



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIEROS
INDUSTRIALES VALENCIA

Curso Académico:

Agradecimientos

Cuando se está a punto de cerrarse una etapa de la vida se hace muy difícil no echar la vista atrás y ver cómo ha ido evolucionando tu entorno y uno mismo. Es por ello que no me gustaría cerrar este capítulo de mi vida sin agradecer, aunque sea con unas pocas palabras, a todas aquellas personas el apoyo recibido.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutora del trabajo final de máster, María Consuelo Jiménez Molero, todo su tesón y afán por enseñar, no solo en este trabajo, sino también en todas las clases a las que he tenido el placer de asistir a lo largo de la carrera y el máster. Es admirable como la ilusión por aprender y transmitir conocimientos permanece intacta en ella día a día. Gracias por confiar en mí para la realización de este proyecto.

A mi querida codirectora Victoria Vendrell Criado, que con su constancia y esfuerzo no solo me ha enseñado gran parte de los conocimientos y técnicas experimentales desconocidos para mí, hasta ahora, sino también a ser más eficaz y eficiente en mi trabajo. Es todo un privilegio haber sido su primer alumno al que le ha dirigido un trabajo final de máster y dudo mucho que este proyecto pudiese haber salido mejor sin su ayuda.

A mis compañeros de la carrera y del máster, y en especial, a mis amigas Alicia, Gemma y Lorena por tantas horas compartidas entre libros y pantallas, ya que con el esfuerzo conjunto hemos podido salir airoso de muchos trabajos y exámenes. Esta experiencia no hubiese sido lo mismo sin vuestra amistad. También a mis amigos por haberme brindado apoyo y consuelo en aquellos momentos de flaqueza.

Y por último, me gustaría dedicar las últimas palabras a mis padres Antonia y José Luis, ya que nada de esto hubiese sido posible sin su perseverancia en proporcionarme todo lo que me hiciese falta y de asegurarse que escogiera el camino en la vida que más me agradase y conviniese. Sin su apoyo y confianza incondicionales no hubiese llegado hasta el día de hoy y probablemente a ser la persona de la hoy me enorgullezco.

A todos ¡Gracias!

Abreviaturas y símbolos

AA	Ácido araquidónico
ACS	Grado analítico
AINE	Antiinflamatorios no esteroideo
Arg	Arginina
AS	Albúmina sérica
ASH	Albúmina sérica humana
CD₃OD	Metanol deuterado
COX	Ciclooxigenasa
COXIB	Inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa
DDD	Dosis diaria definida
DHD	Dosis diaria definida por mil habitantes y día
DNPX	Desmetilnaproxeno
δ	Desplazamiento químico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d₆	Dimetilsulfóxido deuterado
F	Fluorescencia
FDL	Fotólisis de destello láser
ϕ_F	Rendimiento cuántico de fluorescencia
GLU-Br	Éster metílico α -acetobromo del ácido D-glucurónico
GndCl	Hidrocloreuro de guanidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
K_a	Constante ácida de disociación
LAS	Amano Lipasa
MeCN	Acetonitrilo
MeCN-d₃	Acetonitrilo deuterado
NPX	Naproxeno
OMS	Organización Mundial de la Salud
P	Fosforescencia
PBS	Tampón fosfato-salino
PGs	Prostaglandinas
pK_a	Constante ácida de disociación en base logarítmica
pK_a[*]	Constante ácida de disociación del estado excitado en base logarítmica
PLE	Estereasa de hígado porcina
¹³C-RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono

$^1\text{H-RMN}$	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
TLC	Cromatografía de capa fina
Trp	triptófano
τ_s	Tiempo de vida de singlete
τ_T	Tiempo de vida de triplete
TXs	Tromboxanos
Tyr	Tirosina
u.a	Unidades arbitrarias
UPLC-MS	Cromatografía líquida de ultra resolución
UV-A	Ultravioleta A
UV-B	Ultravioleta B
UV-C	Ultravioleta C
UV-vis	Ultravioleta visible

RESUMEN

En este trabajo se ha sintetizado el metabolito de fase I del antiinflamatorio no esteroideo naproxeno, el ácido 6-hidroxi-2-naftil propanoico, y se ha llevado a cabo su caracterización fotofísica y fotoquímica, como estudios preliminares para profundizar sobre la posible fotosensibilización causada por el metabolito.

Partiendo de (*S*)- o (*R*)-naproxeno, por tratamiento en medio ácido, se obtuvieron los dos enantiómeros (*S*)- y (*R*)- del ácido 6-hidroxi-2-naftil propanoico (el metabolito).

En cuanto a los aspectos fotofísicos y fotoquímicos:

- 1) No se observaron diferencias significativas en los espectros de absorción del fármaco y del metabolito en distintos disolventes.
- 2) En los espectros de fluorescencia se apreciaron diferencias entre el comportamiento de ambos sustratos, especialmente en medio tamponado fosfato-salino (pH = 7,4), debido al equilibrio fenol-fenolato que ocurre en el metabolito. Tanto los rendimientos cuánticos de fluorescencia como los tiempos de vida de fluorescencia fueron diferentes para ambos sustratos.
- 3) Fármaco y metabolito poseen energías de singlete muy similares.
- 4) Mediante fotólisis de destello láser, en el espectro de absorción transitoria del metabolito en PBS se observó una banda con un máximo a 440 nm, atribuida al estado excitado triplete y un catión radical a longitudes de onda comprendidas entre 550-650 nm.
- 5) La interacción metabolito-albúmina sérica humana fue estudiada mediante un tratamiento de Stern-Volmer; se observó una desactivación creciente de la fluorescencia de la proteína (debida al triptófano de la misma) a medida que aumentaba la concentración de metabolito en el medio. Se observa una ligera estereodiferenciación.
- 6) La irradiación del metabolito conduce, por descarboxilación, a 1-(6-hidroxinaftalen-2-il)etan-1-ona como principal fotoproducto.
- 7) No se observa fotounión covalente a albúmina sérica humana, aunque sí una degradación del compuesto de partida tras ser irradiado.

Palabras Clave: Naproxeno, 6-O-desmetilnaproxeno, fotofísica, fotoquímica, fotosensibilización.

RESUM

En aquest treball s'ha sintetitzat el metabòlit de fase I del antiinflamatori no esteroïdal naproxén, l'àcid 6-hidroxi-2-naftil propanoic. S'ha procedit a la caracterització fotofísica i fotoquímica per comparar les propietats fotosensibilitzants del metabòlit amb les del fàrmac del qual prové.

Partint de (S)- o (R)-naproxén, per tractament en medi àcid, es va obtenir els dos enantiòmers (S)- i (R)- de l'àcid 6-hidroxi-2-naftil propanoic (el metabòlit).

En quant als aspectes fotofísics i fotoquímics:

- 1) No es van observar diferències significatives en els espectres d'absorció del fàrmac i del metabòlit entre els diferents dissolvents.
- 2) En els espectres de fluorescència es van apreciar diferències entre el comportament d'ambdós substrats, en especial en medi tamponat fosfat-salí (pH = 7,4) per l'equilibri fenol-fenolat del metabòlit. Tant els rendiments quàntics de fluorescència com en els temps de vida de fluorescència van ser diferents per a ambdós substrats.
- 3) Fàrmac i metabòlit tenen energies de singlet molt paregudes.
- 4) Mitjançant fotòlisi de flaix làser, en l'espectre d'absorció transitòria del metabòlit en PBS es va observar una banda amb un màxim a 440 nm, atribuït al estat excitat triplet i un catió radical a longituds d'ona compreses entre 550-650 nm.
- 5) La interacció metabòlit-albúmina sèrica humana va ser estudiada per l'equació d'Stern-Volmer; es va observar una desactivació creixent de la senyal de fluorescència (deguda al triptòfan de la mateixa) segons augmentava la concentració de metabòlit en presència d'albúmina sèrica humana. S'observa una lleugera estereodiferenciació.
- 6) La irradiació del metabòlit condueix, per descarboxilació, a 1-(6-hidroxinaftalen-2-il)etan-1-ona com a principal fotoproducte.
- 7) No es va observar fotounió covalent a l'albúmina sèrica humana, encara que sí una degradació del compost del qual prové després de ser irradiat.

Paraules clau: naproxén, 6-O-desmetilnaproxén, fotofísica, fotoquímica, fotosensibilització.

ABSTRACT

In this work, the nonsteroidal anti-inflammatory phase I metabolite naproxen, the 6-hydroxy-2-naphthalen propanoic acid was synthesised, and its photophysical and photochemical characterization was done as preliminary studies in order to know if the metabolite may cause photosensitization.

Two 6-hydroxy-2-naphthalen propanoic acid (S)- and (R)- enantiomers were obtained from (S)- or (R)- naproxen in acid solution.

Related to photophysical and photochemical matters:

- 1) No significant differences were appreciated between drug's and metabolite's absorption spectra in different solvents.
- 2) Differences in fluorescence spectra were appreciated between both substrates, specially in a phosphate buffer-saline (pH = 7.4) due to a phenol-phenolate equilibrium of the metabolite. Both fluorescence quantum yield and excited singlet state lifetime were different for the substrates.
- 3) Drug and metabolite have similar singlet excitation energy.
- 4) A band with a maximum at 440 nm was observed in the transitory absorption spectra of the metabolite in PBS with laser flash photolysis. This band belongs to the excited triplet state and there is another band between 550-650 nm that fits to a radical cation.
- 5) Metabolite-human serum albumin interaction was studied using the Stern-Volmer's treatment; a growing quenching fluorescence of the protein was appreciated (due to the protein tryptophan) whenever the metabolite concentration were increasing. It was seen a slight stereodifferentiation.
- 6) A decarboxylation reaction was observed after the metabolite irradiation. The main photoproduct was 1-(6-hydroxynaphthalen-2-il)ethan-1-one.
- 7) Covalent photobinding to human serum albumin was not appreciated, although degradation in the initial compound occurred after being irradiated.

Key words: naproxen, 6-O-desmethylnaproxen, photophysics, photochemistry, photosensitization.

ÍNDICE

Memoria técnica	13
1. Objetivos.....	15
2. Justificación	16
2.1 Justificación técnica.....	16
2.2 Justificación académica.....	18
3. Introducción	19
3.1 Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).....	19
3.1.1 Mecanismo de acción de los AINEs.....	20
3.1.2 Principales efectos terapéuticos y reacciones adversas.....	23
3.1.3 Naproxeno.....	25
3.2 Albúmina sérica.....	27
3.2.1 Función de la albúmina sérica humana.....	28
3.2.2 Estructura general de la albúmina sérica humana.....	29
3.2.4 Interacciones con sustratos.....	30
3.3 Fotoquímica molecular.....	32
3.3.1 Procesos fotofísicos.....	33
3.4 metabolitos de xenobióticos como potenciales agentes fotosensibilizadores.....	37
4. Metodología.....	40
4.1 Instrumentación.....	40
4.2 Procedimiento experimental.....	45
4.2.1 Síntesis.....	45
4.2.2 Caracterización fotofísica.....	45
4.2.3 Caracterización fotoquímica.....	49

5. Resultados	51
5.1 Caracterización.....	51
5.2 Caracterización fotofísica.....	54
5.3 Caracterización fotoquímica.....	67
5.3.1 Irradiación de DNPX en medio acuoso.....	67
5.3.2 Irradiación de DNPX en presencia de ASH.....	68
6. Plan futuro.....	70
6.1 Síntesis.....	70
6.2 Caracterización.....	72
7. Conclusiones.....	77
8. Bibliografía.....	78
Presupuesto.....	81
1.1 Precio de la mano de obra.....	82
1.2 Precio de reactivos y disolventes.....	82
1.3 Material fungible.....	83
1.4 Material no fungible.....	84
1.5 Equipos.....	86
1.6 Presupuesto en base de licitación.....	86
Anexos.....	89
Anexo I: Seguridad.....	90
Anexo II: Preparación disoluciones tampón.....	96

MEMORIA TÉCNICA

1. OBJETIVOS

El presente Trabajo Final de Máster, desarrollado en el grupo de *Estados excitados: detección, dinámica, transformaciones y campos de aplicación*, adscrito al Departamento de Química de la Universitat Politècnica de València (UPV) y en colaboración con el Instituto de Tecnología Química (ITQ), tiene como objetivo el estudio de las propiedades fotofísicas y fotoquímicas del metabolito de fase I del fármaco naproxeno (NPX), el ácido 6-hidroxi-2-naftil propanoico (6-O-desmetilnaproxeno, DNPX) en sus formas enantioméricas (*S*)- y (*R*)-, con el fin de compararlo con el fármaco de partida. Para ello se abordarán los siguientes puntos:

- Síntesis de (*S*)- y (*R*)-DNPX a partir del naproxeno.
- Caracterización fotofísica de los estados excitados de DNPX en distintos medios.
- Estudio de la interacción y la posible estereodiferenciación de (*S*)- y (*R*)-DNPX en presencia de la proteína transportadora albúmina sérica humana (ASH)
- Caracterización de los fotoproductos del DNPX obtenidos al irradiar con luz ultravioleta A (UV-A) en disolvente orgánico y en presencia de ASH.

Los objetivos académicos que se pretenden alcanzar con la realización del trabajo son los siguientes:

- ✓ Realización de un proyecto individual en el ámbito de la Ingeniería Química focalizado en el uso de los conocimientos químicos adquiridos a lo largo de la carrera y el máster.
- ✓ Aplicación de los conocimientos relacionados con química básica, química orgánica, química fina, química física, experimentación en análisis químico y elucidación estructural y análisis estadístico para el estudio de los resultados obtenidos.
- ✓ Capacidad para encontrar, analizar, seleccionar, procesar y clasificar información bibliográfica perteneciente al ámbito de la comunidad científica, empleándose para ello herramientas de búsqueda bibliográfica avanzadas.
- ✓ Ampliación de los conocimientos adquiridos a lo largo de la formación académica en el ámbito de la química, especialmente en la disciplina de la fotoquímica orgánica.

2. JUSTIFICACIÓN

2.1 JUSTIFICACIÓN TÉCNICA

En las últimas décadas, los grandes esfuerzos realizados en medicina han permitido conocer el origen de numerosas enfermedades, así como desarrollar tratamientos adecuados para las diversas patologías ocasionadas por las mismas, o incluso su curación mediante el uso de fármacos. Sin embargo, sin una sociedad altamente industrializada con un mercado globalizado, probablemente sería imposible la distribución de dichos tratamientos, restringiendo en gran medida la repercusión de dichos conocimientos en la sociedad.

Actualmente, de entre todas las patologías sufridas por el ser humano, el dolor de origen músculo-esquelético es uno de los motivos de consulta médica más habitual, donde teniendo en cuenta el aumento de la esperanza de vida, el tratamiento de estos síntomas tiene un gran impacto en la sociedad.

En este contexto, los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) constituyen un grupo heterogéneo de compuestos que presentan actividad analgésica, antiinflamatoria y antipirética, reduciendo por ello la sensación de dolor, la inflamación y la fiebre.¹ De hecho, constituyen uno de los grupos farmacéuticos más prescritos en la actualidad, situándose entre los 15 grupos de medicamentos con mayor consumo.²

Según la agencia española de medicamentos y productos sanitarios (AEMPS), el consumo de AINEs ha ido fluctuando a lo largo del siglo XXI. En la primera década, su consumo ha ido en aumento desde 38,74 hasta 52,69 dosis diarias definidas (DDD) por mil habitantes y día (DHD) (un aumento del 36 %). Sin embargo, en los últimos años, su consumo ha ido descendiendo acusadamente, pasando de 43,12 en el año 2013 a 37,89 en el año 2016 (un descenso del 12,13 %). Si bien es cierto que el aumento del consumo de AINEs afectaba prácticamente a los del subgrupo arilpropiónicos, el descenso afecta a todos los subgrupos. En la siguiente imagen se muestra la evolución del consumo de AINEs, diferenciando los cuatro subgrupos más consumidos: arilacéticos, arilpropiónicos, Coxibs y Oxicams).³

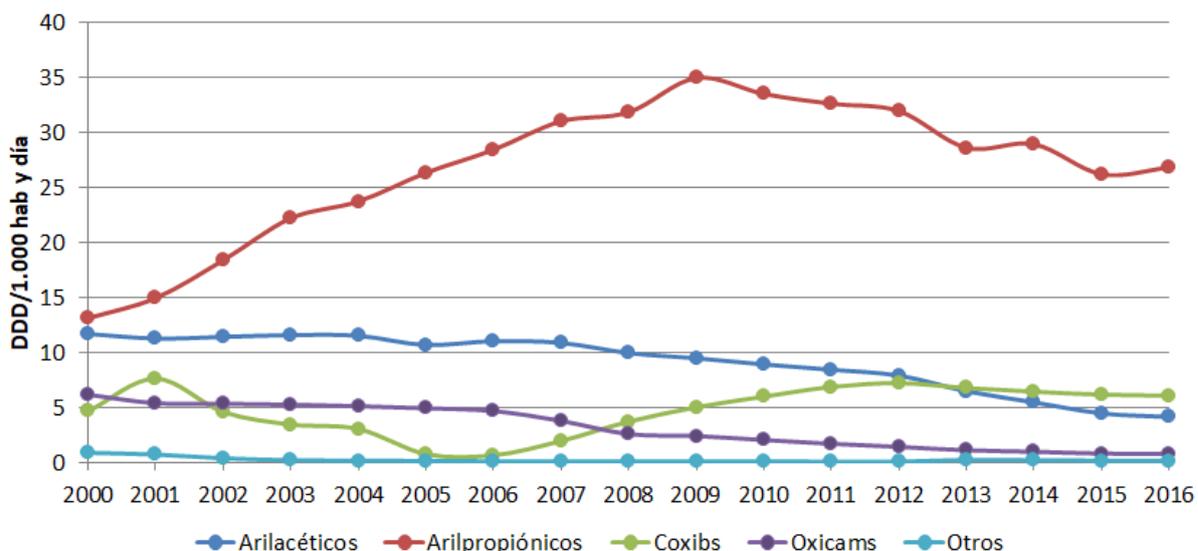


Figura 1. Consumo de AINEs en España entre 2000 y 2016.

Fuente: Elaboración propia a partir del informe de utilización de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos en España durante los periodos 2000-2012 y 2013-2016.

Centrando el análisis en los últimos años (2013-2016)⁴, del consumo total de AINEs, el 80 % corresponde a cuatro principios activos, siendo el ibuprofeno y el naproxeno los más consumidos, con un 36 % y 22 % del total del consumo en 2016, respectivamente (Figura 2). Ambos pertenecen a la familia de los arilpropiónicos. El tercer y cuarto puesto son para el diclorofenaco y etoricoxib, pertenecientes a los subgrupos arilacéticos y Coxibs respectivamente, cuyo consumo es muy similar (representan el 20 %).

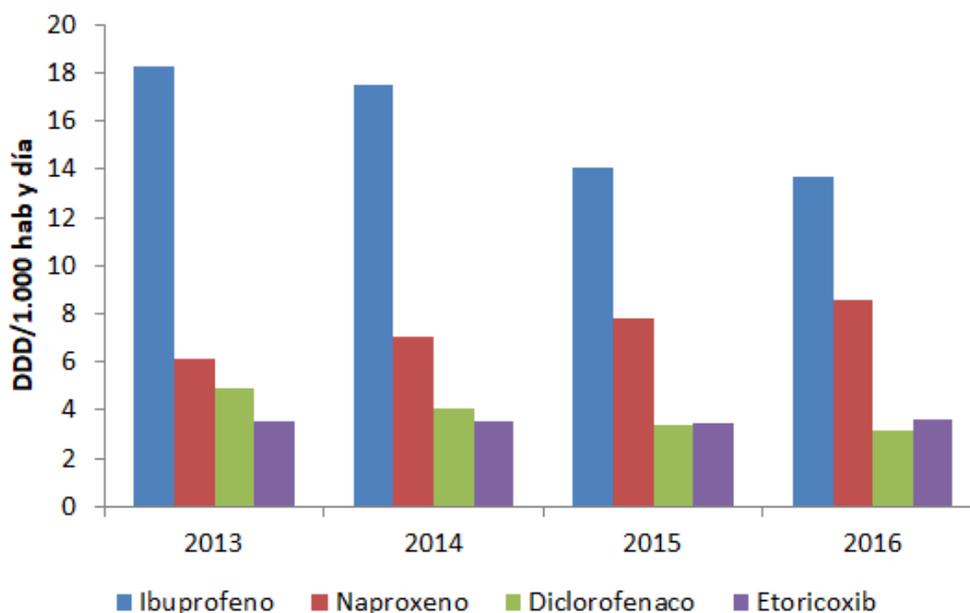


Figura 2. Principios activos más consumidos en España entre 2013 y 2016.

Fuente: Elaboración propia a partir del informe de utilización de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos en España durante el periodo 2013-2016.

Pese a que los efectos beneficiosos de los AINEs son notables, también generan efectos adversos en el organismo. Entre las reacciones adversas más comunes destacan: reacciones gastrointestinales (formación de úlceras gástricas, siendo este evento el más frecuente), incremento del riesgo cardiovascular, fallos renales (nefropatías agudas), reacciones de hipersensibilidad y reacciones hematológicas.¹

Centrando la atención en las reacciones de hipersensibilidad, las más comunes son las reacciones de **fotosensibilidad**, las cuales son respuestas anormales de la piel tras una exposición a la radiación ultravioleta (en concreto, radiaciones de longitud de onda larga o UV-A) y pueden dar lugar a enfermedades denominadas fotodermatosis. Múltiples factores afectan al desarrollo de las reacciones de fotosensibilidad, siendo la causada por agentes exógenos la más habitual. Este tipo de fotosensibilidad se produce cuando un compuesto químico, denominado fotosensibilizante, es capaz de interactuar con la radiación electromagnética y provocar el desarrollo de lesiones en la piel.

Se distinguen dos tipos de fotodermatosis generadas por agentes químicos exógenos (administrados por vía tópica y/o sistemática): la fototoxía (generación de un compuesto fotoactivo capaz de producir daño celular) y la fotoalergia (transformación química del fotosensibilizante que al combinarse con las proteínas de la piel produce una reacción inmunológica).⁵

Entre los principales agentes fotosensibilizantes se encuentran los AINEs como uno de los principales fotosensibilizantes, siendo el ibuprofeno y el naproxeno los dos más consumidos en la sociedad. Si bien hay un gran número de estudios fotoquímicos referentes a dichos compuestos, existen muchos menos estudios referentes a sus metabolitos, que son estructuras químicas que surgen por transformaciones biológicas de los compuestos originales por el organismo. Es por ello que este trabajo tiene como objetivo la caracterización fotofísica y fotoquímica de uno de los metabolitos de fase I del naproxeno, el segundo antiinflamatorio no esteroideo más consumido.

2.2 JUSTIFICACIÓN ACADÉMICA

Se ha realizado el presente Trabajo Final de Máster para la integración de diversos conocimientos adquiridos a lo largo de la titulación de Máster Universitario en Ingeniería Química (MUIQ) de forma transversal, en especial atención a aquellos campos relacionados en el área química, tanto conceptual como experimental, recibida tanto en el grado (como pueden ser Química general, Química-Física, Química Orgánica, Experimentación en Análisis Químico, Experimentación en Ingeniería Química I, II y III, etc.), como en el máster (Química orgánica avanzada: elucidación estructural, Química orgánica industrial: procesos de química fina, Dirección y Gestión de Proyectos, etc.).

Adicionalmente se busca la ampliación de nuevos conocimientos en el campo de la química, como es el caso de la fotoquímica molecular. En este contexto, con el desarrollo y realización del trabajo de pretender completar y finalizar la titulación de Máster Universitario en Ingeniería Química.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINEs)

El desarrollo de los antiinflamatorios no esteroideos tiene sus orígenes en el año 1763, cuando el reverendo Edmund Stone realizó el primer estudio clínico sobre los efectos del extracto de sauce como tratamiento antifebril. Más tarde, en 1828 Johan Andreas Buchner descubrió que el ingrediente activo de la corteza de sauce se debe a la salicina, un glucósido que mediante hidrólisis libera glucosa y alcohol salicílico. Éste último podía ser convertido en ácido salicílico (antecesor de la aspirina), un compuesto que presenta propiedades analgésicas y antiinflamatorias, sintetizado por primera vez en 1859 por Kolbe. Finalmente, en 1897, Félix Hoffmann descubrió el ácido acetilsalicílico, el cual constituye el principio activo de la aspirina, con propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias.⁶

Tras el descubrimiento de la aspirina se impulsó el desarrollo de toda una familia de fármacos, los antiinflamatorios no esteroideos, los cuales poseen actividades analgésicas, antipiréticas y, en su mayoría, antiinflamatorias. Una de las formas de clasificación más común de los AINEs es por su grupo químico¹, el cual se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación química de los antiinflamatorios no esteroideos.

Fuente: B.C. Garrido López et al. Antiinflamatorios no esteroideos: farmacodinámica, reacciones adversas e indicaciones en reumatología, 2011.

Grupo químico	AINE
Ácidos acéticos	Aceclorfenaco Diclorofenaco Indometacina Ketorolaco Sulindaco Tolmetina
Ácidos antranílicos	Ácido mefenámico
Ácidos arilpropiónicos	Fenoprofeno Flurbiprofeno Ibuprofeno Ketoprofeno Naproxeno
Inhibidores de la COX-2	Celecoxib Etoricoxib Parecoxib
Oxicams	Lornoxicam Meloxicam Piroxicam Tenoxicam
Paraaminofenoles	Paracetamol
Pirazolonas	Metamizol Propifenazona
Salicilatos	Ácido acetilsalicílico Diflunisal Salicilato sódico

Sin embargo, una clasificación más simple de los AINEs consiste en dividirlos en dos grandes grupos: inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2 (COXIBs) y los AINEs no selectivos o tradicionales. Esta diferenciación surge como consecuencia de una acción farmacológica diferente en uno de los pasos del mecanismo de su acción general⁷, el cual se detallará a continuación.

Aunque los AINEs poseen las mismas principales acciones terapéuticas, cada uno de ellos posee una acción más específica. Esto es debido al mecanismo de acción, ya que aunque todos parten del mismo origen, el mecanismo de acción puede no desarrollarse de la misma forma en todos los casos, dando lugar a diferentes acciones terapéuticas, así como a reacciones adversas (entre otros factores no farmacológicos). Es necesario definir un cuadro clínico adecuado en cada paciente para determinar el fármaco más adecuado a su situación.⁸

3.1.1 Mecanismo de acción de los AINEs

El mecanismo de acción principal de los AINEs está relacionado con la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX), la cual posee un papel fundamental en los procesos inflamatorios.

Ante determinados estímulos traumáticos (golpes, fisuras, cortes...) el organismo se protege frente a los posibles agentes agresores, provocando la aparición de inflamación y dolor a causa de la acción de mediadores químicos. Dichas agresiones externas activan la enzima fosfolipasa A2 (PLA₂), cuya acción enzimática provoca la hidrólisis de los enlaces ésteres de los fosfolípidos presentes en la membrana celular, ocasionando la ruptura de dicha membrana celular con la consiguiente liberación de los mediadores del dolor histamina, bradiquinina y ácido araquidónico (AA).

El ácido araquidónico o ácido eicosatetraenoico es un ácido graso poliinsaturado perteneciente a la familia de los omega-6 que forma parte de la membrana celular de los mamíferos (esterificado a los fosfolípidos de la membrana) y es sintetizado a partir del ácido linoleico, uno de los ácidos graso esenciales, y por tanto no sintetizable por el organismo, que también pertenece a la familia de omega-6.

Liberado el AA de la membrana celular, es metabolizado por acción enzimática de diferentes enzimas hacia la formación de diferentes eicosanoides (sustancias derivadas del AA) a través de diversas rutas metabólicas, siendo las más relevantes:

- a) La ruta medida por las ciclooxigenasas (COX), la cual da origen a los prostanoides: prostaglandinas (PGs) y tromboxanos (TXs)
- b) La ruta medida por las lipooxigenasas (LOX), la cual da origen a los leucotrienos y las lipoxinas.
- c) La ruta mediada por el citocromo P450 (CYP450), el cual da origen a los ácidos hidroeicosatetraenoicos (HETEs) y a los ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs)

Una vez secretadas, los eicosanoides actúan sobre diferentes receptores ubicados en la misma célula o en el entorno cercano a ella.

Cabe destacar que una secreción controlada de estas moléculas en condiciones normales permite mantener un equilibrio en el funcionamiento del sistema nervioso central, cardiovascular, digestivo, endocrino, respiratorio y sistema inmune, mientras que en situaciones patológicas se generan y

secretan en exceso, alertando al organismo de la presencia de un suceso fuera de lo normal, generando dolor, fiebre e inflamación.⁹

A pesar de la gran cantidad de mediadores liberados en los procesos de inflamación, los AINEs solo actúan sobre la ruta medida por las ciclooxigenasas, inhibiendo reversible o irreversiblemente su acción. En esta ruta, el AA liberado de la membrana plasmática por acción de la PLA₂ es metabolizado por las enzimas COX, dando origen a las prostaglandinas y a los tromboxanos.

Inicialmente, el AA es oxidado catalíticamente por la enzima COX para sintetizar la prostaglandina G₂ (PGG₂), un producto inestable que se convierte rápidamente por acción peroxidante de la COX en la prostaglandina H₂ (PGH₂), la cual mediante transformaciones bioquímicas por acciones enzimáticas específicas origina los prostanoides primarios PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ y TXA₂. Todos ellos desempeñan funciones biológicas cruciales en el organismo, dependiendo del órgano sobre el que actúan y de la condición fisiológica del organismo.

