



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR INGENIEROS
INDUSTRIALES VALENCIA

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

ESTUDIO DE LA FOTORREACTIVIDAD DE SISTEMAS NAPROXENO-AMINOÁCIDO EN ESPACIOS CONFINADOS

AUTOR: ANTONIO VERDASCO VIVANCOS

TUTOR: LUIS ANGEL VILLAESCUSA ALONSO

COTUTOR: IGNACIO VAYÁ PÉREZ

Curso Académico: 2018-19

AGRADECIMIENTOS

Agradecer al Dr. Luis Ángel Villaescusa y al Dr. Ignacio Vayá por darme la oportunidad y confiar en mí para desarrollar este proyecto. Con ellos he podido aprender muchísimas cosas en el mundo de la investigación en un ambiente en el que no me podía sentir más cómodo.

En concreto me gustaría agradecer a Nacho por estar tan atento a que no tuviera dudas y que entendiera en todo momento lo que estábamos haciendo. El, al igual que Luis siempre ha tenido tiempo para mí, atendiendo mis dudas y aconsejándome sin importar el día ni la hora. He tenido muchísima suerte de que hayan sido mis tutores y ojalá pudiera volver a trabajar con ellos.

Tampoco pueden faltar mis compañeros de laboratorio: Jorge, Óscar, Raúl, Vicky, Alejandro y Álex. Que siempre estuvieron ahí para solucionar mis dudas y ayudarme en el laboratorio. También mi compañero y amigo Ernesto, con quien he compartido muchos buenos momentos en el departamento.

Por último me gustaría agradecer el apoyo externo e incondicional de mi familia y mi novia Anabel, que siempre han estado ahí para animarme.

Muchas gracias a todos.

RESUMEN

En este trabajo se han estudiado las propiedades fotofísicas del antiinflamatorio no esteroideo naproxeno en diferentes entornos cuyo grado de complejidad va aumentando progresivamente. Los diferentes modelos diseñados pretenden emular las interacciones reales que tienen lugar en medios biológicos, como pueden ser en proteínas transportadoras. Así pues, se ha investigado la fotorreactividad del naproxeno en presencia de diferentes aminoácidos en entornos de distinta naturaleza: disolución orgánica, disolución acuosa en el interior de micelas y finalmente dentro de sólidos mesoestructurados (MCM-41). Además, se han sintetizado una serie de sistemas bicromofóricos (diadas) compuestos por naproxeno y tirosina y triptófano como modelos sencillos donde se fuerza la unión fármaco-aminoácido, estudiándose también sus propiedades fotofísicas en los mismos ambientes anteriormente mencionados.

La fotorreactividad de los distintos sistemas donde fármaco y aminoácido están presentes, se ha estudiado haciendo uso de técnicas espectroscópicas tales como la fluorescencia (en estado estacionario y resuelta en el tiempo) y la fotólisis de destello láser. En primer lugar, se han estudiado las diadas donde naproxeno y el aminoácido seleccionado (tirosina o triptófano) están unidos covalentemente por un enlace tipo amida. Para ello, se ha sintetizado y caracterizado químicamente cada una de las diadas, donde además se han utilizado los diferentes enantiómeros puros ((S)- o (R)- de naproxeno y/o del aminoácido) con el fin de investigar posibles diferencias en su comportamiento fotofísico por cambios conformacionales. La fotorreactividad de todos los sistemas se ha caracterizado primero en disolución orgánica y en disolución acuosa formando micelas, y finalmente en estado sólido, donde el confinamiento es presumiblemente mayor. El comportamiento fotofísico de las diadas se ha comparado con el observado de mezclas equimolares naproxeno y aminoácido en los diferentes ambientes (medio micelar y dentro de MCM-41). En general, se han observado diferencias significativas en la interacción fármaco-aminoácido en los distintos microambientes.

Palabras clave: Fármacos, aminoácidos, diadas, fluorescencia, fotólisis de destello láser, materiales mesoestructurados

ABSTRACT

In this work we have studied the photophysical properties of the non-steroidal anti-inflammatory drug naproxen in different environments whose degree of complexity is progressively increasing. The different models designed to emulate the real interactions that take place in biological media, such as transport proteins. Therefore, the photoreactivity of naproxen has been investigated in the presence of different amino acids in environments of different nature: organic solution, aqueous solution inside micelles and finally inside mesostructured solids (MCM-41). In addition, a series of bicromophoric systems (dyads) composed of naproxen and tyrosine or tryptophan have been synthesized as simple models where the drug-amino acid binding is strengthened, also studying their photophysical properties in the same environments mentioned above.

The photoreactivity of the different systems where drug and amino acid are present, has been studied using spectroscopic techniques such as fluorescence (steady state and resolved in time) and laser flash photolysis. First, dyads have been studied where naproxen and the selected amino acid (tyrosine or tryptophan) are covalently linked by an amide bond. To do this, each of the diads has been synthesized and chemically characterized, where in addition the different pure enantiomers ((S) - or (R) - of naproxen and / or amino acid) have been used in order to investigate possible differences in its photophysical behavior by conformational changes. The photoreactivity of all the systems has been characterized first in organic solution and in aqueous solution forming micelles, and finally in solid state, where the confinement is presumably higher. The photophysical behavior of the dyads has been compared with that observed for equimolar mixtures naproxen and amino acid in the different environments (micellar medium and within MCM-41). In general, significant differences in the drug-amino acid interaction have been observed in the different microenvironments.

Keywords: Drugs, amino acids, dyads, fluorescence, laser flash photolysis, mesostructured materials

RESUM:

En aquest treball s'han estudiat les propietats fotofísiques de l'antiinflamatori no esteroïdal naproxèn en diferents entorns on el grau de complexitat va augmentant progressivament. Els diferents models dissenyats pretenen emular les interaccions reals que tenen lloc en mitjans biològics, com poden ser en proteïnes transportadores. Així doncs, s'ha investigat la fotorreactivitat del naproxèn en presència de diferents aminoàcids en entorns de distinta naturalesa: dissolució orgànica, dissolució aquosa en l'interior de micel·les i finalment dins de sòlids mesoestructurats (MCM-41). A més, s'han sintetitzat una sèrie de sistemes bicromofòrics (diades) compostos per naproxen, tirosina i triptòfan com a models senzills on es força la unió fàrmac-aminoàcid, estudiant-se també les seues propietats fotofísiques en els mateixos ambients anteriorment nomenats.

La fotorreactivitat dels distints sistemes on fàrmac i aminoàcid estan presents, s'ha estudiat fent ús de tècniques espectroscòpiques com ara la fluorescència (en estat estacionari i resolta en el temps) i la fotòlisi de llampada làser. En primer lloc, s'han estudiat les diades on naproxèn i l'aminoàcid seleccionat (tirosina o triptòfan) estan units covalentment per un enllaç tipus amida. Per a això, s'ha sintetitzat i caracteritzat químicament cada una de les diades, on a més s'han utilitzat els diferents enantiòmers purs ((S) - o (R) - de naproxèn y/o de l'aminoàcid) a fi d'investigar possibles diferències en el seu comportament fotofísic per canvis conformacionals. La fotorreactivitat de tots els sistemes s'ha caracteritzat primer en dissolució orgànica i en dissolució aquosa formant micel·les, i finalment en estat sòlid, on el confinament és presumiblement major. El comportament fotofísic de les diades s'ha comparat amb l'observat en mesclures equimolars naproxèn i aminoàcid en els diferents ambients (mig micelar i dins de MCM-41). En general, s'han observat diferències significatives en la interacció fàrmac-aminoàcid en els distints microambients.

Paraules clau: Fàrmacs, aminoàcids, diades, fluorescència, fotòlisi de llampada làser, materials mesoestructurats

Contenido:

1. OBJETIVOS	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Antecedentes.....	3
2.1.1. <i>Antiinflamatorios no esteroideos</i>	3
2.1.2. <i>Proteínas y sus interacciones con fármacos</i>	5
2.1.3. <i>Procesos fotoquímicos y fotofísicos</i>	7
2.1.4. <i>Sólidos Mesoporosos: El MCM-41</i>	10
2.1.5. <i>Modelos sencillos de un ambiente proteico</i>	11
2.2. Motivación.....	13
2.3. Justificación	14
3. TÉCNICAS Y EQUIPOS DE CARACTERIZACIÓN	17
3.1 Espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible.....	17
3.2 Fluorescencia.....	18
3.3 Fotólisis de destello láser	19
3.4 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).....	21
3.5 Difracción de Rayos X	22
4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS	25
4.1 Síntesis y caracterización de diadas	25
4.1.1 <i>Síntesis de diadas realizadas</i>	25
4.1.2 <i>Procedimiento de síntesis</i>	25
4.1.3. <i>Resultados de la síntesis</i>	28
4.2 Interacciones en disolución orgánica	37
4.2.1 <i>Procedimiento experimental</i>	37
4.2.2 <i>Resultados</i>	37
4.3 Interacciones en micelas de CTAB.....	48
4.3.1 <i>Procedimiento experimental</i>	48
4.3.2 <i>Resultados</i>	49
4.4 Interacciones en estado sólido.....	59
4.4.1 <i>Procedimiento de síntesis:</i>	61
4.4.2 <i>Resultados</i>	62
5. CONCLUSIONES	71
6. BIBLIOGRAFÍA	73

7. PRESUPUESTO	77
8. ANEXOS	85
Anexo 1. Normativa.....	85
Anexo 2. Espectros de fotólisis de destello láser	87
Anexo 3. Difractogramas	90

1. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es el estudio y la caracterización de las propiedades fotofísicas del naproxeno (Npx) en medios que pretenden mimetizar un entorno biológico como son los centros de unión de proteínas. Para ello se estudiará la interacción del Npx en presencia de distintos aminoácidos en diferentes ambientes los cuáles pretenden emular las interacciones reales que toman lugar en las proteínas de transporte.

La selección de los aminoácidos utilizados a lo largo de este estudio: Triptófano (Trp), Tirosina (Tyr) e Histidina (Hist), es debido a que estos se encuentran en los sitios de unión de la albúmina sérica humana, la cuál es la proteína transportadora más frecuente en el plasma sanguíneo. El papel de la proteína juega un papel clave en la interacción con los fármacos y por ende repercute en su acción terapéutica.

La caracterización fotofísica de los sistemas fármaco-aminoácido se llevará a cabo mediante el uso de técnicas espectroscópicas como la fluorescencia y la fotólisis de destello láser, así pues, se estudiará la fotorreactividad en diversos ambientes que constituyen una serie de modelos sencillos que buscan mimetizar las interacciones que tienen lugar cuando el fármaco interacciona “*in vivo*” con la proteínas de transporte. Por ello el comportamiento de este sistema se implementará en espacios confinados que pretenden emular el microentorno generado por la proteína y que protege al fármaco de agentes externos. Así pues, los medios en los que se estudiarán serán: disolución orgánica de acetonitrilo, micelas de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y encapsulados en una matriz mesoestructurada de tipo MCM-41.

Además, con el objetivo de comprobar cuáles son las propiedades de los complejos fármaco-aminoácido, se sintetizarán sus sistemas bicromofóricos (diadas), en las cuáles ambas especies estarán unidas mediante un enlace covalente.

Así pues, se estudiarán sistemas intermoleculares fármaco-aminoácido además de sus diadas en los ambientes antes mencionados en busca de diferencias en sus propiedades fotorreactivas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Antecedentes

2.1.1. Antiinflamatorios no esteroideos

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) son una familia de fármacos extensamente recetados para el tratamiento de diversas dolencias tales como dolor general, formando parte de entre el 5 y 10% de todas las recetas prescritas en todo el mundo (Wongrakpanich, Wongrakpanich, Melhado, & Rangaswami, 2018). Estos agentes terapéuticos son capaces de tratar patologías tales como fiebres, dolores de cabeza y enfermedades degenerativas como la artritis reumatoide.

La funcionalidad de los AINE recae en su capacidad de inhibir las enzimas ciclooxigenasas (COX), las cuales catalizan la oxidación del ácido araquidónico a elementos precursores de tromboxanos, prostaglandinas y prostaciclina, que son los agentes causantes de las molestias causadas (Vayá Pérez, Jiménez Molero, & Miranda Alonso, 2005).

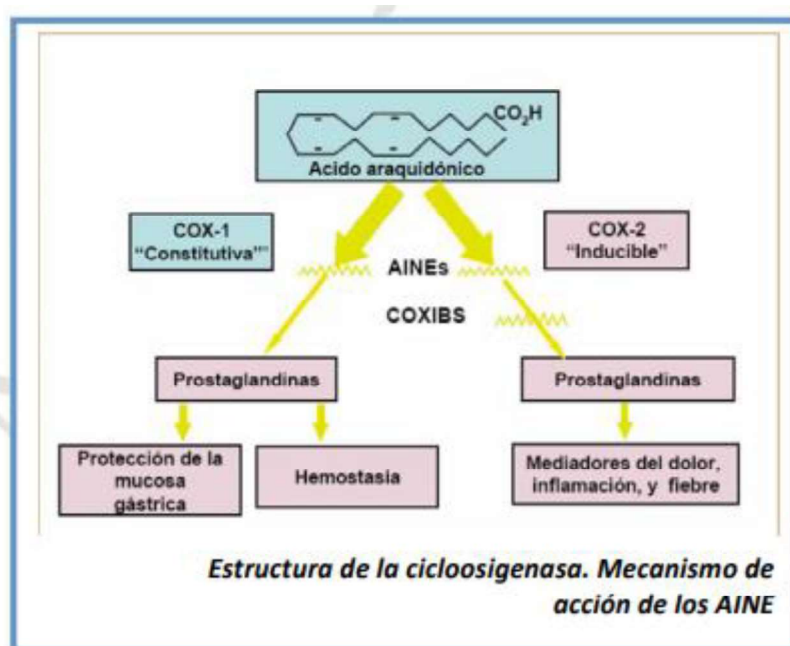


Figura 2.1. Mecanismo de acción de los AINE que provocan inhibición de los COX, los cuales son el origen de las molestias (Muriel, Santos, & Sánchez Montero, 2008).

La clasificación de los AINE se realiza en función de su estructura química, teniéndose distintas familias que en su gran mayoría son derivados de distintos ácidos: salicílico, antranílico, acético, nicotínico, arilpropiónico, etc. (Pallarés Delgado de Molina, 2000). Son precisamente estos últimos, los derivados del ácido arilpropiónico, los más conocidos y utilizados: el ibuprofeno, ketoprofeno, flurbiprofeno y naproxeno son tan sólo algunos de los fármacos que forman parte de esta familia en los AINE.

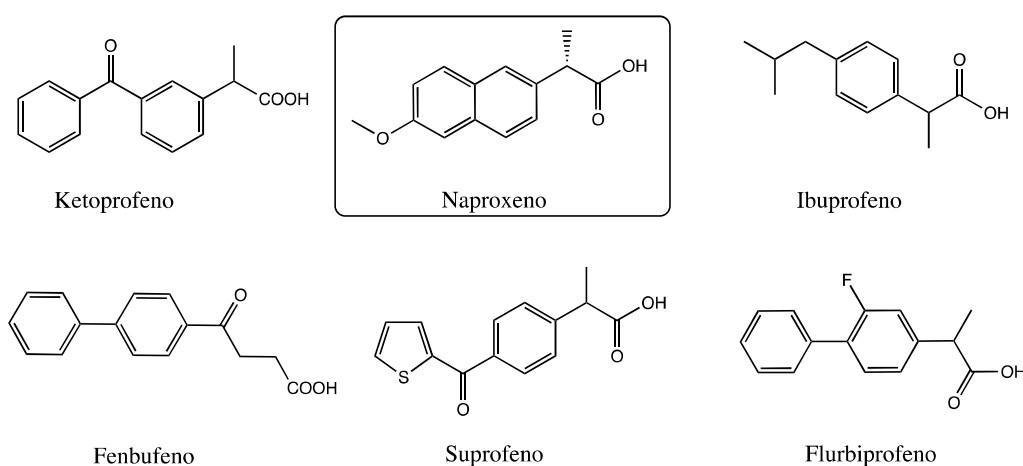


Figura 2.2. Estructura química de fármacos antiinflamatorios no esteroideos derivados del ácido arilpropiónico.

La presencia de cromóforos en su estructura puede conducir a que algunos de los arriba mencionados tengan especial tendencia a producir reacciones fotosensibles, existiendo numerosos estudios que caracterizan sus propiedades fotofísicas y fotoquímicas (absorción, emisiones en los estados excitados, rutas de fotodegradación, etc.) en disolución (Bosca, Marín, & Miranda, 2001).

Conviene mencionar que los AINEs son en su gran mayoría moléculas quirales, presentando así moléculas que pueden ser diferenciadas según la orientación de sus átomos en el espacio, teniéndose así los enantiómeros (R)- y (S)-. La gran mayoría de los AINE se comercializan como mezclas racémicas (con muy pocas excepciones, siendo una de ellas el Npx) aunque es sabido que su habilidad antiinflamatoria reside primordialmente en el enantiómero (S)- (Mascagni, y otros, 2000).

Los enantiómeros de un fármaco quiral poseen propiedades físicas y químicas idénticas en un entorno no quiral, sin embargo, en un dominio que presente quiralidad el comportamiento de las moléculas y por ende su consecuencia farmacológica difiere en función de la estereoisomería. Esto, sumado a que las biomoléculas presentes en el organismo presentan quiralidad en los lugares de unión de los fármacos, como ocurre en las proteínas transportadoras, propicia diferentes respuestas en el organismo en función de la estereoisomería del fármaco (McConathy & Owens, 2003). Es por ello que el estudio del comportamiento de los estereoisómeros de una misma molécula es de vital importancia, ya que estos exhiben diferentes grados de toxicidad, metabolismo y comportamientos farmacocinéticos (Nguyen, He, & Pham-Huy, 2006).

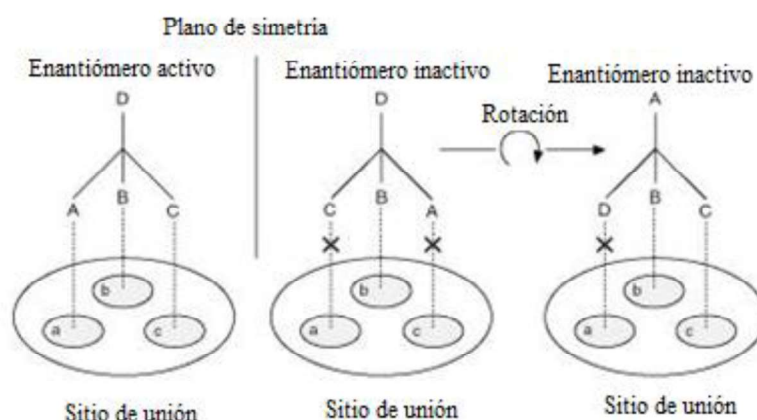


Figura 2.3. Representación de la interacción fármaco y sitio de unión; nótese que tan sólo la situación de la izquierda reacciona debido a la orientación favorable.

2.1.2. Proteínas y sus interacciones con fármacos

Las proteínas son las macromoléculas más abundantes en los organismos vivos, las cuáles controlan una gran cantidad de procesos vitales. Algunas de sus funciones son: actuar como anticuerpos frente a posibles antígenos, constituir tejidos y órganos confiriéndoles un mayor grado de resistencia, regular la expresión génica y división celular o actuar como vehículo de transporte de sustancias endógenas (ácidos grasos, bilirrubina, etc.) o exógenas (nutrientes, fármacos, etc.) (Herrero Limones, 2015).

Las proteínas están constituidas por cadenas lineales de aminoácidos, los cuales se ordenan en una secuencia que determina la estructura tridimensional de las proteínas y por ende los sitios de unión o centros activos que describirán el comportamiento de la proteína frente a distintos ligandos.

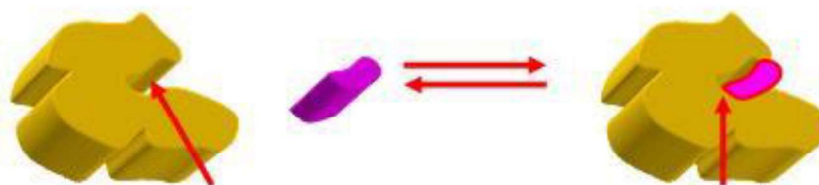


Figura 2.4. Representación de la unión de ligando y proteína en el centro activo

De entre todos los tipos de proteínas existentes, las más comunes en el plasma sanguíneo son las proteínas transportadoras, siendo en concreto una de las más relevantes de estas las albúminas séricas (AS). Estas proteínas se encargan de regular el transporte y disponibilidad de una gran cantidad de sustancias como

metabolitos, hormonas y fármacos además de ayudar a mantener la presión sanguínea y el pH estables (Lee & Wu, 2015).

La albúmina sérica humana (ASH) contiene un total de 585 aminoácidos, un único triptófano, 17 puentes de disulfuro y una cisteína libre. Esta proteína se encuentra de manera muy abundante en la sangre (3,5-4g cada 100mL de sangre) y pese a que es sintetizada en el hígado se puede encontrar en una gran cantidad de fluidos como saliva, sudor y fluido vítreo (Herrero Limones, 2015).

El tipo de interacción entre los fármacos y la ASH es especialmente relevante, ya que durante el proceso de unión es posible modificar una gran cantidad de propiedades de los fármacos así como su solubilidad en el plasma sanguíneo, su tiempo de vida en el organismo o incluso su toxicidad, debido a la liberación de ligandos durante el proceso de unión del fármaco.

Es por ello que el proceso de unión de pequeñas moléculas a la ASH ha sido objeto de estudio en el ámbito científico con el objetivo de entender el comportamiento de las proteínas de transporte además de optimizar al máximo el diseño de nuevos agentes terapéuticos con menos efectos secundarios (Vayá, Bueno, Jiménez, & Miranda, 2006). Debido a esto, una gran cantidad de técnicas como, ultrafiltración, espectrofotometría, fluorescencia, calorimetría, dicroísmo circular, electroforesis capilar o difusión por resonancia magnética han sido utilizados para conocer más de cerca cómo es la unión fármaco proteína (Vayá, Bueno, Jiménez, & Miranda, 2006).

De acuerdo a la clasificación de Sudlow, existen dos sitios de unión en ASH en los que las pequeñas moléculas orgánicas son más afines a unirse: Sitio I y Sitio II.

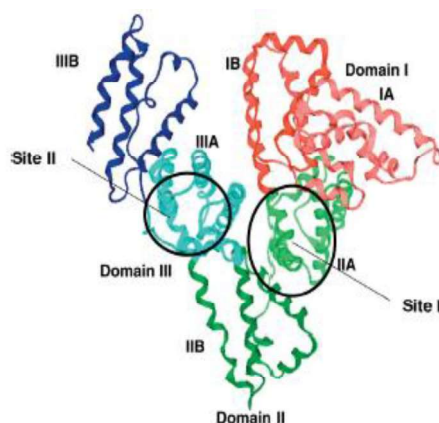


Figura 2.5. Esquema de la estructura del ASH y sus dos sitios de unión más relevantes (Basken, Mathias, & Green, 2009).

En el Sitio I se encuentra el único residuo Trp en toda la proteína; por el otro lado, el Sitio II está principalmente compuesto por los aminoácidos Hist y Tyr. Este hecho unido a la presencia de los cromóforos fenol e indol en las estructuras de la Tyr y el Trp, ha hecho posible estudiar las propiedades fotofísicas de estos, como su fluorescencia para obtener información acerca de cómo son las condiciones y el comportamiento del fármaco

en el microentorno generado por la proteína mientras están unidos (Vayá Pérez, Gustavsson, Markovisti, Miranda Alonso, & Consuelo Jiménez, 2016).

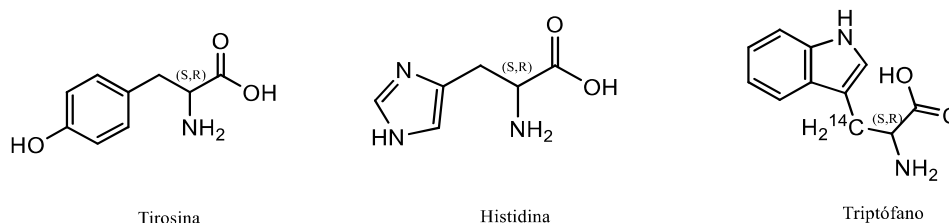


Figura 2.6. Estructura química de los aminoácidos Tirosina, Histidina y Triptófano.

2.1.3. Procesos fotoquímicos y fotofísicos

La fotoquímica es la rama de la ciencia que se encarga de estudiar los procesos químicos y cambios físicos que ocurren en la materia debido a la absorción de luz (fotones).

Dichas reacciones fotoquímicas ocurren debido a la excitación electrónica, que consiste en el cambio de los electrones a estados energéticos más altos que el estado fundamental (estado de energía más bajo posible). Todo este proceso comienza con la absorción de energía selectivamente por grupos cromóforos, que son aquellos que presentan electrones en orbitales π o n (dienos, grupos carbonilo, sistemas aromáticos, etc.).

Una vez los electrones se encuentran en el estado excitado se pueden dar las siguientes situaciones: la molécula puede cambiar su estructura química dando lugar a un nuevo producto, siendo este un proceso fotoquímico o puede volver a su estado fundamental mediante la pérdida de energía, considerándose un proceso fotofísico.

Los mencionados procesos fotofísicos no ofrecen un camino único desde el estado excitado al fundamental, sino que existen una gran cantidad de sucesiones y procedimientos entre múltiples estados energéticos, algunos de ellos acarreado la emisión de fotones (procesos radiativos) mientras que otros no necesitan de dispersión de luz para alcanzar el estado fundamental (procesos no radiativos).

Los procesos fotofísicos radiativos más importantes son:

·Absorción (ocurre en 10^{-15} s): Consiste en la captación de energía electromagnética por parte de los electrones, la cuantía de esta energía captada depende de la naturaleza de la molécula y sus grupos funcionales y/o cromóforos. Estas transferencias de energía siempre ocurren al denominado estado electrónico singlete (espín de valor 0) o al triplete (espín de valor 1), aunque estas últimas son poco comunes debido a que son consideradas transiciones prohibidas.

·Fluorescencia (ocurre en el rango de 10^{-10} s- 10^{-7} s): Emisión de radiación con longitudes de onda pertenecientes a la región ultravioleta-visible (energías con $\lambda=380-780$ nm), ésta siempre ocurre desde el primer estado excitado singlete al fundamental.

·Fosforescencia (ocurre en tiempos muy variables μ s-ms ó s): Emisión desde el primer estado energético triplete hasta el estado fundamental.

Siendo los procesos no radiativos, los siguientes:

- Conversión interna (ocurre en 10^{-11} s- 10^{-9} s): Transición energética desde un estado excitado superior a uno inferior con la consecuente diferencia de energía disipada en forma de energía vibracional y por tanto de calor. Ambos estados energéticos han de tener el mismo espín.
- Cruce de intersistemas (ocurre en 10^{-10} s- 10^{-8} s): Transiciones prohibidas entre estados que poseen diferente multiplicidad de espín. Generalmente se da desde el estado excitado singlete al triplete y desde el estado excitado triplete al estado fundamental.
- Relajación vibracional (ocurre en 10^{-12} s- 10^{-10} s): Transición energética desde un estado energético vibracional alto a uno más bajo (Herrero Limones, 2015).

Todos estos procesos son representados de manera visual en el denominado diagrama de Jablonski:

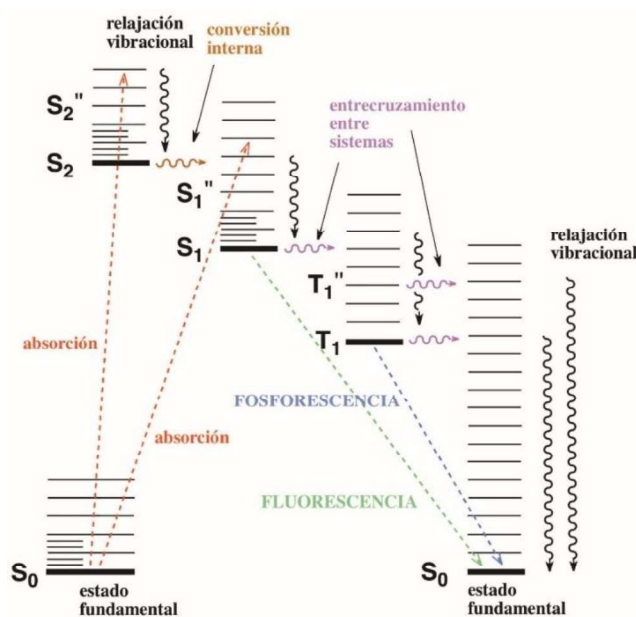


Figura 2.6. Diagrama de Jablonski; permite visualizar los múltiples procesos que pueden ocurrir desde un estado excitado (S=singlete, T=triplete) al fundamental (S_0) (Grupo GIDOLQUIM, s.f.).

Cuando dos cromóforos coexisten en un mismo medio y estos reciben energía en forma de luz, pueden suceder otros procesos que involucran a estas especies fotosensibles. Entre ellos conviene destacar:

-*Transferencia de energía:*

Este proceso ocurre cuando una de las especies cromóforas absorbe luz y tras excitarse, esta misma especie (cromóforo dador) cederá energía a otra (cromóforo aceptor) provocando la excitación del aceptor y la

desactivación del dador. El requisito para que este proceso ocurra es que el estado excitado del cromóforo dador se encuentre en un nivel de energía superior al del aceptor (Herrero Limones, 2015).

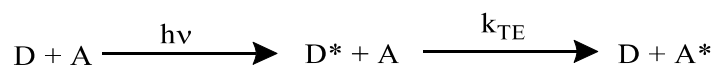


Figura 2.7. Esquema del proceso de transferencia de energía.

-Transferencia electrónica:

Este proceso ocurre cuando una de las especies que se encuentra en estado excitado reacciona cediendo o aceptando electrones de la segunda especie que permanece en su estado fundamental. Este proceso no presenta ninguna restricción, ya que la transferencia electrónica puede ser de cualquier especie a la otra y desde cualquier estado energético.

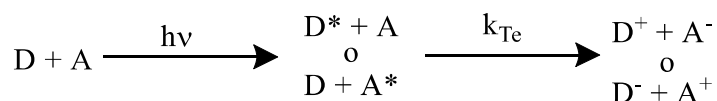


Figura 2.8. Esquema del proceso de transferencia electrónica.

-Formación de exciplejos y/o excímeros:

La formación de exciplejos es básicamente el mismo proceso que el llevado a cabo en la transferencia electrónica, sin embargo, el producto final no son especies ionizadas sino un complejo que posee cargas parciales en ambos cromóforos. Estos complejos pueden llegar a detectarse mediante medidas de fluorescencia.

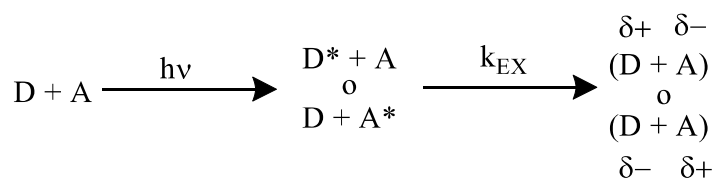


Figura 2.9. Esquema del proceso de formación de exciplejos.

El proceso de formación de excímeros es idéntico al de exciplejos, sin embargo, el primero ocurre entre cromóforos iguales y no entre cromóforos distintos, como ocurre con los exciplejos (D y A).

2.1.4. Sólidos Mesoporosos: El MCM-41

La porosidad es un parámetro que cuantifica la cantidad de cavidades, canales e intersticios presentes en el interior de un material. Dichos materiales pueden ser clasificados en función de las características que presentan dichos poros, como su forma, tamaño, porosidad o superficie específica, determinando dichos parámetros el comportamiento del material y por tanto su utilidad en distintos campos. Sin embargo, la IUPAC establece el diámetro de los poros de un material como parámetro único que clasificará un material en tres grandes grupos: microporosos ($\Phi \leq 2\text{nm}$), mesoporosos ($2\text{nm} < \Phi \leq 50\text{nm}$) y macroporosos ($\Phi > 50\text{nm}$).

