



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA  
SUPERIOR INGENIEROS  
INDUSTRIALES VALENCIA

**TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA**

# **CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA, A TRAVÉS DE TÉCNICAS DE ABSORCIÓN Y EMISIÓN, DE LA INTERACCIÓN FOTOINDUCIDA ENTRE N-ÓXIDOS HETEROCÍCLICOS Y PROTEÍNAS**

AUTORA: CLAUDIA CERDÁN FLORES

TUTORA: SUSANA ENCINAS PEREA

COTUTOR: JORGE C. HERRERA LUNA

**Curso Académico: 2018-19**

## **AGRADECIMIENTOS**

Empezaré dando las gracias a mi tutora Susana y a mi cotutor Jorge, por descubrirme la fotoquímica de rebote al final de la carrera y ofrecerme la propuesta de este TFG, por confiar en que podría sacarlo adelante y sobre todo por la paciencia y el tiempo que me han dedicado entre revisiones y horas de laboratorio.

A todos los profesores que han marcado estos cuatro años de carrera y me han enseñado lo que es el amor por una profesión y por la Ingeniería Química.

A mis padres, por ser los modelos a seguir y enseñarme lo que se siente al admirar a una persona. Por la paciencia infinita, aguantar lo inaguantable y sobre todo por confiar en mí más de lo que yo lo hago. A mi hermana, por ser un ejemplo de vida, de constancia, de lucha, de admiración y de felicidad. Porque a pesar de ser ella la pequeña, es todo lo que yo quiero ser de mayor. A toda mi familia por preocuparse e interesarse por mí como si les fuera la vida en ello. Por estar presentes siempre.

A Raquel, Lara, Leticia, Marina, Andrea y Neus, por recordarme que la música siempre trae cosas buenas y que me ha regalado muchos de los mejores momentos de mi vida. Por seguir ahí sea de la forma que sea, diez años después de conocernos. Y por la música, también a la SUMP y a mis paraféminas por los viernes de ensayo, cerveza y momentitos.

A Alba, Gemma, Helena y Laura por los 23 años que llevo con ellas, por apostar por mí, por llorar y reír conmigo, por sufrir, celebrar y ser conmigo. Por ser mi día a día, estar siempre dispuestas a todo y ser mi puzzle de cinco piezas. Por serlo todo y seguir siempre. A mis chicos, por ser la familia que elegí y por poder con todo lo que viene.

A Merche, por ser la mejor en hacer que todo siga exactamente igual que ese día que nos conocimos, por mucho que pase el tiempo y no sepamos nada la una de la otra, por ser mi mejor versión. A Sara, Elena, Sandra y Gema por empezar conmigo, enseñarme tanto y seguir cinco años después. A todos con los que empecé esta aventura.

A Sheila por ser uña y carne, el perro y el gato o el sol y la luna, todo a la vez. Por todo lo que ha hecho por mí y por ser el día de mis peores noches. A Sara, por aparecer para demostrarme que puede haber alguien exactamente igual que yo, por todo y más. A María, por ser uno de los mayores descubrimientos y la hermana que me llevo de estos años. A Raquel, por ser parte fundamental de todo, siempre. A todas mis chicas por compartirlo todo.

A todos lo que habéis formado parte de esto.

Dicen que lo bueno siempre aparece al final, así que a Tara, Rubén, Jose, Alba, Juana y Ana, también gracias por aparecer a última hora para quedaros.

Y gracias a la vida por darme tantas personas a las que poder agradecerles tanto.

Por el fin de la mejor etapa de mi vida.

## **RESUMEN**

Los *N*-óxidos heterocíclicos (NO) son compuestos aromáticos cuyo heteroátomo es el nitrógeno al que está unido un oxígeno a través de un enlace sencillo. Los NOs han demostrado una amplia versatilidad como agentes bioactivos. Algunos *N*-óxidos tienen potencial negativo por su impacto nocivo en el medio ambiente y porque pueden presentar efectos toxicológicos y/o cancerígenos. Sin embargo, otros tienen connotaciones positivas, ya que se ha detectado su presencia en los tejidos de plantas y animales. Estos *N*-óxidos de origen natural han servido, incluso, de inspiración en la industria farmacéutica para el diseño de nuevos fármacos. En la actualidad, los NOs despiertan un gran interés no solo por sus funciones bioquímicas, sino también por los procesos fotoquímicos y fotofísicos que experimentan en su interacción con el ADN y las proteínas, por ejemplo, con la correspondiente posible aplicación en la industria química y farmacéutica. Entre los NOs se encuentra el *N*-óxido de 4-nitroquinolina (NQNO) reconocido como agente mutagénico y carcinogénico. Con el fin de profundizar en su caracterización fotoquímica e interacción con las biomoléculas, en este trabajo se pretende completar el estudio de las interacciones existentes entre los estados excitados de NQNO y diversos aminoácidos, tanto en sus estructuras monoméricas como formando parte de las macroestructuras de las proteínas. Para ello, se hará uso de técnicas experimentales espectroscópicas como la espectroscopía de absorción UV-visible y de emisión, tanto en estado estacionario como con resolución temporal para la detección de especies en estado excitado. Además, se emplearán diversos reactores fotoquímicos para la irradiación de las muestras, así como técnicas de separación de fotoproductos como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y de caracterización de los productos obtenidos como la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón y carbono-13. Para completar el estudio también se utilizarán técnicas de manipulación de materiales proteicos, como el desarrollo de columnas de Sephadex<sup>®</sup>, determinación de los posibles sitios de unión, etc.

**Palabras Clave:** Fotoquímica; *N*-óxidos heterocíclicos; Proteínas; Fotofísica; Fluorescencia; Interacción fármaco-biomolécula

## RESUM

Els *N*-òxids heterocíclics (NO) són compostos aromàtics l'heteroàtom dels quals és el nitrogen al qual està unit un oxigen a través d'un enllaç senzill. Els NOs han demostrat una àmplia versatilitat com a agents bioactius. Alguns *N*-òxids tenen potencial negatiu pel seu impacte nociu en el medi ambient i perquè poden presentar efectes toxicològics i/o cancerígens. No obstant això, altres tenen connotacions positives, ja que s'ha detectat la seua presència en els teixits de plantes i animals. Aquests *N*-òxids d'origen natural han servit, fins i tot, d'inspiració en la indústria farmacèutica per al disseny de nous fàrmacs. En l'actualitat, els NOs desperten un gran interès no solament per les seues funcions bioquímiques, sinó també pels processos fotoquímics i fotofísics que experimenten en la seua interacció amb l'ADN i les proteïnes, per exemple, amb la corresponent possible aplicació en la indústria química i farmacèutica. Entre els NOs es troba el *N*-òxid de 4-nitroquinolina (NQNO) reconegut com a agent mutagènic i carcinogènic. Amb la finalitat d'aprofundir en la seua caracterització fotoquímica i interacció amb les biomolècules, en aquest treball es pretén completar l'estudi de les interaccions existents entre els estats excitats de NQNO i diversos aminoàcids, tant en les seues estructures monomèriques com formant part de les macroestructures de les proteïnes. Per a això, es farà ús de tècniques experimentals espectroscòpiques com l'espectroscopia d'absorció UV-visible i d'emissió, tant en estat estacionari com amb resolució temporal per a la detecció d'espècies en estat excitat. A més, s'empraran diversos reactors fotoquímics per a la irradiació de les mostres, així com tècniques de separació de fotoproductes com la cromatografia líquida amb alta resolució (HPLC) i de caracterització dels productes obtinguts com l'espectroscopia de ressonància magnètica nuclear de protó i carboni-13. Per a completar l'estudi també s'utilitzaran tècniques de manipulació de materials proteics, com el desenvolupament de columnes de Sephadex<sup>®</sup>, determinació dels possibles llocs d'unió, etc.

**Paraules clau:** Fotoquímica; *N*-òxids heterocíclics; Proteïnes; Fotofísica; Fluorescència; Interacció fàrmac-biomolècula

## **ABSTRACT**

The heterocyclic *N*-oxides (NO) are aromatic compounds whose heteroatom is the nitrogen to which an oxygen is bound by a single bond. The NOs have shown a wide versatility as bioactive agents. Some *N*-oxides have a negative potential because of their harmful impact on the environment and because they may have toxicological and/or carcinogenic effects. However, others have positive connotations, since their presence in the tissues of plants and animals has been detected. These *N*-oxides of natural origin have even served as inspiration in the pharmaceutical industry for the design of new drugs. Nowadays, the NOs have a great interest not only for their biochemical functions, but also for the photochemical and photophysical processes they experience in their interaction with DNA and proteins, for example, with the corresponding possible application in the chemical and pharmaceutical industry. Among the NOs there is the 4-nitroquinoline *N*-oxide (NQNO) recognized as a mutagenic and carcinogenic agent. In order to deepen in its photochemical characterization and interaction with biomolecules, in this project we intend to complete the study of the interactions between the excited states of NQNO and various amino acids, both in their monomeric structures and as part of the macrostructures of the proteins. For this purpose, experimental spectroscopic techniques such as UV-visible and emission absorption spectroscopy, both in steady state and with temporal resolution, will be used to detect species in the excited state. In addition, various photochemical reactors will be used for the irradiation of the samples, as well as techniques for separating photoproducts such as liquid chromatography with high resolution (HPLC) and for characterizing the products obtained as proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. To complete the study will also be used techniques for handling protein materials, such as the development of Sephadex<sup>®</sup> columns, determination of possible binding sites, etc.

**Keywords:** Photochemistry; Heterocyclic *N*-oxides; Proteins; Photophysics; Fluorescence; Drug-biomolecule interaction

## **ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS**

<b>A</b>	Aceptor
<b>A*</b>	Aceptor en estado excitado
<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ASB</b>	Albúmina Sérica Bovina
<b>ASH</b>	Albúmina Sérica Humana
<b>D</b>	Dador
<b>D*</b>	Dador en estado excitado
<b>E</b>	Energía
<b>EX</b>	Formación de excímeros y/o exciplejos
<b><math>\Phi</math></b>	Rendimiento cuántico
<b>HOMO</b>	Higher Occupied Molecular Orbital/Orbital molecular ocupado más alto
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución
<b>I<sub>F</sub></b>	Intensidad de fluorescencia
<b>IR</b>	Radiación Infrarroja
<b>k<sub>q</sub></b>	Constante de desactivación
<b>k<sub>sv</sub></b>	Constante de Stern-Volmer
<b><math>\lambda</math></b>	Longitud de onda
<b>LUMO</b>	Lower Unnoccupied Molecular Orbital/Orbital molecular desocupado más bajo
<b>N<sub>2</sub></b>	Nitrógeno molecular
<b>NO</b>	N-óxido
<b>NQNO</b>	4-Nitroquinolina N-óxido
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno molecular

<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline Solution/Disolución salina tamponada de fosfato
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>S</b>	Singlete en estado fundamental
<b>S<sub>n</sub></b>	Singlete en estado excitado
<b>τ</b>	Tiempo de vida
<b>T</b>	Triplete en estado fundamental
<b>T<sub>n</sub></b>	Triplete en estado excitado
<b>TE</b>	Transferencia de energía
<b>Tel</b>	Transferencia electrónica
<b>Trp</b>	L-Triptófano
<b>UV</b>	Radiación ultravioleta
<b>UVB</b>	Radiación ultravioleta tipo B
<b>UV-Vis</b>	Radiación ultravioleta y visible

# ÍNDICE

## DOCUMENTOS CONTENIDOS EN EL TFG

- Memoria
- Presupuesto

## ÍNDICE DE LA MEMORIA

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. FOTOFÍSICA Y FOTOQUÍMICA .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Otros procesos fotoinducidos .....	5
<b>1.2. N-ÓXIDOS HETEROCÍCLICOS .....</b>	<b>6</b>
1.2.1. La fotoquímica de los <i>N</i> -óxidos .....	7
1.2.2. 4-Nitroquinolina- <i>N</i> -óxido.....	8
<b>1.3. AMINOÁCIDOS Y PROTEÍNAS .....</b>	<b>9</b>
1.3.1. L-Triptófano (Trp).....	11
1.3.2. Albúmina Sérica Humana (ASH).....	12
1.3.3. Albúmina Sérica Bovina (ASB) .....	13
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
<b>3. EQUIPOS, INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. ESPECTROFOTÓMETRO UV-Vis .....</b>	<b>15</b>
<b>3.2. ESPECTROFLUORÍMETRO DE ESTADO ESTACIONARIO.....</b>	<b>16</b>
<b>3.3. ESPECTROFLUORÍMETRO DE TIEMPO RESUELTO .....</b>	<b>17</b>
<b>3.4. FOTORREACTOR.....</b>	<b>18</b>
<b>3.5. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) .....</b>	<b>20</b>
<b>3.6. INSTRUMENTACIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>3.7. REACTIVOS Y DISOLVENTES .....</b>	<b>23</b>
<b>4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>24</b>
<b>4.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES .....</b>	<b>24</b>
4.1.1. Disoluciones madre .....	24
4.1.2. Disoluciones para la caracterización fotofísica y la medición del tiempo de vida de fluorescencia.....	25

4.1.3.	Disoluciones para el estudio de la fotorreactividad de la NQNO.....	26
4.1.4.	Disoluciones para la filtración en gel Sephadex®.....	27
<b>4.2.</b>	<b>INTERACCIÓN NQNO:PROTEÍNA/AMINOÁCIDO .....</b>	<b>27</b>
4.2.1.	Medidas en estado estacionario .....	27
4.2.2.	Medidas con resolución temporal.....	27
<b>4.3.</b>	<b>OBTENCIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA Y DEL TIEMPO ÓPTIMOS DE IRRADIACIÓN .....</b>	<b>28</b>
<b>4.4.</b>	<b>FILTRACIÓN EN GEL SEPHADEX® .....</b>	<b>29</b>
<b>5.</b>	<b>PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
<b>5.1.</b>	<b>ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LA NQNO CON EL AMINOÁCIDO Trp Y PROTEÍNAS ALBÚMINAS SÉRICAS.....</b>	<b>30</b>
5.1.1.	Medidas espectroscópicas de absorción y emisión en estado estacionario .....	30
5.1.1.1.	<i>NQNO:Trp</i> .....	30
5.1.1.2.	<i>NQNO:ASH</i> .....	32
5.1.1.3.	<i>NQNO:ASB</i> .....	34
5.1.2.	Cálculo de la constante cinética de la interacción Trp:NQNO a través de medidas de emisión con resolución temporal.....	36
5.1.2.1.	<i>Ecuación de Stern-Volmer</i> .....	36
5.1.2.2.	<i>NQNO:ASH</i> .....	37
5.1.2.3.	<i>NQNO:ASB</i> .....	39
<b>5.2.</b>	<b>ESTUDIO DE LA FOTORREACTIVIDAD DE LA NQNO .....</b>	<b>41</b>
5.2.1.	NQNO en PBS.....	41
5.2.2.	NQNO:Trp.....	42
5.2.3.	NQNO:ASH .....	43
5.2.4.	NQNO:ASB.....	44
<b>5.3.</b>	<b>ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE UNIÓN COVALENTE FOTOINDUCIDA NQNO-PROTEÍNA.....</b>	<b>45</b>
5.3.1.	NQNO-ASH.....	45
5.3.2.	NQNO-ASB .....	48
<b>6.</b>	<b>PLAN FUTURO .....</b>	<b>51</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>52</b>
<b>8.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>54</b>

Caracterización espectroscópica, a través de técnicas de absorción y emisión, de la interacción  
fotoinducida entre N-óxidos heterocíclicos y proteínas

---

# **DOCUMENTO I**

# **MEMORIA**

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. FOTOFÍSICA Y FOTOQUÍMICA

Heinrich Hertz descubrió en 1888 que al chocar la luz con la superficie de algunos metales, se emitían electrones, lo que se denominó efecto fotoeléctrico. Esto sólo ocurría cuando la frecuencia de la luz que incidía excedía un umbral determinado. Fue en 1905 cuando Einstein propuso que la radiación electromagnética tiene propiedades corpusculares y que los fotones tienen una energía característica que viene definida por la ecuación de Planck<sup>1</sup>:

$$E = h \cdot \nu \quad \text{Ecuación 1}$$

La ecuación de Planck relaciona la frecuencia ( $\nu$ , en  $s^{-1}$ ) de dicha radiación con la energía ( $E$ , en Julios) por medio de una constante (constante de Planck,  $h$ ) cuyo valor es de  $6,63 \cdot 10^{-34}$  J·s.

Estos fueron los primeros descubrimientos que dieron lugar a la fotoquímica como ciencia.

La fotoquímica es la rama de la química que estudia las interacciones entre átomos o moléculas con la luz. Comprende dos aspectos diferentes dependiendo del resultado obtenido por las moléculas o átomos al absorber luz. Uno de ellos es la fotofísica, cuando la interacción entre átomos y/o moléculas da lugar a un cambio físico. El otro es la fotoquímica, cuando la interacción trae consigo un cambio químico.

En la fotoquímica, la energía de activación necesaria para que se produzca una reacción viene dada por la absorción de luz, a diferencia de lo que ocurre en la química tradicional, en la que se utiliza el calor como fuente de energía. Los grupos de átomos capaces de absorber luz, se denominan cromóforos. Según la longitud de onda de la luz absorbida, nos encontraremos en una zona u otra del espectro de luz (**Figura 1**).

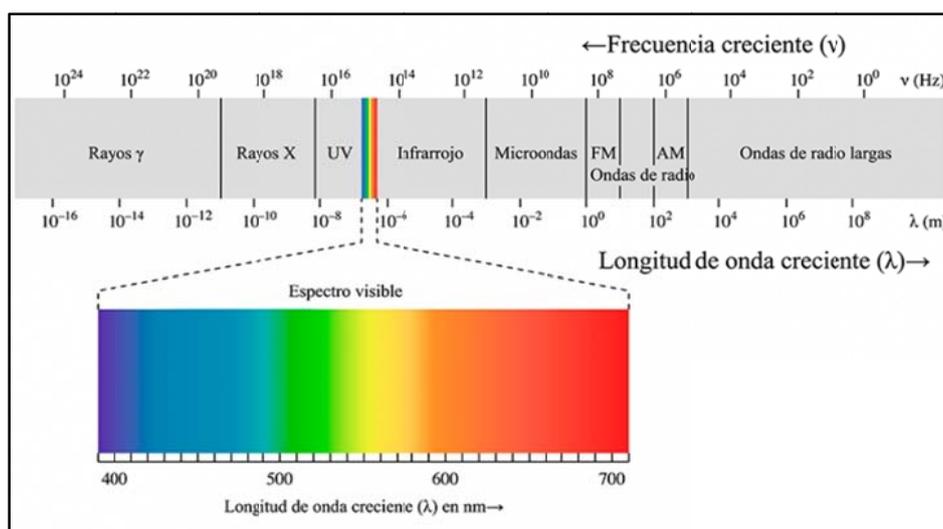


Figura 1. Tipos de radiación según su frecuencia/longitud de onda y espectro visible<sup>2</sup>

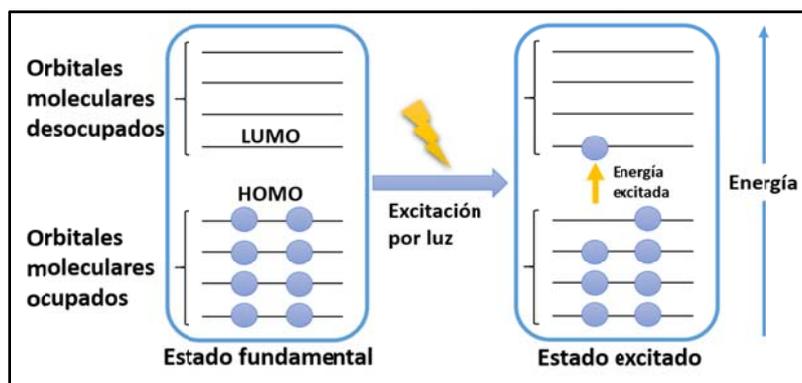
La fotoquímica se rige por unas leyes fundamentales<sup>3</sup>:

**Ley de Grotthus-Draper:** para que se dé una reacción fotoquímica la luz debe ser absorbida por una sustancia.

**Ley de Stark-Einstein:** cada fotón que se absorbe en un sistema químico, sólo activa a una molécula para dar lugar a una reacción fotoquímica. Esta ley es la que permite el cálculo del rendimiento cuántico de una reacción, a partir de la siguiente expresión, para el compuesto i:

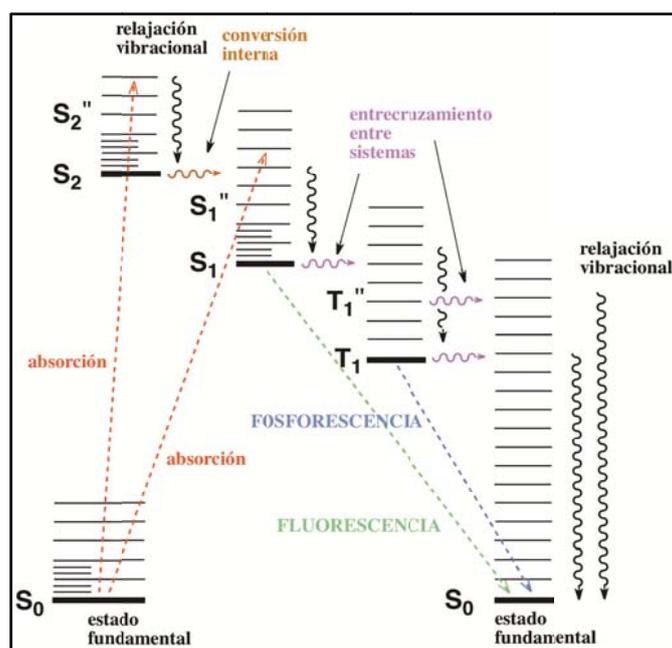
$$\phi_i = \frac{\text{n}^\circ \text{ moléculas que reaccionan}}{\text{n}^\circ \text{ fotones absorbidos}} \quad \text{Ecuación 2}$$