La enzima responsable de esta ruta metabólica del AA no es única, sino que posee dos isoformas (COX-1 y COX-2). La COX-1 es una enzima constitutiva presente en la mayoría de células del organismo, que regula la síntesis de los prostanoides encargados del control homeostático de múltiples funciones fisiológicas, como por ejemplo la citoprotección de la mucosa gástrica, trombogénesis plaquetaria, hemodinámica renal o diferenciación de macrófagos. Por otro lado, la COX-2 es una enzima inducible frente a estímulos inflamatorios. Aunque también está presente de forma constitutiva en tejidos y órganos tales como la médula espinal, el cerebro y los riñones, su expresión se ve notoriamente incrementada ante estados de inflamación, siendo la principal isoforma responsable de los procesos inflamatorios.¹

En resumen, se puede establecer que la isoforma COX-1 está más enfocada a la síntesis de prostaglandinas en condiciones fisiológicas de equilibrio, mientras que ante estímulos inflamatorios, la isoforma COX-2 es la encargada de sintetizar una cantidad adicional de prostaglandinas bajo estas condiciones, generándose en exceso y provocando la aparición de los síntomas típicos de la inflamación.

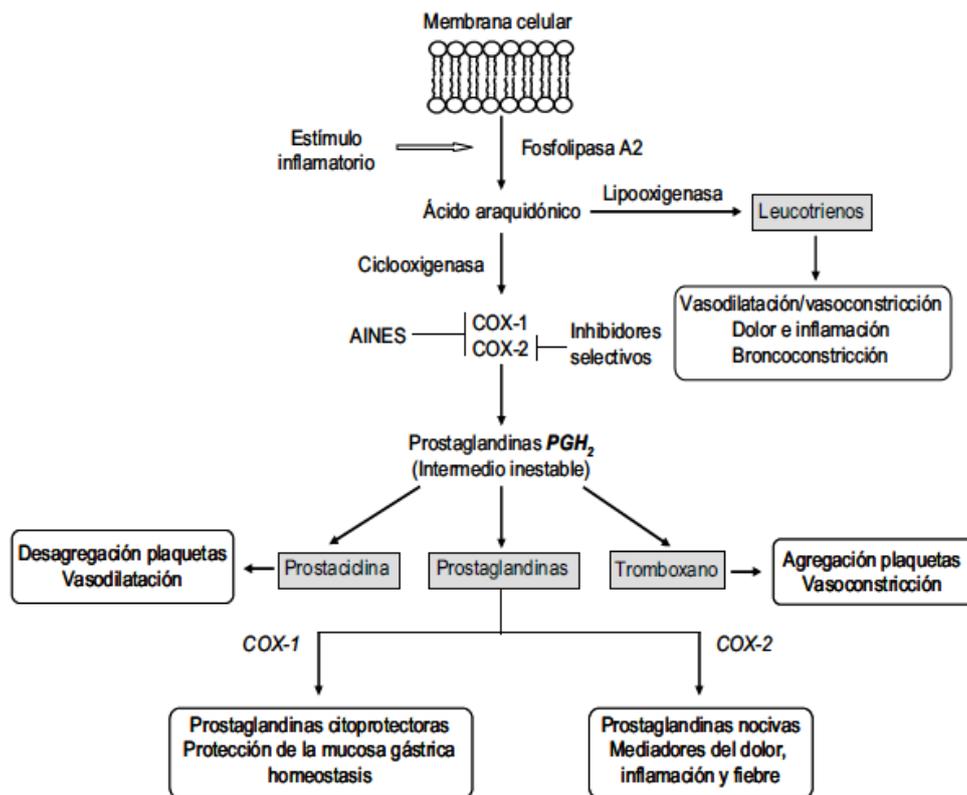


Figura 3. Ruta biosintética de las prostaglandinas y los tromboxanos a partir del ácido araquidónico.

Fuente: I. Vayá Pérez. Estados excitados del antiinflamatorio no esteroideo flurbiprofeno como sondas para la interacción con proteínas, 2007.

En función del poder inhibitorio de los AINEs sobre las isoformas de la ciclooxigenasa, los AINEs se pueden clasificar en cuatro tipos:

1. Inhibición irreversible de ambas isoformas. La aspirina es un ejemplo de este grupo.¹⁰
2. Inhibición competitiva reversible de ambas isoformas. El ibuprofeno o el mefenamato son ejemplos de este grupo.
3. Inhibición lenta y dependiente del tiempo de ambas isoformas. A este grupo pertenecen la mayoría de los arilpropiónicos, como el flurbiprofeno y el naproxeno.¹¹
4. Inhibición lenta y dependiente del tiempo de la isoforma COX-2. A este grupo pertenecen la familia de los coxibs o inhibidores selectivos de la COX-2.¹²

3.1.2 Principales efectos terapéuticos y reacciones adversas

Como se ha mencionado anteriormente, los AINEs son una serie de principios no esteroideos caracterizados por presentar actividad analgésica, antipirética y antiinflamatoria, aunque también muestran una serie de reacciones adversas. La mayoría de estos efectos derivan fundamentalmente del mecanismo de acción, detallado en el apartado anterior. En este punto, se comentarán con más detalle tanto los efectos terapéuticos como las reacciones adversas más comunes de los AINEs.

Entre las principales acciones terapéuticas destacan:

- Acción analgésica. Es la acción principal de los AINEs y, según la OMS, están considerados como los principios activos como mayor efectividad en este campo⁸. Esta acción terapéutica deriva de la derivación del bloqueo de la prostaglandina PGE₂ liberada tras un estímulo inflamatorio tanto a nivel central como periférico, ya que es una de las sustancias endógenas que más dolor, inflamación y enrojecimiento generan por interaccionar con las neuronas sensitivas periféricas de la médula espinal y el cerebro (induciendo un fenómeno de hiperexcitabilidad), aumentar el flujo sanguíneo y la permeabilidad capilar, respectivamente.^{1,9} También influye a nivel periférico el bloque de la expresión de otras prostaglandinas liberadas por traumatismo o inflamación que incrementan la sensibilidad de los nociceptores a los mediadores químicos liberados, como la histamina o bradicina.¹
- Acción antiinflamatoria. La inhibición de la enzima COX provoca la inhibición generalizada de las prostaglandinas y tromboxanos, reduciéndose las actividades sensibilizadoras, vasodilatadoras y quimiotácticas. Generalmente, los AINEs son más eficaces frente a la inflamación aguda.
- Acción antitérmica. La fiebre es un mecanismo de respuesta generado ante situaciones anómalas como la infección, lesión, inflamación, rechazo de tejidos, etc., utilizado para desencadenar mecanismos fisiológicos de defensa, entre ellos, la activación de la síntesis de prostaglandinas (en especial la PGE₂). Inhibiendo la actividad de la enzima COX-2 se reducen las concentraciones a nivel central de PGE₂, evitando la aparición de fiebre.
- Acción antiagregante plaquetaria. Este efecto surge principalmente por la inhibición de la COX-1, disminuyendo la concentración del compuesto TXA₂, un tromboxano responsable de los mecanismos de coagulación: adhesión y agregación plaquetaria. De esta forma se logra reducir el riesgo de formación de trombos. Este efecto es irreversible a lo largo de la vida de la plaqueta en el grupo de los salicilatos y reversible pero con menor efecto en el resto de AINEs (a excepción de los coxibs).^{1,8,9}

Sin embargo, las reacciones adversas por acción farmacológica de AINEs son frecuentes (con una tasa de reacciones adversas superior al 25%), y en ocasiones, graves, suponiendo un riesgo para la salud del paciente. Entre las reacciones adversas comunes destacan:

- Reacciones gastrointestinales. Es el efecto adverso más común entre los AINEs, ya que aparece como consecuencia de la inhibición de la COX-1, la enzima encargada de sintetizar local y sistemáticamente en condiciones fisiológicas prostaglandinas que protegen la mucosa gástrica. Los efectos observados dependen del tipo de fármaco, de la dosis administrada y de factores de riesgo individuales, pudiendo aparecer desde acidez y náuseas en casos de menor gravedad hasta la aparición de úlceras gástricas y hemorragias digestivas altas (HDA), causando sangrado y perforación.
- Reacciones cardiovasculares. Es el efecto adverso más peligroso por aumentar el riesgo cardiovascular de los pacientes. Deriva de la inhibición de la COX-2, ya que la prostaglandina PGI₂ contribuye a la regulación de la homeostasis cardiovascular, desempeñando funciones como efecto vasodilatador e inhibiendo la agregación plaquetaria. La inhibición de dicha prostaglandina ha sido relacionada con un aumento de la proagregación plaquetaria y la vasoconstricción, favoreciendo la aterotrombosis.
- Reacciones renales. Ambas isoformas de la COX desempeñan funciones importantes en las funciones renales tales como vasodilatador, mantener la velocidad de filtración y el flujo sanguíneo del riñón. En este grupo se distinguen entre fallos renales agudos y graves. Los agudos son generalmente dependientes de la duración y la dosis y reversibles. Las patologías más comunes están asociadas con nefropatías agudas (síndrome nefrótico, nefritis intersticial aguda, necrosis tubular aguda, etc.). Por otro lado, los graves se caracterizan por provocar una destrucción parcial o total de alguna de las partes del sistema renal. Destacan la hiperpotasemia y la toxicidad renal crónica, la cual es una nefropatía intersticial que puede evolucionar a insuficiencia renal terminal.
- Reacciones de hipersensibilidad. Es uno de los efectos adversos menos comunes, ya que solo algunos fármacos son capaces de absorber la luz solar y de inducir daños en la piel, causando reacciones fototóxicas y fotoalérgicas. Los síntomas clínicos más frecuentes son las reacciones dérmicas leves (prurito, erupciones cutáneas, quemaduras leves de la dermis, etc.). Efectos menos frecuentes pero más graves son el eritema multiforme, la púrpura, la fotodermatitis (especialmente enfocada al grupo de los arilpropiónicos) y la necrosis epidérmica tóxica o síndrome de Lyell.^{1,8,9,13}

En la figura 4 se presenta a modo de resumen un esquema de las reacciones adversas comunes (toxicidad renal, gastrointestinal y cardiovascular) para algunos AINEs.

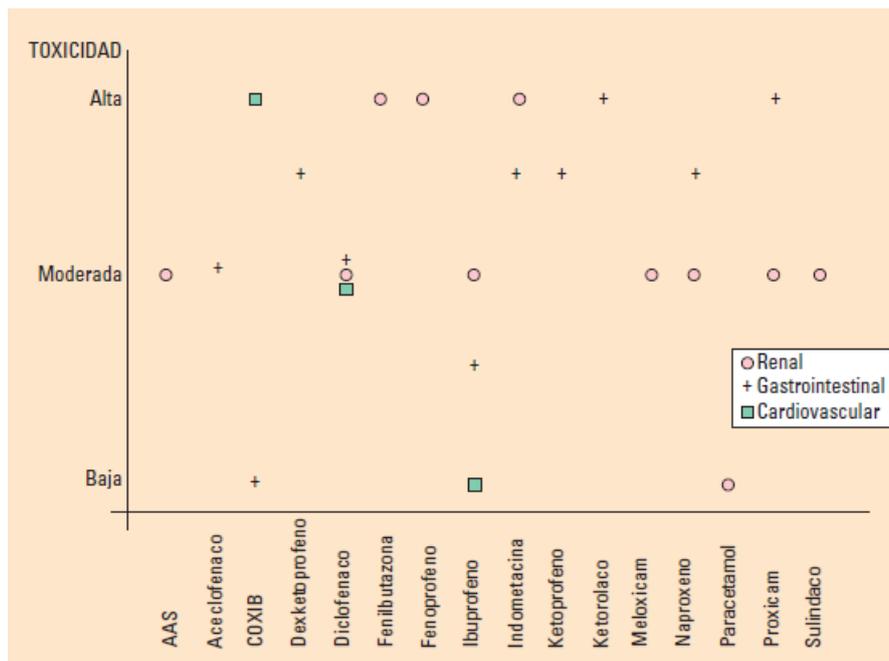


Figura 4. Toxicidad renal, gastrointestinal y cardiovascular de algunos AINEs.

Fuente: B.C. Garrido López et al. Antiinflamatorios no esteroideos: farmacodinámica, reacciones adversas e indicaciones en reumatología, 2011.

3.1.3 Naproxeno

El ácido 2-(6-metoxi-2-naftil) propanoico, comúnmente conocido como naproxeno (NPX) es un antiinflamatorio no esteroideo perteneciente al grupo de los arilpropiónicos. Este fármaco posee un excelente efecto antiinflamatorio acompañado de efectos analgésicos y antipiréticos. Por sus propiedades es utilizado para aliviar los síntomas y signos de la artritis reumatoide, artrosis, episodios de gota aguda, síndromes reumatoides, dismenorrea y espondilitis anquilosante, así como en alteraciones músculo-esqueléticas acompañadas de dolor e inflamación y como aliviador del dolor post-operatorio durante breves periodos de tratamiento¹⁴. No obstante, las complicaciones gastrointestinales son el efecto adverso más común debido a la rápida y completa absorción en el tracto gastrointestinal¹⁵, además de presentar riesgos renales y fototoxicidad debida a la generación de especies transitorias tras absorber luz solar que interaccionen con las biomoléculas.

Se trata de un compuesto quiral en el que la forma enantiomérica (S)- es la forma activa biológicamente, ya que el enantiómero (S)- es más activo como antiinflamatorio que el isómero (R)^{7,16}.

El naproxeno se administra de forma oral en dosis comprendidas entre 500-1000 mg/día (excepcionalmente 1500mg/día)^{14,15}, cuyas propiedades son dosis-dependiente, es decir, las propiedades farmacocinéticas dependen de la cantidad suministrada del fármaco, y por lo general, éstas se mantienen prácticamente constantes para dosis inferiores a 500 mg.¹⁵

Se han realizado numerosos ensayos clínicos para determinar las propiedades farmacocinéticas del naproxeno, cuyos resultados para una dosis de 500 mg administrada de forma oral han sido los siguientes:

- Se absorbe rápida y completamente en el tracto gastrointestinal tras su administración oral, alcanzando una concentración máxima plasmática tras 1-2 h después de la ingesta (rango de tiempo variable según el caso clínico estudiado).^{14,17}
- Tiene un volumen de distribución de 0.16 l/kg y a niveles terapéuticos se encuentra unido fuertemente a las proteínas plasmáticas (albúmina sérica humana principalmente) en más de un 98 %.^{14,17}
- La vida media plasmática o tiempo de vida medio del naproxeno oscila entre 12-16 horas, cuyo estado o concentración de equilibrio se alcanza tras la ingesta de 4 ó 5 dosis.^{13,17,18}
- Aproximadamente, un 95% de la cantidad inicial de naproxeno se excreta en la orina con la siguiente composición: un 50% es excretado como acil glucurónido naproxeno, un 1% como naproxeno, <1% como 6-O-desmetilnaproxeno y el resto como otros compuestos derivados del naproxeno.^{14,17,18}

Una vez introducido el naproxeno en el organismo es metabolizado en dos fases. La primera fase consiste en la desalquilación o desmetilación catalizada por el citocromo P450s para la formación del 6-O-desmetilnaproxeno, siendo el principal metabolito de fase I del naproxeno que presenta un porcentaje de unión a proteínas del 100 % y de excreción inferior al 1 %.

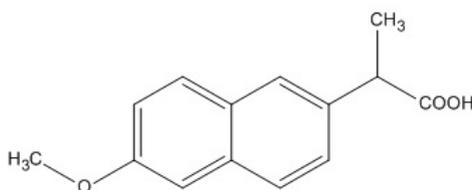


Figura 5. Estructura química del metabolito principal de fase I del naproxeno.

Posteriormente, NPX y DNPX son metabolizados en una segunda fase en acil glucurónido naproxeno, iso acil glucurónido naproxeno y acil glucurónidos derivados del DNPX (6-O-desmetilnaproxeno éter glucurónido, 6-O-desmetilnaproxeno acil glucurónido y 6-O-desmetilnaproxeno iso acil glucurónido), constituyendo los metabolitos de fase II del naproxeno como resultado de la conjugación con el ácido D-glucurónico. En el caso de los metabolitos derivados del DNPX, estos se forman mediante un proceso de sulfatación.^{14,17,19}

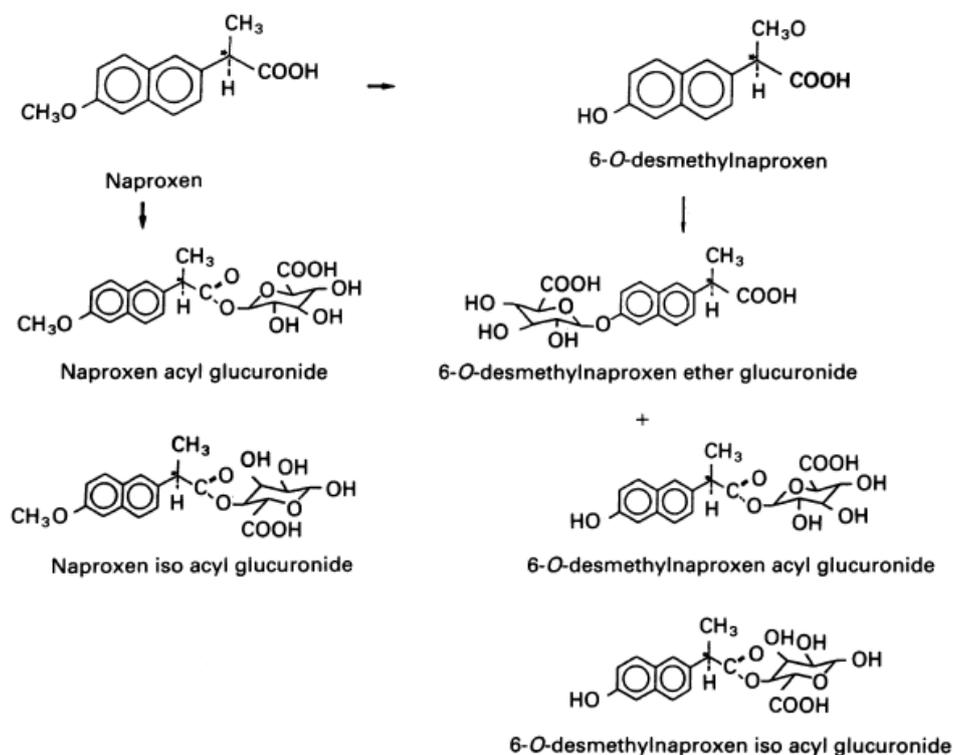


Figura 6. Estructuras químicas del naproxeno y sus posibles metabolitos.

Fuente: The pharmacokinetics of naproxen, its metabolite O-desmethylnaproxen, and their acyl glucuronides in humans. Effect of cimetidine, 1993.

Los acil glucurónidos son moléculas muy reactivas que pueden dar lugar a varias reacciones altamente dependientes de la temperatura y pH. La habilidad de los acil glucurónidos para unirse covalentemente a proteínas es de particular interés para proporcionar más información sobre su toxicidad intrínseca, como hipersensibilidad y toxicidad celular.²⁰

3.2 ALBÚMINA SÉRICA

La albúmina sérica (AS) es una proteína que se encuentra presente en todas las especies animales. Pertenece al grupo de las proteínas transportadoras, que son aquellas encargadas de proporcionar un medio de transporte, en el plasma sanguíneo o a través de la membrana celular, a aquellos sustratos capaces de interactuar con sus centros activos (cavidades donde se producen interacciones específicas entre sustratos y la proteína).

Existen albúminas séricas de diferente naturaleza, tales como de ratas (ASR), conejos (ASC), perros (ASP), cerdos (ASCe), bovinos (ASB), humanos (ASH), etc., y aunque estructuralmente sean similares, diferentes estudios han puesto de manifiesto diferencias en referencia a la unión de fármacos y metabolitos a albúminas de diferente especie (como es el caso de la bilirrubina). Estas diferencias muestran la necesidad de extender los estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos a diferentes especies, siendo las albúminas séricas humanas y bobinas las más utilizadas en investigación, debido a su fácil adquisición y bajo coste.

La albúmina sérica humana (ASH) es una de las proteínas más importantes del cuerpo humano, ya que es sintetizada por el hígado y se encuentra prácticamente en todos los tejidos y fluidos corporales, como por ejemplo, la piel, los músculos, humores vítreo y acuoso, saliva, sudor, sangre, etc., siendo la proteína transportadora más abundante del plasma sanguíneo (39-55 g/L). Además, por sus propiedades es altamente utilizada en medicina y en investigación clínica, especialmente en interacción farmacológica.²¹⁻²⁴

En este trabajo se ha utilizado la ASH para el estudio de las interacciones fármaco-metabolito, por lo que en los siguientes apartados se hablará sobre esta proteína en concreto.

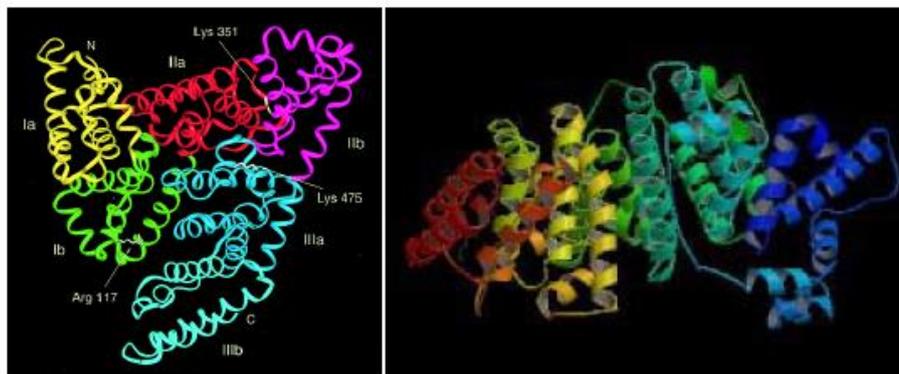


Figura 7. Estructura de la albúmina sérica humana (izquierda) y de la albúmina sérica bovina (derecha).

Fuente: I. Vayá Pérez. Estados excitados del antiinflamatorio no esteroideo flurbiprofeno como sondas para la interacción con proteínas, 2007.

3.2.1 Función de la albúmina sérica humana

La principal función de la albúmina sérica es ejercer como vehículo de transporte y distribución de sustancias exógenas y endógenas en el interior del torrente sanguíneo, como fármacos, hormonas, vitaminas, ácidos grasos aniónicos de cadena larga, etc. Esta función es posible gracias a su alta solubilidad combinada con su elevada carga negativa, facilitando que pueda ligarse reversiblemente tanto a cationes como a aniones.²⁵ Adicionalmente, esta carga negativa impide la excreción de la albúmina por la orina, ya que la membrana basal del glomérulo renal también está cargada negativamente, impidiendo su filtración.²⁴

Además, también ayuda a regular el pH y la presión oncótica, que es la presión osmótica de la sangre ejercida por las proteínas plasmáticas.^{24,27}

Otras funciones de la albúmina sérica son: incrementar la solubilidad de los ligandos unidos a ésta (como los ácidos grasos), disminuyendo su toxicidad o protegiéndolos frente a la oxidación (protección del daño peroxidativo al ácido linoleico), actividad enolasa (actividad enzimática que participa en la glicólisis, que es la ruta metabólica encargada de oxidar la glucosa para obtener energía), actividad esterasa debido a la proximidad de la arginina-410 y la tirosina-411 (hidrólisis de grasas), actividad glucuronidasa (hidrólisis del glucurónido de algunos fármacos como flurbiprofeno, ketoprofeno o naproxeno), etc.^{22,23,28}

3.2.2 Estructura general de la albúmina sérica humana

La albúmina sérica consiste en una cadena polipeptídica simple sin grupos prostéticos (componente no aminoácido que forma parte de la estructura de las proteínas) u otros aditivos, con peso molecular de aproximadamente 67 kDa. Contiene 9 logos dobles formados por 17 puentes disulfuro entrecruzados en toda la macromolécula, envolviendo a los residuos de cisteína adyacentes. Estos se pueden agrupar en tres dominios homólogos (dominio I, II y III) que contienen a su vez 2 logos cada uno de ellos, separados de los contiguos por otro logo, definiéndose dos subdominios (A y B) por dominio. De esta forma, existe un amplio y variado número de sitios de unión donde los sustratos de distinta naturaleza pueden interaccionar.^{29,30}

Es una proteína globular que constituye casi el 60 % del total de proteína en la sangre, la cual un 40 % de la ASH permanece en el plasma mientras que el resto se encuentra en el espacio extravascular. Con una masa molecular promedio de 66.3 kDa, presenta 585 aminoácidos en su secuencia, entre los cuales existe un tiol libre (Cys-34) y un único triptófano (Trp-214). Cuando se irradia la proteína a 295 nm, absorben los aminoácidos aromáticos a excepción del triptófano, el cual tiene una energía de emisión más baja que la energía de absorción de los demás grupos, por lo que sólo vemos su emisión.²⁷

A partir de análisis cristalográficos realizados por difracción de rayos-X, se conoce que la cadena polipeptídica se dobla formando una hélice de dimensiones aproximadas de 80 x 80 x 30 Å, con los siguientes plegamientos: un 67 % en forma de α -hélice, un 10 % de lámina- β y un 23 % de cadena extendida. Estudios recientes proponen que esta conformación cristalina observada en estado sólido es análoga a la que presenta en disolución neutra.^{29,30}

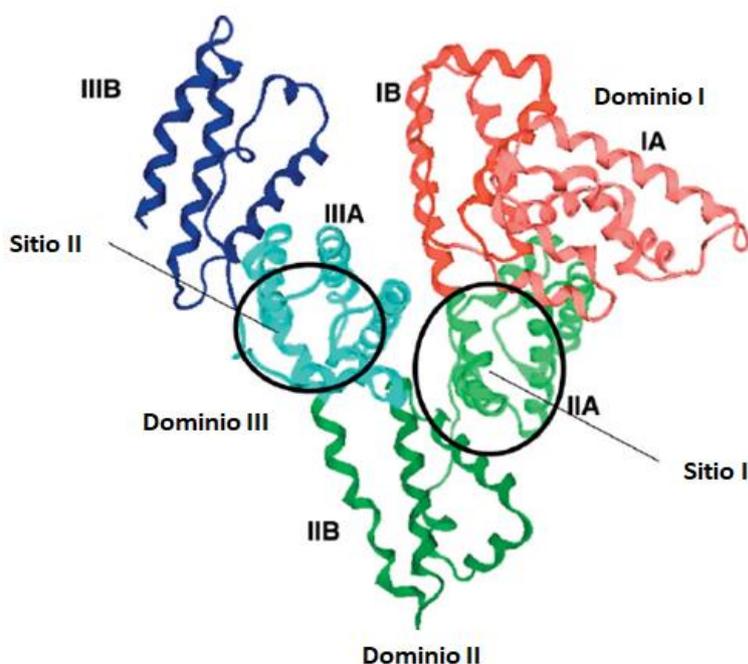


Figura 8. Representación de los dominios I, II y III junto con los subdominios en ASH.

Fuente: V.T. Giam Chuang y M. Otagiri. Stereoselective binding of human serum albumin, 2006.

3.2.4 Interacciones con sustratos

Las albúminas son proteínas flexibles que pueden modificar su estructura para poder interactuar con sustratos de distinta naturaleza en sus centros activo. Dicha interacción puede generar cambios en la albúmina que provoquen un aumento en la estabilidad, mayor afinidad hacia otros sustratos, etc.

En general, las albúminas séricas presentan una gran afinidad por ácidos grasos, aminoácidos, metabolitos como la bilirrubina y fármacos, entre los que se encuentran los antiinflamatorios no esteroideos (AINES).

Interacción con fármacos

Es importante realizar estudios de las interacciones fármaco-proteína a fin de conocer la biodistribución, el metabolismo, la eliminación y el efecto farmacológico de éstos en el organismo.

Los AINES presentan un alto grado de unión con la albúmina, en la mayoría de los casos, del 99 %, la cual se lleva a cabo mediante interacciones reversibles de tipo van der Waals, puente de hidrógeno o puente salino, cuyas constantes de asociación oscilan entre 10^4 y 10^6 M⁻¹. En otros casos, dichas interacciones son irreversibles. Interacciones que se observan con más frecuencia en ciertos tipos de metabolitos de los fármacos, como los glucurónidos. Tanto la naturaleza como la reversibilidad/irreversibilidad de las interacciones son importantes conocerlas, ya que se puede alterar el destino metabólico del fármaco en cuestión, así como modificar las propiedades estructurales y/o funcionales de la proteína, pudiendo generar efectos tóxicos como hipersensibilidad y toxicidad hepática y renal aguda.

Aunque las albúminas séricas poseen varios sitios de unión con sustratos (tal y como se mostró en la figura 8), se sigue aceptando por consenso la existencia de dos sitios específicos de unión o centros activos para moléculas orgánicas pequeñas. En el caso de la ASH, estos sitios de unión específicos, designados por Sudlow et al. en 1975, se conocen como sitio I (o sitio de unión de la warfarina) y sitio II (o sitio de unión del diazepam).

En el sitio I, situado en el subdominio IIA, predominan las interacciones hidrofóbicas (warfarina, indometacina, fenilbutazona o ésteres de los ácidos arilpropiónicos son ejemplos de sustratos con gran afinidad por el sitio I). Algunas evidencias proponen que el sitio I es flexible y de gran tamaño, posibilitando la interacción de moléculas grandes en él y dificultando la observación de la estereoselectividad en la interacción con los sustratos. Los aminoácidos con mayor relevancia para la interacción de sustratos tipo fármacos son el triptófano 214 (Trp-214) y la arginina 218 (Arg-218).

Por otra parte, en el sitio II, situado en el subdominio IIIA, predominan las interacciones electrostáticas y de tipo puente de hidrógeno. Es de menor tamaño y con menor flexibilidad que el sitio I, facilitando la observación de interacciones estereoselectivas (un ejemplo de ello se aprecia con el L-triptófano, cuya afinidad por el sitio II es 100 veces mayor que la del isómero D. Los aminoácidos arginina 410 (Arg-410) y tirosina 411 (Tyr-411) desempeñan un papel importante en la interacción con los ligandos.^{30,31}

Interacción con ácidos grasos

Los ácidos grasos de cadena larga (C₁₆-C₂₀) son intermedios cruciales en el metabolismo de lípidos, puesto que son necesarios para la síntesis de membranas lipídicas, hormonas y son una importante fuente de energía. Son compuestos muy insolubles en el plasma sanguíneo, pero gracias a su interacción con la albúmina sérica, su solubilidad aumenta, permitiendo de esta forma su transporte por el organismo.

