberación de GABA a partir de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$, se hicieron experimentos en ovocitos de rana que expresan receptores GABA_c . Estos receptores son canales iónicos activados por ligando que responden a la unión de GABA abriendo un poro selectivo a cloruro (Cl^-).^[63] A potenciales de membrana cercanos al potencial de reposo, una corriente de Cl^- fluye a través de estos canales en presencia del neurotransmisor. La parte a) de la Figura 3.23 ilustra las corrientes iónicas que se observan típicamente en experimentos de fijación de voltaje durante una curva dosis-respuesta acumulativa para GABA libre.

La capacidad de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ de inducir corrientes de Cl^- mediadas por receptores GABA_c a partir de la fotoliberación de GABA también fue evaluada en registros de fijación de voltaje, como se observa en la parte b) de la Figura 3.23. En estos estudios, la cámara del ovocito fue equilibrada con una solución de *Ringer* preparada con $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ $30\mu\text{M}$.

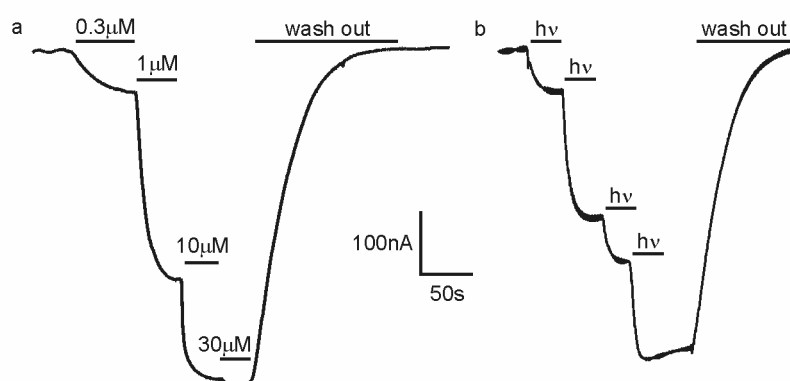


Figura 3.23 Corrientes iónicas en ovocitos de rana durante la aplicación de a) concentraciones crecientes de GABA o b) pulsos de luz sobre una solución de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ $30\mu\text{M}$.

La aplicación del compuesto enjaulado por si solo fue incapaz de evocar cualquier respuesta. En esta condición, la aplicación de pulsos de luz sobre el fondo de la cámara de registro evocó escalones de corriente de membrana similares a los observados con la aplicación directa de concentraciones crecientes de GABA libre. El lavado con solución de *Ringer* devolvió el valor de la corriente a su valor basal, sin que se detectara ninguna señal de citotoxicidad. Como se observa, la amplitud del escalón de corriente obtenido en cada pulso de fotoliberación se mantuvo constante hasta la llegada del nuevo pulso o del lavado final, indicando que la posible recaptación de GABA por parte del complejo no es lo suficientemente importante como para reflejarse a lo largo del experimento.

Con el objetivo de evaluar el desempeño del compuesto en preparaciones de mayor complejidad, se examinó la capacidad de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ de evocar respuestas mediadas por receptores de GABA en neuronas vivas. Con este propósito se utilizaron rodajas agudas de corteza visual de ratón, y se hicieron registros mediante la técnica de fijación de voltaje en célula entera sobre neuronas piramidales de capa 2/3. El compuesto se aplicó en el baño a una concentración de 50 μM . Para probar los efectos de la fotoliberación de GABA, se comenzó utilizando pulsos de luz de láser azul (473 nm, de 5 a 30mW sobre la muestra) enfocados con un objetivo 60x y AN 1.1 en el borde del soma neuronal, como se esquematiza en la parte A de la Figura 3.24. Con las células fijadas a 0 mV y solución interna de Cs^+ , la aplicación de un pulso de 1 ms de duración a los 50 ms de comenzado el registro provocó la manifestación de corrientes salientes como la que se observa en la parte B de la Figura 3.24. Bajo estas condiciones, el sentido saliente de la corriente es compatible con la activación de canales de GABA permeables a Cl^- .

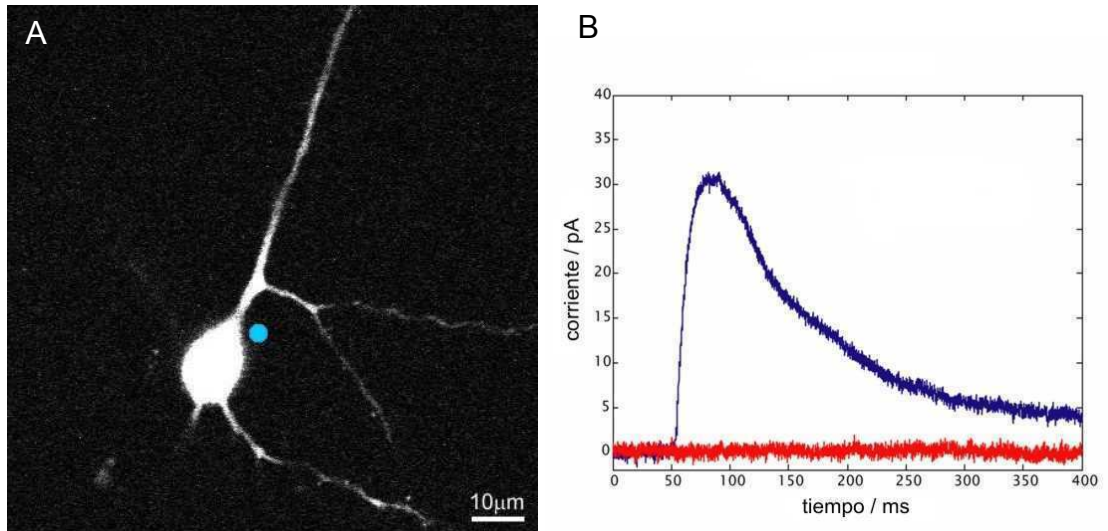


Figura 3.24 A) Neurona piramidal de la capa cortical 2/3 cargada con Alexa Fluor 594. El punto azul indica el lugar de irradiación con luz láser de 473 nm. B) Respuesta representativa ante un pulso de 473 nm (trazo azul) y línea de base (trazo rojo).

Se repitió el experimento fijando sucesivamente el valor del potencial de membrana de -60 a 0 mV a intervalos de 10mV con el objeto de encontrar el potencial de reversión de las corrientes evocadas. Aproximadamente a -43 mV, valor coincidente con el potencial de reversión del Cl⁻ para la combinación de soluciones interna y externa usadas, las corrientes cambiaron de signo. Las corrientes para cada valor de voltaje de fijación y la correspondiente curva corriente-voltaje se muestran en la Figura 3.25.

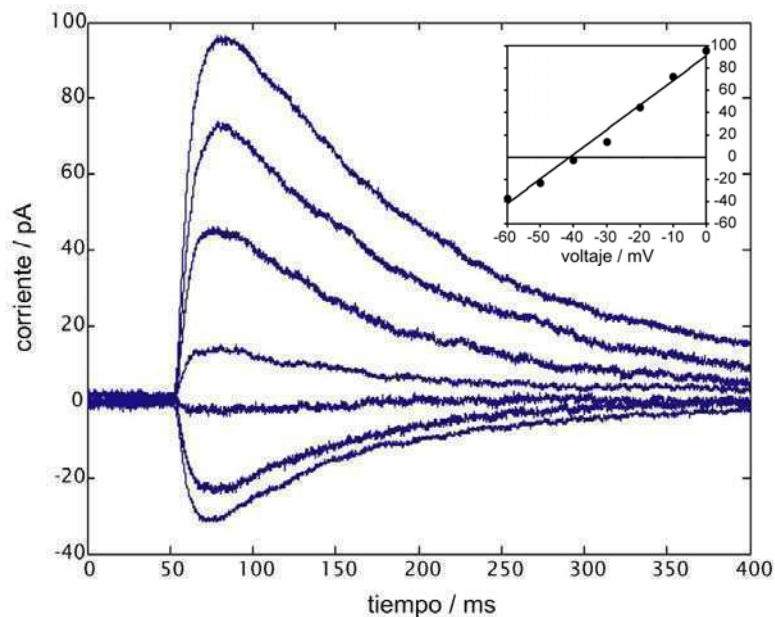


Figura 3.25 Corrientes registradas para distintos valores de potencial de membrana. En el recuadro se muestra la curva corriente-voltaje.

Dada la localización somática del sitio de liberación, lo esperado es que las corrientes mediadas por receptores de GABA estén dominadas por receptores $GABA_A$ permeables a Cl^- , con escasa o nula contribución de corrientes de K^+ evocadas por la activación de receptores $GABA_B$. Para comprobar esto se realizó un experimento utilizando una solución interna de K^+ (potencial de reversión para Cl^- de $-40mV$) y fijando el voltaje a $-70 mV$. Como se muestra en la Figura 3.26, en estas condiciones la aplicación de pulsos de luz generó corrientes entrantes que fueron bloqueadas reversiblemente por la adición al baño de gabacina $20 \mu M$. Estos experimentos demuestran que la fotólisis de $[Ru(bpy)_2PPh_3GABA]^+$ activa receptores $GABA_A$.

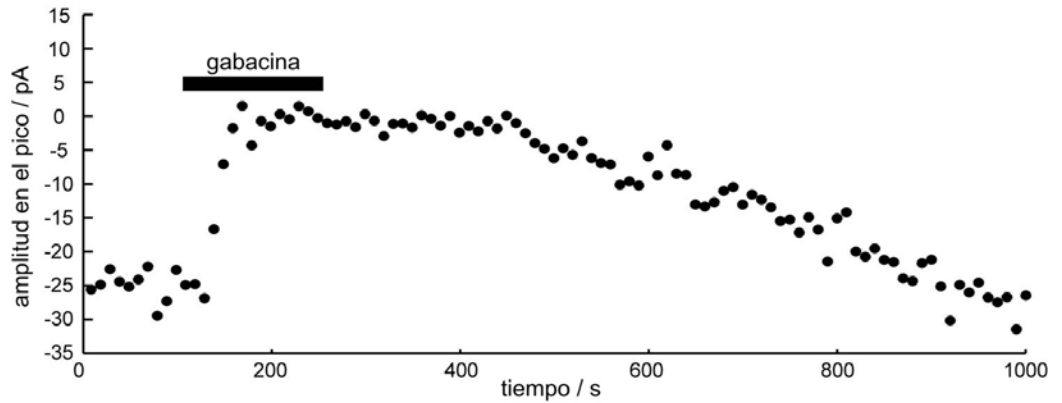


Figura 3.26 Amplitud de las respuestas de desenjaulado antes, durante (barra negra) y después de la aplicación de gabacina $20\mu\text{M}$. Las respuestas fueron registradas a -70mV .

Para comparar la cinética de los eventos evocados por el desenjaulado de GABA desde $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ con la de los eventos sinápticos se registraron mIPSCs somáticos evocados por sacarosa y mIPSCs espontáneos en las mismas condiciones que en los experimentos de desenjaulado. Los resultados de la Figura 3.27 parte A muestran que, en promedio, las respuestas por desenjaulado tuvieron cinéticas mucho más lentas que las corrientes sinápticas endógenas. Además, las cinéticas de las respuestas por desenjaulado son dependientes de la duración del pulso de luz ya que pulsos más largos liberan una mayor cantidad de neurotransmisor. Estas diferencias pueden verse en la parte B de la Figura 3.27.

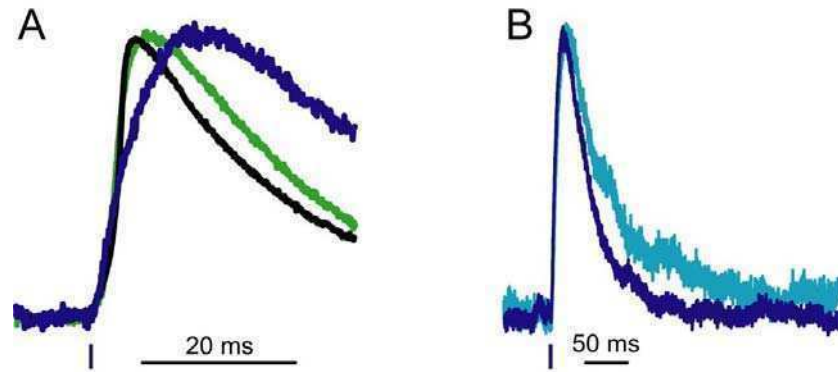


Figura 3.27 A) Promedios de mIPSCs somáticos espontáneos (trazo verde), evocados por sacarosa (trazo negro) y por pulsos de 0,5 ms de láser de 473 nm (azul). B) Cinéticas de las respuestas a pulsos láser de 5 ms (cyan) o 0,5 ms (azul). Respuestas normalizadas.

Para evaluar la capacidad de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ de controlar la actividad neuronal en un circuito se investigó la posibilidad de silenciar neuronas mediante la aplicación de un pulso de luz. El experimento consistió en aplicar un pulso de láser de 5 ms de duración 10 ms antes de una inyección de corriente sinusoidal capaz de disparar un potencial de acción. El silenciamiento resultante se aprecia en la Figura 3.28. Este experimento demuestra que $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ puede ser utilizado para inhibir la actividad neuronal en rebanadas de corteza.

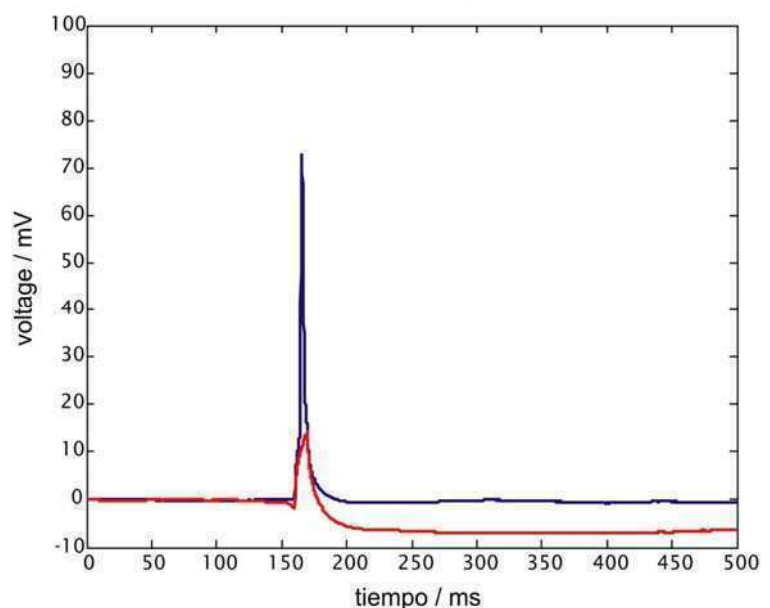


Figura 3.28 Respuesta de una neurona piramidal a la aplicación de un pulso depolarizante de corriente con (trazo rojo) o sin (trazo azul) la aplicación previa de un pulso de láser.

3.5 Resultados biológicos en dos fotones

A pesar de que el desenjaulado de GABA por irradiación con láser de luz visible puede ser una técnica útil para cierto tipo de experimentos, las cinéticas lentas de las corrientes evocadas lo vuelven inconveniente en los casos en los que el objetivo sea simular eventos espontáneos. Es probable que este tipo de cinéticas pueda deberse a la difusión del GABA liberado fuera del punto focal. Para superar esta limitación se buscó provocar la liberación por absorción de radiación IR en régimen de dos fotones.

En los experimentos de dos fotones, el compuesto fue empleado localmente aplicando presión positiva a una pipeta con $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ 1.6 mM posicionada en las inmediaciones de la neurona registrada, como lo ilustra la parte A de la Figura 3.29. La parte B muestra una corriente saliente obtenida como respuesta ante la aplicación de un pulso de 5 ms a 800 nm en la región perisomática.

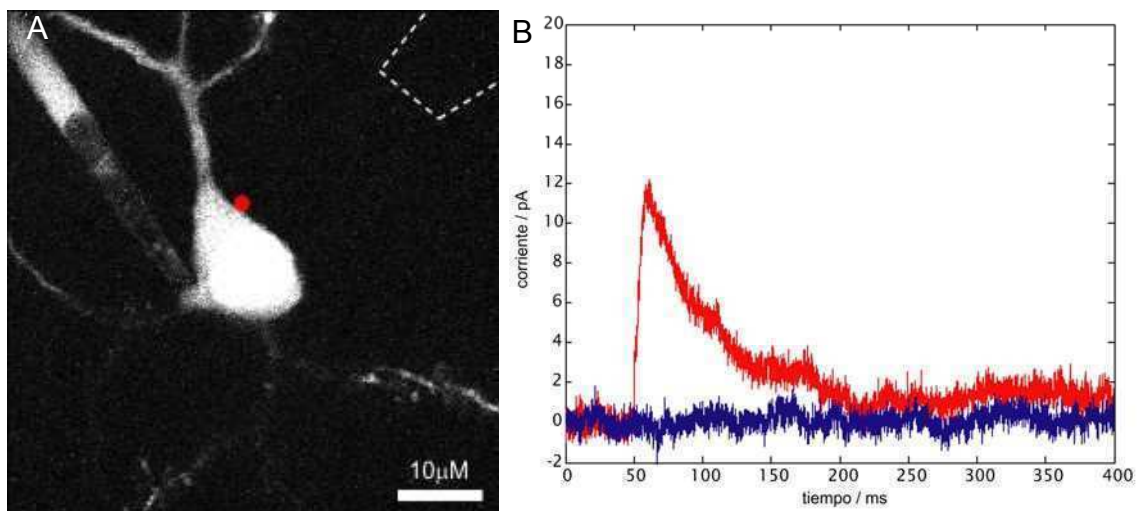


Figura 3.29 A) Neurona piramidal de la capa cortical 2/3 cargada con Alexa Fluor 594. El punto rojo indica el lugar de irradiación. La línea punteada corresponde a la micropipeta cargada con compuesto B) Respuesta ante un pulso de 800 nm (trazo rojo) y línea de base (trazo azul).

En la mayoría de los casos fue necesario realizar un barrido con el punto focal hasta encontrar una posición de respuesta positiva. Una vez encontrada dicha posición, las respuestas fueron reproducibles. Se realizaron pruebas de irradiación a distintas longitudes de onda manteniendo constante la potencia media sobre la muestra. La parte A de la Figura 3.30 muestra tres respuestas obtenidas a 725, 750 y 800 nm en una misma posición de desenjaulado. La curva amplitud de respuesta en función de longitud de onda mostró que la liberación de GABA en dos fotones es más eficiente a 800 nm.

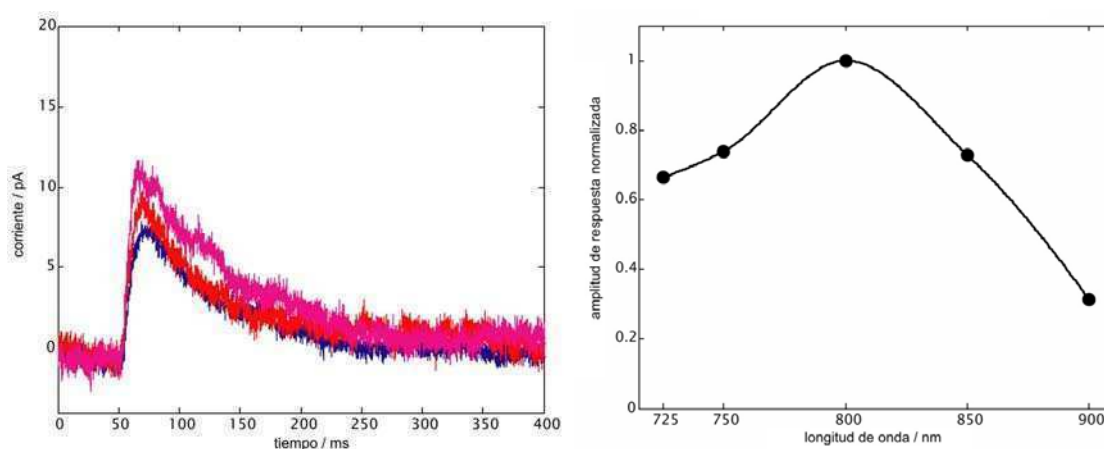


Figura 3.30 A) Respuestas inducidas en una misma célula por el desenjaulado en modo dos fotones a 725 nm (trazo azul), 750 nm (trazo rojo) y 800 nm (trazo magenta). B) Respuestas normalizadas expresadas en función de la longitud de onda de irradiación.