En el caso de las reacciones fotoquímicas, todo comienza cuando se absorbe luz, generándose unos estados excitados debido al movimiento de electrones (**Figura 2**). Lo que ocurre es que un electrón pasa del nivel ocupado más alto, el HOMO (higher occupied molecular orbital) al orbital desocupado más bajo, el LUMO (lower unoccupied molecular orbital). Para que se produzca la reacción fotoquímica es necesario que una molécula en estado fundamental se irradie con luz de una frecuencia correspondiente a la diferencia de energía entre dicho estado y su estado excitado, produciéndose entonces la transición de electrones.<sup>4</sup>



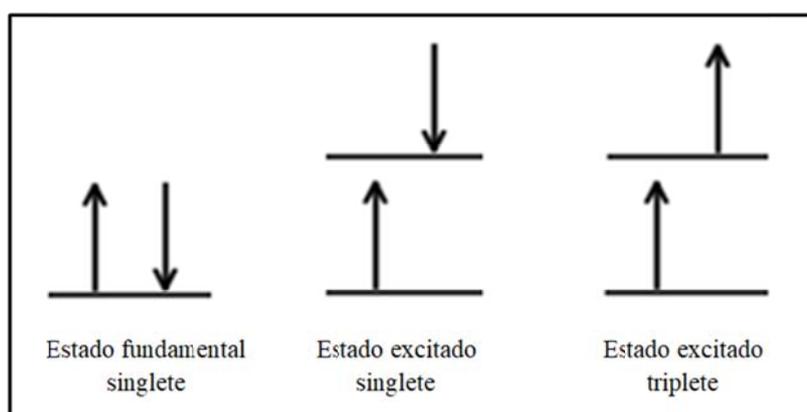
**Figura 2.** Transición de electrones del nivel HOMO al LUMO

Los procesos fotofísicos que ocurren a partir de la absorción de luz por una molécula se pueden detallar gráficamente mediante el diagrama de Jablonski (**Figura 3**). Este diagrama muestra la transición del estado fundamental ( $S_0$ ) a los distintos estados excitados ( $S_n$ ,  $n \geq 1$ ) representados mediante líneas horizontales (en negrita) que indican los distintos niveles electrónicos. Dentro de cada nivel electrónico existen varios estados de energía vibracionales, subdividiéndose estos además en niveles de energía rotacional. Conforme los niveles de energía electrónica se acercan, la superposición de los niveles de energía vibracional aumenta.<sup>5</sup>



**Figura 3.** Diagrama de Jablonski con el detalle de los procesos fotofísicos que se pueden producir a partir de la absorción de luz por una molécula<sup>3</sup>

Estos estados electrónicos excitados se pueden dividir en dos tipos, principalmente: singlete (S) o triplete (T) (**Figura 4**). La diferencia entre ambos es que el estado singlete presenta spines antiparalelos, mientras que el estado triplete, paralelos, siendo la consecuencia de ello una energía menor para el triplete que la de su correspondiente singlete.



**Figura 4.** Representación electrónica del singlete en el estado fundamental, singlete en el estado excitado y triplete en el estado excitado

Cuando una molécula absorbe un fotón se produce el paso de su estado fundamental a un nivel energético electrónico, vibracional o rotacional de un estado excitado  $S_n$ , desde el cual tienen lugar diferentes procesos fotofísicos como la relajación vibracional, conversión interna y/o cruce entre sistemas para llegar a los estados excitados más bajos ( $S_1$  y  $T_1$ ), desde los cuales se

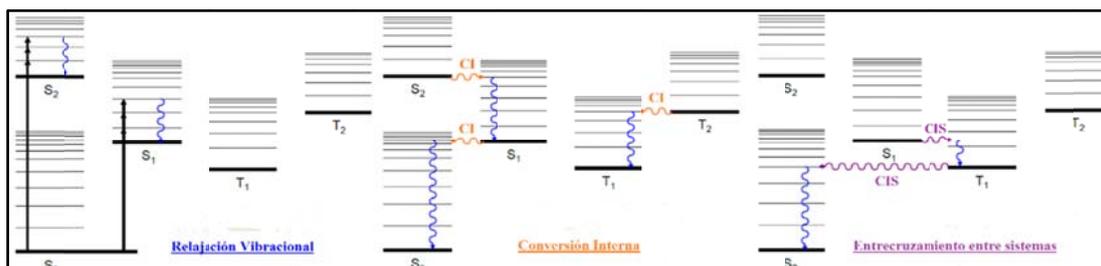
puede producir desactivación radiativa o no radiativa al estado fundamental. A partir de todos estos procesos fotofísicos puede observarse o no, una transformación química de la molécula.

Entre los tipos de procesos fotofísicos se encuentran los procesos radiativos y los no radiativos. La diferencia entre ambos es que los procesos radiativos van acompañados de una emisión de radiación electromagnética cuando las moléculas vuelven a su estado electrónico fundamental, mientras que los no radiativos no se acompañan de ninguna emisión.

En el diagrama de Jablonski (**Figura 3**), las líneas rectas muestran la conversión entre un fotón de luz y la energía de un electrón (proceso radiativo). Las líneas curvas, en cambio, muestran transiciones de electrones sin ninguna interacción con la luz (proceso no radiativo).

Dentro de los procesos no radiativos, se encuentran (**Figura 5**):

- Relajación vibracional: consiste en la transición de un nivel vibracional superior a un nivel de menor energía, dentro del mismo estado electrónico.
- Conversión interna (CI): consiste en un cambio de estado electrónico con menor energía, sin cambio de spin y sin emitir radiación. Por ejemplo, el paso del estado  $S_n$  al  $S_1$  puede darse por conversión interna.
- Entrecruzamiento entre sistemas (CIS): consiste en un proceso de desactivación en el cual la molécula pasa del estado  $S_1$  al  $T_1$ , o del  $T_1$  al  $S_0$ . Se produce un cambio de estado electrónico en el que el spin varía, siendo ambos estados isoenergéticos.



**Figura 5.** Procesos no radiativos

En lo que respecta a los procesos radiativos, destacan los siguientes (**Figura 6**):

- Absorción: se produce cuando la molécula absorbe luz y un electrón pasa de su estado fundamental a un estado excitado superior con la misma multiplicidad. Se produce una transición permitida. Estos estados excitados se caracterizan por su inestabilidad y tiempo de vida corto.
- Fluorescencia: cuando se produce la desactivación del estado electrónico singlete  $S_1$ , desde su nivel vibracional más bajo, al  $S_0$  se da por un proceso de fluorescencia. Consiste en una emisión de radiación UV o visible debida a una transición permitida con conservación de spin.
- Fosforescencia: la desactivación radiativa del estado excitado triplete  $T_1$  al estado fundamental ( $S_0$ ) se da por un proceso de fosforescencia. La diferencia entre este proceso y la fluorescencia, ambos procesos radiativos, es el tiempo de duración de cada proceso. La fluorescencia es un proceso más rápido ya que no conlleva un cambio en la multiplicidad de spin, mientras que la fosforescencia implica la conversión del spin. La emisión de radiación en el caso de la fosforescencia se conoce como una transición prohibida.

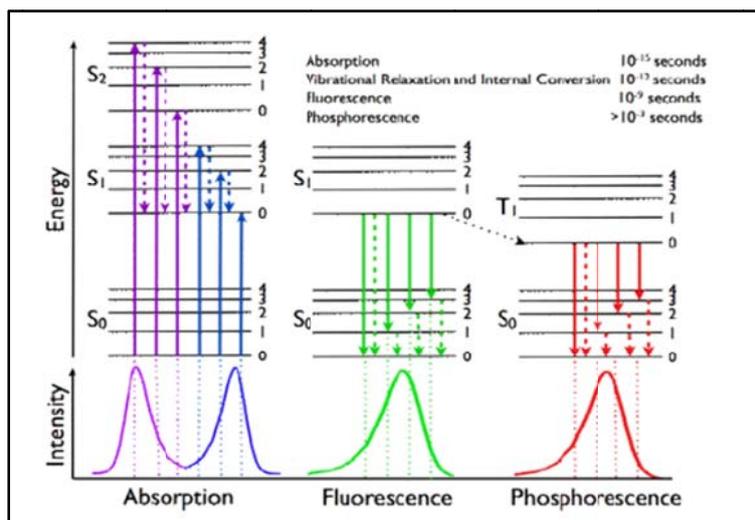


Figura 6. Procesos radiativos (representados con líneas continuas)

### 1.1.1. Otros procesos fotoinducidos

Dentro de los procesos fotoinducidos, cuando coexisten dos o más cromóforos en un mismo medio, que pueden estar unidos o no, y uno de ellos absorbe luz, puede producirse una interacción entre ambos que presenta varias manifestaciones:

- Transferencia de energía (TE): en este proceso fotofísico se diferencian los cromóforos como aceptor (A) y dador (D). La TE se da cuando un cromóforo dador en su estado excitado ( $D^*$ ), cede energía a un cromóforo A que está en un nivel de menor energía. Lo que ocurre en este caso es que el dador se desactivará (D) y el aceptor se activará ( $A^*$ ), pasando a un estado energético superior (**Figura 7**).

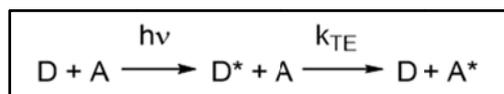


Figura 7. Proceso de transferencia de energía (TE)

El proceso de TE puede ser intramolecular o intermolecular según el dador y aceptor formen parte de una misma molécula o sean dos moléculas distintas, respectivamente.

- Transferencia electrónica (Tel): la Tel es un proceso no radiativo que ocurre cuando se produce la transferencia de un electrón entre una molécula en su estado excitado y otra molécula en su estado fundamental, dando lugar a un radical catión del dador y un radical anión del aceptor (**Figura 8**).

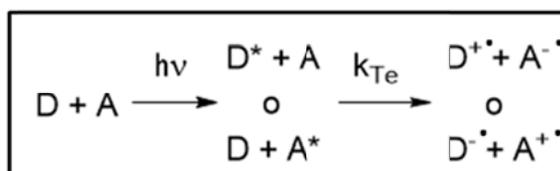


Figura 8. Proceso de transferencia electrónica (Tel)

- Formación de exciplejos y/o excímeros (EX): en el caso de que la transferencia de carga no sea completa se produce la formación de un complejo llamado exciplejo. Un exciplejo tiene carga parcial y un momento dipolar alto. Un excímero es un complejo que se forma entre dos cromóforos idénticos, estando uno en su estado excitado y otro en su estado fundamental (**Figura 9**).

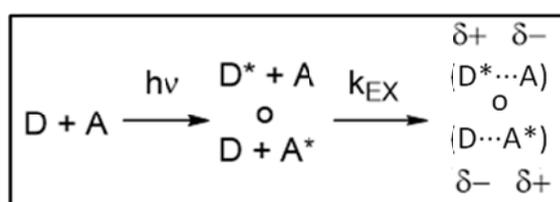


Figura 9. Proceso de formación de exciplejos y/o excímeros

## 1.2. N-ÓXIDOS HETEROCÍCLICOS

Los *N*-óxidos heterocíclicos son compuestos aromáticos cuyo heteroátomo es un nitrógeno al que está unido un oxígeno mediante un enlace sencillo. Este enlace, denominado dativo, da lugar a una separación de carga formal ( $N^+O^-$ ) que es la causa principal de las propiedades físicas y químicas de este tipo de compuestos. El enlace NO está formado por el solapamiento de un par de electrones no enlazantes del nitrógeno y un orbital libre del oxígeno, que es lo que origina la separación de carga formal ya mencionada.

Históricamente, los *N*-óxidos han tenido diferentes utilidades tales como la polimerización fotoinducida, como modelo para la transferencia de oxígeno bioquímico o como intermedios con valor sintético. También se han utilizado como bases de Lewis por su capacidad para coordinarse con metales gracias a las características del enlace  $N^+O^-$ .<sup>6</sup>

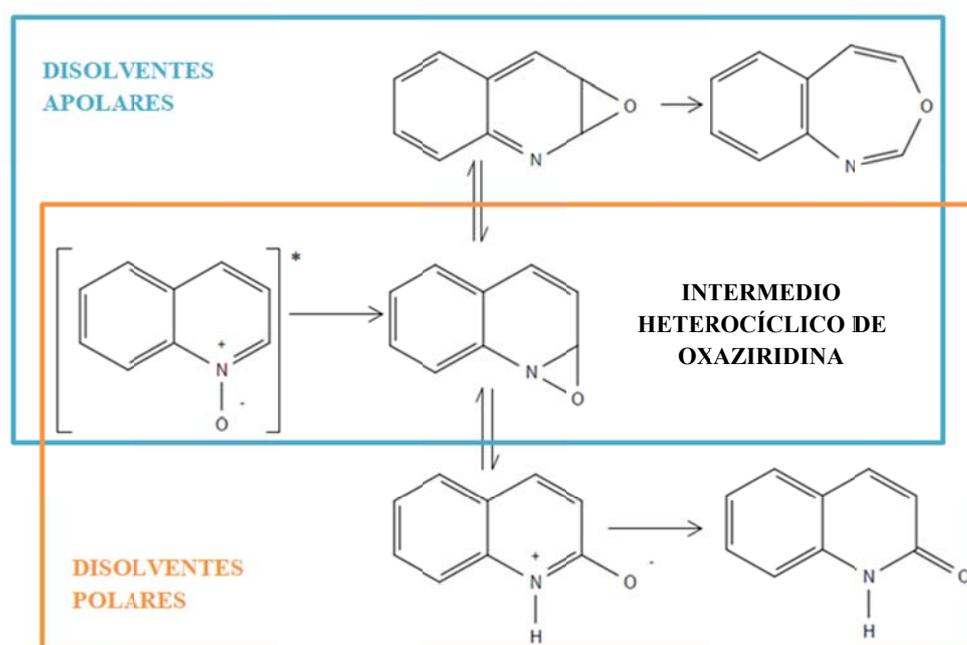
En la actualidad, los estudios e investigaciones en el campo de los *N*-óxidos se centran en su función dentro de sistemas biológicos y su aplicación en la industria farmacéutica para el diseño de nuevos fármacos.

Pero además de estos usos, también son conocidos por sus efectos negativos, principalmente por sus efectos cancerígenos, lo que ha derivado en un especial interés por los procesos fotoquímicos y fotofísicos que experimentan y que conllevan la interacción con sistemas proteicos, fundamento básico de estudio del presente TFG.

### 1.2.1. La fotoquímica de los *N*-óxidos

Los *N*-óxidos heterocíclicos generalmente muestran reactividad fotoquímica con un rendimiento cuántico moderado ( $\Phi \geq 0,1$ ). Además, a principios del siglo XX ya se percibió la fotolabilidad de estos compuestos que absorben la luz solar, aunque la reactividad fotoquímica de los *N*-óxidos heterocíclicos se sospechó por primera vez cuando se descubrió accidentalmente la inestabilidad de unas disoluciones preparadas para caracterización espectroscópica.<sup>7</sup>

Su fotoquímica más común implica la formación de oxaziridinas que pueden dar lugar, por un lado, a la transposición del átomo de oxígeno al carbono contiguo al nitrógeno, o a la expansión del anillo con la introducción del átomo de oxígeno. En ambos casos, la formación de oxaziridinas se produce como paso intermedio previo a la formación de un producto final por transposiciones sigmatrópicas o aperturas electrocíclicas.



**Figura 10.** Fotorreactividad de un *N*-óxido heterocíclico como la quinolina *N*-óxido en diferentes medios

Así, es la polaridad del medio la que determina cuál de los dos procesos es el predominante. La utilización de un disolvente u otro es significativa debido a la polaridad del enlace  $N^+-O^-$  y a la capacidad de formar enlaces de hidrógeno en medios próticos. Por ese motivo, en disolventes apolares se ve favorecida la formación de benzoxazepinas, mientras que en el caso de los disolventes polares, predomina la formación de zwitteriones (**Figura 10**). La formación de la oxaziridina como intermedio carece de evidencias experimentales ya que, por su tiempo de vida tan corto, es muy difícil de detectar.<sup>8</sup>

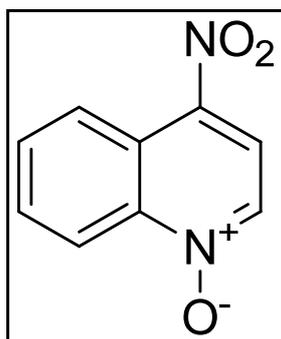
En los estudios realizados en el laboratorio se ha trabajado con disolventes polares, concretamente PBS (Phosphate Buffered Saline Solution), que se trata de una disolución salina de fosfato a pH=7,4 en agua y que simula el entorno celular al tener el mismo pH. Por tanto, la polaridad del medio es significativa para determinar el fotoproducto que predomina.

Además, se conoce una reacción para los *N*-óxidos conocida como desoxigenación fotoquímica. Este proceso se da en menor medida aunque es bastante común. La desoxigenación consiste en

la liberación del átomo de oxígeno unido al nitrógeno (NO), y se da desde un nivel excitado diferente del implicado en la formación de oxaziridinas. Este proceso conlleva la formación de especies reactivas de oxígeno como el oxígeno atómico ( $O(^3P)$ ).<sup>9</sup>

### 1.2.2. 4-Nitroquinolina-N-óxido

El compuesto de estudio en este trabajo fin de grado es la 4-nitroquinolina-N-óxido (NQNO). La 4-nitroquinolina-N-óxido es un compuesto que se sintetizó por primera vez por Ochiai y sus colaboradores al preparar N-óxido de quinolina utilizando peróxido de hidrógeno y añadiéndole posteriormente el grupo nitro.<sup>11-12</sup>



**Figura 11.** Estructura molecular de la 4-nitroquinolina-N-óxido

Los primeros estudios de este compuesto se remontan a 1957 cuando se realizó un experimento con ratones para estudiar la acción carcinogénica del mismo. El equipo de Ochiai aplicó en la piel de los ratones la NQNO a través de una solución de benceno al 0,25%. Entre los 80 y 140 días después de la aplicación, todos los ratones tenían papilomas, y entre los días 120 y 200, los papilomas derivaron en tumores, de los cuales el 36% eran malignos. En unos pocos casos el estudio derivó en metástasis.<sup>12</sup>

Esta fue la primera ocasión en la que se probó la carcinogenicidad de la NQNO. Hasta el momento los estudios de quinolinas en esta línea se referían únicamente a derivados heterocíclicos como la  $\beta$ -antraquinolina, 5,6-benzoquinolina y derivados de naftoquinolina, pero ninguno de ellos presentó ningún signo de carcinogenicidad.<sup>11</sup>

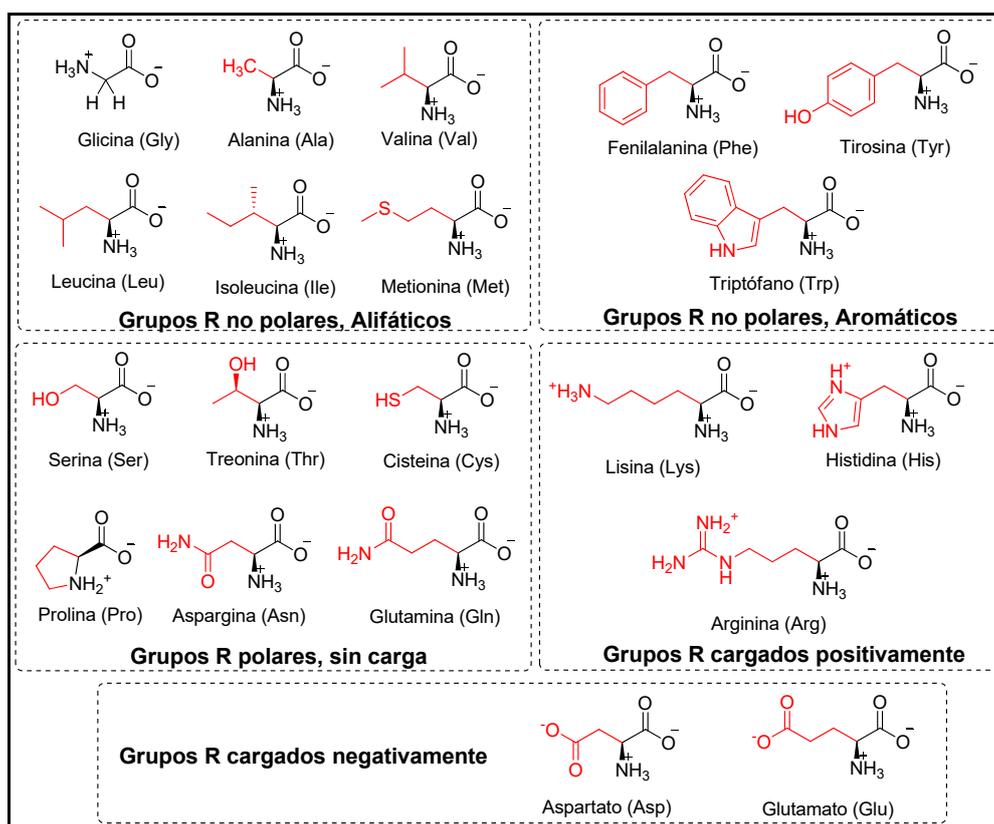
La acción carcinogénica de la NQNO que se había demostrado en este experimento tuvo especial interés por varias razones. En primer lugar, porque por primera vez se introdujo un compuesto bicíclico en las familias de los carcinógenos más potentes. El hecho de que la potencia carcinogénica de la NQNO fuera del mismo orden de magnitud del 1, 2, 5, 6-dibenzantraceno planteó la posibilidad de que en los derivados de la NQNO se pudiese descubrir un carcinógeno más fuerte todavía. En segundo lugar, también se atribuyó el efecto carcinogénico al sustituyente nitro de esta clase de compuestos.<sup>11</sup>