Las albúminas séricas poseen hasta siete sitios de unión con ácidos grasos de distinto tamaño de cadena, donde se establecen interacciones de tipo puente de hidrógeno o puente salino entre el carboxilato del ácido graso y los residuos de aminoácido presentes en el centro de unión e interacciones hidrofóbicas entre la cadena lateral del ácido graso y el medio que le rodea. Mientras los ácidos de cadena media (C₆-C₁₄) interaccionan casi exclusivamente en el sitio II, los de cadena larga lo hacen en el sitio I o en otros dominios de unión de la albúmina, pudiendo utilizarse para desplazar fármacos de su sitio de unión.^{21,32}

Interacciones competitivas

Dada la flexibilidad de la albúmina y a que posee un número limitado de sitios de unión de alta afinidad con los sustratos, la unión sustrato-AS puede generar cambios en la estructura de la proteína susceptibles de influir en la unión de nuevos fármacos a los sitios restantes. Dicha alteración en la estructura proteica es importante porque puede modificarse la distribución y eliminación de un fármaco, hasta el punto de alterar sus efectos terapéuticos. Este riesgo aumenta cuando dos o más fármacos compiten por el mismo sitio de unión, o si un fármaco es desplazado de su sitio de unión preferente (por ejemplo, por un ácido graso). Si un fármaco es desplazado de su sitio de unión preferente, puede o bien desplazarse a otro sitio de unión de menor afinidad, sin salir de la proteína pero con una menor interacción, o bien ser expulsado de la proteína hacia el medio, aumentándose en ambos casos la concentración del fármaco libre en el medio (siendo esta liberación más acusada en el segundo caso).

Puesto que la actividad farmacológica de un medicamento depende de la concentración del fármaco libre en el medio, el desplazamiento al sistema sanguíneo del fármaco previamente unido a la proteína incrementaría la concentración libre de éste, produciéndose un aumento de su actividad que podría llegar a generar toxicidad por sobredosis. Los desplazamientos desde el sitio de mayor afinidad a otro de menor afinidad se producen con mayor frecuencia para los fármacos que interaccionan fuertemente con la proteína y que requieren poca concentración libre para realizar su efecto terapéutico. Por esta razón, es importante estudiar los mecanismos de las interacciones competitivas entre fármacos, para poder determinar, por ejemplo, la dosis a suministrar de un fármaco durante la administración simultánea de otro.^{33,34}

3.3 FOTOQUÍMICA MOLECULAR

La fotoquímica molecular es la rama de la ciencia que estudia los procesos físicos y químicos inducidos por la absorción de fotones y propone mecanismos de reacción basados en estructuras moleculares.³⁵

Un proceso fotoquímico se inicia tras la absorción de radiación UV-visible (200-800 nm). Dicha absorción se produce como consecuencia de la generación de una perturbación debida a la interacción entre el campo eléctrico de la molécula y del fotón, conduciendo a la absorción del fotón, el cual transfiere su energía a la molécula, produciéndose en esta un cambio en su configuración electrónica. Esta energía no se distribuye al azar en la molécula, sino que es absorbida selectivamente por grupos cromóforos (grupos químicos no saturados con electrones en orbitales n o π capaces de absorber energía y excitarse a diferentes longitudes de onda, como por ejemplo, dienos, grupos carbonilo, anillos aromáticos, etc.). El estudio y cuantificación de la distribución de dicha energía mediante espectros de absorción y emisión de una molécula proporcionan información sobre la estructura, energía y dinámica de los estados electrónicos excitados, ayudando a comprender e interpretar las propiedades fotofísicas y reacciones fotoquímicas de los compuestos.

Cuando una molécula absorbe un fotón alcanza un estado electrónicamente excitado, el cual es inestable respecto al estado inicial o fundamental. En este punto, la molécula excitada puede perder el exceso de energía para regresar a su estado fundamental a través de diferentes mecanismos, que dependiendo del resultado final, se pueden clasificar en dos grandes grupos: procesos fotofísicos o fotoquímicos.³⁵

- Los procesos fotoquímicos hacen referencia a las transformaciones químicas que puede experimentar una molécula desde su estado electrónico excitado para dar lugar a estructuras más estables con una configuración distante al de partida.
- Los procesos fotofísicos son aquellos donde se producen cambios en los estados cuánticos de las moléculas sin alterar la estructura química, con el fin de alcanzar estados energéticos más estables. Son transiciones energéticas en las que se producen interconversiones entre estados excitados o un estado excitado y el fundamental. En función de si durante la desactivación se emite radiación electromagnética, los procesos fotofísicos se caracterizan a su vez en procesos radiantes (se produce emisión de radiación electromagnética desde el estado excitado para regresar al fundamental) o no radiantes (conversiones entre estados excitados sin emisión de radiación electromagnética).

3.3.1 Procesos fotofísicos

Los procesos fotofísicos son aquellos en los que se producen cambios cuánticos en las moléculas sin que se vea modificada su estructura química. Estos procesos pueden subdividirse a su vez en dos grupos: las transiciones radiantes, que implican un cambio en la energía total de la molécula debida a la absorción o emisión de un fotón, y las transiciones no radiantes, que implican conversiones entre estados energéticos de la molécula sin que se produzca ninguna emisión de radiación electromagnética. Las principales transiciones radiantes y no radiantes quedan recogidas en el diagrama de Jablonsky (figura 9).

Cabe destacar que cuando uno de los electrones de la molécula es excitado a un nivel de energía superior, éste puede seguir apareado (números de espines opuestos) con el electrón del estado fundamental, formándose un estado singlete excitado (S_n) o puede desaparecer del mismo, permaneciendo paralelos entre sí y originando un estado triplete excitado (T_n).

Entre los procesos radiantes más comunes cabe destacar la absorción, fluorescencia y fosforescencia.³⁴

Absorción (A)

Es el fenómeno por el cual una molécula absorbe la energía de un fotón y es promovida a un estado energético superior al inicial (estado excitado), el cual es inestable y regresará al estado de mínima energía (estado fundamental) liberando la energía absorbida. La absorción está asociada a transiciones electrónicas ente diferentes niveles energéticos dentro de la molécula, las cuales pueden ser transiciones permitidas (singlete-singlete, $S_0 + h\nu \rightarrow S_n$) o prohibidas (singlete-triplete, $S_0 + h\nu \rightarrow T_n$) por la regla del espín.

Cuando se hace pasar un haz de luz monocromática a través de una muestra, la potencia del haz es atenuada como consecuencia de la absorción de fotones por las moléculas absorbentes de la muestra. Se define entonces una propiedad de las sustancias denominada absorbancia, que es la relación logarítmica entre la intensidad del haz antes y después de pasar por la muestra. La ley de Lambert-Beer es la expresión que relaciona la absorbancia de la muestra con su concentración a través de la expresión:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Donde I_0 e I son las intensidades del haz de luz monocromático antes y después de pasar por la muestra, respectivamente, l la distancia recorrida por la luz en el medio absorbente (cm), c la concentración de la sustancia en el medio (mol/l) y ε el coeficiente de absorción molar, que depende de la naturaleza de la sustancia absorbente, la longitud de onda del haz y de la temperatura. La relación lineal entre absorbancia y concentración solo se cumple para valores de absorbancia bajos.^{38,39}

Por otro lado, si se registra la diferencia de intensidades antes y después de pasar por la muestra utilizando haces de luz con longitudes de onda variable en la región UV-visible (de menor a mayor energía), se obtiene el espectro de absorción de la muestra, cuyas bandas dan información sobre las diferencias energéticas entre los estados energéticos de la molécula. Aunque no proporciona una

clara identificación del compuesto, es útil para observar cambios en los grupos funcionales de una molécula, por ejemplo, formas ácido-base de una misma sustancia.⁴⁰

Fluorescencia (F)

Es el fenómeno de interacción entre la radiación y la materia por el cual una molécula previamente excitada emite radiación electromagnética, cuya energía es menor que la energía absorbida por la molécula, para alcanzar el estado fundamental. En concreto, el proceso de fluorescencia implica la emisión de un fotón de la especie desde el estado excitado singlete de menor energía (S_1) hasta el estado fundamental (S_0) ($S_1 \rightarrow S_0 + h\nu$), que al tratarse de una interacción entre estados con la misma multiplicidad de spin, está permitida por la regla del spin.³⁴

La energía emitida siempre será menor que la absorbida, debido a los procesos de disipación interna de la molécula. Cuando una molécula absorbe radiación electromagnética es promovida a un estado energético singlete de mayor energía (S_n). Este estado excitado se mantiene durante un periodo corto de tiempo (10^{-9} a 10^{-8} s), en el cual, la molécula sufre cambios conformacionales e interacciones con el entorno, disipándose parte de la energía hasta alcanzar el estado excitado singlete de menor energía (S_1), momento en cual se producirá la emisión de la cantidad de energía restante para alcanzar el estado fundamental. Este desplazamiento hacia longitudes de onda más larga de denomina desplazamiento de Stokes.^{37,41}

La emisión de fluorescencia se produce rápidamente (del orden de nanosegundos), que para disoluciones diluidas, está directamente relacionada con una constante de velocidad k_f . Si la concentración no es pequeña, se producirá el efecto filtro, el cual hace que la intensidad de luz de excitación no sea constante a través de la solución, provocando una pérdida en la linealidad de la curva de calibración del espectrofluorímetro y/o los perfiles de los espectros de excitación y emisión del compuesto.³⁹

No todos los materiales emiten fluorescencia. Aquellos capaces de emitir fluorescencia contienen estructuras con configuraciones moleculares particulares (grupos funcionales aromáticos, grupos carbonilos, estructuras con dobles enlaces conjugados, etc.) se denominan fluorocromos. La parte del fluorocromo responsable de la emisión de fluorescencia se denomina fluoróforo.⁴¹

Registrando la intensidad de la emisión en función de la longitud de onda de luz emitida se obtiene el espectro de emisión de fluorescencia, para el cual es necesario previamente que el fluorocromo absorba radiación. Si se registra dicha energía en función de la longitud de onda a la máxima longitud de onda de emisión se tiene el espectro de excitación, el cual es similar a un espectro de absorción.⁴⁰

Múltiples factores afectan a la fluorescencia de una molécula, entre las que destacan: rendimiento cuántico de fluorescencia, tipo de transición electrónica, estructura molecular, naturaleza del disolvente, concentración, temperatura, pH y oxígeno disuelto.^{41,42}

Fosforescencia (P)

Es el fenómeno de interacción entre la radiación y la materia por el cual una molécula previamente excitada emite radiación electromagnética, cuya energía es menor que la energía absorbida por la molécula, para alcanzar el estado fundamental. En concreto, el proceso de fosforescencia implica la emisión de un fotón de la especie desde el estado excitado triplete de menor energía (T_1) hasta el estado fundamental (S_0) ($T_1 \rightarrow S_0 + h\nu$), que al tratarse de una interacción entre estados con diferente multiplicidad de spin, está prohibida por la regla del spin, es decir, tiene una baja probabilidad de suceder.

Al contrario que sucede con la fluorescencia, la emisión de fosforescencia persiste tras interrumpir la irradiación, por lo que es una emisión que ocurre más lentamente que la fluorescencia pero de menor intensidad, debido a que el estado excitado triplete posee una menor energía que el singlete, y está caracterizada por una constante de velocidad k_p . Para observar este tipo de emisión se han de realizar las mediciones a bajas temperaturas, en medios altamente viscosos o por moléculas adsorbidas sobre superficies sólidas.³⁴

Entre los procesos no radiantes más habituales se encuentran la relajación vibracional, la conversión interna y el cruce intersistemas.^{34,39}

Relajación vibracional (RV)

Es una transmisión de un exceso de energía que se produce desde un nivel vibracional excitado hacia el mismo nivel de menor energía de un estado electrónico. El exceso de energía es transferido a las moléculas de disolvente vecinas, reflejándose en un incremento de la temperatura del medio prácticamente despreciable.

Conversión interna (CI)

Transiciones entre dos estados electrónicos de la misma multiplicidad de spin en las que la molécula excitada pasa de un estado excitado más alto a otro más bajo. La probabilidad de ocurrencia del proceso aumenta conforme la diferencia de energía entre los estados inicial y final es menor.

Cruce intersistemas (CIS)

Transiciones entre dos estados electrónicos isoenergéticos de diferente multiplicidad de spin. La probabilidad de ocurrencia es favorecida si los niveles vibracionales de los dos estados electrónicos se solapan o por la presencia de átomos pesados (como Pb o Br).

En la figura 9 se representa el diagrama de Jablonsky, un diagrama de diferentes niveles de energía que muestra las principales rutas de desactivación que un cromóforo puede seguir tras absorber un fotón. Los tiempos característicos de los procesos fotofísicos descritos anteriormente se recopilan en la tabla 2.

Tabla 2. Tiempos característicos de los principales procesos fotofísicos.

Fuente: I. Vayá Pérez. Estados excitados del antiinflamatorio no esteroideo flurbiprofeno como sondas para la interacción con proteínas, 2007.

Proceso fotofísico	Tiempo (s)
Absorción	10^{-15}
Relajación vibracional	10^{-12} - 10^{-10}
Tiempo de vida del estado excitado S_1	10^{-10} - 10^{-7}
Conversión interna	10^{-11} - 10^{-9}
Cruce intersistemas	10^{-10} - 10^{-8}
Tiempo de vida del estado excitado T_1	10^{-6}

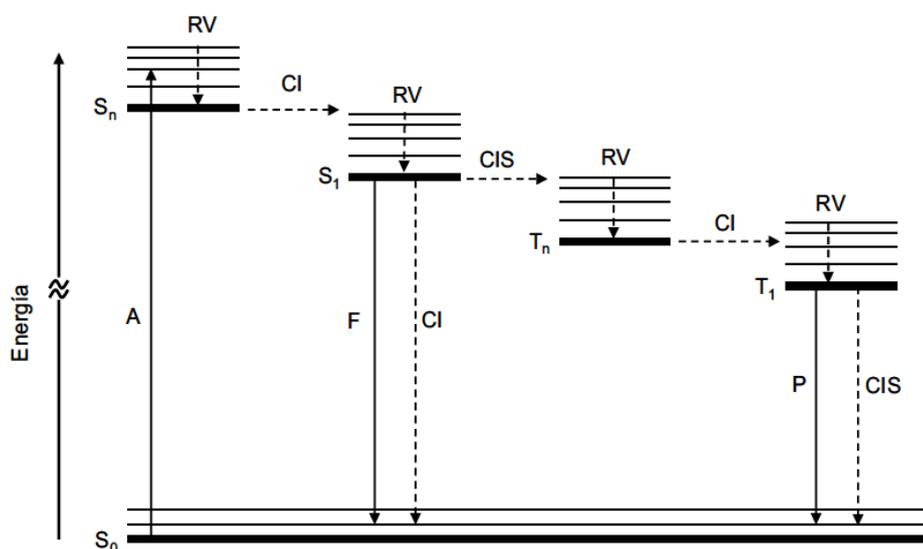


Figura 9. Diagrama de Jablonsky modificado.

Fuente: S.L. Murov. Handbook of photochemistry, 1973.

El diagrama de Jablonsky muestra las transiciones electrónicas que pueden suceder en una molécula. Sin embargo, cuando dos cromóforos se encuentran presentes en el mismo medio (unidos de forma covalente o no) pueden suceder entre ellos otros procesos inducidos por la luz, como por ejemplo.^{35,43}

- Transferencia de protón fotoinducida (TP): proceso mediante el cual un cromóforo dador (DH) transfiere un protón al cromóforo aceptor (A), modificando la estructura química del sustrato. El proceso puede ocurrir por excitación del dador o aceptor.
- Transferencia de energía y formación de exciplejos (EXC): el proceso de transferencia electrónica (TEI) tiene lugar cuando una molécula en su estado excitado cede un electrón a otra en su estado fundamental. En algunos casos se puede formar un complejo de transferencia de carga entre un cromóforo en estado excitado (D^*) y otro aceptor (A). La especie resultante se denomina exciplejo (EX), caracterizado por tener un momento dipolar

elevado y carácter de carga parcial en cada cromóforo, el cual puede ser detectado por fluorescencia.

Los disolventes apolares favorecen la formación del excíplejo, mientras que los polares estabilizan el par iónico radicalario generado por transferencia electrónica.

- Formación de excímero (EXC): formación de una especie (excímero) por colisión entre una molécula excitada con otra idéntica en su estado fundamental, originando como consecuencia la desactivación de la fluorescencia del monómero.

Al contrario que sucede con los excíplejos, no existe una separación de carga. Los excímeros tienen propiedades electrónicas iguales, pudiendo ser detectados por fluorescencia.

- Transferencia de energía fotoinducida (TE): proceso donde un cromóforo excitado dador (D^*) se desactiva a su estado fundamental por transferencia de energía a otro cromóforo aceptor (A), el cual pasa a un estado excitado (A^*)

Para que este proceso ocurra, es necesario que la energía del estado excitado del dador sea superior a la del aceptor, con un tiempo de vida suficientemente largo como para que la transferencia pueda ocurrir.

Estos procesos generalmente se pueden dar a través de dos mecanismos, el coulómbico o tipo Förster (basado en interacciones dipolo-dipolo de largo alcance) e interacciones debidas a solapamiento orbital o tipo Dexter (intercambio electrónico de corto alcance entre los orbitales LUMO y HOMO del dador y aceptor).

3.4 METABOLITOS DE XENOBIÓTICOS COMO POTENCIALES AGENTES FOTOSENSIBILIZADORES

Los fotosensibilizadores son compuestos que tras la absorción de luz pueden inducir alteraciones físicas o químicas en las biomoléculas. Dichos agentes pueden estar presentes como sustancias endógenas en los sistemas vivos o pueden ser introducidos como fuentes exógenas, como pueden ser fármacos, cosméticos, pesticidas, colorantes y otros xenobióticos, y aunque pueden producir efectos beneficiosos en el organismo cuando son utilizados en tratamientos terapéuticos o en la emisión de diagnósticos, ante radiaciones electromagnéticas con elevada energía pueden transformarse en un agente biológico dañino, conduciendo a un amplio espectro de reacciones clínicas relacionados con la fototoxicidad, fotoalergia y la fotocarcinogénesis, cuyos problemas de salud pública asociados al riesgo fotobiológico ha sido reconocido por entidades reguladoras (EMEA, FDA, etc.), quienes han publicado una serie de directrices para las pruebas de fotoseguridad de nuevos compuestos activos.⁴⁴

El daño solar fotoinducido es producido en general por las radiaciones UV-A, UV-B y visible, ya que la radiación UVC es absorbida por la capa de ozono y no afecta a la vida de la superficie terrestre. En particular, la radiación UVA es la responsable de la mayoría de los casos de fotosensibilización debido a su poder de penetración en la piel y su capacidad de excitar a una gran variedad de cromóforos comparado con la radiación UVB.⁵

Un fotosensibilizador activado por luz desencadena una cascada de sucesos químicos que finalmente pueden provocar importantes trastornos biológicos, ocasionando daño directo por modificación de biomoléculas (isomerización, oxidación, etc.) o generando, por ejemplo, especies reactivas de

oxígeno (ROS), oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), aniones radicales de oxígeno ($\text{O}_2^{\cdot-}$), anión superóxido (O^{2-}) u oxígeno atómico ($\text{O}(^3\text{P})$), provocando estrés celular que, si los mecanismo de auto-reparación no son eficientes, se pueden llegar a lesiones irreversibles. En la siguiente figura se presenta un esquema del daño directo y fotoinducido hacia las biomoléculas.⁴⁵

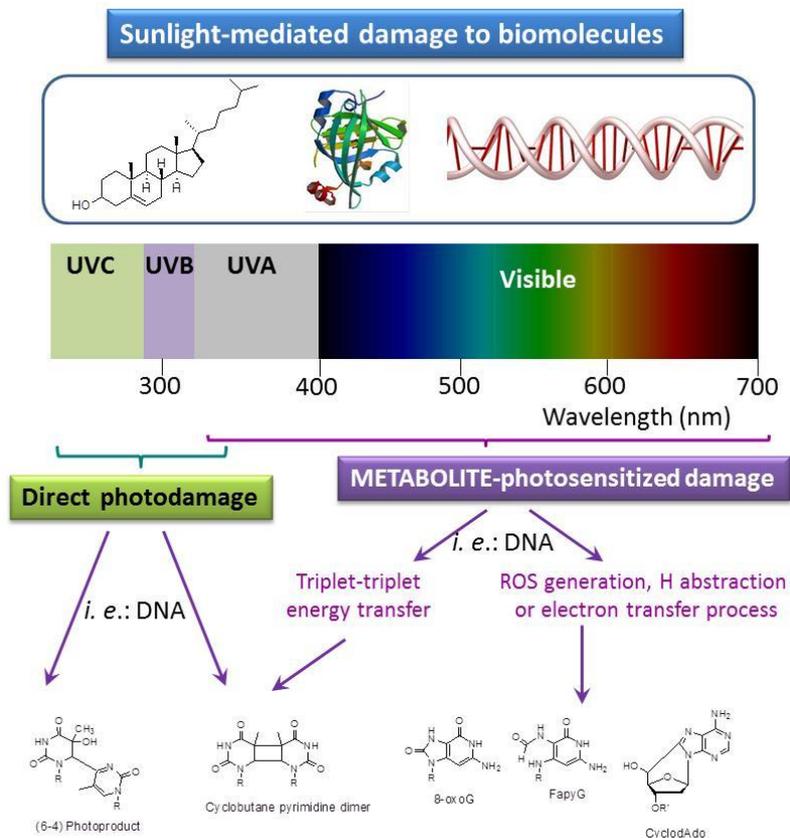


Figura 10. Daño directo y fotoinducido generado por la luz solar hacia las biomoléculas.

Fuente: M.C. Jiménez Molero. Control supramolecular de la fotoreactividad en medios microheterogéneos basados en aminoácidos: geles moleculares y proteínas transportadoras como nanorreactores; CTQ 2016-78875-P, 2016.

El metabolismo de los xenobióticos está compuesto por una amplia gama de modificaciones químicas enzimáticas que tiene lugar en los organismos vivos, transformando productos químicos lipofílicos en derivados hidrofílicos más fácilmente excretados. Los cambios metabólicos son el resultado de dos tipos de procesos secuenciales: las reacciones de fase I y II. Mientras en las reacciones de fase I se introduce un nuevo grupo en el xenobiótico original (mediante oxidaciones, reducciones o hidrólisis), en las reacciones de fase II se procede a la conjugación de los grupos introducidos en la fase I que generalmente inactivan el xenobiótico y facilita su eliminación del cuerpo (mediante procesos de glucuronidación, sulfatación, acetilación, metilación, etc.)

En general, los metabolitos conservan el cromóforo principal del compuesto de partida, y por lo tanto, su capacidad fotosensibilizante, la cual puede verse incrementada tras las modificaciones químicas producidas durante los procesos metabólicos. Específicamente, los metabolitos pueden llegar a mostrar una actividad fotobiológica superior al xenobiótico de partida debido a una combinación de factores, como son:^{45,46}

- a) Desplazamiento batocrómico de la banda de absorción hacia las regiones UVA y visible, ampliándose la fracción activa de la luz solar capaz de producir trastornos por fotosensibilidad.
- b) Modificación de las propiedades de los estados excitados, ya sea fotofísicas (rendimientos cuánticos, tiempos de vida, energías, etc.) o fotoquímicas (carácter ácido-básico, potencial redox, etc.), generando como resultado una reactividad diferente.
- c) Incremento del grado de funcionalización, lo que hace al metabolito más accesible a uniones covalentes con las principales biomacromoléculas (fotounión).
- d) Mayor capacidad de generación de ROS.
- e) Cambios en la afinidad para el transporte por proteínas, conduciendo a una modificación de la biodisponibilidad que se traduce en una fotoreactividad compartimentada.

4. METODOLOGÍA

Una vez presentados los antiinflamatorios no esteroideos y los metabolitos y la importancia de conocer las características fotofísicas y fotoquímicas asociados a los mismos con el fin de prevenir reacciones secundarias adversas por exposición a la luz solar (como fotoalergia, fototoxicidad y fotocarcinogénesis), el desarrollo de este trabajo se centra en la caracterización de uno de los metabolitos de fase I del naproxeno.

En primer lugar, se procederá a la síntesis de dicho metabolito (ácido 6-hidroxi-2-naftil propanoico) para posteriormente caracterizarlo fotofísica y fotoquímicamente.

4.1 INSTRUMENTACIÓN

Equipos

- Equipo de RMN: espectrómetro Bruker Avance III-400 y Magnet System 400 Ascend/R
- Equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC): JASCO UV-1575 intelligent UV/Vis Detector, JASCO PU-2080 Plus intelligent HPLC Pump, JASCO LG-2080-04 Quaternary Gradient Unit y JASCO DG-2080-54 4-Line Degasser.
- Espectrofotómetro UV-vis JASCO V-650
- Espectrofluorímetro JASCO FP-8500 equipado de un SCE-846 y una lámpara de Xenón de 150 W.
- Espectrofluorímetro de tiempo resuelto EasyLife X (Optical Building Blocks) con un detector PTI de resolución temporal en la escala de nanosegundos, utilizando lámparas de excitación LED de distintas longitudes de onda así como filtros para recortar el espectro por debajo de la longitud de onda deseada.
- Equipo de fosforescencia Photon Technology International (PTI, TimeMaster TM/2003), equipado con una lámpara pulsada de xenón.
- Equipo de fotólisis de destello láser (FDL): láser pulsado de Nd-YAG láser (Quantel Brilliant con módulo de 266 ó 355 nm, energía de 10 mJ por pulso), equipado con una lámpara de Xenón como fuente de luz para el análisis de las especies transitorias. El sistema de FDL consiste en una láser pulsado, una lámpara de Xe, un monocromador (Luzchem, $\lambda = 800-200$ nm), un sistema fotomultiplicador y un osciloscopio Tektronic TDS640A. La señal fue transferida a un ordenador personal y los datos se trataron mediante el programa Superspec.
- Equipo de UPLC ACQUITY UPLC (Waters Corp) con un sistema de pinchazo de muestras automático y acondicionado a 10 °C. La columna utilizada para los análisis fue una ACQUITY UPLC BEH C18 (50mm x 2.1 mm i.d., 1.7 μ m). El espectrómetro Waters ACQUITYTM XevoQToF se conectó a un sistema UPLC vía una interfaz de ionización de electrospray (ESI). La Fuente ESI operó de modo ionización positiva con un voltaje capilar de 1.5 kV. La temperatura de la fuente y el sistema de solvatación se mantuvo a 110 °C y 300 °C, respectivamente. Los flujos del cono y el gas de colisión fueron de 0.2 ml/min. Los datos obtenidos se adquirieron usando el software MasslynxTM (Waters corp.). Leucina encefalina

se usó como patrón, generando un ión $[M+H]^+$ (m/z 556.2771) a la concentración de 500 pg/ml y un flujo de 50 $\mu\text{l}/\text{min}$

- Fotorreactor Luzchem provisto con 10 lámparas, situando 5 en cada lateral del fotorreactor. Cada lámpara posee una potencia de 8 W, cuyas longitudes de onda de emisión máxima de irradiación son de 254, 300 y 350 nm. El sistema posee un ventilador para la refrigeración de la muestra y un agitador magnético para favorecer la homogeneización de la misma. (falta foto)
- Cromatógrafo de gases-masas
- Placa de agitación magnética
- Balanza analítica
- Bomba de vacío
- Rotavapor
- Cronómetro
- Baño de ultrasonidos



Imagen 1. Equipo de RMN de 400 MHz.



Imagen 2. Equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)



Imagen 3. Espectrofotómetro JASCO V-650



Imagen 4. Equipo de fluorescencia en tiempo resuelto



Imagen 5. Espectrofluorímetro JASCO FP-8500

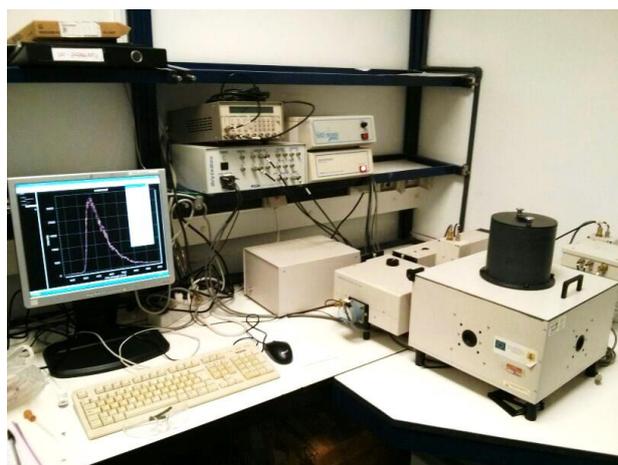


Imagen 6. Equipo de fosforescencia.

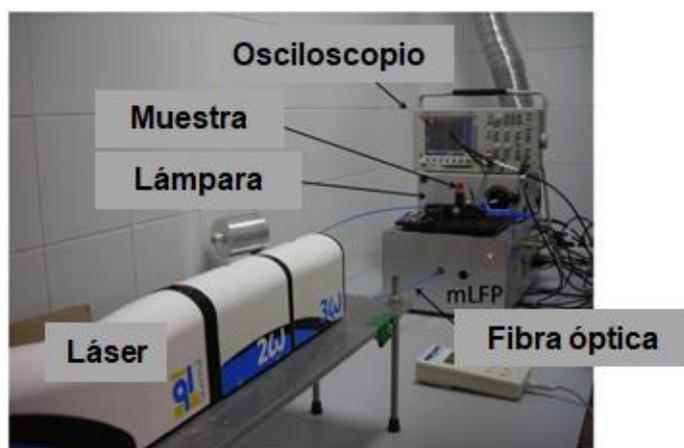


Imagen 7. Equipo de fotólisis de destello láser.



Imagen 8. Fotorreactor Luzchem.