Para descartar la posibilidad de que fuera el pulso de láser por su cuenta el responsable de evocar las respuestas registradas se removió la presión positiva de la pipeta cargada con $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ antes de realizar la irradiación. El pulso de láser sólo, en ausencia del compuesto enjaulado, fue incapaz de inducir respuestas, tal como se muestra en la parte A de la Figura 3.31. La parte B de la misma Figura muestra la curva corriente-voltaje obtenida mediante pulsos de liberación a 800 nm. La corriente cambia de signo a valores próximos al potencial de reversión del Cl^- , que se ubica en -43 mV para la combinación de soluciones utilizada.

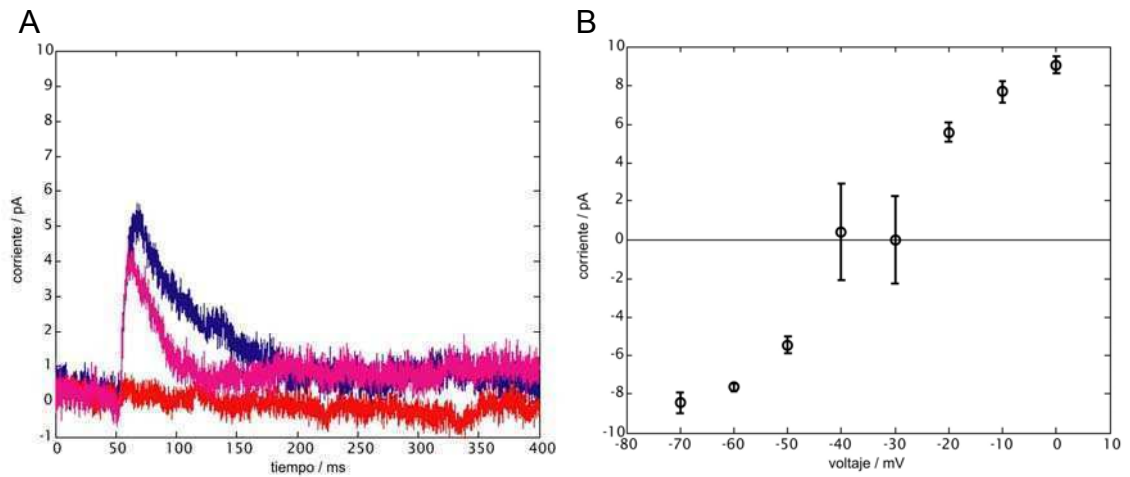


Figura 3.31 B) Respuestas frente a un pulso de 800 nm y 5 ms de duración aplicando consecutivamente a la pipeta una presión de 0.4 (trazo azul), 0 (trazo rojo) y nuevamente 0.4 psi (trazo magenta). B) Curva corriente-voltaje para pulsos de liberación.

Si las corrientes generadas por el láser pulsado son efectivamente mediadas por receptores de GABA, la aplicación de antagonistas debería ser capaz de abolir dicha respuesta. En las pruebas realizadas, un cóctel de gabacina y faclofeno bloqueó de manera completa y reversible las corrientes obtenidas en respuesta a la liberación por dos fotones, como puede verse en la Figura 3.32.

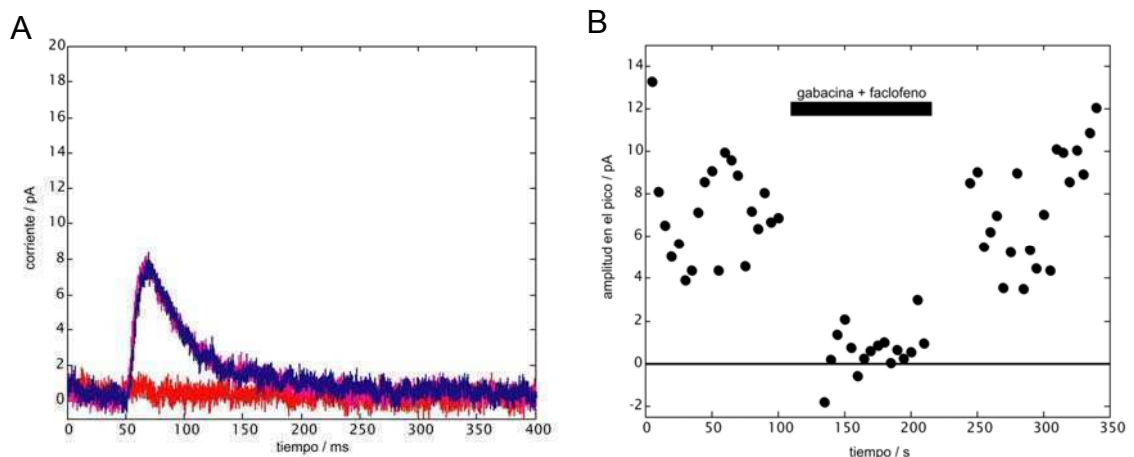


Figura 3.32 A) Respuestas representativas antes (trazo azul), durante (trazo rojo) y después (trazo magenta) de la aplicación en el baño de gabacina 40 μ M y faclofeno 1 mM. B) Amplitud de las respuestas al desenjaulado antes, durante (barra negra) y después de la aplicación del cóctel de bloqueadores.

La liberación por dos fotones debe estar limitada al volumen focal del láser. Para verificar esta propiedad, se obtuvieron respuestas de una neurona y luego se movió el foco del láser a otra posición en el eje z. Un desplazamiento hacia abajo de $10\ \mu\text{m}$ anuló completamente las respuestas al desenjaulado, las que fueron recuperadas con el retorno del láser a su lugar original. En comparación, un desplazamiento igual no produjo efectos apreciables utilizando liberación por un fotón. Los resultados se muestran respectivamente en las partes A y B de la Figura 3.33.

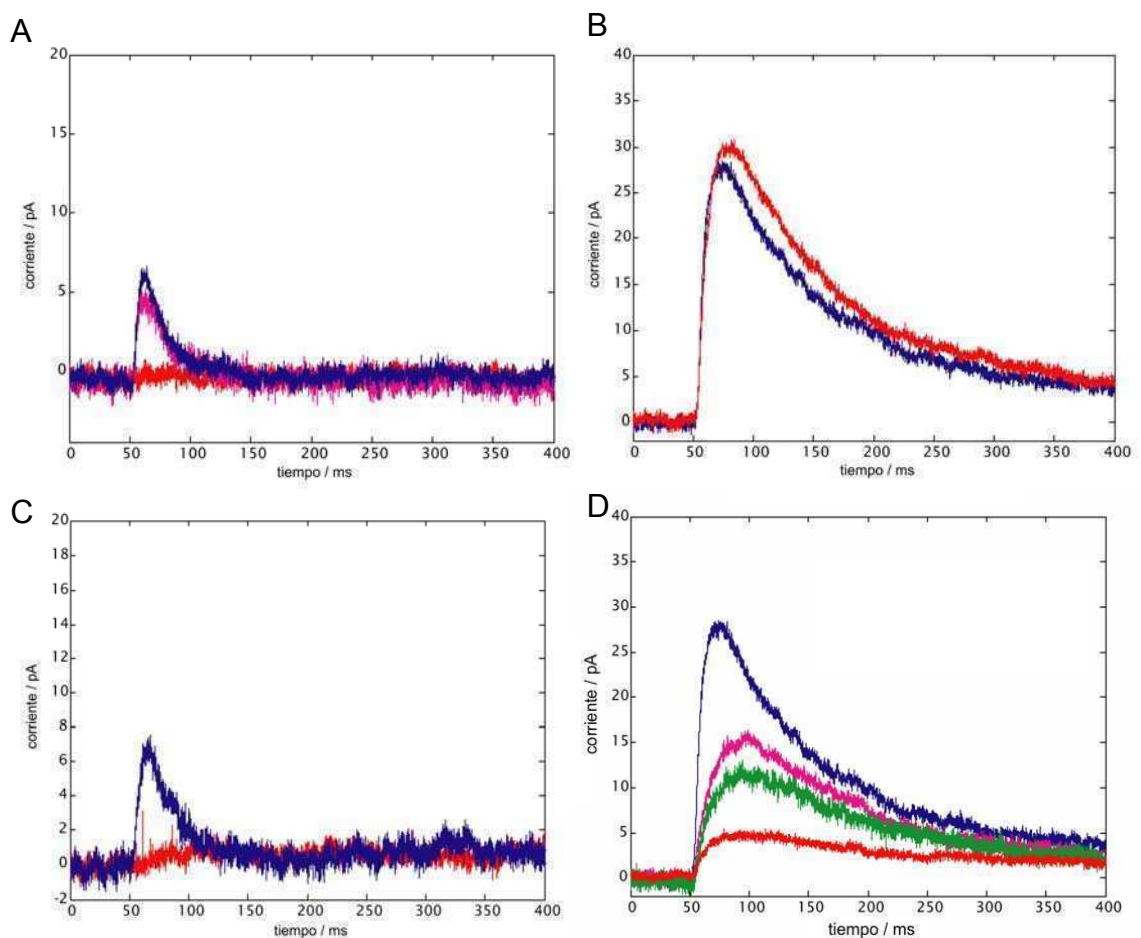


Figura 3.33 A) Desenjaulado por dos fotones en el plano focal de la célula (trazo azul), desplazado $10\ \mu\text{m}$ hacia abajo (trazo rojo) y nuevamente en la posición original (trazo magenta). B) Desenjaulado por un fotón en el plano focal de la célula (trazo azul) o desplazado $10\ \mu\text{m}$ hacia abajo (trazo rojo). C) Desenjaulado por dos fotones en el borde de la célula (trazo azul) y alejado lateralmente $2,5\ \mu\text{m}$ (trazo rojo). D) Desenjaulado por un fotón en el borde de la célula (trazo azul) y alejado lateralmente 5 (trazo magenta), $7,5$ (trazo verde) y $15\ \mu\text{m}$ (trazo rojo).

Para completar la caracterización de la resolución espacial del desenjaulado de GABA, se realizó un experimento similar desplazando el punto focal lateralmente. En la parte C de la Figura 3.33 se puede ver el efecto que provoca un desplazamiento lateral de 2,5 μm cuando el desenjaulado ocurre en régimen de dos fotones. La parte D de la misma Figura muestra las respuestas obtenidas con tres desplazamientos laterales diferentes en régimen de un fotón. Estos resultados ilustran la alta resolución espacial que ofrece el desenjaulado por dos fotones a partir de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$.

La capacidad de producir la liberación de neurotransmisor con alta resolución espacial abre la puerta al mapeo funcional de receptores en una misma célula. Con el objetivo de caracterizar la distribución de receptores de GABA en neuronas piramidales se exploraron distintas regiones de la membrana celular. Como muestra la Figura 3.34, se observaron claras diferencias en las respuestas al desenjaulado, encontrándose zonas de respuesta intensa y zonas de respuesta débil o nula.

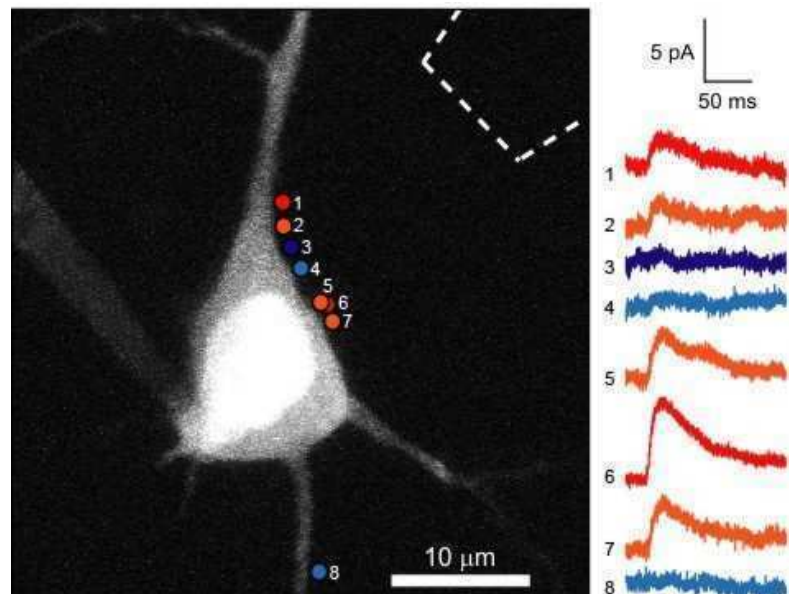


Figura 3.34 Respuestas obtenidas en 8 lugares de desenjaulado diferentes. Los puntos 5 y 6 están en la misma posición XY y diferente plano Z.

Debido a que el desenjaulado por dos fotones prácticamente no genera liberación de neurotransmisor fuera del volumen focal, es de esperar que cuanto más cerca se encuentre el mismo de la sinapsis GABAérgica mayores sean las similitudes entre las cinéticas de los eventos evocados y espontáneos. Para comparar la cinética de ambos eventos, se registraron corrientes post-sinápticas inhibitorias miniatura y corrientes obtenidas en respuesta a la liberación de GABA por dos fotones. Como se muestra en la Figura 3.35, en algunos casos las respuestas al desenjaulado fueron indistinguibles de las corrientes sinápticas registradas en la misma célula. Estos resultados muestran las ventajas de utilizar el desenjaulado por dos fotones para el estudio de sinapsis individuales y también que, con una ubicación apropiada del punto focal, el desenjaulado de GABA por dos fotones puede emular respuestas sinápticas.

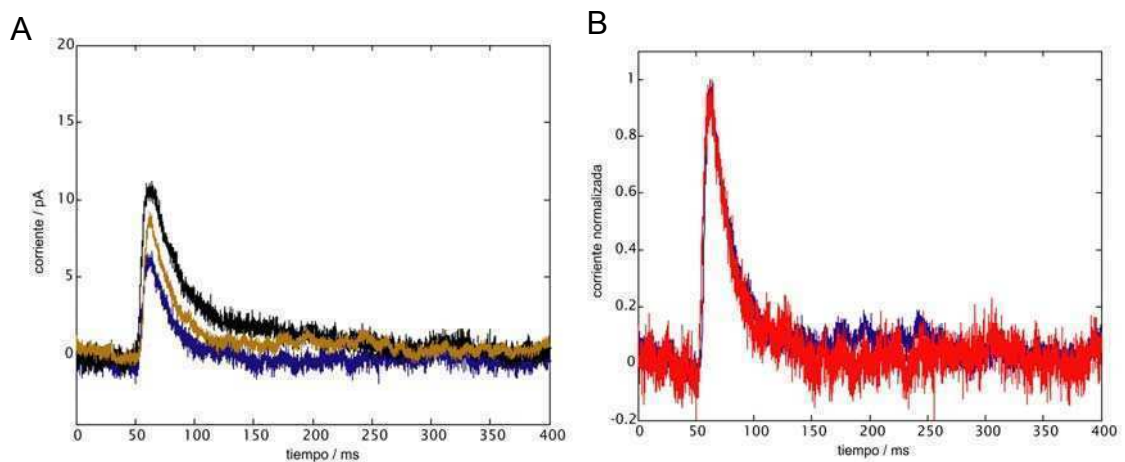


Figura 3.35 A) Corriente espontánea (trazo marrón), respuesta en el punto inicial de desenjaulado (trazo azul) y en el punto de mayor respuesta (trazo negro). B) Valores normalizados de corrientes espontáneas (trazo azul) y respuesta por desenjaulado (trazo rojo).

Capítulo 4 Discusión y conclusiones

La posibilidad de utilizar luz visible en lugar de luz UV para producir la liberación de moléculas de interés presenta numerosas ventajas para la experimentación en biología tanto *in vitro* como *in vivo*. En primer lugar se debe mencionar que la energía de la radiación ultravioleta es lo suficientemente alta como para producir reacciones químicas que alteren la constitución de las preparaciones estudiadas provocando daños celulares o tisulares. Estas alteraciones pueden incluir daños al ADN, proteínas, o activación de proteínas de respuesta a *stress* o factores de transcripción.^{[64,}
^{65]} Si bien estos posibles daños pueden ser hechos a un lado en experimentos *in vitro* mediante la inclusión de los controles experimentales adecuados, los experimentos *in vivo* requieren siempre que las técnicas de manipulación sean inocuas, a los efectos de preservar intacto el sujeto de estudio. La posibilidad de trabajar con luz visible abre la puerta a la aplicación de los compuestos enjaulados de coordinación en niveles de organización cada vez más complejos.

La utilización de luz visible es conveniente en el caso de requerir que la fotoliberación tenga lugar en la profundidad de un tejido biológico, como cuando se trabaja con rodajas de cerebro. La luz visible penetra el tejido más fácilmente que la luz UV, reduciendo la energía de desenjaulado en función de la profundidad de la liberación.^[66] Esta diferencia en la penetrancia tiene su explicación en el *scattering* de Raleigh, y es inversamente proporcional a la cuarta potencia de la longitud de onda.^[67] Al disminuir las desviaciones que sufre la luz al atravesar el tejido, este efecto no sólo mejora la penetrancia sino que además aumenta la resolución espacial de la liberación. Por este motivo, y a pesar de que la liberación por luz UV sufre menores limitaciones por difracción, la resolución espacial lograda en rebanadas de cerebro es superior a la

descrita para los compuestos enjaulados orgánicos y comparable a la lograda con los compuestos doblemente enjaulados.^[68]

Una ventaja adicional del desenjaulado por luz visible consiste en el bajo costo de las fuentes de luz apropiadas y la óptica asociada. Hoy, es posible conseguir potentes láseres azules por una fracción del costo de los láseres UV comúnmente utilizados con los compuestos enjaulados orgánicos. En la Tabla 4-1 se consignan los precios de tres láseres de prestaciones similares, dos azules y uno UV. El láser azul utilizado en este trabajo se vende a US\$2.500. Sin ir más lejos, también hemos realizado pruebas exitosas utilizando como fuentes lumínicas lámparas halógenas o *flashes* fotográficos comunes.

Tabla 4-1. Equipos láser publicados por Crystalaser.

Modelo	λ / nm	Características	Precio / US\$
BCL-475-050	473	50mW, TEM ₀₀ , CW	9.990
BCL-040-440	440	40mW, TEM ₀₀ , CW	7.950
QUV355-050	355	50mW, TEM ₀₀ , Q-switched	19.900

No sólo las fuentes de luz presentan una ventaja desde el punto de vista económico para la utilización de compuestos enjaulados de coordinación. La Figura 4.1 muestra los espectros de transmisión correspondientes a tres modelos de objetivos para microscopios ópticos. Mientras que para los compuestos enjaulados orgánicos se debe trabajar con objetivos que tengan buena transmitancia por debajo de los 300 nm, los compuestos enjaulados de coordinación permiten la utilización de materiales que sólo transmiten a partir de los 400 nm.