Los materiales MCM son materiales porosos basados en sílice sintetizados por primera vez en el año 1992 por investigadores de la petrolera Mobil. El MCM-41 es un material mesoporoso que pertenece a dicha familia, siendo sus propiedades y formas de síntesis profundamente estudiadas. Es por ello que el MCM-41 haya sido ampliamente utilizado y estudiado en infinidad de campos de ciencia y tecnología como son: catálisis heterogénea, bioadsorción, procesos de separación de componentes, química huésped-anfitrión, encapsulado de fármacos, etc. (Bhattacharyya, Lelong, & Saboungi, 2006)

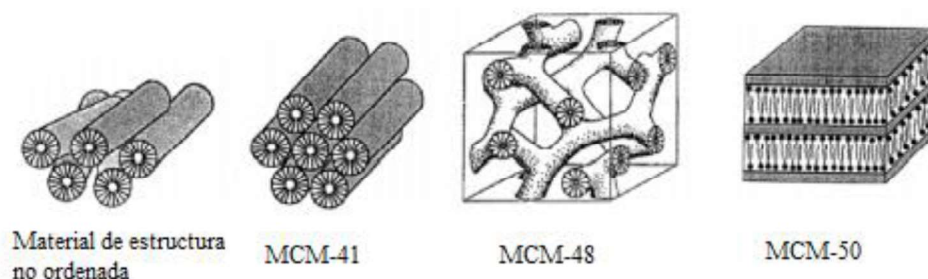


Figura 2.10. Esquema estructural de algunos sólidos MCM (Bhattacharyya, Lelong, & Saboungi, 2006).

El proceso de síntesis del MCM-41 es en general sencillo y reproducible. En el procedimiento de síntesis se requiere de los siguientes reactivos: disolvente (agua y/o etanol), precursor de la sílice (TEOS, TMOS, TBOS) y un surfactante, ocurriendo todo el proceso de síntesis en medios básico, ácido o neutral.

El mecanismo de formación del sólido MCM-41 comienza con la agrupación de las cadenas de surfactante (componentes con cabeza hidrófila y una cadena hidrocarbonada hidrofóbica) formando micelas esféricas de modo que los grupos polares y por tanto hidrófilos, se ordenan en la superficie estando en contacto con el medio acuoso, mientras que las cadenas hidrófobas interactúan entre ellas formando la micela.

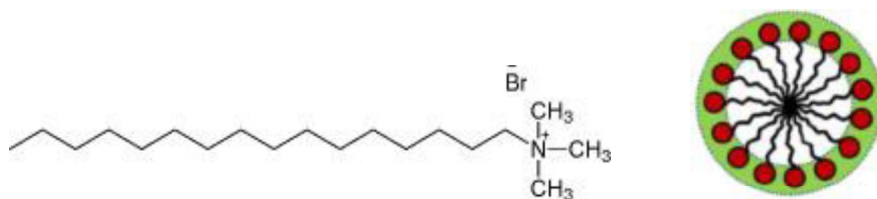


Figura 2.11. Estructura del surfactante CTAB (imagen de la izquierda). Micela de CTAB (imagen de la derecha) (Carl Roth, s.f.).

A continuación, se introducen los denominados precursores de la sílice que polimerizan en una red amorfa, formando una red inorgánica alrededor de las micelas dictada por las interacciones entre surfactante y precursor de la sílice (Bhattacharyya, Lelong, & Saboungi, 2006).

Así pues, se tiene un material mesoestructurado de tipo MCM-41. A dicho material se le puede extraer el surfactante del interior de la red inorgánica mediante calcinación u otro método para finalmente obtener el material mesoporoso MCM-41.

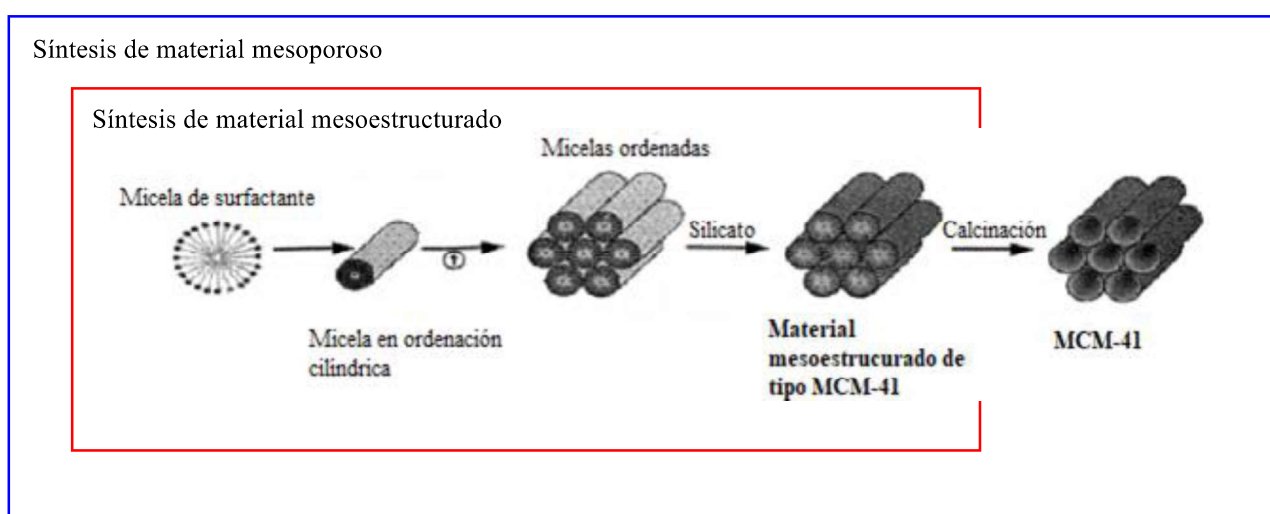


Figura 2.12. Esquema de síntesis de MCM-41 (Bhattacharyya, y otros, 2006).

2.1.5. Modelos sencillos de un ambiente proteico

La interacción de fármacos y proteínas es actualmente un relevante campo de investigación debido a que el conocimiento y entendimiento de los mecanismos que dan lugar a los complejos fármaco-proteína pueden conducir no sólo al diseño de medicamentos más efectivos sino también contribuir al hecho de evitar reacciones adversas como son las fotoalérgicas y fototóxicas.

Numerosos estudios fotofísicos de dichos sistemas fármaco-proteína ya han arrojado luz en determinados aspectos como son el grado de ocupación en los distintos sitios de unión de proteínas de transporte muy

importantes como son la ASH, obteniéndose información acerca de la afinidad de algunos fármacos a los distintos sitios de unión que ofrecen las proteínas para formar el complejo (Vayá Pérez, Jiménez Molero, & Miranda Alonso, 2008).

Dichos estudios fotofísicos ofrecen información relevante que puede aclarar detalles muy específicos debido a que existen parámetros como las transiciones energéticas del triplete que son altamente sensibles a cuál es el microentorno al que está expuesto el compuesto cromóforo (Jiménez Molero, Miranda Alonso, & Vayá Pérez, 2005).

El mencionado microentorno proteico es altamente complejo por la cantidad de aminoácidos existentes. Además, es conocido que las proteínas varían su conformación con la unión de pequeñas moléculas variando así su estructura mediante la rotación de las cadenas que la conforman en multitud de estados dinámicos que asimismo, dependen de la naturaleza de los ligandos unidos. La estructura de la proteína puede ser resuelta mediante métodos computacionales altamente complejos, y aun limitando mucho los ligandos utilizados en la unión existe variabilidad en los resultados (Guizado, 2014).

A toda esta complejidad y variabilidad que presentan las proteínas en cuanto a las condiciones que ofrecen y afectan a la actividad de los fármacos, se le debe añadir otro factor: la estereoquímica es un principio clave que puede marcar la diferencia en la acción farmacológica (McConathy & Owens, 2003).

Por una parte, los fármacos AINE deben su acción antiinflamatoria principalmente al enantiómero (S)- (Jiménez Molero, Miranda Alonso, & Vayá Pérez, 2005). Normalmente se comercializan como mezclas racémicas, pero existen excepciones como el Npx, que es el único se vende en su forma enantioméricamente pura (S)-. Por otro lado, los aminoácidos también poseen quiralidad, pudiendo estar en su forma (S)- o (R)-. Generalmente, en el cuerpo humano se encuentran en su forma (S)-, sin embargo, en las bacterias pueden existir en su forma (R)- (Pearson Education, s.f.). El entendimiento del comportamiento de todas combinaciones enantioméricas fármaco-aminoácido es decisivo para el correcto diseño de un fármaco, ya que se pueden originar numerosas circunstancias que provoquen los enantiómeros no convencionales entren en juego.

En la literatura existen numerosos estudios sobre las interacciones de un elevado número de fármacos y proteínas de transporte (Vuignier, Schappler, Veuthey, & Martel, 2010). Sin embargo, como ya se ha comentado, la variabilidad y complejidad de dichos sistemas es muy elevada, y por ende no se tiene un conocimiento exacto sobre el microentorno en el que se encuentra unido el fármaco en la proteína.

Por esta razón se considera interesante el diseñar modelos que sean capaces de mimetizar con la mayor precisión posible el microentorno generado por una proteína, que es donde va a interaccionar el fármaco. Dicho microentorno deberá ser fijo y manipulable para eliminar toda la mutabilidad y complejidad que exponen las proteínas.

Las dimensiones de diferentes proteínas han sido determinadas mediante centrifugación diferencial combinada con cromatografía de exclusión molecular y tinción negativa, obteniéndose valores de entre 5 y 10nm, dependiendo de la proteína (Erickson, 2009). Este rango es del mismo orden de magnitud que el diámetro de una micela que origina un material mesoporoso como el MCM-41, por lo que introducir un fármaco en este espacio conjunto a un aminoácido con el que se sabe que tiene tendencia a unirse, podría ser un primer paso para el diseño de un modelo sintético de proteína.

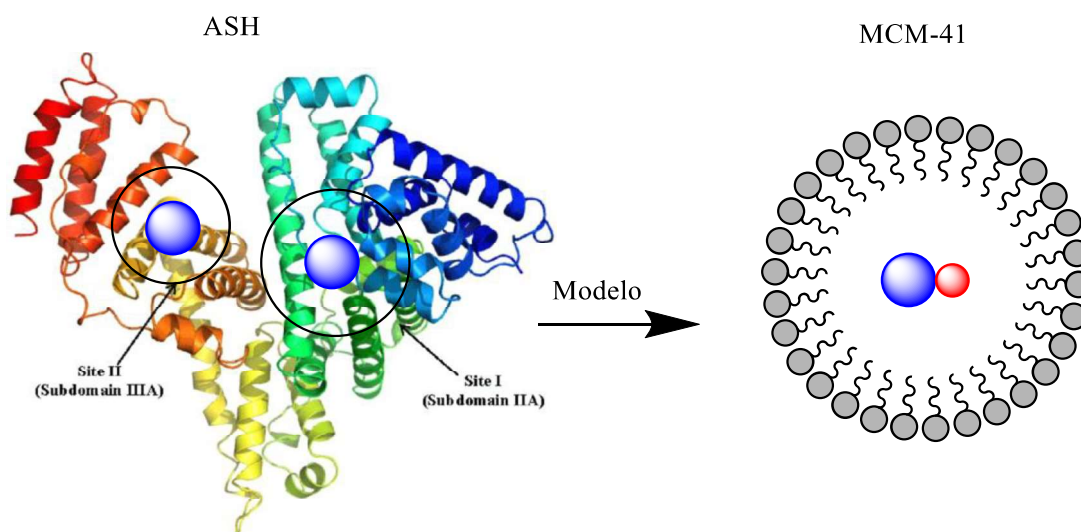


Figura 2.13. Representación esquemática del modelo de interacción fármaco (bola azul) y proteína mediante la encapsulación del fármaco en un espacio confinado originado mediante una micela/poro proveniente de una estructura de tipo MCM-41 con un aminoácido (bola roja).

Sin embargo, la formación del complejo fármaco-aminoácido tal y como ocurre en el arquetipo originado por la proteína no es asegurada. Es por ello que en dichos sistemas confinados no sólo se introducirán el medicamento y aminoácido de manera separada, sino que además se sintetizarán otros sólidos en los que se encapsularán diadas, las cuales consisten en una molécula bicromofórica donde fármaco (Npx) y aminoácido quedan covalentemente unidos mediante un enlace tipo amida.

En trabajos previos ha quedado demostrado que el uso de diadas fármaco-aminoácido son buenos modelos sencillos donde se satisfactoriamente se simulan las interacciones que ocurren a nivel biológico entre el fármaco y la proteína, siendo los procesos fotofísicos observados en las diadas muy similares a los detectados a nivel macromolecular.

2.2. Motivación

Este trabajo de fin de grado se ha realizado con carácter puramente académico, en el cual alumno ha hecho uso de un conjunto de técnicas y conocimientos expuestos en diversas asignaturas a lo largo del Grado de Ingeniería Química.

La realización de este trabajo ha sido una valiosa ocasión para que el alumno pudiera escoger un campo de investigación de interés propio y poner en práctica numerosas competencias adquiridas durante la realización del grado. Es por ello que resulta interesante destacar cuáles son las asignaturas que han motivado a escoger este tema y cómo las enseñanzas impartidas en dichas materias han podido ser aplicadas de manera práctica.

Las asignaturas de *Química*, *Química-Física* y *Química Orgánica* han sido los pilares fundamentales en los que se ha basado este trabajo. En *Química* se aprendieron las nociones básicas: cálculos estequiométricos, interacciones inter e intramoleculares, principios de la fotofísica... Por el otro lado, en *Química-Física* se

estudiaron temas más específicos que han resultado claves en este trabajo, como son las formaciones micelares, principios tensoactivos y propiedades físicas de sustancias, etc. Por último, en *Química Orgánica* se obtuvieron conocimientos acerca de protocolos de síntesis.

En *Ciencia de Materiales* y *Ampliación de Ciencia de Materiales* se estudiaron los diferentes tipos de celdas unidad y las bases de la técnica de difracción por rayos X.

En *Tecnología del Medio Ambiente* y *Gestión de Contaminantes* se aprendió acerca de la normativa ambiental y de cómo gestionar residuos de manera conveniente.

Proyectos de Ingeniería Química permitió al alumnado obtener los conocimientos técnicos para realizar el presupuesto de un proyecto, informando así del alcance económico que acarrea el trabajo de investigación llevado a cabo.

Por último, mencionar el importante papel que han jugado las asignaturas de *Experimentación* y *Laboratorios Integrados* que han aportado habilidad y conocimiento acerca de cómo debe realizarse el trabajo en laboratorio de manera segura y eficiente.

Pese a que estas son las asignaturas que han impartido el contenido más relacionado con el presente trabajo, existen muchas otras materias que han instruido en mayor o menor medida en numerosos aspectos que han sido necesarios para la realización y ejecución de este estudio.

2.3. Justificación

El dolor de origen músculo-esquelético es actualmente uno de los motivos de consulta más frecuente, y para paliarlo los AINEs son la solución más extendida debida a su actividad analgésica, antiinflamatoria y antipirética. Su uso tanto en dolencias crónicas como agudas es extendido por todo el mundo, encontrándose en España dentro de los primeros 15 grupos de medicamentos con mayor consumo.

De entre todos los AINEs, el conjunto de los derivados del ácido son los de mayor consumo, siendo el ibuprofeno el más empleado. Sin embargo, el consumo de estos está disminuyendo de manera muy acelerada los últimos años, en concreto el consumo de los AINEs ha bajado casi un 13% entre 2013 y 2016.

Pese a la evidente caída en el consumo de los AINEs, el naproxeno está experimentando una subida más que notable, concretamente casi un 40% de aumento desde el 2013 al 2016 (Agencia española de medicamentos y productos sanitarios, 2017).

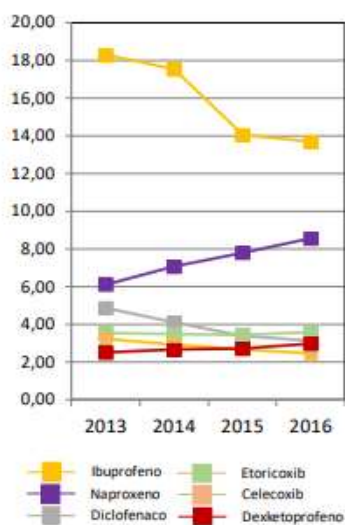


Figura 2.12. Consumo por cada mil habitantes y día de AINEs desde el 2013 al 2016 (Agencia española de medicamentos y productos sanitarios, 2017).

Es por ello, que el hecho de que el naproxeno sea un fármaco que forma parte de un grupo tan relevante, unido a que su consumo está creciendo estos últimos años, favorece su elección como fármaco a estudiar.

En concreto, como fármaco es especialmente conveniente estudiar cómo son las interacciones con las proteínas, siendo este un campo muy relevante en farmacología, debido a que las propiedades de los fármacos varían enormemente en función de su interacción con las proteínas de transporte; como son la solubilidad de este en el plasma sanguíneo, la toxicidad, susceptibilidad a la oxidación, parámetros farmacocinéticos, etc. Estos son tan sólo algunos ejemplos de parámetros que pueden variar en función del tipo de interacción que establecen fármaco y proteína. Por ello, la obtención de información y datos acerca del comportamiento de un fármaco “in vivo” es esencial para el diseño y/o mejora de agentes terapéuticos, siendo así este tipo de estudios de *interés industrial*, ya que están enfocados a la mejora o creación de productos comerciales.

La falta de conocimiento acerca de cuáles son los procesos que acarrea la ingesta de un fármaco puede conducir a problemas severos que pueden causar efectos muy perjudiciales en el organismo humano.

La fototoxicidad es un hecho que se manifiesta cuando fármacos denominados fotosensibles absorben luz en la región ultravioleta y emiten energía dentro del organismo, pudiendo causar daño celular. Por otro lado, las reacciones fotoalérgicas son aquellas que causan cambios estructurales en fármacos fotosensibles (que pueden ser ingeridos o aplicados de forma tópica), formando haptenos, que son moléculas que por sí solas no generan la formación de anticuerpos pero pueden estimular una respuesta inmunitaria al unirse con proteínas como la albúmina sérica, pudiendo generar náuseas, ampollas y quemaduras (Allen, 1993).

El naproxeno es un fármaco fotosensible y se ha comprobado que mediante estudios fotofísicos se pueden realizar estudios mecanísticos que indican cuáles son el conjunto de procesos que conducen al desarrollo de fotoalergias (Vayá Pérez I. , y otros, 2015). La caracterización de sus propiedades fotofísicas mediante la modelización del ambiente “in vivo” que crea la proteína podría dar información relevante acerca de la formación de complejos causantes de fotoalergias siendo así un estudio de *interés biológico*.

3. TÉCNICAS Y EQUIPOS DE CARACTERIZACIÓN

3.1 Espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible

Esta técnica de espectroscopía molecular se basa en la absorción de radiación en la región del UV-visible, la cual puede producir transiciones electrónicas desde el estado basal o fundamental a determinados estados excitados. Estas transiciones ocurren debido a la absorción de luz por parte de los ya mencionados grupos cromóforos.

Además, las moléculas pueden presentar en su estructura grupos auxocromos, que no pueden absorber luz por sí solos pero pueden modificar los picos de absorción propiciados por los cromóforos hacia longitudes de onda más largas, además de poder aumentar sus intensidades. Los auxocromos son grupos cargados positivamente, siendo los grupos metilo, halógeno, hidroxilo, alcoxi y amino algunos ejemplos de estos.

El funcionamiento de esta técnica es bastante sencillo, y consiste básicamente en iluminar una muestra con luz blanca y mediante un monocromador, fraccionar dicha luz blanca en radiaciones de distintas longitudes de onda en el espectro visible. A continuación, se monitoriza la fracción absorbida mediante la diferencia en la luz emitida por el equipo y la reflejada por la muestra, que es cuantificada por una matriz de fotodetectores, obteniendo finalmente un espectro que representará la cantidad de luz absorbida en función de la longitud de onda incidente en la muestra, siendo dichas longitudes de onda pertenecientes a la región ultravioleta-visible del espectro electromagnético.

El espectro electromagnético se compone de diversas regiones las cuales se ordenan según la longitud de onda que presentan las distintas radiaciones determinando así su energía.

Así pues, se clasifican de mayor a menor energía transportada en: rayos gamma, rayos X, luz ultravioleta, luz visible y rayos infrarrojos, hasta llegar a radiaciones con longitudes de onda muy largas como la microondas o las ondas de radio.

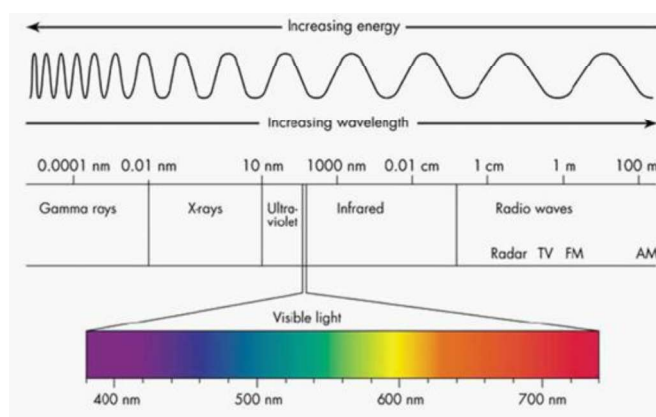


Figura 3.1. Espectro electromagnético según la longitud de onda y energía transportada (Universitat de Barcelona, 2014).

Esta técnica de espectrofotometría se rige por la Ley de Lambert-Beer, la cual establece que la absorbancia de una muestra está directamente relacionada no sólo con la naturaleza de la muestra, sino además con su concentración. Esto ocurre debido a que, obviamente, el aumento de la cantidad de moléculas cromóforas en un determinado medio aumentará la cantidad de luz absorbida por las mismas. Es por ello que la longitud (l , en cm) de la cubeta insertada en el equipo y la concentración molar (C , en $\text{mol} \times \text{L}^{-1}$) de la misma son parámetros que aparecen en la ecuación de Lambert-Beer. Además, esta utiliza otro factor denominado absorptividad molar (ϵ , en $\text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) que relaciona la absorbancia con la naturaleza del cromóforo y otros factores asociados a las condiciones en las que se encuentra (pH, temperatura, etc.).

$$A = \epsilon * C * l \quad (\text{ec. 1})$$

El espectrofotómetro empleado en este trabajo es el modelo Jasco V-650, de doble haz, equipado para escanear en un rango de 200-900nm, con alta estabilidad de la línea base, bajo ruido y estabilidad óptica.



Figura 3.2. Espectrofotómetro ultravioleta-visible utilizado durante la realización de este proyecto.

3.2 Fluorescencia

La absorción de energía en forma de luz por especies cromóforas provoca transiciones electrónicas en dicha molécula hacia estados energéticos más altos. Una vez el electrón se encuentra en el estado electrónico excitado se pueden dar una serie de procesos radiativos o no radiativos que pueden involucrar diferentes estados excitados (singletes, tripletes, etc.), para de nuevo regresar al estado fundamental (véase el apartado: 2.1.3. *Procesos fotoquímicos y fotofísicos*).

La fluorescencia es el fenómeno asociado con la transición directa generalmente desde el primer estado excitado singlete al estado fundamental, mediante un proceso radiativo en el que la diferencia energética se traduce en la emisión de fotones.

Los dispositivos capaces de obtener parámetros característicos de la fluorescencia de compuestos son denominados fluorímetros. Durante la realización de este trabajo se utilizaron dos de estos equipos: el espectrofotómetro de fluorescencia en estado estacionario y el de tiempo resuelto (ver **Figura 3.3**).

El espectrofotómetro de fluorescencia en estado estacionario comienza con la selección de la longitud de onda de excitación de una muestra por parte del usuario. A continuación, se registran en el detector la intensidad fotones con distintas energías provenientes del proceso de fluorescencia. El equipo representa la intensidad (que da información acerca de la cuantía) de los fotones emitidos en función de su longitud de onda característica, obteniéndose finalmente un espectro.

En cambio, el fluorímetro de resolución temporal proporciona información sobre la velocidad en la que se emiten fotones en una muestra. Así la intensidad de los fotones emitidos en el proceso de fluorescencia es medida en función del tiempo, pudiendo obtener información acerca de los tiempos de vida de los fotones emitidos en una muestra después de un pulso de excitación, que es controlado por el usuario.

El espectrofotómetro de estado estacionario es el modelo FP-8500 de la marca JASCO, el cual dispone de: dos monocromadores con anchura de banda seleccionable para excitación y emisión, una lámpara de Xenón de 150W y un rango de medida ofrecido desde los 200 hasta los 750nm con una resolución de hasta 1nm.

El espectrofotómetro de resolución temporal es el modelo EasyLife X[®] de la casa HORIBA, capaz de medir tiempos de vida desde los 150ps hasta los 4 μ s, con posibilidad de insertar lámparas de excitación desde los 265 hasta los 670nm con selección de longitudes de onda concretas mediante la inserción de filtros de manera manual.



Figura 3.3. Espectrofotómetro de estado estacionario (imagen de la izquierda) y de resolución temporal (imagen de la derecha) utilizado durante la realización de este proyecto.

3.3 Fotólisis de destello láser

La fotólisis de destello láser (FDL) es una técnica espectroscópica utilizada para estudiar la absorción de especies transitorias de una muestra, la cual es excitada con un haz de luz proveniente de un láser pulsado de alta intensidad. Dicho láser genera especies como radicales, iones o estados excitados triplete que tienen un tiempo de vida del orden de microsegundos, pero son capaces de generar cambios en la absorción de luz ofrecida por la muestra.

De manera simultánea a la irradiación de la muestra con el láser, ésta es iluminada con un haz analizador formado por una lámpara de Xenón y un detector UV-vis, que informarán acerca de la formación de especies transitorias.

Esto es debido a que el sistema de fotólisis actúa como si fuese un doble haz, uno de referencia y otro de muestra, los cuáles están separados en el tiempo. La diferencia de intensidad medida por el detector UV-vis entre la muestra antes (I_0) y después (I_t) del disparo permitirá obtener la diferencia de absorción.

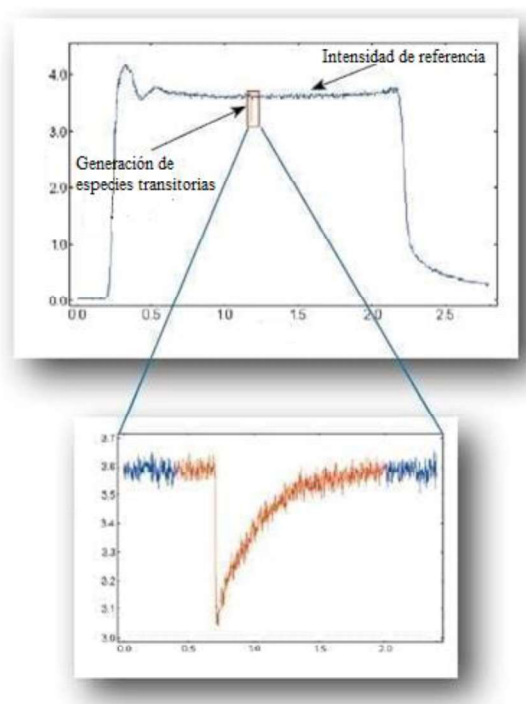


Figura 3.4. Funcionamiento de obtención de señal del FDL (EDINBURGH INSTRUMENTS, s.f.).

La diferencia de absorción es obtenida mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta A = -\log\left(\frac{I_0}{I_t}\right) \quad (ec. 2)$$

Además, estos equipos tienen un detector de señales monocromáticas que posibilita la obtención de medidas de tiempo y longitudes de onda. Es por ello que las medidas ofrecidas por estos equipos permiten obtener no sólo los tiempos de vida de especies transitorias, sino además espectros de absorción en función la longitud de onda y del tiempo en que han sido registrados.

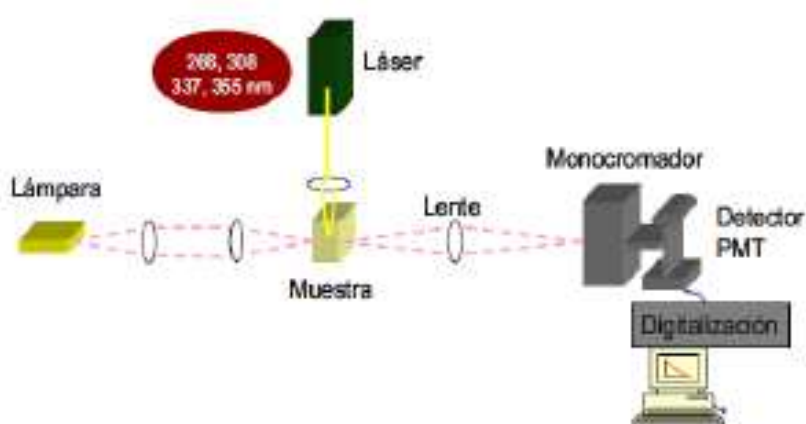


Figura 3.5. Esquema de un sistema de fotólisis de destello láser (Mayo Tamarit, 2018).

El equipo de fotólisis de destello láser utilizado para este trabajo consta de un sistema láser Nd-YAG de 266, 355 o 532nm.

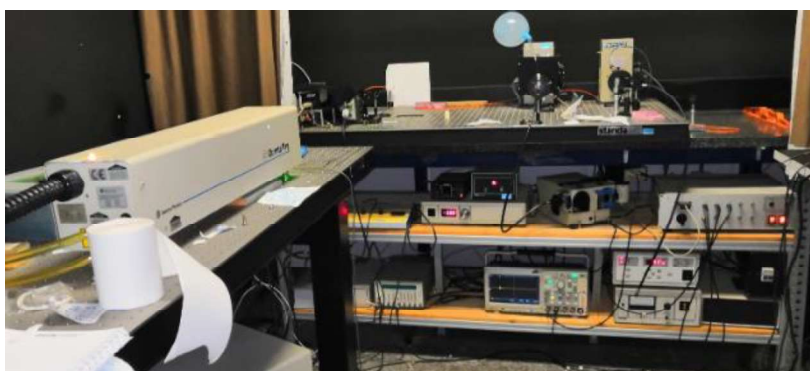


Figura 3.6. Equipo de fotólisis de destello laser usado durante la realización del presente proyecto.

3.4 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear es una técnica de caracterización que permite obtener información acerca de la estructura molecular, parámetros cinéticos y composición de un analito, siendo una técnica enormemente útil en química orgánica. El funcionamiento de esta técnica reside en la aplicación de un fuerte campo magnético a los núcleos de una muestra.

Dichos núcleos, también poseerán su propio campo magnético, los cuáles se alinearán de manera paralela con el campo magnético aplicado por el equipo, estando así en un estado energético bajo denominado

"estado α ". Sin embargo, estos núcleos pueden pasar a un segundo nivel energético alto denominado "estado β ", en el cual se orientan de manera antiparalela al campo magnético aplicado. Esta transición energética ocurre mediante la absorción de energía electromagnética en la región de las radiofrecuencias en un proceso denominado resonancia.

La cantidad de energía necesaria para que un determinado núcleo consiga alcanzar la resonancia depende únicamente de la naturaleza de dicho núcleo y de cuál es el ambiente electrónico al que está expuesto en la molécula a la cual pertenece.

El carácter del ambiente electrónico al que está sometido un núcleo varía debido a una característica intrínseca de los átomos denominada electronegatividad, la cual provoca que determinadas especies puedan alterar las posiciones de las nubes electrónicas de otros núcleos de la molécula. Este hecho provoca que determinados núcleos atómicos estén rodeados en mayor o menor medida por electrones. Esta característica, denominada apantallamiento es un factor que altera la energía necesaria para que alcance la condición de resonancia.