Materiales

- Frascos de vidrio 1, 5 y 22 mL
- Matraz de fondo redondo 25, 50, 100, 250 y 500 mL
- Matraz Erlenmeyer de cuello estrecho 100 y 250 mL
- Matraz aforado de 100 mL tipo A
- Probetas graduadas 10, 50, 100 y 250 mL
- Vasos de precipitados 100 mL
- Pipetas automáticas 25, 200, 1000 y 5000 μ L
- Pipetas Pasteur
- Puntas de pipetas 25, 200, 1000 y 5000 μ L
- Cristalizador con pico
- Papel de filtro (12 μ m)
- Microespátula cuchara plana
- Embudo de decantación 250 y 500 mL
- Jeringas de plástico estériles sin aguja 2 y 5 mL
- Agujas estériles BD Microbalance TM
- Filtros Sephadex P-10
- Globos de goma
- Parafilm
- Tapón septum de inyección
- Viales de UPLC
- Tubos de RMN
- Cubetas de cuarzo 4 mL
- Tapones de rosca
- Potacubetas
- Tapones de goma tipo septum
- Sonda de temperatura
- Embudo de filtrado
- Gafas de seguridad (Láser)

Reactivos y disolventes

- 2-metoxietanol grado analítico (ACS), Scharlau 2.5 L
- Acetato de etilo grado HPLC, Scharlau 2.5 L
- Acetato de sodio anhidro grado analítico (ACS), Scharlau 1 kg
- Acetona grado analítico (ACS), Scharlau 5 L
- Acetona grado HPLC, Scharlau 1 L
- Acetonitrilo-d₃ deuterado, Sigma Aldrich 10 mL
- Acetonitrilo grado HPLC, Scharlau 2.5 L
- Ácido acético glacial grado analítico (ACS), Scharlau 2.5 L
- Ácido bromhídrico 48%, Scharlau 1 L
- Ácido clorhídrico 37%, Scharlau 1 L
- Ácido (S)-2-(6-metoxi-2-naftil) propanoico, Sigma Aldrich 5g

- Ácido (*R*)-2-(6-metoxi-2-naftil) propanoico, Sigma Aldrich 5g
- Albúmina sérica humana, Sigma Aldrich 10 g
- Amano Lipasa A de *Aspergillus niger*, Sigma Aldrich 10 g
- Bicarbonato de sodio grado analítico (ACS), Scharlau 5 kg
- Carbonato de cesio 99%, Sigma Aldrich 50 g
- Cloruro de potasio grado analítico (ACS), Scharlau 1kg
- Cloruro sódico grado analítico (ACS), Labkem 5 kg
- Diclorometano grado HPLC, Scharlau 2.5 L
- Dimetilsulfóxido-d₆ deuterado, Sigma Aldrich 10 mL
- Dimetilsulfóxido grado analítico (ACS), Scharlau 1 L
- Éster metílico α -acetobromo del ácido D-glucurónico, Apollo Scientific 5 g
- Etanol grado HPLC, Scharlau 2.5 L
- Gel de sílice (70-230 mesh ASTM), Scharlau 1 kg
- Hidrocloruro de guanidina, Sigma Aldrich 500 g
- Hidróxido sódico (pellets) 99%, Scharlau 1 kg
- Metanol-d₄ deuterado, Sigma Aldrich 10 mL
- Metanol grado HPLC, Scharlau 2.5 L
- Sulfato de magnesio anhidro extra puro, Scharlau 1 kg
- Tampón salino de fosfato (PBS), Sigma Aldrich 100 T
- TLC sílica gel 60 F₂₅₄, Merk
- Tris(hidroximetil)aminoetano sustancia buffer 99.5%, Sigma Aldrich 100 g

4.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

A continuación se describirá el procedimiento realizado para la síntesis de metabolitos del antiinflamatorio no esteroideo naproxeno y su posterior caracterización fotofísica y fotoquímica.

4.2.1 Síntesis

En este apartado se recoge el procedimiento de síntesis del metabolito de fase I del naproxeno (NPX), el ácido 6-hidroxi-2-naftil propanoico, realizados según el procedimiento descrito en la bibliografía.^{19,20,47} Las formas enantioméricas (S)- y (R)- se obtuvieron a partir de los compuestos (S)-NPX y (R)-NPX, respectivamente.

Síntesis del compuesto ácido 6-metoxi-2-naftil propanoico

Se disolvió una cantidad de (S)- o (R)-naproxeno (200 mg, 0.870 mmol) en ácido acético (4 mL) y, tras dejar enfriar en un baño de agua a 0°C durante 15 minutos, se adicionó ácido bromhídrico (HBr) al 48% (0.748 g, 1.5 mL, 9.235 mmol). La mezcla reaccionante se mantuvo en agitación y se calentó a reflujo.

Tras 24 horas de reacción, se dejó enfriar el matraz de fondo redondo a temperatura ambiente y se adicionó agua destilada fría (4°C) hasta observar precipitación. La emulsión resultante se sumergió en un baño de hielo para forzar todavía más su precipitación, el precipitado se recogió mediante filtración a vacío

Los compuestos (S)-DNPX y (R)-NPX se obtuvieron tras purificar por HPLC (columna HPLC de sílice pura en fase reversa, 50/50 MeCN-H₂O pH 3, flujo 2 mL/min) con un rendimiento del 80 % en ambos casos.

4.2.2 Caracterización fotofísica

Las propiedades fotofísicas de los metabolitos (S)-DNPX y (R)-DNPX se determinaron y se compararon con el correspondiente fármaco (NPX), ya descrito en bibliografía.

La preparación de las disoluciones de naproxeno y desmetilnaproxeno (en sus formas enantioméricas (S)- o (R)-) utilizadas en este apartado se realizaron a partir de disoluciones madre de esos mismos componentes, con una concentración de $1 \cdot 10^{-3}$ M utilizando acetona grado HPLC como disolvente.

Las diferentes alícuotas se prepararon siguiendo la ecuación de dilución presentada a continuación:

$$C_0 \cdot V_0 = C_F \cdot V_F \quad [1]$$

Donde C_0 representa la concentración inicial de la disolución madre ($1 \cdot 10^{-3}$ M), V_0 el volumen a pipetear de dicha disolución, C_F la concentración deseada y V_F el volumen final de disolución a añadir tras la evaporación de la acetona, cuyo valor en todos los casos fue la capacidad volumétrica de la cubeta de cuarzo (3 mL)

Rendimiento cuántico de fluorescencia

El rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ_F) es un parámetro que muestra la eficiencia de un proceso fluorescente mediante una relación entre el número de fotones emitidos y el número de fotones absorbidos. Este parámetro se determina empleando una sustancia de referencia, cuyo rendimiento es conocido, y comparando los espectros de absorbancia y emisión de fluorescencia entre el patrón y la muestra a través de la expresión:

$$\phi_F = \phi_r \cdot \frac{A_r}{A_i} \cdot \frac{I_i}{I_r} \cdot \frac{n_i^2}{n_r^2} \quad [2]$$

Donde ϕ_r es el rendimiento cuántico de fluorescencia de la referencia en las condiciones experimentales, A el valor de la absorbancia a la longitud de onda del experimento, I el área bajo la curva del espectro de emisión de fluorescencia medido a la longitud de onda del experimento y n el índice de refracción de la disolución ($n_{\text{MeCN}} = 1.340$, $n_{\text{PBS}} = 1.333$). Los subíndices "r" e "i" hacen alusión a los valores de la sustancia de referencia y a la muestra, respectivamente.

Es importante resaltar que la ecuación [2] solo es válida para valores de absorbancia menores a 0.1, de otra forma se produce efecto filtro.

Se prepararon un total de 12 disoluciones de (S)-NPX, (R)-NPX, (S)-DNPX y (R)-DNPX con una concentración de 20 μmol en acetonitrilo, tampón fosfato salino (PBS) y una disolución equimolar de albúmina sérica humana en PBS, a partir de las disoluciones madre según la ecuación [1]

Posteriormente se registraron los espectros de absorción correspondientes y los de emisión de fluorescencia a la longitud de onda de excitación de 295 nm. Las medidas se realizaron 3 veces, tomando como valor final la media de los 3 valores.

Energía del estado excitado singlete

El cálculo de E_s se realiza a través de la ecuación de Planck, en la cual se incluye el número de Avogadro (N_A) y la conversión de Julios a kilocalorías (B) para expresar el resultado en kcal/mol.

$$E_s = \frac{h \cdot c}{\lambda} \cdot B \cdot N_A \quad [3]$$

Donde h es la constante de Planck ($6.626 \cdot 10^{-34}$ J/s), c la velocidad de la luz ($3 \cdot 10^8$ m/s), B la conversión de Julios a kilocalorías, N_A el número de Avogadro y λ la longitud de onda de emisión-excitación (expresada en metros), calculada a partir de la intersección entre los espectros normalizados de emisión y de excitación de fluorescencia.

La energía del estado excitado singlete se determinó tras registrar y normalizar los espectros de emisión ($\lambda_{\text{exc}} = 295$ nm) y los de excitación ($\lambda_{\text{em}} = 355$ para NPX; $\lambda_{\text{em}} = 360$ para DNPX) de los compuestos (S)-NPX, (R)-NPX, (S)-DNPX y (R)-DNPX a una concentración 20 μM y disueltos en acetonitrilo y tampón fosfato salino (PBS)

Del cruce de ambos espectros se obtiene la longitud de onda de emisión-excitación y a partir de la ecuación de Planck se obtiene la energía del estado excitado singlete.

Tiempo de vida de singlete

Se registró el tiempo de vida del estado excitado singlete en el espectrofluorímetro de tiempo resuelto, utilizando un led a 295 nm para excitar la muestra con un filtro UV de 320 nm, registrándose la señal de fluorescencia.

Ciclo de Förster

Tras la aparición de un hombro en el espectro de absorción del desmetilnaproxeno en PBS (véase apartado 5.2) se sospechó de la presencia de un equilibrio fenol-fenolato debido al grupo fenol del metabolito. Para estudiar este comportamiento, se determinó el valor del pK_a^* mediante la aplicación del ciclo de Förster⁴⁸, cuya expresión es la siguiente:

$$pK_a - pK_a^* = \frac{E_{HA} - E_A^-}{2.3RT} \quad [4]$$

Donde pK_a es el logaritmo de la constante ácida del compuesto, pK_a^* el logaritmo de la constante ácida del compuesto en el estado excitado singlete, E_{HA} la energía de singlete en la forma protonada del compuesto (fenol) y E_A^- la energía de singlete en la forma desprotonada del compuesto (fenolato)

Dada la insolubilidad del DNPX en agua y su similitud estructural con el 2-naftol, se tomó como valor del pK_a el de esta última molécula ($pK_{a_{2\text{-naftol}}} = 9.51$). Para comprobar esta hipótesis, se prepararon tampones de pH 1, 4, 7.3, 8, 9, 10 y 12, cuya preparación se detalla en los anexos (véase anexo II: preparación de disoluciones tampón).

A continuación, se prepararon muestras de DNPX con una concentración de 20 μmol en los diferentes tampones de pH y se registraron los espectros de absorción correspondientes.

Finalmente, para el cálculo de las energías E_{HA} y E_A^- se siguió el mismo procedimiento descrito para el cálculo de las energías de singlete. Para la forma protonada se utilizó el tampón de pH 1, garantizando la presencia del grupo fenol, y para la forma desprotonada el tampón de pH 12, garantizando la presencia del grupo fenolato. En esta ocasión se registraron los espectros de emisión de fluorescencia a la longitud de onda de excitación de 310 nm y los espectros de excitación de fluorescencia a 360 nm y 412 nm, respectivamente.

Interacción fármaco-proteína

Los estudios de transferencia de energía entre la albúmina sérica humana y los metabolitos del naproxeno se llevaron a cabo la ecuación de Stern-Volmer^{16,40} utilizando una cantidad constante de albúmina sérica humana como desactivador y cantidades crecientes de (S)-NPX, (R)-NPX, (S)-DNPX y (R)-DNPX.

Se prepararon 5 disoluciones por fármaco o metabolito (un total de 20 muestras) con las siguientes características:

Tabla 3. Disoluciones para el ensayo Stern-Volmer

Concentración HSA (μM)	Equivalentes HSA	Concentración (μM)	V_0 (μL)	V_F (mL)
20	-	0	-	3
	0,5	10	30	3
	1	20	60	3
	2	40	120	3
	5	100	300	3

Donde V_0 indica el volumen a pipetear de la disolución madre $1 \cdot 10^{-3}$ M del fármaco para tener la concentración final deseada en 3 mL.

Posteriormente se registraron los espectros de absorción correspondientes, los espectros de emisión de fluorescencia a la longitud de onda de 295 y 310 nm y el tiempo de vida del estado excitado singlete a 295 nm con un filtro UV de 320 nm.

Energía del estado excitado triplete

Se prepararon 15 mL de una disolución de DNPX en etanol a una concentración tal que a $\lambda = 300$ nm la absorbancia de la muestra fuese de aproximadamente 0.8. Paralelamente, como patrón de referencia, se utilizó benzofenona preparada en las mismas condiciones que la muestra.

Las concentraciones finales de las muestras fueron de 0.1 mM para el desmetilnaproxeno y 1.7 mM para la benzofenona.

Dado que la señal de fosforescencia emitida por muestras líquidas es muy pequeña y difícilmente detectable, es necesario realizar las medidas en una matriz sólida, por lo que se introdujo una pequeña cantidad de muestra en un tubo cilíndrico de cuarzo diámetro 2.5 mm) y se sumergió lentamente en un baño de nitrógeno líquido, obteniéndose de esta forma una matriz sólida cristalina homogénea.

En último lugar, se registraron los espectros de emisión de fosforescencia correspondientes, realizando un total de dos mediciones por muestra.

Fotólisis de destello láser

Se prepararon 15 mL de una disolución de NPX y DNPX en acetonitrilo grado HPLC y PBS tal que a la longitud de onda de excitación ($\lambda = 266$ nm) la absorbancia de la muestra fuese de aproximadamente 0.3. Se registraron las señales a $\lambda = 440$ nm en PBS.

4.2.3 Caracterización fotoquímica

El análisis fotoquímico contempla el estudio de cambios moleculares como consecuencia de una exposición prolongada a una fuente de radiación ultravioleta, preferiblemente en el rango UV-B ($290 < \lambda < 400$ nm).

Para el estudio fotoquímico del metabolito DNPX, se realizaron dos experiencias: una en ausencia y otra en presencia de proteína.

Irradiación de DNPX

El seguimiento de esta reacción se llevó a cabo por RMN, para lo cual se disolvió una cantidad de DNPX (5 mg, 23.15 μ mol) en acetonitrilo deuterado (MeCN- d_3) (1mL) y se registró su espectro de 1 H-RMN (tiempo 0).

A continuación, se introdujo la muestra en un fotorreactor y se irradió con lámparas UV-B centrada a $\lambda = 300$ nm durante un total de 8 horas, parando el experimento cada 2 horas para registrar el grado de avance de la reacción por 1 H-RMN.

El producto final fue analizado por cromatografía de gases-masas y UPLC-MS.

Irradiación de DNPX en presencia de albúmina sérica humana

El crudo de irradiación de DNPX se analizó mediante dos procedimientos diferentes: en el primero, para estudiar la posible fotounión a la proteína, se hizo una cromatografía por exclusión de tamaño (size-exclusion chromatography) utilizando Sephadex[®] G-25; en el segundo, para investigar si se formaban fotoproductos que no se unen a la proteína, se desnaturizó la misma y se realizó una centrifugación.

Para el estudio de la posible fotounión a la proteína, se prepararon un total de 4 disoluciones con una concentración de 33.3 μ M de (S)-DNPX o (R)-DNPX y 66.6 μ M de albúmina sérica humana (relación molar 1:2 ligando/proteína) en 3 mL de PBS. Adicionalmente, se preparó una quinta disolución que contenía únicamente proteína 66.6 μ M. A continuación se registraron los espectros de absorción correspondientes y los espectros de fluorescencia a la longitud de onda de excitación de 310 nm de todas las muestras. A continuación se irradiaron las muestras DNPX/ASH y ASH (como control) durante 60 minutos en el fotorreactor a 300 nm y se registraron nuevamente los espectros de absorción y de emisión de fluorescencia excitando a 310 nm. Seguidamente, a los crudos de irradiación de (S)-DNPX/ASH o (R)-DNPX/ASH se añadieron 1.72 g de hidrocloreto de guanidina (GndCl) 6 M, con el fin de causar la desnaturización de la proteína. Posteriormente, la mezcla se filtró mediante una columna Sephadex[®] G-25. En primer lugar, se hicieron pasar 25 mL de PBS, y tras enrasar se añadieron 2.5 mL de la mezcla DNPX-ASH-GndCl. Tras enrasar, se eluyó con 3.5 mL más de PBS, recogiendo esta última elución como muestra final. Finalmente, se registraron los espectros de absorción correspondientes y de emisión de fluorescencia a la longitud de onda de excitación de 310 nm de las muestras finales.

Por otro lado, para investigar la posible formación de fotoproductos no unidos covalentemente, se prepararon 4 disoluciones de concentración de 100 μM de (S)-DNPX o (R)-DNPX y 200 μM de albúmina sérica humana en 6 mL de PBS. Las muestras fueron irradiadas durante 60 minutos. Para poder analizarlas por cromatografía UPLC se llevó a cabo el siguiente tratamiento: a 2 mL de muestra se adicionaron 24 mL de acetona grado HPLC a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y tras 1 h de reposo a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, las muestras se centrifugaron a 6000 rpm durante 20 min. Posteriormente se decantó la fase líquida, se rotavaporó y se redisolvió en acetonitrilo grado HPLC para su posterior análisis por UPLC-MS.

5. RESULTADOS

En este apartado se mostrarán los resultados obtenidos a partir de los ensayos experimentales realizados en el laboratorio, expuestos en el apartado anterior.

5.1 CARACTERIZACIÓN

Para la caracterización de los compuestos sintetizados, los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN se registraron en un espectrómetro Bruker Avance III-400. La información proporcionada se trató con el programa MestReNova 6.0.2, obteniéndose los datos del desplazamiento químico, la multiplicidad, la integración y la constante de acoplamiento.

Adicionalmente, se sometieron los compuestos a UPLC-MS, observándose una única señal, y se detectó la masa molecular correspondiente.

Espectros ^1H y ^{13}C del compuesto ácido (S)-2-(6-hidroxi-2-naftil) propanoico

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 9.65 (s, 1H), 7.70 - 7.57 (m, 3H), 7.35 (dd, $J = 8.5, 1.8$ Hz, 1H), 7.06 (dt, $J = 8.7, 2.3$ Hz, 2H), 3.82 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 1.52 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD): δ 178.52, 156.41, 136.78, 135.49, 130.28, 129.85, 127.53, 127.06, 126.93, 119.50, 109.74, 46.54, 19.01. HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$): Calculada para $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{O}_3$ 217.0865, encontrada 217.0858.

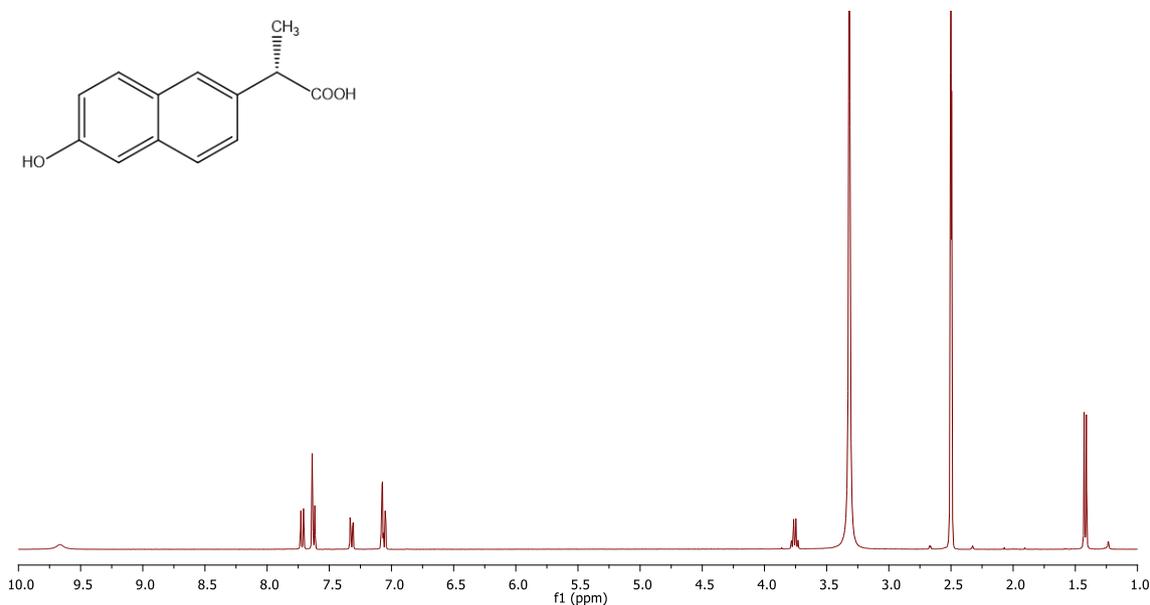


Figura 11. Espectro ^1H del compuesto ácido (S)-2-(6-hidroxi-2-naftil) propanoico.

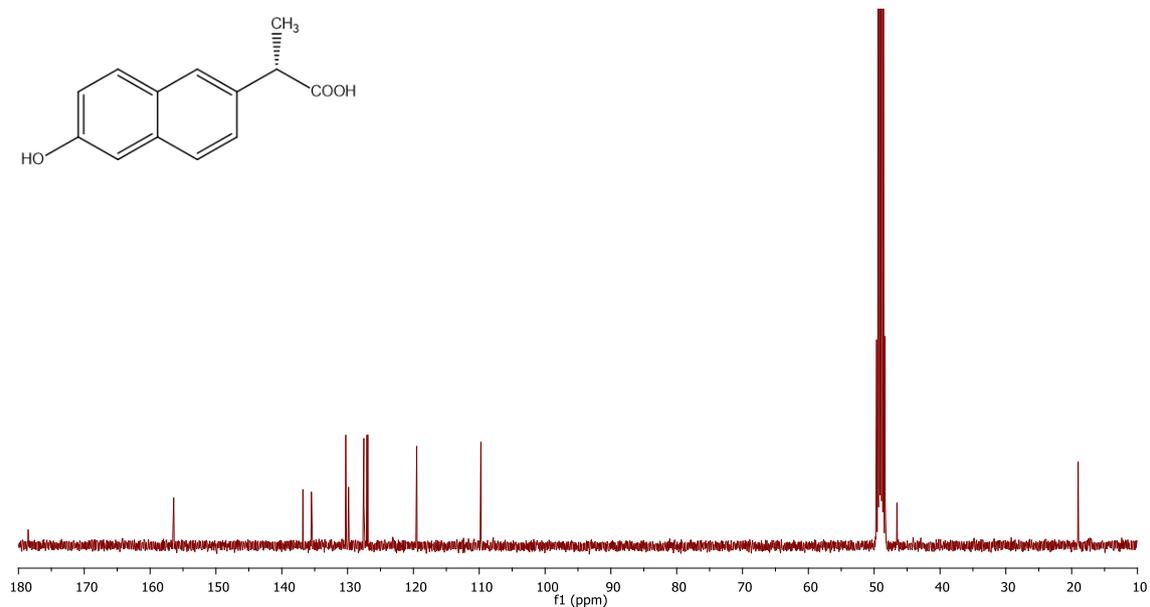


Figura 12. Espectro ^{13}C del compuesto ácido (S)-2-(6-hidroxi-2-naftil) propanoico.

Espectros ^1H y ^{13}C del compuesto ácido (*R*)-2-(6-hidroxi-2-naftil) propanoico

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 9.67 (s, 1H), 7.67 (dd, $J = 36.3, 8.6$ Hz, 3H), 7.32 (dd, $J = 8.6, 1.7$ Hz, 1H), 7.06 (dd, $J = 10.6, 1.9$ Hz, 2H), 3.76 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 1.42 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ 175.54, 155.14, 135.39, 133.53, 129.11, 127.62, 126.17, 126.13, 125.55, 118.76, 108.45, 44.57, 18.45. HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$): Calculada para $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{O}_3$ 217.0865, encontrada 217.0857.

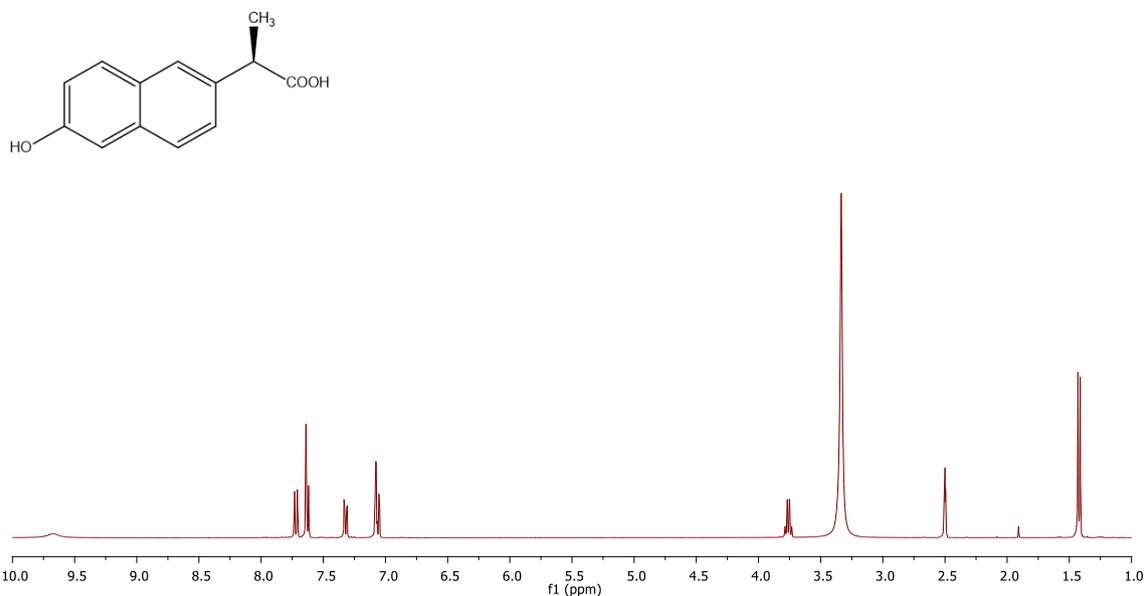


Figura 13. Espectro ^1H del compuesto ácido (*R*)-2-(6-hidroxi-2-naftil) propanoico.

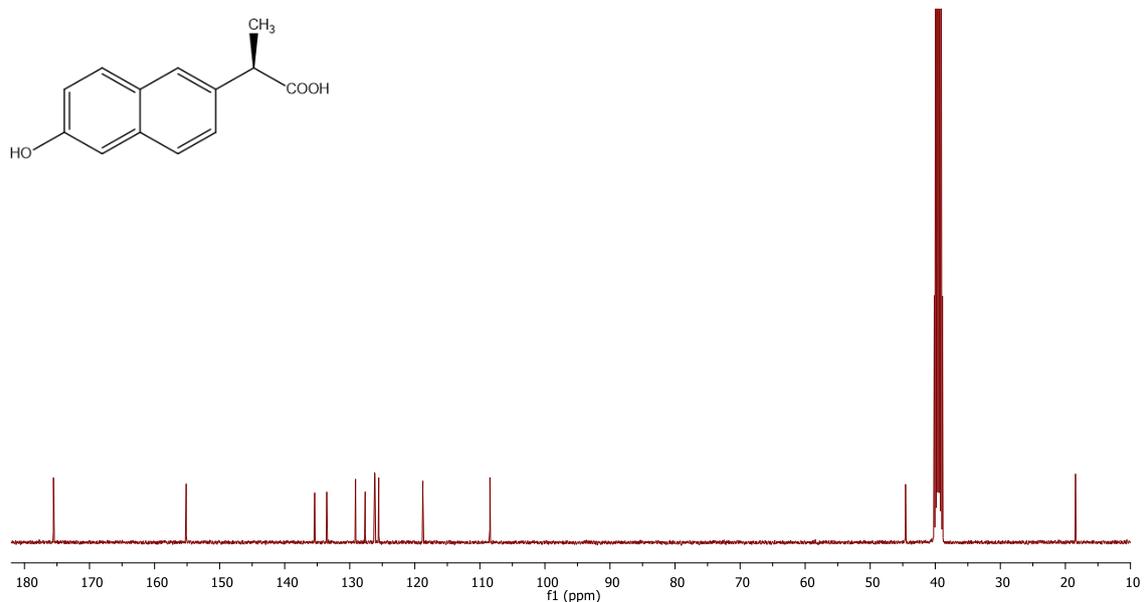


Figura 14. Espectro ^{13}C del compuesto ácido (*R*)-2-(6-hidroxi-2-naftil) propanoico.

5.2 CARACTERIZACIÓN FOTOFÍSICA

El tratamiento de los espectros de absorción y los de emisión y excitación de fluorescencia se realizó utilizando el programa OriginPro 9.0.

En ausencia de ASH solo se mostrarán los espectros de las formas enantioméricas (S)-, tanto de NPX como de DNPX, ya que en disolventes no quirales como los empleados no existe diferencia de comportamiento entre ambos sustratos. En presencia de proteína, se investigarán los dos enantiómeros, para ver si existe enantiodiferenciación en la unión a la proteína.

Espectros de absorción, de emisión y rendimiento cuántico de fluorescencia

Los espectros de absorción y los de emisión de fluorescencia a $\lambda_{exc} = 295$ nm de las sustancias en acetonitrilo, PBS y en presencia de albúmina sérica humana se presentan a continuación.