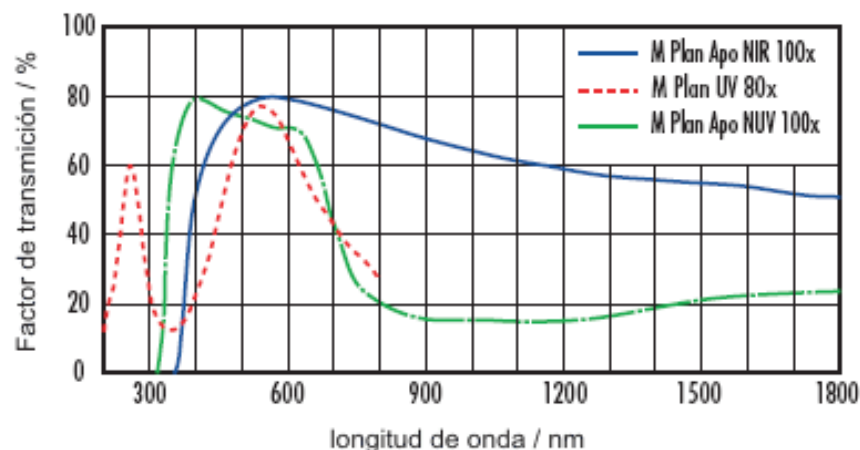


Figura 4.1 Espectros de transmisión para tres modelos de objetivos Mitutoyo

La posibilidad de utilizar longitudes de onda de desenjaulado superiores a los 400 nm permite entonces prescindir de la costosa óptica de cuarzo que es obligatoria para los compuestos enjaulados orgánicos. La Tabla 4-2 muestra la distribución de precios de tres modelos de objetivos de alta calidad para tres valores distintos de magnificación. En todos los casos el costo de los objetivos para luz UV quintuplica el de los objetivos para luz visible. El costo de objetivos genéricos estándar, también aptos para transmitir la luz de 400-500 nm, se ubica un orden de magnitud por debajo de estos valores. El menor costo del equipamiento necesario para trabajar con compuestos enjaulados activables por luz visible pone esta técnica a disposición de un espectro más amplio de grupos de investigación, especialmente en el tercer mundo.

Tabla 4-2. Objetivos Mitutoyo publicados por Edmund Optics Inc.

Modelo	λ / nm	Precio / us\$		
		20X	50X	100X
M Plan Apo NIR	> 400	2.620	2.860	4.050
M Plan Apo NUV	> 350	5.360	5.500	7.070
M Plan Apo UV	>250	14.200	14.500	19.900

Para la liberación por un fotón, el producto la absorptividad molar por el rendimiento cuántico de fotoliberación da una idea cabal de la eficiencia de utilización de la luz de desenjaulado que incide sobre una preparación biológica. Este parámetro muestra que de todos los compuestos enjaulados sintetizados, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ es el que mejor uso fotoquímico hace de los fotones incidentes, disminuyendo la cantidad de luz necesaria para liberar una determinada cantidad de moléculas de GABA y minimizando la posibilidad de producir fotodaños. La eficiencia de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ es incluso mayor que la del compuesto enjaulado orgánico comercial α -carboxy-*O*-nitrobenzil-caged GABA (*O*-CNB-GABA), adoptado como estándar en los experimentos que recurren a la fotoliberación de GABA.^[12] Por su parte, el compuesto enjaulado de coordinación $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(5\text{HT})_2]^{2+}$ posee una eficiencia cuántica de liberación similar a la del compuesto orgánico *O*-CNB-5HT.^[11] Sin embargo el compuesto de coordinación hace un uso mucho más eficiente de la luz incidente debido a que su absorptividad molar a la longitud de onda de desenjaulado es mucho mayor que la de su par orgánico. La Tabla 4-3 reúne los parámetros fotoquímicos correspondientes de todos estos compuestos.

Tabla 4-3. Parámetros fotofísicos y fotoquímicos de los compuestos liberadores de GABA en H₂O a 293 K.

	$\epsilon_{\text{máx}}$ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{máx}}$ nm	λ_{irrad} nm	ϕ_{lib} pH 7	$\epsilon_{\text{máx}}\phi_{\text{lib}}$ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$	6400	424	450	0.21	1344
<i>O</i> -CNB-GABA	4500	262	308	0.16	720
$\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{GABA})_2$	8955	488	450	0.036	322
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(5\text{HT})_2]^{2+}$	9880	488	450	0.023	227
<i>O</i> -CNB-5HT	800	280	337	0.03	24

El hecho de que $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ muestre una mayor eficiencia cuántica de liberación que $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{GABA})_2$ puede ser explicado dentro del marco conceptual comúnmente aceptado para la fotoquímica de las polipiridinas de rutenio. El carácter π aceptor del ligando PPh_3 es muy marcado, mientras que el de GABA coordinado a través del grupo amino es nulo. La retrodonación π disminuye la densidad electrónica sobre el rutenio y aumenta la energía de la transición MLCT que conduce al estado $d\pi(\text{Ru}^{+3})-\pi^*(\text{bpy}^-)$. Esta desestabilización de los estados excitados de Ru^{+3} hace que la diferencia de energía entre el estado $^3\text{MLCT}$ y el $d-d$ sea menor en el complejo que contiene PPh_3 , lo que aumenta la participación de la vía disociativa en la relajación al estado fundamental. La Figura 4.2 esquematiza las posiciones de los niveles de energía correspondientes a ambos compuestos.

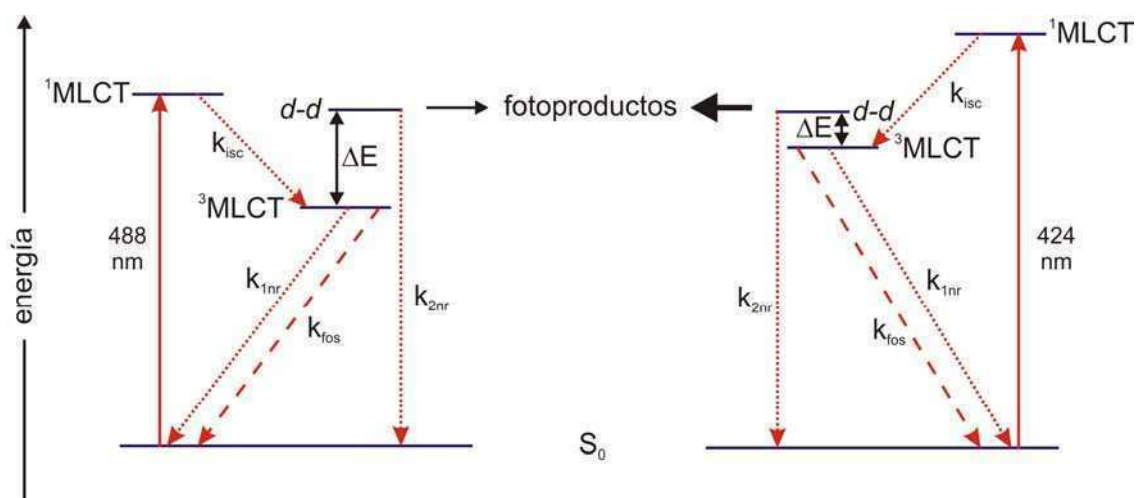


Figura 4.2 Diagrama de niveles de energía para $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{GABA})_2$ (izquierda) y $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ (derecha).

La desestabilización de los estados Ru^{3+} puede ser verificada también por mediciones electroquímicas en las que resulta esperable que cuanto mayor sea el poder π aceptor de los ligandos monodentados más alto se ubique el valor de la cupla $\text{Ru}^{2+/3+}$. La Tabla 4-4 resume los valores correspondientes a la longitud de onda de la banda

MLCT, la cupla $\text{Ru}^{2+/3+}$ y la eficiencia cuántica de fotoliberación de todos los compuestos sintetizados.

Tabla 4-4. Posiciones de la banda MLCT y rendimientos cuánticos de fotólisis para compuestos de tipo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Y})]^{n+}$ en solución acuosa sintetizados en el presente trabajo.

	XY	$\lambda_{\text{MLCT}} / \text{nm}^{\text{a}}$	$E_{1/2} / \text{V}^{\text{b}}$	$\phi_{\text{lib}}^{\text{a}}$
A	(tiramina) ₂	488	1.10	0.03
B	(triptamina) ₂	488	1.11	0.02
C	(5HT) ₂	488	1.03	0.03
D	(GABA) ₂	488	1.06	0.04
E	PPh ₃ GABA	424	1.41	0.21

^aDeterminado en agua. ^bDeterminado en acetonitrilo vs. SSCE

En la Tabla 4-5 se reproducen los valores hallados para los compuestos de tipo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Y})]^{2+}$ cuyos espectros de absorción fueron medidos en solución acuosa. Como se mencionó en la introducción, en 1984 Pinnick y Durham describieron correlaciones lineales entre estas tres variables con coeficientes mayores a 0.9.^[55]

Tabla 4-5. Posiciones de la banda MLCT y rendimientos cuánticos de fotólisis para compuestos de tipo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Y})]^{2+}$ en solución acuosa reportados por Pinnick y Durham.^[55]

	XY	$\lambda_{\text{MLCT}} / \text{nm}^{\text{a}}$	$E_{1/2} / \text{V}^{\text{b}}$	$\phi_{\text{lib}}^{\text{a}}$
1	(acetonitrilo) ₂	423	1.44	0.44
2	(piridina) ₂	456	1.3	0.26
3	(pirazol) ₂	468	sd	0.20
4	(H ₂ O) ₂ <i>cis</i>	480	sd	0.05
5	(H ₂ O) ₂ <i>trans</i>	495	sd	0.03

^aDeterminado en agua. ^bDeterminado en acetonitrilo vs. SSCE

Con fines comparativos, y para evaluar si los compuestos sintetizados en este trabajo se comportan según las tendencias descritas para otros compuestos de la misma familia, se construyeron gráficos combinados tomando los datos de las tablas precedentes. La Figura 4.3 muestra la correlación de la energía de la banda MLCT con el potencial de la cupla $\text{Ru}^{2+/3+}$. De los compuestos a los que Pinnick y Durham realizaron mediciones electroquímicas, sólo se han incluido en este gráfico aquellos dos cuyos espectros de absorción fueron registrados en solución acuosa. Como puede verse, los compuestos enjaulados de coordinación refuerzan la correlación previamente establecida tomando posición de acuerdo al carácter dador o aceptor de sus ligandos.

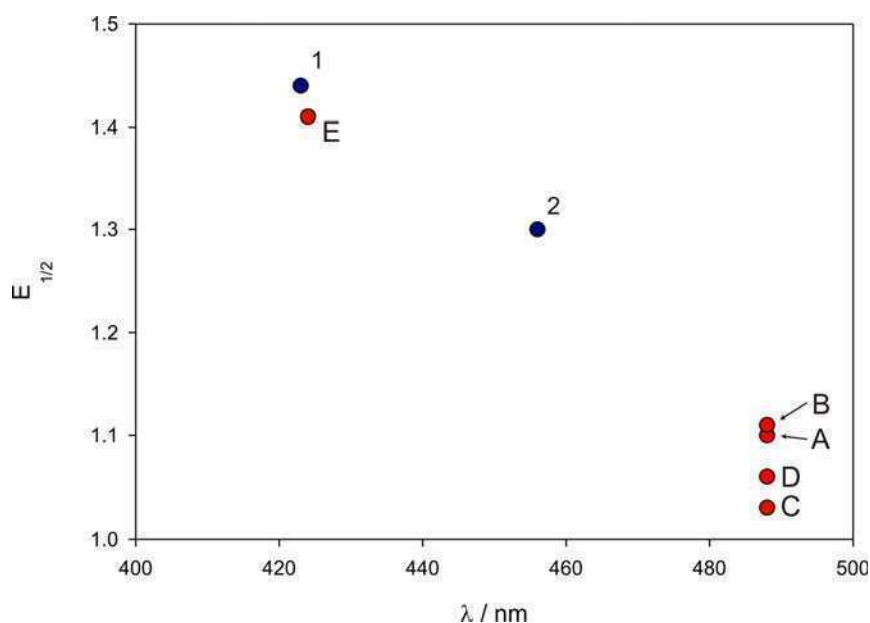


Figura 4.3 Correlación de la energía de la banda MLCT con el potencial de la cupla $\text{Ru}^{2+/3+}$ para compuestos sintetizados (rojo) o reportados por Pinnick y Durham (azul).

En la Figura 4.4 se realiza el mismo procedimiento para la correlación de la longitud de onda de la banda MLCT con la eficiencia cuántica de fotoliberación. En este caso se toman los cinco complejos de la Tabla 4-5 debido a que en todos los casos las fotólisis fueron realizadas en agua.

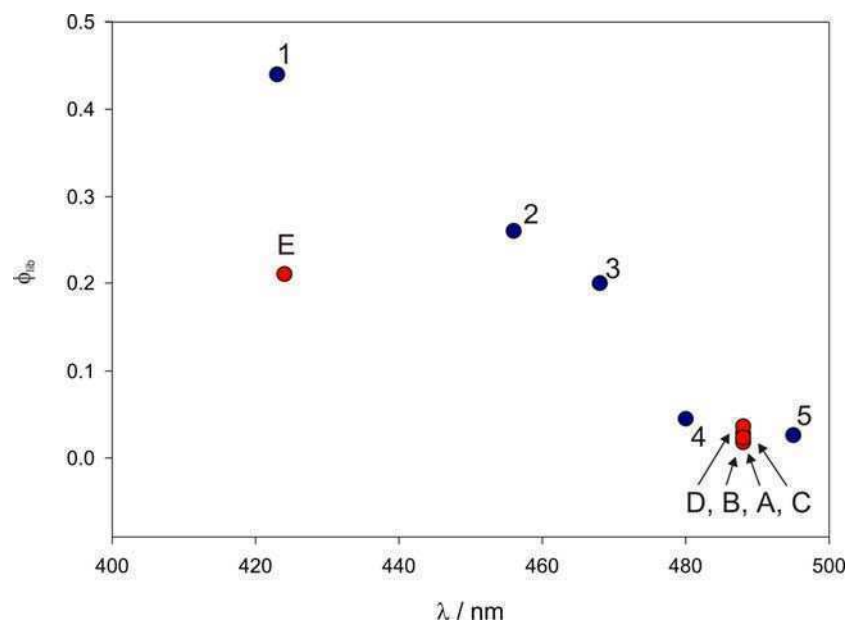


Figura 4.4 Correlación de la energía de la banda MLCT con el rendimiento cuántico de fotoliberación para compuestos sintetizados (rojo) o reportados por Pinnick y Durham (azul).

En este caso, los compuestos de tipo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Y})]^{2+}$ se comportan de la manera prevista, mientras que $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ exhibe un rendimiento menor que el previsto para la posición de su banda MLCT. Esto se debe a que el complejo posee una única unidad de GABA liberable, por lo que el rendimiento cuántico de fotoliberación de GABA cae a la mitad. Cabe decir que Pinnick y Durham determinaron además que complejos bisustituídos con ligandos PR_3 resultaron inertes frente a la fotosustitución.

El comportamiento de los compuestos enjaulados sintetizados se enmarca adecuadamente en la teoría tradicional de la química de las polipiridinas de rutenio. No se realizaron pruebas para estudiar la relación entre la eficiencia cuántica de fotosustitución y la temperatura debido a que los experimentos biológicos a los que están destinados estos compuestos se llevan a cabo en un rango de temperaturas acotado de no más de 20 °C de amplitud.

$[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ es el primer compuesto enjaulado usado en experimentos biológicos para fotoliberar GABA con luz visible. Los únicos antecedentes de fotoliberación de moléculas biológicas con luz mayor a 350 nm corresponden a dos recientemente aparecidos compuestos enjaulados orgánicos basados en cumarina que liberan glutamato o glicina con luz de 400 nm.^[69-71] También es de reciente aparición un compuesto de rutenio fotoliberador de óxido nítrico con luz de 355 nm.^[72] En el pasado, la liberación por un fotón ha sido utilizada exitosamente para mapear circuitos usando glutamato enjaulado,^[73-76] mientras que el uso de compuestos enjaulados orgánicos de GABA ha permitido analizar la función y distribución de contactos GABAérgicos con baja resolución^[77-79] o impedir eventos pseudos-epilépticos en cultivos primarios.^[80] En este trabajo se muestra que la fotólisis de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ por un fotón produce corrientes mediadas por receptores GABA_A y se ilustra como el compuesto puede ser utilizado para inhibir óptimamente la actividad neuronal. Un protocolo como este último podría ser usado para evaluar la contribución de un grupo de células dentro de una red de neuronas. El conjunto de propiedades ventajosas de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ podrían traducirse en su uso para aplicaciones in vivo, sin descartar posibilidades terapéuticas.

Mientras que el desenjaulado por un fotón es una herramienta útil para responder preguntas biológicas que no requieran una gran resolución espacial, el estudio de sinapsis individuales exige la liberación de neurotransmisor en volúmenes del orden del femtolitro. Por este motivo, el desenjaulado de neurotransmisores por dos fotones se vuelve necesario para realizar el mapeo funcional de conexiones neuronales con resolución sináptica. La fuerza y plasticidad sináptica de contactos glutamatérgicos individuales ha sido estudiada con liberación de glutamato por dos fotones utilizando el compuesto enjaulado orgánico MNI-glutamato.^[81-84] Desafortunadamente, este tipo de

investigaciones en sinapsis GABAérgicas resultaban imposibles de hacer debido a la falta de compuestos enjaulados de GABA con capacidad de fotoliberación por dos fotones. $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ puede ocupar ese lugar permitiendo el estudio sistemático de la transmisión GABAérgica con alta resolución espacial en tejido vivo.

Ubicado apropiadamente el punto de fotoliberación, las respuestas inducidas a partir del desenjaulado por dos fotones muestran una cinética y una amplitud muy similares a las de las mIPSCs espontáneas registradas en la misma célula. Este resultado indica que el desenjaulado por dos fotones posee la resolución espacial suficiente para estimular sinapsis individuales, reproduciendo con GABA el grado de control experimental logrado en sinapsis glutamatérgicas. La capacidad de fotoliberar GABA con resolución sináptica supone una herramienta esencial para el estudio de la transmisión GABAérgica, ya que hasta ahora no era posible localizar precisamente las estructuras post-sinápticas en tejido vivo. A diferencia de las sinapsis glutamatérgicas, los contactos GABAérgicos no están segregados en estructuras anatómicas fácilmente distinguibles bajo microscopía óptica. Los sitios postsinápticos pueden estar localizados en el soma celular, el árbol dendrítico o el segmento axonal inicial.^[85] A pesar de que se han utilizado anticuerpos fluorescentes para marcar receptores GABAérgicos en cultivos de neuronas piramidales, la existencia de una sinapsis genuina debe ser confirmada con posterioridad a la fijación. El uso de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ y la liberación por dos fotones permite hacer mapeos funcionales de contactos GABAérgicos en neuronas vivas.

Otra ventaja del desenjaulado por dos fotones con $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ es que permite ser combinado con el de glutamato, usando dos longitudes de onda diferentes. La longitud de onda óptima para desenjaular GABA con

$[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ es de 800 nm, mientras que la utilizada para desenjaular glutamato con MNI-glutamato es de 720-730 nm.^[33] A pesar de que $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ es parcialmente sensible a la irradiación de 725 nm, el MNI-glutamato esencialmente no fotolibera a 800 nm. Estas diferencias podrían hacer posible el uso de ambos compuestos en experimentos de desenjaulado dual para manipular circuitos óptimamente, excitando o inhibiendo neuronas según se desee con la alta resolución espacial que provee la excitación por dos fotones.