La interacción de la NQNO con biomoléculas como ADN y proteínas, se explica por la capacidad electrofílica del anillo de quinolina, que se ve acentuada por el efecto electrón-atractor del sustituyente nitro en la posición 4 del anillo de quinolina N-óxido. Esto permite formar complejos de transferencia de carga con el ADN, por ejemplo.<sup>10</sup>

Se sabe también que la NQNO en su estado excitado triplete es mejor electrófilo que en su estado fundamental, favoreciendo la interacción con biomoléculas (ADN y proteínas) como aceptor de electrones. Este estado ha sido más estudiado que el estado singlete, siendo que la fotofísica de la NQNO no está caracterizada completamente.<sup>13</sup>

### 1.3. AMINOÁCIDOS Y PROTEÍNAS

Los aminoácidos son moléculas orgánicas pequeñas que contienen un grupo amino ( $-NH_2$ ) y un grupo carboxilo ( $-COOH$ ). Estos grupos están unidos al mismo átomo de carbono, el carbono  $\alpha$ , por lo que se les denomina  $\alpha$ -aminoácidos. Los  $\alpha$ -aminoácidos son los monómeros de las proteínas, ya que las proteínas están formadas por una o más cadenas lineales de aminoácidos que se unen a través de enlaces peptídicos, formando los polipéptidos. Además, al carbono  $\alpha$  se une otro sustituyente con tamaño y características diversas que es el que diferencia a cada aminoácido de los demás. Este sustituyente se denomina cadena lateral del aminoácido y sus propiedades son las que determinan el comportamiento químico de cada aminoácido. Para la formación de las proteínas solo se utilizan 20 aminoácidos diferentes (**Figura 12**).<sup>14-15</sup>



**Figura 12.** Estructuras químicas de los 20 aminoácidos que forman las proteínas

Los enlaces peptídicos son enlaces covalentes que se forman en una reacción de síntesis de proteínas por condensación entre dos aminoácidos. Durante la síntesis de proteínas, el grupo carboxílico al final de la cadena polipeptídica en crecimiento, se une con el grupo amino primario del aminoácido entrante, liberándose una molécula de agua y dando lugar a un grupo amida por la formación de un nuevo enlace denominado enlace peptídico (**Figura 13**).

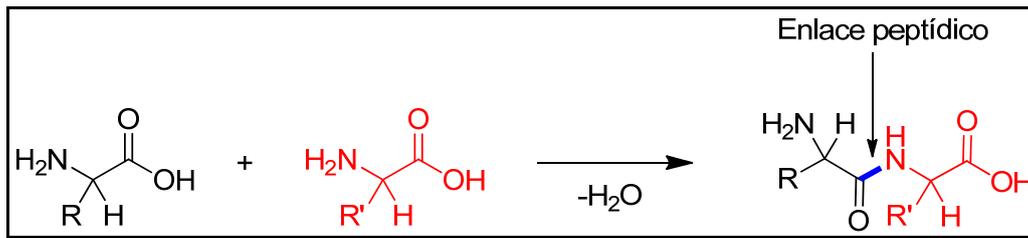


Figura 13. Formación del enlace peptídico en la síntesis de proteínas

Al unirse dos o más aminoácidos queda un extremo denominado amino terminal y otro con un grupo carboxílico terminal.

Como ya se ha explicado, las proteínas son polímeros de aminoácidos, por lo que se consideran macromoléculas, ya que son moléculas relativamente grandes. El orden de unión de los aminoácidos es lo que determina la estructura tridimensional de las proteínas y sus sitios de unión o centros activos. Generalmente, la mayoría de las proteínas tienen entre 80 y 300 aminoácidos por subunidad proteica.<sup>15</sup>

En las proteínas se distinguen cuatro estructuras principales: primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria<sup>16</sup>:

- Estructura primaria: es la secuencia de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos.
- Estructura secundaria: este tipo de estructura se produce cuando los aminoácidos de los polipéptidos se unen entre sí, además, por enlaces de hidrógeno o con otra cadena polipeptídica. Dentro de la estructura secundaria se distinguen la hélice alfa, la hoja plegada beta y la triple hélice.
- Estructura terciaria: se origina cuando se producen interacciones entre diferentes zonas de la cadena polipeptídica, esto conlleva que algunos fragmentos de la misma se retuerzan y se plieguen, adquiriendo la proteína una estructura tridimensional.
- Estructura cuaternaria: es el nombre que se le da a una proteína (biológicamente activa) que está formada por dos o más subunidades polipeptídicas.

Las proteínas son unas de las macromoléculas orgánicas más abundantes en los seres vivos y cada proteína tiene una función única, controlando una gran cantidad de procesos vitales. La forma de una proteína es esencial para la función que desempeñe en el organismo y, por ejemplo, cambios en la temperatura, el pH o la presencia de sustancias químicas, pueden alterar su forma y provocar que pierda su funcionalidad, lo que se conoce como desnaturalización de una proteína, debido a la pérdida de la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria.<sup>15</sup>

Las proteínas en las que se han basado los estudios realizados en este trabajo son las albúminas séricas humana (ASH) y bovina (ASB). De estas se tiene información de su estructura primaria, secundaria y terciaria, además de su función fisiológica y las moléculas con las que son capaces de interactuar, generalmente, por fuerzas iónicas, enlaces de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals. La albúmina sérica es una proteína secretada por el hígado, circula por la sangre y ayuda a mantener la presión osmótica en la misma. Su concentración en sangre se encuentra entre 3,5 y 5 g/dL, lo que significa más de la mitad del contenido del plasma sanguíneo.<sup>17</sup>

La elección de las albúminas séricas como proteínas para el estudio de la interacción fármaco-biomolécula es porque son proteínas transportadoras que forman parte del tipo de proteínas llamadas dianas farmacológicas, ya que interaccionan con diversos sustratos para su distribución plasmática.

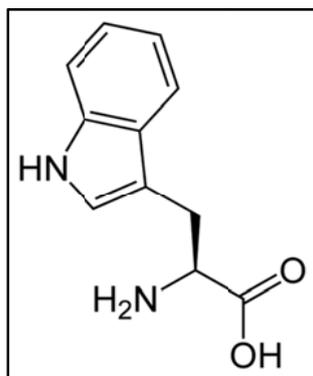
### 1.3.1. L-Triptófano (Trp)

El triptófano, con fórmula molecular  $C_{11}H_{12}N_2O_2$  y una masa molecular de 204,23 g/mol, es un aminoácido esencial que el cuerpo no puede sintetizar y por tanto, se tiene que conseguir a través de la alimentación.

El triptófano es una molécula quiral y de sus dos estereoisómeros, es el L-Trp el que forma parte de las proteínas.

El organismo utiliza el triptófano principalmente para producir serotonina, que es un neurotransmisor, es decir, una sustancia química que permite la comunicación entre neuronas. La serotonina modula procesos como el estado de ánimo, procesos conductuales, el apetito, la memoria y la atención, entre otros.<sup>18</sup>

El triptófano es un aminoácido aromático, cuyos anillos se pueden sintetizar a partir de precursores alifáticos. El anillo aromático (indol) del Trp está unido al aminoácido a través de un carbono metilénico (**Figura 14**).



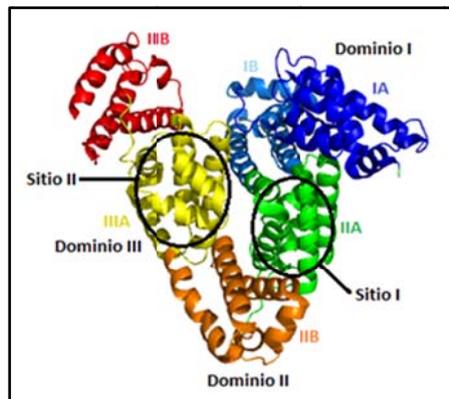
**Figura 14.** Fórmula molecular del L-Triptófano

En cuanto a algunas de las características fotofísicas conocidas del L-Triptófano, se sabe que este aminoácido presenta un máximo de absorción de luz UVB entorno a los 280 nm y un máximo de emisión por fluorescencia alrededor de los 330 nm (dependiendo del disolvente utilizado).

### 1.3.2. Albumina Sérica Humana (ASH)

La albúmina sérica humana es la proteína más abundante en la sangre (con una concentración entre 3,5 y 5 g/dL), concretamente constituye el 60% de todas las proteínas de la sangre. Tiene una masa molecular de 66500 Da y se conoce su estructura primaria (secuencia de aminoácidos), formada por 585 aminoácidos. En su estructura existen 17 puentes disulfuro, un tiol libre y un único residuo de triptófano (Trp) en el aminoácido 214.<sup>17</sup>

La albúmina sérica humana presenta varios sitios de unión potencialmente accesibles para los sustratos, pero hay dos centros activos en su estructura (Sitio I y Sitio II) que la definen según se observa en su estructura terciaria de la **Figura 15**. En el Sitio I se dan interacciones hidrofóbicas, presenta un residuo de triptófano y es el sitio de unión de la Warfarina. Mientras que en el Sitio II, la cavidad es más pequeña, contiene un residuo del aminoácido tirosina y es el sitio de unión del Ibuprofeno.



**Figura 15.** Estructura terciaria de la proteína ASH

La albúmina sérica humana se encuentra en el grupo de las proteínas transportadoras que, como se ha dicho, pueden interactuar con diferentes sustratos para su distribución plasmática. La interacción se puede producir por fuerzas iónicas, enlaces de hidrógeno y/o fuerzas de Van der Waals.

Según análisis cristalográficos de rayos X de la ASH, la cadena polipeptídica se dobla formando una hélice de dimensiones aproximadas de 80 x 80 x 30 Å, con cerca del 67% de  $\alpha$ -hélice, un 10% de lámina- $\beta$  y un 23% de cadena extendida. Así, su estructura secundaria y terciaria es conocida ya que ha sido caracterizada mediante difracción de rayos X de los cristales de albúmina sérica humana.

En la estructura terciaria de la ASH se encuentran los dos sitios de unión mencionados anteriormente (**Figura 15**) y a partir de los cuales se puede observar la interacción de la proteína tanto con moléculas endógenas (biomoléculas) como exógenas (fármacos).<sup>7</sup> Dicha interacción se detecta a través de la emisión del aminoácido Trp ya que al irradiar la proteína (a 295 nm) todos los aminoácidos aromáticos que absorben radiación, experimentarán transferencia de energía al nivel energético  $S_1$  del Trp por ser el más bajo en energía. Es en el Sitio I (de carácter hidrofóbico) donde la proteína presenta un residuo de triptófano (Trp), de carácter nucleofílico, y donde se sospecha que interactuará la ASH a través de este aminoácido con el fármaco en cuestión (NQNO), con marcado carácter electrófilo.

### 1.3.3. Albúmina Sérica Bovina (ASB)

La albúmina sérica bovina, tiene una masa molecular de 66382 Da, y también se conoce su estructura primaria, con un total de 583 aminoácidos, así como sus estructuras secundaria y terciaria por estudios cristalográficos de difracción de rayos X (**Figura 16**).



**Figura 16.** Estructura terciaria de la proteína ASB<sup>15</sup>

La ASB es una de las proteínas más estudiadas en investigación bioquímica. Su secuencia es similar a la de la ASH en un 76%, diferenciándose la una de la otra en el número de residuos de triptófano que presentan. A diferencia de la ASH, la ASB cuenta con dos residuos de triptófano. Uno de ellos se encuentra en el aminoácido 213 y el otro en el 134. También cabe destacar que la ASB presenta 7 residuos de tirosina (Tyr), próximos al Trp-134, mientras que el Trp de la ASH, no contiene ninguno. Esta diferencia en cuanto al mayor número de residuos de Trp y grupos aromáticos se refleja en una mayor intensidad de absorbancia a 295 nm para la proteína ASB comparándola con la de la ASH, así como en unos mayores rendimientos de emisión de fluorescencia.<sup>19</sup>

## 2. OBJETIVOS

---

Tras conocer la acción carcinogénica del *N*-óxido heterocíclico, 4-nitroquinolina-*N*-óxido (NQNO), se buscará caracterizar la interacción de dicho fármaco con el aminoácido L-Triptófano tanto a nivel monomérico como formando parte de la macroestructura de la proteína transportadora albúmina sérica (en sus variantes humana y bovina).

Este estudio se realizará mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas de absorción y emisión en estado estacionario y con resolución temporal para profundizar en la fotofísica tanto de los compuestos por separado como de las disoluciones de NQNO con los distintos aminoácidos y proteínas, observando y analizando la influencia de la concentración en las disoluciones.

Se determinará el tiempo de vida de fluorescencia para mezclas de NQNO con las distintas proteínas y en diferentes concentraciones con el objetivo de caracterizar la interacción entre ellos.

Además, se procederá a la irradiación de las muestras en fotorreactor a 355 nm para estudiar la fotoquímica de los compuestos en el rango de luz UV-visible y así poder confirmar la interacción y los posibles fotoproductos derivados de la misma.

Se aplicarán técnicas de filtración a través del gel Sephadex<sup>®</sup> para detectar la posible unión fotoinducida fármaco-proteína.

Los diferentes experimentos se realizarán para mezclas de 4-nitroquinolina-*N*-óxido (NQNO) con L-Triptófano (Trp), y con proteínas transportadoras albúmina sérica humana (ASH) y albúmina sérica bovina (ASB).

### 3. EQUIPOS, INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS

---

#### 3.1. ESPECTROFOTÓMETRO UV-Vis

La espectrofotometría ultravioleta-visible utiliza la luz en los rangos visible y adyacentes, es decir, el ultravioleta (UV) cercano y el infrarrojo (IR) cercano. El espectrofotómetro UV-Vis considera la intensidad de luz que pasa a través de una muestra comparándola con la intensidad de luz antes de pasar a través de la muestra, para generar como resultado la luz absorbida por la muestra que se traduce en su espectro de absorción.<sup>20</sup>

Un equipo de espectrometría UV-Vis (**Figura 17**) consta principalmente de una fuente de luz, que es diferente en función del rango del espectro en que se trabaje. Por ejemplo, para longitudes de onda visibles se utiliza una bombilla incandescente, en cambio, para el rango del ultravioleta, una lámpara de arco de deuterio. Además, en el interior existe un soporte para la muestra, una rejilla de difracción para separar las longitudes de onda y un detector.

El equipo utilizado en el laboratorio es un espectrofotómetro UV-Vis JASCO V-650 (**Figura 17**). Este equipo es de doble haz, lo que significa que la luz, antes de llegar a la muestra, se divide en dos haces. Uno de ellos actúa como referencia mientras que el otro atraviesa la muestra.



**Figura 17.** Espectrofotómetro UV-Vis JASCO V-650

La muestra se introduce disuelta en una cubeta de cuarzo de 1x1 cm, donde la anchura de la cubeta se corresponde con el parámetro **L** (paso óptico de la celda) de la ecuación de Beer-Lambert:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot L \quad \text{Ecuación 3}$$

En la que, además:

**c**, es la concentración de la especie que absorbe luz, con unidades de mol/L.

$\epsilon$ , es un valor constante conocido como coeficiente de extinción, propio de cada compuesto para un disolvente dado.

$A$ , es la absorción que presenta la muestra medida y el valor que se representa frente a la longitud de onda para dar lugar al espectro de absorción de una muestra en disolución (resultado que se extrae de un espectrofotómetro UV-Vis).

### 3.2. ESPECTROFLUORÍMETRO DE ESTADO ESTACIONARIO

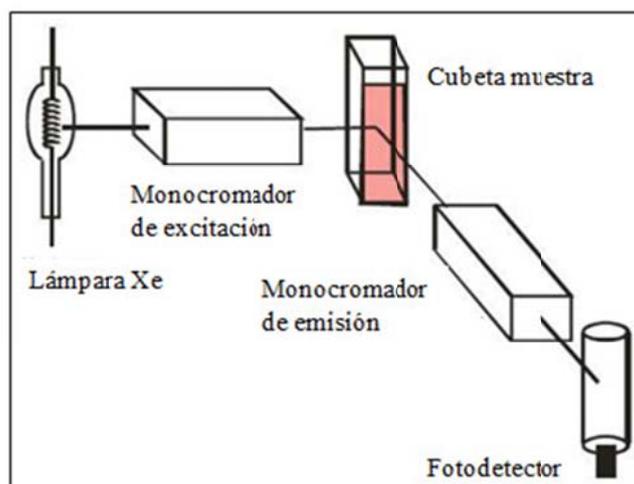
La espectrofluorimetría es un tipo de espectroscopía que analiza la fluorescencia de una muestra dando como resultado el espectro de emisión de dicha muestra. En este caso se utiliza luz, generalmente ultravioleta, que excita los electrones de las moléculas de la muestra mediante la absorción de un fotón de luz desde su estado electrónico basal a uno de los estados electrónicos y vibracionales excitados. Esto provoca colisiones con otras moléculas que contribuyen a que la molécula excitada pierda energía vibracional, lo que provoca una emisión de luz de menor energía, emitiendo un fotón en el proceso. La emisión de fluorescencia siempre se produce desde el estado excitado singlete de menor energía ( $S_1$ ) de la molécula irradiada, hasta su estado fundamental ( $S_0$ ).

Mediante la utilización del espectrofluorímetro (**Figura 18**) se puede obtener tanto el espectro de emisión de una muestra como su espectro de excitación.



**Figura 18.** Espectrofluorímetro JASCO FP-8500

En un espectrofluorímetro (**Figura 19**) la luz de una fuente de excitación pasa a través del monocromador (selección de la longitud de onda o intervalo de excitación) e incide sobre la muestra. Parte de esa luz es absorbida por la muestra (según el valor de  $A$  de la muestra) haciendo que algunas de las moléculas se exciten promoviendo a un estado excitado superior en energía y posteriormente produciendo una emisión radiativa (fluorescencia) al recuperar su estado fundamental.



**Figura 19.** Esquema simplificado de un espectrofluorímetro

Las medidas de las muestras se realizan utilizando cubetas de cuarzo de 1x1 cm, siendo la detección de la emisión perpendicular a la dirección de incidencia del haz de irradiación sobre la muestra. La radiación emitida por la muestra también pasa a través de un monocromador antes de llegar al fotodetector.

Los monocromadores mencionados utilizan un retículo de difracción que consiste en una rejilla que permite cambiar el ángulo de salida de la luz, ajustando, por tanto, una longitud de onda u otra.

Los datos recogidos en el detector son traducidos, finalmente, en un espectro de emisión ( $\text{Intensidad} = f(\lambda)$ ) para la muestra estudiada.

En el laboratorio se utiliza un espectrofluorímetro JASCO FP-8500, con lámpara de arco de xenón y con un rango de longitudes de onda de 200 nm a 750 nm.

### 3.3. ESPECTROFLUORÍMETRO DE TIEMPO RESUELTO

El espectrofluorímetro de tiempo resuelto utilizado mide el tiempo de vida en una escala de nanosegundos, del estado excitado singlete, de una determinada muestra. El tiempo de vida depende del tiempo promedio que permanece la molécula en su estado excitado antes de emitir un fotón. Por ello si la única desactivación que sufre el singlete es radiativa (lo que es muy común), su tiempo de vida se conoce como el tiempo de emisión de fluorescencia.

Los tiempos de vida de desactivación del estado excitado oscilan entre 0,5 y 20 nanosegundos para compuestos que emiten fotones con energías desde el UV hasta el infrarrojo cercano.

En el laboratorio se utilizó un espectrofluorímetro de tiempo resuelto EasyLife X con un detector PTI de resolución temporal en escala de nanosegundos, lámparas LED de diferentes longitudes de onda para la excitación y filtros para limitar las emisiones que presentarán longitudes de onda mayores que las de excitación, ya que la emisión siempre es menos energética que la excitación (**Figura 20**).



**Figura 20.** Espectrofluorímetro de tiempo resuelto EasyLife X (Optical Building Blocks)

### 3.4. FOTORREACTOR

El fotorreactor, también conocido como cámara de irradiación, es un equipo que dispone de una cámara para irradiar muestras líquidas, con 10 lámparas fluorescentes laterales (**Figura 21 y Figura 22**).