El espectrómetro RMN es capaz de registrar la cantidad de energía que debe de suministrar para que los núcleos del tipo estudiado (en el caso del equipo usado, los núcleos ^{13}C y ^1H) alcancen el estado de resonancia. Así pues, esta información permite conocer los grupos funcionales que tienen a su alrededor los diferentes núcleos de la muestra, posibilitando conocer la estructura molecular de los elementos que componen un analito.

En este trabajo se ha hecho uso de un equipo de RMN modelo Bruker Avance III de 400MHz.



Figura 3.7. Espectrómetro de resonancia magnética Bruker Avance III.

3.5 Difracción de Rayos X

La difracción de rayos X es una técnica que permite detectar y cuantificar la periodicidad en la materia.

Esta técnica está basada en el fenómeno de difracción de rayos por sólidos cristalinos, los cuales presentan geometría regular, elementos de simetría y la propiedad de anisotropía, la cual se tiene cuando un material presenta características distintas en función de la dirección del espacio que se examine.

Su modo de funcionamiento es tal que una muestra interacciona con un haz incidente de rayos X. Si la muestra presenta ordenación atómica (lo cual es una característica de los materiales cristalinos), las ondas serán dispersadas una distancia interplanar “d”. Las ondas dispersadas interfieren de manera constructiva y la diferencia de trayectoria entre ondas viene dada por la ley de Bragg, donde “λ” es la longitud de onda de los rayos, “θ” el ángulo de difracción, es decir, el que forma el rayo con los planos del cristal.

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (\text{ec. 3})$$

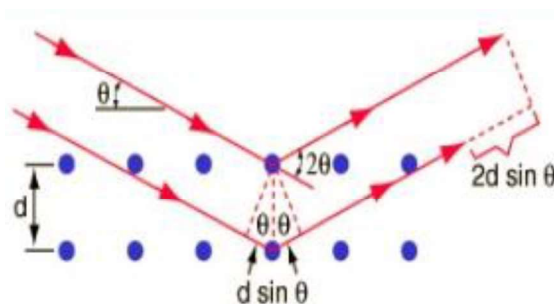


Figura 3.8. Reflexión de Rayos tras interactuar con los planos atómicos de un sólido cristalino.

Tanto la intensidad como la posición de los rayos difractados informan sobre la estructura cristalina del material, indicando así como se ordenan los átomos en la celda unidad.

En el presente estudio se ha utilizado un difractómetro de la marca Bruker, modelo “D8 Advance”. El equipo posee una fuente de rayos con ánodo de cobre de alta estabilidad (radiación Cu-Kα, λ=1’5418 Å), además de un detector de centelleo. Los difractogramas se obtuvieron con un intervalo de ángulo de incidencia en un 2θ (paso bajo) de entre 1.3º y 8.3º, utilizando las rendijas 0,2 mm para el emisor, 3 mm para el receptor y 1 mm, para la rendija interna.

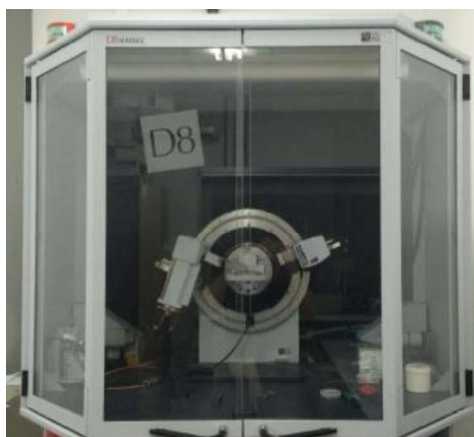


Figura 3.8. Difractómetro de Rayos-X Bruker D8 Advance.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

4.1 Síntesis y caracterización de diadas

Durante el desarrollo de este estudio se realizó la síntesis orgánica de diadas, en las cuáles se buscó favorecer la interacción entre el Naproxeno y aminoácido mediante la formación de un enlace covalente tipo amida entre ambos. La fotorreactividad de estos sistemas será comparada en los distintos medios confinados a estudiar con los de las mezclas intermoleculares, en las que fármaco y aminoácido son introducidos de manera independiente en un determinado ambiente.

Durante la elaboración del proyecto se utilizaron los aminoácidos con un grupo metilo en su estructura debido a que ello mejoraba la pobre solubilidad ofrecida por ellos cuando están sin modificar. Por ello, a partir de ahora, en el presente trabajo serán referidos como: TrpMe, TyrMe e HistMe.

4.1.1 Síntesis de diadas realizadas

Como se ha comentado anterioridad, se sintetizaron una serie de diadas, las cuales estaban compuestas por Npx y TyrMe o TrpMe unidos covalentemente por un enlace amida, como modelos sencillos que pretenden emular las interacciones del complejo real Npx-proteína.

Así pues se sintetizaron las diadas: (S,R)-NpxTyrMe, (R,R)-NpxTyrMe, (S,R)-NpxTrpMe y (R,R)-NpxTrpMe, todas con el enantiómero del aminoácido (R)-. El comportamiento fotoquímico y fotofísico de estas se comparó con el de unas diadas, previamente sintetizadas por un compañero de grupo, donde únicamente cambia la quiralidad del aminoácido a la (S)-.

Las diadas con el aminoácido de Histidina se decidieron no sintetizar debido a que fueron examinadas con anterioridad a este proyecto, no observándose ningún tipo de interacción fármaco-aminoácido (Vayá Pérez I., Ros, Jiménez Molero, & Miranda Alonso, 2013).

4.1.2 Procedimiento de síntesis

La síntesis de las diadas se realizó utilizando 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC). La combinación de estos dos compuestos favorece la formación de un enlace amida, a partir de la amina presente en los aminoácidos involucrando al grupo ácido fármaco.

El procedimiento de síntesis explicado a continuación fue un protocolo general, siendo el mismo en las cuatro diadas sintetizadas.

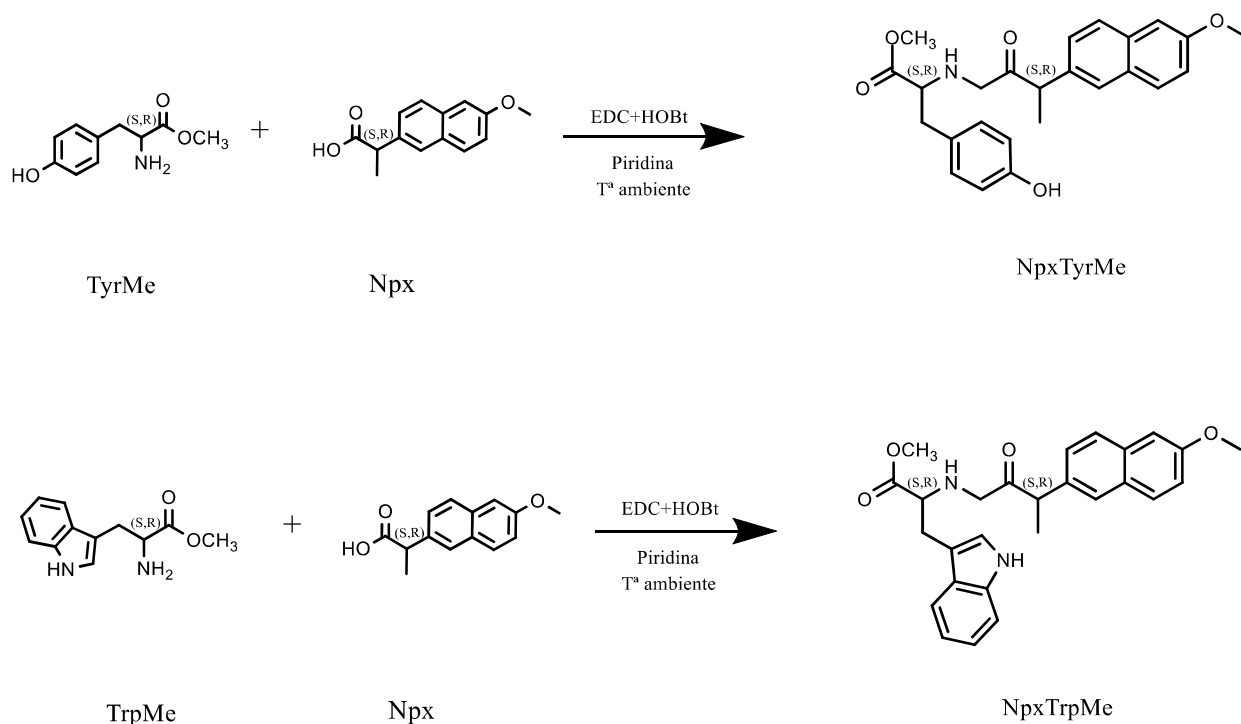


Figura 4.1. Reacciones de síntesis de las diadas.

El proceso de síntesis comenzó con un cálculo estequiométrico que se basaba en la equivalencia molar entre el aminoácido, el EDC y el HOBT con un ligero déficit del fármaco. En primer lugar, se empezó pesando el HOBT y el fármaco en un matraz de balón de 50mL. A continuación, se pesó el aminoácido en un vial de 20mL, donde se introdujo Piridina, que era el disolvente orgánico que mejor disolvía el aminoácido. El siguiente paso, fue pipetear el EDC en estado líquido en el matraz de balón mientras este estaba posado sobre la balanza de precisión, una vez se pesó correctamente la masa de EDC, se introdujo en el balón un imán y se llevó al agitador magnético, donde, gota a gota se añadió el aminoácido disuelto en Piridina. Se dejó la reacción un día entero.



Figura 4.2. Imagen tomada durante la síntesis de 3 de las 4 diadas producidas.

Una vez se paró la reacción, se eliminó el disolvente por destilación a vacío mediante el uso de un rotavapor, dónde la piridina se evaporó, obteniéndose dos de los cuatro productos en estado sólido y los otros dos en forma de un aceite de color amarillento.

El siguiente paso fue el lavado de todos los productos mediante una extracción líquido-líquido. Las diadas se redisolvieron en unos 30mL de diclorometano (DCM) y se vertieron en diferentes embudos de decantación de 100mL, donde se introdujo primero bicarbonato de sodio diluido (más o menos unos 10mL) para después cerrar la parte superior del embudo con un tapón y agitar para que las fases se mezclaran. A continuación, se dejó reposar la mezcla, formándose dos fases que se separaron abriendo la válvula en la parte inferior del embudo, tirándose a residuos la fase menos densa e inorgánica que seguía en el embudo y extrayéndose la fase orgánica más densa que, de nuevo era vertida al embudo de decantación ya vacío con la ayuda de un matraz Erlenmeyer colocado en la salida de la válvula. El lavado se realizó por triplicado con las siguientes disoluciones acuosas: bicarbonato sódico, ácido clorhídrico y salmuera.

Tras decantar los productos en disolución orgánica por última vez, el contenido no se vertió de nuevo a los embudos de decantación, sino que se mantuvieron en el matraz Erlenmeyer, en dónde se añadió sulfato sódico anhidro con el objetivo de eliminar el agua residual. Después de agitar cuidadosamente con una espátula, el contenido de los Erlenmeyer fue filtrado a vacío, y los filtrados donde se encontraban las diadas se concentraron por destilación a vacío para eliminar el DCM, obteniéndose en todos los casos un sólido blanquecino como producto.



Figura 4.3. Embudo de decantación conteniendo una fase orgánica densa y una inorgánica menos densa en el momento anterior a la separación de fases mediante la apertura de la válvula en la parte inferior del embudo (imagen de la izquierda). Producto de síntesis disuelto en fase orgánica tras ser filtrado a vacío para separar el sulfato de magnesio anhidro empleado en la eliminación del agua del producto (imagen de la derecha).

Con el fin de comprobar rápidamente que las diadas se habían sintetizado correctamente y para ver su grado de pureza, estas se sometieron a una cromatografía líquida en capa fina (TLC). Para la realización de la misma, se disolvió una pequeña cantidad de diada sintetizada, fármaco y aminoácido utilizando DCM en distintos tubos de ensayo y estos se posaron sobre varias placas TLC con diferentes combinaciones de eluyentes en distintos porcentajes para conocer el disolvente o mezcla de ellos que permitía observar de manera clara la diferenciación en el posicionamiento de las manchas de los compuestos examinados. Finalmente, se obtuvieron resultados satisfactorios utilizando una mezcla DCM al 80% y acetato de etilo (EtOAc) al 20%, con la que se encontró que el producto contenía trazas de fármaco y aminoácido.

El siguiente paso fue una primera purificación de las diadas mediante cromatografía líquida de capa preparativa (PLC). La PLC también se subió con el eluyente compuesto por DCM y EtOAc en relación 4:1, lo que permitió la correcta separación del exceso de fármaco y aminoácido no reaccionados de la diada deseada. Este método de purificación consistió en repartir la totalidad de la diada en disolución orgánica en la parte inferior de una placa de sílice ($20 \times 20 \text{ cm}^2$), haciéndose la cromatografía con 250 mL de eluyente. Transcurridas aproximadamente unas 1.5h, se paró la cromatografía y secó la PLC; a continuación, con ayuda de la lámpara UV, se detectó la señal correspondiente a la diada deseada, se marcó y se procedió a extraer la sílice con ayuda de una espátula. Ésta se introdujo en un Erlenmeyer de 250 mL y se procedió a hacer cuatro extracciones sólido-líquido con DMC/EtOAc con el fin de disolver la diada en la disolución orgánica. Finalmente, el disolvente orgánico se evaporó por destilación a vacío, con ayuda del rotavapor, obteniendo un sólido ligeramente amarillento (probablemente por la presencia de alguna pequeña impureza).

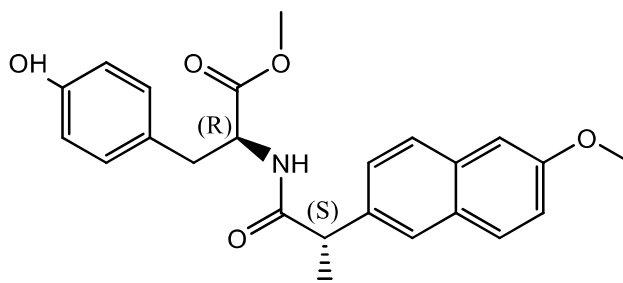
Una vez realizada la primera purificación, se disolvió una pequeña cantidad de cada una de las diadas en cloroformo deuterado y se realizó un ^1H -RMN para determinar su pureza. El resultado fue satisfactorio, sin embargo se observó que las muestras habían epimerizado (interconversión entre estereoisómeros) ligeramente, debido a que un grupo de picos característicos en las diadas (S,R)- se observaban en las diadas (R,R)- y viceversa.

Con el fin de repurificar las diadas se realizó una cristalización. Primeramente, la diada era disuelta en DCM en un matraz esférico, si el producto tenía problemas para disolverse, el matraz se calentaba unos segundos en un baño a 125° . Una vez estuvo completamente disuelto, se añadió de manera lenta y controlada unas gotas de hexano hasta que el producto comenzara a precipitar; si el producto precipitaba demasiado rápido se volvía a añadir DCM o se calentaba durante unos segundos. Una vez se alcanzó el equilibrio de saturación (punto en el cual una sola gota de Hexano provocaría la precipitación del producto) se dejó la muestra reposando un par de horas. Finalizada la cristalización, el producto se filtró a vacío reteniéndose en la membrana porosa un sólido cristalino que era recogido y depositado en un vial.

4.1.3. Resultados de la síntesis

A continuación, se exponen los RMNs de protón y carbono de las cuatro diadas sintetizadas tras su cristalización, utilizando cloroformo deuterado como disolvente.

N-[2-(*S*)-2-(2-Metoxinaftalen-6-il)propionilo]-(*R*)-tirosina metil éster ((*S,R*)-NpxTyrMe)



Fórmula química: $C_{24}H_{25}NO_5$

Peso molecular: 407.47

Estado físico: Cristalino.

m/z: 407.17 (100.0%), 408.18 (26.0%), 409.18 (2.7%), 409.18 (1.0%)

Análisis Elemental: C, 70.75; H, 6.18; N, 3.44; O, 19.63

Espectro de RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 1.59 (d, 3H, J = 7.3 Hz), 2.86 (dd, 1H, J₁ = 6.4 Hz, J₂ = 14.0 Hz), 2.97 (dd, 1H, J₁ = 5.5 Hz, J₂ = 14.0 Hz), 3.67 (q, 1H, J = 7.3 Hz), 3.93 (s, 3H), 4.83 (m, 1H), 5.80 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 6.29 (d, 1H, J = 8.5 Hz), 6.46 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 6.68 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 7.15-7.19 (m, 2H), 7.30 (dd, 1H, J₁ = 1.8 Hz, J₂ = 8.5 Hz), 7.58 (s, 1H), 7.68 (d, 1H, J = 9.0 Hz), 7.69 (d, 1H, J = 8.4 Hz).

Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 17.94, 36.8, 46.8, 52.3, 52.9, 55.3, 105.7, 115.2, 119.1, 126.1, 126.3, 127, 129, 129.3, 130.1, 133.8, 136.2, 154.7, 157.7, 172.1, 173.7.

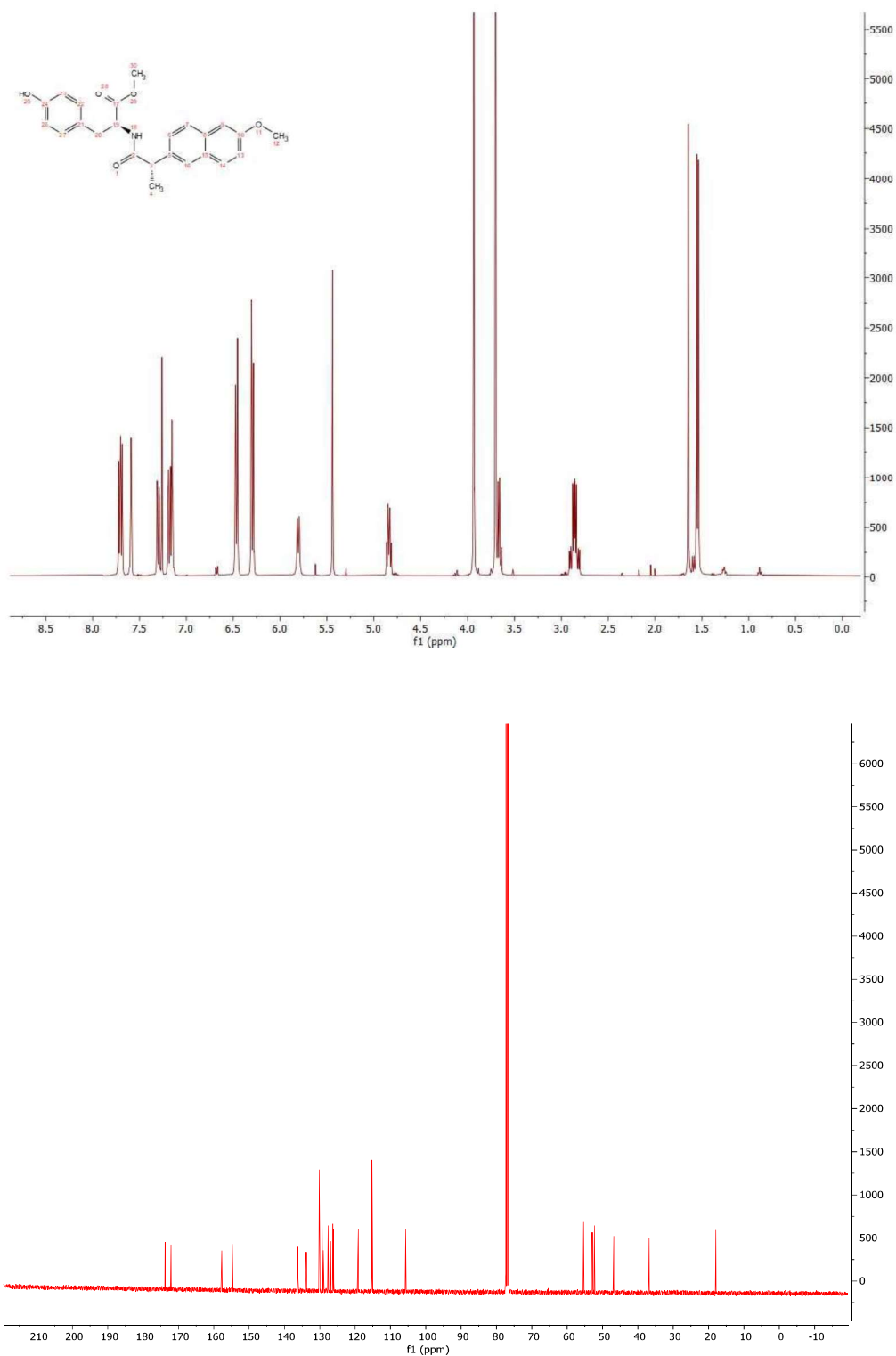
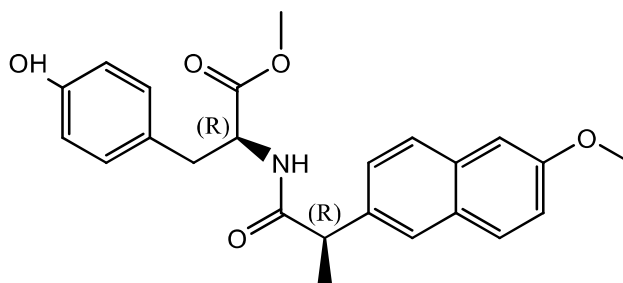


Figura 4.4. Espectro ^1H -RMN (imagen superior) y ^{13}C -RMN (imagen inferior) de la diada (S,R)-NpxTyrMe.

N-[2-(*R*)-2-(2-Metoxinaftalen-6-il)propionilo]-(*R*)-tirosina metil éster ((*R,R*)-NpxTyrMe)



Fórmula química: $C_{24}H_{25}NO_5$

Peso molecular: 407.47

Estado físico: Cristalino.

m/z: 407.17 (100.0%), 408.18 (26.0%), 409.18 (2.7%), 409.18 (1.0%)

Análisis Elemental: C, 70.75; H, 6.18; N, 3.44; O, 19.63

Espectro de RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 1.56 (d, 3H, J = 7.3 Hz), 2.90 (dd, 1H, J₁ = 6.4 Hz, J₂ = 14.0 Hz), 2.97 (dd, 1H, J₁ = 5.5 Hz, J₂ = 14.0 Hz), 3.66 (s, 3H), 3.71 (q, 1H, J = 7.3 Hz), 3.93 (s, 3H), 4.75 (m, 1H), 5.75 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 6.45 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 6.67 (d, 2H, J = 8.5 Hz), 7.13-7.19 (m, 2H), 7.32 (dd, 1H, J₁ = 1.8 Hz, J₂ = 8.5 Hz), 7.61 (s, 1H), 7.69 (d, 1H, J = 8.4 Hz).

Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 18.0, 36.8, 47.0, 52.3, 53.0, 55.3, 105.7, 115.3, 119.0, 126.1, 126.3, 127.5, 129.0, 129.3, 130.2, 133.8, 135.6, 154.6, 157.8, 171.9, 174.1.

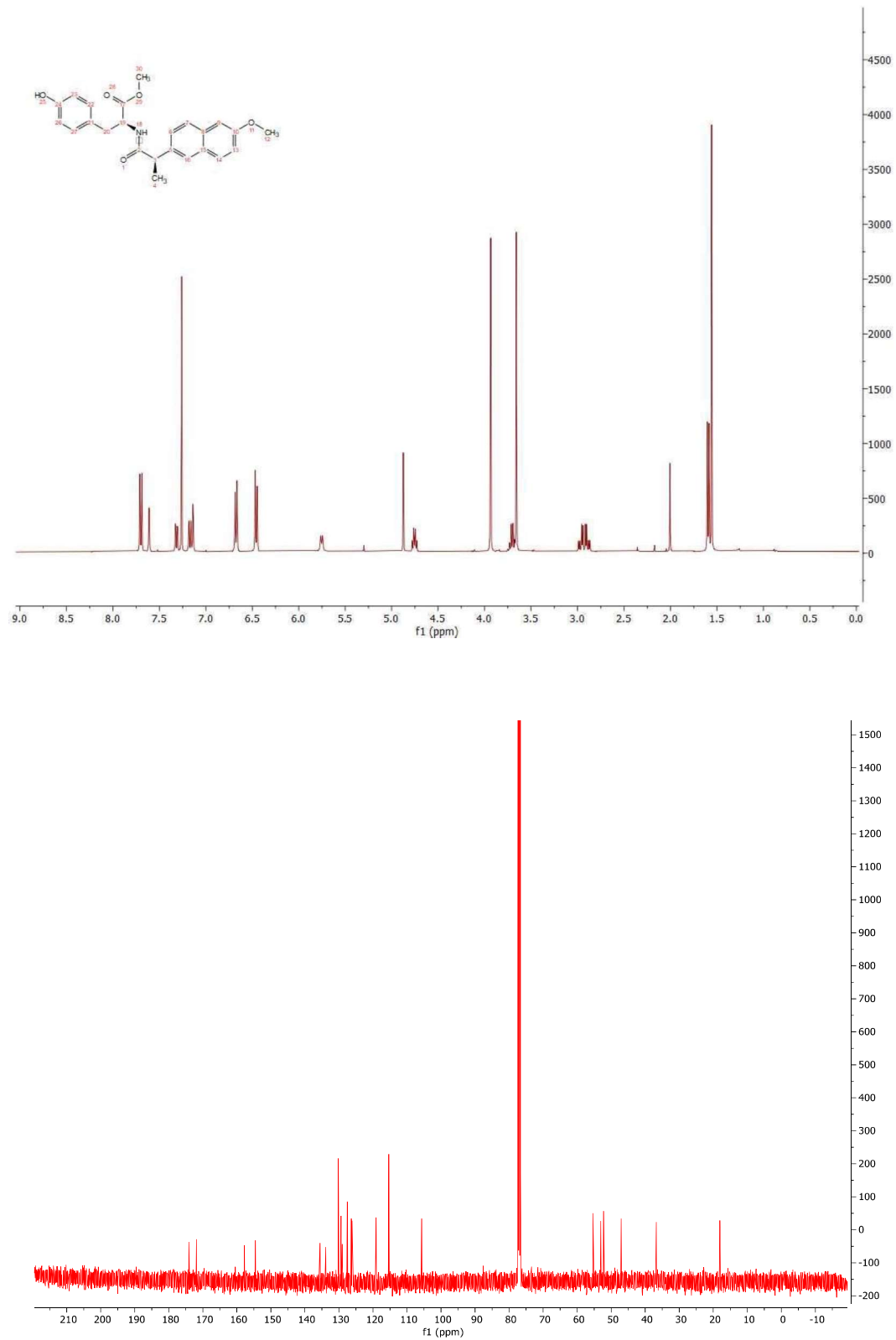
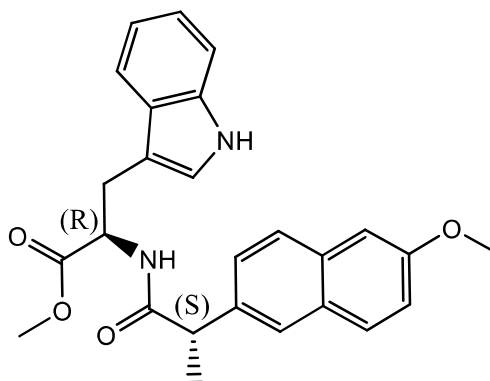


Figura 4.5. Espectro ^1H -RMN (imagen superior) y ^{13}C -RMN (imagen inferior) de la diada (R,R)-NpxTyrMe.

N-[2-(*S*)-2-(2-Metoxinaftalen-6-il)propionilo]-(*R*)-triptófano metil éster ((*S,R*)-NpxTrpMe)



Fórmula química: $C_{26}H_{26}N_2O_4$

Peso molecular: 430.50

Estado físico: Cristalino.

m/z: 430.19 (100.0%), 431.19 (28.1%), 432.20 (2.7%), 432.20 (1.1%)

Análisis Elemental: C, 72.54; H, 6.09; N, 6.51; O, 14.87

Espectro de RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 1.53 (d, 3H, J = 7.2 Hz), 3.12 (m, 2H), 3.63 (q, 1H, J = 7.2 Hz), 3.96 (s, 3H), 4.89 (m, 1H), 5.86 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 6.19 (s, 1H), 6.90 (t, 1H, J = 7.8 Hz), 7.08-7.32 (m, 5H), 7.41 (s, 1H), 7.55 (bs, 1H), 7.64 (d, 2H, J = 7.8 Hz), 7.67 (d, 1H, J = 8.4 Hz).

Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 18.2, 27.3, 46.9, 52.3, 55.3, 55.8, 105.7, 111.0, 111.4, 118.4, 119.0, 119.6, 122.0, 122.7, 126.3, 127.5, 129.0, 129.3, 134.0, 136.6, 138.0, 157.7, 172.3, 173.6.

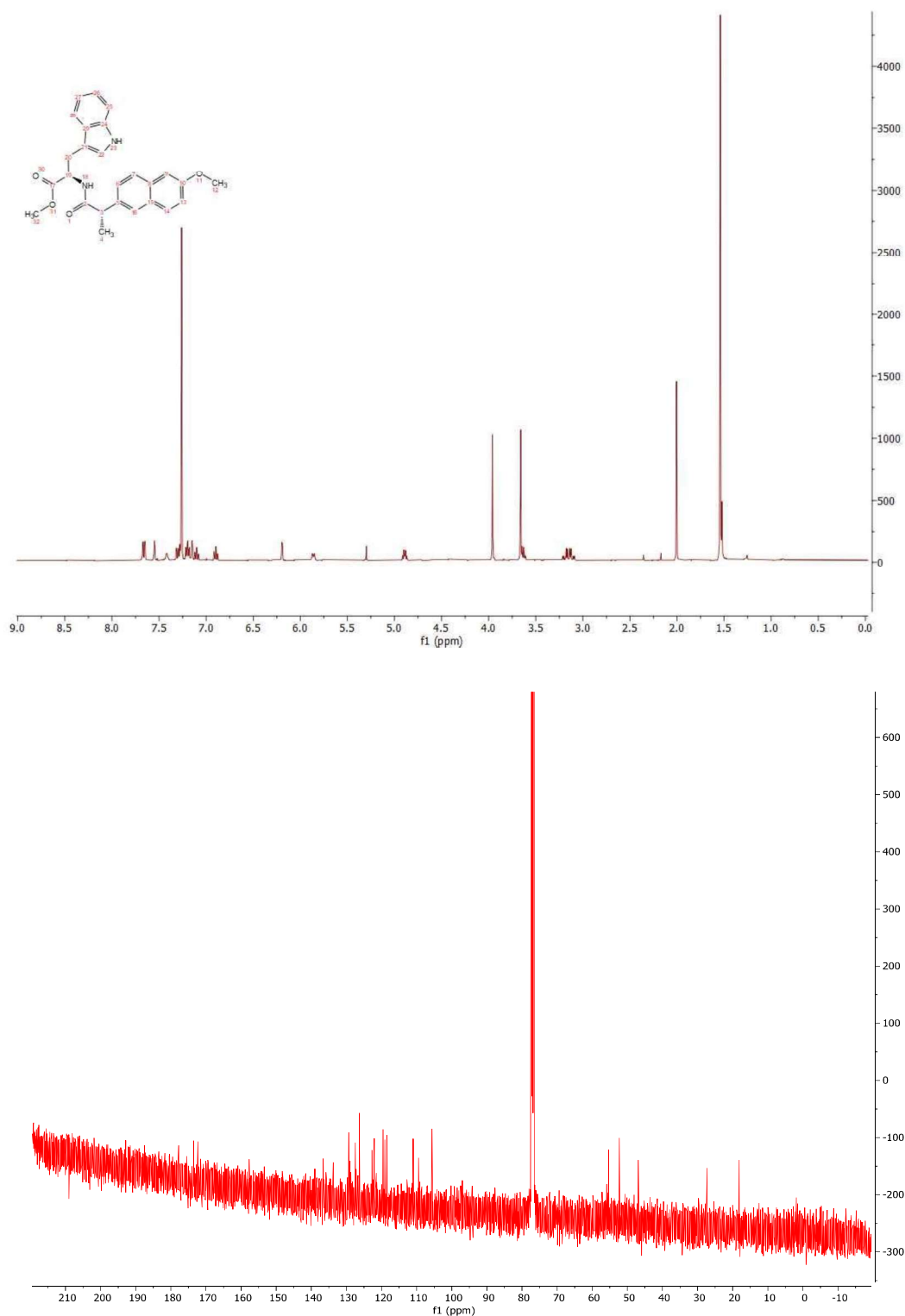
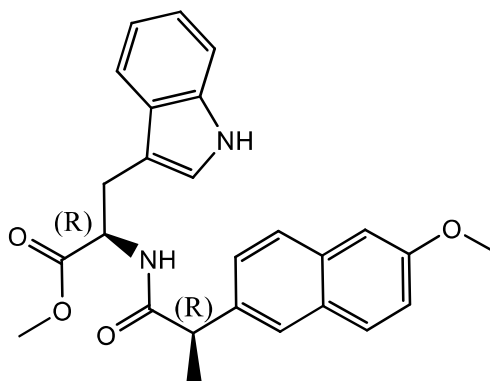


Figura 4.6. Espectro ^1H -RMN (imagen superior) y ^{13}C -RMN (imagen inferior) de la diada (S,R)-NpxTrpMe.