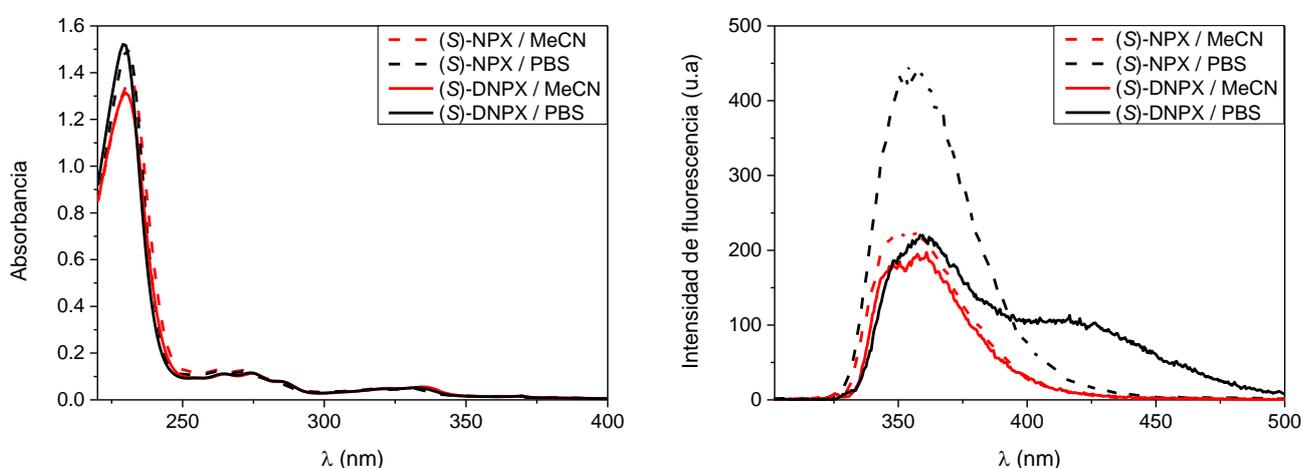


Figura 15. Espectro de absorción (izquierda) y de emisión de fluorescencia a $\lambda_{exc} = 295$ nm (derecha) de (S)-NPX y (S)-DNPX 20 μ M en acetonitrilo y PBS.

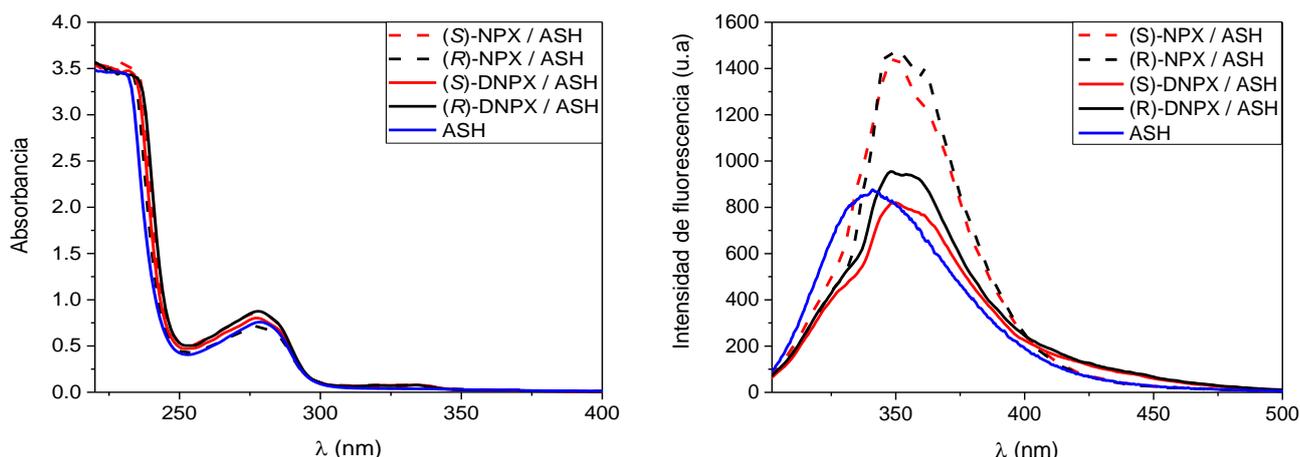


Figura 16. Espectro de absorción (izquierda) y de emisión de fluorescencia a $\lambda_{exc} = 295$ nm (derecha) de (S)-NPX, (R)-NPX, (S)-DNPX y (R)-DNPX 20 μ M en ASH 20 μ M (1 eq.)

Como puede apreciarse, los espectros de absorción de NPX y DNPX son prácticamente idénticos, y muy similares en acetonitrilo y PBS. La nueva banda observable en los espectros en presencia de proteína se debe al triptófano de la ASH, el cual absorbe en el rango 250-290 nm.

Respecto a la emisión, el espectro de fluorescencia depende del disolvente utilizado. Así, en acetonitrilo, NPX y DNPX presentan un espectro similar, aunque NPX presenta una intensidad superior y su máximo de emisión se centra a 352 nm (para DNPX el máximo aparece ligeramente desplazado, a 358 nm). En PBS las diferencias entre el fármaco y su metabolito son mucho más acusadas. Así, la banda de emisión de NPX aparece centrada alrededor de 355 nm, mientras que el DNPX además de desplazarse ligeramente a 360 nm, exhibe la formación de un hombro a 412 nm. Este fenómeno es debido a la presencia de la forma protonada y desprotonada del compuesto por el grupo fenol. En presencia de ASH, al excitar a $\lambda = 295$ nm absorbe tanto la proteína como los ligandos, donde la emisión del Trp de la ASH corresponde al hombro situado a $\lambda \approx 340$ nm. En este caso no se observa la banda debida al fenolato ($\lambda > 400$ nm). Sin embargo, se observa un incremento notorio en la intensidad de la banda centrada a 350 nm, el cual es más acusado en el naproxeno.

Los máximos de absorción y emisión de fluorescencia a 295 nm se presentan en la tabla 5:

Tabla 4. Máximos de absorbancia y emisión de fluorescencia.

	Máximos absorción			Máximo(s) fluorescencia		
	MeCN	PBS	ASH (1 eq.)	MeCN	PBS	ASH (1 eq.)
(S)-NPX	263, 272, 333	263, 272, 330, 370	278, 317	352	355	351
(R)-NPX			278, 320			351
(S)-DNPX	265, 275, 286, 336, 365	265, 274, 282, 333, 370	279, 333	358	360, 412	351
(R)-DNPX			277, 334			351

Aplicando la ecuación [2] y tomando como referencia el (S)-NPX ($\phi_F(\lambda = 295 \text{ nm})/\text{MeCN} = 0.42$)⁴⁹, se determinaron valores de los rendimientos cuánticos de fluorescencia que fueron:

Tabla 5. Rendimientos cuánticos de fluorescencia.

	MeCN	PBS	ASH (1 eq.)
(S)-NPX	0.42	0.63	0.41
(R)-NPX			0.41
(S)-DNPX	0.40	0.75	0.35
(R)-DNPX			0.35

Como es de esperar, los enantiómeros de un mismo compuesto no presentan diferencias en acetonitrilo y PBS (por ello, los resultados se indican en una misma entrada para los dos enantiómeros). En presencia de proteína, al ser un medio quiral, puede ocurrir estereodiferenciación. Sin embargo, este no fue el caso. Este efecto, aunque a priori pueda parecer contradictorio, existen precedentes en la literatura⁴⁹ que muestran un ϕ_F idéntico en presencia de ASH para los enantiómeros del NPX.

En presencia de disolventes polares no próticos (como el MeCN) apenas existe variación de ϕ_F entre fármaco y metabolito, mientras que en el medio tamponado fosfato-salino con un pH biológico, el rendimiento cuántico de fluorescencia es superior en el metabolito. Este efecto hace patente una diferencia entre el naproxeno y su metabolito de tipo I, lo que es un aliciente para realizar futuros estudios de estos componentes en medios biológicos (por ejemplo, cultivos celulares).

Además, en presencia de ASH los rendimientos cuánticos de fluorescencia disminuyen, siendo la disminución más acusada en el desmetilnaproxeno.

Energía del estado excitado singlete

La energía del estado excitado singlete (E_s) se obtiene a partir de los espectros normalizados de excitación y emisión.

Según lo expuesto en el apartado anterior, para disoluciones en MeCN y PBS solo se mostrarán los resultados correspondientes a las formas enantioméricas (S)-.

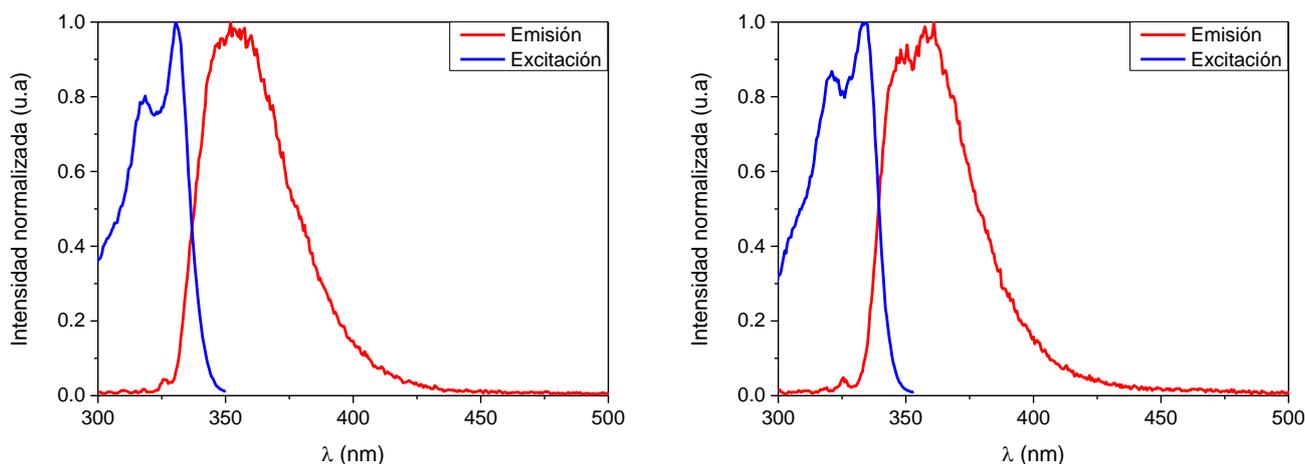


Figura 17. Espectros de emisión-excitación de fluorescencia de (S)-NPX (izquierda) y (S)-DNPX (derecha) 20 μM en acetonitrilo.

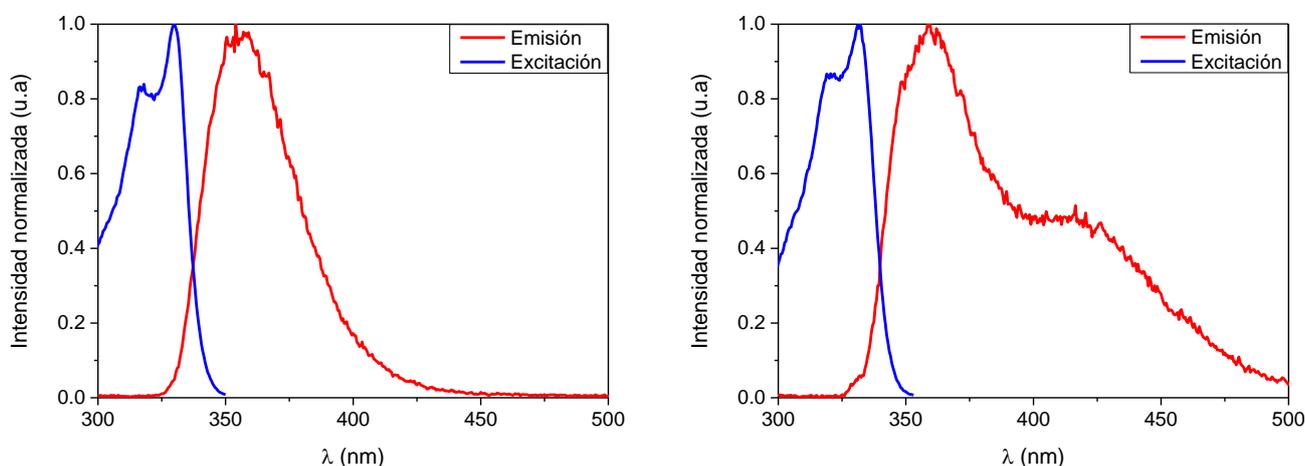


Figura 18. Espectros de emisión-excitación de fluorescencia de (S)-NPX (izquierda) y (S)-DNPX (derecha) 20 μM en PBS.

Tanto para NPX como para el DNPX, los espectros son prácticamente idénticos, por lo que se espera una energía de singlete muy similar.

A partir de la intersección de los espectros normalizados de emisión y excitación y por aplicación de la ecuación [3], se obtiene que la longitud de onda de emisión-excitación ($\lambda_{\text{em-exc}}$) es de 337 nm para el NPX y 340 nm para el DNPX. Finalmente, la energía del estado excitado singlete es de 84.99 kcal/mol para el NPX y 84.24 kcal/mol para el DNPX.

Tiempo de vida de singlete

Dicho valor puede hallarse mediante un ajuste exponencial de la señal registrada por el fluorímetro de tiempo resuelto, utilizando como algoritmo de iteración Levenberg Marquardt.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla 6. Tiempos de vida del estado excitado singlete.

Compuesto	τ_s (ns)
(S)-NPX / MeCN	6.419
(S)-NPX / PBS	8.778
(S)-DNPX / MeCN	5.871
(S)-DNPX / PBS	6.917

De forma general, se observa que los tiempos de vida del naproxeno son superiores a los de su metabolito. Además, en ambos casos el tiempo de vida es superior en PBS que en acetonitrilo.

Para el caso del NPX, los valores de los tiempos de vida son similares con los encontrados en bibliografía: τ_s ($\lambda = 295$ nm/MeCN) = 7.44 ns⁵⁰; τ_s ($\lambda = 295$ nm/PBS) = 8 ns⁴⁹.

Ciclo de Förster

Inicialmente se comprobó la hipótesis de que el valor de pKa en el estado fundamental del DNPX se puede aproximar al del 2-naftol. Para ello se llevó a cabo el registro de los espectros de absorción en medio tamponado a distintos pH.

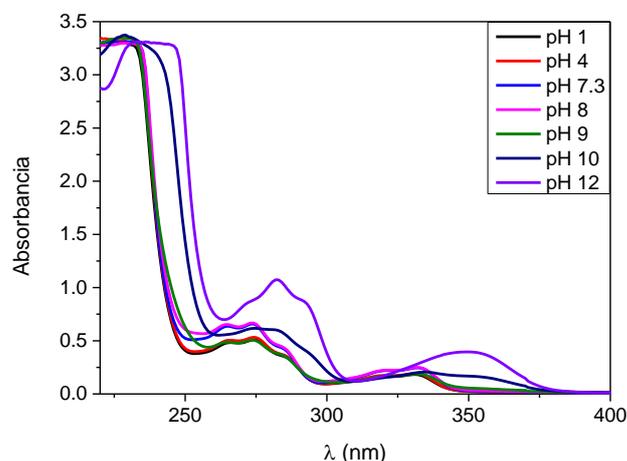


Figura 19. Espectros de absorción (S)-DNPX 20 μM en tampones de pH 1, 4, 7.3, 8, 9, 10 y 12.

Se observó que a pH comprendido entre 1 y 9 existe una banda a 250-300 nm y otra a 300-330 nm. A pH = 10, estas bandas comienzan a desplazarse hacia longitudes de onda mayores, hasta que a un pH = 12 las nuevas bandas se sitúan a 260-310 nm y 315-380 nm, respectivamente, además de producirse un incremento en la absorbancia. Se observa pues que existe un cambio entre pH = 9 y pH = 10, dado que los espectros de absorción se ven modificados.

La ecuación de Henderson-Hasselbalch (ecuación 5) permite relacionar el pH de una disolución tampón con la disociación y la constante K_a de ese equilibrio.

$$pH = pK_a + \log_{10} \left(\frac{[A^-]}{[HA]} \right) \quad [5]$$

Como se puede observar, cuando la concentración de ácido y su base conjugada son iguales, el pK_a coincide con el pH de la disolución.

Retomando los espectros de absorción obtenidos a distinto pH, puede concluirse que para un pH comprendido entre 1-9 existe una predominancia de la forma ácida, dado que el espectro de absorción no sufre cambios significativos. Para un pH = 10, los desplazamientos de las bandas del espectro indican que la forma básica comienza a dominar sobre la ácida, dominancia que se torna completa para un pH = 12, momento en el cual las bandas han variado, tanto de posición como de intensidad.

Es por ello que existe un intermedio de transición entre la forma ácida y básica localizado entre pH = 9 y pH = 10, localizándose el equilibrio fenol-fenolato en este intervalo. Por tanto, la hipótesis inicial puede considerarse válida y el pKa del DNPX es similar al 2-naftol ($pK_a = 9.51$).

A continuación, el siguiente paso de acuerdo con la expresión del ciclo de Förster (ec. 2) es el cálculo de las energías del estado excitado singlete para la forma protonada y desprotonada, cuyo procedimiento es idéntico al utilizado en el cálculo de las energías de singlete para NPX y DNPX en acetonitrilo y PBS, sustituyendo los disolventes por disoluciones tampón de pH= 1 (predominio de forma ácida) y pH = 12 (predominio de forma básica), realizando las medidas de emisión de fluorescencia a 310 nm y las de excitación de fluorescencia según el máximo de emisión de los mismos.

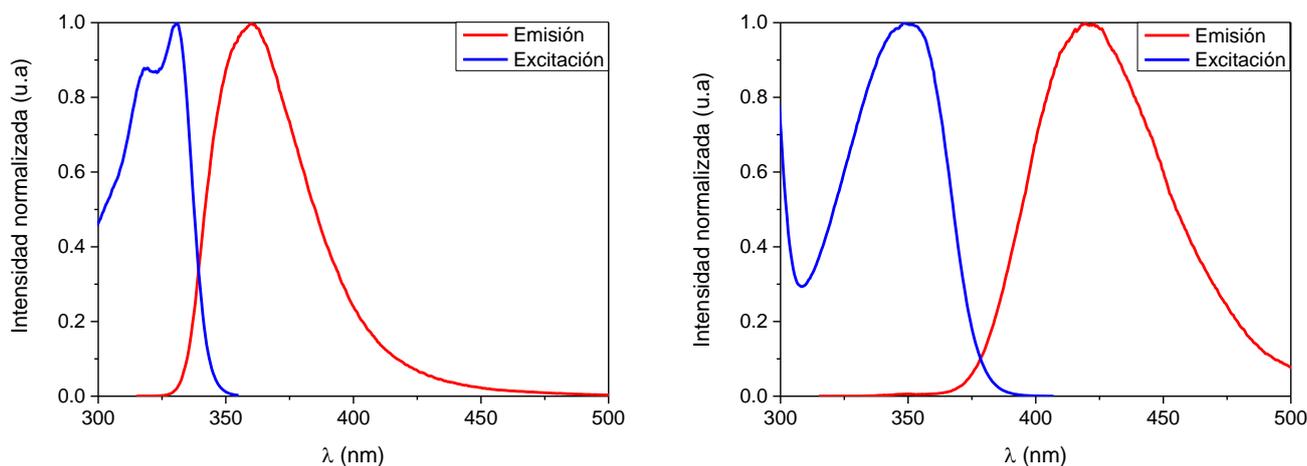


Figura 20. Espectros de emisión-excitación de fluorescencia de (S)-DNPX 20 μ M a pH 1 (izquierda) y pH 12 (derecha).

A diferencia del espectro de emisión de fluorescencia del compuesto en PBS, esta vez solamente se observa una única banda (banda roja) en lugar de la presencia de una banda seguida de un hombro, lo que muestra la predominancia de una de las formas sobre la otra. Además, a pH = 1 se observa un máximo de emisión de fluorescencia a 340 nm, que es el mismo para el caso del PBS (pH 7.3), mientras que a pH = 12, tanto la banda de emisión como su máximo se ven desplazados, situándose este a 412 nm, siendo este valor la longitud de onda a la cual aparecía el hombro en el espectro de fluorescencia en PBS. Con estos resultados se corrobora la hipótesis deducida a partir de los espectros de absorción a diferentes pH, puesto que a un pH comprendido entre 1-9 existe una predominancia de la forma ácida, ya que existe una banda principal con un máximo a 340 nm, mientras que a partir de pH 10 la predominancia cambia a favor de la forma básica, cuyo espectro de emisión de fluorescencia se desplaza hacia la derecha, mostrando un máximo a 412 nm.

Realizando la intersección entre los espectros de emisión y de excitación de fluorescencia se obtienen las longitudes de onda de emisión-excitación, donde utilizando la ecuación de Planck (ec. 4) se obtienen las correspondientes energías del estado excitado singlete.

Forma ácida: $\lambda_{em-exc} = 340$ nm, $E_{HA} = 84.24$ kcal/mol

Forma básica: $\lambda_{em-exc} = 378$ nm, $E_A^- = 75.77$ kcal/mol

Finalmente, aplicando la ecuación del ciclo de Förster (ec. 2) se obtiene que el pK_a^* es de 3.20. En la bibliografía se encuentran valores similares para otros naftoles.⁵¹ Este valor indica un incremento de la acidez del compuesto en estado excitado, pudiendo ocasionar un daño en los organismos vivos.

Interacción fármaco-proteína

La ecuación de Stern-Volmer permite analizar la desactivación de la señal de fluorescencia de una sustancia, debido principalmente a la desactivación por choques moleculares o a la formación de un complejo carente de emisión.⁴⁰ La expresión es la siguiente:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [F] = 1 + K_{SV} \cdot [F] \quad [6]$$

Donde I_0 e I son las intensidades de fluorescencia antes y después de adicionar el fármaco, K_{SV} la constante de decaimiento bimolecular de Stern-Volmer, $[F]$ la concentración del fármaco, k_q la constante bimolecular de desactivación y τ_0 el tiempo de vida del estado excitado singlete del fármaco. Dicha expresión predice una relación lineal entre la relación de intensidades I_0/I y la concentración del fármaco.

El ensayo de Stern-Volmer se realizó registrando los espectros de emisión de fluorescencia de las muestras a 295 nm y aplicando la ecuación para los resultados a 320 nm con el fin de comparar los resultados obtenidos con la bibliografía.⁴⁹

Esta diferencia de longitudes de onda es corregida con los valores de absorbancia de las muestras de la siguiente forma:

$$I_{corr} = I \cdot 10^{\left(\frac{A_{295} + A_{320}}{2}\right)}$$

Los resultados obtenidos se presentan a continuación:

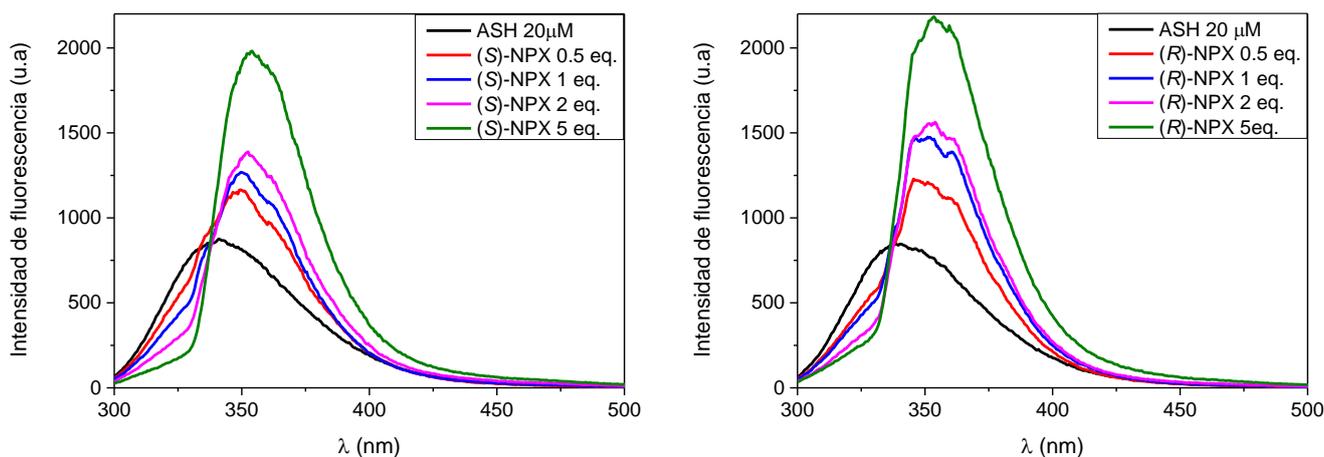


Figura 21. Espectros de emisión de fluorescencia a 295 nm de (S)-NPX (izquierda) y (R)-NPX (derecha) en ASH 20 μ M.

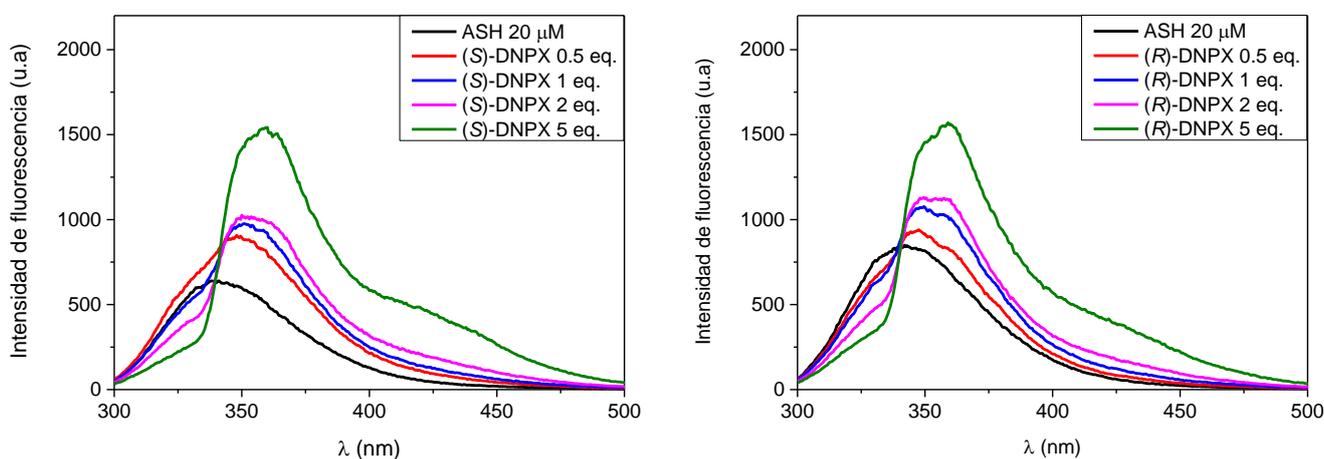


Figura 22. Espectros de emisión de fluorescencia a 295 nm de (S)-DNPX (izquierda) y (R)-DNPX (derecha) en ASH 20 μ M.

En todos los casos se puede apreciar que conforme aumenta la concentración de fármaco o metabolito, la contribución del Trp de ASH a la emisión (300-340 nm) va disminuyendo, mientras que la del fármaco o metabolito aumenta (siendo este incremento superior en el naproxeno que en el desmetilnaproxeno). No obstante, este aumento no se corresponde con el que cabría esperar si se estudiasen ambos compuestos por separado, revelándose así una interacción fármaco-proteína a través de la transferencia de energía singlete-singlete desde el estado excitado singlete del triptófano de la proteína ($E_s = 96$ kcal/mol)⁵² al del NPX ($E_s = 84.99$ kcal/mol) y al DNPX ($E_s = 84.24$ kcal/mol). Además, para el caso de DNPX, cuando su concentración es muy superior a la proteína se puede apreciar el hombro a 412 nm característico del equilibrio fenol-fenolato de la molécula, lo que muestra que en estas condiciones existe metabolito no unido a la proteína.

Registradas las intensidades de fluorescencia, se aplica la ecuación [6] para la obtención de las constantes de desactivación aplicando la corrección a los valores de intensidad registrados.

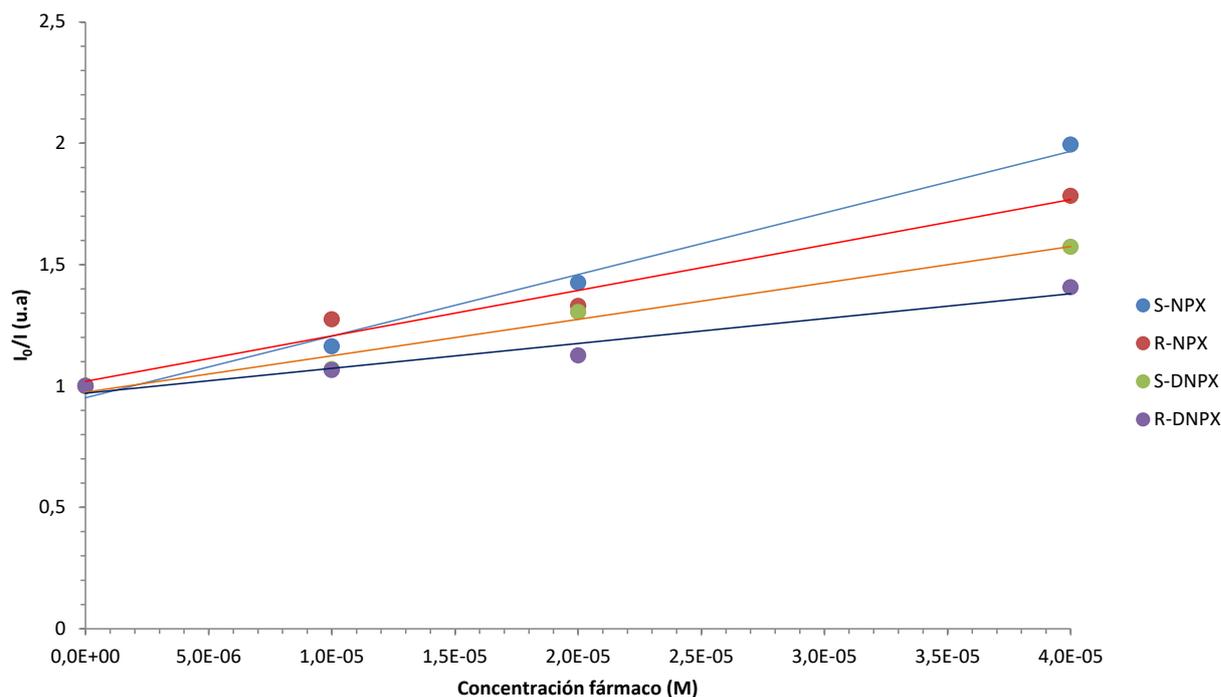


Figura 23. Representación de Stern-Volmer.