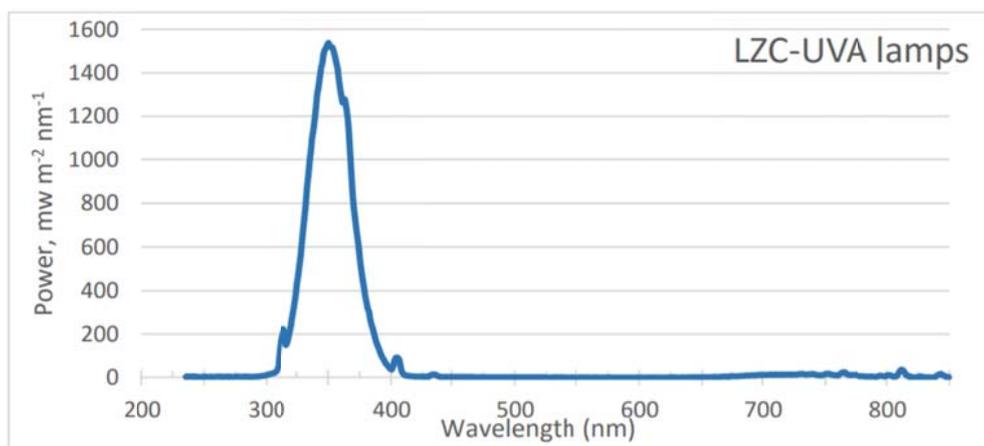


**Figura 21.** Cámara de irradiación LuzChem



**Figura 22.** Cámara de irradiación LuzChem con 10 lámparas de  $\lambda = 355$  nm

El equipo utilizado es una cámara de irradiación LuzChem con 10 lámparas de deuterio que emiten una longitud de onda centrada en 355 nm. El espectro de emisión de dichas lámparas se muestra en la **Figura 23**.



**Figura 23.** Espectro de emisión de las lámparas de deuterio utilizadas en el fotorreactor, proporcionado por el catálogo del fabricante

Las muestras se introducen en el fotorreactor dentro de una cubeta de cuarzo de 1x1 cm que se cubre con un recipiente de Pyrex que actúa como filtro sin dejar pasar las longitudes de onda por debajo de 290 nm.

### 3.5. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

La cromatografía líquida es una técnica de separación e identificación que consiste en una fase móvil (líquida) que se desplaza a través de una columna que contiene la fase estacionaria. La cromatografía HPLC puede separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles y muchos otros grupos de peso molecular elevado.

La separación se produce por las diferentes interacciones químicas entre las sustancias analizadas y su reparto entre las fases móvil y estacionaria que componen el sistema.

La muestra se introduce en pequeñas cantidades (20  $\mu$ L) en la columna y los distintos componentes se desplazan a velocidades diferentes dependiendo de su retención en la fase estacionaria. Para la separación de los compuestos utilizados en este trabajo se utilizaron disolventes como el agua, el metanol y el acetonitrilo.

Una vez encontrada la fase móvil más adecuada para la separación de los componentes de la muestra, se identifican y/o caracterizan a través de su espectro de absorción UV-Vis que proporciona el equipo, para cada uno de los picos observados en el cromatograma resultante.

En el laboratorio se utilizó un 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 (**Figura 24**).



**Figura 24.** Equipo de cromatografía líquida HPLC

### 3.6. INSTRUMENTACIÓN

La instrumentación utilizada durante la realización del trabajo engloba todo aquel material, de un solo uso o de uso prolongado que ha sido necesario para llevar a cabo los experimentos. Se divide en material fungible y material no fungible.

La totalidad del material utilizado se detalla en el presupuesto, asignándole el precio correspondiente a cada ítem.

Algunos ejemplos del material de laboratorio empleado se muestran en las **Figuras 25-32**:

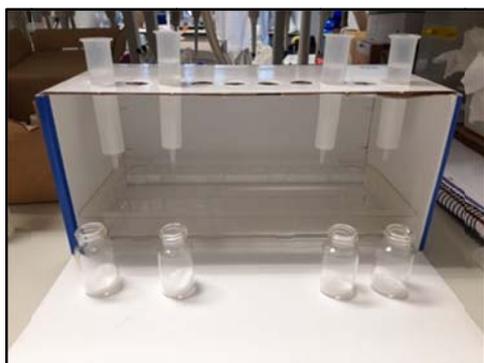
#### - Material fungible



**Figura 25.** Puntas de pipeta



**Figura 26.** Pipetas Pasteur



**Figura 27.** Filtros Sephadex®



**Figura 28.** Viales transparentes con tapón

- **Material no fungible**



**Figura 29.** Micropipetas de volumen variable



**Figura 30.** Cubeta de cuarzo



**Figura 31.** Bata de laboratorio

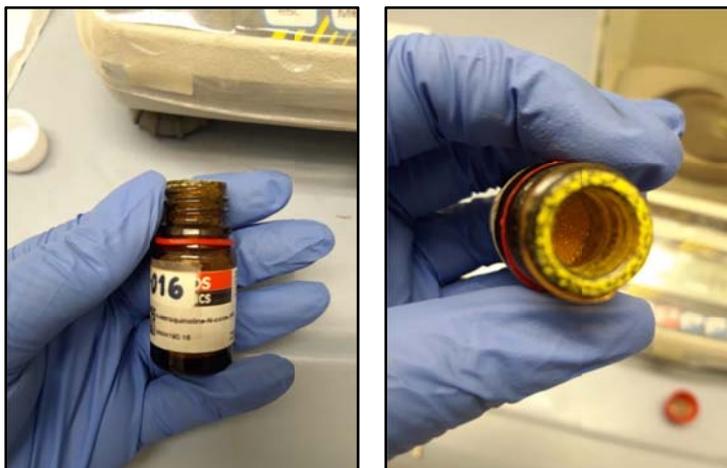


**Figura 32.** Vasos de precipitados

### 3.7. REACTIVOS Y DISOLVENTES

En lo que respecta a los reactivos y disolventes utilizados durante toda la fase experimental del proyecto, se especifican las cantidades y precios más detalladamente en el presupuesto.

Como ya se ha explicado, se ha trabajado con la 4-nitroquinolina *N*-óxido (NQNO) (**Figura 33**) como fármaco. Y se ha estudiado la interacción de la misma con diferentes biomoléculas: dos proteínas, las albúminas séricas humana (ASH) y bovina (ASB) y el aminoácido L-Triptófano (Trp), concretamente el hidrocloreto de L-Triptófano metiléster al 98%.



**Figura 33.** 4-Nitroquinolina *N*-óxido 98%

Para preparar las disoluciones se utilizó PBS (Phosphate Buffered Saline Solution, con pH=7,4) como disolvente. Este disolvente se preparó con una tableta de tampón salino de fosfato y 200 mL de agua ultrapura Milli-Q. El agua Milli-Q es un agua filtrada y purificada por ósmosis inversa, disponible en el departamento de química.

En la preparación de la disolución madre de NQNO, conservada durante toda la duración de la parte experimental en el frigorífico, se utilizó como disolvente PBS.

Para la realización de la filtración en gel Sephadex<sup>®</sup> que se explicará en el apartado 4.4., se utilizó cloruro de guanidinio, que es un agente que desnatura la proteína rompiendo todas las interacciones excepto las covalentes, quedando únicamente la estructura primaria de la proteína.

Un disolvente adicional que se utilizó en la fase experimental fue el acetonitrilo, necesario para la elución del fotoproducto de la NQNO en la técnica de separación e identificación por HPLC.

Todos los reactivos y disolventes fueron suministrados por la casa comercial Sigma-Aldrich.

## 4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

---

### 4.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

Para la realización del estudio de caracterización de la interacción entre la NQNO y las diferentes biomoléculas, se emplearon una serie de disoluciones en función del aspecto a estudiar en cada momento. Para ello, se va a explicar el procedimiento de preparación de las distintas disoluciones según su uso.

#### 4.1.1. Disoluciones madre

Una disolución madre es una disolución con una concentración determinada, a partir de la cual se van a preparar todas aquellas muestras que se requieran a lo largo del trabajo.

En este caso, tanto para el N-óxido en cuestión, NQNO, como para las proteínas y el aminoácido, se utilizaron unas disoluciones madre con una concentración de  $10^{-3}$  M, a partir de las cuales se prepararon todas las muestras necesarias tomando diferentes alícuotas de las mismas.

Para la preparación de la disolución madre de la NQNO, se parte del compuesto en estado sólido, por lo que se debe pesar una cantidad determinada en función del volumen de disolución que se quiera preparar.

Para conocer la cantidad de producto que se necesita pesar, se utiliza la **Ecuación 5**, obtenida a partir del desarrollo de la siguiente expresión general (**Ecuación 4**):

$$[C]_F \cdot V_F = \frac{m_{NQNO}/1000}{M_r} \cdot \frac{\% \text{ pureza}}{100} = n_F \quad \text{Ecuación 4}$$

$$[C]_F \cdot V_F \cdot 1000 \cdot \frac{100}{\% \text{ pureza}} \cdot M_r = m_{NQNO} \text{ (en mg)} \quad \text{Ecuación 5}$$

Dónde:

$n_F$ , son los moles que tiene que haber del compuesto en la disolución final.

$[C]_F$  es la concentración que tendrá la disolución final, en mol/L.

$V_F$  es el volumen de disolución que se quiere preparar, en L.

**% pureza** es el grado de pureza del compuesto.

$M_r$  es la masa molecular del compuesto, en g/mol.

Además, se multiplica por 1000 para obtener el resultado final en mg.

Una vez conocida la cantidad que se debe pesar de NQNO, se añadió el volumen correspondiente de PBS, que fue el disolvente utilizado.

El PBS (Phosphate Buffered Saline Solution), es una disolución salina de tampón fosfato a pH=7,4 en agua que simula el entorno celular, por lo que se añadió el volumen necesario de PBS para tener el volumen final de disolución deseado.

En el caso de la NQNO, la cantidad de disolución que se preparó se pudo utilizar en los distintos experimentos, porque se almacenaba en la nevera para evitar su posible degradación. En cambio, tanto para las proteínas como para el aminoácido utilizado, se preparó la cantidad necesaria para cada experimento, ya que con el paso de los días, es posible que se degradaran y no resultaran representativos los datos obtenidos en las mediciones.

#### 4.1.2. Disoluciones para la caracterización fotofísica y la medición del tiempo de vida de fluorescencia

En primer lugar, se realizó la caracterización fotofísica y la determinación del tiempo de vida de fluorescencia, y en este caso, se necesitaron varias muestras de NQNO con proteína o aminoácido incrementando las cantidades de NQNO en las distintas disoluciones preparadas. De esta forma, se obtuvieron 7 muestras con diferentes relaciones de concentración: 1:0,25 eq; 1:0,5 eq; 1:1 eq; 1:2 eq; 1:5 eq; 1:10 eq y 1:20 eq.

En la **Figura 34** se muestra un ejemplo de la batería de disoluciones que se necesitaron preparar para obtener todas las mezclas indicadas.



**Figura 34.** Batería de disoluciones con diferentes concentraciones

En este caso, para preparar estas mezclas, se partió de las disoluciones madre, tomándose la alícuota necesaria para llevar cada compuesto a la disolución que se requiere. Teniendo en cuenta que un equivalente se corresponde con una concentración de  $2 \times 10^{-5}$  M en el caso del Trp y de  $5 \times 10^{-5}$  M en el caso de la ASH y la ASB. Para calcular los volúmenes de alícuota necesarios se emplearon las siguientes expresiones (**Ecuaciones 6-8**):

$$n_F = n_0 \quad \text{Ecuación 6}$$

$$[C]_F \cdot V_F = [C]_0 \cdot V_0 \quad \text{Ecuación 7}$$

$$10^{-3} M \cdot \frac{x \text{ mL}}{V_F} = [C]_F \quad \text{Ecuación 8}$$

En donde  $n$  son los moles de cada compuesto necesarios para preparar la disolución, siendo  $n_0$  los que se cogen de la disolución madre y  $n_F$  los mismos que estarán presentes en la disolución final. Los subíndices 0 y F hacen referencia a la situación en la disolución madre o en la disolución final, respectivamente.

En la **Ecuación 8**, el término  $x$  indica la alícuota que se deberá tomar de la disolución madre ( $[C]_0=10^{-3} M$ ) para preparar una disolución con una concentración determinada ( $[C]_F$ ), y un volumen fijado ( $V_F$ ).

Por ejemplo, para preparar 6 mL de una disolución de NQNO:ASH (1:2 eq), se necesitarán los siguientes volúmenes de las disoluciones madre de NQNO y de ASH, así como de la disolución de PBS:

$$10^{-3} M \cdot \frac{x \text{ mL}}{6 \text{ mL}} = 2 \cdot 10^{-5} M \rightarrow V_{NQNO} = x = 0,12 \text{ mL} = 120 \mu\text{L}$$

$$10^{-3} M \cdot \frac{x \text{ mL}}{6 \text{ mL}} = 4 \cdot 10^{-5} M \rightarrow V_{ASH} = x = 0,24 \text{ mL} = 240 \mu\text{L}$$

$$V_{PBS} = 6 \text{ mL} - V_{NQNO} - V_{ASH} = 6 - 0,12 - 0,24 = 5,64 \text{ mL}$$

#### 4.1.3. Disoluciones para el estudio de la fotorreactividad de la NQNO

Siguiendo el orden de los experimentos a realizar para estudiar la fotorreactividad, en primer lugar fue necesario determinar el tiempo óptimo de irradiación. Para ello, se preparó una disolución de NQNO con la respectiva proteína o aminoácido con una relación en equivalentes (eq) de 1:2.

Un equivalente de NQNO se corresponde con una concentración de  $2 \times 10^{-5} M$ , por lo que la relación 1:2 eq indica que la concentración de NQNO será de  $2 \times 10^{-5} M$ , mientras que la de la proteína o el aminoácido será de  $4 \times 10^{-5} M$ .

Después de analizar la estabilidad de las disoluciones, se estableció que las disoluciones de NQNO con L-Triptófano se podrían utilizar en el momento de prepararlas. En cambio, las disoluciones con proteína se debían dejar durante toda la noche en nevera para asegurar unos buenos resultados, por lo que se prepararon el día anterior a las mediciones correspondientes.

Y de forma análoga a los experimentos anteriores, se calcularon las distintas alícuotas empleando la **Ecuación 8**.

#### 4.1.4. Disoluciones para la filtración en gel Sephadex<sup>®</sup>

Una vez estudiada la fotorreactividad de la NQNO en presencia de Trp y proteínas, se procedió a realizar el experimento con gel Sephadex<sup>®</sup>.

Para este experimento se prepararon dos disoluciones. Una de ellas fue una disolución de NQNO con proteína en una relación 1:2 de concentración, de la misma forma que se ha explicado para el experimento de estudio de la fotorreactividad de la NQNO. La otra disolución fue únicamente de 2 eq de proteína, es decir, una disolución de la biomolécula con una concentración de  $4 \times 10^{-5}$  M.

## 4.2. INTERACCIÓN NQNO:PROTEÍNA/AMINOÁCIDO

### 4.2.1. Medidas en estado estacionario

Para estudiar la interacción de la 4-nitroquinolina *N*-óxido (NQNO) con la proteína (ASH, ASB) o el aminoácido (Trp) correspondiente, se prepararon disoluciones con cantidad fija de proteína o aminoácido y cantidades crecientes del fármaco. Para ello, se fijó una concentración de  $2 \times 10^{-5}$  M para el Trp y  $5 \times 10^{-5}$  M tanto para la ASH como para la ASB y se iba incrementando la concentración de NQNO. Como disolvente se utilizó PBS.

Así, se obtuvieron siete muestras de cada mezcla y se midió su absorbancia con el espectrofotómetro UV-Vis y su fluorescencia con el espectrofluorímetro.

Para ambas mediciones se siguió el mismo procedimiento. En primer lugar se depositaron 3 mL de la muestra en una cubeta de cuarzo de 1x1 cm y se introdujo la cubeta en el espectrofotómetro o en el espectrofluorímetro, se fijaron los parámetros deseados y se inició la medición.

En el espectrofotómetro UV-Vis se estableció un rango de medida de 220 nm a 550 nm para el registro del espectro de absorción. En el espectrofluorímetro, en cambio, el rango de medida para fijar la longitud de onda de excitación, viene definido en función del máximo de absorbancia obtenido en el UV-Vis. Dicho valor se fijó y el rango de medida de la emisión producida comenzó 5 nm por encima de la excitación y llegó hasta 650 o 700 nm.

### 4.2.2. Medidas con resolución temporal

El tiempo de vida de fluorescencia, como ya se ha explicado, suele coincidir con el tiempo de vida del estado excitado singlete de una determinada especie.

En este trabajo se midieron los tiempos de vida del estado excitado singlete del Trp debido a que su rendimiento cuántico de fluorescencia es adecuado para poder observarla con los equipos utilizados.

Para obtener el tiempo de vida de fluorescencia del Trp, se introdujeron las muestras en una cubeta de cuarzo en el espectrofluorímetro de tiempo resuelto, se fijaron los parámetros deseados y se realizó la medición utilizando un led a 295 nm para excitar las muestras y con un filtro UV de 320 nm para detectar la emisión generada.

Con el fluorímetro que se dispone se midió el tiempo de vida de todo lo que tuviera emisión a partir de 320 nm. Por tanto, mayoritariamente el tiempo medido correspondió a la emisión del Trp (máximo a 330 nm) en el caso de concentraciones no muy elevadas de NQNO (relación proteína:NQNO  $\leq$  1:2).

Cada medición se realizó tres veces, de forma que con la media de las tres veces se minimizaron los errores experimentales que se hubieran podido producir.

#### 4.3. OBTENCIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA Y DEL TIEMPO ÓPTIMOS DE IRRADIACIÓN

Un fotorreactor es un reactor químico que emplea una fuente de radiación, luz ultravioleta en este caso, como fuente energética para provocar una determinada reacción química.

En el caso de la irradiación como experimento en este estudio, se busca excitar selectivamente a la NQNO para estudiar la posibilidad de una interacción con las biomoléculas ensayadas.

El fotorreactor dispone de 10 lámparas que irradian con una longitud de onda centrada en 355 nm.

Para determinar el tiempo óptimo de irradiación se preparó una disolución de NQNO con proteína y/o aminoácido en una relación de concentración de 1:2 equivalentes. 3 mL de esta disolución se depositaron en una cubeta de cuarzo de 1x1 cm y se introdujeron en el fotorreactor bajo un cristalizador de Pyrex que actúa como filtro sin dejar pasar la radiación UV con longitudes de onda por debajo de 300 nm (**Figura 35 y Figura 36**).



**Figura 35.** Cubeta de cuarzo



**Figura 36.** Cristalizador Pyrex

A continuación, se programó el reactor y se fueron irradiando las muestras progresivamente definiendo la escala de tiempos más adecuada para observar cambios a través de las técnicas espectroscópicas de revelado utilizadas.

#### 4.4. FILTRACIÓN EN GEL SEPHADEX®

El gel Sephadex®, que es la marca registrada con que se comercializa el gel dextrano, se utiliza como un sistema de filtración que deja pasar las moléculas con una masa molecular mayor de 5000 Da y retiene las de menor masa molecular. Es decir, en este caso, la proteína (66500 Da) atravesaría el filtro mientras que la NQNO (190,16 Da) y sus derivados se quedarían retenidos. Una vez conocido el tiempo óptimo de irradiación, se irradió la muestra y se realizó una filtración por Sephadex®. Si se produce una fotounión, enlace covalente, entre el fármaco y la biomolécula, al medir la absorbancia tras filtrar la muestra irradiada, podría observarse una banda correspondiente a la NQNO unida a la proteína en una región en la que la proteína no absorbe y si se midiera su emisión esta podría cambiar.

En este procedimiento el gel dextrano, que es un polímero ramificado de glucosa y entrecruzado, es el que actúa como fase estacionaria, reteniendo las moléculas pequeñas en los poros de las partículas de gel y excluyendo las moléculas grandes.

En la **Figura 37** se puede observar el montaje utilizado para la filtración.



**Figura 37.** Columnas de filtración en gel Sephadex®

Para realizar la filtración, se lavó la columna, en primer lugar, cinco veces con 5 mL de PBS. A su vez, se prepararon 3 mL de la disolución a filtrar y se le añadieron 1,72 g de cloruro de guanidinio, dejando reposar la mezcla 5 minutos, produciéndose una reacción endotérmica al desnaturizarse la proteína.

A continuación, se añadieron 2,5 mL de la disolución con cloruro de guanidinio a la columna, que dio lugar a un filtrado y, por último se lavó la columna con 3,5 mL de PBS recogiendo también esta disolución de lavado junto con el filtrado. Esta dilución se tuvo en cuenta a la hora de registrar el espectro de absorbancia y emisión.