N-[2-(*R*)-2-(2-Metoxinaftalen-6-il)propionilo]-(*R*)-triptófano metil éster ((*R,R*)- NpxTrpMe)



Fórmula química: $C_{26}H_{26}N_2O_4$

Peso molecular: 430.50

Estado físico: Cristalino.

m/z: 430.19 (100.0%), 431.19 (28.1%), 432.20 (2.7%), 432.20 (1.1%)

Análisis Elemental: C, 72.54; H, 6.09; N, 6.51; O, 14.87

Espectro de RMN-¹H (CDCl₃) δ (ppm): 1.57 (t, 3H, J = 7.2 Hz), 3.22 (d, 2H), 3.65 (q, 1H, J = 7.1 Hz), 3.93 (s, 3H), 4.84 (m, 1H), 5.85 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 6.52 (s, 1H), 7.02 (t, 1H, J = 7.8 Hz), 7.11-7.29 (m, 5H), 7.41 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 7.52 (bs, 1H), 7.64 (d, 2H, J = 7.8 Hz).

Espectro de RMN-¹³C (CDCl₃) δ (ppm): 18.2, 27.4, 47.2, 52.4, 52.8, 55.5, 105.8, 110.0, 111.3, 118.7, 119.1, 119.8, 122.3, 122.7, 126.3, 126.6, 129.1, 129.5, 133.9, 136.1, 136.2, 157.9, 172.3, 174.1.

4.2 Interacciones en disolución orgánica

Una vez concluido el proceso de síntesis de las diadas, purificación y caracterización química completa, verificando que su grado de pureza era óptimo, se procedió a estudiar su fotorreactividad en disolución orgánica.

4.2.1 Procedimiento experimental

El procedimiento experimental para la preparación de las diadas en disolución orgánica fue muy sencillo. Se comenzó preparando las disoluciones madre de cada diada, lo cual consistía en coger una pequeña cantidad de diada en estado sólido y disolver cada una en unos 3-4mL de MeCN en un vial pequeño.

A continuación, se cogió un segundo grupo de viales grandes en los cuáles se añadieron unos 15mL de MeCN. En cada uno de esos viales grandes se añadían unas gotas de una disolución madre de diada y su absorbancia en el espectrofotómetro UV-vis era medida.

Se prepararon disoluciones con igual absorbancia a la longitud de onda dada. Para lograr estos valores de absorbancia el proceso era muy simple, el contenido del vial grande era medio en el espectrofotómetro UV-vis y si la disolución daba un valor de absorbancia muy bajo se añadía más disolución madre, si por el otro lado era muy alto se diluía añadiendo más disolvente.

Este procedimiento se realizó además de con las diadas, con el (S)-Npx, la (S)-TyrMe y el (S)-TrpMe para realizar una comparativa completa.

4.2.2 Resultados

Con el objetivo de determinar si existe algún tipo de estereodiferenciación en el conjunto de diadas, y las posibles variaciones del comportamiento de estas en función del aminoácido ligado, sus propiedades fotofísicas fueron determinadas en disolución orgánica, un primer medio no confinado. Por ello las diadas en disolución orgánica fueron medidas utilizando las siguientes técnicas: espectrofotometría UV-vis, fluorescencia de estado estacionario, fluorescencia de resolución temporal y fotólisis de destello láser.

·Espectroscopía ultravioleta-visible:

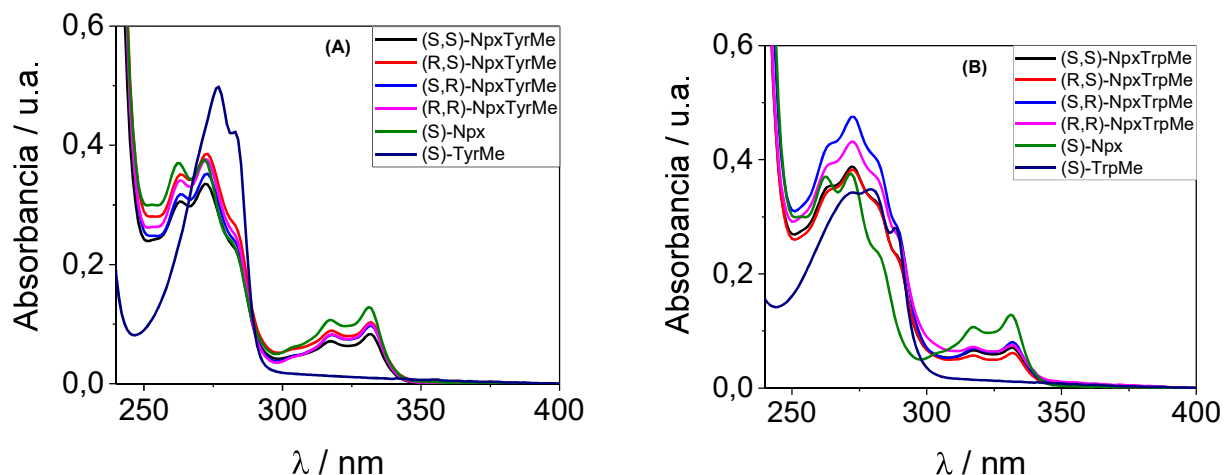


Figura 4.8. Espectro de absorción UV-vis de disoluciones de: Npx, TyrMe y diadas NpxTyrMe **(A)** y Npx, TrpMe y diadas NpxTrpMe **(B)** en MeCN y atmósfera de aire.

De los espectros de absorción de las diadas en disolución orgánica presentados en la **Figura 4.8**, se pueden seleccionar las longitudes de onda en las que interesa excitar las muestras para obtener información sobre la interacción entre el fármaco y el aminoácido que la componen, eligiendo longitudes de onda que favorezcan la absorción de luz de estos componentes por separado.

El Npx presenta un pico de absorción en torno a los 320nm, mientras que ningún aminoácido absorbe a dicha longitud de onda, por lo que excitar las diadas a 320nm debería de resultar en un espectro de fluorescencia debido únicamente a la acción del cromóforo que contiene el fármaco, por ello todas las diadas se excitarán a dicha longitud de onda. Los valores de excitación seleccionados para intentar excitar de manera selectiva al aminoácido se justifican a continuación.

La elección del valor de excitación para la TyrMe no es tan trivial como en el Npx, ya que no hay ninguna longitud de onda a la cual absorba la TyrMe y no lo haga el Npx. Sin embargo, en torno a los 280m el aminoácido presenta un máximo de absorción que no coincide con ningún máximo del Npx, por lo que excitar también a esa longitud de onda a las diadas de TyrMe, asegurarían un resultado ocasionado (aunque no de manera exclusiva) por este aminoácido.

Con el TrpMe, ocurre exactamente lo mismo que con la TyrMe, complicando la elección de una longitud de onda para su excitación de manera selectiva. Sin embargo, en el caso del TrpMe, el máximo no coincidente con un pico del Npx es a 290nm, longitud de onda a la que las diadas que contengan este aminoácido serán excitadas de manera adicional a los 320nm antes mencionados.

·Fluorescencia:

Las medidas de fluorescencia se realizaron tras excitar a diferentes longitudes de onda donde absorben únicamente el fármaco (320nm) y donde absorben preferentemente la TyrMe (280nm) y el TrpMe (290nm). Para ello, se prepararon disoluciones de Npx, TrpMe, TyrMe y de las diadas en acetonitrilo, de modo que estas absorbieran lo mismo a la longitud de onda deseada. Sin embargo, debido a las pequeñas discrepancias en los espectros de absorción (tal y como se vio en la **Figura 4.8**), las emisiones se corregirán por un factor teniendo en cuenta la absorbancia dada a cada longitud de onda de excitación mediante el uso de una referencia. El procedimiento matemático se explica a continuación:

$$\frac{A_{ref}(\lambda x)}{A_{muestra}(\lambda x)} = constante \quad (ec.3)$$

$$E_{muestra\ CORREGIDA}(\lambda x) = E_{muestra\ SIN\ CORREGIR}(\lambda x) * constante \quad (ec.4)$$

Siendo: A_{ref} la absorbancia de la referencia (siendo el Npx la escogida) a una longitud de onda λx , $A_{muestra}$ la absorbancia de la muestra cuya fluorescencia quiere ser corregida a una longitud de onda λx y $E_{muestra}$ el espectro de fluorescencia de la muestra obtenido tras su excitación a una longitud de onda λx .

En la **Figura 4.9A** y **Figura 4.9B** se pueden observar los espectros de emisión de las diadas NpxTyrMe excitando a 320nm, donde absorbe únicamente el Npx y 280 nm, donde parte de la luz la absorbe la TyrMe. En estos gráficos se observa que la banda de emisión de este grupo de diadas es prácticamente idéntica a la del fármaco, con tan sólo una pequeña inhibición de la fluorescencia a 280nm. Además, se observa que en el espectro de emisión excitando a 280nm las diadas no reflejan ninguna cola en su banda a longitudes de onda bajas (en la zona de 300-320nm), donde el aminoácido tiene su máximo de fluorescencia, no observándose ningún indicio del estado excitado de este. Este hecho indica que puede estar teniendo lugar un proceso de transferencia de energía altamente eficiente desde el estado excitado singlete de la TyrMe al del Npx.

En cuanto a los resultados de fluorescencia obtenidos de las diadas NpxTrpMe, presentados en la **Figura 4.9C** y **4.9D**, se observa tras excitar a 290nm (longitud de onda donde el aminoácido absorbe luz) la ausencia de emisión del TrpMe debido de nuevo a un proceso de transferencia energética desde el estado excitado singlete del TrpMe al del Npx. Sin embargo, en las diadas NpxTrpMe, salta a la vista que pese a que su emisión resulta ser la banda característica del Npx, estas presentan una intensidad mucho menor que la banda emisión del fármaco, siendo esta desactivación causada debido probablemente a un proceso de transferencia electrónica entre fármaco y aminoácido. Esta desactivación ha demostrado ser de naturaleza dinámica, como se observa en las cinéticas de desactivación representadas en la **Figura 4.10B**, donde se observa una gran diferencia entre los tiempos de vida de las diadas y el Npx. Además se observa mediante las cinéticas de fluorescencia que este proceso de desactivación es más rápido para las diadas (R,S)- y (S,R)- que para sus análogos (S,S)- y (R,R)-, lo cual es totalmente acorde a lo observado en los espectros de emisión de la **Figura 4.9C** y **4.9D**.

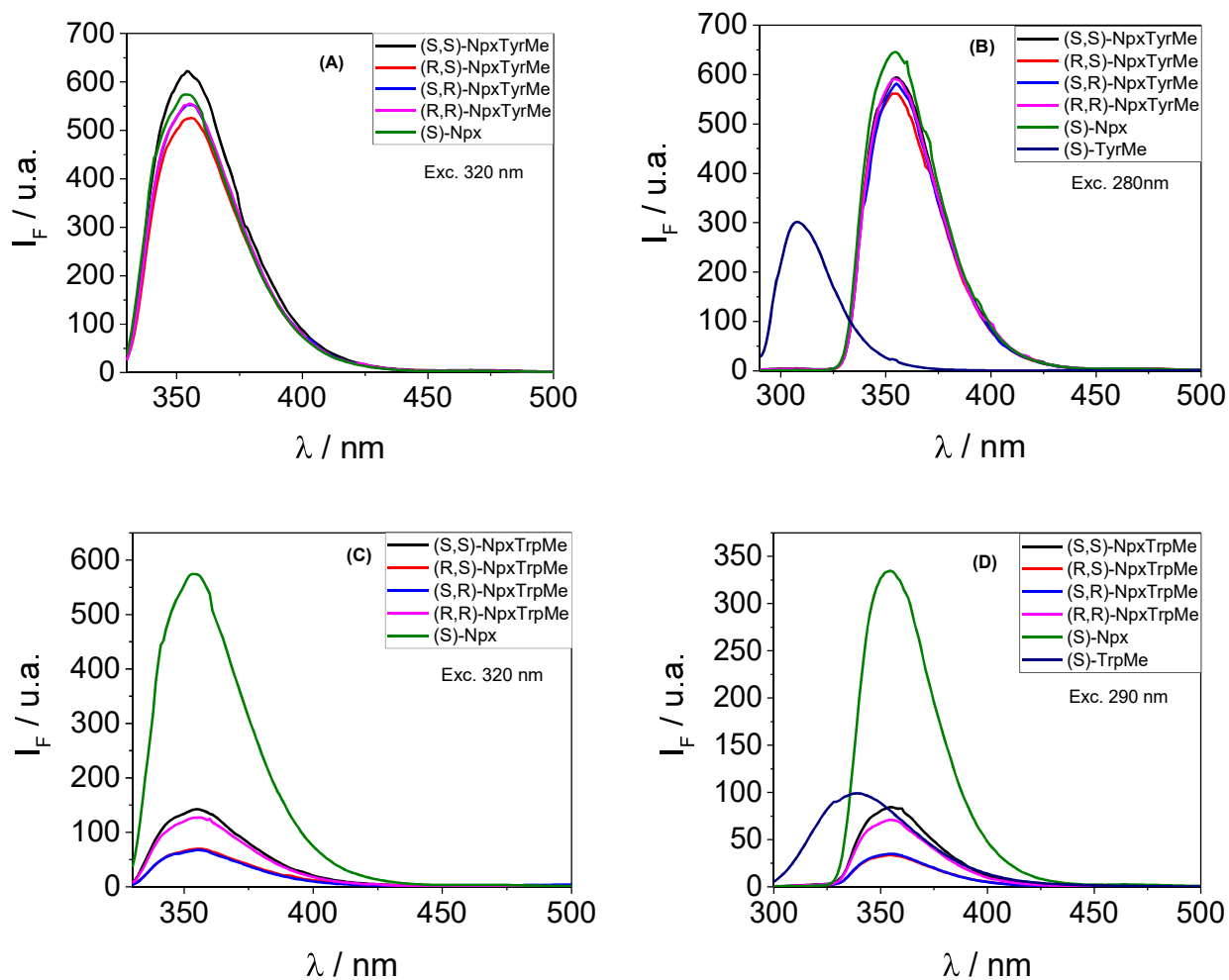


Figura 4.9. Espectro de emisión de estado estacionario de: Npx y diadas de TyrMe excitando 320nm **(A)**, Npx, TyrMe y diadas de TyrMe excitando a 280nm **(B)**, Npx y diadas de TrpMe excitando a 320nm **(C)** y Npx, TrpMe y diadas de TrpMe excitando a 290nm **(D)** en MeCN y atmósfera de aire.

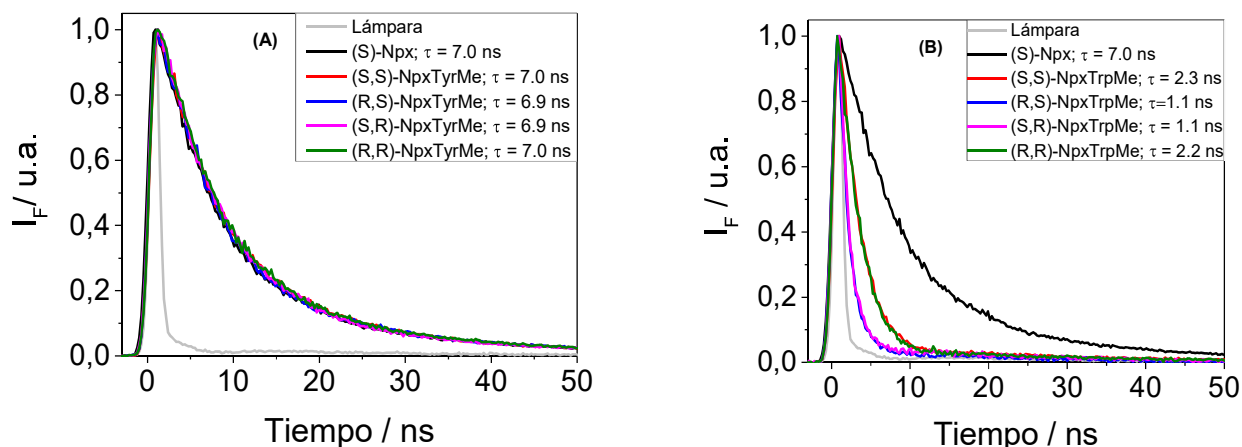


Figura 4.10. Espectro de emisión de resolución temporal normalizados con excitación a 310nm de: Npx y diadas de NpxTyrMe **(A)** y Npx, y diadas de NpxTrpMe **(B)** en MeCN y atmósfera de aire. Tiempos de vida medios calculados mediante ajuste monoexponencial.

Fotólisis de destello láser:

En la **Figura 4.11B** se observa cómo las diadas NpxTyrMe presentan una absorción ligeramente más baja que el Npx, aunque sus espectros presentan la misma que el fármaco con un máximo de absorción a 440nm. Esta pequeña disminución de la absorción en el espectro de las diadas con respecto al del Npx es debido a la desactivación previa de los estados singlete tras excitar a 266nm con el láser, siendo dichos niveles energéticos los precursores de los estados excitados triplete, los cuáles originan la banda observada en el láser. Esta mencionada desactivación del singlete es inapreciable excitando a 320nm tal y como se representa en la **Figura 4.9A**, sin embargo, excitando a 280nm se observa una pequeña inhibición de la fluorescencia no estereoselectiva (véase **Figura 4.9B**), que a la vista de los resultados del láser también parece existente a 266nm e igualmente de manera no estereoselectiva, debido a que los espectros de las cuatro diadas de TyrMe son bastante similares (véase la **Figura 7.1** del **Anexo 2**). Por último, debido a la igualdad presentada entre los tiempos de vida del triplete del (S)-Npx y las diadas de TyrMe presentados en la **Figura 4.12A**, se puede afirmar que no existe una interacción significativa desde el estado excitado triplete.

En cuanto a las diadas NpxTrpMe presentadas en la **Figura 4.11C**, existe una diferencia bastante notable entre sus espectros de absorción y el del Npx, siendo la absorción menor en la diada (R,S)- y (S,R)- que en la (S,S)- y (R,R) (véase la **Figura 7.2** del **Anexo 2**). Esta diferencia en los espectros de absorción entre los dos grupos de diadas NpxTrpMe es debido a que en estas la desactivación del singlete es un proceso estereoselectivo que ocurre en mayor grado en la diadas (R,S)- y (S,R)- que en la (S,S)- y (R,R)-, tal y como se pudo observar en sus espectros de fluorescencia presentados en las **Figuras 4.9C** y **4.9D**. Esta desactivación del singlete estereoselectiva se ha observado en fluorescencia tras excitar a 320 y 290nm, y es también visible en el espectro de absorción de triplete de la diada tras excitar a 266nm. Como se ha observado con las diadas NpxTyrMe, la similitud entre los tiempos de vida del triplete de las diadas NpxTrpMe con el Npx presentados en la **Figura 4.12B**, conduce a pensar que tampoco hay interacción significativa desde el triplete.

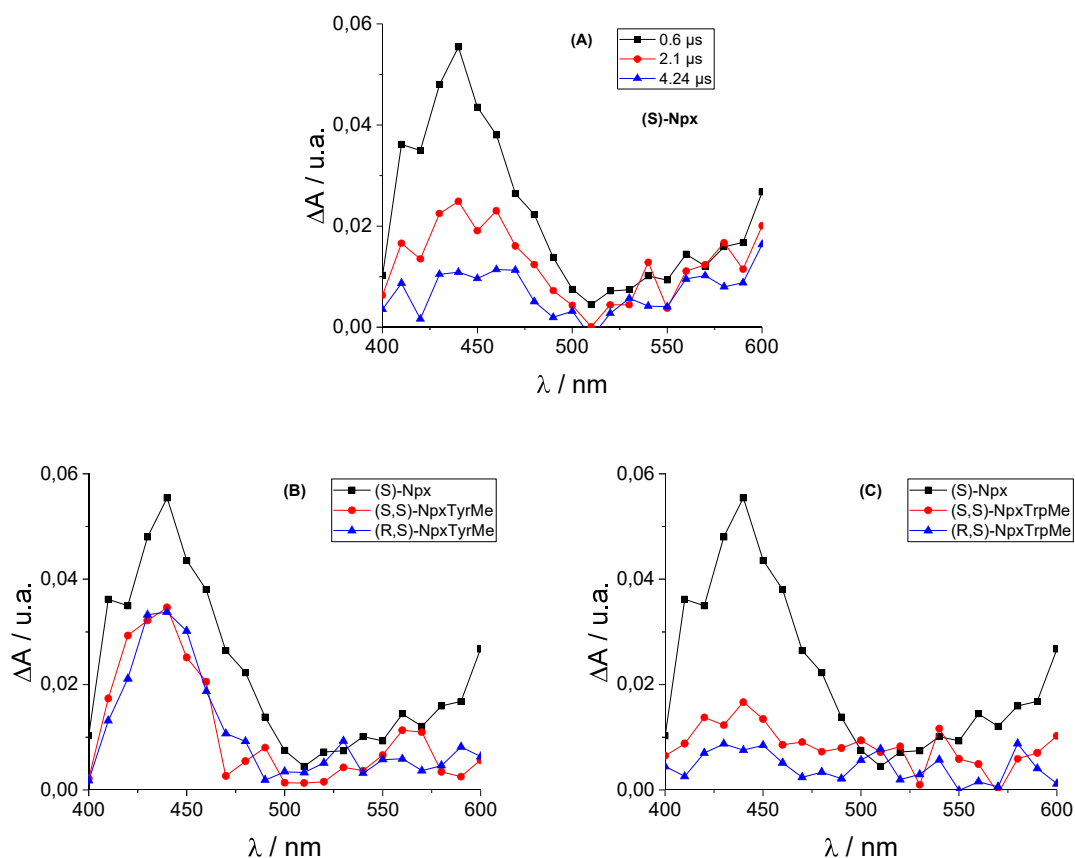


Figura 4.11. Espectros de fotólisis de destello láser de: (S)-Npx a diferentes tiempos **(A)**, (S)-Npx, (S,S)-NpxTyrMe y (R,S)-NpxTyrMe **(B)**, (S)-Npx, (S,S)-NpxTrpMe y (R,S)-NpxTrpMe **(C)**, medidos tras excitación a 266nm registrados en 0.6 μ s en disolución de acetonitrilo y atmósfera inerte de nitrógeno. Resto de diadas presentadas en las Figuras 7.1 y 7.2 del Anexo 2.

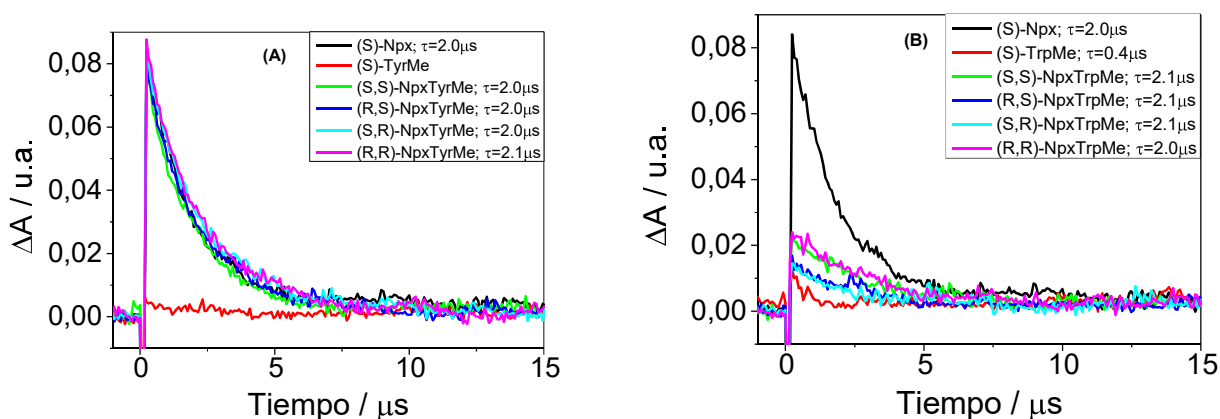


Figura 4.12 Cinéticas de desactivación monitorizadas a 440nm de: Npx y diadas de TyrMe **(A)** y Npx y diadas de TrpMe **(B)** medidas tras excitación a 266nm en acetonitrilo y atmósfera inerte de nitrógeno.

La desactivación dinámica y estereoselectiva del estado singlete presentada por las diadas NpxTrpMe puede ser analizada en mayor profundidad mediante la obtención de los parámetros cinéticos y rendimientos cuánticos que rigen los diferentes procesos que pueden lograr la consecución del estado fundamental a partir de su excitación a 320nm.

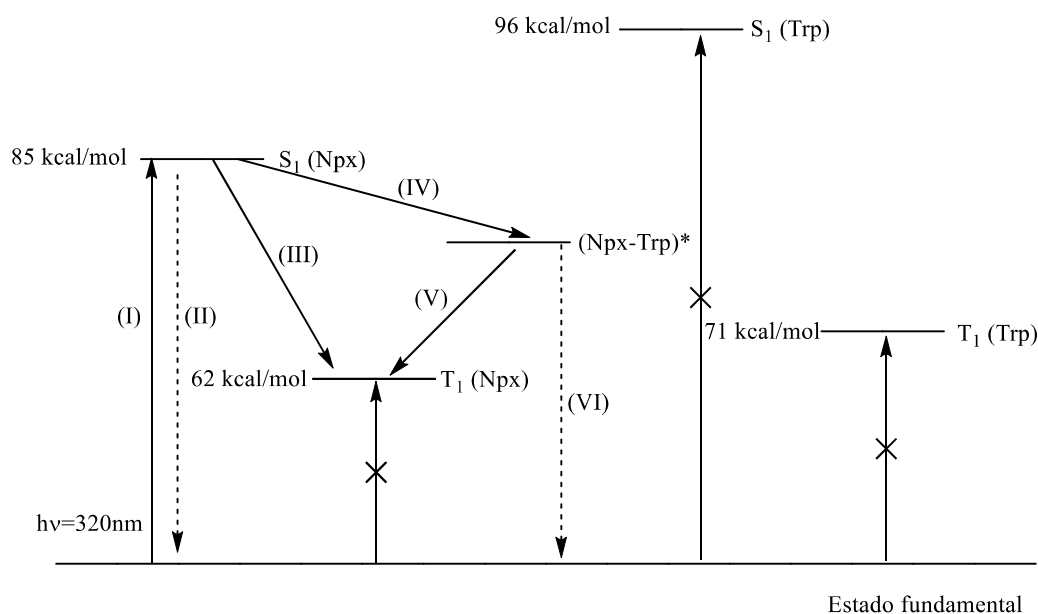


Figura 4.13. Diagrama de Jablonski cualitativo de estados excitados generados tras la excitación a 320nm de las diadas NpxTrpMe (valores de energía obtenidos en literatura (Vayá Pérez, Jiménez Molero, Lhiaubet-Vallet, Pérez Ruiz, & Miranda Alonso, 2010), (Murov, 1993)).

Al irradiar las diadas NpxTrpMe a 320nm los electrones tan sólo pueden alcanzar el estado energético propio del singlete del Npx (ruta I), debido a que el singlete del TrpMe no puede ser logrado ya que esta especie no absorbe a 320nm y que tampoco se pueden promover los electrones a ningún estado triplete debido a que es una transición prohibida.

Una vez se alcanza el estado excitado singlete del Npx existen diferentes posibilidades: una transición directa al estado fundamental con la consiguiente emisión de fotones (ruta II), un cruce de intersistemas al estado triplete del Npx (ruta III) o por último, un proceso de desactivación intermolecular debido a la formación de un nuevo nivel energético en el cual se tiene un proceso de transferencia electrónica para dar lugar a la formación de un nivel energético en el que se forman especies radicalarias y/o exciplejos (ruta IV). A su vez, desde este último mencionado nivel de energía se puede tener de nuevo un cruce entre sistemas para generar el estado excitado triplete del Npx (ruta V), o la emisión de fotones en caso de un posible estado exciplejo singlete (ruta VI), sin embargo, este hecho no ha sido detectado como tal en los espectros de fluorescencia de las diadas, los cuáles se presentan en la **Figura 4.9A**.

En cuanto a la ruta IV, no se conoce el nivel energético en el que se encuentran los electrones tras la formación de especies radicalarias y/o exciplejos, desconociéndose si este proceso es termodinámicamente favorable desde el singlete del Npx. Sin embargo, este puede ser estimado mediante la aplicación de la ecuación Rehm-Weller (Vayá Pérez I. , 2007), la cual no calcula el nivel energético de dicho nivel pero ofrece un valor que

informa si un proceso de transferencia electrónica o formación de exciplejos es termodinámicamente favorable o no desde el singlete del Npx mediante la utilización de los potenciales de oxidación y reducción de los componentes de una diada.

$$\Delta G_{TEI} = E_{OX} - E_{RED} - \frac{E_{0-0}}{23.061} + \frac{2.6}{\varepsilon} - 0.13 \quad (ec.5)$$

$$\Delta G_{EX} = E_{OX} - E_{RED} - \frac{E_{0-0}}{23.061} - \frac{\mu^2}{\rho^3} \left(\frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - 0.19 \right) + 0.38 \quad (ec.6)$$

donde ΔG_{TEI} y ΔG_{EX} son las variaciones de energía libre de Gibbs en eV del proceso de transferencia electrónica y de formación de exciplejo desde el singlete del Npx, E_{OX} es el potencial de oxidación del naproxeno en Voltios (cromóforo del Npx, $E_{OX}=1.45V$ (Montes, y otros, 2016)), E_{RED} el potencial de reducción del indol en Voltios (cromóforo del Trp, $E_{RED}=1.24V$ (Harriman, 1987)), E_{0-0} es la energía del estado excitado singlete del Npx en $kcal \times mol^{-1}$ ($E_{0-0}=85 kcal \times mol^{-1}$), ε es la constante dieléctrica del disolvente (37.5 para el acetonitrilo (Vayá Pérez I. , Estados excitados del antiinflamatorio no esteroideo flurbiprofeno como sondas para la interacción con proteínas, 2007)), y μ^2/ρ^3 que tiene un valor promedio de 0.75eV (Vayá Pérez I. , 2007).

El valor de ΔG_{TEI} obtenido es de $-81.6 kcal \times mol^{-1}$, y el de ΔG_{EX} de $-76.4 kcal \times mol^{-1}$, concluyéndose que el proceso de desactivación de la fluorescencia por transferencia electrónica o formación de exciplejo son termodinámicamente favorables en las diadas de TrpMe.