En la mayoría de los experimentos de desenjaulado de glutamato por dos fotones el compuesto se aplica localmente desde una pipeta cercana al punto de irradiación. Este modo de aplicación, si bien restringe el área de desenjaulado se utiliza no sólo porque permite minimizar la cantidad de compuesto que se consume en cada experimento sino también porque la aplicación generalizada del compuesto enjaulado en la solución que baña la preparación puede producir alteraciones fisiológicas, las que rara vez son descritas. Si bien el estudio de estos efectos no recibe mucha atención, se cree que pueden deberse a agonismos, antagonismos o interacciones inespecíficas del compuesto con la membrana celular y sus componentes. Estas interacciones se terminan manifestando como la modificación de la actividad basal de los circuitos neuronales. En el caso de MNI-glutamato, la aplicación en solución puede generar actividad de tipo epiléptica en circuitos neuronales.

En el caso de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$, los primeros experimentos se hicieron agregando el compuesto al baño en concentraciones de 400 μM a 800 μM . En este rango de concentraciones fue posible evocar respuestas que revirtieron al potencial de reversión esperado para el ión cloruro, y que fueron bloqueadas por gabacina, indicando que se trataba de respuestas mediadas por GABA (no mostrado). Sin embargo se

encontró que a estas altas concentraciones era más difícil establecer el acceso a las células, presumiblemente debido a una posible interacción del compuesto con la membrana celular. Para verificar esta posibilidad se estudiaron las propiedades de la membrana celular en ausencia y presencia del compuesto $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{Cl}]^+$. La Figura 4.5 muestra los valores de la resistencia de entrada en ambas condiciones, indicando que la presencia del compuesto produce un aumento en la corriente de fuga.

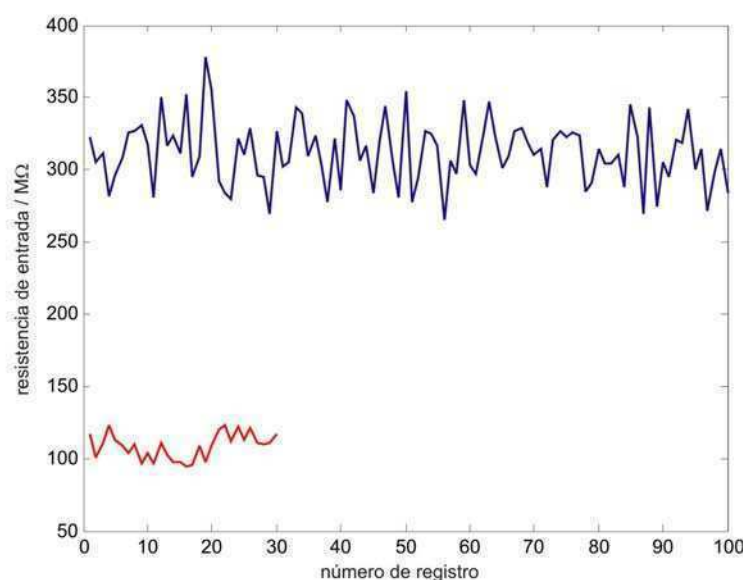


Figura 4.5 Resistencia de entrada de neuronas piramidales en presencia (trazo rojo) o ausencia (trazo azul) de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{Cl}]^+$.

$[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ posee una molécula de trifenilfosfina, la cual es altamente lipofílica y por ende potencialmente responsable de una posible interacción del compuesto con la membrana celular. Evidencias de esta interacción pueden encontrarse en el hecho de que luego de la exposición al compuesto que ocurre durante un experimento con rodaja de cerebro de ratón, el mismo la colorea de manera tenue pero persistente. Para corregir este efecto deben buscarse alternativas a la trifenilfosfina que preserven la posición de la banda MLCT pero que al mismo tiempo presenten una menor hidrofobicidad.

La búsqueda de ligandos que cumplan con estas características forma parte de las perspectivas orientadas a perfeccionar el desempeño de los compuestos enjaulados de coordinación. Como alternativas a la trifenilfosfina podría pensarse en ligandos aceptores como tioéteres, fosfitos o monopiridinas. Si bien estos son ligandos menos lipofílicos que podrían reducir o eliminar la interacción del compuesto con la membrana celular manteniendo una alta eficiencia cuántica de fotoliberación, su utilización resulta inviable debido a que la fotólisis provoca su liberación en lugar de la de los ligandos biológicos coordinados a través del grupo amino. Esto se debe a que en este tipo de compuestos, a similar capacidad π aceptora el ligando saliente es aquel que presenta menor capacidad σ donora, es decir, el menos básico.^[86] Esta restricción obliga a sugerir otras opciones como la utilización de fosfinas de bajo peso molecular como trimetilfosfina, o que presenten sustituyentes más hidrofílicos. Algunos ejemplos de estas últimas son las trifenilfosfinas modificadas con grupos hidroxilo o sulfonato que se muestran en la Figura 4.6. Pruebas preliminares mostraron que compuestos con trifenilfosfinas sulfonadas no colorean tejidos biológicos.

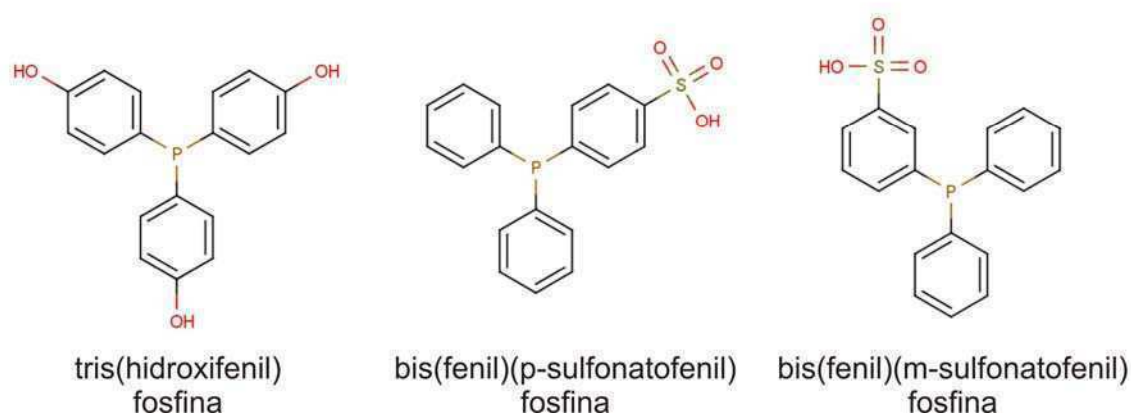


Figura 4.6 Trifenilfosfinas sustituidas.

Los otros dos blancos a dónde dirigir la manipulación de las propiedades de los compuestos enjaulados de coordinación son las bipyridinas y el átomo metálico. La incorporación de bipyridinas derivatizadas a la esfera de coordinación permitiría contribuir a ajustar tanto la polaridad de los compuestos como la posición de la banda MLCT. En el caso de las bipyridinas, sustituyentes dadores de electrones que enriquecen la densidad electrónica de los anillos piridínicos tienden a desestabilizar el estado $d\pi(\text{Ru}^{+3})-\pi^*(\text{bpy}^-)$, corriendo la banda a hacia el azul. La coordinación de aminobipyridinas produce este efecto, mientras que la coordinación de bipyridinas con sustituyentes aceptores como las carboxibipyridinas produce el efecto contrario.^[87] Otras derivatizaciones sobre las bipyridinas permiten imaginar el anclaje de los compuestos enjaulados sobre superficies sólidas.

A fin de alterar las propiedades de los compuestos sintetizados, la posibilidad de cambiar el átomo metálico central también debe ser analizada. Como se dijo, el rutenio es un metal de transición perteneciente al grupo VIII, del que también forman parte el osmio y el hierro. De estudios anteriores, se sabe que las energías de los estados basales a los estados excitados $d-d$ en complejos análogos aumenta aproximadamente un 30% al pasar de la primera serie de transición a la segunda y otro 30% desde la segunda a la tercera.^[88] Para los complejos osmio los estados $d-d$ pueden quedar térmicamente inaccesibles, al menos alrededor de la temperatura ambiente, lo que implicaría una fuerte disminución de la participación de las vías fotosustitutivas en la relajación de los estados excitados. Por el contrario, en el caso del hierro una disminución en la energía de los estados $d-d$ implicaría un mayor acceso a estos niveles y redundaría en tasas de fotosustitución más elevadas. Sin embargo debe considerarse que complejos de la forma $[\text{Fe}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Y})]^{n+}$ suelen presentar configuraciones de alto *spin*, lo que supone una elevada reactividad durante la síntesis, aún cuando el producto final fuese estable.

A lo largo de este trabajo, se ha demostrado que las polipiridinas de rutenio pueden funcionar como grupos protectores removibles por luz visible o infrarroja en compuestos enjaulados de neurotransmisores que contengan aminas primarias. Se ha demostrado que la reacción de fotólisis ocurre sin la generación de especies intermedias o productos secundarios y que el comportamiento químico de las sustancias sintetizadas se ajusta al esperado para este tipo de compuestos. La naturaleza intrínseca de los compuestos de coordinación y la elección de los ligandos adecuados han permitido obtener compuestos enjaulados de alta absorptividad y eficiencia de fotoliberación con fotones de luz visible de baja energía. La aplicación de estos compuestos sobre preparaciones biológicas ha permitido realizar experimentos exitosos en régimen de uno o dos fotones, reflejando la utilidad de los compuestos desarrollados en el área de las neurociencias. Además de ser el primero en hacerlo con luz visible, el compuesto $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ es el compuesto enjaulado de GABA que mejor uso hace de los fotones incidentes. También es el primer compuesto reportado capaz de fotoliberar GABA en modo dos fotones, ofreciendo una resolución espacial antes inaccesible. Los compuestos cuyo desarrollo se describe en esta tesis reflejan sólo una parte de los que podrían ser sintetizados. La relativa sencillez con la que se sintetizan y el hecho fundamental de que la derivatización de sus componentes no anula sus propiedades fotoquímicas preanuncia el desarrollo de nuevos compuestos, ampliando el repertorio de biomoléculas enjaulables y refinando la sintonización química y biológica de su liberación.

Capítulo 5 Índice de figuras

Figura 1.1 Arreglo experimental del trabajo de Fork. La lente está montada sobre un micromanipulador que permite barrer el haz a través del ganglio y controlar el foco vertical.....	1-6
Figura 1.2 Apertura de jaula mediante la absorción de luz y liberación de la especie bioactiva atrapada. Adaptado de Haydon y Ellis Davies. ^[2]	1-7
Figura 1.3 Esquema de reacción de fotólisis para ATP enjaulado.....	1-8
Figura 1.4 Diferencias entre la excitación por un fotón (a) y la excitación por dos fotones (b). Adaptado de Helmchen y Denk ^[30] y Zipfel, Williams y Webb. ^[31]	1-10
Figura 1.5 A) Esquema de la reacción de fotoliberación de glutamato por absorción de dos fotones. B) Ilustración de la liberación por dos fotones sobre una sinapsis individual. Adaptado de Judkewitz, Roth y Häusser. ^[35]	1-11
Figura 1.6 Fotólisis en agua de a) $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ y b) $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{py}_2]^{2+}$	1-12
Figura 1.7 Algunos ligandos comunes en compuestos de coordinación	1-13
Figura 1.8 Isómeros <i>cis</i> - y <i>trans</i> - del compuesto $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$	1-14
Figura 1.9 Diagrama simplificado de los niveles de energía correspondientes a $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$	1-15
Figura 1.10 Espectro de absorción en agua de $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$	1-17
Figura 1.11 Diagrama de los estados excitados de baja energía en $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$	1-19
Figura 1.12 Algunos ligandos de la serie espectroquímica.....	1-22
Figura 1.13 Ligandos en orden de electro-acepción creciente.....	1-22
Figura 1.14 Correlación de la longitud de onda de la banda MLCT con el potencial $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$ para $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Y})]^{n+}$. Adaptado de Pinnick y Durham. ^[55]	1-23
Figura 1.15 Correlación de la longitud de onda de la banda MLCT con el rendimiento cuántico de fotoliberación para $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Y})]^{n+}$. Adaptado de Pinnick y Durham. ^[55]	1-24
Figura 1.16 Piridinas con distintos sustituyentes en orden de electro-acepción creciente.	1-24
Figura 1.17 Correlación de la longitud de onda de la banda MLCT con el potencial $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$ para $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Cl})]^+$. Adaptado de Ershov et al. ^[56]	1-25
Figura 1.18 Correlación de la longitud de onda de la banda MLCT con el rendimiento cuántico de fotoliberación para $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Cl})]^+$. Adaptado de Ershov et al. ^[56]	1-26
Figura 3.1 Espectro de ^1H RMN de tiramina y $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Tir})_2]^{2+}$ en D_2O	3-36

Figura 3.2 Región alifática de los espectros de ^1H RMN en D_2O del compuesto $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(5\text{HT})_2]^{2+}$ sintetizado en H_2O (trazo rojo) o en D_2O (trazo verde).....	3-37
Figura 3.3 Espectro de ^1H RMN de triptamina en acetona- d_6 y $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Trip})_2]^{2+}$ en D_2O	3-39
Figura 3.4 Espectro de ^1H RMN de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(5\text{HT})_2]^{2+}$ en D_2O	3-40
Figura 3.5 Espectro de ^1H RMN de GABA y $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{GABA})_2$ en D_2O	3-42
Figura 3.6 Región aromática de espectros de ^1H RMN para fotólisis parcial de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Tir})_2]^{2+}$. Se observan el compuesto de partida (trazo superior) y los productos medidos inmediatamente (trazo intermedio) o 30 minutos después (trazo inferior) de la fotólisis.....	3-44
Figura 3.7 Región alifática de espectros de ^1H RMN para un experimento de fotólisis de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Tir})_2]^{2+}$. En la figura se observan el compuesto de partida (trazo superior) y los productos de la reacción medidos inmediatamente (trazo intermedio) o 30 minutos después (trazo inferior) de ocurrida la fotólisis.	3-45
Figura 3.8 Voltagramas realizados a los compuestos (A) $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Tir})_2](\text{PF}_6)_2$, (B) $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Trip})_2](\text{PF}_6)_2$, (C) $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(5\text{HT})_2](\text{PF}_6)_2$ y (D) $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{GABA})_2](\text{PF}_6)_2$ Soluciones en CH_3CN con TBAPF_6 100mM a 298 K. Valores vs. SSCE. $dE/dt = 100 \text{ mV/s}$	3-46
Figura 3.9 Fluorescencia de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Tir})_2]^{2+}$ en agua a pH 7 a diferentes tiempos de irradiación. Excitación a 450 nm.	3-48
Figura 3.10 Espectros de absorción (trazo negro) y emisión (trazo azul) de $\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{GABA})_2$ (A), $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Tir})_2]^{2+}$ (B), $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Trip})_2]^{2+}$ (C) y $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(5\text{HT})_2]^{2+}$ (D).....	3-48
Figura 3.11 Series de espectros de absorción para la fotólisis de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Tir})_2]^{2+}$ a pH 7. El recuadro muestra el grado de fotoconversión.....	3-50
Figura 3.12 Series de espectros de absorción para la fotólisis de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{Tir})_2]^{2+}$ a pH 12. El recuadro muestra el grado de fotoconversión.....	3-50
Figura 3.13 Espectro ^1H RMN de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ en D_2O	3-51
Figura 3.14 Espectros ^1H RMN en D_2O correspondientes a la fotólisis parcial de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ (trazo rojo) y al agregado de GABA (trazo verde).....	3-52
Figura 3.15 Espectros de ^1H RMN 200 en D_2O correspondientes a un experimento de fotólisis exhaustiva de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$. En el trazo superior, todo el GABA se encuentra coordinado al Ru^{2+} , mientras que el trazo inferior se encuentra libre en su totalidad.....	3-53
Figura 3.16 Voltagrama del compuesto $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$. Solución en CH_3CN con TBAPF_6 100mM a 298 K. Valores vs. SSCE. $dE/dt = 200 \text{ mV/s}$	3-54

Figura 3.17 Series de espectros de absorción para la fotólisis de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ a pH 12. El recuadro muestra el grado de fotoconversión.	3-55
Figura 3.18 Series de espectros de absorción para la fotólisis de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ a pH 12. El recuadro muestra el grado de fotoconversión.	3-55
Figura 3.19 Fluorescencia de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{AP})_2]^{2+}$ en dos fotones con excitación a 750 nm.	3-57
Figura 3.20 Espectros de fluorescencia de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{AP})_2]^{2+}$ en solución acuosa. Excitación a 480 nm (trazo superior) y a 750 nm (trazo inferior). Fluorescencia espuria del láser a 690 nm.	3-58
Figura 3.21 Espectros absorción de soluciones de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{AP})_2]^{2+}$ antes (trazos negros) y después de la irradiación con luz de 365 nm (trazo azul) o de 740 nm (trazo rojo).	3-58
Figura 3.22 Espectro ^1H RMN en D_2O de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{AP})_2]^{2+}$ antes (trazo superior) y después (trazo intermedio) de la irradiación a 740 nm. Una vez obtenidos los fotoproductos se agregó 4AP sólida al tubo de RMN y se registró un último espectro (trazo inferior).	3-59
Figura 3.23 Corrientes iónicas en ovocitos de rana durante la aplicación de a) concentraciones crecientes de GABA o b) pulsos de luz sobre una solución de $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ 30 μM	3-60
Figura 3.24 A) Neurona piramidal de la capa cortical 2/3 cargada con Alexa Fluor 594. El punto azul indica el lugar de irradiación con luz láser de 473 nm. B) Respuesta representativa ante un pulso de 473 nm (trazo azul) y línea de base (trazo rojo).	3-62
Figura 3.25 Corrientes registradas para distintos valores de potencial de membrana. En el recuadro se muestra la curva corriente-voltaje.	3-63
Figura 3.26 Amplitud de las respuestas de desenjaulado antes, durante (barra negra) y después de la aplicación de gabacina 20 μM . Las respuestas fueron registradas a -70mV.	3-64
Figura 3.27 A) Promedios de mIPSCs somáticos espontáneos (trazo verde), evocados por sacarosa (trazo negro) y por pulsos de 0,5 ms de láser de 473 nm (azul). B) Cinéticas de las respuestas a pulsos láser de 5 ms (cyan) o 0,5 ms (azul). Respuestas normalizadas.	3-65
Figura 3.28 Respuesta de una neurona piramidal a la aplicación de un pulso depolarizante de corriente con (trazo rojo) o sin (trazo azul) la aplicación previa de un pulso de láser.	3-65
Figura 3.29 A) Neurona piramidal de la capa cortical 2/3 cargada con Alexa Fluor 594. El punto rojo indica el lugar de irradiación. La línea punteada corresponde a la micropipeta cargada con compuesto B) Respuesta ante un pulso de 800 nm (trazo rojo) y línea de base (trazo azul).	3-66

Figura 3.30 A) Respuestas inducidas en una misma célula por el desenjaulado en modo dos fotones a 725 nm (trazo azul), 750 nm (trazo rojo) y 800 nm (trazo magenta). B) Respuestas normalizadas expresadas en función de la longitud de onda de irradiación. 3-67

Figura 3.31 B) Respuestas frente a un pulso de 800 nm y 5 ms de duración aplicando consecutivamente a la pipeta una presión de 0.4 (trazo azul), 0 (trazo rojo) y nuevamente 0.4 psi (trazo magenta). B) Curva corriente-voltaje para pulsos de liberación.....3-68

Figura 3.32 A) Respuestas representativas antes (trazo azul), durante (trazo rojo) y después (trazo magenta) de la aplicación en el baño de gabacina 40 μ M y faclofeno 1 mM. B) Amplitud de las respuestas al desenjaulado antes, durante (barra negra) y después de la aplicación del cóctel de bloqueadores.3-68