Tabla 7. Resultados de la representación de Stern-Volmer.

Fármaco	Constante de Stern-Volmer $K_{SV} \times 10^5 (M^{-1})$	R^2	Constante bimolecular de desactivación $k_q \times 10^{-13} (M^{-1} s^{-1})$
(S)-NPX	2.54	0.9895	3.96
(R)-NPX	1.88	0.9707	2.13
(S)-DNPX	1.50	0.9772	2.55
(R)-DNPX	1.03	0.9575	1.48

A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que los experimentos se ajustan a la ecuación de Stern-Volmer. De forma general, dicha desactivación es mayor en el naproxeno y en las formas enantioméricas (S)-, por lo que existe una cierta estereodiferenciación.⁴⁹

Fosforescencia

El proceso de fosforescencia consiste en excitar a una molécula para alcanzar el estado excitado triplete, un estado de menor energía que el singlete pero con una mayor reactividad al entorno químico. Una vez excitada, la molécula emitirá dicha energía mediante un proceso de relajación vibracional, regresando al estado fundamental correspondiente. Si se registra esa emisión, se tiene el espectro de emisión de fosforescencia de la molécula, a partir del cual se puede determinar la energía del estado excitado triplete (E_T)

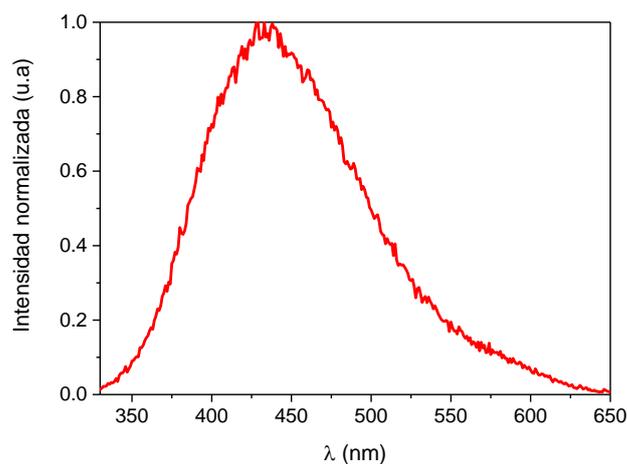


Figura 24. Espectro de emisión de fosforescencia normalizado a 300 nm de (S)-DNPX 0.1 mM en etanol.

A partir del espectro de emisión de fosforescencia, el cálculo de la energía del estado excitado triplete es análogo al del singlete, es decir, utilizando la ecuación de Planck (ec. 4) con la salvedad de que en este caso, la longitud de onda a sustituir es la correspondiente a que alcanza el 30 % de la intensidad del espectro ($\lambda = 375$ nm).

Sustituyendo en la expresión se tiene que la energía del estado excitado triplete para el desmetilnaproxeno es de 76.27 kcal/mol.

Fotólisis de destello láser

La técnica de fotólisis de destello láser permite medir el espectro de absorción de especies transitorias formadas tras la aplicación de un pulso láser, así como el tiempo de vida de dichas especies que se obtiene a partir de la cinética de desaparición, ajustando la misma con un término monoexponencial, utilizando el algoritmo Levenberg Marquardt como algoritmo de iteración.

Se llevaron a cabo estudios para el (S)-NPX y (S)-DNPX en disoluciones de PBS en condiciones anaeróbicas. En la siguiente figura se muestran los espectros de absorción transitoria de los compuestos (S)-NPX y (S)-DNPX tras la excitación con láser a $\lambda = 266$ nm.

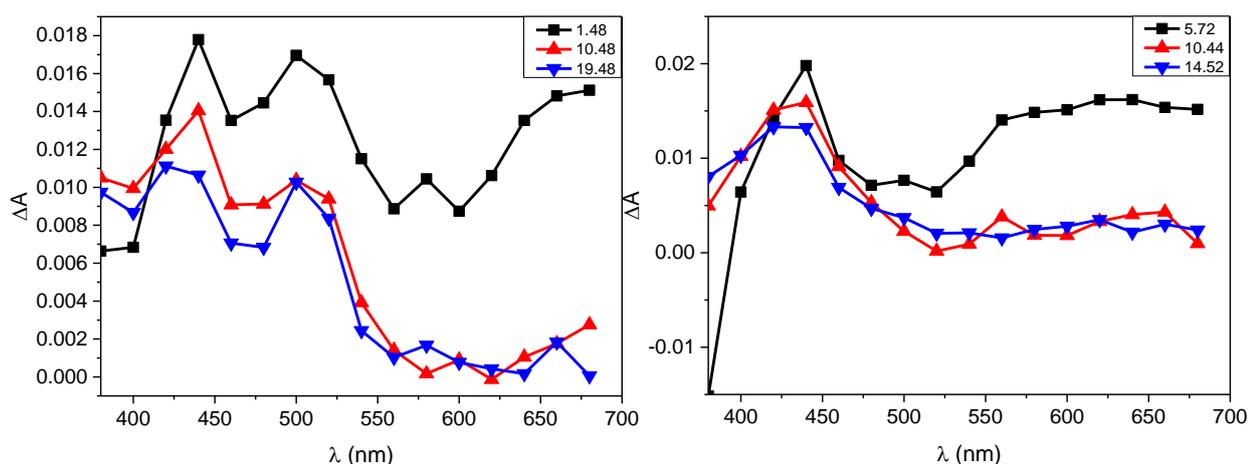


Figura 25. Espectro de FDL a 266 nm de (S)-NPX (izquierda) y (S)-DNPX (derecha) 60 μ M en PBS.

La banda con un máximo a 440 nm se atribuye a la transición triplete-triplete según bibliografía, mientras que la banda de absorción más débil en el rango de 550 - 650 nm corresponde al catión radical formado por fotoionización de los compuestos,^{53,54} y el aumento de absorción registrado a partir de 650 nm a tiempos cortos corresponde a la presencia del electrón solvatado, observándose una mayor proporción de catión radical mayor en el DNPX.

Paralelamente, se realizaron experimentos en presencia de proteína (2 eq.). Sin embargo, ésta absorbe a la longitud de onda de excitación del láser (266 nm). Por ello, inicialmente se registró la desaparición a 440 nm de la ASH y se observó una señal que se asignó al triptófano. Es por eso que al realizar experimentos de FDL con mezclas DNPX/ASH se obtendría a 440 nm una señal compleja en la que podrían estar contribuyendo la proteína. Por ello, se hace necesario el estudio excitando selectivamente al fármaco o metabolito a longitudes de onda superiores a 300 nm. Por desgracia, únicamente se disponen de longitudes de onda de excitación de 266 y 355 nm (longitud a la cual el cromóforo no absorbe).

Los tiempos de vida de triplete obtenidos a partir del ajuste de las cinéticas de desaparición son los siguientes:

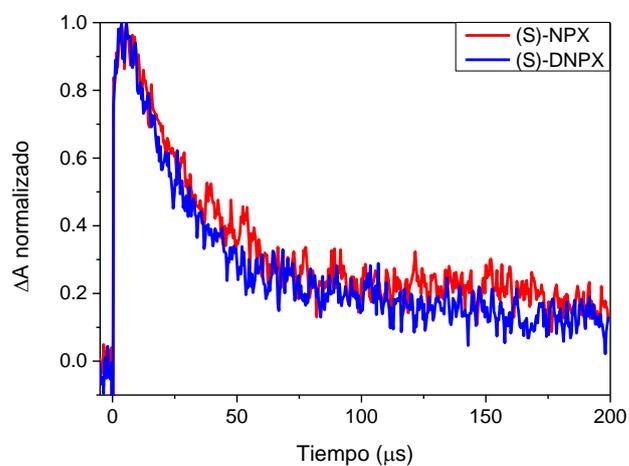


Figura 26. Cinética de desaparición de triplete a 440 nm en PBS.

Tabla 8. Tiempos de vida del estado excitado triplete a 440 nm en PBS.

Fármaco	τ_T (μ s)	R^2
NPX	28.9	0,96211
DNPX	26.0	0.96695

5.3 CARACTERIZACIÓN FOTOQUÍMICA

5.3.1 Irradiación de DNPX en medio acuoso

Según antecedentes bibliográficos, los fotoproductos del naproxeno en condiciones anaeróbicas o aeróbicas utilizando agua destilada o PBS como disolvente se forman como consecuencia de un proceso de descarboxilación, como se muestra en la figura 27.⁵⁵ Así, y con el fin de determinar si la irradiación del metabolito da lugar al mismo tipo de fotoproductos o a otros distintos, se irradió DNPX en el fotorreactor con luz UVB a centrada a 300 nm durante 8 horas. El crudo de irradiación se analizó por RMN.

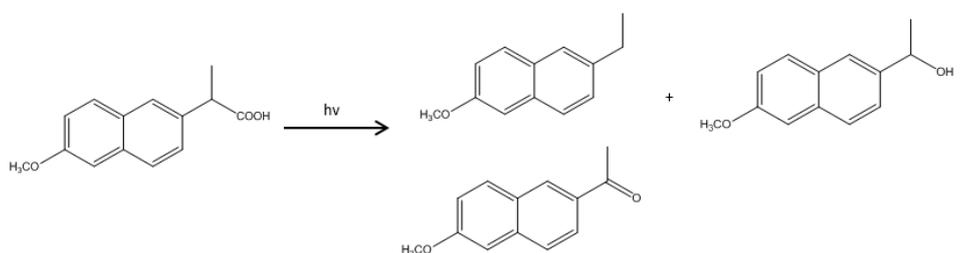


Figura 27. Fotoproductos del naproxeno.

Fuente: M.C. Jiménez et.al. Photochemistry of naproxen in the presence of β -cyclodextrin, 1997.

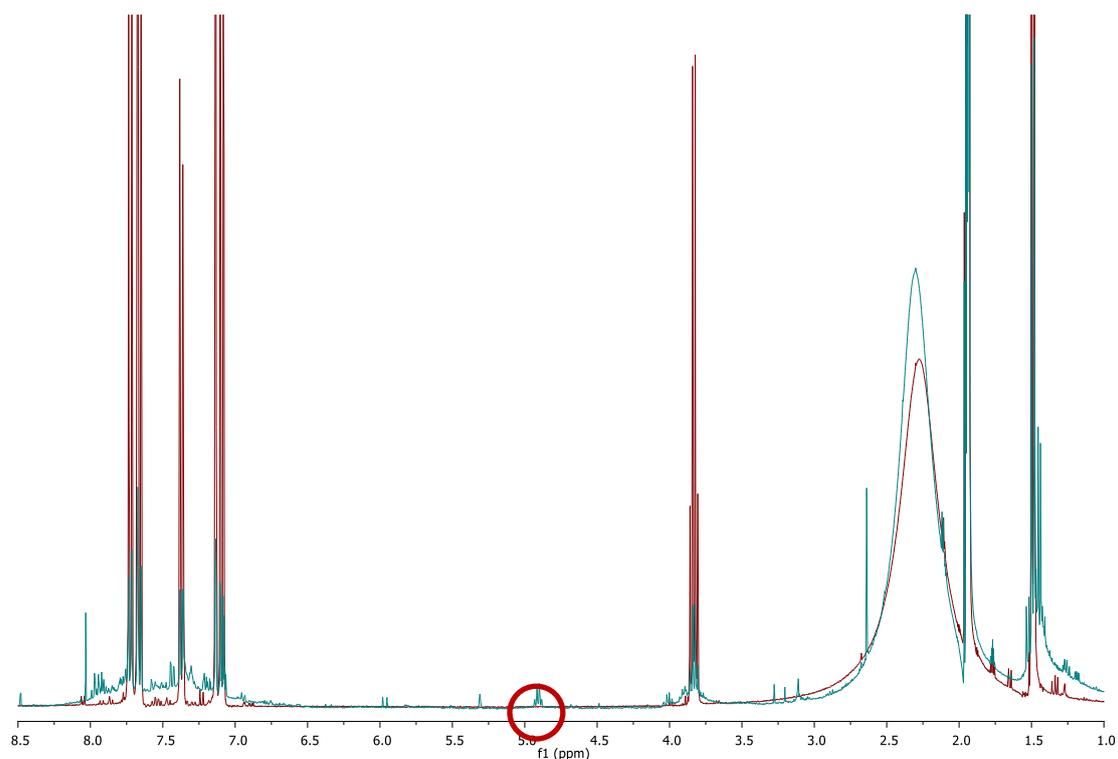


Figura 28. En rojo, espectro de ^1H -RMN de DNPX. En verde, espectro de tras 8 h de irradiación

Se observó una degradación parcial del compuesto a causa de la irradiación y la presencia de una nueva señal (δ 4.9, q)

Basándonos en la bibliografía y tras realizar una posterior simulación de los RMN de los posibles fotoproductos del DNPX formados con el programa MestReNova 6.0.2, la nueva señal observada en podría deberse a los fotoproductos 1-(6-hidroxi-naftalen-2-il)etan-1-ona o 1-hidroxi-etil-6-hidroxi-naftaleno (figura 29).

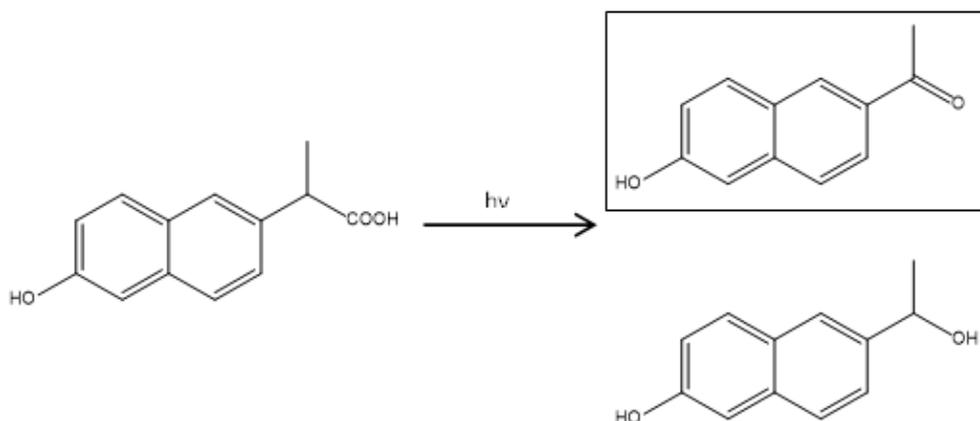


Figura 29. Fotoproductos del desmetilnaproxeno.

El crudo de irradiación se analizó por UPLC-MS, obteniéndose la masa del fotoproducto 1-(6-hidroxi-naftalen-2-il)etan-1-ona pero no la de 1-hidroxi-etil-6-hidroxi-naftaleno.

HRMS ($M+H^+$): Calculada para $C_{12}H_{11}O_2$ 187.0759, encontrada 187.0751.

HRMS ($M+H^+$): Calculada para $C_{12}H_{13}O_2$ 189.0759, no encontrada.

Este fotoproducto es una cetona aromática, por lo que a priori se espera que sea activo desde el punto de vista fotoquímico. En este sentido, sería un candidato a ser estudiado y caracterizado fotofísicamente.

5.3.2 Irradiación de DNPX en presencia de ASH.

En primer lugar, se llevó a cabo la irradiación de DNPX en presencia de 2 equivalentes de ASH con lámparas UV-B centradas a $\lambda = 300$ nm durante 1 hora, y se filtró a través de Sephadex® G-25 con el fin de determinar si había ocurrido fotounión. Los crudos de irradiación antes y después de filtrar se analizaron por fluorescencia, obteniéndose los siguientes resultados.

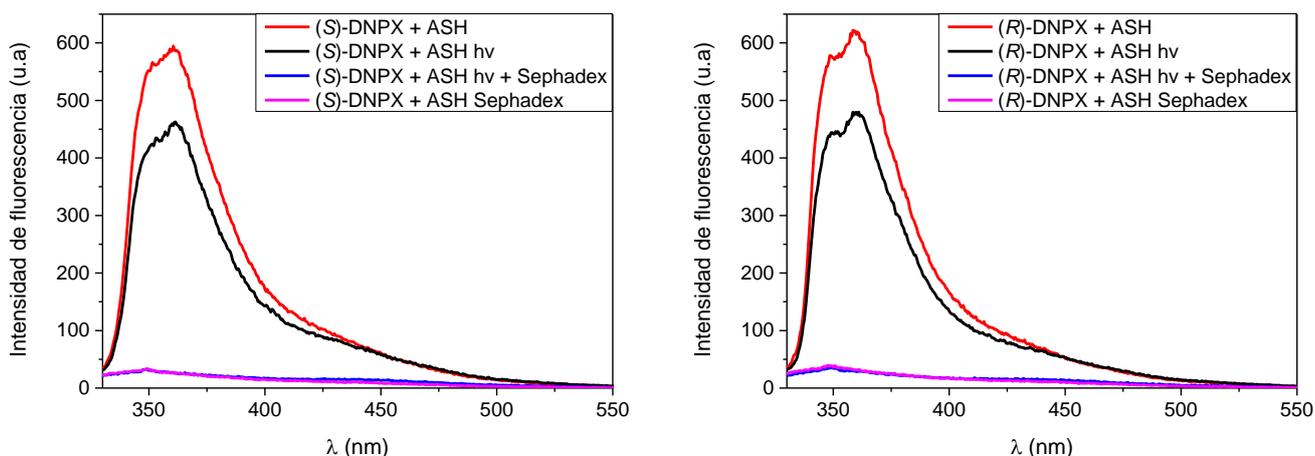


Figura 30. Espectros de emisión de fluorescencia a 310 nm de (S)-DNPX (izquierda) y (R)-DNPX (izquierda) 33.3 μM en ASH 66.6 μM .

A la vista de los espectros se puede deducir que: en primer lugar, no existe diferencias entre la irradiación de (S)-DNPX y (R)-DNPX en presencia de proteína. En segundo lugar, la intensidad de fluorescencia inicial de la muestra (curva roja) se ve disminuida tras someterla a irradiación en presencia de proteína (curva negra), debido a la degradación del metabolito. Por último, tras hacer pasar las muestras por Sephadex® G-25 no se detecta fluorescencia, independientemente de si ha sido o no irradiada con anterioridad (curvas azul y rosa), por lo que no parece que ocurra fotounión metabolito-proteína. Con el fin de determinar el motivo por el cual se detectó esa disminución de fluorescencia, sería interesante estudiar las muestras mediante análisis proteómico con el fin de identificar si el fotoproducto ha interactuado con algún aminoácido de la misma, pero el proceso no se puede seguir por fluorescencia.

Por otro lado, para analizar la formación de fotoproductos en presencia de proteína (sin fotounión) se desnaturizó la proteína con hidrocloreuro de guanidina y se extrajeron las muestras irradiadas con acetona, se rotavaporaron y se redisolviaron en acetonitrilo grado HPLC. El análisis por UPLC no reveló la formación de fotoproductos.

6. PLAN FUTURO

En posteriores trabajos, se realizará el estudio del metabolito de fase II del naproxeno: el 2-(6-metoxi-2-naftil) propanoato de 2, 3, 4, 5-tetrahidroxi-2-furano, ya que se tienen evidencias de que existe una unión estereoselectiva en proteínas.⁵⁶

Dicho estudio ya se ha comenzado a realizar en este trabajo con la caracterización de los intermedios de la reacción de los intermedios de la síntesis del metabolito y se presenta a continuación.

Adicionalmente, para el DNPX, debido a la aparición de una banda de absorción en la región del UV-A y la fotoreactividad para dar lugar a una cetona aromática, se realizarán ensayos con células.

6.1 SÍNTESIS

El procedimiento de síntesis se realizó según el descrito en la bibliografía.²⁰

Síntesis del compuesto 2-(6-metoxi-2-naftil) propanoato de 2, 3, 4, 5-tetrahidroxi-2-furano

Según el procedimiento descrito en la bibliografía, el esquema de síntesis comprende dos etapas: síntesis del 2-(6-metoxi-2-naftil) propanoato de 2-(metoxicarbonil)-3, 4, 5-triacetato-2-furano y desprotección vía enzimática de los grupos acetato, siendo el esquema sintético idéntico para las formas enantioméricas (S)- (a) y (R)- (b)

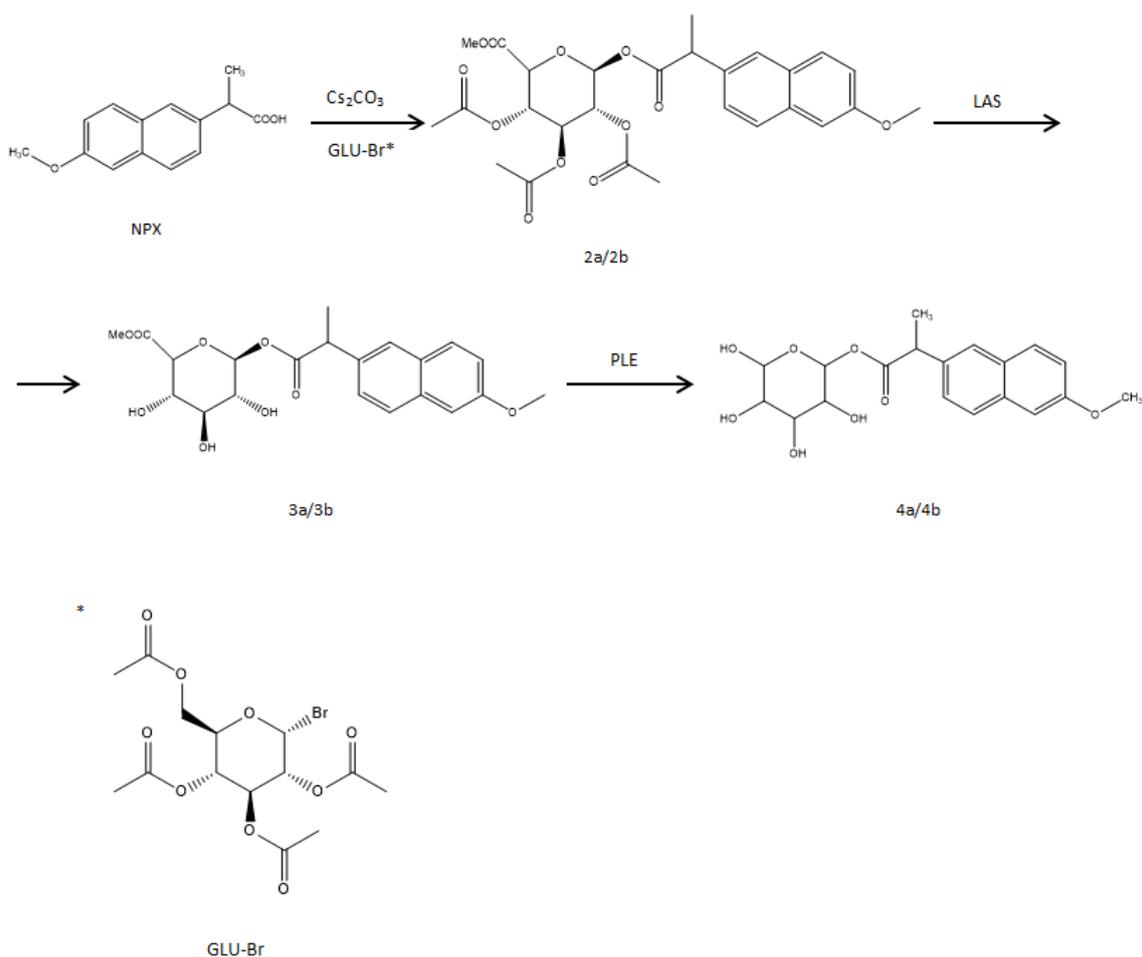


Figura 31. Esquema sintético del compuesto 2-(6-metoxi-2-naftil) propanoato de 2, 3, 4, 5-tetrahidroxi-2-furano.

Etapa 1: Síntesis de 2a/2b

Una suspensión de (*S*)- o (*R*)-naproxeno (247 mg, 1.074 mmol) en metanol (2 mL) se mezcló con una disolución de carbonato de cesio (200 mg, 0.614 mmol, 2.83 M). Tras 5 minutos, la mezcla se rotavaporó hasta la completa eliminación del disolvente. Posteriormente, se adiciona al matraz de reacción dimetilsulfóxido (2.5 mL) y una disolución de éster metílico α -acetobromo del ácido D-glucurónico (glucurónido-Br, GLU-Br) (352 mg, 0.861 mmol) en dimetilsulfóxido (2.5 mL).

Tras 24 h de reacción a 30°C, el producto de la reacción se separó mediante decantación, adicionando acetato de etilo (50 mL) y realizando la extracción con agua (100 mL), disolución saturada de NaHCO_3 (3x40 mL) y NaCl saturado. La fase orgánica se secó con MgSO_4 y el compuesto 2a (o 2b) se purificó por cristalización, utilizando etanol. El rendimiento final de la reacción fue del 50%.

Etapa 2: Síntesis de 3a/3b

En un matraz Erlenmeyer, se vertieron 104.2 mL de un buffer de citrato-fosfato 25 mM y se sumergió en un baño a 40 °C. Alcanzada dicha temperatura, se vertieron 1.90 g de enzima amino lipasa (15 mg/L, mezcla de incubación) y una disolución de 2a (o 2b) (35 mg, 0.064 mmol) en 2-metoxietanol (26 mL).

Se dejó incubar a reacción a 40°C con agitación suave. Tras 2 horas, se paró la reacción dejando enfriar hasta temperatura ambiente. Se añadieron 100 mL de acetato de etilo y por decantación de recogió la fase orgánica, se secó con MgSO₄ y se rotavaporó el disolvente. El compuesto 3a (o 3b) se obtuvo tras purificar con HPLC (columna HPLC de sílice pura en fase reversa, 50/50 MeCN-H₂O pH 3, flujo 2 mL/min). El rendimiento final de la reacción fue del 10 %.

6.2 CARACTERIZACIÓN

La caracterización del metabolito de fase II se realizó análogamente al DNPX.

Espectros ^1H y ^{13}C del compuesto (S)-2-(6-metoxi-2-naftil) propanoato de 2-(metoxicarbonil)-3, 4, 5-triacetato-2-furano (2a)

^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 7.78 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.70 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.36 (dd, $J = 8.5, 1.7$ Hz, 1H), 7.30 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.17 (dd, $J = 8.9, 2.6$ Hz, 1H), 6.05 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 5.51 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H), 5.04 – 4.95 (m, 2H), 4.66 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H), 3.98 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.48 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6): δ 172.11, 169.41, 169.24, 168.89, 166.83, 157.32, 134.29, 133.46, 129.19, 128.32, 127.03, 126.17, 125.90, 118.83, 105.73, 90.97, 71.41, 70.78, 69.75, 68.80, 55.18, 52.58, 44.22, 20.26, 20.17, 20.09, 17.96. HRMS ($\text{M}+\text{Na}^+$): Calculada para $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{12}\text{Na}$ 569.1635, encontrada 569.1632.

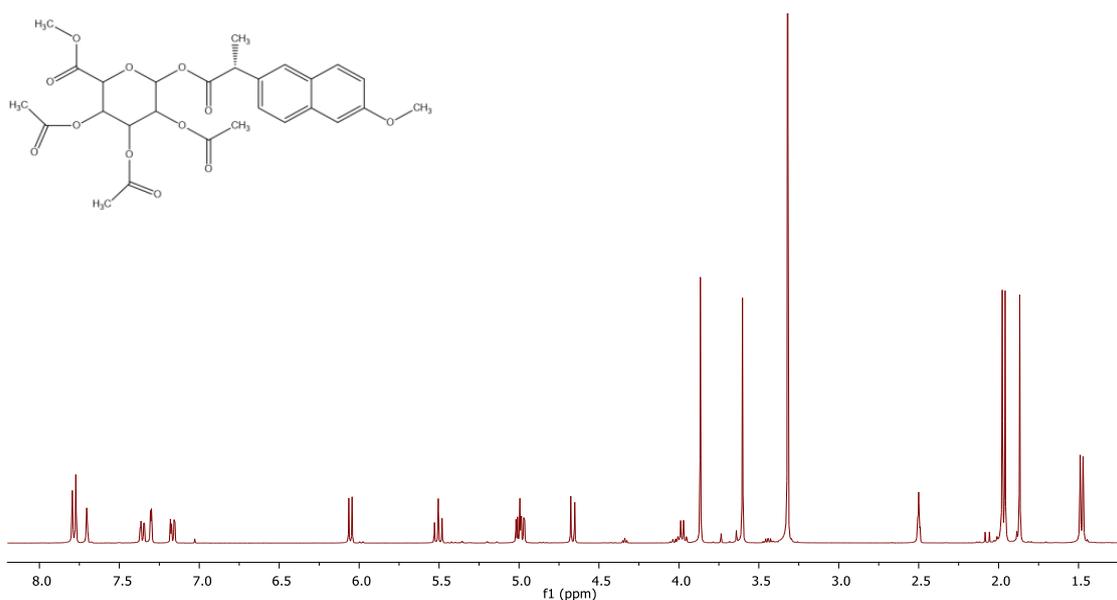


Figura 32. Espectro ^1H del compuesto 2a.