Una vez se conoce cuáles son las posibles rutas energéticas que pueden seguir los electrones desde el estado singlete del Npx tras excitar a 320nm, se pueden estudiar los procesos con mayor profundidad, cuantificando mediante la obtención de constantes cinéticas y rendimientos cuánticos cual es el comportamiento fotofísico de las distintas diadas NpxTrpMe estudiadas.

Para ello, inicialmente se determinan los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) de las diadas en el disolvente de estudio, los cuales se obtienen mediante la siguiente ecuación:

$$\Phi_F = \Phi_{Fref} * \frac{A}{A_{ref}} * \frac{Abs_{ref}}{Abs} * \frac{n^2}{n_{ref}^2} \quad (ec.7)$$

Donde A representa el área bajo la curva de fluorescencia del compuesto, Abs la absorbancia del mismo a la longitud de onda de excitación y n el índice de refracción del disolvente empleado. Los subíndices "ref" indican que el valor de la variable ha de ser el de una referencia en la que se apoya el cálculo. La referencia escogida es el Npx disuelto en acetonitrilo, el cual se ha encontrado en bibliografía que tiene un $\Phi_{Fref} = 0.31$ (Velazquez, 1995) disuelto en acetonitrilo. La elección de esta referencia ha sido debido a que sus valores Abs_{ref} y A_{ref} pueden ser encontrados a partir de las gráficas de absorbancia y fluorescencia que se han medido experimentalmente.

A continuación, se calculan los parámetros cinéticos que rigen los diferentes procesos fotofísicos. Observando las Figuras 4.9A y 4.9C se puede afirmar tal y como se ha explicado antes, que las bandas de emisión exhibidas por las diadas corresponden a la del Npx, ya que su emisión coincide con la del fármaco en disolución con un máximo centrado a 350nm. Teniendo esto en cuenta, se puede calcular la constante cinética de desactivación k_D , que da información acerca del proceso de transferencia electrónica entre el estado excitado singlete del Npx y la formación de una especie radicalaria y/o un excíplejo en un proceso de transferencia electrónica (ruta IV).

$$k_D = \frac{1}{\tau_F} - \frac{1}{\tau_{F(\text{modelo})}} \quad (\text{ec. 8})$$

Donde τ_F es el tiempo de vida de fluorescencia de la diada y $\tau_{F(\text{modelo})}$ corresponde al tiempo de vida de fluorescencia del modelo (S)-Npx.

La constante cinética del proceso de emisión de fluorescencia por parte del estado excitado singlete del Npx (ruta II) de las diadas k_F puede también ser resuelta a partir de los valores experimentales de τ_F , y el rendimiento cuántico Φ_F obtenido mediante la (ec.7).

$$k_F = \frac{1}{\tau_F} \quad (\text{ec. 9})$$

A partir de los valores de k_F , Φ_F y k_D se calcula el rendimiento cuántico de desactivación dinámica intermolecular $\Phi_{D(\text{din})}$.

$$\Phi_{D(\text{din})} = \frac{k_D}{k_F} * \Phi_F \quad (\text{ec. 10})$$

Por último, a partir de las áreas de los espectros de las diadas y del Npx, se obtiene el rendimiento de desactivación total.

$$\Phi_{D(\text{tot})} = 1 - \frac{A_{\text{diada}}}{A_{\text{modelo}}} \quad (\text{ec. 11})$$

Así pues, las propiedades fotofísicas de las diadas se detallan a continuación:

Tabla 4.1. Propiedades fotofísicas de las diadas NpxTyrMe y NpxTrpMe en MeCN.

Compuesto	τ_F (ns) ^a	τ_T (μ s) ^b	Φ_F	k_D ($\times 10^{-8} s^{-1}$)	k_F ($\times 10^{-8} s^{-1}$)	$\Phi_{D(din)}$	$\Phi_{D(tot)}$
(S,S)-NpxTyrMe	7.0	2.0	-	-	-	-	-
(R,S)-NpxTyrMe	6.9	2.0	-	-	-	-	-
(S,R)-NpxTyrMe	6.9	2.0	-	-	-	-	-
(R,R)-NpxTyrMe	7.0	2.1	-	-	-	-	-
(S,S)-NpxTrpMe	2.3	2.1	0.080	0.29	0.43	0.053	0.84
(R,S)-NpxTrpMe	1.1	2.1	0.040	0.76	0.91	0.034	0.93
(S,R)-NpxTrpMe	1.1	2.1	0.039	0.76	0.91	0.032	0.92
(R,R)-NpxTrpMe	2.2	2.0	0.071	0.31	0.45	0.049	0.84
(S)-Npx (ref)	7.0	2.0	0.31	-	-	-	-

^a Medido tras excitación a 310 nm ^b Medido tras excitación a 266nm

En la **Tabla 4.1** se presentan las propiedades fotofísicas obtenidas para cada una de las diadas. En primer lugar, se observa como todas las diadas de NpxTyrMe comparten tiempos de vida tanto desde el singlete como del triplete, siendo aproximados además con los valores del Npx, concluyéndose que no existe interacción significativa ni desde el singlete ni desde el triplete.

El elevado grado de desactivación desde el estado excitado singlete exhibido por las diadas de NpxTrpMe indicó que el aminoácido influía en las propiedades fotofísicas del fármaco. Esta influencia se refleja en una disminución drástica de la fluorescencia que es más fuerte en las (R,S)- y (S,R)- que las (R,R)- y (S,S)- exhibiendo así un fuerte grado de desactivación de carácter dinámico, reflejado en la disminución de los tiempos de vida de fluorescencia de las diadas en comparación con el del (S)-Npx.

Esta desactivación desde el estado excitado singlete se asoció con una posible formación de exciplexo y/o especie radicalaria proveniente desde el singlete del Npx, siendo dicho proceso termodinámicamente favorable, tal y como indicó el resultado del cálculo de la ecuación Rehm-Weller, obteniéndose valores negativos que reflejan la espontaneidad de que este proceso ocurra. El movimiento de electrones a este nivel de energía desde el singlete del Npx provoca que existan menos electrones en el singlete que lleven a cabo la transición estado singlete-estado fundamental la cual está asociada con el proceso de fluorescencia, obteniéndose así la banda de fluorescencia propia del Npx pero con menor intensidad como se vio en las **Figuras 4.9C y 4.9D**.

El proceso de fluorescencia es cuantificado mediante su constante cinética k_F , obtenida en base a los tiempos de vida de los fotones en el fluorímetro de resolución temporal, y su rendimiento cuántico Φ_F calculado a partir de las bandas observadas en la fluorescencia de estado estacionario. El rendimiento de fluorescencia, Φ_F , que refleja la intensidad o el número de fotones emitidos, es menor en las diadas (R,S)- y (S,R)- debido a que en

estas el proceso de fluorescencia es más lento (menores valores de k_f) y por lo tanto los electrones toman otras rutas desde el estado excitado singlete del Npx.

Como es de esperar en las diadas NpxTrpMe, sus rendimientos cuánticos de desactivación dinámica son mayores para la (R,S)- y (S,R)- que para sus análogos (S,S)- y (R,R)-, ya que los tiempos de vida de fluorescencia son menores que los de los últimos. Finalmente el rendimiento de desactivación total de la fluorescencia para las cuatro diadas son más o menos similares, siendo los obtenidos para (R,S)- y (S,R)- algo superiores que para los (S,S)- y (R,R)-. Estas diferencias en estos dos rendimientos reflejan el carácter estereoselectivo del proceso de desactivación y su dinámica desde el estado excitado singlete del Npx, para dar lugar a la formación de especies iónicas radicalarias y/o exciplejos.

4.3 Interacciones en micelas de CTAB

Con la finalidad de observar las interacciones entre fármaco y aminoácido en un espacio en cierta medida más confinado que el observado en disolución orgánica, se prepararon diferentes mezclas intermoleculares en relación molar fármaco-aminoácido 1:1, además de las diadas disponibles en una disolución acuosa con micelas de CTAB.

El procedimiento experimental y los resultados obtenidos se presentan a continuación.

4.3.1 Procedimiento experimental

-Disoluciones intermoleculares:

En primer lugar, se empezó preparando disoluciones 2mM de Npx, TyrMe, TrpMe e HistMe con sus enantiómeros (R)- y (S)- en metanol (MeOH) de calidad HPLC, disolvente en el que se comprobó que a esa concentración todos los componentes eran perfectamente solubles. Para ello se obtuvo, mediante un sencillo cálculo estequiométrico, las masas necesarias de estos compuestos para tener una concentración 2mM en un volumen de 5mL. Las masas eran pesadas en viales de 20mL mediante el uso de una balanza analítica de alta precisión, a continuación se vertía el volumen exacto de 5mL utilizando una pipeta automática o propipeta. En el caso de que la masa pesada en la balanza no fuera exactamente la buscada, se recalculaba el volumen de MeOH y se vertía de manera sencilla con la pipeta automática.

Por otro lado, se preparó una disolución madre de CTAB; pesando 250mg de CTAB en un matraz Erlenmeyer de 500mL utilizando una balanza analítica. A continuación, se vertieron 120mL de agua mili-Q y se dejó el matraz en un baño de ultrasonidos a 40 grados durante 30 minutos para favorecer la dilución total del CTAB. Por último, es importante mencionar que la agitación tuvo que ser lenta para evitar la generación de espuma en el matraz.

En total se prepararon 20 muestras diferentes:

-Disoluciones de un solo componente: (S)-Npx, (R)-Npx, (S)-TyrMe, (R)-TyrMe, (S)-TrpMe, (R)-TrpMe, (S)-HisMe y (R)-HisMe.

-Disoluciones intermoleculares con fármaco y aminoácido en relación molar 1:1: combinaciones (S)+(S), (R)+(S), (S)+(R) y (R)+(R) del Npx con uno de los aminoácidos TyrMe, TrpMe o HistMe.

Para ello se introdujeron en cada vial 75µL de la disolución 2mM correspondiente a cada compuesto que se quería estudiar y disolución madre de CTAB hasta llegar al volumen de 3mL (para ello se vertían 2925 o 2850µL, en función de si se iba a estudiar uno o dos componentes en la muestra), obteniéndose así, fármaco y aminoácidos en medio acuoso de CTAB en una concentración 50µM.

Las disoluciones, una vez preparadas, se dejaron reposar aproximadamente una hora con el objetivo de asegurar que se formaran las micelas conteniendo el fármaco y/o aminoácido en su interior

-Disoluciones de diadas:

Para la preparación de las disoluciones de las diadas NpxTyrMe y NpxTrpMe en CTAB, se procedió de igual manera que en disolución orgánica, obteniendo disoluciones de igual absorbancia a la longitud de onda deseada en una disolución acuosa de CTAB.

4.3.2 Resultados

A estas muestras se les realizó un estudio fotofísico con el objetivo de observar si existían interacciones significativas desde los estados excitados singlete y/o triplete entre el fármaco y el aminoácido en un espacio confinado originado por las micelas de CTAB.

Por ello las muestras se estudiaron mediante la técnica de espectrometría de absorción UV-vis, fluorescencia en estado estacionario y por último mediante fotólisis de destello láser.

Espectroscopía ultravioleta-visible:

A la vista de los resultados observados en la **Figura 4.14**, se puede constatar que no existe discriminación enantiomérica ya que como se puede observar, tanto en las disoluciones de un solo componente como en las intermoleculares los espectros de las disoluciones se superponen unos a otros sin importar si en ellas se encuentran los enantiómeros (R)- o (S)-.

Por otra parte, de las **Figuras 4.14B, 4.14C y 4.14D** se observa que los espectros de las disoluciones intermoleculares Npx+aminoácido son iguales a la suma teórica de los espectros del Npx y el aminoácido individuales (líneas naranjas a rayas en las Figuras), lo cual refleja la ausencia de interacciones significativas entre Npx y aminoácido desde el estado fundamental en las mezclas intermoleculares.

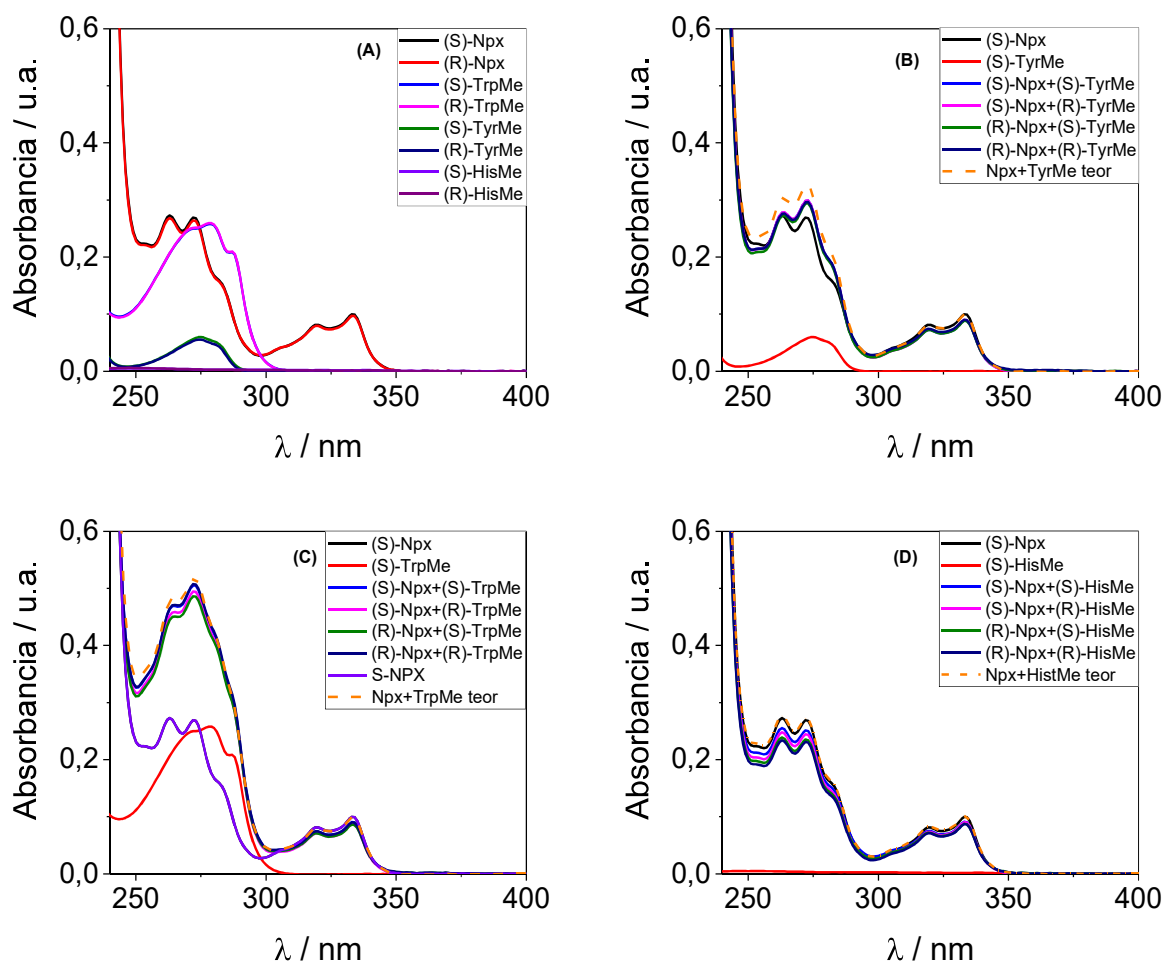


Figura 4.14. Espectro de absorción UV-vis de disoluciones en CTAB 50 μ M en aire de Npx y aminoácidos **(A)**, Npx y TyrMe **(B)**, Npx y TrpMe **(C)** y Npx e HistMe **(D)** en CTAB a concentración 50 μ M y atmósfera de aire.

En la **Figura 4.15A** se pueden observar los espectros de absorción UV-vis de las diadas de NpxTyrMe, los cuales coinciden en forma con los espectros de absorción obtenidos de las disoluciones intermoleculares de Npx+TyrMe de la **Figura 4.14B**. Como se ha comentado anteriormente, los espectros de las disoluciones intermoleculares de Npx+TyrMe son la suma de los espectros de fármaco y aminoácido por separado, lo cual es una prueba de la ausencia de interacciones significativas entre los cromóforos desde el estado fundamental. La similitud entre los resultados obtenidos en las diadas de TyrMe y los sistemas intermoleculares sugiere que pese a que los cromóforos del Npx y la TyrMe son forzados a interactuar en las diadas mediante la proximidad generada por el enlace covalente creado, estos parecen interactuar de forma significativa, por ejemplo formando un complejo desde el estado fundamental.

En cuanto a las diadas de TrpMe, se observan ligeras diferencias en la forma de su espectro de absorción presentado en la **Figura 4.15B** respecto al del sistema intermolecular Npx+TrpMe de la **Figura 4.14C**. Sin embargo, las disoluciones intermoleculares y las de las diadas, no tienen las mismas concentraciones, debido a que tal y como se ha explicado anteriormente, las disoluciones intermoleculares fueron realizadas mediante pesada exacta de los compuestos para obtener una disolución exactamente 50 μ M y las disoluciones de las diadas fueron preparadas en base a su absorbancia en el espectrómetro UV-vis, con una concentración

desconocida. Para constatar que existiera una posible interacción entre los cromóforos del fármaco y el aminoácido en el estado estacionario este experimento debería repetirse con disoluciones intermoleculares y de diadas de igual concentración, ya que en estas condiciones se podrían obtener conclusiones erróneas.

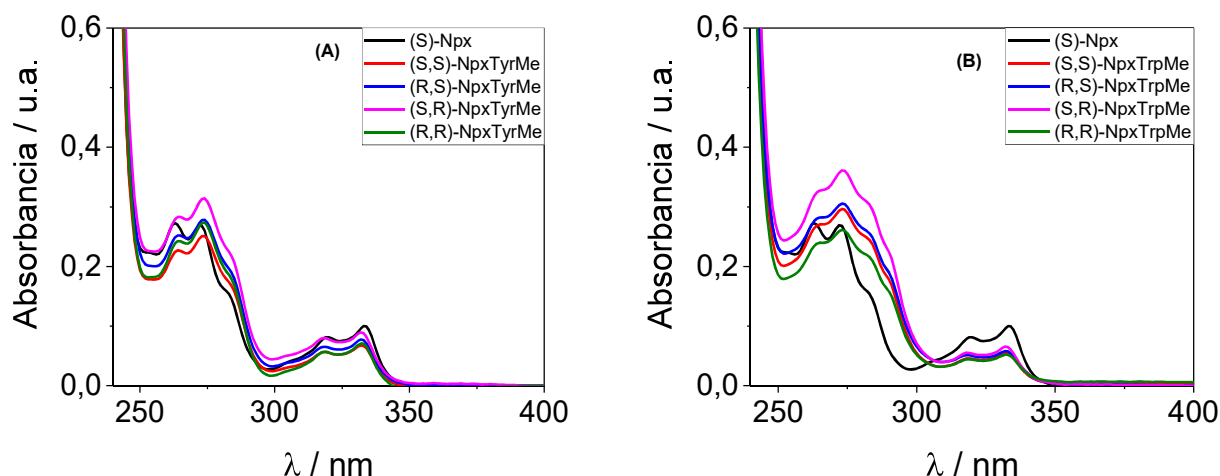


Figura 4.15. Espectro de absorción de disoluciones de las diadas de Npx y TyrMe **(A)**, Npx y TrpMe **(B)** en CTAB y atmósfera de aire.

Fluorescencia

La elección de las longitudes de onda para excitar de manera selectiva al Npx, TyrMe y TrpMe ha sido explicada previamente en el apartado de “Fluorescencia” del punto 4.2.2, donde se decidió registrar las medidas de fluorescencia tras excitar a 320nm; y en el caso de TyrMe y TrpMe también se excitará a 280 y 290nm respectivamente.

A la vista de los resultados obtenidos en los espectros de fluorescencia de estado estacionario, se pueden observar diversos procesos que se van a detallar a continuación.

Cuando las muestras intermoleculares se excitan a 320nm, cuyos espectros se presentan en las **Figuras 4.16A, 4.16C y 4.16E**, se observa que todas se superponen con la emisión de referencia que es la del Npx. Las variaciones existentes son mínimas y no deben de ser consideradas. Además, a ninguna longitud de onda de excitación existe discriminación enantiomérica, todos los sistemas se comportan igual sin importar la estereoisomería de las especies que forman las mezclas intermoleculares.

En cuanto a los espectros de emisión de las disoluciones intermoleculares tras excitar a 280 y 290nm para monitorizar la señal proveniente de la TyrMe y el TrpMe, respectivamente, representados en las **Figuras 4.16B y 4.16D**, además de mostrar los mismos, se han representado sus emisiones teóricas: “Npx+TyrMe teórica” y “Npx+TrpMe teórica”, las cuáles se han determinado considerando el porcentaje de luz que absorbe cada especie a las longitudes de onda de excitación dada y cuáles son sus bandas de emisión para después sumarlas. Como ejemplo, se va a detallar la forma en la que se obtiene el espectro de emisión para la mezcla intermolecular Npx+TrpMe:

A 290nm el TrpMe tiene una $A_{290} = 0.17$ y el Npx a esa misma longitud de onda un valor de $A_{290} = 0.06$, por lo que el TrpMe en una mezcla bicomponente absorbe el 74% de la luz y el Npx el 26% restante.

Por lo que la emisión de una mezcla intermolecular equimolar "Npx+TrpMe teórica" es obtenida a partir de la siguiente ecuación:

$$E(Npx + TrpMe)_{290}teórica = E(TrpMe)_{290} * 0.74 + E(Npx)_{290} * 0.26$$

Una vez calculadas las emisiones teóricas, se observa una ligera desactivación no estereoselectiva en las emisiones a 280nm y 290nm para las mezclas intermoleculares de TyrMe y TrpMe, siendo más notable en este último. Además, cabe resaltar que las bandas de emisión obtenidas para estos sistemas tras excitar a 2980 y 290nm no corresponden a la misma forma exacta del espectro del Npx, debido a se observan ligeras colas en dichas bandas provenientes de la fluorescencia propia de los aminoácidos del sistema. Este resultado obtenido en longitudes de onda donde los aminoácidos absorben luz (a diferencia de a 320nm) indica que la transferencia de energía en sistemas intermoleculares desde los estados excitados del aminoácido a los del fármaco no es tan efectiva la observada anteriormente en las diadas NpxTyrMe y NpxTrpMe en acetonitrilo, lo cual es entendible ya que aquí no se ha forzado la interacción de los cromóforos como en las diadas.

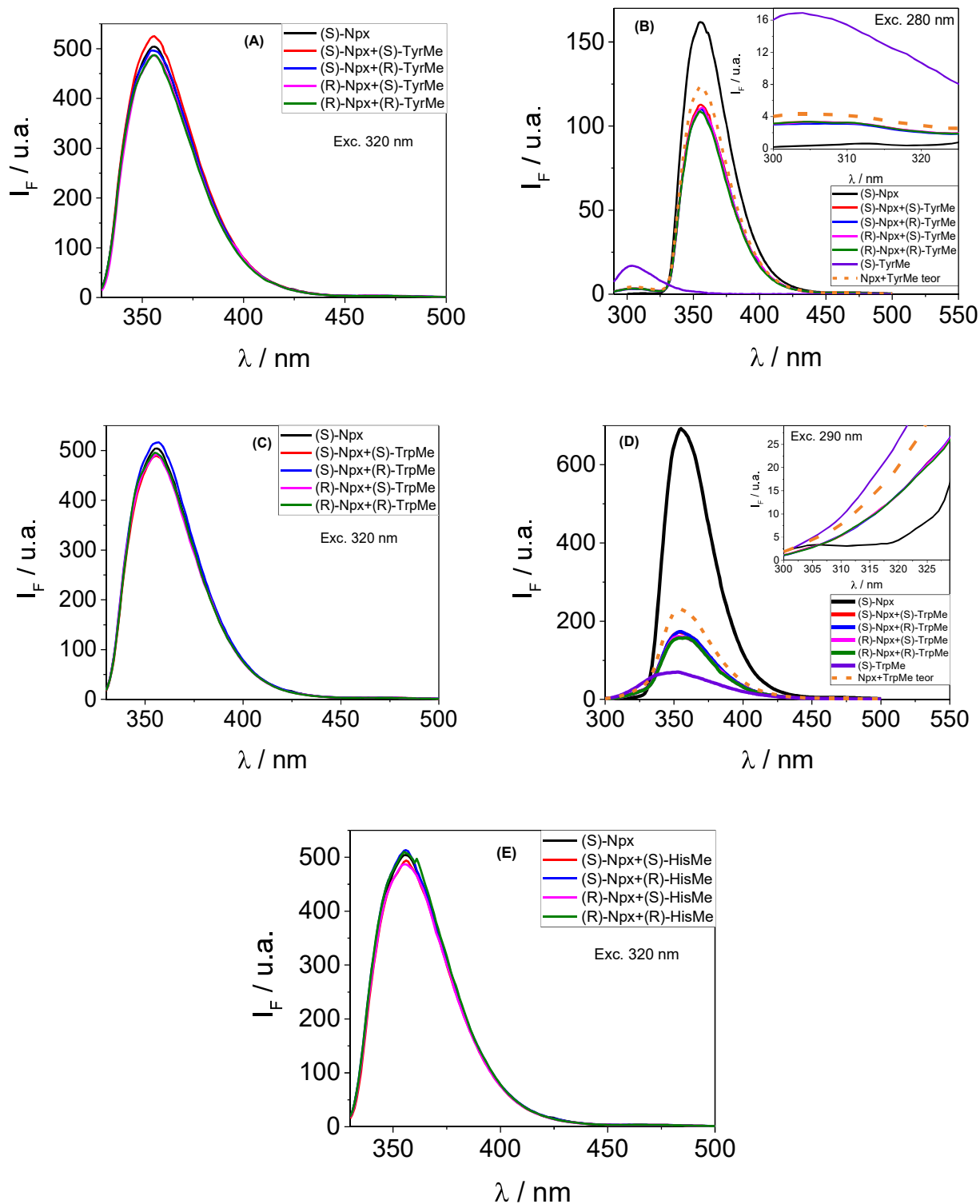


Figura 4.16. Espectro de emisión de disoluciones en CTAB 50 μ M en aire de: Npx y TyrMe excitando 320nm **(A)**, Npx y TyrMe excitando a 280nm **(B)** Npx y TrpMe excitando a 320nm **(C)**, Npx y TrpMe excitando a 290nm **(D)** y Npx e HistMe excitando a 320nm **(E)** en CTAB a concentración 50 μ M en atmósfera de aire.

En cuanto a las diadas de NpxTyrMe presentadas en las **Figuras 4.17A y 4.17B**, se observan resultados muy similares a los obtenidos en disolución orgánica. Tras la excitación a 320nm se observa claramente como las diadas coinciden tanto en forma como en intensidad con la emisión del Npx. Por el otro lado, a 280nm se observa una ligera desactivación de la emisión de las diadas, resultado que ya se observó anteriormente a esta misma longitud de onda de excitación en disolución orgánica el cual se presenta en la **Figura 4.9B** aunque de manera más suave, probablemente debido a que en disolución acuosa con micelas de CTAB se favorece un posible proceso de transferencia electrónica o formación de excíplejo. Por último, comentar que tras excitar a 280nm las diadas de TyrMe, no se observan colas de emisión provenientes del aminoácido en la región de los 300 hasta los 320nm donde la Tyr tiene su máximo de fluorescencia, a diferencia de como se ha observado anteriormente en las disoluciones intermoleculares de Npx+TyrMe en CTAB, pudiéndose concluir que la transferencia de energía entre los estados energéticos excitados de la Tyr y el Npx es mucho más eficiente cuando estos se encuentran unidos covalentemente.

Las diadas de NpxTrpMe expuestas en las **Figuras 4.17C y 4.17D** presentan el mismo comportamiento que el expuesto anteriormente tras los resultados obtenidos en disolución orgánica. Así pues, existe la inhibición de la fluorescencia de las diadas que además ocurre de manera estereoselectiva y dinámica, tal y como refleja la disminución de los tiempos de vida con respecto al del Npx expuesto en la **Figura 4.18**. Sin embargo, esta vez el grado de desactivación ha sido mucho menor, en concreto, las emisiones obtenidas en acetonitrilo tras excitar a 320nm de las diadas (S,S)- y (R,S)- fueron un 75% y un 88% menores en el máximo de emisión en relación a la señal obtenida para el Npx, resultado mucho más amplio que el obtenido en CTAB donde la desactivación del (S,S)- es del 31% y la del (R,S)- del 48%, reproduciéndose también esta tendencia tras excitar a 290nm, corroborando que el proceso de transferencia electrónica es menos favorable cuando las diadas se encuentran encapsuladas en micelas de CTAB. Además, otra diferencia apreciable es que esta desactivación en CTAB parece más lenta, tal y como refleja el aumento de los tiempos de vida en comparación con los exhibidos en acetonitrilo, donde los tiempos dependían de la estereoisomería y eran de 1.1 y 2.3ns pasando a ser en CTAB un tiempo similar y único para todas las diadas de 3.8ns, demostrando que en CTAB los tiempos de vida de fluorescencia no son dependientes de la estereoisomería que conforma la diada.

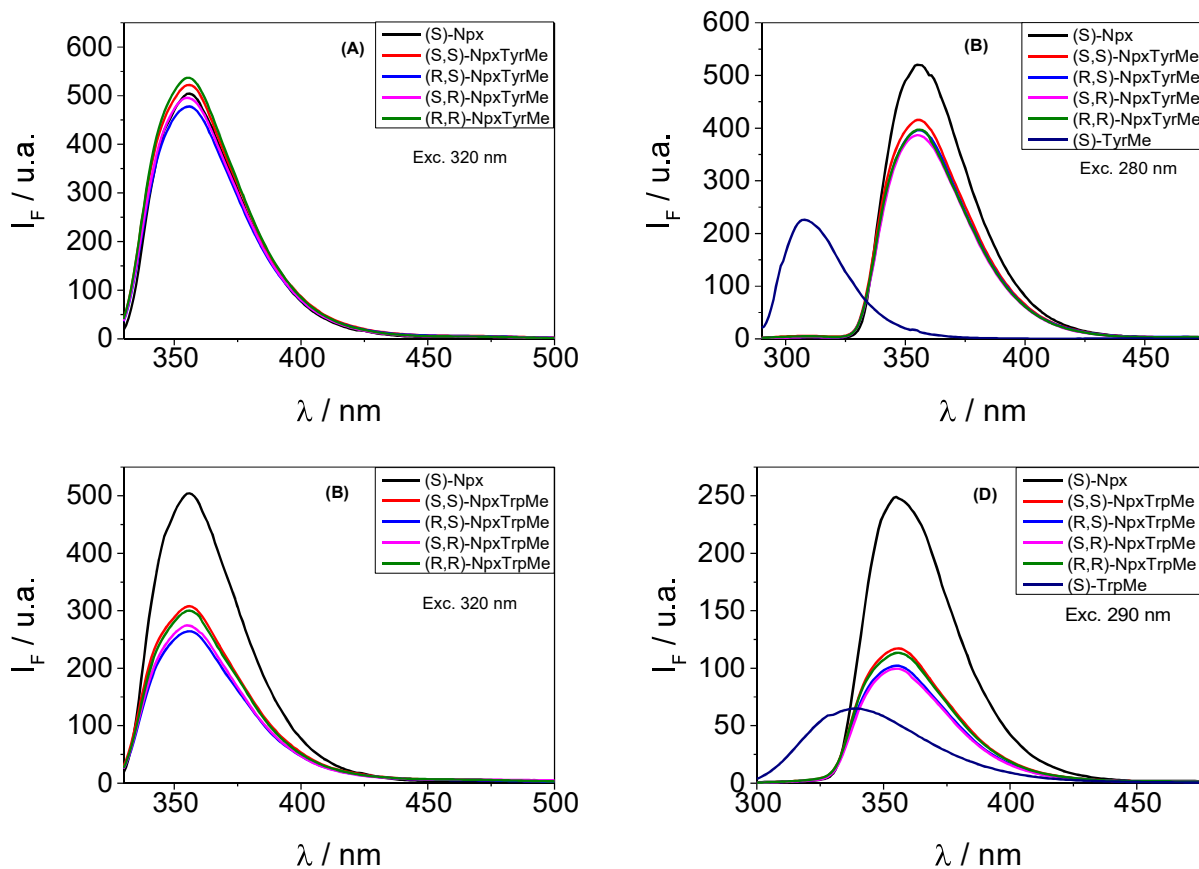


Figura 4.17. Espectro de emisión de disoluciones en CTAB en aire de: Npx y diadas de TyrMe excitando 320nm **(A)** Npx y diadas de TyrMe excitando a 280nm **(B)** Npx y diadas de TrpMe excitando a 320nm **(C)** y Npx y diadas de TrpMe excitando a 290nm **(D)** en CTAB y atmósfera aire.