Figura 3.33 A) Desenjaulado por dos fotones en el plano focal de la célula (trazo azul), desplazado 10 μ m hacia abajo (trazo rojo) y nuevamente en la posición original (trazo magenta). B) Desenjaulado por un fotón en el plano focal de la célula (trazo azul) o desplazado 10 μ m hacia abajo (trazo rojo). C) Desenjaulado por dos fotones en el borde de la célula (trazo azul) y alejado lateralmente 2,5 μ m (trazo rojo). D) Desenjaulado por un fotón en el borde de la célula (trazo azul) y alejado lateralmente 5 (trazo magenta), 7,5 (trazo verde) y 15 μ m (trazo rojo).....3-69

Figura 3.34 Respuestas obtenidas en 8 lugares de desenjaulado diferentes. Los puntos 5 y 6 están en la misma posición XY y diferente plano Z.3-70

Figura 3.35 A) Corriente espontánea (trazo marrón), respuesta en el punto inicial de desenjaulado (trazo azul) y en el punto de mayor respuesta (trazo negro). B) Valores normalizados de corrientes espontáneas (trazo azul) y respuesta por desenjaulado (trazo rojo).3-71

Figura 4.1 Espectros de transmisión para tres modelos de objetivos Mitutoyo.....4-74

Figura 4.2 Diagrama de niveles de energía para Ru(bpy)₂(GABA)₂ (izquierda) y [Ru(bpy)₂PPh₃GABA]⁺ (derecha).4-76

Figura 4.3 Correlación de la energía de la banda MLCT con el potencial de la cupla Ru^{2+/3+} para compuestos sintetizados (rojo) o reportados por Pinnick y Durham (azul). 4-78

Figura 4.4 Correlación de la energía de la banda MLCT con el rendimiento cuántico de fotoliberación para compuestos sintetizados (rojo) o reportados por Pinnick y Durham (azul).4-79

Figura 4.5 Resistencia de entrada de neuronas piramidales en presencia (trazo rojo) o ausencia (trazo azul) de [Ru(bpy)₂PPh₃Cl]⁺4-83

Figura 4.6 Trifenilfosfinas sustituidas.4-84

Capítulo 6 Índice de tablas

Tabla 1-1. Posiciones de la banda MLCT, potenciales de oxidación y rendimientos cuánticos de fotólisis para los compuestos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Y})]^{n+}$. Adaptado de Pinnick y Durham. ^[55]	1-23
Tabla 1-2. Posiciones de la banda MLCT, potenciales de oxidación rendimientos cuánticos de fotólisis para los compuestos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Cl})]^+$. Adaptado de Ershov et al. ^[56]	1-25
Tabla 3-1. Potenciales de óxido-reducción para los compuestos $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{RNH}_2)_2]^{n+}$.	3-47
Tabla 3-2. Longitudes de onda de absorción, emisión y eficiencia cuántica de emisión en agua a 293K para compuestos de tipo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{RNH}_2)_2]^{n+}$	3-48
Tabla 3-3. Longitudes de onda de absorción, coeficientes de absortividad molar y de eficiencia cuántica de fotoliberación para compuestos de tipo $[\text{Ru}(\text{bpy})(\text{RNH}_2)_2]^{n+}$ en H_2O a 293 K.	3-50
Tabla 3-4. Potenciales de óxido-reducción para $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$. Solución en CH_3CN con TBAPF_6 100mM a 298 K. Valores vs. SSCE. $dE/dt = 200$ mV/s. Se reportan potenciales pico.	3-54
Tabla 3-5. Longitud de onda de absorción, coeficiente de absortividad molar y de eficiencia cuántica de fotoliberación para $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ en H_2O a 293 K.	3-56
Tabla 4-1. Equipos láser publicados por Crystalaser.....	4-73
Tabla 4-2. Objetivos Mitutoyo publicados por Edmund Optics Inc.....	4-74
Tabla 4-3. Parámetros fotofísicos y fotoquímicos de los compuestos liberadores de GABA en H_2O a 293 K.	4-75
Tabla 4-4. Posiciones de la banda MLCT y rendimientos cuánticos de fotólisis para compuestos de tipo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Y})]^{n+}$ en solución acuosa sintetizados en el presente trabajo.	4-77
Tabla 4-5. Posiciones de la banda MLCT y rendimientos cuánticos de fotólisis para compuestos de tipo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{X})(\text{Y})]^{2+}$ en solución acuosa reportados por Pinnick y Durham. ^[55]	4-77

Capítulo 7 Índice de citas

1. Fork, R.L., *Laser Stimulation of Nerve Cells in Aplysia*. Science, 1971. **171**(3974): p. 907-908.
2. Haydon, P.G. and G.C.R. Ellis-Davies, *Ultra-high-speed photochemical stimulation of neurons*. Nature Methods, 2005. **2**: p. 811-812.
3. Patchornik, A., B. Amit, and R.B. Woodward, *Photosensitive protecting groups*. J. Am. Chem. Soc. , 1970. **92**(21): p. 6333-6335.
4. Kaplan, J.H., B.I. Forbush, and J.F. Hoffman, *Rapid photolytic release of adenosine 5'-triphosphate from a protected analogue: utilization by the Na:K pump of human red blood cell ghosts*. . Biochemistry 1978. **17**(10): p. 1929-1935.
5. Walker, J.W., J.A. McCray, and G.P. Hess, *Photolabile protecting groups for an acetylcholine receptor ligand. Synthesis and photochemistry of a new class of o-nitrobenzyl derivatives and their effects on receptor function*. Biochemistry, 1986. **25**: p. 1799-1805.
6. Wilcox, M., et al., *Synthesis of photolabile precursors of amino acid neurotransmitters*. J. Org. Chem., 1990. **55**: p. 1585-1589.
7. Marque, J.J., *Using caged neurotransmitters*. Nature, 1989. **337**(6207): p. 583-584.
8. Kaplan, J.H. and A.P. Somlyo, *Flash photolysis of caged compounds: new tools for cellular physiology*. Trends Neurosci., 1989. **12**(2): p. 54-59.
9. McCray, J.A. and D.R. Trentham, *Properties and uses of photoreactive caged compounds*. . Annu Rev Biophys Biophys Chem., 1989. **18**: p. 239-270.
10. Adams, S.R. and R.Y. Tsien, *Controlling cell chemistry with caged compounds*. Annu. Rev. Physiol. , 1993. **55**: p. 755-784.
11. Breiting, H.G.A., et al., *Synthesis and Characterization of Photolabile Derivatives of Serotonin for Chemical Kinetic Investigations of the Serotonin 5-HT₃ Receptor*. Biochemistry, 2000. **39**(18): p. 5500-5508.
12. Gee, K.R., R. Wieboldt, and G.P. Hess, *Synthesis and Photochemistry of a New Photolabile Derivative of GABA-Neurotransmitter Release and Receptor Activation in the Microsecond Time Region*. J. Am. Chem. Soc., 1994. **116**(18): p. 8366-8367.

13. Wieboldt, R., et al., *Synthesis and photochemistry of photolabile derivatives of gamma-aminobutyric acid for chemical kinetic investigations of the gamma-aminobutyric acid receptor in the millisecond time region*. *Biochemistry*, 1994. **33**(6): p. 1526-1533.
14. Cürten, B., et al., *Synthesis, Photophysical, Photochemical and Biological Properties of Caged GABA, 4-[[[(2H-1-Benzopyran-2-one-7-amino-4-methoxy) carbonyl] amino] Butanoic Acid*. *Photochemistry and Photobiology*, 2005. **81**(3): p. 641-648.
15. Wieboldt, R., et al., *Photolabile precursors of glutamate: synthesis, photochemical properties, and activation of glutamate receptors on a microsecond time scale*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 1994. **91**(19): p. 8752-8756.
16. Rossi, F.M., et al., *N-Nmoc-L-Glutamate, a New Caged Glutamate with High Chemical Stability and Low Pre-photolysis Activity*. *J. Biol. Chem.*, 1997. **272**(52): p. 32933-32939.
17. Ueno, S., et al., *Photolysis of a newly synthesized caged glycine activates the glycine receptor of rat CNS neurons*. *J. Neurosci. Methods*, 1995. **58**(1-2): p. 163-166.
18. Grewer, C., et al., *A New Photolabile Precursor of Glycine with Improved Properties: A Tool for Chemical Kinetic Investigations of the Glycine Receptor*. *Biochemistry*, 2000. **39**(8): p. 2063-2070.
19. Heinbockel, T., et al., *Endocannabinoid Signaling Dynamics Probed with Optical Tools*. *J. Neurosci.*, 2005. **25**(41): p. 9449-9459.
20. Fitzsimons, D.P., J.R. Patel, and R.L. Moss, *Role of myosin heavy chain composition in kinetics of force development and relaxation in rat myocardium*. *J. Physiol.*, 1998. **513**(1): p. 171-183.
21. Eder, M., W. Zieglgansberger, and H.U. Dodt, *Neocortical long-term potentiation and long-term depression: site of expression investigated by infrared-guided laser stimulation*. *J. Neurosci.*, 2002. **22**(17): p. 7558-7568.
22. Grewer, C., *Investigation of the α_1 -glycine receptor channel-opening kinetics in the submillisecond time domain*. *Biophys. J.*, 1999. **77**(2): p. 727-738.
23. Dierkes, P.W., P. Hochstrate, and W.R. Schlue, *Distribution and functional properties of glutamate receptors in the leech central nervous system*. *J Neurophysiol*, 1996. **75**(6): p. 2312-2321.

24. Pettit, D.L. and G.J. Augustine, *Distribution of Functional Glutamate and GABA Receptors on Hippocampal Pyramidal Cells and Interneurons*. J Neurophysiol, 2000. **84**(1): p. 28-38.
25. Shao, L.-R. and F.E. Dudek, *Electrophysiological Evidence Using Focal Flash Photolysis of Caged Glutamate That CA1 Pyramidal Cells Receive Excitatory Synaptic Input From the Subiculum*. J Neurophysiol, 2005. **93**(5): p. 3007-3011.
26. Kötter, R., et al., *Analysing functional connectivity in brain slices by a combination of infrared video microscopy, flash photolysis of caged compounds and scanning methods*. Neuroscience, 1998. **86**(1): p. 265-277.
27. Korkotian, E., et al., *Confocal microscopic imaging of fast UV-laser photolysis of caged compounds*. Journal of Neuroscience Methods, 2004. **133**(1-2): p. 153-159.
28. Shoham, S., et al., *Rapid neurotransmitter uncaging in spatially defined patterns*. Nature Methods, 2005. **2**: p. 837-843.
29. Denk, W., J.H. Strickler, and W.W. Webb, *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy*. Science, 1990. **248**(4951): p. 73-76.
30. Helmchen, F. and W. Denk, *Deep tissue two-photon microscopy*. Nat. Methods, 2005. **2**(12): p. 932-940.
31. Zipfel, W.R., R.M. Williams, and W.W. Webb, *Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences*. Nat. Biotechnol., 2003. **21**(11): p. 1369-1377.
32. Denk, W., *Two-Photon Scanning Photochemical Microscopy: Mapping Ligand-Gated Ion Channel Distributions*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994. **91**(14): p. 6629-6633.
33. Matsuzaki, M., et al., *Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons*. . Nat. Neurosci., 2001. **4**(11): p. 1051-1052.
34. Matsuzaki, M., G.C.R. Ellis-Davies, and H. Kasai, *Three-Dimensional Mapping of Unitary Synaptic Connections by Two-Photon Macro Photolysis of Caged Glutamate*. J Neurophysiol, 2008. **99**(3): p. 1535-1544.
35. Judkewitz, B., A. Roth, and M. Häusser, *Dendritic Enlightenment: Using Patterned Two-Photon Uncaging to Reveal the Secrets of the Brain's Smallest Dendrites*. Neuron, 2006. **50**(2): p. 180-183.
36. Kramer, R.H., J.J. Chambers, and D. Trauner, *Photochemical tools for remote control of ion channels in excitable cells*. Nat. Chem. Biol., 2005. **1**(7): p. 360-365.

37. Günter Mayer, A.H., *Biologically Active Molecules with a Light Switch*. Angew. Chem. Int. Ed., 2006. **45**(30): p. 4900-4921.
38. Gorostiza, P. and E. Isacoff, *Optical switches and triggers for the manipulation of ion channels and pores*. Mol. BioSyst., 2007. **10**: p. 686-704.
39. Durham, B., et al., *Photochemistry of Ru(bpy)₃²⁺*. J. Am. Chem. Soc., 1982. **104**(18): p. 4803-4810.
40. Durham, B., et al., *Cis-trans photoisomerization in Ru(bpy)₂(OH₂)₂²⁺. Crystal structure of trans-[Ru(bpy)₂(OH₂)(OH)](ClO₄)₂*. J. Am. Chem. Soc., 1980. **102**(2): p. 600-607.
41. Felix, F., et al., *The electronic spectrum of tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(2+)*. J. Am. Chem. Soc., 1980. **102**(12): p. 4096-4102.
42. Van Houten, J. and R.J. Watts, *Temperature dependence of the photophysical and photochemical properties of the tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) ion in aqueous solution*. J. Am. Chem. Soc., 1976. **98**(16): p. 4853-4858.
43. Castellano, F.N., et al., *Creation of Metal-to-Ligand Charge Transfer Excited States with Two-Photon Excitation*. Inorg. Chem., 1997. **36**(24): p. 5548-5551.
44. Kirk, A.D., et al., *Picosecond flash photolysis and spectroscopy: Transition metal coordination compounds*. Chemical Physics Letters, 1976. **37**(2): p. 199-203.
45. Demas, J.N. and D.G. Taylor, *On the "intersystem crossing" yields in ruthenium(II) and osmium(II) photosensitizers*. Inorg. Chem., 1979. **18**(11): p. 3177-3179.
46. Van Houten, J. and R.J. Watts, *Photochemistry of tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) in aqueous solutions*. Inorg. Chem., 1978. **17**(12): p. 3381-3385.
47. Meyer, T.J., *Photochemistry of metal coordination complexes: metal to ligand charge transfer excited states*. Pure and Applied Chemistry, 1986. **58**(9): p. 1193-1206.
48. Pinnick, D.V. and B. Durham, *Temperature dependence of the quantum yields for the photoanation of Ru(bpy)₂L₂²⁺ complexes*. Inorg. Chem., 1984. **23**(24): p. 3841-3842.
49. Wilson, R.B. and E.I. Solomon, *Spectroscopic studies of photochemically important transition metal excited states. 2. The ¹T_{1g}, ³T_{1g}, and ⁵T_{2g} excited states of hexaamminecobalt(III)*. J. Am. Chem. Soc., 1980. **102**(12): p. 4085-4095.

50. Balzani, V. and V. Carassiti, *Photochemistry of Coordination Compounds*. 1970, London: Academic Press.
51. Suen, H.F., et al., *Photosubstitution reactions of terpyridine complexes of ruthenium(II)*. *Inorg. Chem.*, 1989. **28**(4): p. 786-791.
52. Sullivan, B.P., D.J. Salmon, and T.J. Meyer, *Mixed phosphine 2,2'-bipyridine complexes of ruthenium*. *Inorg. Chem.*, 1978. **17**(12): p. 3334-3341.
53. Ershov, A.Y., et al., *Spectral Properties of Ruthenium(II) Mixed-Ligands Complexes with 2,2'-Bipyridyl and Phosphines*. *Russian Journal of General Chemistry*, 2001. **71**(9): p. 1409-1412.
54. Caspar, J.V. and T.J. Meyer, *Photochemistry of MLCT excited states. Effect of nonchromophoric ligand variations on photophysical properties in the series cis-Ru(bpy)₂L₂²⁺*. *Inorg. Chem.*, 1983. **22**(17): p. 2444-2453.
55. Pinnick, D.V. and B. Durham, *Photosubstitution reactions of Ru(bpy)₂XYⁿ⁺ complexes*. *Inorg. Chem.*, 1984. **23**(10): p. 1440-1445.
56. Ershov, A.Y., et al., *Chemistry of Polypyridine Ruthenium Complexes: VII. Electronic Structure and Photochemistry of cis-[Ru(2,2'-bpy)₂(L)(Cl)]⁺ Complexes*. *Russian Journal of General Chemistry*, 2003. **73**(1): p. 135-140.
57. Bard, A.J. and L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*. 1980, New York: Wiley.
58. Miledi, R., I. Parker, and K. Sumikawa, *Fidia Research Foundation Neuroscience Award Lecture*, ed. J. Smith. Vol. 3. 1989, New York: Raven Press.
59. Dodsworth, E.S. and A.B.P. Lever, *Correlations between electrochemical potentials and optical charge transfer energies in ruthenium bipyridine derivatives*. *Chemical Physics Letters*, 1986. **124**(2): p. 152-158.
60. Lever, A.B.P., *Electrochemical parametrization of metal complex redox potentials, using the ruthenium(III)/ruthenium(II) couple to generate a ligand electrochemical series*. *Inorg. Chem.*, 1990. **29**(6): p. 1271-1285.
61. Keene, F.R., D.J. Salmon, and T.J. Meyer, *Oxidation of primary amines bound to bis(2,2'-bipyridine)ruthenium(II)*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1976. **98**(7): p. 1884-1889.
62. Zayat, L., et al., *A New Strategy for Neurochemical Photodelivery: Metal-Ligand Heterolytic Cleavage*. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003. **125**(4): p. 882-883.

63. Zhang, D., et al., *Structure and function of GABAC receptors: a comparison of native versus recombinant receptors*. Trends in Pharmacological Sciences, 2001. **22**(3): p. 121-132.
64. Trautinger, F., et al., *Stress proteins in the cellular response to ultraviolet radiation*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 1996. **35**(3): p. 141-148.
65. Wees, C.v.d., et al., *Nucleotide excision repair in differentiated cells*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2007. **614**(1-2): p. 16-23.
66. Svaasand, L.O. and R. Ellingsen, *Optical properties of human brain*. Photochemistry and Photobiology, 1983. **38**(3): p. 293-299.
67. Fowles, G.R., *Introduction to modern optics*. 2nd ed. 1989, New York: Dover Publications. viii, 328 p.
68. Pettit, D.L., et al., *Chemical Two-Photon Uncaging: a Novel Approach to Mapping Glutamate Receptors*. Neuron, 1997. **19**(3): p. 465-471.
69. Banerjee, A., et al., *Toward the Development of New Photolabile Protecting Groups That Can Rapidly Release Bioactive Compounds upon Photolysis with Visible Light*. J. Org. Chem., 2003. **68**(22): p. 8361-8367.
70. Shembekar, V.R., et al., *A Protecting Group for Carboxylic Acids That Can Be Photolyzed by Visible Light*. Biochemistry, 2005. **44**(19): p. 7107-7114.
71. Shembekar, V.R., et al., *Coumarin-Caged Glycine that Can Be Photolyzed within 3 μ s by Visible Light*. Biochemistry, 2007. **46**(18): p. 5479-5484.
72. Lima, R.G.d., et al., *Controlled nitric oxide photo-release from nitro ruthenium complexes: The vasodilator response produced by UV light irradiation*. Inorganica Chimica Acta, 2005. **358**(9): p. 2643-2650.
73. Bureau, I., G.M. Shepherd, and K. Svoboda, *Precise development of functional and anatomical columns in the neocortex*. . Neuron 2004. **42**(5): p. 789-801.
74. Callaway, E.M. and L.C. Katz, *Photostimulation using caged glutamate reveals functional circuitry in living brain slices*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1993. **90**(16): p. 7661-7665.
75. Shepherd, G.M., T.A. Polgruto, and K. Svoboda, *Circuit analysis of experience-dependent plasticity in the developing rat barrel cortex*. Neuron, 2003. **38**(2): p. 277-289.