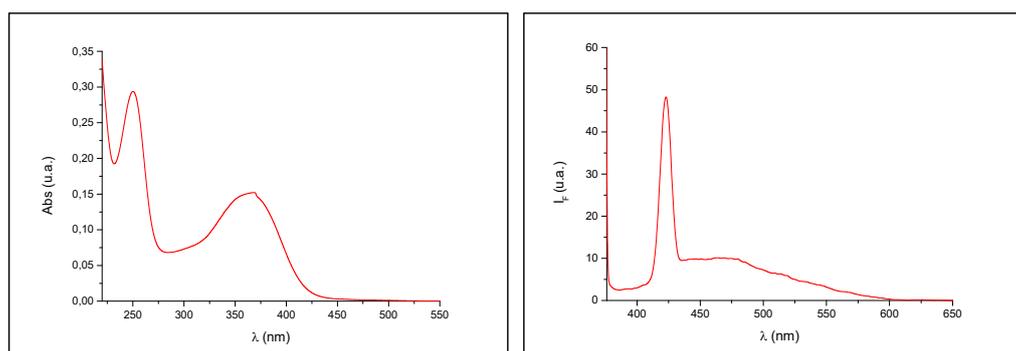
## 5. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 5.1. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LA NQNO CON EL AMINOÁCIDO Trp Y PROTEÍNAS ALBÚMINAS SÉRICAS

#### 5.1.1. Medidas espectroscópicas de absorción y emisión en estado estacionario

Con el fin de poder estudiar la interacción entre la NQNO y los diferentes aminoácidos y proteínas, se realizó la medición de los espectros de absorción y emisión de fluorescencia de una disolución madre de NQNO en PBS con una concentración de  $2 \times 10^{-5}$  M. De este modo, se podrá comprobar de forma más visible cualquier cambio en su espectro debido a la interacción con las distintas biomoléculas.

En los resultados gráficos (**Gráficos 1-2**) obtenidos se observa el espectro de absorción con el máximo característico de la NQNO en torno a los 365 nm de longitud de onda. En cuanto al espectro de emisión de fluorescencia se observa que el fármaco de estudio no presenta apenas emisión de fluorescencia, tal y como se esperaba por la bibliografía disponible.<sup>13</sup> El pico que se observa se corresponde con la frecuencia Raman del agua, por lo que se confirma el prácticamente nulo rendimiento cuántico de emisión de fluorescencia de la NQNO en PBS.

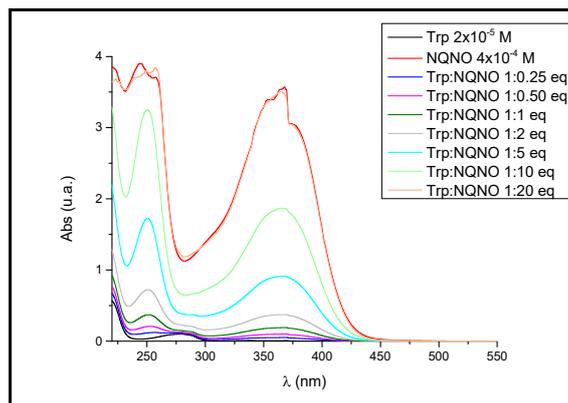


**Gráficos 1-2.** Espectros de absorción (izquierda) y de emisión de fluorescencia (derecha) de la NQNO con concentración  $2 \times 10^{-5}$  M en PBS

#### 5.1.1.1. *NQNO:Trp*

Para determinar y detectar si la NQNO interacciona con el triptófano se realizó la medida del espectro de absorción ultravioleta-visible (UV-Vis) y de emisión de fluorescencia de mezclas de triptófano con NQNO en PBS, incrementando la cantidad de NQNO de forma progresiva.

Se comenzó con una concentración fija de Trp de  $2 \times 10^{-5}$  M. En el **Gráfico 3** se representa, además, el espectro de absorción de la NQNO sola con la máxima concentración añadida en las mezclas,  $4 \times 10^{-4}$  M, así como el del aminoácido con su concentración que se mantiene constante.

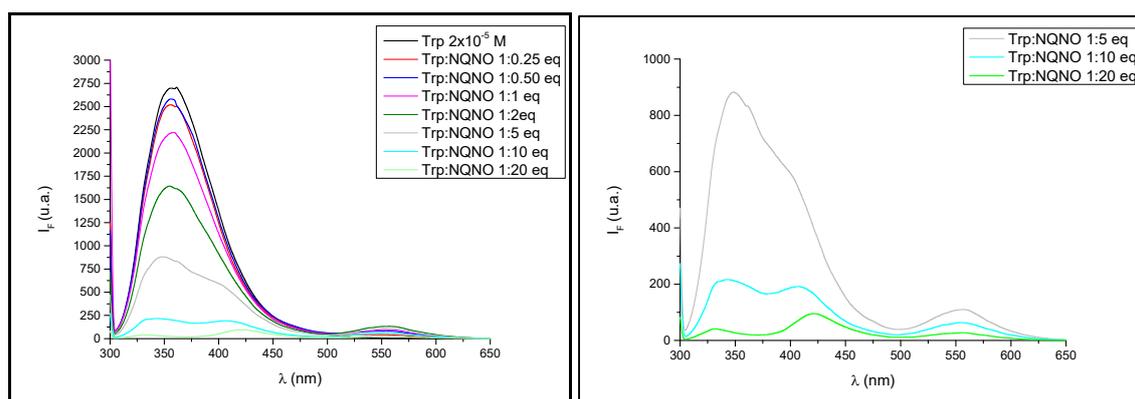


**Gráfico 3.** Espectro de absorción UV-Vis de las mezclas Trp:NQNO en las que el Trp permanece constante y se va aumentando la concentración de la NQNO

Lo que se observa al obtener los espectros de absorción para las distintas proporciones Trp:NQNO, es que a medida que aumenta la cantidad de NQNO en la mezcla, el espectro de absorción de la misma va aumentando manteniendo la forma característica de la absorción de la NQNO. Con el perfil de absorción obtenido se puede concluir que no se observa interacción entre el triptófano y la NQNO en el estado fundamental.

En cambio, cuando se registraron los espectros de emisión de fluorescencia tanto para las mezclas Trp:NQNO como para los componentes por separado, sí que se observó una disminución de la intensidad de fluorescencia del triptófano (330 nm) a medida que se aumentó la cantidad de NQNO (**Gráfico 4**). Además, se observó la aparición de una nueva banda alrededor de los 420 nm, que se puede observar mejor en el **Gráfico 5**.

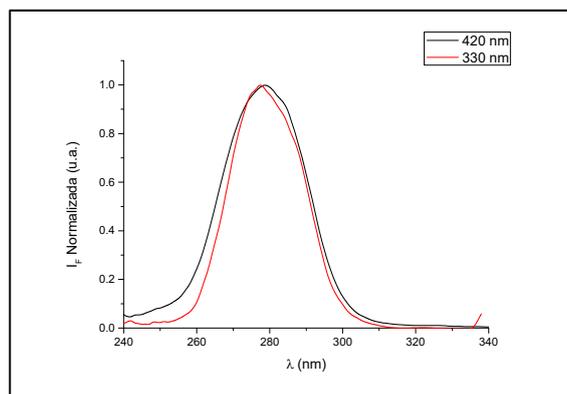
Se puede observar, también, como la fluorescencia de la NQNO (~550 nm) se hace visible para concentraciones elevadas del fármaco.



**Gráficos 4-5.** Espectros de emisión de fluorescencia, excitando a 295 nm, de las mezclas Trp:NQNO con concentraciones crecientes de NQNO (izquierda) y ampliación de algunos de los espectros para observar la formación del nuevo máximo de emisión a 420 nm (derecha)

Para el caso de la fluorescencia del Trp es necesario aclarar que a pesar de la existencia de un efecto filtro, debido a la absorción en aumento de la NQNO a 295 nm, su disminución sigue existiendo al aumentar la concentración de NQNO.

La nueva banda que aparece a 420 nm se atribuye a la interacción entre el triptófano y la NQNO debida a la formación de un exciplexo (complejo en estado excitado), ya que al registrar los espectros de excitación en ambos máximos de emisión, estos son coincidentes (**Gráfico 6**). Los espectros de excitación coinciden, a su vez, con el espectro de absorción del triptófano.



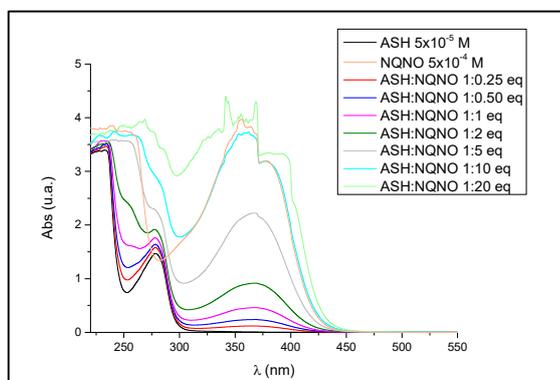
**Gráfico 6.** Espectros de excitación normalizados de la mezcla Trp:NQNO 1:10 eq a las longitudes de onda de emisión de los máximos 330 nm y 420 nm

La emisión a 420 nm está de acuerdo con la formación de un exciplexo entre el Trp en su estado excitado singlete y la NQNO en su estado fundamental ( $\text{Trp}^* \cdots \text{NQNO}$ ).

#### 5.1.1.2. NQNO:ASH

Con el fin de caracterizar la posible interacción de la NQNO con la proteína ASH, que contiene un residuo de Trp se realizaron, también, medidas de absorción y emisión en estado estacionario.

Así, se registró el espectro de absorción de mezclas de ASH con cantidades crecientes de NQNO, según se indica en el **Gráfico 7**.

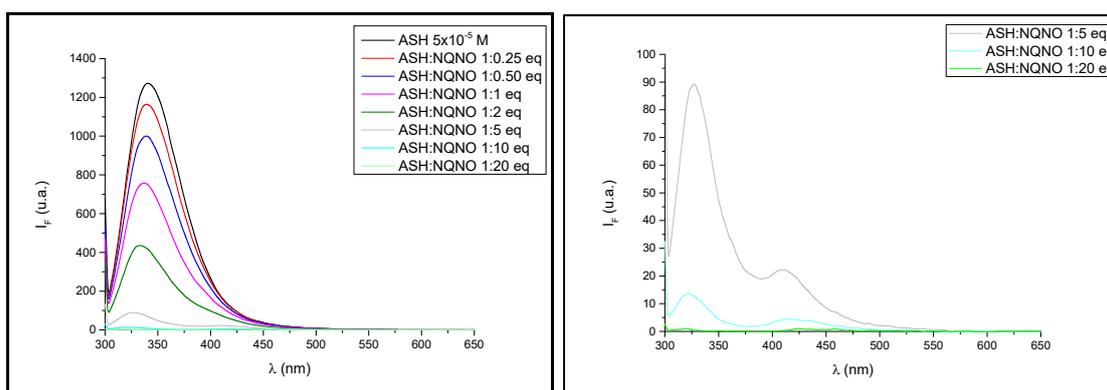


**Gráfico 7.** Espectro de absorción UV-Vis de las mezclas ASH:NQNO con concentraciones crecientes de NQNO en PBS

Como ocurría con las mezclas de Trp:NQNO, a medida que aumenta la concentración de NQNO en la mezcla, el espectro de absorción observado es el propio de la NQNO, por lo que no se detecta ningún tipo de interacción en el estado fundamental mediante estos resultados.

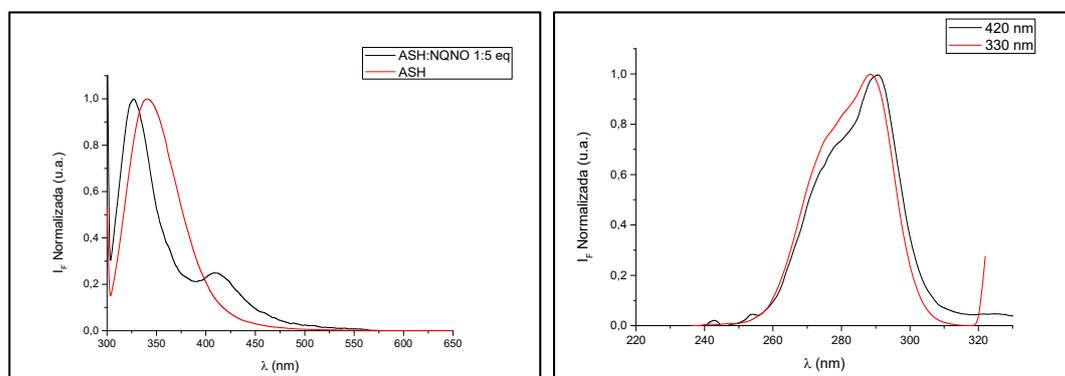
Por otro lado, se registró el espectro de emisión de la ASH en presencia de cantidades crecientes de NQNO, cuando las mezclas se irradian a la longitud de onda de 295 nm en PBS.

En este caso, se observó una disminución de la intensidad de fluorescencia debida al Trp de la proteína (máximo a 330 nm) y la aparición de una nueva banda entorno a 420 nm asociada al exciplexo (Trp\*...NQNO), al igual que ocurría para el caso del triptófano libre con la NQNO (**Gráficos 8-9**).



**Gráficos 8-9.** Espectros de emisión de fluorescencia de las mezclas ASH:NQNO con concentraciones crecientes de NQNO (izquierda) y ampliación de los espectros obtenidos para las concentraciones mayores de NQNO (derecha)

Asimismo, se determinó que la banda que aparecía a 420 nm (**Gráfico 10**) correspondía a un exciplexo entre el estado excitado singlete del Trp en la ASH y la NQNO en estado fundamental a través del registro de los espectros de excitación en los dos máximos de emisión de las mezclas (**Gráfico 11**).



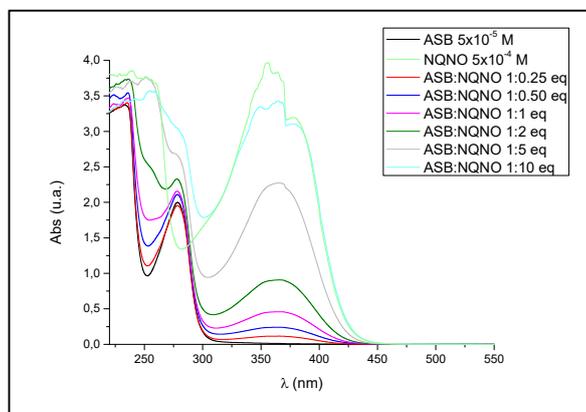
**Gráficos 10-11.** Espectros de emisión de fluorescencia normalizados de ASH y ASH:NQNO 1:5 eq (izquierda) y de excitación normalizados de la mezcla ASH:NQNO 1:5 eq a las longitudes de onda de emisión de los máximos 330 nm y 420 nm (derecha)

Por lo tanto, también se pudo evidenciar una interacción entre el estado excitado del triptófano de la ASH y la NQNO en su estado fundamental, lo que indica que se encuentran espacialmente próximos. Como se sabe por la bibliografía<sup>18</sup>, el triptófano de la ASH se encuentra en una posición interna de la proteína (Trp-214) y próximo al sitio I, por lo que se puede concluir que un cierto número de moléculas de NQNO se sitúan en el interior de la proteína cuando ambos sistemas se ponen en contacto.

### 5.1.1.3. NQNO:ASB

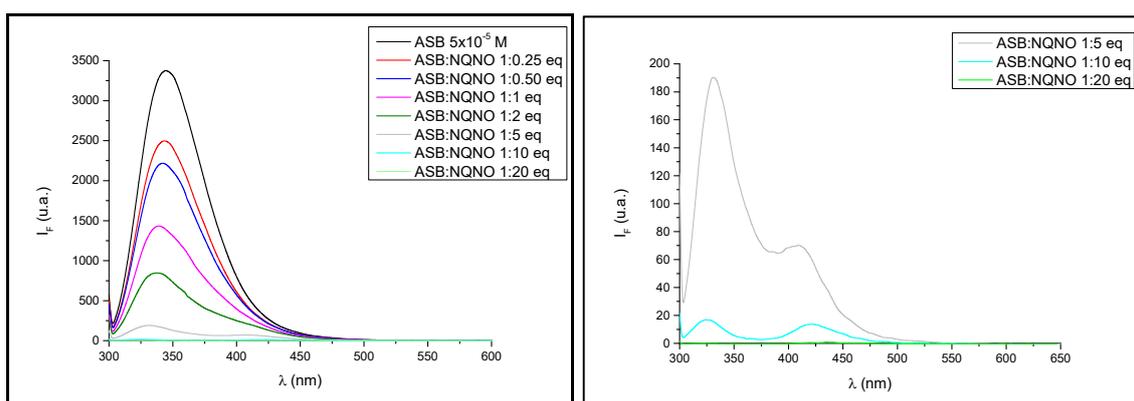
Para comprobar la reproducibilidad en sistemas proteicos, se realizó el mismo experimento con otra albumina sérica pero de origen distinto, la albúmina sérica bovina. La ASH y la ASB tienen una estructura similar, pero difieren en algunos aspectos como el número de residuos de triptófano junto con la ubicación y entorno de los mismos. En los resultados anteriores se ha observado una interacción con la NQNO tanto del triptófano libre como de la ASH. En el caso de la ASB, que tiene el doble de residuos de triptófano que la ASH y con un entorno distinto, se quiere comprobar si también, y en qué magnitud, se produce la interacción con la NQNO.

Se registró el espectro de absorción UV-Vis de la ASB con cantidades crecientes de NQNO en PBS (**Gráfico 12**). Se observó que con grandes cantidades de NQNO el espectro satura pero conforme aumenta la proporción de NQNO el espectro se asimila al de la NQNO. Por lo tanto, se concluye que mediante las medidas de absorbancia en estado estacionario no se observa interacción en el estado fundamental entre los triptófanos de la ASB y la NQNO, tal y como ocurría en el caso de las mezclas entre NQNO con el triptófano libre o la ASH.



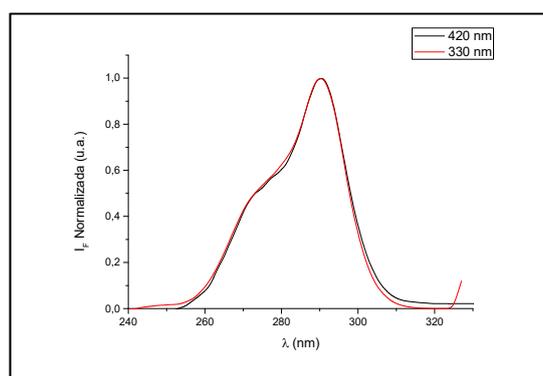
**Gráfico 12.** Espectros de absorción UV-Vis de las mezclas ASB:NQNO con concentraciones crecientes de NQNO en PBS

Por otra parte se registraron los espectros de emisión de la ASB con cantidades crecientes de NQNO bajo excitación a 295nm en PBS, así como de la ASB sola (**Gráfico 13**). En este caso se observa la disminución de intensidad de fluorescencia de los Trp de la ASB (máximo a 330 nm) al aumentar la cantidad de NQNO y la aparición de una nueva banda a 420 nm atribuida a la formación del exciplexo entre el estado excitado del Trp y la NQNO en estado fundamental (**Gráfico 14**).



**Gráficos 13-14.** Espectros de emisión de fluorescencia de las mezclas ASB:NQNO con concentraciones crecientes de NQNO (izquierda) y ampliación de los espectros registrados para las concentraciones superiores de NQNO (derecha)

También en este caso los espectros de excitación registrados para los dos máximos de emisión (330 y 420 nm) fueron coincidentes (**Gráfico 15**). Dichos espectros de excitación se corresponden con el espectro de absorción de la proteína.



**Gráfico 15.** Espectros de excitación normalizados de la mezcla ASB:NQNO 1:5 eq a las longitudes de onda de emisión de los máximos 330 nm y 420 nm

Por lo tanto, se puede concluir que se forma el exciplexo entre el triptófano y la NQNO tanto en disolución acuosa de PBS como en el medio proteico de las albúminas séricas humana y bovina. El hecho de que se forme el exciplexo también para las albúminas indica que una parte de las moléculas de NQNO se encuentran en el interior de las proteínas. Debido a que se observa el exciplexo tanto con ASH como con ASB se puede concluir que la interacción entre el triptófano y la NQNO no se ve afectada por el entorno químico distinto de los Trp en cada uno de los ambientes proteicos, si bien la cantidad de complejo sí parece ser mayor en el caso de la proteína ASB.

Este último resultado podría deberse al mayor número de Trp que favorecería su interacción con el fármaco.

### 5.1.2. Cálculo de la constante cinética de la interacción Trp:NQNO a través de medidas de emisión con resolución temporal

#### 5.1.2.1. *Ecuación de Stern-Volmer*

La ecuación de Stern-Volmer estudia la cinética de procesos fotoinducidos de desactivación, como puede ser la transferencia de energía intermolecular a través de medidas de fluorescencia (el caso de este estudio) o de fosforescencia.

Esta desactivación se produce cuando la presencia de una especie acelera la desactivación del estado excitado de otra, produciéndose una transferencia de energía de la especie B a la especie A, según se observa en la **Figura 38**.



**Figura 38.** Proceso de transferencia de energía de la especie B a la especie A

La especie B, que se encuentra en el estado excitado transfiere su energía a la especie A quedando la especie B en el estado fundamental y la A, en el estado excitado.

En nuestro caso, A sería la NQNO y B sería la ASH (o la ASB), según se observa en la **Figura 39**:



**Figura 39.** Proceso de transferencia de energía de la proteína al fármaco (NQNO)

La ecuación de Stern-Volmer puede aplicarse para calcular la constante cinética del proceso de desactivación utilizando medidas de intensidades de fluorescencia o de tiempos de vida de fluorescencia.