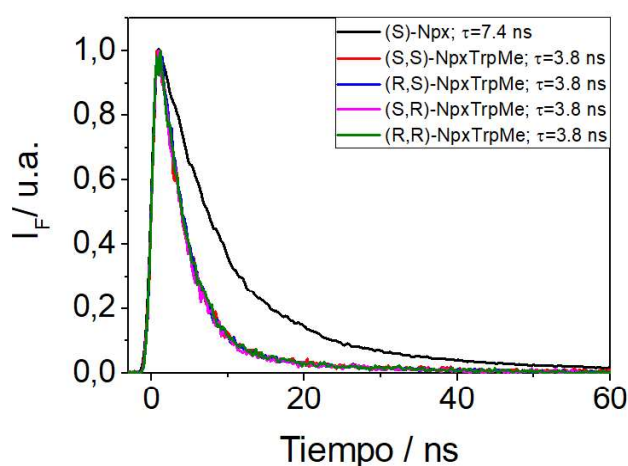


Figura 4.18. Espectros de emisión de resolución temporal normalizados con excitación a 310nm en disoluciones de CTAB en atmósfera de aire de Npx y diadas de TrpMe.

Fotólisis de destello láser:

Los espectros de absorción de las diadas de TyrMe son mostrados en la **Figura 4.19B**, en los cuáles se observa una pequeña desactivación no estereoselectiva con respecto a la señal del Npx, al igual que se obtuvo en disolución orgánica. Esta disminución de la señal con respecto a la del Npx es ocasionada debido a la desactivación del singlete del fármaco de la diada tras excitar a 266nm con la lámpara de Xenón del láser. Esta desactivación no estereoselectiva se puede observar también en su fluorescencia tras excitar a 280nm, como se presenta en la **Figura 4.17B**.

En cuanto a las diadas NpxTrpMe se obtiene una intensidad del estado excitado triplete del Npx ligeramente menor a la del fármaco en disolución de CTAB. Esto es significativo ya que en principio desearíamos observar una disminución significativa en la formación del triplete en las diadas, ya que se observa una importante desactivación previa del estado excitado singlete (**Figura 4.17D**). Aunque es un efecto que requiere experimentos adicionales para su entendimiento y caracterización, parece que para las diadas en CTAB se favorezca el cruce intersistemas y se obtenga más triplete del esperado.

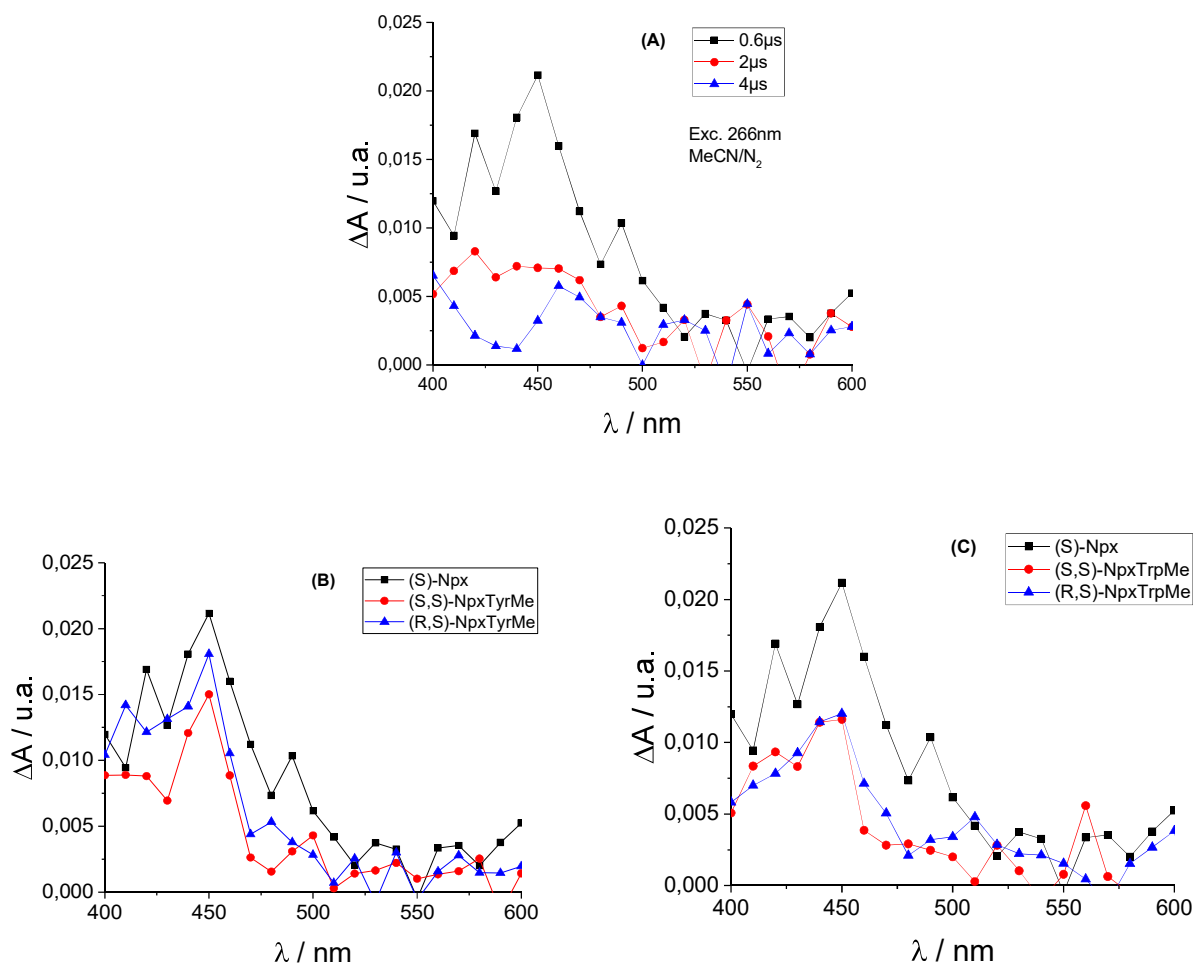


Figura 4.11. Espectros de fotólisis de destello láser de: (S)-Npx a diferentes tiempos **(A)**, (S)-Npx (S,S)-NpxTyrMe y (R,S)-NpxTyrMe **(B)**, (S)-Npx, (S,S)-NpxTrpMe y (R,S)-NpxTrpMe **(C)**, medidos tras excitación a 266nm registrados en 0.6 μ s en disolución de micelar de CTAB y atmósfera de aire. Resto de diadas presentadas en las **Figuras 7.3 y 7.4 del Anexo 2**.

Por último y al igual que en acetonitrilo, se descarta ningún tipo de interacción significativa desde el triplete para las diadas de TyrMe y TrpMe debido a la igualdad de los tiempos de vida del triplete con el fármaco.

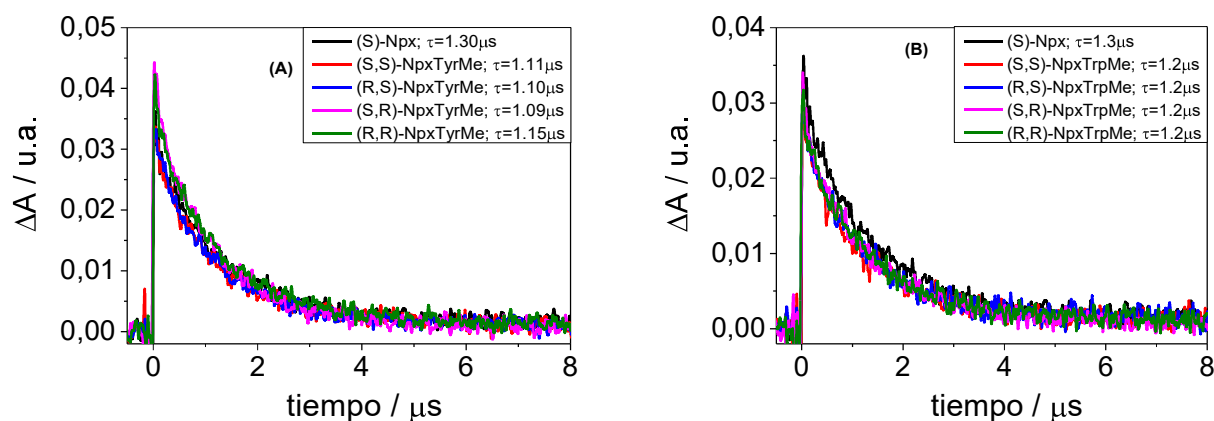


Figura 4.20. Cinéticas de desactivación monitorizadas a 440nm para: Naproxeno y diadas de Tirosina **(A)** y Naproxeno y diadas de Triptófano **(B)** medidos tras excitación a 266nm en CTAB/Aire.

De manera análoga a en disolución orgánica, se calculan las constantes cinéticas y rendimientos cuánticos relativos a los procesos de desactivación y fluorescencia antes descritos.

Tabla 4.2. Propiedades fotofísicas de las diadas NpxTrpMe en CTAB.

Compuesto	τ_F (ns) ^a	τ_T (μ s) ^b	Φ_F	k_D ($\times 10^{-8} s^{-1}$)	k_F ($\times 10^{-8} s^{-1}$)	$\Phi_{D(din)}$	$\Phi_{D(tot)}$
(S,S)-NpxTrpMe	3.8	1.2	0.20	0.13	0.26	0.098	0.59
(R,S)-NpxTrpMe	3.8	1.2	0.17	0.13	0.26	0.084	0.65
(S,R)-NpxTrpMe	3.8	1.2	0.18	0.13	0.26	0.088	0.65
(R,R)-NpxTrpMe	3.8	1.2	0.20	0.13	0.26	0.095	0.60
(S)-Npx	7.4	1.3	-	-	-	-	0

^a Medido tras excitación a 310 nm ^b Medido tras excitación a 266nm

A la vista de los resultados obtenidos en **Tabla 4.2**, se observan unos tiempos de vida en fluorescencia iguales para todas las diadas de TrpMe con valores de 3.8ns, cifra bastante inferior a los 7.4ns del Npx. Esta diferencia en los tiempos de vida, pese a ser bastante notable, es menor que la obtenida por estas sustancias en medio orgánico, donde las diadas exhibían tiempos de fluorescencia de 1.1 y 2.3ns en función de su estereoisomería. Esta igualdad entre los tiempos de vida hace que las constantes cinéticas del proceso de fluorescencia sean todas iguales con valor $0.26 \times 10^8 s^{-1}$, valor mucho inferior al obtenido en acetonitrilo donde era de aproximadamente $0.45 \times 10^8 s^{-1}$ para las diadas (R,S)- y (S,R)- y de $0.91 \times 10^8 s^{-1}$ para la (S,S)- y (R,R)-.

En cuanto al proceso de desactivación se ha obtenido que el valor de la constante cinética k_D , es igual para todas las diadas con un valor de $0.13 \times 10^8 s^{-1}$, siendo ligeramente más lento que en medio orgánico, lo que se

refleja en una menor disminución de la fluorescencia en CTAB. También se presentan los valores de los rendimientos de desactivación dinámicos, los cuáles son iguales para todas las diadas con valores de 0.49, demostrando que la desactivación de las diadas en el tiempo es igual para todas ellas, siendo esta una diferencia del comportamiento de las mismas según el medio en el que se encuentran, debido a que en disolución orgánica los rendimientos de desactivación dinámicos del singlete resultaron ser dependientes de la isomería de los compuestos de la diada. Sin embargo, se observan diferencias entre las diadas en los rendimientos de desactivación total, lo cual se debe a que el proceso de formación de especies intermedias es un proceso estereoselectivo, tal y como ocurrió con las mismas en acetonitrilo.

4.4 Interacciones en estado sólido

En este último bloque del proyecto, se presentan los resultados obtenidos en los sistemas basados en sólidos mesoestructurados de tipo MCM-41, los cuáles se han diseñado compuestos con todas las diadas y sistemas intermoleculares fármaco+aminoácido, siendo estos resumidos en la siguiente tabla:

Tabla 4.3: Sólidos mesoestructurados de tipo MCM-41 sintetizados con diferentes sistemas en su interior. Las masas entre paréntesis indican las cantidades de fármaco, aminoácido o diada que fueron introducidas para la realización de dicho sólido. Los sólidos intermoleculares naproxeno+aminoácido fueron sintetizados con cantidades equimolares de estos, la igualdad de sus masas especificadas en la tabla se debe a que todos los aminoácidos utilizados y el fármaco poseen pesos moleculares similares.

Sólidos mesoestructurados (MS) sintetizados
MS: Blanco
MS: (S)-Npx (5mg)
MS: (R)-Npx (5mg)
MS: (S)-Npx+(S)-HisMe (1+1mg)
MS: (S)-Npx+(S)-HisMe (2+2mg)
MS: (S)-Npx+(S)-HisMe (5+5mg)
MS: (S)-Npx+(S)-HisMe (10+10mg)
MS: (R)-Npx+(S)-HisMe (5+5mg)
MS: (S)-Npx+(R)-HisMe (1+1mg)
MS: (S)-Npx+(R)-HisMe (2+2mg)
MS: (S)-Npx+(R)-HisMe (5+5mg)
MS: (R)-Npx+(R)-HisMe (5+5mg)
MS: (S)-Npx+(S)-TyrMe (5+5mg)
MS: (R)-Npx+(S)-TyrMe (5+5mg)
MS: (S)-Npx+(R)-TyrMe (5+5mg)
MS: (R)-Npx+(R)-TyrMe (5+5mg)
MS: (S)-Npx+ (S)-TrpMe (5mg+5mg)
MS: (R)-Npx+(S)-TrpMe (5+5mg)
MS: (S)-Npx+(R)-TrpMe (5+5mg)
MS: (R)-Npx+(R)-TrpMe (5+5mg)
MS: (S,S)-NpxTyrMe (10mg)
MS: (R,S)-NpxTyrMe (10mg)
MS: (S,R)-NpxTyrMe (10mg)
MS (R,R)-NpxTyrMe (10mg)
MS: (S,S)-NpxTrpMe (10mg)
MS: (R,S)-NpxTrpMe (10mg)
MS: (S,R)-NpxTrpMe (10mg)
MS: (R,R)-NpxTrpMe (10mg)

Los primeros sólidos sintetizados fueron los que contenían en su interior el sistema (S)-Npx+(S)-HistMe. Para la elaboración de dichos sólidos, se introdujeron distintas masas de fármaco y aminoácido: (1+1mg), (2+2mg), (5+5mg) y (10+10mg). Estos sólidos fueron sintetizados por la dirección de este trabajo y se realizaron con el objetivo de comprobar la robustez del método de síntesis, de si se podía llegar a medir bien con los equipos disponibles y de elegir las masas idóneas a introducir de fármaco y aminoácido en futuros sólidos en base a los resultados obtenidos.

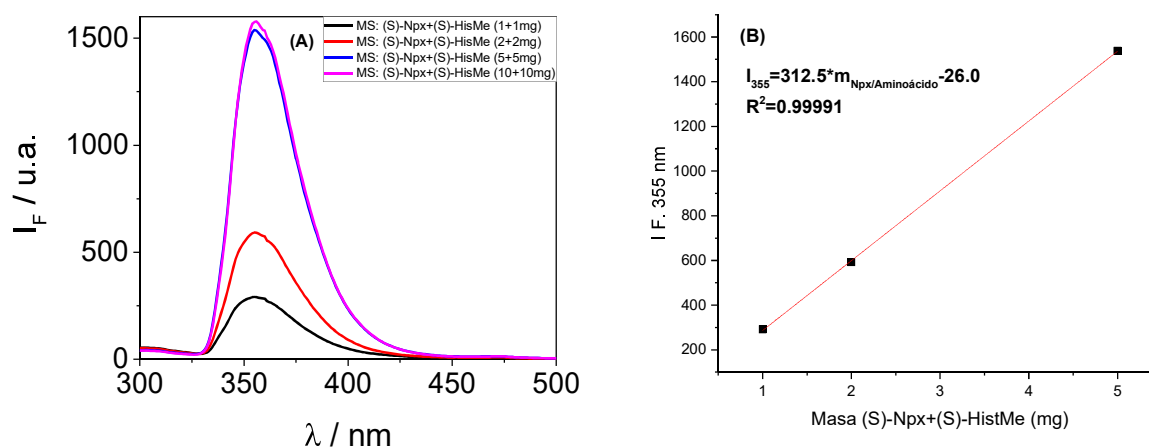


Figura 4.21. Espectros de emisión en estado sólido tras excitar a 280nm sistemas (S)-Npx+(S)-HistMe en los que se introdujeron diferentes masas de fármaco y aminoácido durante la síntesis del sólido **(A)**. Correlación entre la intensidad de fluorescencia a 355nm tras excitar a 280nm de los sistemas (S)-Npx+(S)-HistMe en función de las diferentes masas de fármaco y aminoácido introducidas durante la síntesis del sólido **(B)**.

De la **Figura 4.21B** se observa la buena linealidad entre la emisión del sólido y la masa de fármaco y aminoácido introducida, con un coeficiente de correlación de 0.99996, pudiéndose afirmar que el sistema se introducía en la matriz sólida de manera muy eficiente. Además, se observó que con el protocolo de síntesis utilizado, introduciendo 10mg de cada compuesto el sólido daba la misma señal que con 5mg, sugiriendo que el sistema se satura de Npx y aminoácido en cantidades superiores a 5mg. Por ello, los siguientes sólidos se sintetizaron introduciendo 5mg de fármaco y/o aminoácido, o 10mg si se trataba de una diada, ya que en su molécula alberga una molécula de fármaco y otra de aminoácido.

4.4.1 Procedimiento de síntesis:

El protocolo seguido para la elaboración de un sólido con un determinado sistema en su interior, el cual involucra la presencia de Naproxeno, aminoácido o diada se explica a continuación.

En primer lugar, en un balón de 250mL se pesan 250mg de CTAB en una balanza analítica. A continuación, se introduce en el balón un imán y 110mL de agua mili-Q. El balón con el contenido en su interior era llevado a un agitador magnético con placa calefactora al cual se le acoplaba un "Heat-on", que básicamente es un recipiente en forma de semiesfera donde se acopla el balón y asegura una buena transferencia de calor entre la placa y el balón. A continuación, se activaba la agitación (a una velocidad moderada, para evitar la generación de espumas) y se calentaba el balón a unos 50°C con el objetivo de que se disolviese bien el CTAB.

Mientras se esperaba a que el CTAB solubilizara bien en el agua, se llevaba a cabo la pesada en viales del compuesto o compuestos que conformarían el sistema que se desea introducir en el interior del sólido. Una vez el CTAB estaba completamente disuelto en el medio, se introducía el contenido de los viales volcándolos en la boca del balón y por último lavando el contenido de los viales con 10mL de agua.

Después, se subía la temperatura del balón hasta los 80°C y se ajustaba la velocidad de agitación a exactamente 920rpm. Una vez se alcanzaba dicha temperatura, se añadían 440µL de sosa (NaOH) 4M y seguidamente 1.25mL de TEOS, ambos gota a gota. La solución, que adquiría instantáneamente un color blanquecino azulado, era dejada en agitación a 80°C durante exactamente dos horas.

Una vez pasaban las dos horas, la manta calefactora se apagaba (la agitación se mantenía encendida a 920rpm) y se esperaba a que el balón se enfriara dentro del Heat-on hasta los 50°C.

Pasado ese tiempo, el contenido del balón era introducido con el imán incluido en un tubo de centrifuga Falcon. Si se estuvo sintetizando más de un sólido distinto ese día, la masa de los Falcon que albergaban los diferentes sólidos debían ser igualadas introduciendo agua en estos para que la centrifuga, objeto del siguiente paso, estuviera perfectamente equilibrada.

Los tubos Falcon eran a continuación llevados a una centrifuga dónde se insertaban, y se ponía en marcha un programa de centrifugación de 15 minutos a 10000rpm. Una vez el programa finalizaba, se recogían los Falcon y se observaba como el sólido sintetizado se depositaba de manera muy compacta en el fondo del tubo y el sobrenadante se quedaba en la parte superior. Si se veían muchas partículas de sólido suspendidas en el agua era recomendable volver a centrifugar el tubo y no avanzar al siguiente paso.

Después, se eliminaba el sobrenadante en el recipiente de residuos adecuado, con cuidado de no inclinar demasiado el tubo ya que esto podría haber ocasionado que el sólido cayese. A continuación, se introducían unos 40mL de agua destilada en los tubos, los cuáles debían ser además pesados de nuevo para igualar sus masas. Acto seguido, tras cerrar los Falcon, se agitaban vigorosamente para romper la matriz solida compactada en el fondo del tubo y así poder lavar el sólido para eliminar el exceso de reactivos.



Figura 4.22. Tubos Falcon conteniendo dos sólidos en su interior mientras son agitados en un agitador magnético con placa calefactora antes de ser introducidos en la centrifuga (Imagen de la izquierda). Centrifuga utilizada durante la síntesis de los sólidos (Imagen de la derecha).

Pasados unos 5 minutos de agitación, los Falcon eran llevados de nuevo a la centrifuga. El procedimiento seguido desde el llenado de Falcon con agua, agitado, centrifugado, hasta el decantado del sobrenadante componía un lavado. En total cada sólido era lavado hasta que su pH, medido con papel de tornasol fuera de aproximadamente 7, lo cual se conseguía con unos 3 o 4 lavados.

Alcanzado el pH objetivo, el sólido era lavado una última vez, introduciendo esta vez en su interior no agua sino acetona para eliminar el agua. Una vez se completaba este último lavado, los sólidos sintetizados eran llevados a una estufa a 35°C donde se dejaban secar una noche.

Al día siguiente, los Falcon era recogidos y su contenido sólido, con masas oscilando entre los 500 y 800mg, era triturado con la ayuda de una espátula hasta obtener un fino polvo blanco. Los sólidos eran a continuación introducidos en viales los cuáles eran etiquetados.

4.4.2 Resultados

·Difracción de rayos X de polvo:

El primer paso, antes de comenzar a medir las propiedades fotofísicas de los diferentes sistemas confinados en la matriz sólida, fue la comprobación mediante la técnica de difracción de Rayos X que la matriz sólida se había sintetizado correctamente.

En total, se caracterizaron mediante esta técnica siete sólidos con fármaco, diada y fármaco con aminoácido en su interior, con el objetivo de asegurar que el protocolo de síntesis se realizó de manera correcta y también para comprobar la reproducibilidad del procedimiento, ya que los sólidos fueron obtenidos en días distintos.

En el difractograma expuesto en la **Figura 4.23** se ha incluido el indexado de sus reflexiones en un sistema cristalino hexagonal 2D ($a=b$, $\gamma=120^\circ$), obtenido mediante la utilización de la ley de Bragg (ec.3) y la ecuación de la celda cúbica, la cual se expone a continuación:

$$\frac{1}{d^2} = \frac{4}{3} \left(\frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} \right) \quad (\text{ec. 12})$$

Siendo “d” la distancia interplanar en Å, obtenida a partir de la Ley de Bragg utilizando un valor de λ con la que se irradió la muestra de 1.5406Å y “a” el parámetro de celda medio de 42.5Å

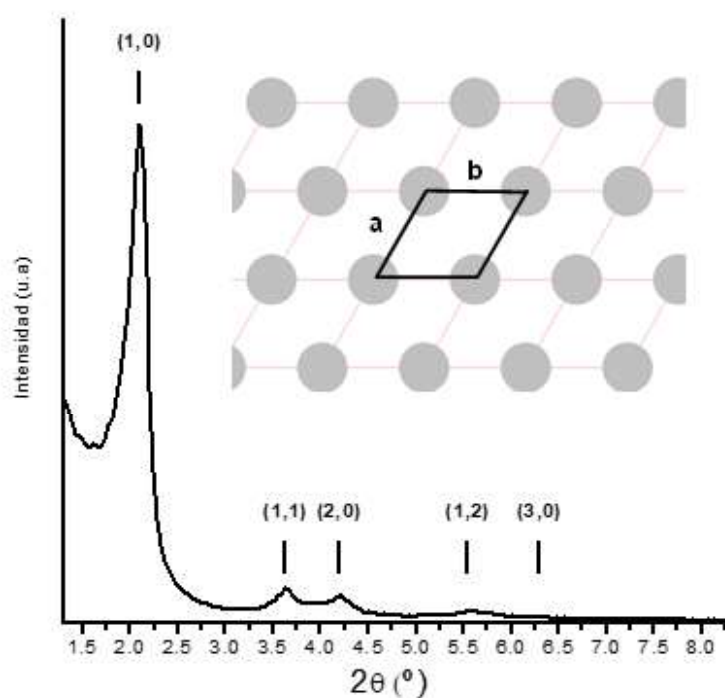


Figura 4.23. Difractograma de rayos- de polvo del sólido MCM-41 con el fármaco (R)-Npx en su interior con el indexado de sus reflexiones en el sistema hexagonal 2D.

Los difractogramas de todos los sólidos caracterizados mediante esta técnica corroboraron la estructura hexagonal característica del MCM-41, siendo estos presentados en la **Figura 7.5** del **Anexo 3**.

·Masa de fármaco introducida:

Una vez comprobado que los sólidos caracterizados mediante el Rayos X de polvo tenían la misma estructura y que el método de síntesis ofrecía resultados reproducibles, se procedió a sintetizar los sólidos con el resto de sistemas todavía no introducidos.

Cuando ya se tuvieron todos los sólidos sintetizados, se propuso un método para saber la concentración de fármaco que quedó retenida en el sólido mesoestructurado (ya que de los 5mg introducidos en el balón durante la síntesis no todos se internalizan en el sólido). Para ello se comenzó realizando una recta de calibrado basada en la absorción del Npx en disolución acuosa con la ayuda del espectrofotómetro UV-vis.

Para la realización de la recta se comenzó introduciendo 10mg de sólido MCM-41 blanco (sin fármaco, aminoácido o diada en su interior) en un vial grande. Una vez pesado el sólido, se introdujeron en dicho vial 2mL de NaOH 4M y 1mL de agua mili-Q.

A continuación, el vial se puso en agitación para asegurar que el sólido se disolviese correctamente. Mientras tanto, se preparó una disolución 2mM de Naproxeno en otro vial con MeOH como disolvente.

Más tarde, un volumen conocido de la disolución de Naproxeno en MeOH fue pipeteado en el vial que contenía el sólido disuelto en NaOH, este vial fue a continuación llevado al espectrofotómetro UV-vis para medir su espectro de absorción. Este proceso fue repetido varias veces, aumentando así de manera gradual el contenido de Naproxeno en la disolución medida.

Una vez realizadas las medidas pertinentes, se seleccionó el valor de absorbancia por la muestra a 320nm y se representó frente a la concentración de fármaco en el instante de la medida, la cual era conocida, para así obtener la recta de calibrado.

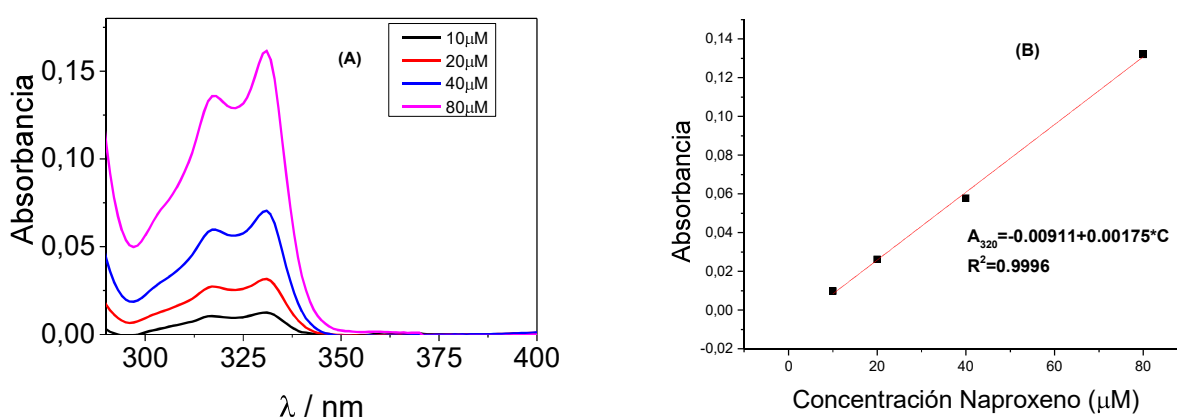


Figura 4.24. Espectros de absorción de la disolución con diferentes concentraciones de Naproxeno (A). Recta de calibrado, obtenida representando la absorbancia de la disolución a 320nm en función de su concentración (B).

Una vez se tuvieron los sólidos sintetizados con los cromóforos en su interior, la obtención de la masa de fármaco siguió básicamente el mismo esquema de trabajo que para obtener la recta de calibrado. Se pesaron 10mg de cada sólido, se disolvieron con 2mL de NaOH 4M y 1mL de agua mili-Q y se midió su espectro.

El procedimiento para la obtención de la masa de fármaco se detalla a continuación:

-Una vez obtenido el espectro se registraba la absorbancia a 320nm.

-La concentración de Naproxeno en la disolución era obtenida con la recta de calibrado:

$$C_{Npx} = \frac{A_{320} + 0.00911}{0.00175}$$

-Los moles de Naproxeno en la disolución eran fácilmente calculados debido a que el volumen de la disolución era conocido (2mL de NaOH y 1mL de agua mili-Q) y la concentración también (paso anterior).

$$n_{Npx} = C_{Npx} * 3mL$$

-La masa de Naproxeno en la disolución es obtenida dividiendo sus moles entre su masa molecular:

$$m_{Npx} = \frac{n_{Npx}}{230.26g * mol^{-1}}$$

-La masa de Naproxeno era finalmente dividida por los 10mg de sólido que había en la disolución, teniéndose el resultado con unidades de masa de Naproxeno dividido por masa de sólido.

Los resultados se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 4.4: Masa de Naproxeno contenida en los distintitos sólidos sintetizados.