76. Yoshimura, Y., J.L. Dantzker, and E.M. Callaway, *Excitatory cortical neurons form fine-scale functional networks*. Nature, 2005. **433**(7028): p. 868-873.
77. Katagiri, H., M. Fagiolini, and T.K. Hensch, *Optimization of somatic inhibition at critical period onset in mouse visual cortex*. Neuron, 2007. **53**(6): p. 805-812.
78. Pettit, D.L. and G.J. Augustine, *Distribution of functional glutamate and GABA receptors on hippocampal pyramidal cells and interneurons*. J. Neurophysiol., 2000. **84**(1): p. 28-38.
79. Wang, S.S. and G.J. Augustine, *Confocal imaging and local photolysis of caged compounds: dual probes of synaptic function*. Neuron, 1995. **15**(4): p. 755.
80. Rothman, S.M., et al., *Optical suppression of seizure-like activity with an LED*. Epilepsy Res., 2007. **74**(2-3): p. 201-209.
81. Bloodgood, B.L. and B.L. Sabatini, *Nonlinear regulation of unitary synaptic signals by CaV(2.3) voltage-sensitive calcium channels located in dendritic spines*. Neuron, 2007. **53**(2): p. 249-60.
82. Matsuzaki, M., et al., *Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons*. Nat Neurosci, 2001. **4**(11): p. 1086-92.
83. Matsuzaki, M., et al., *Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines*. Nature, 2004. **429**(6993): p. 761-766.
84. Araya, R., et al., *The spine neck filters membrane potentials*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006. **103**(47): p. 17961-17966.
85. Buhl, E.H., K. Halasy, and P. Somogyi, *Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites*. Nature, 1994. **368**(6474): p. 823-828.
86. Petroni, A., L.D. Slep, and R. Etchenique, *Ruthenium(II) 2,2'-Bipyridyl Tetrakis Acetonitrile Undergoes Selective Axial Photocleavage*. Inorg. Chem., 2008.
87. Bargawi, K.R., A. Llobet, and T.J. Meyer, *Synthetic design of MLCT excited states. Ligand-substituted, mono-2,2'-bipyridine complexes of ruthenium(II)*. J. Am. Chem. Soc., 1988. **110**(23): p. 7751-7759.
88. Lever, A.B.P., *Inorganic Electronic Spectroscopy*. 1985, New York: Elsevier. 864.

Capítulo 8 Trabajos publicados

Two-photon uncaging of neurochemicals using inorganic metal complexes

Volodymyr Nikolenko,^a Rafael Yuste,^a Leonardo Zayat,^b Luis M. Baraldo^b and Roberto Etchenique^{*b}

Received (in Cambridge, MA) 10th December 2004, Accepted 18th January 2005

First published as an Advance Article on the web 7th February 2005

DOI: 10.1039/b418572b

Neuroactive compounds can be photoreleased by means of two-photon excitation using a new kind of transition metal-based caged compound.

Phototriggers have increasingly been used in recent years. Their capability to release “caged” molecules through light excitation turns them into a powerful tool to deliver substances with a very high spatial and temporal resolution. One of the fields in which caged compounds are widely used is neurobiology. The possibility they offer to achieve subcellular localization without invasive electrodes or picosyringes together with the new techniques for optical imaging of neuronal activity open a new promising field of all-optical control of neuronal circuits. Caged compounds comprise two main parts: the molecule to be photoreleased and the protecting group. Nitrobenzyls are the most widely used protecting groups. In this kind of phototrigger, UV light (<350 nm) is used to break the relatively high-energy bond between the active compound and nitrobenzyl groups. For example, glutamate, GABA, glycine and other major neurotransmitters and their analogs have been caged likewise. In most studies, caged compound excitation is achieved by photon absorption at these wavelengths, with light being focused on the preparation through microscope optics. This method of excitation allows a precise delivery of the neurochemical with high lateral resolution.^{1–3} Unfortunately, the depth of the excitation cannot be precisely defined. This occurs because the excitation light beam is active not only at the single focal point but also in the adjacent bi-cone that triggers photorelease above and below this point.

In some recent works, however, a new strategy has been developed in order to obtain better spatial resolution in the axial direction. By means of a high instantaneous power laser it is possible to generate two-photon absorption on the irradiated molecule, a process frequently forbidden. As the probability of two-photon excitation scales with the square of light intensity, which itself diminishes nonlinearly with increasing distance from the focal point, the two-photon excitation can only occur in a very small zone at the focal point.^{4–6} Another advantage of this technique is that the excitation is generated using low energy IR photons rather than UV light. IR light scatters much less than UV-Vis light in living tissue. Two-photon release of the inorganic neurotransmitter NO has recently been achieved by Ford and coworkers.⁷

In our previous work,⁸ a new kind of caged compound based on metal coordination chemistry was presented. Ruthenium bipyridyl complexes can undergo ligand substitution when irradiated with

visible light, without any radical species being produced. Ligands can be entire molecules, such as the organic neurochemical 4-aminopyridine (4AP), a K⁺ channel blocker. This type of compounds uses visible rather than UV photons to promote uncaging, allowing at the same time chemical, redox and photophysical tuning if changes to any of the bipyridyl ligands are introduced.^{9,10}

We show in this paper that metal based caged compounds are also capable of undergoing two-photon excitation using very low energy IR photons, enabling their use as phototriggers for organic biologically-active compounds in new, highly precise, two-photon techniques.

The procedure to obtain [Ru(bpy)₂(4AP)₂]Cl₂ (Ru4AP) was described in our previous work.⁸ UV-Vis spectra in water were obtained with U-2000 spectrophotometer (Hitachi Instruments, Parsippany, NJ). The irradiation of the samples was made by means of a Chameleon pulsed laser from Coherent (Santa Clara, CA), at an average power of 900 mW at 725 nm and 350 mW at 950 nm, providing 120 fs pulses with a 90 MHz repetition rate. The focusing required to achieve high instantaneous IR intensity was attained using a custom-made laser scanning microscope.¹¹ Fluorescence spectra were taken using an Ocean Optics diode array spectrofluorometer (model USB2000).

As a preliminary test, a 100 μM solution of Ru4AP was irradiated by means of the pulsed laser focused approximately at the central point of an UV-Vis cuvette. The orange fluorescence of the sample was apparent only in the focal volume, indicating effective two-photon excitation. Fig. 1a shows the fluorescence

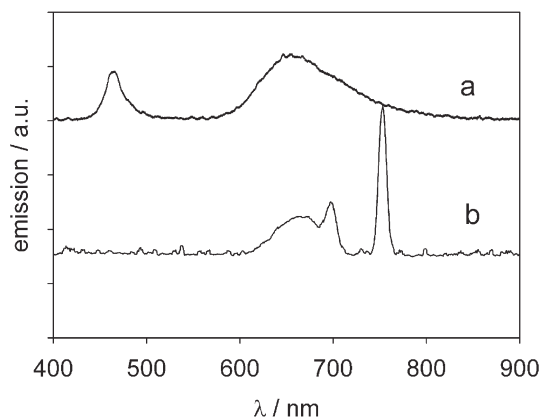


Fig. 1 Fluorescence spectra of Ru4AP in aqueous solution. (a) Excitation at 480 nm. (b) Excitation at 750 nm (two-photon absorption fluorescence). A spurious fluorescence at 690 nm from the laser is apparent.

*rober@qi.fcen.uba.ar

spectrum of Ru4AP with 1 photon excitation ($\lambda = 480$ nm). In order to take the two-photon fluorescence spectra, a glass micropipette was filled with approx. 1 μ L of a 250 mM aqueous solution of the complex, attached to the microscope slide, and irradiated with 725 to 950 nm light through a 0.8 NA 40 \times water immersion objective. The results can be seen in Fig. 1b.

A similar experiment was performed to detect the photocleavage of the complex. The pipette was irradiated for ~ 30 min and the resulting solution was dissolved in 2 mL of water. Fig. 2 shows the absorption spectra of Ru4AP before and after irradiation with high power 740 nm light. The irradiated sample shows a similar change to those samples irradiated at 473 nm that yield free 4AP and the aquo complex as cleavage products.⁵

In order to test that the decomposition was effectively a two-photon process, the beam was defocused, keeping the same average power. No change in absorption spectrum was seen in this case. The irradiation at 950 nm did not show noticeable cleavage activity using our experimental set-up.

Direct irradiation of Ru4AP crystals with 750 nm light also produced photobleaching of the fluorescence emission in the solid phase. This behavior is also compatible with the photocleavage of Ru4AP yielding free 4AP and the non-fluorescent aquo complex.

In order to obtain direct proof of 4AP two-photon photorelease, a capillary containing about 5 μ L of Ru4AP 500 mM in D₂O was irradiated over 1 h with a pulsed Ti-Sapphire laser through a 10 \times microscope objective. A NMR spectrum of this irradiated sample was taken with a Bruker 500 MHz spectrometer. A non irradiated blank was also measured. The results are shown in Fig. 3. The doublets that appear at 6.87 ppm and 8.08 after 2P irradiation are due to the hydrogens of the free 4AP. The identity of this product was verified by addition of free 4AP as internal standard. Just one pair of doublets is also seen in this case, showing that the unique photoproduct was 4AP. The slight shift in the doublets when 4AP concentration is increased is due to the change in pH of the solution.

Finally, irradiation of Ru4AP with 365 nm light was also performed to compare the two-photon process with the one-photon decomposition. A 100 W Xe lamp was filtered with a water/CuSO₄ filter to stop IR, a lowpass at 325 nm and a bandpass centered at 365 nm and focused on a quartz cuvette. A ferrioxalate actinometry was performed to measure the radiant power of this source, which was found to be 3.73 mW.

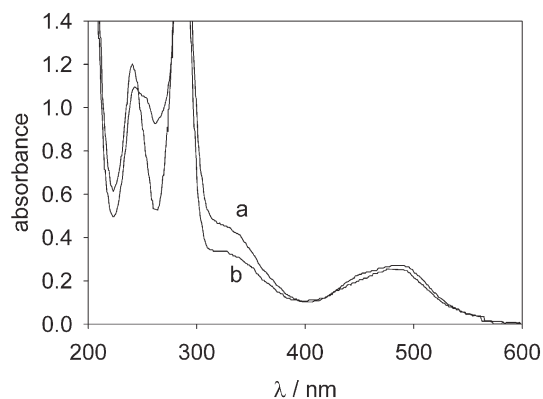


Fig. 2 Absorption spectra of Ru4AP in aqueous solution before (a) and after irradiation (b) with a 740 nm highly focused beam.

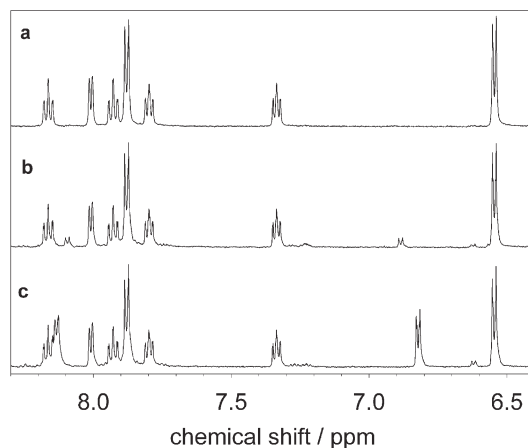


Fig. 3 (a) Ru4AP NMR spectrum before two-photon irradiation. (b) Ru4AP NMR spectrum after 1 h 2P irradiation ($P_{\text{avg}} = 300$ mW, $\lambda = 800$ nm, $\tau = 100$ fs, $f = 80$ MHz) through a 10 \times objective. (c) The same spectrum after 4AP addition as internal standard. The small shift in free 4AP doublets between spectra (b) and (c) are due to the change in pH produced by the 4AP added.

A 250 mM solution of Ru4AP was irradiated using this source and the UV-Vis spectra were taken at different intervals. The photodecomposition is shown in Fig. 4. The presence of two isosbestic points suggest that only two species are involved. Although the final spectrum resembles the initial one, the differences are clearly noticeable. The final spectrum is similar to both that obtained by irradiation at 473 nm and by two-photon uncaging (Fig. 2b), all corresponding to the monoquo complex.⁸

Complete spectral analysis allowed us to measure the degree of conversion and thus the quantum yield of photocleavage which was found to be $\phi_{365} = 0.049$, slightly higher than $\phi_{473} = 0.029$.⁸

In conclusion, we have demonstrated that two-photon uncaging of 4AP from its ruthenium bipyridyl complex is possible in physiological conditions, allowing the use of this new family of caged compounds with two-photon microscopes. The irradiation at 720 nm, which excites the 360 nm band, leads to photocleavage while the activity at 950 nm was not noticeable, probably due to a very low two-photon action cross section at this wavelength. Two-photon fluorescence was detected in solution or solid form at

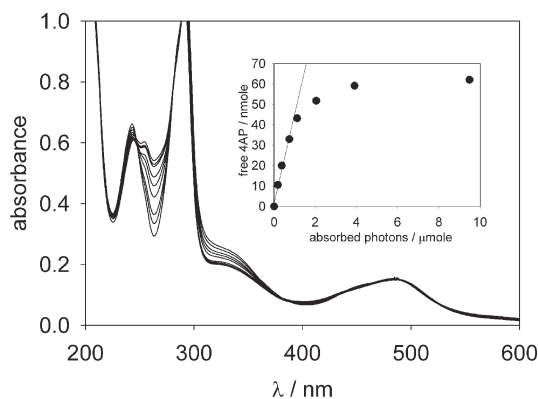


Fig. 4 Absorption spectra of 22.4 μ M aqueous Ru4AP irradiated at 365 nm. Inset: Conversion plot using data from absorption spectra through complete spectral analysis.

720 nm, 800 nm and 950 nm excitation. The photoproducts are free 4AP and the complex $[\text{RUBY}_2(\text{H}_2\text{O})(4\text{AP})]^{2+}$, as shown by UV-Vis and NMR spectra. The action cross section for the uncaging of 4AP was not precisely measured, but a gross estimation based in the NMR 2P photolysis indicates that it is in the order of 0.01 to 0.1 GM at 800 nm.

We thank the invaluable collaboration of Darío Kunik and Oscar Martínez that made this work possible. LB and RE are staff of CONICET. RY and VN were supported by the NIH, the HFSP and the New York STAR Center for High Resolution Imaging of Functional Neural Circuits. This work was supported by Fundación Antorchas and the Fulbright Commission.

Volodymyr Nikolenko,^a Rafael Yuste,^a Leonardo Zayat,^b Luis M. Baraldo^b and Roberto Etchenique^{*b}

^aDepartment of Biological Sciences, Columbia University, New York, NY 10027, USA

^bDepartamento de Química Inorgánica, INQUIMAE, Facultad de

Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria Pabellón 2 C1428EHA Buenos Aires, Argentina.
E-mail: rober@qi.fcen.uba.ar

Notes and references

- 1 E. M. Callaway and L. C. Katz, *PNAS*, 1993, **90**, 7661.
- 2 D. Schubert, J. F. Staiger, N. Cho, R. Kötter, K. Zilles and H. J. Luhmann, *J. Neurosci.*, 2001, **21**, 3580.
- 3 E. M. Callaway and R. Yuste, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2002, **12**, 587.
- 4 M. Matsuzaki, N. Honkura, G. C. R. Ellis-Davies and H. Kasai, *Nature*, 2004, **429**, 761.
- 5 W. Denk, J. H. Strickler and W. W. Webb, *Science*, 1990, **248**, 73.
- 6 S. H. Wang, L. Khiroug and G. J. Augustine, *PNAS*, 2000, **97**, 8635.
- 7 S. Weckler, A. Mikhailovsky and P. C. Ford, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 13566.
- 8 L. Zayat, C. Calero, P. Albores, L. Baraldo and R. Etchenique, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 882.
- 9 E. S. Dodsworth and A. B. P. Lever, *Chem. Phys. Lett.*, 1986, **124**, 152.
- 10 D. V. Pinnick and B. Durham, *Inorg. Chem.*, 1984, **23**, 1440.
- 11 V. Nikolenko, B. Nemet and R. Yuste, *Methods*, 2003, **30**, 3.

Ruthenium(II) Bipyridyl Complexes as Photolabile Caging Groups for Amines

Leonardo Zayat, Marcelo Salierno, and Roberto Etchenique*

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física, INQUIMAE, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria Pabellón 2, AR1428EHA Buenos Aires, Argentina

Received August 1, 2005

The synthesis and characterization of a series of ruthenium bis(bipyridine) complexes where the inorganic moiety acts as a photolabile protecting group is described. Complexes of the type $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}_2]^+$ where $\text{bpy} = 2,2'$ -bipyridine and $\text{L} =$ butylamine, γ -aminobutyric acid, tyramine, tryptamine, and serotonin were studied by nuclear magnetic resonance, cyclic voltammetry, and electronic absorption spectroscopy. In all cases, ligands are coordinated by the amine group. The complexes are stable in water for several days and deliver one molecule of ligand upon irradiation with visible light (450 nm). These properties make them suitable for their use as biological caged compounds.

Introduction

Caged compounds are powerful experimental tools in physiology since they provide a means for rapid and localized delivery of bioactive substances.¹ In the last few years, a number of photolabile protecting groups have been developed for the caging of a variety of biomolecules.² Chemical bonds established between bioactive ligands and proper protecting groups should be strong enough to be water-stable and weak enough to be broken with low-energy, tissue-innocuous photons. Most available caged compounds are based on the use of nitrobenzyls or nitrophenyls as protecting groups.² These caged compounds show releasing wavelengths below 350 nm, which can damage living tissue. It is also desirable for protecting groups to be easily derivatizable in order to allow versatile interaction with inorganic or organic structures such as polymers or cell membranes.

In a recent work, we presented the use of metal complexes as photolabile protecting groups for biomolecules, giving birth to a new family of inorganic caged compounds.³ The first member of that family was the potassium channel

blocker 4-aminopyridine (4AP) caged compound $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{AP})_2]^{2+}$. The coordination bond between the ruthenium and the aromatic nitrogen of 4AP is water-stable and can be broken with visible light around 470 nm. The bipyridines provide easy chemical derivatization. The general relevance of the advantages conveyed by inorganic caged compounds relies on the diversity of biomolecules that may be coordinated to the metal center.

On this occasion, we show that ruthenium polypyridines can also act as protecting groups for amines, extending the scope of action for this class of caged compounds. We report the synthesis and characterization of ruthenium bis(bipyridine) caged compounds of the neurotransmitters serotonin (5HT) and γ -aminobutyric acid (GABA), together with those of the analogues tryptamine, butylamine, and tyramine (see Chart 1).

Experimental Section

All reagents were commercially available and used as received. $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$ was synthesized according to the literature.⁴ The UV–vis spectra were taken with a HP8452A diode-array spectrometer. NMR spectra were obtained using a 500 MHz Bruker AM-500. Fluorescence measurements were made with a PTI Quantamaster spectrofluorometer.

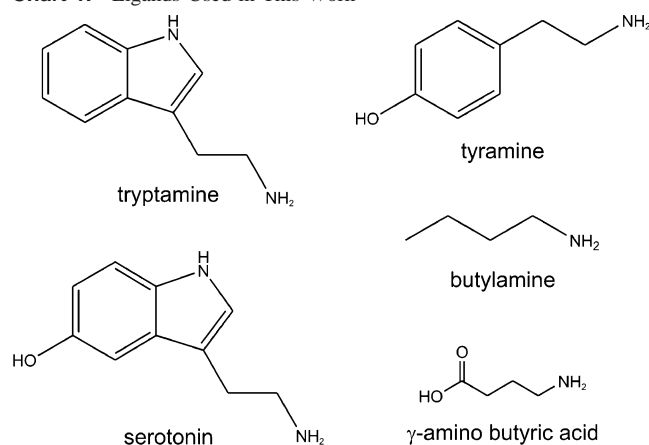
Voltgrams were obtained in $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\text{M TBAPF}_6$ using a three-electrode potentiostat based on an operational amplifier TL071

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: rober@qi.fcen.uba.ar.