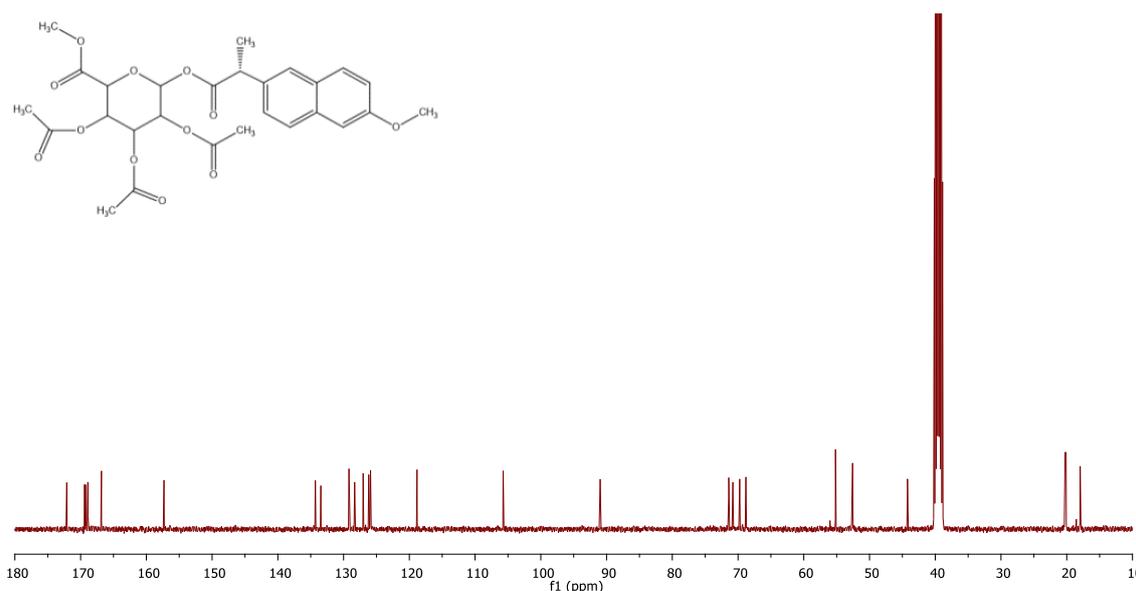


Figura 33. Espectro ^{13}C del compuesto 2a.

Espectros ^1H y ^{13}C del compuesto (*R*)-2-(6-metoxi-2-naftil) propanoato de 2-(metoxicarbonil)-3, 4, 5-triacetato-2-furano (2b)

^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 7.77 (dd, $J = 8.7, 4.7$ Hz, 2H), 7.66 (d, $J = 1.0$ Hz, 1H), 7.33 – 7.27 (m, 2H), 7.15 (dd, $J = 9.0, 2.5$ Hz, 1H), 5.97 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 5.41 (t, $J = 9.6$ Hz, 1H), 4.97 (t, $J = 9.7$ Hz, 1H), 4.84 (dd, $J = 9.6, 8.3$ Hz, 1H), 4.65 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H), 3.98 (q, $J = 7.0$ Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.63 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.88 (s, 3H), 1.45 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.21 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6): δ 172.39, 169.50, 169.45, 168.40, 167.02, 157.44, 134.80, 133.59, 129.33, 128.53, 127.34, 125.92, 118.98, 105.80, 90.89, 71.55, 70.87, 69.50, 68.92, 55.30, 52.77, 44.15, 20.28, 20.26, 19.37, 19.37, 17.75. HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$): Calculada para $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{O}_{12}$ 547.1816, encontrada 547.1821.

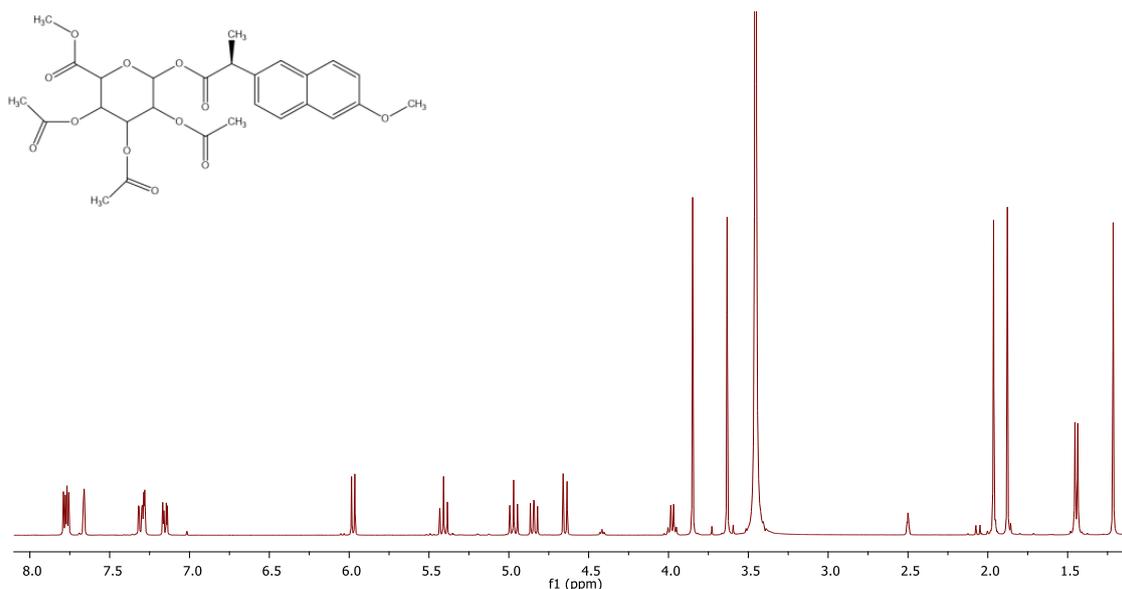


Figura 34. Espectro ^1H del compuesto 2b.

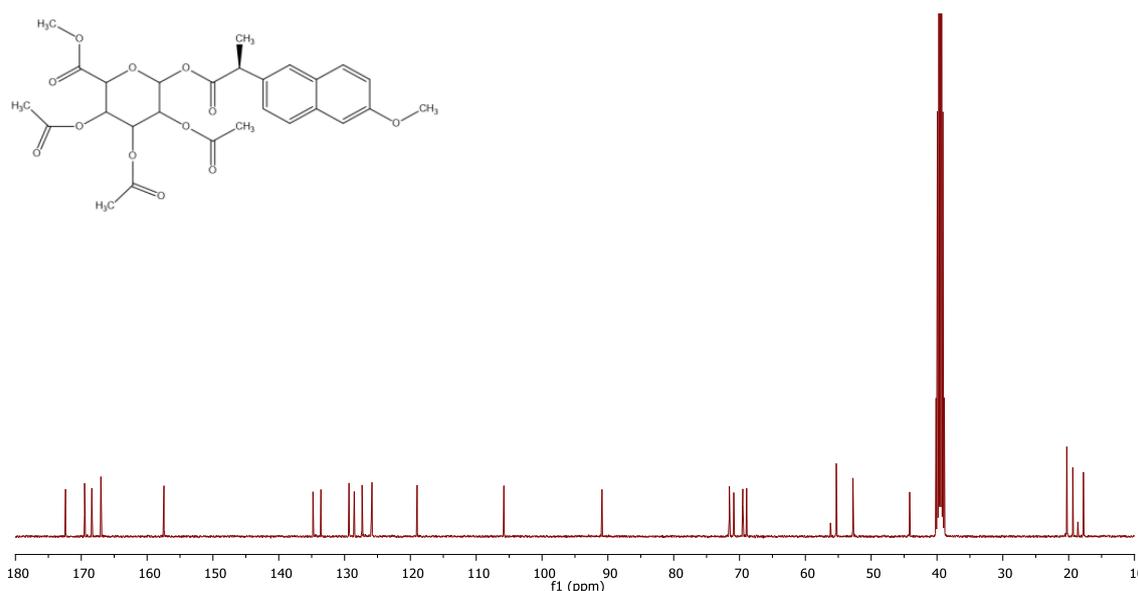


Figura 35. Espectro ^{13}C del compuesto 2b.

Espectros ^1H y ^{13}C del compuesto (S)-2-(6-metoxi-2-naftil) propanoato de 2-(metoxicarbonil)-3, 4, 5-trihidroxi-2-furano (3a)

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.74 - 7.66 (m, 4H), 7.38 (dd, $J = 8.5, 1.8$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.11 (dt, $J = 8.9, 2.3$ Hz, 1H), 5.53 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 4.02 - 3.87 (m, 6H), 3.71 (s, 1H), 3.56 - 3.33 (m, 4H), 3.25 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 1.56 (d, $J = 7.2$ Hz, 4H). ^{13}C NMR (101MHz, CD_3OD): δ 174.76, 170.67, 159.05, 136.35, 135.14, 130.26, 130.12, 128.13, 127.10, 126.99, 119.78, 106.42, 95.70, 77.17, 73.47, 72.84, 55.60, 52.77, 46.25, 19.44. HRMS ($\text{M}+\text{H}^+$): Calculada para $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{O}_9$ 421.1499, encontrada 421.1501.

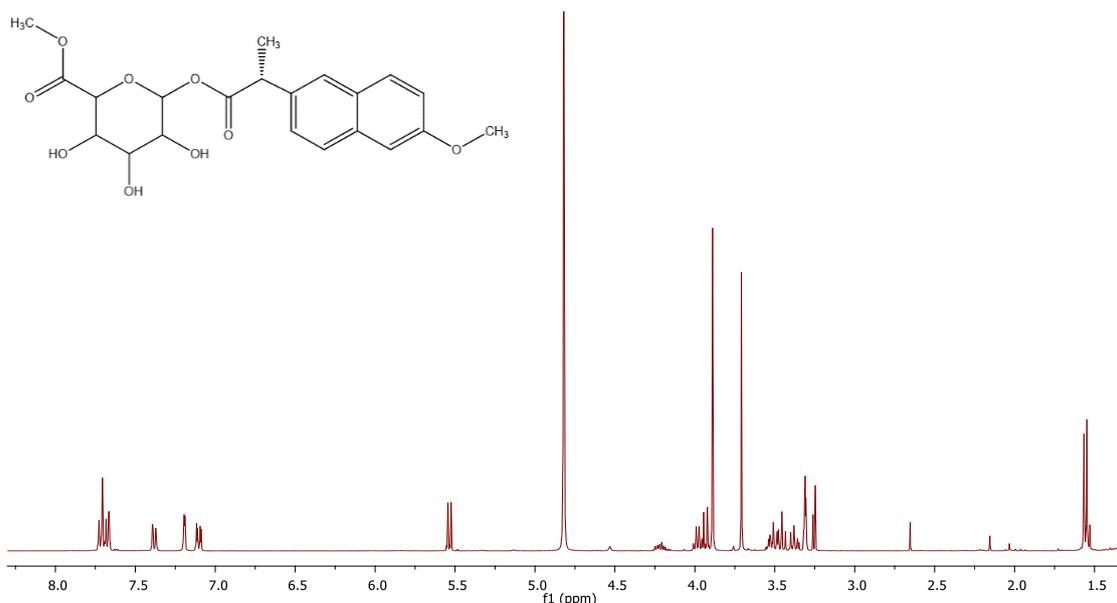


Figura 36. Espectro ^1H del compuesto 3a.

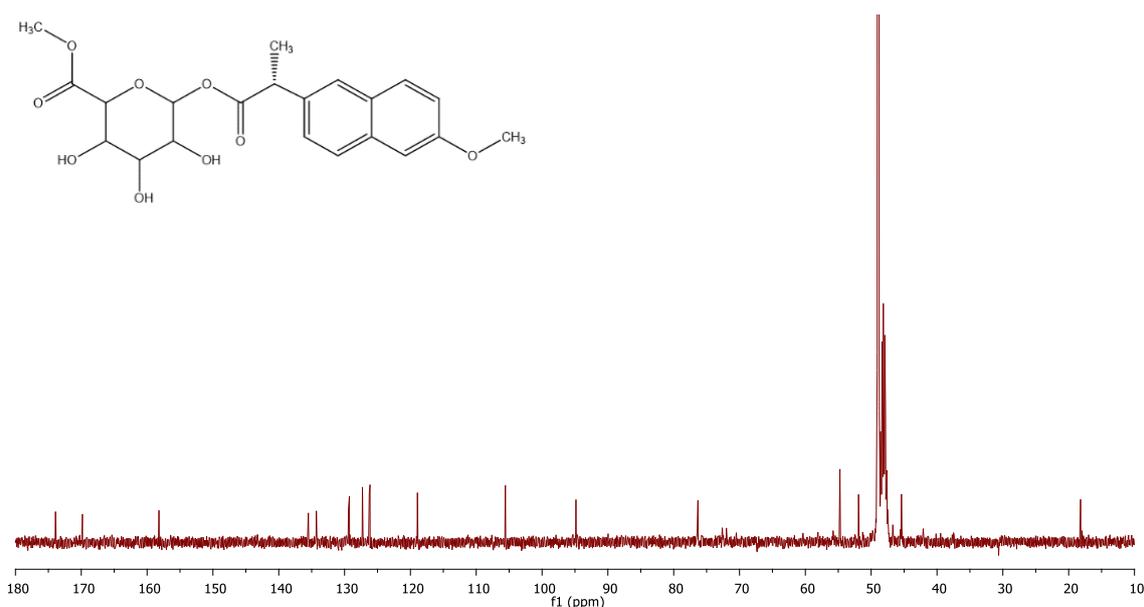


Figura 37. Espectro ^{13}C del compuesto 3a.

Espectros ^1H y ^{13}C del compuesto (*R*)-2-(6-metoxi-2-naftil) propanoato de 2-(metoxicarbonil)-3, 4, 5-trihidroxi-2-furano (3b)

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.77 – 7.64 (m, 15H), 7.41 (dd, $J = 8.6, 1.8$ Hz, 4H), 7.24 – 7.12 (m, 6H), 7.12 – 7.01 (m, 4H), 5.51 (d, $J = 7.9$ Hz, 3H), 4.20 – 3.92 (m, 8H), 3.78 (s, 8H), 3.60 – 3.49 (m, 4H), 3.46 – 3.32 (m, 9H), 1.58 (d, $J = 7.2$ Hz, 10H). ^{13}C NMR (101MHz, CD_3OD): δ 175.00, 170.82, 159.22, 136.46, 135.32, 130.28, 130.13, 128.22, 127.30, 127.13, 119.92, 106.57, 95.85, 77.34, 73.52, 72.88, 55.73, 52.90, 46.46, 19.11. HRMS ($\text{M}+\text{Na}^+$): Calculada para $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_9\text{Na}$ 443.1318, encontrada 443.1322.

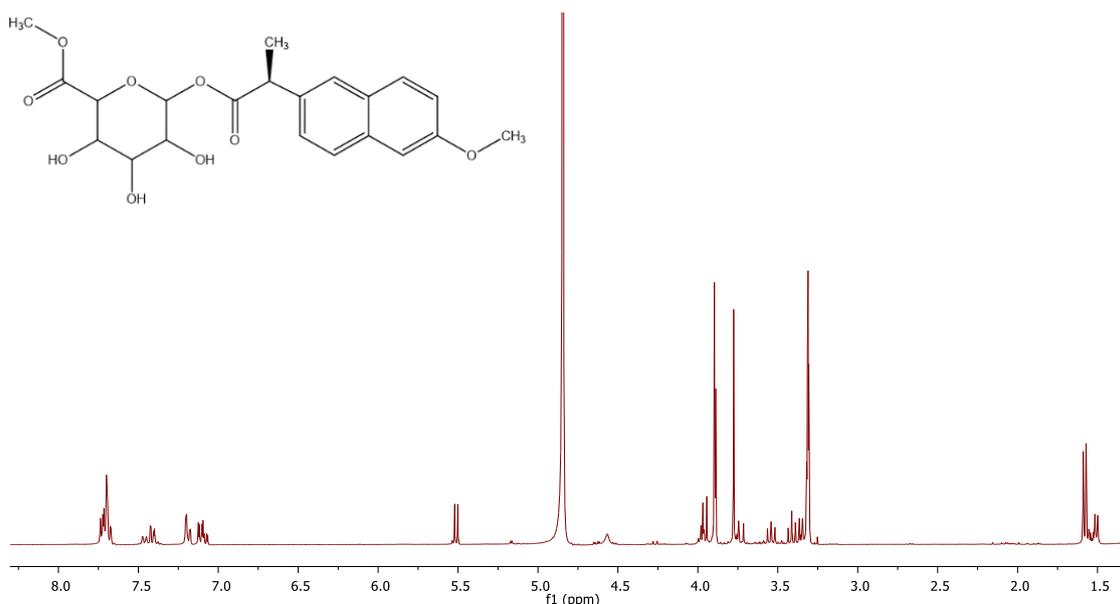


Figura 38. Espectro ^1H del compuesto 3b.

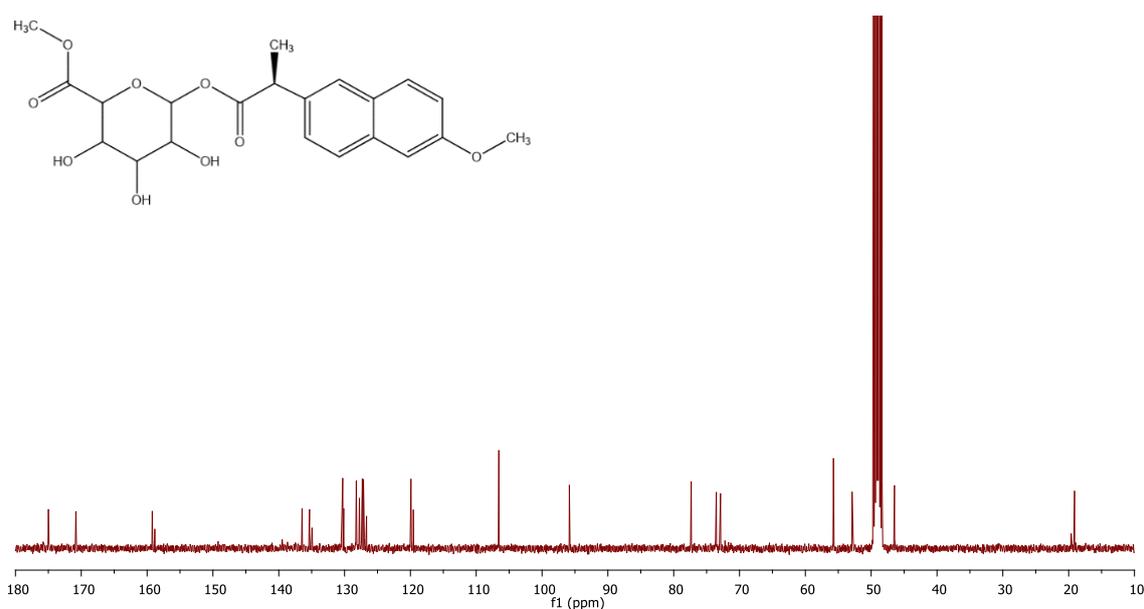


Figura 39. Espectro ^{13}C del compuesto 3b.

7. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones tras llevar a cabo la síntesis y caracterización estructural del DNPX son:

- Se han comparado las principales características y parámetros fotofísicos de DNPX y NPX, observándose que:
 - En el espectro de absorción, DNPX no presenta diferencias respecto al fármaco de partida, mientras que en el espectro de emisión existe una disminución de intensidad en PBS y la aparición de una nueva banda a 412 nm.
 - La energía de singlete de DNPX es ligeramente inferior a la del fármaco de partida, el NPX (84.24 kcal/mol vs 84.99 kcal/mol).
 - El tiempo de vida de fluorescencia es inferior para el DNPX, tanto en MeCN como en PBS (siendo en este caso la disminución más acusada), cuyos valores son 5.871 ns y 6.917 ns, respectivamente.
 - El rendimiento cuántico de fluorescencia del DNPX es ligeramente inferior que el fármaco inicial en MeCN y en presencia de proteína (0.40 y 0.35), al contrario que sucede en PBS, que es mayor (0.75). Al igual que sucede en el NPX, no existe estereodiferenciación en el rendimiento cuántico de fluorescencia.
 - La energía del estado excitado triplete de DNPX es superior a la del fármaco de partida, el NPX (61.90 kcal/mol vs 76.27 kcal/mol).
 - Las especies que se observan en el espectro de absorción transitoria excitando a $\lambda = 266$ nm corresponden a la transición triplete-triplete (440 nm), la formación de catión radical (550-650 nm) y la presencia de electrón solvatado ($\lambda > 650$ nm).
 - El tiempo de vida del estado excitado triplete a 440 nm en PBS es inferior a la del fármaco de partida, el NPX (26 μ s vs 28.9 μ s).
 - El pK_a^* del metabolito (pK_a en el estado excitado) es de 3.20, valor similar para otros naftoles.

- En presencia de albúmina sérica humana, el metabolito desactiva la fluorescencia de la proteína según un ajuste lineal tipo Stern-Volmer.

- El principal fotoproducto de DNPX tras irradiación en acetonitrilo deuterado con una fuente UV-B de $\lambda_{m\acute{a}x} = 300$ nm, es a 1-(6-hidroxi-naftalen-2-il)etan-1-ona.

- No se encontraron evidencias de fotounión del fotoproducto a la proteína ASH ni se detectó la formación de fotoproductos en este medio, aunque hubo fotodegradación mismo.

- En cuanto a la fototoxicidad, no se espera que existan diferencias apreciables con respecto al fármaco de partida, a excepción de la formación de una nueva banda en el rango UV-A.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. B.C. Garrido López, F. Navarro Sarabia, E.M. Montero Martín. Antiinflamatorios no esteroideos: Farmacodinámica, reacciones adversas e indicaciones en reumatología. *Medicine (Baltimore)*. 2011; 10 (92): 6255-6261.
2. J. Simó Miñana. Utilización de medicamentos en España y en Europa. *Aten. Primaria*. 2012; 44 (6): 335-347.
3. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Utilización de Medicamentos Antiinflamatorios No Esteroides (AINE) En España Durante El Periodo 2000-2012. 2014.
4. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Utilización de Medicamentos Antiinflamatorios No Esteroides En España Durante El Periodo 2013-2016. 2017.
5. C. Sierra Talamantes, V. Zaragoza Ninet, A. Esteve Martínez, B. Fornés Pujalte, F. Palomar Llatas. Reacciones de fotosensibilidad de origen exógeno: fototoxia y fotoalergia. *Enferm. Dermatol.* 2015; 9 (1): 10-18.
6. E. Stone. *Philos. Trans. R. Soc, London*. 1763; 53: 195-200.
7. S. Harirforoosh, W. Asghar, F. Jamali. Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2013; 16 (5): 821-847.
8. J. Rosas Gómez de Salazar, G. Santos Soler, R. Martín Doménech, R. Cortés Verdú, A. Álvarez Cienfuegos. Antiinflamatorios no esteroideos. *Enfermedades Reumáticas: Actualización SVR*. 2008; 469-475.
9. S.M. Cantú, H. Jin Lee, A. Donoso, A.M. Puyó, H.A. Peredo. El ácido araquidónico y sus derivados. Generalidades de los prostanoideos en relación con procesos inflamatorios. *Cienc. Invest.* 2017; 67(4)
10. G. Roth, N. Standford, P. Majerus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1975; 72: 3073-3076.
11. R. Kulmacz, W. Lans. *J. Biol. Chem.* 1985; 260: 12572-12578.
12. J. Gierse. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 15810-15814.
13. D.J. Angiolillo, S.M. Weisman. Clinical pharmacology and cardiovascular safety of naproxen. *Am. J. Cardiovasc. Drugs*. 2017; 17: 97-107.
14. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Ficha Técnica Del Naproxeno. 2015.
15. N.M. Davies, K.E. Anderson. Clinical pharmacokinetics of naproxen. *Clin. Pharmacokinet.* 1997; 32 (4): 268-293.
16. F. Bou-Abdallah, S.E. Sprague, B.M. Smith, T.R. Giffune. Binding thermodynamics of diclofenac and naproxen with human and bovine serum albumins: A calorimetric and spectroscopic study. *J. Chem. Thermodyn.* 2016; 103: 299-309.
17. T.B. Vree, M. Van Den Biggelaar-Martea, C.P.W.G.M. Varwey-Van Wissien, M.L. Vree, P.L.M. Guelen. Pharmacokinetics of naproxen, its metabolite O-desmethylnaproxen, and their acyl glucuronides in humans. *Biopharm. Drug Dispos.* 1993; 14: 491-502.

18. T.B. Vree, M. Van Der Biggelaar-Martea, C.P.W.G.M Verwey-van Wissien. Determination of naproxen and its metabolite O- desmethylnaproxen with their acyl glucuronides in human plasma and urine by means of direct gradient high- performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1992; 518: 239-249.
19. C.N. Falany, P. Ström, S. Swedmark. Sulphation of o-desmethylnaproxen and related compounds by human cytosolic sulfotransferases. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2005; 60(6): 632-640.
20. A. Baba, T. Yoshioka. Synthesis of 1- β -O-acyl glucuronides of diclorofenac, mefenamic acid and (S)-naproxen by the chemo-selective enzymatic removal of protecting groups from the corresponding methyl acetyl derivatives. *Org. Biomol. Chem.* 2006; 4: 3303-3310.
21. T. Peters. *All about Albumin; Biochemistry, Genetics and Medical Applications*. New York: Academic Press. 1995.
22. S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, K. Kobayashi. *Protein Eng.* 1992; 12: 439-446.
23. M. Dockal, D. Carter, F.J. Ruker. *Biol. Chem.* 1994; 274.
24. Octapharma. Albumin[®]. 2010. <https://www2.bago.com.bo/e-learning/BagoBolivia/conferencias/Albumina%20OctaPharma%20Pres%20EMPP.pdf>. Último acceso 31/08/2018
25. M.R. Cordero, U.C. Montero, N. Murillo. Conceptos generales sobre la albúmina humana y su utilización clínica. *Acta Med Costarricense.* 2004; 28(1): 32-38.
26. E. Nuin Plá. Propiedades fotoquímicas de fármacos que contienen el cromóforo naftaleno en medios microheterogéneos. 2013.
27. L. Thomson. Bioquímica II: proteínas plasmáticas. Último acceso 31/08/2018.
28. J. Ewaskiewicz, T. Devlin, J. Ch'ih. *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; 179:1095-1100.
29. V.T. Monje López. Proteínas como microrreactores en fotoquímica. 2014.
30. D.C. Carter, J.X. Ho. Structure of serum albumin. *Advances in Protein Chemistry.* 1994:153-196.
31. I. Lammers, V. Lhiaubet-Vallet, F. Ariese, M.A.Miranda, C. Gooijer. Binding of naproxen enantiomers to human serum albumin studied by fluorescence and room-temperature phosphorescence. *Spectrochim Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2013; 105: 67-73.
32. A. Bhattacharya, T. Grüne, S. Curry. *J. Mol. Biol.* 2000; 303: 721-732.
33. U. Kragh-Hansen. *Dan. Med. Bull.* 1990; 37: 57-84.
34. M. Rahman, T. Maruyama, T. Okada, T. Imai, M. Otagiri. *Biochem. Pharmacol.* 1993; 46: 1733-1740.
35. N.J. Turro. Organic photochemistry-an overview. *Modern Molecular Photochemistry.* 1991; 1-16.
36. I. Vayá Pérez. Estados excitados del antiinflamatorio no esteroideo flurbiprofeno como sondas para la interacción con proteínas. 2007.
37. J.I. Junquera San José. Puesta a punto de un método óptico para la determinación de la hormona tiroxina T4. 2016.
38. C. Brunatti, A.M. Martín. Introducción a la espectroscopía de absorción molecular ultravioleta, visible e infrarrojo cercano. <http://materias.fi.uba.ar/6305/download/Espectrofotometria.pdf>. Último acceso 1/09/2018.

39. F. de la Torre. Espectrofotometría: apuntes de espectrofotometría. <http://www.bioquimica.ucv.cl/paginas/central/bioquimica%20clinica/apuntes%20de%20espectrofotometria.pdf>. Último acceso 2/09/2018.
40. C. Lorente. Fotofísica y propiedades fotosensibilizadores de pterinas en solución acuosa: espectroscopía electrónica. 2003; 5: 49-59.
41. Universidad de Alicante. Microscopía de fluorescencia y epifluorescencia. <https://ssyf.ua.es/es/formacion/documentos/cursos-programados/2011/especifica/microscopia-optica/microscopia-optica-y-laser-confocal-2a-ed/tema-5.pdf>. Último acceso 2/09/2018.
42. Fotoluminiscencia molecular. https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginlife.php/4492/mod_folder/content/0/2017%20Teoria%20Luminiscencia.pdf. Último acceso 2/09/2018.
43. J. Birks. *Photophysics of Aromatic Molecules*. New York; 1970.
44. P.G. Pearson, L.C. Wienkers. *Handbook of Drug Metabolism*. 2008.
45. M.A. Miranda. Photosensitization by drugs. *Pure Appl. Chem.* 2001; 73 (3): 481-486.
46. M.L. Marin, L. Santos-Juanes, A. Arques, A.M. Amat, M.A. Miranda. Organic photocatalysts for the oxidation of pollutants and model compounds. *Chem. Rev.* 2012; 112: 1710-1750.
47. M. Lahmann, M. Bergström, D. Turek, S. Oscarson. Synthesis of urine drug metabolites: glucuronosyl esters of carboxymefloquine, indoprofen, (S)-naproxen, and desmethyl (S)-naproxen. *J. Carbohydr. Chem.* 2004; 23 (2-3): 123-132.
48. B. Marciniak, H. Kozubek, S. Paszyc. Estimation of pK_a^* in the first excited singlet state. *J. Chem. Educ.* 1992; 69 (3): 247-249.
49. M. González-Béjar, E. Alarcón, H. Pobleto, J.C. Scaiano, J. Pérez-Prieto. Stereoselective interaction of epimeric naproxen-RGD peptides with human serum albumin. *Biomacromolecules*. 2010; 11 (9): 2255-2260.
50. U. Pischel, S. Abad, M.A. Miranda. Stereoselective fluorescence quenching by photoinduced electron transfer in naphthalene-amine dyads. *Chem. Commun.* 2003; 3 (9): 1088-1089.
51. M. Lawrence, C.J. Marzocco, C. Morton, C. Schwab, A.M. Halpern. Excited-state deprotonation of 2-naphthol by anions. *J. Phys. Chem.* 1991; 95 (25): 10294-10299.
52. S.L. Murow. *Handbook of Photochemistry*. New York: Marcel Dekker Inc. 1973.
53. M.C. Jiménez, U. Pischel, M.A. Miranda. Photoinduced processes in naproxen-based chiral dyads. *J. Photochem. Photobiol. A. Chem.* 2007; 8: 128-142.
54. R. Pérez Ruiz, R. Alonso, E. Nuin, I. Andreu, M.C. Jiménez, M.A. Miranda. Naphthalene triplet excited state as a probe for the assessment of drug distribution in binary protein systems. *J. Phys. Chem. B.* 2011; 115: 4460-4468.
55. M.C. Jiménez, M.A. Miranda, R. Tormos. Photochemistry of naproxen in the presence of β -cyclodextrin. *J. Photochem. Photobiol. A. Chem.* 1997; 104: 119-121.
56. A. Bischer, P. Zia-amirhosseini, M. Iwaki, A.F. Mcdonagh, L.Z. Benet. Stereoselective binding properties of naproxen glucuronide diastereomers to proteins. *J. Pharm. Bio.* 1995; 23 (4): 379-395.
57. Preparación de buffers de pH. <http://delloyd.50megs.com/moreinfo/buffers2.html#phosphate>. Último acceso 12/09/2018.