Sólido	Abs ($\lambda=320\text{nm}$)	Conc (M)	m Npx (mg)	mg Npx/g solido
MS: (S)-Npx (5mg)	0.163	9.82E-05	0.068	6.59
MS: (S)-Npx+(S)-HistMe (5+5mg)	0.157	9.47E-05	0.065	7.03
MS: (S)-Npx+(R)-HistMe (5+5mg)	0.012	1.19E-05	0.008	0.79
MS: (S)-Npx+(S)-TyrMe (5+5mg)	0.010	1.08E-05	0.007	0.68
MS: (S)-Npx+(R)-TyrMe (5+5mg)	0.016	1.41E-05	0.010	0.95
MS: (S)-Npx+(S)-TrpMe (5+5mg)	0.012	1.19E-05	0.008	0.84
MS: (S)-Npx+(R)-TrpMe (5+5mg)	0.013	1.28E-05	0.009	0.91
MS: (R)-Npx (5mg)	0.179	1.07E-04	0.074	7.27
MS: (R)-Npx+(S)-HistMe (5+5mg)	0.193	1.15E-04	0.080	7.90
MS: (R)-Npx+(R)-HistMe (5+5mg)	0.018	1.55E-05	0.011	1.01
MS: (R)-Npx+(S)-TyrMe (5+5mg)	0.010	1.11E-05	0.008	0.74
MS: (R)-Npx+(R)-TyrMe (5+5mg)	0.009	1.05E-05	0.007	0.71
MS: (R)-Npx+(S)-TrpMe (5+5mg)	0.004	7.32E-06	0.005	0.51
MS: (R)-Npx+(R)-TrpMe (5+5mg)	0.009	1.06E-05	0.007	0.76

Como se puede observar en la **Tabla 4.4** no se incluyen los sólidos en los que se introdujeron las diadas, ello es debido a que en las disoluciones de estos no se observó señal a ninguna longitud de onda en el espectrofotómetro UV-vis, por lo que se concluyó que no se había introducido diada en dichos sólidos, probablemente por la pobre solubilidad que estas presentaban.

Otro resultado que salta a la vista es que los sólidos con los sistemas (S)-Npx, (R)-Npx, (S)-Npx+(S)-HistMe (R)-Npx+(S)-HistMe tienen masas de fármaco por gramo de sólido mucho mayores que el resto de sólidos. Estos cuatro sólidos fueron sintetizados al principio de la elaboración del proyecto, pocas semanas antes de comenzar a sintetizar el resto de sólidos. Pese a que las causas de la elevada diferencia en la introducción de fármaco entre estos cuatro sólidos y el resto son desconocidas, su señal fue visible en el espectrómetro UV-vis y el fluorímetro de estado estacionario.

Espectroscopía ultravioleta-visible:

La absorbancia es medida con el mismo equipo utilizado para las mediciones en disolución orgánica y disolución acuosa con micelas de CTAB. Sin embargo, debido a que los sistemas se encontraban en estado sólido, se extrajo la plataforma para cubetas del espectrofotómetro y se introdujo una esfera integradora, la cual permitía el estudio de muestras en estado sólido.

Como se puede observar en los espectros de la **Figura 4.25**, los sólidos: (S)-Npx, (R)-Npx, (S)-Npx+(S)-HistMe y (R)-Npx+(S)-HistMe son los sólidos que más absorben. Esto es debido a que, como se ha demostrado antes, son los sólidos que más fármaco contienen en su interior. El resto de sistemas presentan una absorbancia bastante baja debido a la baja masa de fármaco introducida.

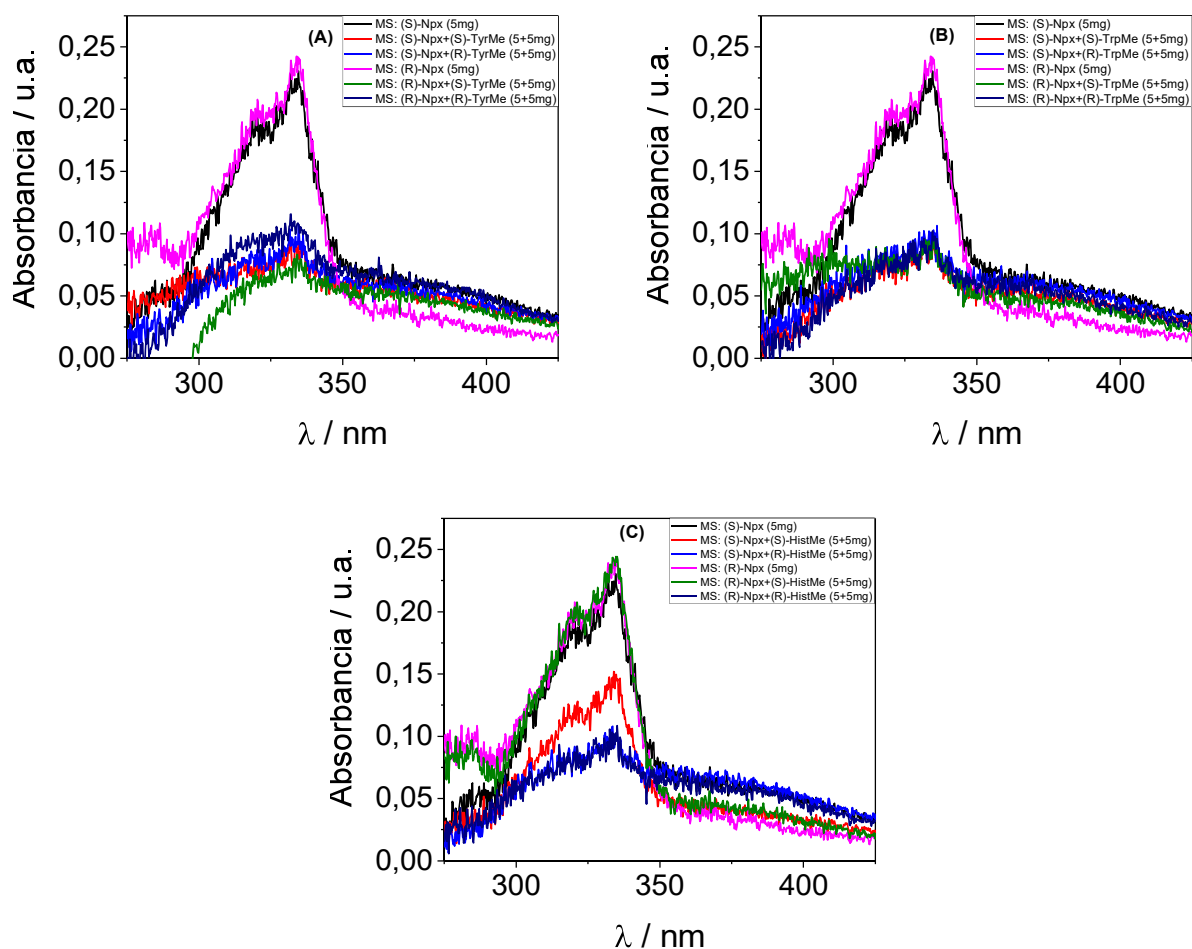


Figura 4.25. Espectros de absorción de los sólidos con sistemas de: Npx y TyrMe (A), Npx y TrpMe (B) y Npx e HistMe (C).

Fluorescencia:

Debido al ruido y a la variabilidad de las lecturas obtenidas en el espectrofotómetro UV-vis, se decidió no corregir los espectros de fluorescencia como se ha realizado anteriormente debido a que ello podría haber arrastrado errores y haber llevado a la deducción de conclusiones incorrectas. En lugar de ello, se presentan normalizados a 1, por lo tanto la variabilidad ocasionada por los distintos grados en los que el fármaco se introdujo en el sólido quedan obviados, por ello no se pueden deducir resultados que involucren diferencias de intensidad de fluorescencia, como las ocasionadas debido a un proceso de transferencia electrónica.

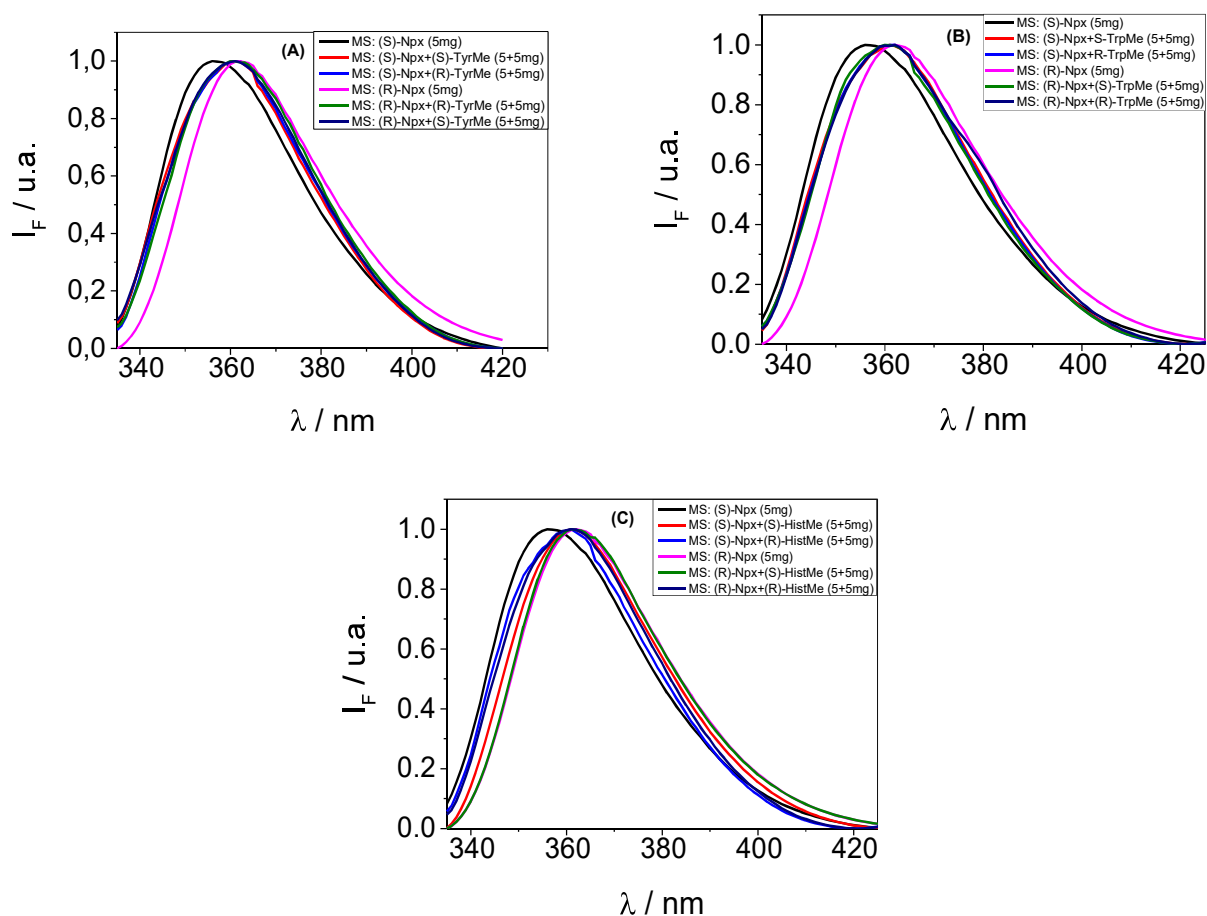


Figura 4.26. Espectros de emisión tras excitar a 320nm de los sólidos con sistemas de: Npx y TyrMe **(A)**, Npx y TrpMe **(B)** y Npx e HistMe **(C)**.

Los malos resultados en cuanto a la introducción de fármaco y aminoácido en los sólidos MCM-41, los cuáles han provocado el descarte de los sólidos con diada y la alta variabilidad en las lecturas de los sólidos con sistemas intermoleculares en su interior, impide el correcto análisis de sus propiedades fotofísicas. Pese a que corrección de las emisiones de fluorescencia con los espectros UV-vis de los sólidos serían posibles, tal y como se ha realizado a lo largo de este proyecto, los elevados valores de los factores de corrección de emisión podrían arrastrar errores que propiciarán la formulación de conclusiones erróneas. Es por ello, que los resultados presentados de este bloque son de carácter orientativo, ya que el estudio fotofísico de los sistemas encapsulados en sólidos mesoporosos deberían hacerse tras establecer un protocolo de síntesis que asegure buenos valores de introducción del fármaco.

Durante el desarrollo de la caracterización fotofísica de Npx en disolución acuosa de CTAB, uno de los problemas presentados por el fármaco fue su pobre solubilidad en este medio. Para mejorarla se incrementaba el pH de la disolución añadiendo NaOH y dejándolo reposar unos minutos en el ultrasonidos. Durante la síntesis de los sólidos, el fármaco, aminoácido y diada eran vertidos directamente en la disolución acuosa con CTAB, para al cabo de unos minutos verter de manera muy seguida la NaOH y el TEOS. Es probable, que la pobre introducción del fármaco en el sólido haya sido debido a que cuando se introduce el TEOS, y la formación del sólido comienza, el fármaco no este todavía en el interior de las micelas de CTAB, debido a que

este no ha estado el tiempo suficiente en la disolución con la NaOH, que es realmente la sustancia que le hace ser soluble, ocasionando que el fármaco se quede suspendido en la fase líquida del balón que era extraída durante los lavados. Por ello, es necesario introducir una posible mejora en el protocolo de síntesis, en la cual el fármaco (sólo o con el aminoácido) o la diada sean introducidos ya disueltos en el balón durante la síntesis, en lugar de verterlos directamente en estado sólido tal y como se hizo. La modificación del protocolo de síntesis planteada consistiría en añadir la NaOH no directamente en el balón, sino en el vial el cual alberga el fármaco con o sin él aminoácido y la diada, siendo dicho vial sometido a agitación para favorecer la dilución total de los compuestos. A continuación, el contenido de los viales con la NaOH sería pipeteado en el balón y se esperaría un periodo de tiempo controlado para asegurar la introducción de los compuestos en la micela antes de introducir el TEOS y comenzar a formar el sólido.

5. CONCLUSIONES

El objetivo del presente trabajo es el estudio y caracterización de las propiedades fotofísicas del fármaco Npx en diferentes entornos que pretenden emular las interacciones reales entre el fármaco y proteínas de transporte. Para ello, mediante la síntesis orgánica de diadas se ha forzado la interacción intercromofórica fármaco-aminoácido estudiándose dichos sistemas en disolución orgánica, micelas de CTAB y sólidos mesoestructurados de tipo MCM-41, comparándose los resultados de las diadas en estos dos últimos ambientes con sistemas intermoleculares en los que fármaco y aminoácido eran introducidos en estos medios de manera independiente. Conviene resaltar que los ensayos obtenidos durante el estudio de las propiedades fotofísicas del fármaco en la matriz mesoestructurada son resultados preliminares, y que todavía precisan de un protocolo de síntesis mejorado que incremente la cantidad de fármaco introducido. De este trabajo se pueden concluir los siguientes puntos:

✓ Se han sintetizado diadas de NpxTrpMe y NpxTyrMe con muy buenos resultados en cuanto a su rendimiento y grado de pureza. Además, se ha utilizado un método de purificación alternativo basado en una primera criba por cromatografía de capa preparativa y una recristalización, técnicas que lidiaron de manera efectiva con el problema de la epimerización y que sustituyen al procedimiento habitual de purificación basado en la cromatografía por columna, mucho más laboriosa.

✓ Se ha caracterizado el comportamiento del fármaco en disolución orgánica y acuosa en micelas de CTAB cuando éste forma parte de una diada con TrpMe y/o TyrMe. En todas las diadas se detectó la existencia de un proceso de transferencia de energía altamente eficiente desde el estado excitado singlete de los aminoácidos al del Npx.

✓ Se ha podido observar un proceso de desactivación dinámica tanto en disolución orgánica como en CTAB en las diadas NpxTrpMe, siendo estereoselectivo, ya que era más acentuado en las diadas (S,R)- y (R,S)- que en (S,S)- y (R,R)-. Esta desactivación fue probablemente causada por un proceso de transferencia electrónica para dar lugar a la formación de especies radicalarias y/o excíplejos, siendo este termodinámicamente favorable tal y como se explica tras la aplicación de la ecuación de Rehm-Weller. Así, se ha propuesto un mecanismo que explica los procesos fotofísicos fundamentales que tienen lugar en las diadas NpxTrpMe. En dicho mecanismo se han valorado mediante la cuantificación de constantes cinéticas y rendimientos cuánticos los procesos detectados, obteniéndose resultados que indican que cuando las diadas están confinadas en CTAB el proceso de desactivación es menor y con una velocidad que no depende de la estereoisomería de los componentes de la diada, a diferencia de en disolución orgánica donde sí lo hace y además a velocidades bastante más elevadas.

✓ En cuanto a las diadas de NpxTyrMe, estas han mostrado indicios de experimentar un proceso de desactivación excitando a longitudes de onda de 266nm y 280nm, siendo éste ligeramente más notable en

disolución acuosa con micelas de CTAB que en disolución orgánica, a diferencia de las diadas de NpxTrpMe, donde ocurría justo lo contrario.

✓ Se ha podido observar además en los sistemas intermoleculares fármaco-aminoácido la disminución de la eficiencia del proceso de transferencia de energía entre los estados excitados singlete del aminoácido y el fármaco y la ausencia de un proceso de desactivación importante, como ocurre en las diadas NpxTrpMe.

✓ Se ha planteado un método efectivo para la cuantificación de la introducción de fármaco dentro del sólido mesoestructurado.

✓ Los experimentos preliminares han indicado que es posible preparar sólidos mesoestructurados de tipo MCM-41 como matrices de inmovilización de especies para su estudio fotofísico.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. (2017). *Utilización de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos en España durante el periodo 2013-2016*. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.
- Allen, J. (1993). Drug-induced photosensitivity. *Clinical Pharmacy*, 12(8), 580-587.
- Basken, N. E., Mathias, C. J., & Green, M. A. (2009). Elucidation of the Human Serum Albumin (HSA) Binding Site for the Cu-PTSM and Cu-ATSM Radiopharmaceuticals. *J Pharm Sci*, 6(98), 2170-2179.
- Bhattacharyya, S., Lelong, G., & Sabounji, M.-L. (2006). Recent progress in the synthesis and selected. *Journal of Experimental Nanoscience*, 1(3), 375-395.
- Bosca, F., Marín, M. L., & Miranda, M. Á. (2001). Photoreactivity of the Nonsteroidal Anti-inflammatory 2-Arylpropionic Acids with Photosensitizing Side Effects. *Photochemistry and Photobiology*, 5, 637-655.
- Carl Roth. (s.f.). *Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)*. Recuperado el 12 de 05 de 2019, de Carl Roth: [https://www.carlroth.com/pl/en/Life-Science/Biochemistry/Detergents/Cetyltrimethylammonium-bromide-\(CTAB\)/p/0000000000009a5100040023_en](https://www.carlroth.com/pl/en/Life-Science/Biochemistry/Detergents/Cetyltrimethylammonium-bromide-(CTAB)/p/0000000000009a5100040023_en)
- EDINBURGH INSTRUMENTS. (s.f.). *Transient Absorption*. Recuperado el 21 de 5 de 2019, de EDINBURGH INSTRUMENTS: <https://www.edinst.com/techniques/transient-absorption/>
- Erickson, H. (2009). Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. *BioMed Central*, 11, 32-51.
- Grupo GIDOLQUIM. (s.f.). *TÉCNICAS Y OPERACIONES AVANZADAS EN EL LABORATORIO QUÍMICO (TALQ)*. Recuperado el 05 de 06 de 2019, de Universitat de Barcelona: <http://www.ub.edu/talq/es/node/259>
- Guizado, T. R. (2014). Analysis of the structure and dynamics of human serum albumin. *Journal of Molecular Modeling*, 10, 2450.
- Harriman, A. (1987). Further comments on the redox potentials of tryptophan and tyrosine. *J. Phys. Chem*, 91(24), 6102-6104.
- Herrero Limones, D. (2015). *Fotoquímica de compuestos heteroaromáticos tricíclicos en medios biomiméticos*. Valencia: UPV-CSIC.
- Jiménez Molero, M. c., Miranda Alonso, M. Á., & Vayá Pérez, I. (2005). Triplet Excited States as Chiral Reporters for Binding of Drugs to Transport Proteins. *Journal of American Chemical Society*, 127(29), 10134-10135.
- Lee, P., & Wu, X. (2015). Review: Modifications of Human Serum Albumin and Their Binding Effect. *HHS Public Access*, 21(14), 1862-1865.
- Mascagni, P., Sabbatini, V., Biordi, L., Martinotti, S., Allegretti, M., Marullo, A., & Caselli, G. (2000). R- and S-isomers of nonsteroidal anti-inflammatory drugs differentially regulate cytokine production. *European Cytokine Network*, 11(2), 195-192.

- Mayo Tamarit, L. (2018). *Diseño de nanopartículas de oro funcionalizadas con AINEs y proteínas para su uso en biomedicina*. UPV.
- McConathy, J., & Owens, M. (2003). Stereochemistry in Drug Action. *Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry*, 5(2), 70-73.
- Montes, R., Lima, A., Cunha, R., Guedes, T., dos Santos, W., Nossol, E., . . . Muñoz, R. (2016). Size effects of multi-walled carbon nanotubes on the electrochemical oxidation of propionic acid derivative drugs: Ibuprofen and naproxen. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 775(15), 342-349.
- Muriel, C., Santos, J., & Sánchez Montero, F. J. (2008). *Farmacología de los analgésicos no opiáceos*. Obtenido de Catedra del Dolor: <http://www.catedradeldolor.com/PDFs/Cursos/Tema%206.pdf>
- Murov, S. L. (1993). *Handbook of Photochemistry*. Nueva York: Marcel Dekker.
- Nguyen, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2006). Chiral Drugs: An Overview. *IJBS*, 2(2), 85-100.
- Pallarés Delgado de Molina, J. (2000). AINEs PREFERENTEMENTE INHIBIDORES DE LA COX-2. *REUNIÓN CIENTÍFICA DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DEL DOLOR*, 13-18.
- Pearson Education. (s.f.). *L- and D-Amino Acids*. Recuperado el 14 de 05 de 2019, de Prentice Hall Bridge page: http://www.phschool.com/science/biology_place/biocoach/bioprop/landd.html
- Universidad de Granada. (s.f.). *Listado de tarifas por servicio*. Recuperado el 2019 de 06 de 19, de Universidad de Granada: <https://cic.ugr.es/tarifas-por-servicio.php?codServicio=1>
- Universidad Miguel Hernández de Elche. (08 de 2013). *Tarifas de servicio de instrumentación cinética*. Recuperado el 2019 de 06 de 19, de Universidad Miguel Hernández de Elche: <http://sicgfyf.umh.es/files/2013/08/ANEXO-XX-Tarifas.pdf>
- Universitat de Barcelona. (2014). *Percepción y atención, Apuntes de Psicología*. Obtenido de docsity: <https://www.docsity.com/es/percepcion-y-atencion-24-5/3510410/>
- Vayá Pérez, I. (2007). *Estados excitados del antiinflamatorio no esteroideo flurbiprofeno como sondas para la interacción con proteínas*. Valencia: UPV.
- Vayá Pérez, I., Gustavsson, T., Markovisti, D., Miranda Alonso, M., & Consuelo Jiménez, M. (2016). Influence of the spacer on the photoreactivity of flurbiprofen-tyrosine dyads. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 322.323(15), 95-101.
- Vayá Pérez, I., Jiménez Molero, M., & Miranda Alonso, M. (2008). Transient absorption spectroscopy for determining multiple site occupancy in drug-protein conjugates. A comparison between human and bovine serum albumins using flurbiprofen methyl ester as a probe. *J. Phys. Chem*, 112(9), 2694-2699.
- Vayá Pérez, I., Jiménez Molero, M., & Miranda Alonso, M. (2005). Stereodifferentiation in the fluorescence of naproxen-arginine salts in the solid state. *Tetrahedron: Assymetry*, 16(12), 2167-2171.
- Vayá Pérez, I., Jiménez Molero, M., Lhiaubet-Vallet, V., Pérez Ruiz, R., & Miranda Alonso, M. (2010). Drug-protein interactions assessed by fluorescence measurements in the real complexes and in model dyads. *Chemical Physics Letters*, 486(4-6), 147-153.
- Vayá Pérez, I., Ros, A., Jiménez Molero, M., & Miranda Alonso, M. (2013). Photooxygenation mechanisms in naproxen-amino acid linked systems. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 13(2), 224-230.

- Vayá Pérez, I., Ros, A., Monje-López, M., Tomás, V., Jiménez Molero, M., & Miranda Alonso, M. (2015). Mechanistic Studies on the Photoallergy Mediated by Fenofibric Acid: Photoreactivity with Serum Albumins. *American Chemical Society*, 29(1), 40-46.
- Vayá, I., Bueno, C., Jiménez, M., & Miranda, M. (2006). Use of triplet excited states for the study of drug binding to human and bovine serum albumins. *ChemMedChem*, 1(9), 1015-1020.
- Velazquez, M. (1995). Hydrogen bonding in a non-steroidal anti-inflammatory drug Naproxen. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 29(1), 23-31.
- Vuignier, K., Schappler, J., Veuthey, J.-L., & Martel, S. (2010). Drug-protein binding: A critical review of analytical tools. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(1), 53-66.
- Wongrakpanich, S., Wongrakpanich, A., Melhado, K., & Rangaswami, a. (2018). A Comprehensive Review of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Use in The Elderly. *Aging and Disease*, 9(1).

7. PRESUPUESTO

Con el objetivo de valorar cuál ha sido el coste total de ejecución de este proyecto se presenta el documento del presupuesto, el cual se encuentra fraccionado en cuatro capítulos que coinciden con el esquema de presentación del trabajo, los cuáles son:

- Capítulo I: Síntesis de las diadas
- Capítulo II: Interacciones en disolución orgánica
- Capítulo III: Interacciones en micelas de CTAB
- Capítulo IV: Interacciones en estado sólido

Cada capítulo estará a su vez segmentado en cuatro subcapítulos:

- Subcapítulo I: Materiales
- Subcapítulo II: Reactivos
- Subcapítulo III: Instrumentación
- Subcapítulo IV: Personal

Para la obtención de los precios del material de laboratorio se han utilizado las webs comerciales de la marca *Labbox* y *Fisher Scientific*. Para la consecución del precio unitario de un material, el cual se vendía en lotes de varias unidades, se ha cogido siempre el pack más pequeño y su precio era dividido por el número de unidades que este traía consigo. Si un determinado material de laboratorio ya ha sido especificado y contabilizado en un bloque anterior y este fue simplemente reutilizado, en el bloque repetido su precio no será contado una segunda vez, en lugar de ello en la casilla de su precio aparecerá "Reut".

El precio de los reactivos ha sido extraído de la casa comercial *Sigma Aldrich*. Para la obtención del precio de un gramo o un mililitro de cada sustancia se ha utilizado la misma esquemática de obtención de precios que con los materiales, salvo que en lugar de precio por unidad de material se ha realizado por unidad de masa o volumen.

Para la instrumentación no analítica (balanza, rotavapor, agitador electromagnético, etc.), se ha obtenido el precio de uso por una hora del equipo en cuestión mediante su coste calculado de amortización, considerando que los tiempos de amortización de la instrumentación de laboratorio se suele establecer en 10 años y que los días laborables de trabajo por son 245 con 8 horas de trabajo diarias. En cuanto a la instrumentación analítica (cómo la espectroscopía UV-vis, equipos de fluorescencia o RMN) su precio de uso por hora ha sido obtenido a partir de las tarifas ofertadas por instituciones públicas en España a investigadores del mismo centro, las cuales ofrecen el uso de equipos de la misma funcionalidad y características similares a los usados en este proyecto (Universidad Miguel Hernández de Elche, 2013) (Universidad de Granada, s.f.).

Por último, cabe destacar que durante la realización de este trabajo se utilizaron 4 diadas las cuáles no fueron sintetizadas, sino que fueron prestadas por el laboratorio de trabajo para la realización de este proyecto. Por el hecho de no haber sido producidas durante el transcurso de este trabajo, el coste de su síntesis no puede ser contemplado en el Capítulo I. Pese a ello, fueron utilizadas en las partes del proyecto correspondientes a

los Capítulos II, III y IV y su precio debe de ser contabilizado. Para la estimación de su precio por miligramo, se ha contado que su procedimiento de síntesis y los costes que estas acarrearán son idénticos que los de la realización de las cuatro diadas que sí fueron producidas durante la realización de este proyecto. Por lo que el precio de un miligramo de una diada, ha sido obtenido a partir del coste de realización del propio Capítulo I, donde se obtuvieron 4 diadas de 300mg cada una.