- (1) Adams, S. R.; Tsien, R. Y. *Annu. Rev. Physiol.* **1993**, *55*, 755.
- (2) (a) McCray, J. A.; Trentham, D. R. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **1989**, *18*, 239. (b) Wilcox, M.; Viola, R. W.; Johnson, K. W.; Billington, A. P.; Carpenter, B. K.; McCray, J. A.; Guzikowski, A. P.; Hess, G. P. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1585. (c) Shembekar, V. R.; Chen, Y.; Carpenter, B. K.; Hess, G. P. *Biochemistry* **2005**, *44*, 7107.
- (3) Zayat, L.; Calero, C.; Albores, P.; Baraldo, L.; Etchenique, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 882.

- (4) Sullivan, B. P.; Salmon, D. J.; Meyer, T. J. *Inorg. Chem.* **1978**, *17*, 3334.

Chart 1. Ligands Used in This Work



in current-to-voltage configuration⁵ and an acquisition software written in QB 4.5. A Pt wire with a diameter of 500 μm was used as the work electrode. All syntheses were done by degassing the solutions with N_2 prior to heating to prevent oxidation of the Ruthenium aquo complexes. Visible light irradiation of samples was performed using a Luxeon Star III Royal Blue high power light-emitting diode (LED).

Synthesis. 1. $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L})_2](\text{PF}_6)_2$ for L = Butylamine, Tryptamine, Tyramine, and Serotonin (5HT). $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$ (100 mg) was suspended in 10 mL of distilled water; N_2 was bubbled for 15 min, and the suspension was heated at 80 $^\circ\text{C}$ until total dissolution. The formation of the $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ complex was determined by its band at 480 nm.⁶ After formation of the diaquo complex, 5–10 equivalents of the ligand dissolved in a small amount of EtOH was added, and the solution was heated until no further changes in the UV–vis spectrum at pH 12 were apparent. The solution was filtered to remove any insoluble particles and precipitated with NH_4PF_6 saturated solution after cooling. The precipitate was washed with several portions of cold water. NMR (acetone- d_6), L = butylamine: ^1H δ 0.65 (t, 6H), 1.04 (m, 2H), 1.37 (m, 2H), 1.96 (m, 2H), 2.05 (m, 4H), 2.13 (m, 2H), 3.86 (t, 2H), 4.06 (t, 2H), 7.32 (t, 2H), 7.78 (d, 2H), 7.94 (t, 2H), 7.97 (t, 2H), 8.33 (t, 2H), 8.60 (d, 2H), 8.79 (d, 2H), 9.46 (d, 2H).

2. $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L})_2]\text{Cl}_2$ for L = Butylamine, Tryptamine, Tyramine, and Serotonin (5HT). The PF_6^- salt was dissolved into a minimum amount of acetone. Drops of tetrabutylammonium chloride saturated in acetone were added until total precipitation of the chloride salt. The precipitate was washed with several portions of acetone and dried. NMR (D_2O), L = tyramine: ^1H δ 1.92 (m, 2H), 2.28 (m, 2H), 2.45 (m, 4H), 3.07 (t, 2H), 3.19 (t, 2H), 6.68 (d, 4H), 6.73 (d, 4H), 7.05 (t, 2H), 7.47 (d, 2H), 7.68 (t, 2H), 7.75 (t, 2H), 8.13 (t, 2H), 8.24 (d, 2H), 8.39 (d, 2H), 8.66 (d, 2H). NMR (D_2O), L = serotonin: ^1H δ 1.91 (m, 2H), 2.41 (m, 2H), 2.62 (m, 4H), 2.88 (t, 2H), 3.13 (t, 2H), 6.31 (s, 2H), 6.85 (dd, 2H), 6.90 (s, 2H), 6.94 (t, 2H), 7.29 (d, 2H), 7.33 (d, 2H), 7.46 (t, 2H), 7.61 (t, 2H), 7.85 (d, 2H), 7.87 (d, 2H), 7.91 (t, 2H), 8.54 (d, 2H). NMR (D_2O), L = tryptamine: ^1H δ 2.02 (m, 2H), 2.37 (m, 2H), 2.75 (m, 4H), 3.05 (t, 2H), 3.12 (t, 2H), 7.02 (s, 2H), 7.04 (t, 2H), 7.12 (m, 4H), 7.39 (m, 4H), 7.42 (t, 2H), 7.56 (d, 2H), 7.73 (t, 2H), 7.94 (t, 2H), 8.03 (d, 2H), 8.06 (d, 2H), 8.49 (d, 2H).

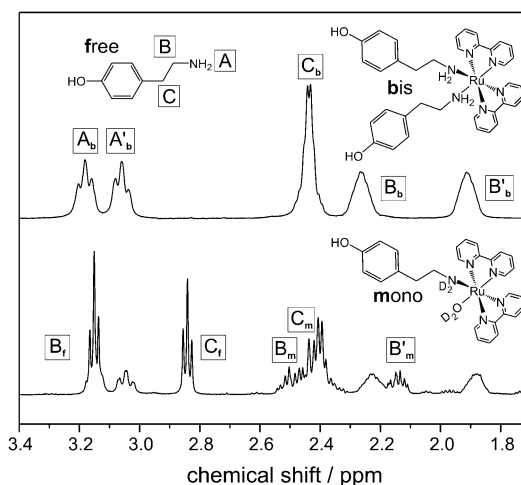


Figure 1. ^1H NMR spectra of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{tyr})_2]^{2+}$ in D_2O showing tyramine signals. The upper trace shows the disubstituted complex in the dark (bis, b). The lower trace shows the partial photolysis of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{tyr})_2]^{2+}$ with visible light around 450 nm, after proton exchange, yielding the monosubstituted complex $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{tyr})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (mono, m) and free tyramine (free, f).

3. $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{GABA})_2](\text{PF}_6)_2$. The previous procedure was followed, but precipitation was achieved by using 60% HPF_6 in water and leaving the suspension on ice for 1 h. No further anion changes were performed. NMR (D_2O): ^1H δ 1.65 (m, 4H), 1.85 (m, 2H), 2.03 (m, 2H), 2.17 (t, 4H), 3.12 (t, <1H), 3.27 (t, <1H), 7.20 (t, 2H), 7.66 (d, 2H), 7.88 (t, 2H), 7.93 (t, 2H), 8.29 (t, 2H), 8.42 (d, 2H), 8.62 (d, 2H), 9.16 (d, 2H).

Results and Discussion

The identity of the complexes and their irradiation photoproducts were inferred by ^1H NMR. Both acetone- d_6 and D_2O solutions produced the free ligands under irradiation with 450 nm light. For acetone studies, the PF_6^- salts were used, while chloride salts were preferred in D_2O measurements. The only exception was the GABA complex, in which the PF_6^- salt can be solubilized in D_2O at neutral or basic pH. The photocleavage of the complexes was also studied by ^1H NMR, and the results confirmed that the unique photoproducts were the monoaquo complex and the free amine ligand, with no detectable side products. This can be seen in Figure 1. The fact that there are no side products is very important in terms of the application of these compounds to physiological studies.

In the aromatic region (see Supporting Information), the 8 signals that correspond to the bipyridyl protons split into 16 after irradiation, showing that the symmetric bis-substituted complex leads to an asymmetric monosubstituted product. Figure 1 (top) shows that the signals of the methylene B in the aliphatic chain of the bis-substituted complex appear at 1.92 and 2.28 ppm, displaying different chemical environments for each proton. The signals of the methylene C appear at 2.45 ppm. On the other hand, in the free tyramine, these two methylene signals appear at 3.15 and 2.84 ppm, respectively (Figure 1, bottom). The mono-substituted complex shows intermediate displacements for these signals.

Even in D_2O , the signals of the amine protons of butylamine, tyramine, tryptamine, and 5HT are visible and

(5) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*; Wiley: New York, 1980; Chapter 13; ISBN 0-471-04372-9.

(6) Durham, B.; Wilson, S. R.; Hodgson, D. J.; Meyer, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 600.

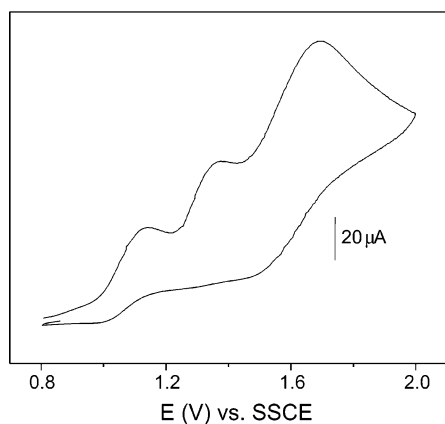


Figure 2. Cyclic voltammetry of native $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{tyr})_2]^{2+}$ at 100 mV/s on Pt wire electrode in CH_3CN containing 100 mM TBAPF_6

Table 1. Redox Potentials for All the Complexes in CH_3CN Containing 100 mM TBAPF_6 at 298 K^a

complex	$E_{1/2}$ (V)		
	1st	2nd	3rd
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{tyr})_2]^{2+}$	1.10	1.38p	1.69p
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{buNH}_2)_2]^{2+}$	1.04	1.25	1.48
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{GABA})_2]^{2+}$	1.06p	1.25	1.55p
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{tryp})_2]^{2+}$	1.11p	1.36p	1.67p
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{5HT})_2]^{2+}$	1.03p	1.11p	1.64p

^a Values are shown vs SSCE. $dE/dt = 100$ MV/s. In the cases where the reversibility is poor, peak potentials (p) are reported

integrate for four protons in the bis-substituted complex. This behavior indicates that the amine group is involved in the coordination to ruthenium, in a way that no further protonation is possible and no proton exchange can occur. If the synthesis is done in deuterated water, proton exchange on the ligand's free amine occurs prior to the coordination, so the proton signals do not appear in the NMR spectrum (see Supporting Information). That the coordination bond is established through the amine group is consistent with the fact that nonaminic carboxylic acids such as butyric, propionic, and benzoic do not coordinate to the metal in aqueous solutions.

After irradiation, the signals of the amine protons in the monosubstituted complex are apparent at 2.97 and 2.63 ppm, but they disappear after a few hours in the dark, suggesting that, in the monoquo complexes, some equilibrium via labilization of the ligand is taking place (see Supporting Information). A similar result was seen in the GABA complex, but in this case, some proton exchange exists even in the bis-GABA compound. ¹H NMR spectra of all the studied compounds are given as Supporting Information.

Cyclic voltammetry (CV) was used to examine the electrochemical behavior of the complexes. The redox potential for the $\text{Ru}^{2+}/\text{Ru}^{3+}$ couple and subsequent oxidation of the amines in the bis-tyramine complex can be seen in Figure 2.

The results of all the complexes studied in this work are shown in Table 1. We obtained the expected values for the $\text{Ru}^{2+}/\text{Ru}^{3+}$ couples, which are in agreement with previous studies of similar compounds that assign the first oxidation wave to the bis-amine complex, the second one to the

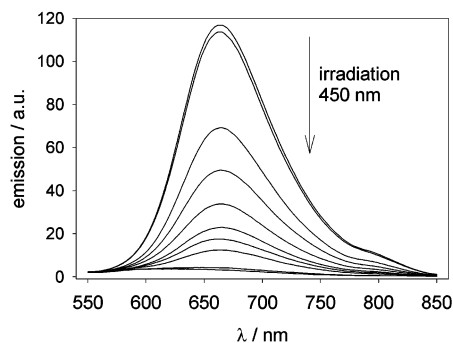


Figure 3. Fluorescence of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{tyr})_2]^{2+}$ in water at pH 7 at different irradiation times; excitation wavelength = 450 nm.

Table 2. Extinction Coefficients at Maximum Absorption, Quantum Yield of Emission, and Wavelength of Maximum Emission in Water at 293 K

complex	$\epsilon_{\text{max}}/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	ϕ	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{tyr})_2]^{2+}$	8940	1.9×10^{-3}	664
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{buNH}_2)_2]^{2+}$	7910	9.7×10^{-4}	670
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{GABA})_2]^{2+}$	8955	1.5×10^{-3}	674
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{tryp})_2]^{2+}$	9720	1.8×10^{-3}	666
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{5HT})_2]^{2+}$	9880	1.7×10^{-3}	662

amine–nitrile complex, and the third one to the bis-nitrile complex.⁷

The $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}_2]^{2+}$ complexes usually present fluorescence,⁸ and the involved electronic states structure is related with their photoreleasing capabilities. We have measured fluorescence in all the bis-amine complexes, with the quantum efficiency being between 10^{-3} and 2×10^{-3} .

$[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ ($\phi = 0.042$) was used as an emission standard given its absorption overlap with the analyzed compounds. Figure 3 shows the emission spectra in aqueous solution for $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{tyr})_2]^{2+}$ at increasing times of irradiation. The monoquo complex does not present fluorescence, suggesting the charge transfer (CT) excited state is decaying completely through nonradiative paths, possibly through solvent-coupled vibrations via the aquo ligand.

The other complexes investigated shared the same behavior. The corresponding data is presented in Table 2.

The absorption spectra of all synthesized complexes were similar, showing the metal-to-ligand charge transfer (MLCT) band in the visible region at 488 nm. In all the studied compounds, irradiation on the MLCT bands led to the heterolytic cleavage of one of the ligands with quantum efficiencies ~ 0.03 , which is high for the release of a biomolecule at this mild wavelength. In comparison, the quantum efficiency for the release of pyridine in $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{py}_2]^{2+}$ is ~ 10 times greater⁹ because of the lower basicity of the ligand, which shifts the MLCT band to higher energies, promoting an easier population of the dissociative d–d state. The monosubstituted complexes, in which a solvent molecule replaces the original ligand, do not present significant photodecomposition, as can be deduced from the isosbestic points appearing in all the irradiation spectra.

(7) Keene, F. R.; Salmon, D. J.; Meyer, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 1884.

(8) Kaspar, J. V.; Meyer, T. J. *Inorg. Chem.* **1983**, *22*, 2444.

(9) Pinnick, D. V.; Durham, B. *Inorg. Chem.* **1984**, *23*, 1440.

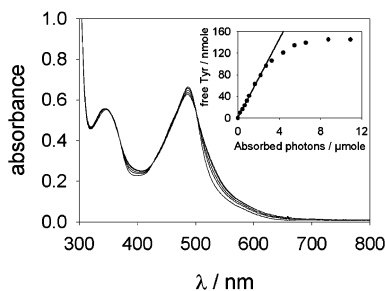


Figure 4. UV-vis spectra of an aqueous solution of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{tyr})_2]^{2+}$ at neutral pH, under irradiation at 450 nm. The inset shows the degree of photoconversion.

To determine the quantum efficiency of the photouncaging, series of UV-visible spectra of the complexes in aqueous solution were taken after irradiation at 450 ± 20 nm, using a high-power blue LED. The solutions were made by dissolving the PF_6^- salts into a minimal drop of acetone and further addition of distilled water or by dissolving the chloride salts directly into water. Both procedures gave the same results. The spectra for $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{tyr})_2]\text{Cl}_2$ is shown in Figure 4. From the analysis of the complete spectra, it is possible to determine the degree of advance of the photo-reaction. The inset of Figure 4 depicts the results of this calculation.

As can be noticed from Figure 4, the final spectra of the bis-substituted and monosubstituted complexes are almost identical in aqueous solution at neutral pH. The very small differences between the two species make the uncaging analysis quite difficult, forcing every source of noise to be avoided.

If the pH of the irradiated solution is increased, the acidic aqueous complex loses a proton, yielding the hydroxyl complex $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{L})(\text{OH})]^+$. This species presents a characteristic red-shifted spectrum that is readily distinguishable from that of the disubstituted species. The uncaging results for $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{tyr})_2]^{2+}$ at pH 12 are shown in Figure 5.

The quantum efficiency of photodissociation, obtained from the initial slope of the photoconversion plots, seems to be slightly dependent on the pH in the studied range. The values corresponding to all the complexes synthesized are depicted in Table 3.

Although many biomolecules contain the amine group as an important active part, most photolabile protecting groups developed until now are limited to the caging of carboxylates. The use of ruthenium bipyridine fragments as caging groups for amines offers a general way for making phototriggers of these relevant biomolecules. The tryptamine and the 5HT

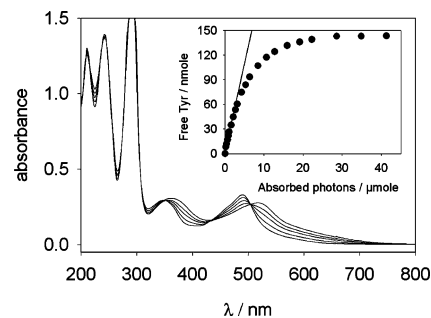


Figure 5. UV-vis spectra of an aqueous solution of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{tyr})_2]^{2+}$ at pH 12, under irradiation at 450 nm. The inset shows the degree of photoconversion.

Table 3. Quantum Yield of Uncaging in Aqueous Solution at 293 K

complex	ϕ pH 7	ϕ pH 12
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{tyr})_2]^{2+}$	0.028	0.016
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{buNH}_2)_2]^{2+}$	0.044	0.016
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{GABA})_2]^{2+}$	0.036	0.032
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{tryp})_2]^{2+}$	0.018	0.016
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(5\text{HT})_2]^{2+}$	0.023	

complexes were tested in an acute preparation of leech (*Hirudo medicinalis*) ganglia in concentrations up to 1 mM in a isoosmotic saline solution³ The compounds were not toxic in these conditions according to the nontoxicity exhibited by the first complex of this series $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(4\text{AP})_2]\text{Cl}_2$.

It has not escaped our notice that caged compounds of dopamine, histamine, or octopamine, molecules of high biological relevance, may be obtained this way. Such synthesis are currently being pursued.

Generally speaking, the syntheses here presented are very convenient, since they can be performed in aqueous solution in a one-step batch from the amine to be caged and the $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$ precursor. The fact that active caged compounds present fluorescence while their photoproducts do not allows the continuous monitoring of the bulk and local concentrations during the experiment.

Acknowledgment. This research was supported by the National Agency for Science and Technology Promotion (ANPCyT 14013) and the University of Buenos Aires (UBACyT X037). R.E. is a member of the CONICET.

Supporting Information Available: ¹H NMR spectra of all the studied compounds can be found in the Supporting Information. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

IC0512983

DOI: 10.1002/cbic.200700354

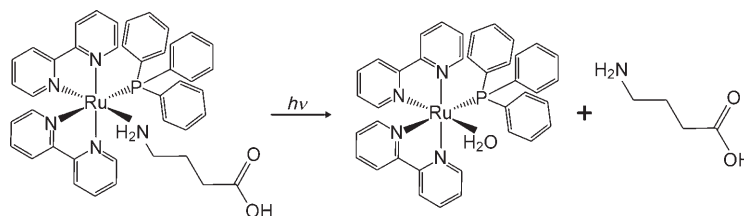
A New Inorganic Photolabile Protecting Group for Highly Efficient Visible Light GABA Uncaging

Leonardo Zayat,^[a] María G. Noval,^[a]
 Julieta Campi,^[a] Cecilia I. Calero,^[b]
 Daniel J. Calvo,^[b] and Roberto Etchenique^{*[a]}

The field of cage compound design is continuously advancing, driven by the successful application of these tools in different biological experimental settings.^[1] One area in which these compounds have proved particularly useful is neuroscience, where the rapid and highly localized release of neuroactive molecules that they permit has produced relevant results in studies of receptor distribution,^[2] channel kinetics^[3] and network circuitry.^[4] Ideal caging groups should be noncytotoxic, establish enduring bonds with the biomolecules they protect, effectively block biomolecule activity when bonded, and undergo efficient removal by low-energy photons in order to minimize photodamage. Most photolabile protecting groups developed so far are organic compounds. Substituted nitrobenzyl and nitroindolyl ester derivatives of many neuroactive substances including γ -aminobutyric acid (GABA), the main inhibitory neurotransmitter in the brain, have been synthesized and characterized both chemically and biologically.^[5] These protecting groups are removed upon irradiation with potentially harmful ultraviolet light, with uncaging quantum yields under 0.2. The longest photolization wavelength for an organic protecting group so far reported is 400 nm.^[6]

In the last few years we have developed a new series of caged compounds that make use of ruthenium polypyridines as protecting groups. The link between the protecting group and the biomolecule is established through a coordination bond that can be broken with visible light. In the past, we have prepared caged compounds of the form $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}_2]^{2+}$ (bpy: 2,2'-bipyridine; L: 4-aminopyridine (a potassium channel blocker),^[7] serotonin (a neuromodulator) or GABA^[8]). The quantum efficiencies of photorelease measured for these com-

pounds lie between 0.02 and 0.04 at 450 nm. In this work we report the synthesis, chemical properties and preliminary biological testing of an improved inorganic caged GABA compound in which one of the monodentate ligands has been replaced by a triphenylphosphine (PPh_3) moiety. The new caged compound, $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$, releases the neurotransmitter with a quantum yield above 0.2 at 450 nm (Scheme 1).