Así, la ecuación de Stern-Volmer para calcular la constante de desactivación del proceso fotofísico utilizando **la intensidad de fluorescencia**, tendría la forma:

$$\frac{I_f^0}{I_f} = 1 + k_{SV} \cdot [Q] \rightarrow \frac{I_f^0}{I_f} = 1 + k_q \tau_f^0 \cdot [Q] \quad \text{Ecuación 9}$$

$$k_{SV} = k_q \tau_f^0 \quad \text{Ecuación 10}$$

En donde, para el caso de este trabajo:

$I_f^0$  es la intensidad máxima de fluorescencia inicial de la ASH excitando a 295nm antes de añadir la especie desactivadora, NQNO.

$I_f$  es la intensidad máxima de fluorescencia de la ASH excitando a 295nm para distintas cantidades de NQNO.

$k_{SV}$  es la constante cinética de Stern-Volmer que es igual a  $k_q\tau_f^0$  y que se obtiene de la pendiente de la recta al representar la relación de intensidades de fluorescencia en función de la concentración de NQNO, sus unidades son  $M^{-1}$ .

$k_q$  es la constante cinética de desactivación y se obtiene dividiendo la  $k_{SV}$  por la  $\tau_f^0$ , las unidades de la  $k_q$  son  $M^{-1}s^{-1}$ .

$\tau_f^0$  es el tiempo de vida de fluorescencia inicial de la ASH excitada a 295nm cuando no hay NQNO, sus unidades son segundos.

$[Q]$  es la concentración de la especie desactivadora, que en este caso es la NQNO, se mide en mol/L.

Y en el caso del cálculo de la constante de desactivación utilizando **tiempos de vida de fluorescencia**, la ecuación de Stern-Volmer tiene la forma:

$$\frac{\tau_f^0}{\tau_f} = 1 + k_{SV} \cdot [Q] \rightarrow \frac{\tau_f^0}{\tau_f} = 1 + k_q\tau_f^0 \cdot [Q] \quad \text{Ecuación 11}$$

En donde, para este trabajo:

$\tau_f$  es el tiempo de vida de fluorescencia de la ASH excitando a 295nm en presencia de distintas cantidades de NQNO.

#### 5.1.2.2. NQNO:ASH

Se midieron los tiempos de vida de fluorescencia en el espectrofluorímetro de tiempo resuelto, para las distintas mezclas de ASH y NQNO para las que se midió el espectro de emisión mostrado en el apartado 5.1.1.2. El registro de los tiempos de vida se llevó a cabo para una longitud de onda de emisión  $\geq 320$  nm, tal y como se explica en la metodología (apartado 4.2.2).

El tiempo de vida medido para la ASH fue:  $\tau_{ASH} = 3,55$  ns

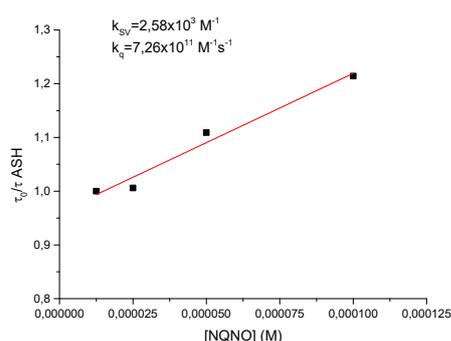
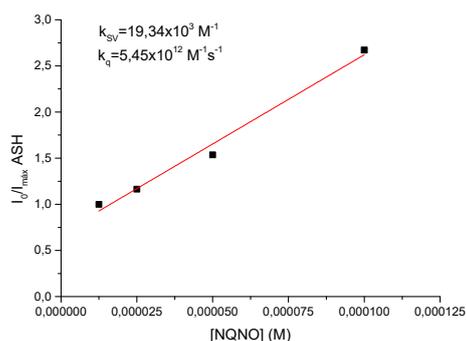
Y su intensidad en el máximo de emisión fue:  $I_{m\acute{a}x} = 1273,34$  u.a.

A continuación se muestra en la **Tabla 1** los tiempos de vida obtenidos para la emisión de las mezclas de ASH con cantidades crecientes de NQNO. En dicha tabla se proporcionan, también, los valores de la intensidad en el máximo de emisión de la fluorescencia de la ASH (según el **Gráfico 8**).

Se tomaron los datos hasta una relación 1:2 de ASH:NQNO para minimizar la contribución del excipiente y se aplicó la ecuación de Stern-Volmer tanto en función de tiempos de vida de fluorescencia como de las intensidades medidas en el máximo de emisión, obteniendo los **Gráficos 16** y **17**, que se ajustan a una línea recta para determinar el valor de la constante cinética de la interacción  $Trp^* \cdots NQNO$ .

**Tabla 1.** Datos de emisión ( $\tau, I$ ) para las mezclas de ASH con concentraciones crecientes de NQNO

[NQNO] (M)	$\tau$ (s)	$\tau_0/\tau$	$I_{\text{máx}}$	$I_0/I_{\text{máx}}$
0,25 eq = $1,25 \cdot 10^{-5}$	$3,46 \cdot 10^{-9}$	1	1165,21	1
0,50 eq = $2,5 \cdot 10^{-5}$	$3,44 \cdot 10^{-9}$	1,006	1000,43	1,165
1 eq = $5 \cdot 10^{-5}$	$3,12 \cdot 10^{-9}$	1,109	758,423	1,536
2 eq = $1 \cdot 10^{-4}$	$2,85 \cdot 10^{-9}$	1,214	436,095	2,672
5 eq = $2,5 \cdot 10^{-4}$	$1,81 \cdot 10^{-9}$	1,911	89,386	13,035
10 eq = $5 \cdot 10^{-4}$	$1,42 \cdot 10^{-9}$	2,436	13,705	85,018
20 eq = $1 \cdot 10^{-3}$	$0,64 \cdot 10^{-9}$	5,406	1,0274	1134,079



**Gráficos 16-17.** Representación gráfica de la relación  $I_0/I_{\text{máx}}$  en función de la concentración de NQNO (izquierda) y de la relación  $\tau_0/\tau$  en función de la concentración de NQNO (derecha) a través de un ajuste lineal para la obtención de la constante de Stern-Volmer en ASH

De la pendiente de la recta se obtiene la constante de Stern-Volmer, y a partir de la misma, la constante del proceso de desactivación del estado excitado singlete del Trp por la NQNO.

En la **Tabla 2** se recogen los resultados obtenidos para la ASH.

**Tabla 2.** Resultados de las constantes de Stern-Volmer y de desactivación obtenidos a través de las dos formas de aplicación de la ecuación de Stern-Volmer para ASH

ASH	Con $I_{\text{máx}}$	Con $\tau$
$k_{\text{SV}} (\text{M}^{-1})$	$19,34 \cdot 10^3$	$2,58 \cdot 10^3$
$k_q (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	$5,45 \cdot 10^{12}$	$7,26 \cdot 10^{11}$

Valores de  $k_q \geq 10^9$  indican un proceso eficiente de desactivación del estado excitado singlete del Trp debido a su interacción con la NQNO por formación del exciplexo.

### 5.1.2.3. NQNO:ASB

Mediante de los tiempos de vida de fluorescencia medidos en el espectrofluorímetro de tiempo resuelto, se han obtenido los siguientes resultados para la ASB.

El tiempo de vida de la ASB es:  $\tau_{ASB} = 5,15 \text{ ns}$

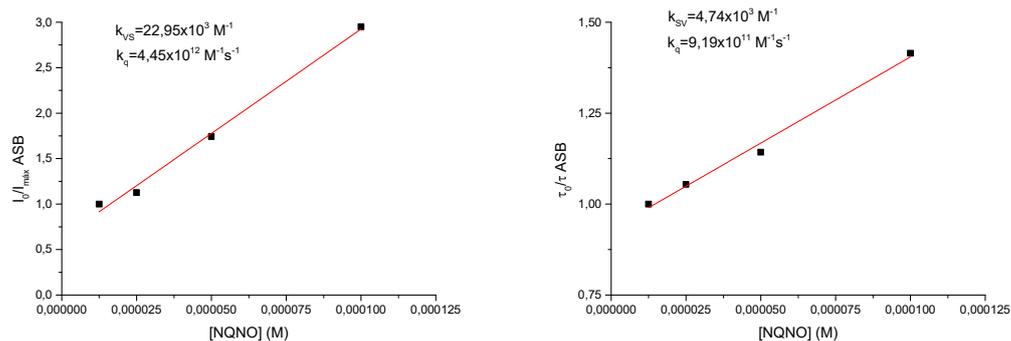
Y su intensidad en el máximo de emisión fue:  $I_{m\acute{a}x} = 3375,79 \text{ u.a.}$

A continuación se muestra en la **Tabla 3** los tiempos de vida obtenidos para la emisión de las mezclas de ASB con cantidades crecientes de NQNO. En dicha tabla se proporcionan, también, los valores de la intensidad en el máximo de emisión de la fluorescencia de la ASB (según el **Gráfico 13**).

De la misma manera que en el caso de la ASH, se tomaron los datos hasta una relación 1:2 de ASB:NQNO para minimizar la contribución del exciplexo y se aplicó la ecuación de Stern-Volmer tanto en función de tiempos de vida de fluorescencia como de las intensidades medidas en el máximo de emisión, obteniendo los **Gráficos 18 y 19**, que se ajustan a una línea recta para determinar el valor de la constante cinética de la interacción  $\text{Trp}^* \cdots \text{NQNO}$ .

**Tabla 3.** Datos de emisión ( $\tau, I$ ) para las mezclas de ASB con concentraciones crecientes de NQNO

[NQNO] (M)	$\tau$ (s)	$\tau_0/\tau$	$I_{m\acute{a}x}$	$I_0/I_{m\acute{a}x}$
0,25 eq = $1,25 \cdot 10^{-5}$	$5,05 \cdot 10^{-9}$	1	2499,12	1
0,50 eq = $2,5 \cdot 10^{-5}$	$4,79 \cdot 10^{-9}$	1,054	2218,24	1,126
1 eq = $5 \cdot 10^{-5}$	$4,42 \cdot 10^{-9}$	1,142	1434,58	1,742
2 eq = $1 \cdot 10^{-4}$	$3,57 \cdot 10^{-9}$	1,414	847,273	2,949
5 eq = $2,5 \cdot 10^{-4}$	$1,23 \cdot 10^{-9}$	4,105	190,608	13,111
10 eq = $5 \cdot 10^{-4}$	$1,33 \cdot 10^{-9}$	3,797	17,007	146,947
20 eq = $1 \cdot 10^{-3}$	$1,66 \cdot 10^{-9}$	3,042	0,0895	27926,249



**Gráficos 18-19.** Representación gráfica de la relación  $I_0/I_{max}$  en función de la concentración de NQNO (izquierda) y de la relación  $\tau_0/\tau$  en función de la concentración de NQNO (derecha) a través de un ajuste lineal para la obtención de la constante de Stern-Volmer en ASB

De la pendiente de la recta se obtiene la constante de Stern-Volmer, y a partir de la misma, la constante del proceso de desactivación del estado excitado singlete del Trp por la NQNO.

A continuación, en la **Tabla 4**, se presentan los resultados obtenidos para la ASB.

**Tabla 4.** Resultados de las constantes de Stern-Volmer y de desactivación obtenidos a través de las dos formas de aplicación de la ecuación de Stern-Volmer para ASB

ASB	Con $I_{m\acute{a}x}$	Con $\tau$
$k_{SV} (M^{-1})$	$22,95 \cdot 10^3$	$4,74 \cdot 10^3$
$k_q (M^{-1} \cdot s^{-1})$	$4,45 \cdot 10^{12}$	$9,19 \cdot 10^{11}$

Valores de  $k_q \geq 10^9$  indican un proceso eficiente de desactivación del estado excitado singlete del Trp debido a su interacción con la NQNO por formación del exciplexo.

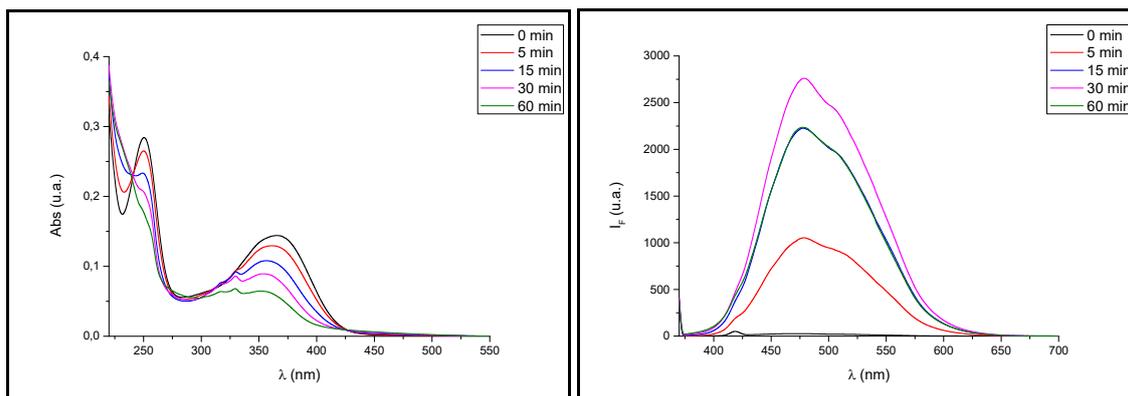
Cuando se obtiene desactivación tanto utilizando la ecuación de Stern-Volmer con las intensidades máximas de emisión como con los tiempos de vida, se deduce que se produce una interacción dinámica. Si solo hubiese cambio en las intensidades pero los tiempos de vida no variaran, sería una interacción estática.

La interacción dinámica entre el triptófano y el N-óxido (NQNO) da lugar a la desactivación del singlete del triptófano. Además, como se ha comprobado en los resultados tanto para la proteína ASH como para la ASB, es un proceso muy eficiente, con una constante de desactivación mayor de  $10^9$ .

## 5.2. ESTUDIO DE LA FOTORREACTIVIDAD DE LA NQNO

### 5.2.1. NQNO en PBS

Con el fin de analizar la fotorreactividad de la NQNO, se realizó el estudio de la fotoquímica de la misma siguiendo su cinética mediante espectroscopia de absorción y emisión en estado estacionario y excitando a 365nm, irradiando en fotorreactor con 10 lámparas de deuterio centradas a 355 nm (**Gráficos 20-21**).



**Gráficos 20-21.** Espectros de absorción (izquierda) y de emisión de fluorescencia (derecha) de la fotorreactividad de la NQNO con concentración  $2 \times 10^{-5}$  M irradiada a 355 nm en fotorreactor

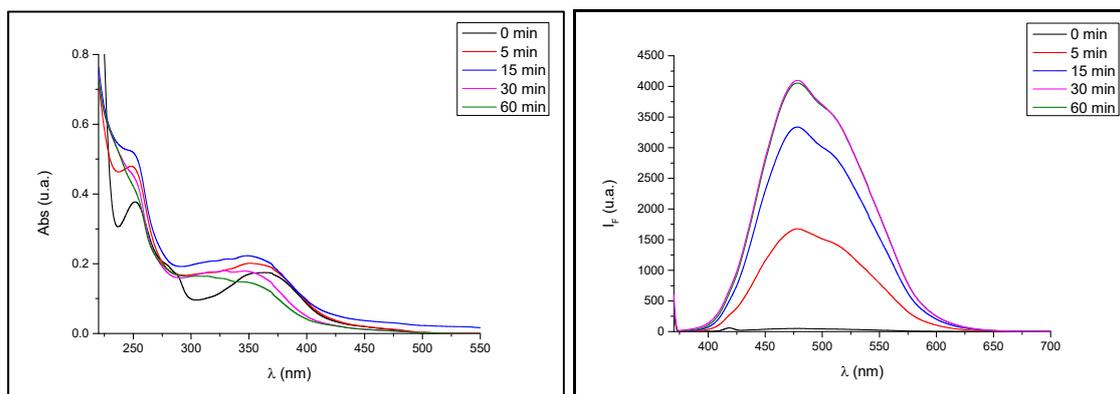
Lo que se observa es que, a medida que avanza la cinética, la banda de absorción a 365nm va disminuyendo progresivamente y sufre un ligero desplazamiento hipsocrómico. En la cinética de absorción se pueden observar al menos dos puntos isobésticos, lo cual indica la descomposición de la NQNO en un único fotoproducto en los tiempos de irradiación utilizados.

Con el espectro de fluorescencia podemos observar la variación más notable, pues la intensidad de emisión excitando en el máximo de absorción de la NQNO (a 365 nm) es prácticamente despreciable pero conforme avanza la irradiación se observa un aumento considerable de la intensidad de emisión. Al alcanzar los 30 minutos de irradiación se observa el valor máximo de intensidad de emisión y al continuar la irradiación comienza a disminuir. Se decide detener la irradiación a los 30 minutos ya que se alcanza la máxima cantidad de fotoproducto principal y a partir de este tiempo lo que se produce es una descomposición de dicho fotoproducto, ya que observamos la pérdida de su fluorescencia.

### 5.2.2. NQNO:Trp

Una vez establecido el tiempo óptimo de irradiación en fotorreactor con 10 lámparas de deuterio centradas en 355 nm para la NQNO en PBS, con una concentración de  $2 \times 10^{-5}$  M, en un valor de 30 minutos, se decidió proceder al estudio de la fotoquímica de la NQNO en presencia de triptófano en las mismas condiciones experimentales.

La cinética de absorción en este caso también muestra una variación de la banda con máximo alrededor de 350 nm con un ligero desplazamiento hipsocrómico como en el caso de la NQNO en PBS (**Gráficos 22-23**).



**Gráficos 22-23.** Espectros de absorción (izquierda) y de emisión de fluorescencia (derecha) de la fotorreactividad de la mezcla NQNO:Trp 1:2 eq ( $[NQNO] = 2 \times 10^{-5}$  M;  $[Trp] = 4 \times 10^{-5}$  M) irradiada a 355nm en fotorreactor

La cinética de fluorescencia reproduce los resultados de la NQNO en PBS. En este caso se observa un máximo en la intensidad de emisión a los 30 minutos, y a los 60 minutos disminuye ligeramente, por lo que se concluye que a partir de los 30 minutos ya no aumenta la emisión de la mezcla. Con esto, se puede proponer que no se ve afectada la fotoquímica de la NQNO en presencia de triptófano, ya que es prácticamente igual que libre en disolución de PBS.

Cuando se siguió la emisión del Trp excitando a 295 nm para los distintos tiempos de irradiación se observó cómo su emisión desaparece ya desde los 5 minutos de irradiación, indicando que no queda Trp como tal en el medio (resultados no mostrados).

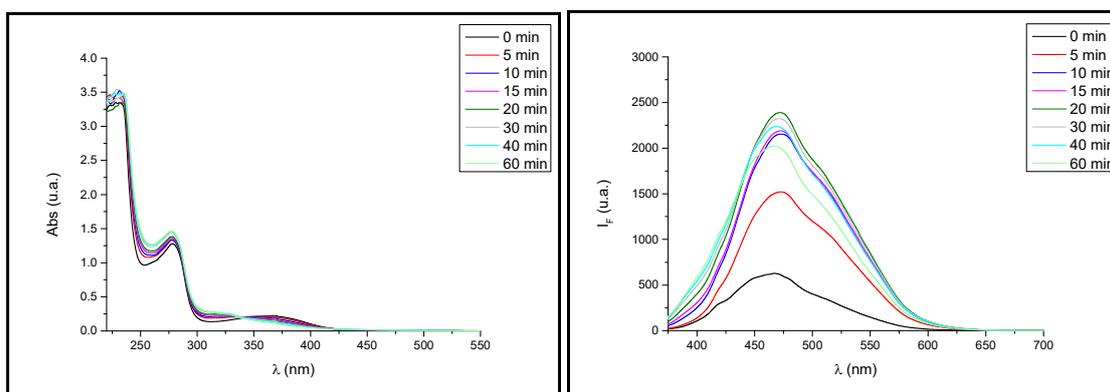
Con todo ello, se puede concluir que un fotoproducto de la NQNO se forma indistintamente en presencia o no de Trp cuyo rendimiento cuántico de fluorescencia es mayor que para la NQNO. La formación de dicho fotoproducto de la NQNO se ve incrementada en presencia de Trp junto con la desaparición del Trp.

### 5.2.3. NQNO:ASH

También se probó el análisis de la fotorreactividad de la NQNO en medio proteico utilizando albumina sérica humana, ASH.

De forma análoga, se realizó la irradiación a 355nm de una disolución de NQNO  $2 \times 10^{-5} \text{ M}$  con ASH  $4 \times 10^{-5} \text{ M}$  en PBS en el fotorreactor.

El objetivo era comparar los resultados obtenidos con los de la mezcla de NQNO con triptófano para poder confirmar la influencia del residuo de triptófano presente en la ASH y si el entorno de la proteína afectaba de forma significativa a la interacción entre ellos (**Gráficos 23-24**).