·Capítulo I: Síntesis de las diadas:

Subcapítulo 1.1: Materiales				
Cantidad	Ud	Descripción	Precio unitario	Importe
4	Ud	Matraz de balón de fondo redondo de 50mL	4.00 €	16.00 €
4	Ud	Vial de vidrio de 20mL	0.19 €	0.76 €
12	Ud	Pipeta Pasteur de vidrio	0.04 €	0.48 €
4	Ud	Imán agitador	1.88 €	7.52 €
4	Ud	Soporte de pie trípode	13.41 €	53.64 €
1	Ud	Microespatula con cuchara de acero inoxidable	7.78 €	7.78 €
4	Ud	Pinza de sujeción universal	5.94 €	23.76 €
4	Ud	Nuez doble	4.98 €	19.92 €
4	Ud	Soporte de corcho para balones	4.75 €	19.00 €
4	Ud	Embudo de decantación de 100mL	21.52 €	86.08 €
1	Ud	Probeta graduada de vidrio de 100mL	4.50 €	4.50 €
4	Ud	Matraz Erlenmeyer de vidrio de 100mL	4.00 €	16.00 €
2	Ud	Embudo de Büchern con placa filtrante	19.28 €	38.56 €
2	Ud	Adaptador macho con oliva lateral	2.96 €	5.92 €
0.5	Ud	Papel de cromatografía TLC de 46x57cm	1.78 €	0.89 €
1	Ud	Cubeta cilíndrica para cromatografía	11.71 €	11.71 €
6	Ud	Tubo de ensayo de 7mL	0.05 €	0.30 €
1	Ud	Gradilla universal para tubos de ensayo	13.41 €	13.41 €
4	Ud	Placas de gel de sílice para PLC	23.90 €	95.60 €
1	Ud	Cubeta rectangular para cromatografía	156.92 €	156.92 €
4	Ud	Tubos de RMN de 3mm	220.00 €	880.00 €
1	Ud	Plato de cristalización de vidrio Pyrex	47.82 €	47.82 €
4	Ud	Vial de vidrio de 5mL	0.13 €	0.52 €
0.02	%	Costes directos complementarios		30.14 €
				1,537.23 €

Subcapítulo 1.2: Reactivos				
Cantidad	Ud	Descripción	Precio unitario	Importe
0.4	g	(S)-Npx 98%	14.88 €	5.95 €
0.4	g	(R)-Npx, 98%	69.40 €	27.76 €
0.512	g	(R)-TrpMe, 98%	23.40 €	11.98 €
0.464	g	(R)-TyrMe, 98%	73.00 €	33.87 €
0.88	mL	EDC, 97%	12.80 €	11.26 €
0.544	g	HoBt, 97%	1.91 €	1.04 €
40	mL	Piridina HPLC	0.22 €	8.80 €
440	mL	DCM HPLC	0.07 €	30.80 €
75	mL	EtOAc HPLC	0.07 €	5.25 €
40	mL	Hexano HPLC	0.09 €	3.60 €
10	mL	Metanol HPLC	0.03 €	0.30 €
120	mL	Disolución de bicarbonato sódico	0.04 €	4.56 €
120	mL	Disolución de ácido clorhídrico al 37%	0.10 €	11.47 €
120	mL	Salmuera	0.07 €	8.59 €
5	mL	Cloroformo deuterado 100%	1.64 €	8.20 €
0.02	%	Costes directos complementarios		3.47 €
				176.91 €

Subcapítulo 1.3: Instrumentación				
Cantidad	Ud	Descripción	Precio unitario	Importe
1	hr	Balanza analítica	0.30 €	0.30 €
60	hr	Placa cafectora con agitación	0.00 €	0.11 €
5	hr	Equipo evaporador rotativo	0.06 €	0.30 €
10	hr	Espectroscopía RMN	38.50 €	385.00 €
0.02	%	Costes directos complementarios		7.71 €
				393.42 €

Subcapítulo 1.4: Personal				
Cantidad	Ud	Descripción	Precio unitario	Importe
40	hr	Antonio Verdasco Vivancos	15.00 €	600.00 €
25	hr	Ignacio Vayá Pérez (Tutor experimental)	20.00 €	500.00 €
0.02	%	Costes directos complementarios		22.00 €
				1,122.00 €

·Capítulo II: Interacciones en disolución orgánica:

Subcapítulo 2.1: Materiales				
Cantidad	Ud	Descripción	Precio unitario	Importe
11	Ud	Vial de vidrio de 5mL	0.13 €	1.43 €
11	Ud	Vial de vidrio de 20mL	0.19 €	2.09 €
1	Ud	Microespatula con cuchara de acero inoxidable	Reut	Reut
11	Ud	Pipeta Pasteur de vidrio	0.04 €	0.44 €
4	Ud	Cubeta de cuatro caras pulidas de cuarzo	110.88 €	443.52 €
1	Ud	Portacubetas de Polietileno	2.15 €	2.15 €
4	Ud	Aguja extraíble Hamilton	25.67 €	102.68 €
4	Ud	Aguja Hipodérmica Agani	0.05 €	0.21 €
4	Ud	Globo de Látex	0.10 €	0.40 €
0.02	%	Costes directos complementarios		11.06 €
				563.98 €

Subcapítulo 2.2: Reactivos				
Cantidad	Ud	Descripción	Precio unitario	Importe
245	mL	MeCN	0.13 €	32.34 €
0.01	g	(S)-Npx 98%	14.88 €	0.15 €
0.01	g	(R)-TrpMe, 98%	23.40 €	0.23 €
0.01	g	(R)-TyrMe, 98%	73.00 €	0.73 €
10	mg	Diada no sintetizada: (S,S)-NpxTyrMe	2.34 €	23.4 €
10	mg	Diada no sintetizada: (R,S)-NpxTyrMe	2.34 €	23.4 €
10	mg	Diada no sintetizada: (S,S)-NpxTrpMe	2.34 €	23.4 €
10	mg	Diada no sintetizada: (R,S)-NpxTrpMe	2.34 €	23.4 €
0.02	%	Costes directos complementarios		2.54 €
				129.59 €

Subcapítulo 2.3: Instrumentación				
Cantidad	Ud	Descripción	Precio unitario	Importe
6	hr	Espectroscopía UV-vis	6.00 €	36.00 €
6	hr	Espectrofluorímetro de estado estacionario	10.00 €	60.00 €
6	hr	Espectrofluorímetro de resolución temporal	20.00 €	120.00 €
12	hr	Fotólisis de destello láser	30.00 €	360.00 €
0.02	%	Costes directos complementarios		11.52 €
				587.52 €

Subcapítulo 2.4: Personal				
Cantidad	Ud	Descripción	Precio unitario	Importe
60	hr	Antonio Verdasco Vivancos	15.00 €	900.00 €
25	hr	Ignacio Vayá Pérez (Tutor experimental)	20.00 €	500.00 €
0.02	%	Costes directos complementarios		28.00 €
				1,428.00 €

·Capítulo III: Interacciones en micelas de CTAB:

Subcapítulo 3.1: Materiales				
Cantidad	Ud	Descripción	Precio unitario	Importe
20	Ud	Vial de vidrio de 20mL	0.19 €	3.80 €
1	Ud	Microespatula con cuchara de acero inoxidable	Reut	Reut
37	Ud	Punta de propipeta de 1 a 5mL	0.05 €	1.92 €
1	Ud	Matraz Erlenmeyer de 500mL	6.96 €	6.96 €
1	Ud	Imán agitador	Reut	Reut
1	Ud	Probeta graduada de vidrio de 250mL	16.34 €	16.34 €
4	Ud	Soporte de pie trípode	Reut	Reut
4	Ud	Pinza de sujeción universal	Reut	Reut
4	Ud	Nuez doble	Reut	Reut
20	Ud	Punta de propipeta de 2 a 200µL	0.004 €	0.08 €
4	Ud	Cubeta de cuatro caras pulidas de cuarzo	Reut	Reut
1	Ud	Portacubetas de Polietileno	Reut	Reut
0.02	%	Costes directos complementarios		0.58 €
				29.69 €

Subcapítulo 3.2: Reactivos				
Cantidad	Ud	Descripción	Precio unitario	Importe
0.0025	g	(S)-Npx 98%	14.88 €	0.04 €
0.0025	g	(R)-Npx, 98%	69.40 €	0.17 €
0.0025	g	(S)-TrpMe, 98%	10.68 €	0.03 €
0.0025	g	(R)-TrpMe, 98%	23.40 €	0.06 €
0.0025	g	(S)-TyrMe, 98%	6.32 €	0.02 €
0.0025	g	(R)-TyrMe, 98%	73.00 €	0.18 €
100	mL	Metanol HPLC	0.03 €	3.00 €
0.25	g	CTAB	1.85 €	0.46 €
0.02	%	Costes directos complementarios		0.08 €
				4.04 €

Subcapítulo 3.3: Instrumentación				
Cantidad	Ud	Descripción	Precio unitario	Importe
1	hr	Balanza analítica	0.30	0.30
12	hr	Espectroscopía UV-vis	6.00	72.00
12	hr	Espectrofluorímetro de estado estacionario	10.00	120.00
6	hr	Espectrofluorímetro de resolución temporal	20.00	120.00
8	hr	Fotólisis de destello láser	30.00	240.00
0.02	%	Costes directos complementarios		11.04
				563.04 €

Subcapítulo 3.4: Personal				
Cantidad	Ud	Descripción	Precio unitario	Importe
85	hr	Antonio Verdasco Vivancos	15.00 €	1,275.00 €
30	hr	Ignacio Vayá Pérez (Tutor experimental)	20.00 €	600.00 €
0.02	%	Costes directos complementarios		37.50 €
				1,912.50 €

·Capítulo IV: Interacciones en estado sólido:

Subcapítulo 4.1: Materiales				
Cantidad	Ud	Descripción	Precio unitario	Importe
3	Ud	Balón de 250mL	50.14	150.42
1	Ud	Microespatula con cuchara de acero inoxidable	Reut	Reut
4	Ud	Soporte de corcho para balones	Reut	Reut
3	Ud	Imán agitador	Reut	Reut
1	Ud	Probeta graduada de vidrio de 250mL	Reut	Reut
3	Ud	Soporte de pie trípode	Reut	Reut
3	Ud	Pinza de sujección universal	Reut	Reut
3	Ud	Nuez doble	Reut	Reut
3	Ud	Heat-on de 150mL	234.00	702.00
72	Ud	Vial de vidrio de 5mL	0.13	9.36
20	Ud	Pipeta Pasteur de vidrio	0.04	0.80
2	Ud	Vaso de precipitados de 5mL de Pyrex	4.35	8.70
56	Ud	Tubos Falcon	0.34	19.04
0	Ud	Tiras de papel indicadoras de pH	32.76	8.19
1	Ud	Cubeta de estado sólido	250.00	250.00
0	%	Costes directos complementarios		19.96
				1018.05

Subcapítulo 4.2: Reactivos				
Cantidad	Ud	Descripción	Precio unitario	Importe
0.12	g	(S)-Npx 98%	14.88 €	1.79 €
0.07	g	(R)-Npx, 98%	69.40 €	4.86 €
0.01	g	(S)-TrpMe, 98%	10.68 €	0.11 €
0.01	g	(R)-TrpMe, 98%	23.40 €	0.23 €
0.01	g	(S)-TyrMe, 98%	6.32 €	0.06 €
0.01	g	(R)-TyrMe, 98%	73.00 €	0.73 €
10	mg	Diada no sintetizada: (S,S)-NpxTyrMe	2.34 €	23.40 €
10	mg	Diada no sintetizada: (R,S)-NpxTyrMe	2.34 €	23.40 €
10	mg	Diada no sintetizada: (S,S)-NpxTrpMe	2.34 €	23.40 €
10	mg	Diada no sintetizada: (R,S)-NpxTrpMe	2.34 €	23.40 €
7	g	CTAB	1.85 €	12.95 €
35	mL	TEOS	1.36 €	47.60 €
0.13	g	NaOH en pellets	12.80 €	1.66 €
5	mL	Metanol HPLC	0.03 €	0.15 €
0.02	%	Costes directos complementarios		3.14 €
				160.24 €

Subcapítulo 4.3: Instrumentación				
Cantidad	Ud	Descripción	Precio unitario	Importe
4	hr	Balanza analítica	0.30 €	1.20 €
85	hr	Placa cafectora con agitación	0.002 €	0.15 €
10	hr	Centrífuga	0.008 €	0.08 €
6	hr	Espectroscopía UV-vis	6.00 €	36.00 €
6	hr	Espectrofluorímetro de estado estacionario	10.00 €	60.00 €
4	hr	Difracción de Rayos X	22.80 €	91.20 €
0.02	%	Costes directos complementarios		3.74 €
				190.94 €

Subcapítulo 4.4: Personal				
Cantidad	Ud	Descripción	Precio unitario	Importe
115	hr	Antonio Verdasco Vivancos	15.00 €	1,725 €
10	hr	Ignacio Vayá Pérez (Tutor experimental)	20.00 €	200.00 €
0.02	%	Costes directos complementarios		38.50 €
				1,963.50 €

·PRESUPUESTO TOTAL:

Código	Descripción	Importe
Capítulo I	Síntesis de diadas	3,229.60 €
Capítulo II	Interacciones en disolución orgánica	2,709.09 €
Capítulo III	Interacciones en micelas de CTAB	2,509.27 €
Capítulo IV	Interacciones en estado sólido	3,332.03 €
	Presupuesto de ejecución material	11,779.99 €
	7% Gastos generales y Cargas fiscales	824.60 €
	0% Beneficio Industrial	- €
	Presupuesto de ejecución por contrata	12,604.59 €
	21% IVA	2,646.96 €
	Presupuesto base de licitación del proyecto	15,251.55 €

Finalmente, el presupuesto base de licitación del proyecto asciende a **QUINCE MIL DOSCIENTOS CINCUENTA Y UN EUROS CON CINCUENTA Y CINCO CÉNTIMOS.**

8. ANEXOS

Anexo 1. Normativa

Durante el desarrollo de este proyecto se han seguido las distintas legislaciones de ámbito: autonómico, estatal y europeo, las cuáles son expuestas a continuación:

·Ley de saneamiento de aguas residuales de la Comunidad Valenciana.

- **Ley 2/1992**, de 26 de marzo
Publicado en: «DOGV» núm. 1761, de 08/04/1992, «BOE» núm. 128, de 28/05/1992.
Departamento: Comunidad Valenciana
Referencia: BOE-A-1992-12147

·Ley de prevención de Riesgos Laborables

- **Ley 31/1995**, de 8 de noviembre
Publicado en: «BOE» núm. 269, de 10/11/1995
Departamento: Jefatura del estado
Referencia: BOE-A-1995-24292

·Real Decreto sobre la protección de la salud y seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo.

- **Real Decreto 374/2001**, de 6 de abril
Publicado en: «BOE» núm. 104, de 01/05/2001
Departamento: Ministerio de la presidencia
Referencia: BOE-A-2001-8436

·Real Decreto sobre Básica de Residuos Tóxicos y Peligrosos

- **Real Decreto 952/1997**, de 20 de junio
Publicado en: «BOE» núm. 160, de 5 de julio de 1997, páginas 20871 a 20880 (10 págs.)
Departamento: Ministerio de Medio Ambiente
Referencia: BOE-A-1997-14934

·**Real Decreto que aprueba el Reglamento sobre clasificación, envasado y etiquetado de preparados peligrosos.**

- **Real Decreto 255/2003**, de 28 de febrero
Publicado en: «BOE» núm. 54, de 4 de marzo de 2003, páginas 8433 a 8469 (37 págs.)
Departamento: Ministerio de la Presidencia
Referencia: BOE-A-2003-4376

·**Ley de residuos y suelos contaminados.**

- **Ley 22/2011**, de 28 de julio
- Publicado en: «BOE» núm. 181, de 29/07/2011.
Departamento: Jefatura del Estado
Referencia: BOE-A-2011-13046

·**Reglamento (CE) sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas**

- **Reglamento (CE) nº 1272/2008**, de 16/12/2008
- Publicado en: «DOUE» núm. 353, de 31 de diciembre de 2008, páginas 1 a 1355 (1355 págs.)
Departamento: Unión Europea
Referencia: DOUE-L-2008-82637

·**Directiva (CE) por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas**

- **Directiva 2000/60/CE**, de 23/10/2000
- Publicado en: «DOCE» núm. 327, de 22 de diciembre de 2000, páginas 1 a 73 (73 págs.)
Departamento: Comunidades Europeas
Referencia: DOUE-L-2000-82524

Anexo 2. Espectros de fotólisis de destello láser

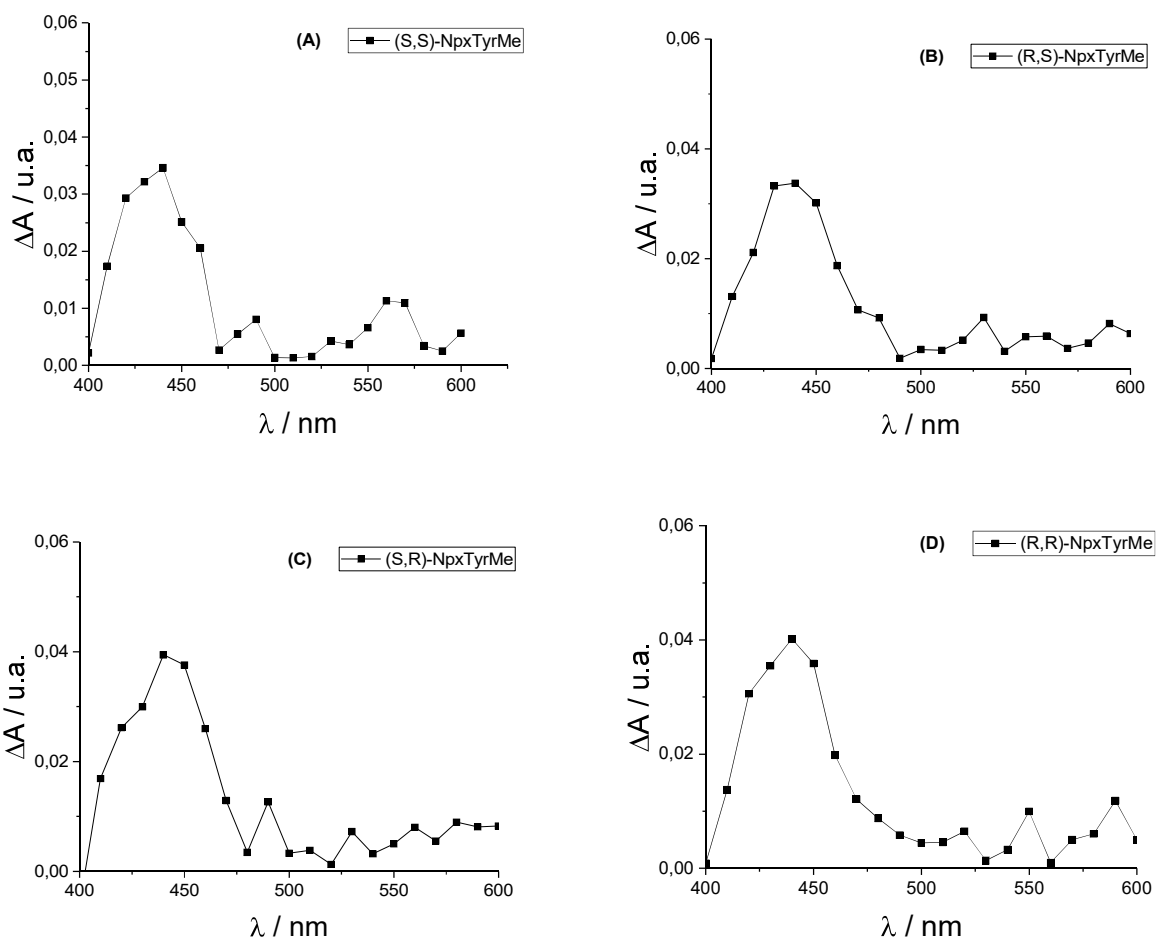
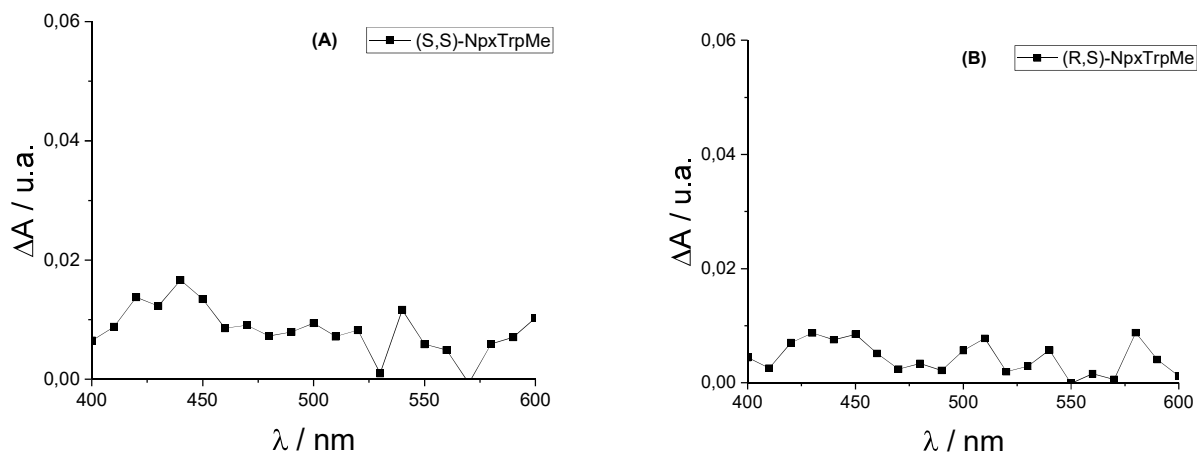


Figura 7.1. Espectros de fotólisis de destello láser a $0.6\mu\text{s}$ de disoluciones en acetonitrilo en atmósfera de nitrógeno de las diadas: (S,S)-NpxTyrMe (A), (R,S)-NpxTyrMe (B), (S,R)-NpxTyrMe (C), (R,R)-NpxTyrMe (D).



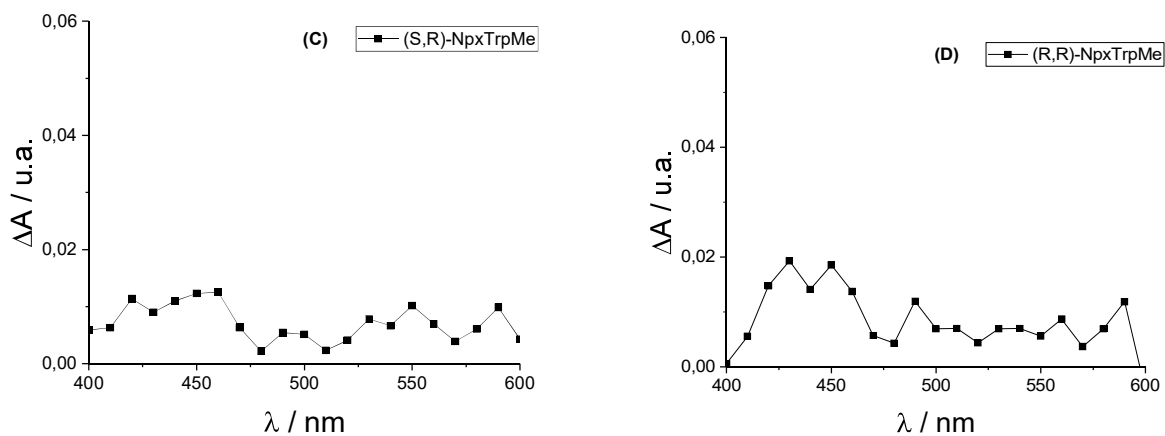


Figura 7.2. Espectros de fotólisis de destello láser a $0.6\mu\text{s}$ de disoluciones en acetonitrilo en atmósfera de nitrógeno de las diadas: (S,S)-NpxTrpMe (A), (R,S)-NpxTrpMe (B), (S,R)-NpxTrpMe (C), (R,R)-NpxTrpMe (D).

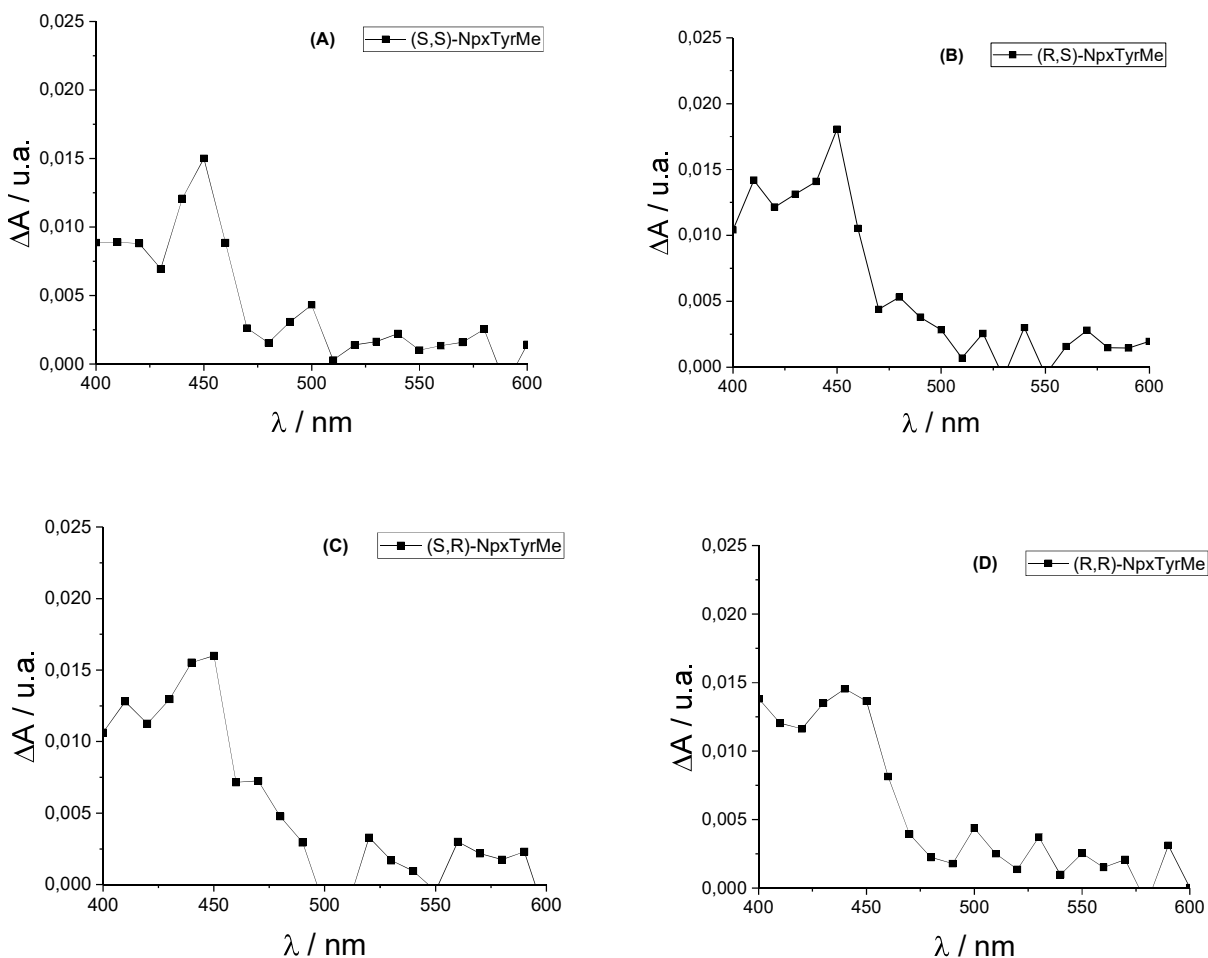


Figura 7.3. Espectros de fotólisis de destello láser a $0.6\mu\text{s}$ de disoluciones en CTAB en atmósfera de aire de las diadas: (S,S)-NpxTyrMe (A), (R,S)-NpxTyrMe (B), (S,R)-NpxTyrMe (C), (R,R)-NpxTyrMe (D).

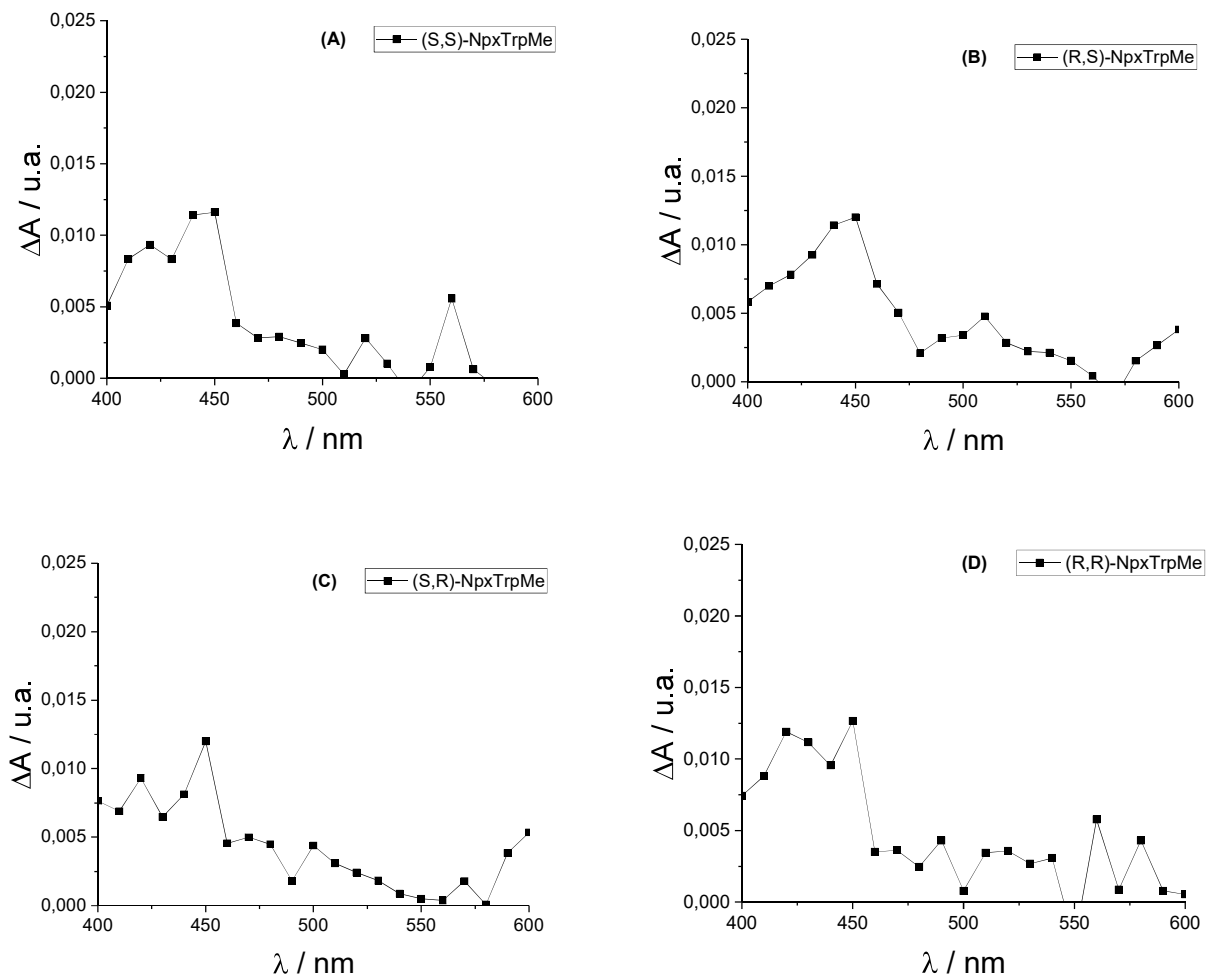


Figura 7.4. Espectros de fotólisis de destello láser a 0.6 μ s de disoluciones en CTAB en atmósfera de aire de las diadas: (S,S)-NpxTrpMe (A), (R,S)-NpxTrpMe (B), (S,R)-NpxTrpMe (C), (R,R)-NpxTrpMe (D).

Anexo 3. Difractogramas

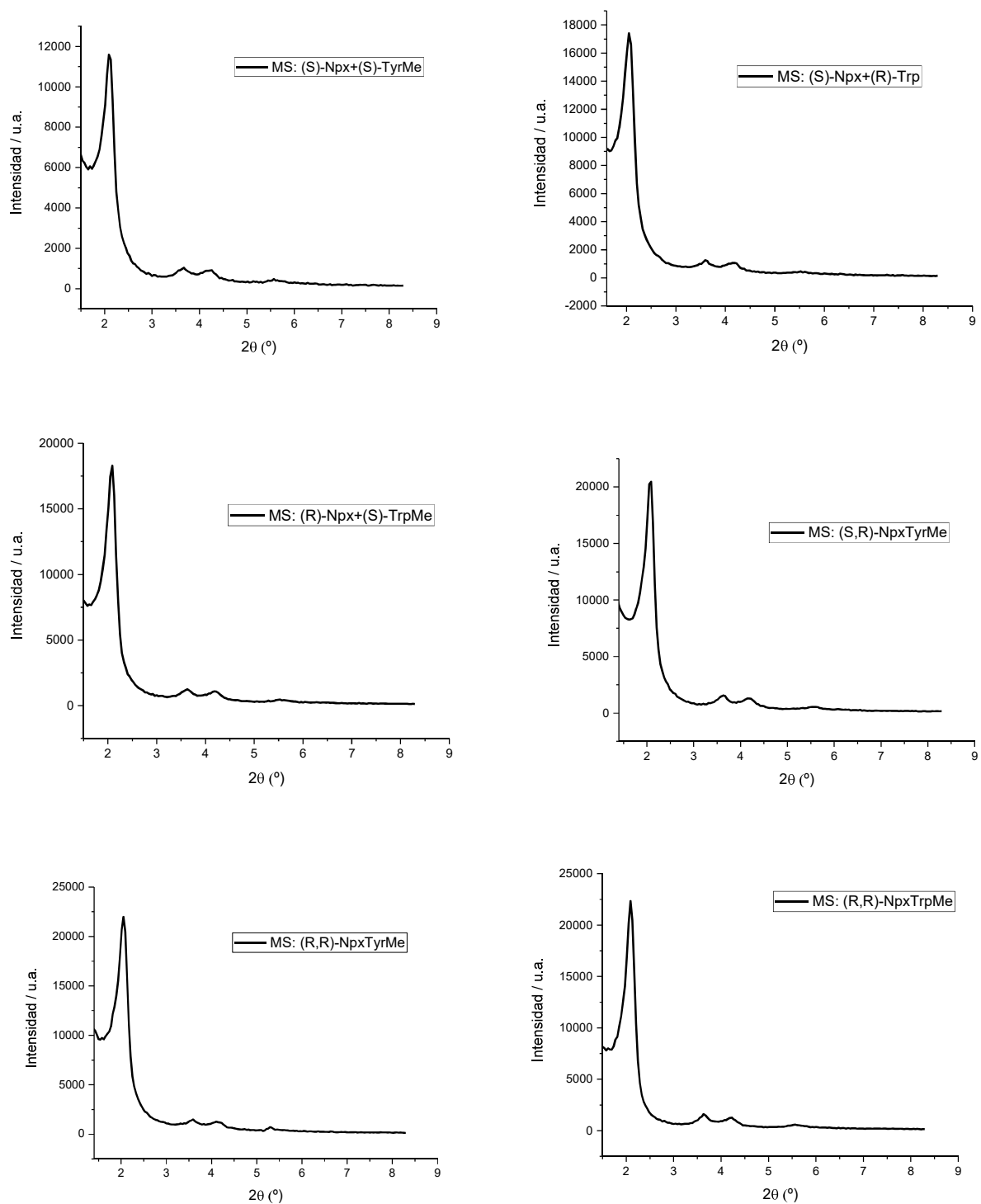


Figura 7.5: Difractogramas de Rayos X de algunos de los sólidos sintetizados.