PRESUPUESTO

El presupuesto es el documento que refleja el coste del proyecto, es decir, la inversión necesaria para llevarlo a cabo. Para realizarlo se deben obtener las mediciones de las diversas unidades de obra que lo componen, la determinación del precio unitario de cada unidad de obra y la amortización correspondiente a las infraestructuras adquiridas en el mismo.

En este trabajo se realizará el presupuesto correspondiente al coste de realización de este trabajo final de máster, es decir, el coste de ejecución de los ensayos experimentales.

Cabe destacar que todos los datos han sido obtenidos de los correspondientes catálogos de precio de cada fabricante.

1.1 PRECIO DE LA MANO DE OBRA

En la tabla se especifican los operarios requeridos para la obtención de los resultados experimentales del laboratorio, teniendo en cuenta que se empleará un máximo de 300 horas en el desarrollo de los mismos repartidas a lo largo de 5 meses a media jornada.

Tabla 9. Mano de obra.

Designación	Tiempo (h)	Precio unitario (€/h)	Precio total (€)
Ingeniero químico	300	30	9000
Técnico laboratorio	100	20	2000
Total			11000

1.2 PRECIO DE REACTIVOS Y DISOLVENTES

A continuación se presentan los reactivos y disolventes utilizados en el laboratorio utilizados para la realización del trabajo.

Tabla 10. Reactivos y disolventes.

Reactivo/disolvente	Precio	Unidad (€/x)	Cantidad	Unidad	Coste (€)
2-metoxietanol (ACS), Scharlau	48,39	€/L	0,5	L	24,20
Acetato de etilo (HPLC), Scharlau	41,4	€/L	0,8	L	33,12
Acetato de sodio anhidro (ACS), Scharlau	59,7	€/kg	20	g	1,19
Acetona (ACS)	10,9	€/L	10	L	109,00
Acetona (HPLC)	40,6	€/L	200	mL	8,12
Acetonitrilo-d3, Sigma Aldrich	45,7	€/mL	5	mL	228,50
Acetonitrilo (HPLC)	93,6	€/L	5	L	468,00
Ácido acético glacial (ACS), Scharlau	43,52	€/L	100	mL	4,35
Ácido bromhídrico 48%, Scharlau	128,7	€/L	40	mL	5,15
Ácido clorhídrico 37%, Scharlau	28,23	€/L	5	mL	0,14
Ácido (S)-2-(6-metoxi-2-naftil) propanoico, Sigma Aldrich	14,34	€/g	8	g	114,72
Ácido (R)-2-(6-metoxi-2-naftil) propanoico, Sigma Aldrich	66,8	€/g	4	g	267,20
Albúmina sérica humana, Sigma Aldrich	96,1	€/g	5	g	480,50
Amano Lipasa A de Aspergillus niger, Sigma Aldrich	2,94	€/g	40	g	117,60
Bicarbonato de sodio (ACS), Scharlau	18,54	€/kg	50	g	0,93
Carbonato de cesio 99%, Sigma Aldrich	1,75	€/g	4	g	7,00
Cloruro de potasio (ACS)	42,98	€/kg	2	g	0,09
Cloruro sódico (ACS), Labkem	4,03	€/kg	200	g	0,81
Diclorometano (HPLC), Scharlau	42,12	€/L	0,5	L	21,06
Dimetilsulfóxido-d6, Sigma Aldrich	58	10 mL	15	mL	870,00
Dimetilsulfóxido (ACS), Scharlau	69,55	€/L	50	mL	3,48
Ester metílico α -acetobromo del ácido D-glucurónico, Apollo Scientific	27,91	€/g	7	g	195,37
Etanol (HPLC), Scharlau	65,84	€/L	200	mL	13,17
Guanidina hidrocloreídrica, Sigma Aldrich	0,33	€/g	100	mg	0,03
Hidróxido sódico (pellets) 99%, Scharlau	37,58	€/kg	6	g	0,23
Metanol-d4, Sigma Aldrich	18,1	€/mL	6	mL	108,60
Metanol (HPLC), Scharlau	25,4	€/L	50	mL	1,27
Gel de sílice (70-230 mesh ASTM), Scharlau	86,6	€/kg	50	g	4,33
Sulfato de magnesio anhidro extra puro, Scharlau	32,25	€/kg	100	g	3,23
Tampón salino de fosfato (PBS), Sigma Aldrich	1,41	€/T	30	tabletas	42,30
Tris(hidroximetil)aminoetano sustancia buffer 99.5%, Sigma Aldrich	3,25	€/g	3	g	9,75
Total					3143,42

1.3 MATERIAL FUNGIBLE

En la siguiente tabla se presenta el material fungible, es decir, el de un solo uso, empleado en la realización del trabajo.

Tabla 11. Material fungible.

Material fungible	Precio unitario (€)	Unidades utilizadas	Coste (€)
Agujas estériles BD Microlance 1x100	3,66	20	0,73
Bobina de papel industrial 45kg	14,67	1	14,67
Jeringa de plástico estéril 2 mL 1x100	15,63	15	2,34
Jeringa de plástico estéril 5 mL 1x100	19,7	12	2,36
Filtros de jeringa de Nylon 0.45 µm 1x100	33	10	3,30
Filtros de jeringa de PTFE 0.45 µm 1x100	53,4	17	9,08
Filtros Sephadex® G-25 medium	68	1	68,00
Globos de goma 1x100	7,99	25	2,00
Guantes desechables de nitrilo sin polvo talla M 1x100	7,07	100	7,07
Lámina de cierre Parafilm M	28	0,1	2,80
Punta de pipeta 0,5-20 µL 1x1000	10,29	15	0,15
Punta de pipeta 1-200 µL 1x1000	8,31	20	0,17
Punta de pipeta 100-1000 µL 1x500	6,77	100	1,35
Punta de pipeta 1-10 mL 1x100	17,83	120	21,40
Pipeta Pasteur de vidrio 1x250	9,53	200	7,62
Tapón de polipropileno/Vial 13.5 mL 1x100	29,5	160	47,20
Tapón de polipropileno/Vial 22.5 mL 1x100	49,5	80	39,60
Tapón Septum para inyectar 1x20	24,1	10	12,05
Tapón de goma tipo septum 1x30	24,1	10	8,03
Tubo de centrifuga PP 50 mL	0,13	8	1,04
TLC sílica gel 60 F ₂₅₄	13,4	3	40,20
Vial de HPLC 1x100	73	15	10,95
Vial transparente 13.5 mL 1x100	63,5	160	101,60
Vial transparente 22.5 mL 1x100	72,7	80	58,16
Total			461,88

1.4 MATERIAL NO FUNGIBLE

Se presenta el material fungible, es decir, la instrumentación, utilizada en la realización del trabajo.

Síntesis y caracterización fotofísica y fotoquímica de metabolitos del antiinflamatorio no esteroideo naproxeno

Tabla 12. Material no fungible.

Material no fungible	Cantidad	Precio unitario (€)	Precio total (€)	Vida útil (años)	Amortización (€/h)	Tiempo (h)	Coste (€)
Adaptador expansión-reduccción esm. H-14/23 M-29/32	2	6,61	13,22	2	0,00075	10	0,01
Adaptador expansión-reduccción esm. H-24/29 M-19/26	2	6,61	13,22	2	0,00075	10	0,01
Bata de laboratorio	1	20,45	20,45	5	0,00047	300	0,14
Columna HPLC fase reversa	1	675	675,00	2	0,03853	60	2,31
Columna cromatográfica 29/32 ϕ_i 25 mm 400 mm Poro 0	1	201,57	201,57	2	0,01151	4	0,05
Cristalizador con pico 300 mL	1	4,25	4,25	2	0,00024	100	0,02
Cubeta de cuarzo tipo 3 roscado, paso de luz 10 mm	5	357,11	1785,55	5	0,04077	100	4,08
Embudo Büchner	1	29,2	29,20	2	0,00167	1	0,00
Embudo de decantación cónico llave PTFE boca 19/26 250 mL	1	21,81	21,81	2	0,00124	2	0,00
Embudo de decantación cónico llave PTFE boca 24/29 500 mL	1	27,09	27,09	2	0,00155	2	0,00
Embudo rama corta ϕ 50 mm	1	1,11	1,11	2	0,00006	1	0,00
Espátula cuchara plana 210 mm L. acero inox.	1	3,99	3,99	10	0,00005	1	0,00
Gafas de seguridad	1	8,98	8,98	5	0,00021	80	0,02
Matraz aforado clase A 100 mL	8	8,34	66,72	2	0,00381	4	0,02
Matraz esférico 50 mL F/Redondo ESM. Boca 14/23	2	3,09	6,18	2	0,00035	20	0,01
Matraz esférico 100 mL F/Redondo ESM. Boca 14/23	2	3,99	7,98	2	0,00046	20	0,01
Matraz esférico 100 mL F/Redondo ESM. Boca 29/32	2	4,05	8,10	2	0,00046	20	0,01
Matraz esférico 500 mL F/Redondo ESM. Boca 29/32	4	7,22	28,88	2	0,00165	200	0,33
Matraz Erlenmeyer cuello estrecho 100 mL	2	1,02	2,04	2	0,00012	5	0,00
Matraz Erlenmeyer cuello estrecho 250 mL	2	1,52	3,04	2	0,00017	5	0,00
Matraz Kitasado forma Erlenmeyer 100 mL	1	8,58	8,58	2	0,00049	1	0,00
Microespátula cuchara-plana acero inox. 150 mm	1	1,56	1,56	10	0,00002	2	0,00
Micropipeta de volumen variable 5-50 μ L	1	75,05	75,05	5	0,00171	0,5	0,00
Micropipeta de volumen variable 10-100 μ L	1	75,05	75,05	5	0,00171	1	0,00
Micropipeta de volumen variable 100-1000 μ L	1	75,05	75,05	5	0,00171	2	0,00
Micropipeta de volumen variable 500-5000 μ L	1	75,05	75,05	5	0,00171	2	0,00
Nuez doble tipo Fisher	10	3,06	30,60	10	0,00035	100	0,03
Pera Richardson 500 mL	1	7,38	7,38	10	0,00008	4	0,00
Pesafiltros forma alta h 50 mm ESM.	2	1,87	3,74	2	0,00021	20	0,00
Pieza acodada 75° ESM. 29/32	2	6,71	13,42	2	0,00077	60	0,05
Pinzas para rótulas, sin resorte R-51	2	38	76,00	3	0,00289	50	0,14
Pinzas de laboratorio recta para disección	1	2,93	2,93	10	0,00003	4	0,00
Pinza universal 4 dedos	6	5,94	35,64	10	0,00041	100	0,04
Portacubetas de PE	1	2,15	2,15	5	0,00005	100	0,00
Probeta graduada clase A base hex. 10 mL	1	3,13	3,13	2	0,00018	10	0,00
Probeta graduada clase A base hex. 100 mL	1	5,52	5,52	2	0,00032	10	0,00
Probeta graduada clase A base hex. 250 mL	2	9,96	19,92	2	0,00114	10	0,01
Precolumna ODS	1	233,38	233,38	2	0,01332	60	0,80
Sonda de temperatura	1	10,25	10,25	5	0,00023	100	0,02
Soporte para balones corcho ϕ 80 mm	2	4,75	9,50	10	0,00011	20	0,00
Soporte para balones corcho ϕ 100 mm	2	5,3	10,60	10	0,00012	20	0,00
Soporte para balones corcho ϕ 120 mm	2	6,14	12,28	10	0,00014	100	0,01
Soporte pie de plato acero inox. ϕ 10 mm	4	31	124,00	10	0,00142	100	0,14
Tapón hueco esm. cabeza hex. 19/26	1	2,87	2,87	2	0,00016	2	0,00
Tapón hueco esm. cabeza hex. 24/29	1	3,94	3,94	2	0,00022	2	0,00
Tapón hueco plástico 14/23	8	0,45	3,60	5	0,00008	8	0,00
Temporizador	1	9,36	9,36	2	0,00053	150	0,08
Tetina de goma para pipeta Pasteur	8	0,14	1,12	1	0,00013	200	0,03
Tuberías de látex ϕ int 4.5 mm ϕ ext 9 mm 1x1 metro	5	2,03	10,15	1	0,00116	200	0,23
Tubo de cuarzo-Wilman RMN	2	67,6	135,20	2	0,00772	10	0,08
Refrigerante serpentín boca 14/23 I_{total} 295 mm	1	8,73	8,73	2	0,00050	300	0,15
Varilla agitadora de vidrio redondeada 300 mm	1	0,61	0,61	2	0,00003	1	0,00
Varilla magnética cilíndrica para agitación ϕ 1 3/6 mm	2	1,41	2,82	5	0,00006	100	0,01
Varilla magnética cilíndrica para agitación ϕ 1 4,5/15 mm	2	1,37	2,74	5	0,00006	200	0,01
Varilla recogeimanes PTFE 250 mm	1	11,07	11,07	10	0,00013	0,5	0,00
Vaso de precipitados forma baja 100 mL	2	1,4	2,80	2	0,00016	4	0,00
Vaso de precipitados forma baja 250 mL	2	2,33	4,66	2	0,00027	4	0,00
Total							8,88

1.5 EQUIPOS

Se detallan a continuación los equipos utilizados para las mediciones realizadas a lo largo del proyecto.

Tabla 13. Equipos.

Equipo	Coste (€)	Vida útil (años)	Amortización (€/h)	Tiempo (h)	Coste (€)
Balanza digital	3000	15	0,02232	3	0,07
Baño de ultrasonidos	5000	15	0,03720	0,5	0,02
Centrifuga	6000	15	0,04464	1	0,04
Espectrómetro de RMN	300000	15	2,23214	10	22,32
Espectrofotómetro JASCO V-650	10000	15	0,07440	10	0,74
Espectrofluorímetro Jasco FP-8500	28000	15	0,20833	20	4,17
Espectrofluorímetro EasyLife X	20000	15	0,14881	4	0,60
Equipo de fosforescencia Photon Technology International (PTI)	60000	15	0,44643	5	2,23
Fotorreactor Luzchem	5000	15	0,03720	25	0,93
Láser pulsado de Nd-YAG	100000	15	0,74405	10	7,44
HPLC semipreparativo Jasco PU-2080	350000	15	2,60417	60	156,25
Placa calefactora	269	5	0,00600	300	1,80
Rotavapor	8000	15	0,05952	20	1,19
UPLC ACQUITY (Waters Corp)	350000	15	2,60417	2	5,21
Total					203,01

1.6 PRESUPUESTO EN BASE DE LICITACIÓN

El presupuesto Base de Licitación expresa el coste final del proyecto, resultado de sumar los presupuestos parciales y de adicionar los porcentajes correspondientes a los gastos generales (que refleja los costes de mantenimiento y consumo eléctrico, entre otros), el beneficio industrial (en este caso, beneficio para la universidad) y el I.V.A., siendo representados como un porcentaje adicional del 13 %, 6 % y 21 % respectivamente.

Síntesis y caracterización fotofísica y fotoquímica de metabolitos del antiinflamatorio no esteroideo naproxeno

Presupuesto de ejecución material

1.- Mano de obra	11000,00
2.- Reactivos y disolventes	3143,42
3.- Material fungible	461,88
4.- Material no fungible	8,88
5.- Equipos	203,01
Total.....: 14817,19 €	

Asciende el presupuesto de ejecución material a la expresada cantidad de CATORCE MIL OCHOCIENTOS DIECISIETE EUROS CON DIECINUEVE CÉNTIMOS.

Presupuesto base de licitación

Presupuesto de ejecución material	14817,43 €
Gastos generales (13 %)	1926,24
Beneficio industrial (6 %)	1004,61
Presupuesto de ejecución por contrata	17748,03 €
I.V.A. (21%)	3727,09
Total.....: 21475,12 €	

Asciende el presupuesto base de licitación a la expresada cantidad de VEINTIÚN MIL CUATROCIENTOS SETENTA Y CINCO EUROS CON DOCE CÉNTIMOS.

ANEXOS

ANEXO I: SEGURIDAD

A continuación se detallan los pictogramas de seguridad, las indicaciones de peligro y las declaraciones de prudencia de los reactivos químicos empleados en la realización de este trabajo, los cuales han sido: 2-metoxietanol, acetato de etilo, acetato de sodio, acetonitrilo, ácido acético, ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, bicarbonato de sodio, dimetilsulfóxido, etanol, hidróxido sódico, metanol, tampón salino de fosfato y tris(hidroximetil)aminometano (tris).

2-metoxietanol

- Pictogramas de seguridad



- Indicación(es) de peligro

H226 Líquidos y vapores inflamables.

H302 + H312 + H332 Nocivo en caso de ingestión, contacto con la piel o inhalación.

H360FD Puede perjudicar a la fertilidad. Puede dañar al feto.

H370 Provoca daños en los órganos (Sistema inmunitario).

H373 Puede provocar daños en los órganos (timo) tras exposiciones prolongadas o repetidas.

- Declaración(es) de prudencia

P201 Pedir instrucciones especiales antes del uso.

P210 Mantener alejado del calor, de superficies calientes, de chispas, de llamas abiertas y de cualquier otra fuente de ignición. No fumar.

P260 No respirar polvos/ humos/ gases/ nieblas/ vapores/ aerosoles.

P280 Llevar guantes/ prendas/ gafas/ máscara de protección.

P308 + P311 EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico.

P370 + P378 En caso de incendio: Utilizar arena seca, producto químico seco o espuma resistente al alcohol para la extinción.

Acetato de etilo

- Pictogramas de seguridad



- Indicación(es) de peligro

H225 Líquido y vapores muy inflamables.

H319 Provoca irritación ocular grave.

H336 Puede provocar somnolencia o vértigo.

- Declaración(es) de prudencia

P210 Mantener alejado del calor, de superficies calientes, de chispas, de llamas abiertas y de cualquier otra fuente de ignición. No fumar.

P305 + P351 + P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

P370 + P378 En caso de incendio: Utilizar polvo seco o arena seca para la extinción.

P403 + P235 Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener en lugar fresco.

Acetato de sodio

No es una sustancia o mezcla peligrosa según el Reglamento (CE) No. 1272/2008.

Acetonitrilo

- Pictogramas de seguridad



- Indicación(es) de peligro

H225 Líquido y vapores muy inflamables.

H302 + H312 + H332 Nocivo en caso de ingestión, contacto con la piel o inhalación.

H319 Provoca irritación ocular grave.

- Declaración(es) de prudencia

P210 Mantener alejado del calor, de superficies calientes, de chispas, de llamas abiertas y de cualquier otra fuente de ignición. No fumar.

P261 Evitar respirar el polvo/ el humo/ el gas/ la niebla/ los vapores/ el aerosol.

P280 Llevar guantes/ prendas de protección.

P305 + P351 + P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

P370 + P378 En caso de incendio: Utilizar polvo seco o arena seca para la extinción.

P403 + P235 Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener en lugar fresco.

Ácido acético

- Pictogramas de seguridad



- Indicación(es) de peligro

H226 Líquidos y vapores inflamables.

H314 Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.

- Declaración(es) de prudencia

P280 Llevar guantes/ prendas/ gafas/ máscara de protección.

P305 + P351 + P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

P310 Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico.

Ácido bromhídrico

- Pictogramas de seguridad



- Indicación(es) de peligro

H314 Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.

H335 Puede irritar las vías respiratorias.

- Declaración(es) de prudencia

P260 No respirar el polvo/ el humo/ el gas/ la niebla/ los vapores/ el aerosol.

P280 Llevar guantes/ prendas/ gafas/ máscara de protección.

P303 + P361 + P353 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitar inmediatamente todas las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua/ ducharse.

P304 + P340 + P310 EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico.

P305 + P351 + P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

Ácido clorhídrico

- Pictogramas de seguridad



- Indicación(es) de peligro (frases H)

H290 Puede ser corrosivo para los metales.

H314 Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.

H335 Puede irritar las vías respiratorias.

- Declaración(es) de prudencia (frases P)

P260 No respirar el polvo/ el humo/ el gas/ la niebla/ los vapores/ el aerosol.

P280 Llevar guantes/ prendas/ gafas/ máscara de protección.

P303 + P361 + P353 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitar inmediatamente todas las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua/ ducharse.

P304 + P340 + P310 EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la persona al aire libre y mantenerla en una posición que le facilite la respiración. Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA/médico.

P305 + P351 + P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

Bicarbonato de sodio

No es una sustancia o mezcla peligrosa de acuerdo con el Reglamento (CE) No. 1272/2008.

Dimetilsulfóxido

No es una sustancia o mezcla peligrosa de acuerdo con el Reglamento (CE) No. 1272/2008.

Etanol

- Pictogramas de seguridad



- Indicación(es) de peligro

H225 Líquido y vapores muy inflamables.

H319 Provoca irritación ocular grave.

- Declaración(es) de prudencia

P210 Mantener alejado del calor, de superficies calientes, de chispas, de llamas abiertas y de cualquier otra fuente de ignición. No fumar.

P305 + P351 + P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

P370 + P378 En caso de incendio: Utilizar polvo seco o arena seca para la extinción.

P403 + P235 Almacenar en un lugar bien ventilado. Mantener en lugar fresco.

Hidróxido sódico

- Pictogramas de seguridad



- Indicación(es) de peligro (frases H)

H290 Puede ser corrosivo para los metales.

H314 Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.

- Declaración(es) de prudencia (frases P)

P280 Llevar guantes/ prendas/ gafas/ máscara de protección.

P305 + P351 + P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.

P310 Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACION TOXICOLOGICA o a un médico.

Metanol

- Pictogramas de seguridad



- Indicación(es) de peligro

H225 Líquido y vapores muy inflamables.

H301 + H311 + H331 Tóxico en caso de ingestión, contacto con la piel o inhalación

H370 Provoca daños en los órganos.

- Declaración(es) de prudencia

P210 Mantener alejado del calor, de superficies calientes, de chispas, de llamas abiertas y de cualquier otra fuente de ignición. No fumar.

P260 No respirar el polvo/ el humo/ el gas/ la niebla/ los vapores/ el aerosol.

P280 Llevar guantes/ prendas de protección.

P301 + P310 EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico.

P311 Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico.

Tampón salino de fosfato

No es una sustancia o mezcla peligrosa según el Reglamento (CE) No. 1272/2008.

Tampón salino de fosfato y tris(hidroximetil)aminometano

No es una sustancia o mezcla peligrosa de acuerdo con el Reglamento (CE) No. 1272/2008.

ANEXO II: PREPARACIÓN DISOLUCIONES TAMPÓN

A continuación, se presentan los cálculos realizados para la preparación de las disoluciones tampón de pH empleados en la determinación del pKa* del compuesto 6-O-desmetilnaproxeno.

Las cantidades, así como los reactivos utilizados se prepararon según la bibliografía⁵⁷. Los pH de las disoluciones se comprobaron con un pHmetro.

Tampón pH 1

Se preparan 25 mL de KCl 0.2 M

Pureza = 99.8%; Masa molecular = 74.55 g/mol

$$n \text{ mol} = 0.2 \cdot 25 \cdot 10^{-3} = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol KCl} \cdot \frac{74.55 \text{ g}}{1 \text{ mol KCl}} = 0.3728 \text{ g} / 0.99 \text{ pureza} \approx 0.377 \text{ g KCl}$$

Se prepara una disolución de HCl 0.2 M

Pureza = 37%; $\rho_{\text{HCl}} = 1180 \text{ g/L}$

$$C_{\text{botella}} = \frac{1180 \text{ g}}{1 \text{ L}} \cdot \frac{37 \text{ g HCl}}{100 \text{ g disolución}} \cdot \frac{1 \text{ mol}}{36.5 \text{ g HCl}} = 11.96 \text{ mol/L}$$

$$V \cdot C = V' \cdot C'$$

$$V \cdot 11.96 \text{ M} = 100 \text{ mL} \cdot 0.2 \text{ M}$$

$$V = \frac{100 \cdot 0.2}{11.96} = 1.67 \text{ mL HCl}$$

La disolución de HCl 0.2 M se valoró con una disolución de NaOH 0.2 M previamente preparada, obteniéndose un factor de corrección (F) de 1.061.

Finalmente, en un matraz aforado de 100 mL se toman 25 mL KCl 0.2 M, 67 mL HCl 0.2 M y se enrasó con agua destilada.

Tampón pH 4

Se preparan 18 mL de acetato de sodio trihidrato 0.1 M

Pureza \approx 100%; Masa molecular = 100 g/mol

$$n \text{ mol} = 0.1 \cdot 18 \cdot 10^{-3} = 1.8 \cdot 10^{-3} \text{ mol acet. Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O} \cdot \frac{100 \text{ g}}{1 \text{ mol acNa}} = 0.18 \text{ g acet. Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$$

Se prepara una disolución de ácido acético 0.1 M

Pureza = 99.8%; $\rho_{\text{Ac. Acet.}} = 1050 \text{ g/L}$

$$C_{botella} = \frac{1050 \text{ g}}{1 \text{ L}} \cdot \frac{99.8 \text{ g HCl}}{100 \text{ g disolución}} \cdot \frac{1 \text{ mol}}{60.05 \text{ g HCl}} = 17.45 \text{ mol/L}$$

$$V \cdot C = V' \cdot C'$$

$$V \cdot 17.45 \text{ M} = 100 \text{ mL} \cdot 0.1 \text{ M}$$

$$V = \frac{100 \cdot 0.1}{17.45} \approx 573.07 \text{ } \mu\text{L Ac. acet.}$$

Finalmente, en un matraz aforado de 100 mL se toman 18 mL de acetato de sodio trihidrato 0.1 M y 82 mL de ácido acético.

Tampón pH 7.3

Se disuelve una pastilla de tampón salino de fosfato en 200 mL de agua Milli-Q, obteniéndose como resultado una disolución salina 0.05 M con 7.3 pH.

Tampón pH 8

Se preparan 100 mL de tris (hidroximetil) aminoetano 0.1 M

Pureza \approx 100%; Masa molecular = 121 g/mol

$$n \text{ mol} = 0.1 \cdot 100 \cdot 10^{-3} \text{ mol tris} \cdot \frac{121 \text{ g}}{1 \text{ mol tris}} = 1.21 \text{ g tris}$$

Se prepara una disolución de HCl 0.1 M

Pureza = 37%; $\rho_{\text{HCl}} = 1180 \text{ g/L}$

$$C_{botella} = \frac{1180 \text{ g}}{1 \text{ L}} \cdot \frac{37 \text{ g HCl}}{100 \text{ g disolución}} \cdot \frac{1 \text{ mol}}{36.5 \text{ g HCl}} = 11.96 \text{ mol/L}$$

$$V \cdot C = V' \cdot C'$$

$$V \cdot 11.96 \text{ M} = 100 \text{ mL} \cdot 0.1 \text{ M}$$

$$V = \frac{100 \cdot 0.1}{11.96} \approx 836.1 \text{ } \mu\text{L HCl}$$

Finalmente, en un matraz aforado de 100 mL se tomaron 50 mL tris 0.1 M, 29.2 mL HCl 0.1 M y se enrasó con agua destilada.

Tampón pH 9

Se parten de las disoluciones preparadas para el tampón pH 8 (tris 0.1 M y HCl 0.1 M)

En un matraz aforado de 100 mL se tomaron 50 mL tris 0.1 M, 5.7 mL HCl 0.1 M y se enrasó con agua destilada.

Tampón pH 10

Se preparan 100 mL de bicarbonato de sodio 0.05 M

Pureza \approx 100%; Masa molecular = 84 g/mol

$$n \text{ mol} = 0.05 \cdot 100 \cdot 10^{-3} \text{ mol NaHCO}_3 \cdot \frac{84 \text{ g}}{1 \text{ mol NaHCO}_3} = 0.42 \text{ g NaHCO}_3$$

Se prepara una disolución de NaOH 0.1 M a partir de una disolución madre de NaOH 0.2 M (F = 1.0906)

$$V \cdot C \cdot F = V' \cdot C'$$

$$V \cdot 0.2 \text{ M} \cdot 1.0906 = 10.7 \text{ mL} \cdot 0.1 \text{ M}$$

$$V = \frac{10.7 \cdot 0.1}{0.2} = 5.35 \text{ mL NaOH}$$

Finalmente, en un matraz aforado de 100 mL se tomaron 50 mL NaHCO₃ 0.05 M, 10.7 mL NaOH 0.1 M y se enrasó con agua destilada.

Tampón pH 12

Se preparan 25 mL de KCl 0.2 M

Pureza = 99.8%; Masa molecular = 74.55 g/mol

$$n \text{ mol} = 0.2 \cdot 25 \cdot 10^{-3} = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol KCl} \cdot \frac{74.55 \text{ g}}{1 \text{ mol KCl}} = 0.3728 \text{ g} / 0.99 \text{ pureza} \approx 0.377 \text{ g KCl}$$

Se prepara una disolución de NaOH 0.2 M

Pureza = 98%; Masa molecular = 40 g/mol

$$n \text{ mol} = 0.2 \cdot 100 \cdot 10^{-3} = 0.02 \text{ mol NaOH} \cdot \frac{40 \text{ g}}{1 \text{ mol NaOH}} = 0.8 \text{ g} / 0.98 \text{ pureza} \approx 0.808 \text{ g NaOH}$$

La disolución de NaOH 0.2 M se valoró con una disolución de HCl 0.1 M previamente preparada, obteniéndose un factor de corrección (F) de 1.0906.

Finalmente, en un matraz aforado de 100 mL se tomaron 25 mL KCl 0.2 M, 6 mL NaOH 0.2 M y se enrasó con agua destilada.