**Gráficos 23-24.** Espectros de absorción (izquierda) y de emisión de fluorescencia (derecha) de la fotorreactividad de la mezcla NQNO:ASH 1:2 eq ( $[\text{NQNO}] = 2 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $[\text{ASH}] = 4 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) irradiada a 355nm en fotorreactor

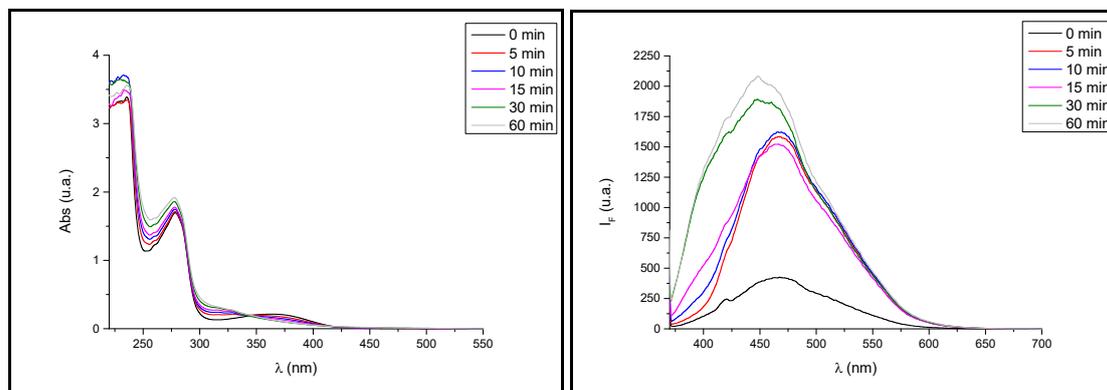
En la cinética de absorción se observa una disminución del máximo de absorción con la aparición de un punto isobéptico y un desplazamiento hipsocrómico más abrupto que en el caso de la NQNO con Trp. La cinética de fluorescencia cambia respecto a la NQNO en presencia de Trp ya que se observa el máximo de la intensidad de fluorescencia a los 20 minutos y al seguir con la irradiación se observa una disminución y un desplazamiento del máximo de emisión lo cual indica la aparición de al menos otra especie que emite.

Se evidenció, también, que la cinética de desaparición del Trp al irradiar a la NQNO en presencia de ASH era más lenta que para el caso de la mezcla NQNO:Trp (datos no mostrados).

Con estos resultados, se puede concluir que existe una interacción NQNO:ASH que hace disminuir la emisión del Trp de la ASH, no tan eficientemente que cuando el Trp está en disolución, y aumentar la emisión de una especie con un rendimiento cuántico de emisión superior al de la NQNO.

#### 5.2.4. NQNO:ASB

Para comprobar la reproducibilidad de los resultados obtenidos con la NQNO en medio proteico de ASH, se realizó el estudio de la fotorreactividad también en medio proteico de albumina sérica bovina, ASB, que contiene dos residuos de triptófano (**Gráficos 25-26**).



**Gráficos 25-26.** Espectros de absorción (izquierda) y de emisión de fluorescencia (derecha) de la fotorreactividad de la mezcla NQNO:ASB 1:2 eq ( $[NQNO] = 2 \times 10^{-5}$  M;  $[ASB] = 4 \times 10^{-5}$  M) irradiada a 355 nm en fotorreactor

En la cinética de absorción se observa la disminución de la banda máxima de absorción con la presencia de un punto isosbético y el desplazamiento hipsocrómico de forma muy similar al caso de la ASH.

En la cinética de fluorescencia se observa que el máximo de la intensidad de emisión se produce a los 10 minutos de irradiación y al continuar irradiando se produce una disminución junto con un desplazamiento de la banda hacia el azul para posteriormente, para mayores tiempos de irradiación, aumentar de nuevo la emisión desplazándose aún más el máximo.

Se observó que con menos tiempo (la mitad) de irradiación se obtiene la máxima concentración de la primera especie que emite y que al seguir la irradiación va desapareciendo para dar lugar a otra especie con mayor y distinto máximo de emisión.

Además, al seguir la cinética de desaparición de la emisión del Trp (a 340 nm) se observó que era más rápida que en el caso de la irradiación de la NQNO en presencia de ASH sin llegar a la gran eficiencia de desaparición en el caso del Trp en disolución (datos no mostrados).

Por tanto, se puede concluir que la fotorreactividad de la NQNO se ve afectada por el medio proteico y por la cantidad de triptófano, de manera que se ve acelerada al realizarse en medio de ASB que contiene dos residuos de triptófano, frente a la ASH que solo contiene un residuo de triptófano.

Así, como conclusión, los tiempos de irradiación de la NQNO necesarios para la formación de una primera especie fluorescente (con máximo a 470 nm) se ordenarían: ASB < ASH < Triptófano = PBS.

### 5.3. ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE UNIÓN COVALENTE FOTOINDUCIDA NQNO-PROTEÍNA

Al observarse la formación de un exciplexo entre el triptófano y la NQNO tanto en disolución como en medio proteico de ASH y ASB, además de observar una aceleración de la fotorreactividad de la NQNO en presencia de ASH y ASB respecto al Trp en disolución, se decidió estudiar la posible unión covalente fotoinducida fármaco-proteína.

Para ello, se realizó el estudio de la formación de un aducto entre la NQNO y algún residuo de la albumina sérica utilizando técnicas espectroscópicas de absorción y emisión realizando una filtración por exclusión de tamaños utilizando un filtro de Sephadex®.

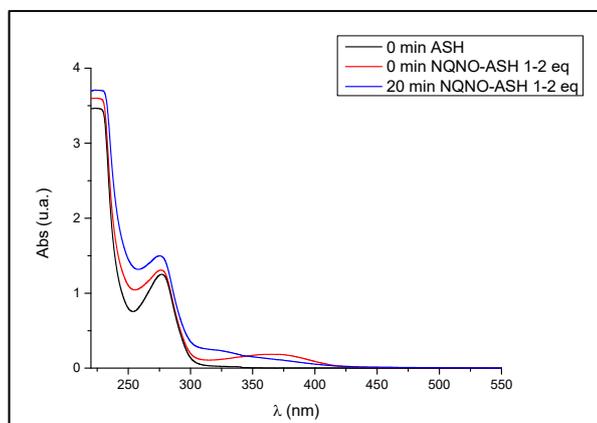
#### 5.3.1. NQNO-ASH

Se registraron los espectros de absorción y emisión en distintas condiciones: antes y después de irradiar y antes y después de filtrar con Sephadex®.

Como primer paso, antes de presentar y comentar los resultados obtenidos con la filtración, se midieron los espectros de absorción de la proteína libre, de la mezcla irradiada y de la mezcla sin irradiar.

Las mezclas utilizadas fueron disoluciones de NQNO  $2 \times 10^{-5}$  M y ASH  $4 \times 10^{-5}$  M en PBS, según se estableció en la metodología como condiciones óptimas de reacción y detección (ver apartado 4.1.4.). El tiempo de irradiación también fue escogido como el óptimo para la formación máxima de fotoproducto, según se analizó en el apartado 5.2.3.

Lo que se observa (**Gráfico 27**) es que en la mezcla sin irradiar de NQNO y ASH, el máximo de absorbancia correspondiente a la proteína coincide prácticamente con el de la proteína cuando se encuentra sola y que tiene la misma concentración, no apareciendo el máximo característico de la NQNO en el caso de la proteína sola. Al irradiar la mezcla se confirma lo que se había observado en el estudio de fotorreactividad, el máximo de absorción de la proteína sobre 290 nm aumenta, mientras que el correspondiente a la NQNO disminuye y se desplaza hacia longitudes de onda menores.

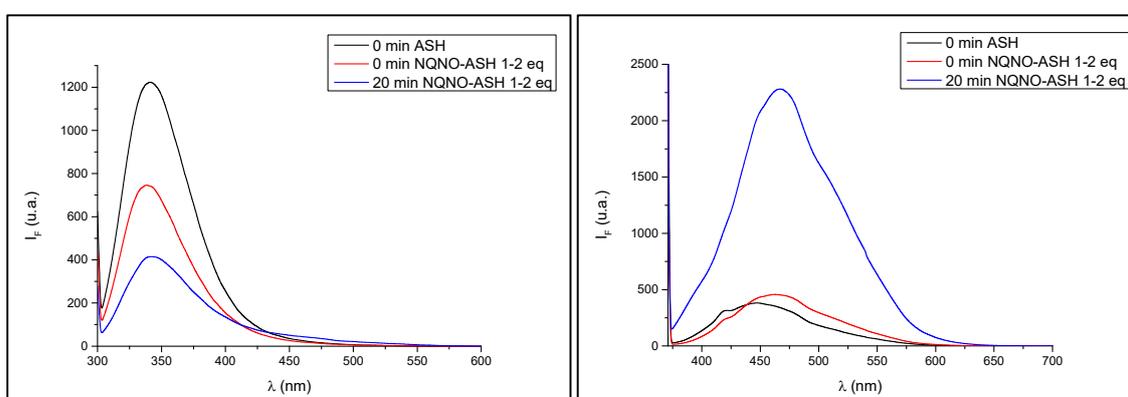


**Gráfico 27.** Espectros de absorción UV-Vis de la mezcla NQNO-ASH 1-2 eq ( $[NQNO] = 2 \times 10^{-5}$  M;  $[ASH] = 4 \times 10^{-5}$  M) antes y después de irradiar y de la proteína libre sin irradiar ( $[ASH] = 4 \times 10^{-5}$  M)

A continuación se midieron los espectros de emisión utilizando dos longitudes de onda de excitación: 365 nm (excitación selectiva de la NQNO) y 295 nm (excitación de la proteína y de la NQNO).

En los **Gráficos 28 y 29** se puede observar como los resultados del estudio de fotorreactividad se confirman. Mirando al comportamiento de la proteína (excitación a 295 nm), en presencia de NQNO y sin irradiar, la intensidad de emisión de la proteína (Trp) disminuye respecto a la de la proteína sola, y como era de esperar según la fotoquímica analizada, después de 20 minutos de irradiación, disminuye todavía más.

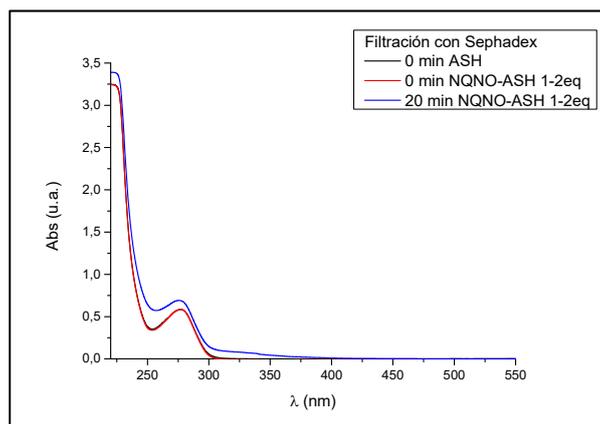
En cambio, mirando el comportamiento de la NQNO (excitación a 365 nm), la proteína sola y la mezcla de NQNO y proteína apenas tienen emisión a longitudes de onda mayores de 400 nm, pero se observa un aumento muy importante de la intensidad de emisión con máximo a 470 nm cuando la mezcla ha sido irradiada.



**Gráficos 28-29.** Espectros de emisión de fluorescencia de la mezcla NQNO-ASH 1-2 eq ( $[NQNO] = 2 \times 10^{-5}$  M;  $[ASH] = 4 \times 10^{-5}$  M) antes y después de irradiar y de la proteína libre, sin irradiar ( $[ASH] = 4 \times 10^{-5}$  M), excitando con el fluorímetro a 295 nm (izquierda) y a 365 nm (derecha)

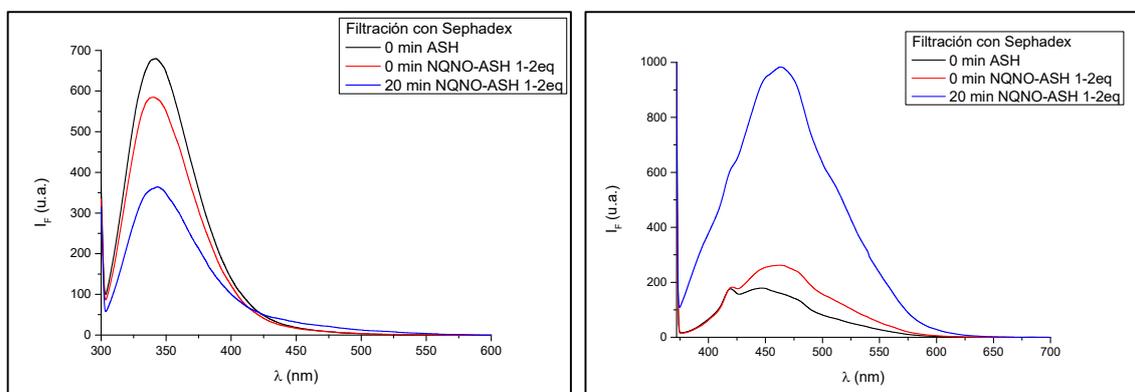
Como último paso se presentan los resultados de absorción y emisión para las mismas muestras analizadas tras la filtración por Sephadex<sup>®</sup>.

En el espectro de absorción se observa que la banda característica de la NQNO después de filtrar con Sephadex<sup>®</sup> y antes de irradiar, no se observa para la mezcla. Esto significa que no se ha formado un aducto entre la proteína y el fármaco en el estado fundamental, ya que como la NQNO tiene una masa molecular menor de 5000 Da, ha sido retenida en la filtración. En cambio, existe una diferencia observable en el espectro de absorción al filtrar por Sephadex<sup>®</sup> de la disolución de NQNO-ASH irradiada y de la mezcla sin irradiar (**Gráfico 30**). Esto puede indicar la presencia de una especie que absorbe en esa región y la cual no es únicamente la proteína, por lo que todo parece dirigir a la formación de un aducto entre la NQNO (o un fotoproducto de esta) y ASH que se ha formado al irradiar la mezcla.



**Gráfico 30.** Espectros de absorción UV-Vis tras la filtración con Sephadex<sup>®</sup> de la mezcla NQNO-ASH 1-2 eq ( $[NQNO] = 2 \times 10^{-5}$  M;  $[ASH] = 4 \times 10^{-5}$  M) antes y después de irradiar y de la proteína libre sin irradiar ( $[ASH] = 4 \times 10^{-5}$  M)

En cuanto a los espectros de emisión (**Gráficos 31-32**) se observa una disminución importante en la intensidad de emisión debida al Trp libre cuando la muestra ha sido irradiada respecto a la no irradiada, bajo excitación a 295 nm. Y cuando se excita únicamente a la NQNO o fotoproductos relacionados a 365 nm, lo que se observa es un aumento considerable en la banda de emisión a 470 nm al irradiar y filtrar respecto a cuando la proteína está libre o a la disolución filtrada sin irradiar, lo cual indica que existe un compuesto nuevo que está dando esa diferencia de emisión.



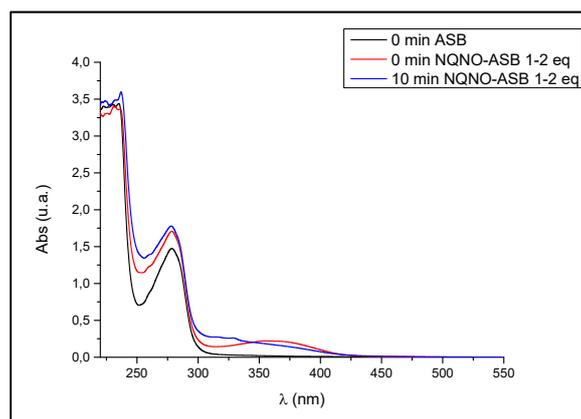
**Gráficos 31-32.** Espectros de emisión de fluorescencia tras la filtración con Sephadex<sup>®</sup> de la mezcla NQNO-ASH 1-2 eq ( $[NQNO] = 2 \times 10^{-5}$  M;  $[ASH] = 4 \times 10^{-5}$  M) antes y después de irradiar y de la proteína libre ( $[ASH] = 4 \times 10^{-5}$  M), excitando con el fluorímetro a 295nm (izquierda) y a 365 nm (derecha)

Estos resultados están de acuerdo con la formación de un aducto entre la proteína (posiblemente desde su Trp) y la NQNO o un derivado de ella.

### 5.3.2. NQNO-ASB

Se procedió de la misma forma con la ASB, registrando los espectros de absorción y emisión antes y después de irradiar y de filtrar con Sephadex<sup>®</sup>. Se utilizó una disolución de NQNO  $2 \times 10^{-5}$  M y ASB  $4 \times 10^{-5}$  M en PBS.

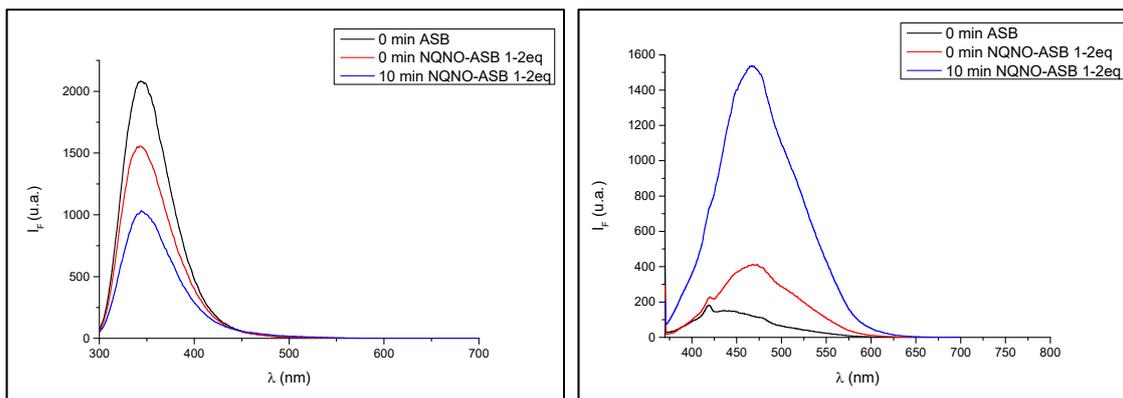
Primero se registraron los espectros de absorción de la proteína libre, y de la mezcla con NQNO antes y después de irradiar (**Gráfico 33**).



**Gráfico 33.** Espectros de absorción UV-Vis de la mezcla NQNO-ASB 1-2 eq ( $[NQNO] = 2 \times 10^{-5}$  M;  $[ASB] = 4 \times 10^{-5}$  M) antes y después de irradiar y de la proteína libre sin irradiar ( $[ASB] = 4 \times 10^{-5}$  M)

En el caso de la mezcla de NQNO con la albúmina sérica bovina se reproduce el mismo comportamiento que en el caso de la ASH. Una vez irradiada la mezcla durante 10 minutos se observa el resultado esperado, es decir, el máximo de la proteína sobre 290 nm aumenta respecto a la proteína libre, mientras que el de la NQNO disminuye.

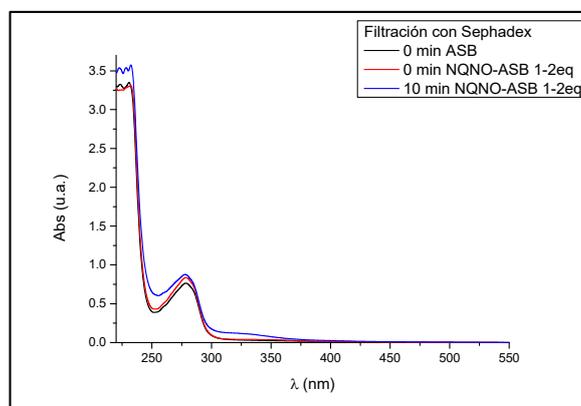
A continuación, con los resultados de emisión (**Gráficos 34-35**) se observa un comportamiento similar al obtenido con la ASH y que en los estudios de fotorreactividad de la ASB. En el **Gráfico 34**, excitando a 295 nm, el máximo de emisión de la proteína disminuye en la mezcla respecto a la proteína libre por la presencia de la NQNO, lo que lleva a esperar un aumento significativo del máximo de emisión de la NQNO tras la irradiación. Esto se confirma en el **Gráfico 35**, con excitación a 365 nm, donde se observa el comportamiento de la NQNO cuya emisión, en efecto, sufre un aumento de intensidad notable.



**Gráficos 34-35.** Espectros de emisión de fluorescencia de la mezcla NQNO-ASB 1-2 eq ( $[NQNO] = 2 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $[ASB] = 4 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) antes y después de irradiar y de la proteína libre sin irradiar ( $[ASB] = 4 \times 10^{-5} \text{ M}$ ), excitando con el fluorímetro a 295nm (izquierda) y a 365 nm (derecha)

Por último, se llevaron a cabo los experimentos de filtración en Sephadex<sup>®</sup>.