Scheme 1. The scheme depicts the release of GABA after irradiation of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$.

Once synthesized, the compound was subjected to ^1H NMR spectroscopy in order to verify its chemical structure and purity, as well as to determine the absence of free GABA, either as a synthesis residue or arising from product decomposition in the solid state. The aromatic region of the spectrum showed the signals predicted for this complex alone (see the Supporting Information). The signals of coordinated GABA were found in the aliphatic portion of the spectrum (Figure 1).

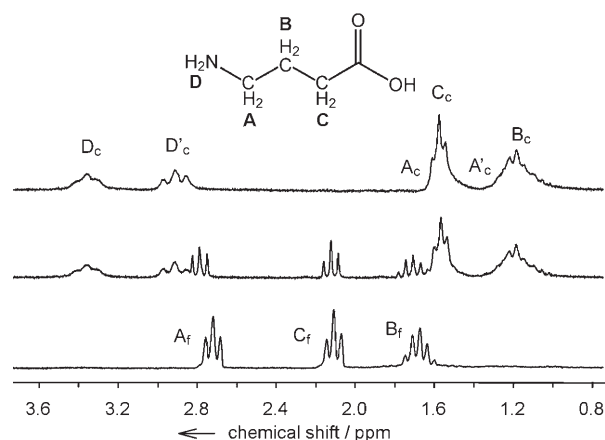


Figure 1. ^1H NMR spectra of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ in D_2O . The upper trace shows the signals of coordinated (c) GABA in the dark complex. The middle trace corresponds to partial photolysis, and the lower trace shows the signal of free (f) GABA after total photolysis.

As found previously,^[8] amine protons that belong to coordinated nitrogens do not undergo exchange for deuterium in D_2O ; this shows that the bond is stable in water since nitrogen's free pair is restricted to the coordination bond. The upper trace in Figure 1 corresponds to the sample in the dark, and shows no signals other than those of coordinated GABA. The middle trace belongs to the same sample irradiated with a tungsten lamp to achieve partial photolysis, whilst exhaustive

[a] L. Zayat, M. G. Noval, J. Campi, Prof. Dr. R. Etchenique
 Departamento de Química Inorgánica Analítica
 y Química Física, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
 Universidad de Buenos Aires
 Intendente Güiraldes 2160, Ciudad Universitaria
 C1428EGA Buenos Aires (Argentina)
 Fax: (+54) 11-4576-3341
 E-mail: rober@qi.fcen.uba.ar

[b] C. I. Calero, D. J. Calvo
 Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética
 y Biología Molecular, Consejo Nacional de Investigaciones
 Científicas y Técnica, Vuelta de Obligado 2490
 1428 Buenos Aires (Argentina)
 Fax: (+54) 11-4786-8578

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.chembiochem.org> or from the author.

photolysis is shown in the lower trace. After irradiation, the signals of free GABA become apparent. These signals increased in intensity after direct addition of solid GABA to the sample. No photoproducts other than $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ and GABA were detected in the irradiated sample. The NMR analysis confirmed the 1:1 stoichiometry of the photoreaction.

The electrochemical behaviour of the complex was studied by cyclic voltammetry. We found three oxidation peaks at 1.67, 2.11, 2.34 V vs. NHE. This number of processes has also already been described for bis-primary amine complexes of ruthenium.^[9] They are assigned to the $\text{Ru}^{\text{II}}/\text{Ru}^{\text{III}}$ couples of the amine complex, its oxidation to the imine complex and finally to the nitrile complex, respectively. Similar results with lower potentials had been obtained for $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{GABA}_2]^+$.^[8] The fact that $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ shows higher oxidation potentials is explained by the phosphine's lower basicity. These high values should prevent any cellular component from oxidizing the complex. To assess the photoreleasing performance of the compound, a series of UV/Vis absorption spectra were acquired while photolysis was conducted until all GABA was released. Superimposed spectra obtained from the photoreaction at neutral pH are depicted in Figure 2. The unvarying

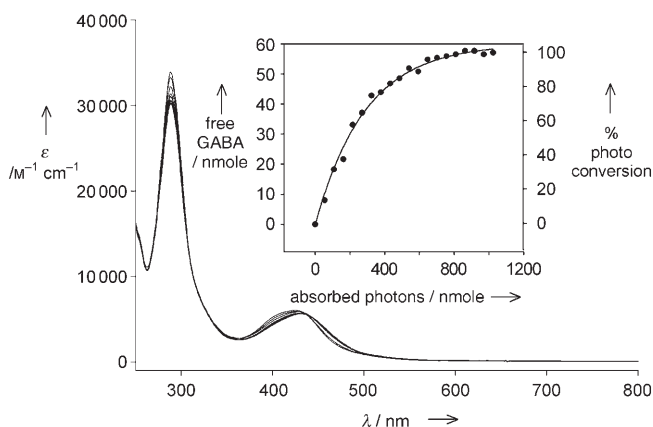


Figure 2. UV/Vis spectra of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ in aqueous solution at pH 7, with irradiation at 450 nm. The inset shows the evolution of the photoreaction.

band at 290 nm is assigned to $\pi^* \leftarrow \pi$ transitions localized at the bipyridines.^[10] The initial spectrum shows a maximum at 425 nm that corresponds to the metal-to-ligand charge transfer (MLCT) band. Absorption at this band populates a triplet state that is thermally activated to a dissociative d-d state, which leads to photoproducts.^[11] Over the course of the reaction, the MLCT band is displaced to 430 nm in the $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ complex. The small differences between the initial and final spectra, associated with the similar basicities of H_2O and NH_2R , were enough to compute reaction progress, which is represented in the inset. As each molecule of the aqua complex corresponds to one of GABA, the production of the latter can be denoted.

Photolysis was also carried out at pH 12. Under these conditions, the reaction produces $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{OH}]^+$ instead of

$[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ as one of the photoproducts. The MLCT band of the former is red-shifted to 450 nm, making differences with the starting species more evident. Stacked electronic spectra, together with the degree of photoconversion, are shown in Figure 3. Quantum yields of uncaging obtained from

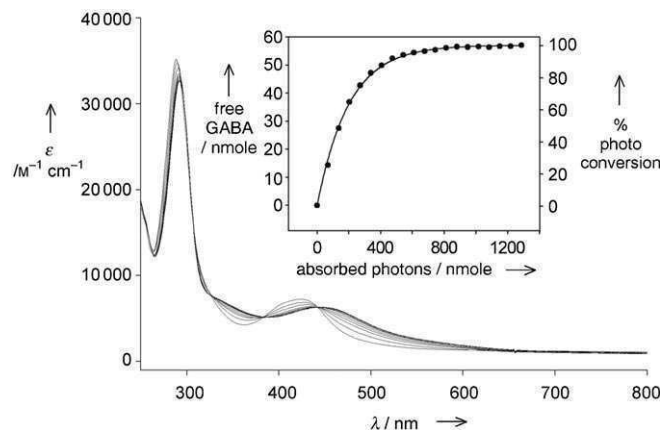


Figure 3. UV/Vis spectra of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ in aqueous solution at pH 12, with irradiation at 450 nm. The inset shows the evolution of the photoreaction.

photolysis data can be found in Table 1, together with those of previously reported $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{GABA}_2]^+$ ^[8] and commercially available γ -aminobutyric acid α -carboxy-2-nitrobenzyl ester (O-(CNB-caged) GABA).^[5b] Extinction coefficients at wavelength of maximal absorption are also provided.

Table 1. Wavelength of maximal absorption, extinction coefficient at maximal absorption, irradiation wavelength and quantum yield of photo-release of various caged forms of GABA.

Compound	pH	λ_{max} [nm]	ϵ_{max} [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]	λ_{irrad} [nm]	$\phi\lambda_{\text{irrad}}$
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$	7	424	6400	450	0.21
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$	12	424	6400	450	0.29
$[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{GABA}_2]^{2+}$	7	488	8955	450	0.036
O-(CNB-caged) GABA	7	262	4500	308	0.16

It has already been established for $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{XY}]^{2+}$ complexes that higher energies for the MLCT band correlate positively to higher quantum yields of photosubstitution,^[12] as is the case for $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ vs. $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{GABA}_2]^{2+}$. The ruthenium phosphine protecting group is removed with a quantum yield that surpasses that of the nitrobenzyl ester group, while the active absorption wavelength is kept in the visible range. The combination of extinction coefficients and quantum yields shows that $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ makes good use of incident photons, minimizing the amount of light needed to release a certain number of GABA molecules.

In order to study the physiological value of GABA photorelease from $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$, experiments were performed in frog oocytes expressing GABA_C receptors. These receptors

are ligand-gated ion channels that open a chloride (Cl^-) selective pore upon binding of GABA.^[13] Thus, at membrane potentials near to the neuronal resting state, a measurable Cl^- current will flow through these channels in the presence of the neurotransmitter. Figure 4A illustrates ionic currents typically

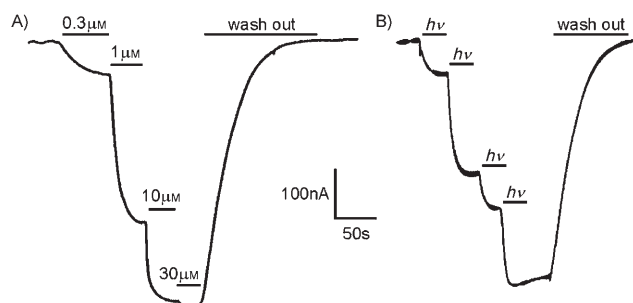


Figure 4. Membrane ionic currents recorded in frog oocytes expressing GABA_C receptors during application of A) increasing concentrations of free GABA, or B) light pulses to a bath solution containing $30 \mu\text{M}$ $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$.

observed in voltage-clamp experiments during a cumulative dose-response curve for free GABA. The ability of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ to induce GABA_C receptor-mediated Cl^- currents upon GABA photorelease was also evaluated by voltage-clamp recording. In these studies, the oocyte chamber was first equilibrated with frog Ringer's solution containing $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ ($30 \mu\text{M}$). Ambient light was kept to a minimum in order to avoid unwanted photorelease. Application of the caged compound without illumination was unable to evoke any membrane response or to change the recording baseline (not shown). Under these conditions, delivery of sequential light pulses to the bottom of the recording chamber evoked oocyte membrane current steps comparable to those observed during the direct application of increasing concentrations of free GABA (compare representative records in Figure 4A and B). Light-evoked membrane responses produced with $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$ were washed out with frog Ringer's solution; this returned the oocyte to its initial baseline without any sign of cytotoxicity.

The inorganic-based GABA caged compound we have synthesized is a promising new tool in the field of neuroscience. The ruthenium phosphine protecting group is removed by visible light with a high quantum yield, contributing to reducing the risk of cell photodamage on irradiation of a biological preparation. Moreover, as light scattering is reduced with increasing irradiation wavelength^[14] these low-energy photons should be able to penetrate further into biological tissue and allow for deeper neurotransmitter release. Additionally, the obligatory use of expensive optic materials or light sources can be avoided. Although UV-LEDs have become readily available, focusable short-wavelength lasers needed for localized uncaging are still of restricted accessibility. Biologically active neurotransmitter photodelivery from this compound has been shown in one-photon absorption mode.

Photochemical fragmentation kinetic studies on this compound require further investigation. However, photosubstitution kinetic constants determined for related $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{XY}]^{2+}$ compounds show values above 10^5 s^{-1} ,^[15] which if reproduced by $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]^+$, should allow the use of this photochemical tool in most neurophysiological studies. Photoelectrophysiological experiments with mouse cortical brain slices that show two-photon absorption promoted photorelease with this compound will be published elsewhere.

Experimental Section

Synthesis: Reagents and solvents were commercially available and were used as received. $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$ was synthesized according to the literature.^[16] All solutions were degassed with N_2 prior to heating to prevent oxidation of the ruthenium aquo complexes.

$[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{Cl}]\text{Cl}$: $\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{Cl}_2$ (682 mg, 1.3 mmol) was dissolved in methanol (45 mL). Triphenylphosphine (410 mg, 1.5 mmol) was added, and the mixture was stirred until complete dissolution. After this, water (20 mL) was added, and the mixture was heated at reflux for 2 h. Once the reaction was complete, the solution was concentrated by rotary evaporation. The solid was resuspended in acetone (50 mL), which first produced the dissolution of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{Cl}]^+$ and then the precipitation of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{Cl}]\text{Cl}$. The solution was kept at 0°C for one hour before filtration. The red solid was washed with portions of cold acetone and diethyl ether.

$[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{GABA}]\text{PF}_6$: $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{Cl}]\text{Cl}$ (110 mg, 147 μmol) was dissolved in water (10 mL). The mixture was heated at 80°C for half an hour to form $[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{PPh}_3\text{H}_2\text{O}]^{2+}$. GABA (455 mg, 4.42 mmol) and aqueous NaOH (4.4 mL, 1 M) were then added. Heating was continued for 3 h, before complex precipitation with KPF₆ (0.8 mL, 1 M) in ice and centrifugation in a test tube. The pellet was twice resuspended in water (3 mL) and recentrifuged prior to desiccation. Further purification can be achieved through column filtration through OH^- -loaded DEAE-Sephadex A-25 at pH 9.

NMR spectra were obtained with 200 MHz and 500 MHz Bruker NMR instruments. Complete NMR spectra are available in the Supporting Information. The voltogram was obtained in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{TBAPF}_6$ (0.1 M) by use of a three-electrode potentiostat based on an operational amplifier TL071 in current-to-voltage configuration and acquisition software written in QB 4.5. A Pt wire with a diameter of 500 μm was used as the working electrode.

Photolysis: The UV/Vis spectra were measured with a HP8453 diode-array spectrometer. Visible light irradiation of samples for quantum yield determination was performed with a Luxeon Star III Royal Blue high-power light-emitting diode (LED). Light power was measured in a test photolysis of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{py})_2]^{2+}$, by assuming a quantum yield photosubstitution of 0.26.^[12] Photoconversion plots were fitted with a two-parameter single-exponential rise to maximum function $y = a(1 - \exp(-bx))$; quantum yields were obtained as $a \times b$. Visible-light irradiation for biological studies was achieved with a fibre optic light source and a quartz halogen tungsten lamp.

RNA preparation, oocytes manipulation and electrophysiology: A human cDNA encoding the $\rho 1$ GABA_C receptor subunit cloned in the vector pBS (SK^-), suitable for in vitro transcription, was used as a template to synthesize cRNAs. cRNA solutions (0.1 to 0.3 ng nL^{-1}) were prepared in RNase-free H_2O and stored at -70°C . *Xenopus*

laevis oocytes at stages V and VI were used for cRNA expression. Isolation and maintenance of oocytes were carried out as previously described.^[17] Two-electrode voltage-clamp recordings were performed with an Axoclamp 2B amplifier 3 to 7 days after oocyte injection. Standard glass recording electrodes were made in a Narishige PB-7 puller and filled with KCl (3 M). Resistance values were approximately 1 M Ω . Holding potential was set to -70 mV, and current traces were acquired with an analogue to digital interface and stored on a PC with the aid of AXOTAPE software. Oocytes were placed in a chamber (volume 100 μ L) containing frog Ringer's solution [NaCl (115 mM), KCl (2 mM), CaCl₂ (1.8 mM), HEPES (5 mM), pH 7.0], and drugs were dissolved in this solution and applied through the superfusion system. All the experiments were carried out at room temperature (23–24 °C).

Acknowledgements

Supported by ANPCyT, CONICET and UBA.

Keywords: cage compounds · gamma-aminobutyric acid · GABA · photolysis · ruthenium

- [1] G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5020–5042; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900–4921.
- [2] a) M. Eder, W. Zieglgansberger, H. U. Dodt, *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 7558–7568; b) D. L. Pettit, G. J. Augustine, *J. Neurophysiol.* **2000**, *84*, 28–38; c) M. Matsuzaki, G. C. Ellis-Davies, T. Nemoto, Y. Miyashita, M. Iino, H. Kasai, *Nat. Neurosci.* **2001**, *4*, 1086–1092.
- [3] a) L. Ramakrishnan, G. P. Hess, *Biochemistry* **2005**, *44*, 8523–8532; b) C. Grewer, *Biophys. J.* **1999**, *77*, 727–738.
- [4] a) I. H. Brivanlou, J. L. Dantzer, C. F. Stevens, E. M. Callaway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 2560–2565; b) H. U. Dodt, A. Schierloh, M. Eder, W. Zieglgansberger, *Neuroreport* **2003**, *14*, 623–627; c) A. Losonczy, J. C. Magee, *Neuron* **2006**, *50*, 291–307; d) R. Araya, K. B. Eisenthal, R. Yuste, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 18799–18804.
- [5] a) R. Wieboldt, K. R. Gee, L. Niu, D. Ramesh, B. K. Carpenter, G. P. Hess, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 8752–8756; b) K. R. Gee, R. Wieboldt, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 8366–8367; c) M. Canepari, L. Nelson, G. Papageorgiou, J. E. Corrie, D. Ogden, *J. Neurosci. Methods* **2001**, *112*, 29–42.
- [6] V. R. Shembekar, Y. Chen, B. K. Carpenter, G. P. Hess, *Biochemistry* **2005**, *44*, 7107–7114.
- [7] L. Zayat, C. Calero, P. Albores, L. Baraldo, R. Etchenique, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 882–883.
- [8] L. Zayat, M. Salierno, R. Etchenique, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 1728–1731.
- [9] F. R. Keene, D. J. Salmon, T. J. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 1884–1889.
- [10] B. P. Sullivan, D. J. Salmon, T. J. Meyer, *Inorg. Chem.* **1978**, *17*, 3334–3341.
- [11] B. Durham, J. V. Caspar, J. K. Nagle, T. J. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 4803–4810.
- [12] D. V. Pinnick, B. Durham, *Inorg. Chem.* **1984**, *23*, 1440–1445.
- [13] D. Zhang, Z. Pan, M. Awobuluyi, S. A. Lipton, *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, *22*, 121–132.
- [14] L. O. Svaasand, R. D. Ellingsen, *Photochem. Photobiol.* **1983**, *38*, 293–299.
- [15] B. Durham, J. V. Caspar, J. K. Nagle, T. J. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 4803–4810.
- [16] C. Viala, C. Coudret, *Inorg. Chim. Acta* **2006**, *359*, 984–989.
- [17] R. Miledi, I. Parker, K. Sumikawa in *Fidia Research Foundation Neuroscience Award Lecture, Vol. 3* (Ed.: J. Smith), Raven, New York, **1989**, pp. 57–90.

Received: June 26, 2007

Published online on October 15, 2007