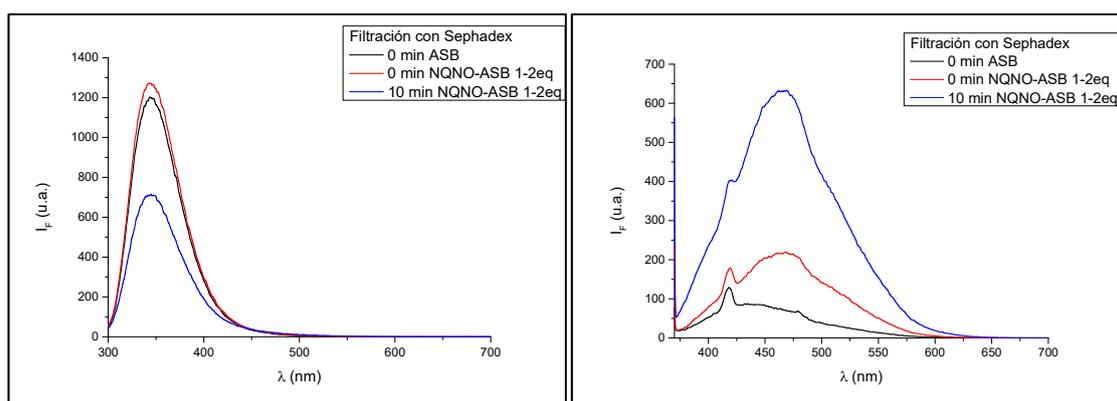
Lo que se observa en el **Gráfico 36** es el aumento del máximo de absorción al irradiar y su desplazamiento. Además, se observa diferencia de intensidad de absorción entre la muestra irradiada y filtrada y la filtrada sin irradiar, indicando la presencia de algún compuesto que no estaba presente antes de irradiar y que pasa por el filtro de Sephadex<sup>®</sup>. Esto quiere decir, que puede existir la formación de un aducto entre un fotoproducto de la NQNO y la ASB.



**Gráfico 36.** Espectros de absorción UV-Vis tras la filtración con Sephadex<sup>®</sup> de la mezcla NQNO-ASB 1-2 eq ( $[NQNO] = 2 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $[ASB] = 4 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) antes y después de irradiar y de la proteína libre sin irradiar ( $[ASB] = 4 \times 10^{-5} \text{ M}$ )

Además, se registraron los espectros de emisión de fluorescencia de las mezclas de NQNO y ASB tras filtrar por Sephadex<sup>®</sup>, obteniéndose los **Gráficos 37-38**.

En el espectro de fluorescencia, cuando se excita a 365 nm, de nuevo se observa el aumento de la intensidad de emisión al irradiar tras la filtración con Sephadex<sup>®</sup>. También se puede ver una diferencia en la intensidad de emisión entre la disolución irradiada y filtrada y la disolución filtrada sin irradiar. Esto indica la presencia de un compuesto que se ha unido a la proteína tras irradiar y que pasa junto a esta al ser filtrada ya que no se retiene como una molécula pequeña.



**Gráficos 37-38.** Espectros de emisión de fluorescencia tras la filtración con Sephadex<sup>®</sup> de las mezclas NQNO-ASB 1-2 eq ( $[NQNO] = 2 \times 10^{-5}$  M;  $[ASB] = 4 \times 10^{-5}$  M) antes y después de irradiar y de la proteína libre sin irradiar ( $[ASB] = 4 \times 10^{-5}$  M), excitando con el fluorímetro a 295nm (izquierda) y a 365 nm (derecha)

Así pues, se observa tanto en ASH como en ASB una unión inducida por luz (fotounión) de la NQNO con la proteína, posiblemente a través de su residuo de Trp.

## 6. PLAN FUTURO

---

Durante la realización del proyecto se han ido obteniendo una serie de resultados lo suficientemente concluyentes como para confirmar la interacción de la NQNO tanto con Trp libre como en el entorno de las proteínas ASH y ASB.

Por este motivo, se plantea la posibilidad de poder ampliar el estudio de estas interacciones aislando el fotoproducto formado mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Por la duración limitada de horas de laboratorio en la realización de la parte experimental, se trabajó con el equipo de HPLC y se empezó la separación cromatográfica del fotoproducto obtenido en la irradiación de la NQNO, pero no fue posible concluir dicho experimento por falta de tiempo. El tiempo invertido en esta técnica se dedicó a buscar las condiciones óptimas de separación y elución de los productos de la reacción.

Asimismo, de cara a futuros experimentos para completar los estudios en cuestión, una vez aislado el fotoproducto por HPLC, se caracterizará por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) de protón y carbono.

Y además, se realizarán estudios proteómicos para caracterizar las posibles modificaciones generadas en las proteínas después de ser irradiadas en presencia de NQNO. Con estos experimentos será posible caracterizar el lugar de unión NQNO-proteína así como la estructura del fármaco o fotoproducto unido a la proteína.

## 7. CONCLUSIONES

---

El presente trabajo de fin de grado tenía como objetivo general realizar un estudio de la interacción fotoinducida entre un fármaco, la 4-nitroquinolina *N*-óxido (NQNO) y diferentes tipos de proteínas, albúmina sérica humana (ASH) y bovina (ASB) y un aminoácido, el L-Triptófano (Trp).

Una vez realizados todos los experimentos y estudios detallados en esta memoria, se han analizado y explicado los resultados obtenidos, de los cuales se extraen las siguientes conclusiones:

- Mediante los estudios de interacción de la NQNO con Trp, ASH y ASB, se ha observado la formación de un exciplexo entre la NQNO y el Trp ( $\text{Trp}^* \cdots \text{NQNO}$ ), tanto en disolución como formando parte de las proteínas ASH y ASB. Evidencias de este complejo se encuentran en los espectros de emisión de fluorescencia, en los que se observa la aparición de una nueva banda a 420 nm a medida que se aumenta la concentración de NQNO que no se corresponde con la banda característica de emisión de la NQNO ni con la del Trp. La formación de dicho complejo se confirma con los espectros de excitación obtenidos.
- A partir de los estudios de medición de los tiempos de vida de fluorescencia de cada una de las mezclas NQNO:ASH/ASB, se han obtenido las constantes de desactivación del proceso. Estas constantes en ambos casos han sido mayores de  $10^9$  ( $k_q \sim 10^{11} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), por lo que se confirma un proceso de desactivación del singlete del triptófano, en ambas proteínas, muy eficiente. Además, como estos resultados se obtienen tanto utilizando la ecuación de Stern-Volmer con intensidades como con tiempos de vida, se concluye que el proceso de desactivación es dinámico.
- Por otro lado, en los estudios de fotoreactividad se observa la formación de un fotoproducto de la NQNO en disolución de PBS. Este resultado se contrasta con lo obtenido al irradiar la NQNO en presencia de Trp, ASH y ASB y se comprueba que en los tres casos la intensidad de emisión del fotoproducto formado aumenta durante un tiempo determinado para después disminuir y dar lugar a un segundo fotoproducto.
- Además, se observa que el medio proteico quiral de cada una de las proteínas con residuos de triptófano influye en la fotoreactividad de la NQNO, acelerando la formación del fotoproducto formado que parece ser el mismo en todos los casos. La fotoreacción más rápida se da para la ASB (10 minutos de irradiación), seguida de la ASH (20 minutos) y siendo algo más lento para la NQNO en presencia de Trp en disolución (30 minutos). Por lo tanto, se puede concluir que, el confinamiento de la NQNO dentro de la proteína favorece la interacción NQNO:Trp.
- La unión covalente fotoinducida entre la NQNO (o un fotoproducto) y la ASH y/o la ASB se confirma con la filtración en gel Sephadex<sup>®</sup>. En este tipo de filtración, si no existiese la formación de un aducto, los resultados obtenidos tras la misma serían los espectros de absorción y emisión propios de cada una de las proteínas, ya que la NQNO quedaría retenida. En cambio, para ambas proteínas irradiadas en presencia de la NQNO, se observa la aparición de un aducto (NQNO-proteína) que presenta un espectro de absorción y de emisión característico y distinto a los de las proteínas y la NQNO por separado.

- Finalmente, se observa que la emisión del Trp en mezclas NQNO-proteína excitadas a 295 nm disminuye por formación de un exciplexo y, cuando las mezclas se irradian a 355 nm, la disminución de la emisión del Trp aumenta porque el Trp desaparece, aún más, al formar un aducto con la NQNO o su derivado.

En términos generales, se puede confirmar la formación de un fotoproducto resultante de la interacción entre la 4-nitroquinolina *N*-óxido tanto con el L-Triptófano, como con las albúminas séricas, humana y bovina (ASH y ASB). Esta interacción se evidencia por la detección del exciplexo (Trp\* $\cdots$ NQNO).

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Turro, N. J., Ramamurthy, V., & Scaiano, J. C. (2010). *Modern Molecular Photochemistry of Organic Molecules*. Sausalito, California, United States: University Science Books.
2. Heinrich Hertz, destacado científico del siglo XX que pudo demostrar la propagación de la radiación electromagnética. (s.f.). Recuperado de <http://www.fondecyt.gob.pe/fondecyt-informa/heinrich-hertz-destacado-cientifico-del-siglo-xx-que-pudo-demostrar-la-propagacion-de-la-radiacion-electromagnetica>
3. Grupo de Innovación Docente en Operativa de Laboratorios Químicos. (s.f.). *Reacciones fotoquímicas. Fundamento de la técnica*. Recuperado de <http://www.ub.edu/talq/es/node/259>
4. Luna, M. M. (2018). *Trabajo Fin de Grado en Ingeniería Química. Estudio mecanístico de la fotodegradación de contaminantes fenólicos empleando sales de quinolinio y acridinio como fotocatalizadores orgánicos*. Valencia, España: Universitat Politècnica de València.
5. Jaffé, H. H., & Miller, A. L. (1966). *The Fates of Electronic Excitation Energy*. *Journal of Chemical Education*, 43(9), 469–473.
6. Albini, A., & Alpegiani, M. (1984). *Photochemistry of the N-Oxide Function*. *Chemical Reviews*, 84(1), 43–71.
7. Albini, A. & Pietra, S. (1991). *Heterocyclic N-oxides*. CRC Press Florida, USA.
8. Albini, A.; Fasani, E. & Dacrema, M., *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 2738-2742 (1980).
9. Scaiano, J.C. & Burcher, G., *J. Phys. Chem.* 176-179 (1987).
10. Winkle, S.A. & Tinoco, I., *J. Biochemistry.* 17, 1352-1356 (1978).
11. Nakahara, W., Fukuoka, F., & Sugimura, T. (1957). *Carcinogenic action of 4-nitroquinoline-N-oxide*. *Gann*, 48, 129–137.
12. Ochiai, E., and Sei, S.: *J. Pharmac. Soc. Japan*, 65, 18 (1945).
13. Durán-Giner, N., Carlotti, B., Clementi, C., Elisei, F., Encinas, S., & Miranda, M. A. (2019). Estudios espectroscópicos de absorción transitoria en el 4-nitroquinolina N -óxido: de femtosegundos a escala de tiempo de microsegundos. *Spectrochimica Acta. Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 216, 265–272.
14. Introducción a las proteínas y los aminoácidos. (s.f.). Recuperado de <https://es.khanacademy.org/science/biology/macromolecules/proteins-and-amino-acids/a/introduction-to-proteins-and-amino-acids>

15. Moreno, S. F. (s.f.). Aminoácidos y Proteínas. *Temas Selectos de Bioquímica General* (pp. 70–88). Recuperado de <http://www.dagus.uson.mx/smoreno/4%20Amino%C3%A1cidos%20y%20Prote%C3%ADnas.pdf>
16. Timberlake, K. C. (2011). *Química: Una Introducción a la Química General, orgánica y biológica*. Madrid, España: Pearson Educación S.A.
17. Sugio, S., Mochizuki, S., Noda, M., & Kashima, A. (1999). Crystal structure of Human Serum Albumin. Recuperado de <http://www.rcsb.org/structure/1AO6>
18. McIntosh, J. (2018, 2 febrero). ¿Qué es la serotonina y cuál es su función? Recuperado 28 noviembre, 2019, de <https://www.medicalnewstoday.com/articles/291259.php>
19. Protein Data Bank, Majorek, K.A., Porebski, P.J., Dayal, A., Zimmerman, M.D., Jablonska, K., Stewart, A.J., Chruszcz, M., Minor, W, R. C. S. B. (1970, 1 enero). RCSB PDB - 3V03: Crystal structure of Bovine Serum Albumin. Recuperado 3 diciembre, 2019, de <http://www.rcsb.org/structure/3V03>
20. Espectrometría ultravioleta-visible. (s.f.). Recuperado de [https://www.espectrometria.com/espectrometra\\_ultravioleta-visible](https://www.espectrometria.com/espectrometra_ultravioleta-visible)

## ÍNDICE DEL PRESUPUESTO

<b>1. PRESUPUESTO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. MANO DE OBRA</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. REACTIVOS Y DISOLVENTES</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3. MATERIAL FUNGIBLE</b> .....	<b>2</b>
<b>1.4. MATERIAL NO FUNGIBLE</b> .....	<b>3</b>
<b>1.5. EQUIPOS</b> .....	<b>4</b>
<b>1.6. PRESUPUESTO EN BASE DE LICITACIÓN</b> .....	<b>4</b>

Caracterización espectroscópica, a través de técnicas de absorción y emisión, de la interacción  
fotoinducida entre N-óxidos heterocíclicos y proteínas

---

# **DOCUMENTO II**

# **PRESUPUESTO**

## 1. PRESUPUESTO

---

El presupuesto es el segundo documento del presente TFG y en él se refleja el coste total del proyecto.

Se ha dividido en seis capítulos para diferenciar las diferentes unidades de obra que lo componen. Así, se calcula el precio unitario de cada unidad de obra y, posteriormente, en el capítulo 6 se procede al cálculo del presupuesto en base de licitación, en el que se determinará el coste total del trabajo realizado.

Los datos de los precios de cada uno de los componentes de las distintas unidades de obra se han obtenido de los catálogos correspondientes de cada fabricante.

### 1.1. MANO DE OBRA

El primer capítulo del presupuesto se destina al cálculo del coste de la mano de obra, es decir, en función de los operarios requeridos para la realización del proyecto, y en función de sus honorarios, se presenta la siguiente tabla:

**Tabla 1.** Mano de obra

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

Las horas de trabajo del Ingeniero Químico se fijan en función del número de créditos asignado al Trabajo Fin de Grado para el cuarto curso del Grado en Ingeniería Química.

## 1.2. REACTIVOS Y DISOLVENTES

Durante la realización del proyecto se han utilizado distintos reactivos y disolventes en función de los experimentos realizados para el estudio en cuestión.

**Tabla 2.** Reactivos y disolventes

Reactivo/Disolvente	Precio	Unidad (€/x)	Cantidad	Unidad	Coste (€)
4-nitroquinolina- <i>N</i> -óxido 98%, Sigma Aldrich	63,5	€/g	4	mg	0,25
Acetonitrilo (HPLC), Sigma Aldrich	93,6	€/L	0,5	L	46,80
Acetona	10,9	€/L	3	L	32,70
Albúmina sérica bovina, Sigma Aldrich	58,2	€/g	10	mg	0,58
Albúmina sérica humana, Sigma Aldrich	96,1	€/g	10	mg	0,96
Cloruro de guanidinio, Sigma Aldrich	0,35	€/g	20,7	g	7,25
L-Triptófano metiléster hidrociorado 98%, Sigma Aldrich	10,68	€/g	10	mg	0,11
Tampón salino de fosfato (PBS), Sigma Aldrich	1,4	€/tableta	15	tabletas	21,00
<b>Total</b>					<b>109,65 €</b>

## 1.3. MATERIAL FUNGIBLE

A continuación se presenta la tabla de precios para el material fungible, entendiéndose como tal todo aquel material que sea de un solo uso empleado en la realización del trabajo.

**Tabla 3.** Material fungible

Material fungible	Precio unitario (€)	Unidades utilizadas	Coste (€)
Bobina de papel industrial 45kg	14,67	1	14,67
Filtros Sephadex® G-25 medium	9,85	8	78,80
Guantes desechables de nitrilo sin polvo talla S 1x100	8	100	8,00
Lámina de cierre Parafilm M	28	0,2	5,60
Punta de pipeta 0,5-20 µL 1x1000	10,5	25	0,26
Punta de pipeta 20-200 µL 1x1000	10,5	25	0,26
Punta de pipeta 100-1000 µL 1x500	8,2	15	0,25
Punta de pipeta 500-5000 µL 1x100	15	30	4,50
Pipeta Pasteur de vidrio 1x250	9,6	150	5,76
Tapón de polipropileno/Vial 6 mL 1x100	15,5	100	15,50
Tapón de polipropileno/Vial 13,5 mL 1x100	29,5	60	17,70
Tapón de polipropileno/Vial 22,5 mL 1x100	49,5	12	5,94
Vial transparente 6 mL 1x100	54,5	100	54,50
Vial transparente 13,5 mL 1x100	63,5	60	38,10
Vial transparente 22,5 mL 1x100	72,75	12	8,73
<b>Total</b>			<b>258,57 €</b>

#### 1.4. MATERIAL NO FUNGIBLE

En el capítulo 4 del documento presupuesto se presenta el material no fungible, es decir, toda la instrumentación necesaria durante el trabajo en el laboratorio.

Tabla 4. Material no fungible

Material no fungible	Cantidad	Precio unitario (€)	Precio total (€)	Vida útil (años)	Amortización (€/h)	Tiempo (h)	Coste (€)
Bata de laboratorio	1	20,5	20,5	5	0,00047	300	0,14
Columna HPLC	1	675	675	2	0,03853	4	0,15
Cristalizador PYREX	1	4,25	4,25	3	0,00016	100	0,02
Cubeta de cuarzo tipo 3 roscado, paso de luz 10 mm	8	350	2800	5	0,06393	50	3,20
Espátula cuchara plana 210 mm, acero inox.	1	4	4	10	0,00005	1	0,00
Gafas de seguridad	1	8,95	8,95	5	0,00020	100	0,02
Microespátula cuchara plana 150 mm, acero inox.	1	1,55	1,55	10	0,00002	1	0,00
Micropipeta de volumen variable 2-20µL	1	75,1	75,1	5	0,00171	0,5	0,00
Micropipeta de volumen variable 10-100µL	1	75,1	75,1	5	0,00171	1	0,00
Micropipeta de volumen variable 20-200µL	1	75,1	75,1	5	0,00171	1,5	0,00
Micropipeta de volumen variable 100-1000µL	1	75,1	75,1	5	0,00171	1,5	0,00
Micropipeta de volumen variable 500-5000µL	1	75,1	75,1	5	0,00171	2	0,00
Pinzas para rótulas R-51	1	38	38	3	0,00145	8	0,01
Pinza de laboratorio recta	1	3	3	10	0,00003	1	0,00
Portacubetas de PE	1	2,25	2,25	5	0,00005	100	0,01
Probeta graduada clase A base hexagonal 250 mL	1	9,95	9,95	2	0,00057	1	0,00
Precolumna ODS	1	234,45	234,45	2	0,01338	4	0,05
Temporizador	1	9,35	9,35	2	0,00053	15	0,01
Tetina de goma para pipeta Pasteur	5	0,15	0,75	1	0,00009	100	0,01
Vaso de precipitados forma baja 100 mL	2	1,5	3	2	0,00017	10	0,00
Vaso de precipitados forma baja 250 mL	2	2,5	5	2	0,00029	10	0,00
<b>Total</b>							<b>3,63 €</b>

## 1.5. EQUIPOS

En el apartado destinado a Equipos se hace referencia a los equipos utilizados en el laboratorio, teniendo en cuenta la amortización de los equipos y las horas destinadas a su uso.

Tabla 5. Equipos

Equipo	Coste (€)	Vida útil (años)	Amortización (€/h)	Tiempo (h)	Coste (€)
Balanza digital	500	15	0,0038	3	0,011
Baño de ultrasonidos	2500	15	0,0190	1	0,019
Espectrofotómetro JASCO V-650	10000	15	0,0761	8	0,609
Espectrofluorímetro JASCO FP-8500	28000	15	0,2131	10	2,131
Espectrofluorímetro EasyLife X	20000	15	0,1522	10	1,522
Fotoreactor LuzChem	5000	15	0,0381	15	0,571
HPLC semipreparativo JASCO PU-2080	350000	15	2,6636	4	10,654
Sistema de purificación agua Milli-Q	1000	5	0,0228	1	0,023
<b>Total</b>					<b>15,54 €</b>

## 1.6. PRESUPUESTO EN BASE DE LICITACIÓN

Por último, el presupuesto en base de licitación es el que refleja el coste total del proyecto tras sumar el presupuesto de ejecución material (PEM) y el presupuesto de ejecución por contrata (PEC). El PEM contiene los impuestos asociados a Gastos Generales (13%) y Beneficio Industrial (6%), y el PEC incluye, además, el IVA (21%).

Tabla 6. Presupuesto de ejecución material (PEM)

Presupuesto de Ejecución Material (PEM)	Precio (€)
1. Mano de obra	11000,00
2. Reactivos y disolventes	109,65
3. Material fungible	258,57
4. Material no fungible	3,63
5. Equipos	15,54
<b>Total</b>	<b>11387,39 €</b>

El presupuesto de ejecución material asciende a la cantidad de **ONCE MIL TRESCIENTOS OCHENTA Y SIETE EUROS CON TREINTA Y NUEVE CÉNTIMOS**.

**Tabla 7.** Presupuesto en base de licitación

<b>Presupuesto base de licitación</b>	<b>Precio (€)</b>
<b>Presupuesto de Ejecución Material (PEM)</b>	<b>11387,39</b>
Gastos generales (13%)	1480,36
Beneficio industrial (6%)	683,24
<b>Presupuesto de Ejecución por Contrata (PEC)</b>	<b>13551,00</b>
I.V.A. (21%)	2845,71
<b>Total</b>	<b>16396,71 €</b>

Con todo esto, el presupuesto en base de licitación del proyecto asciende a la cantidad de **DIECISÉIS MIL TRESCIENTOS NOVENTA Y SEIS EUROS CON SESENTA Y SIETE CÉNTIMOS**.