



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



ESCOLA TÈCNICA  
SUPERIOR ENGINYERIA  
INDUSTRIAL VALÈNCIA

Curs Acadèmic:



## **AGRAÏMENTS**

Començaré donant les gràcies a la meva tutora María Consuelo Jiménez Molero d'aquest Treball de Fi de Màster, per saber transmetre la seva estima i dedicació a la química en cadascuna de les assignatures impartides durant el grau i el màster així com per haver-me despertat curiositat en aquest camí. Si més no, agrair-li també haver-hi confiat amb mi per a desenvolupar aquest projecte.

En segon lloc, agrair a la meva cotutora Inmaculada Andreu Ros la constància, paciència i dedicació que ha tingut amb mi aquests darrers mesos així i tot quan les coses no eixien segons l'esperat. Al mateix temps, agrair-li l'oportunitat tant de descobrir la fotoquímica com la foto(geno)toxicitat i poder haver realitzat una xicoteta part d'aquest projecte en l'Institut d'Investigació Sanitària La Fe (IIS La Fe).

En tercer lloc, però no menys important, agrair per una banda a Alejandro, el meu director experimental, les hores de dedicació en el laboratori, les explicacions necessàries per a poder entendre el que estava ocorrent així com tota l'ajuda prestada en tots aquests mesos que ha durat el desenvolupament experimental. I, per l'altra, a Mery, per tota la seva ajuda i dedicació desinteressada en la meva instància en la IIS La Fe. Per descomptat, agrair a tots els integrants del laboratori 2.2, en el que he desenvolupat el projecte, l'ajuda rebuda durant aquests darrers mesos.

A més, vull agrair el suport rebut per part de la meva família, ja que m'han recolzat en tot moment tant en la meva decisió a l'hora d'escollir la carrera a estudiar com en el suport rebut quan se m'ha fet costera amunt qualsevol situació. Per consegüent, reconec que aguantar-me i tindre paciència amb mi en aquests moments té el seu mèrit.

Tanmateix, agrair tant a la família universitària que hem creat durant aquests set anys, pel suport rebut i l'ajuda incondicional en cada moment que ho he requerit, així com totes les festes de celebració per qualsevol motiu que trobàvem oportú, viatges i altres aventures que hem viscut i que de segur que en queden moltes més per viure.

Finalment, però no menys important, em cal mostrar els meus agraïments a les amigues de sempre, les del poble, per entendre'ns en els moments de màxima angoixa i saber donar-nos suport quant es necessari.

Estudi fotoquímic i fotofísic de l'ansiolític clordiazepòxid i el seu metabòlit demoxepam.

---

## **ABREVIATURES I SÍMBOLS**

- ADN:** Àcid desoxiribonucleic
- ACS:** Grau analític
- ARN:** Àcid ribonucleic
- AS:** Albúmina sèrica
- ASH:** Albúmina sèrica Humana
- AWS:** Síndrome d'abstinència alcohòlica
- BDZ:** Benzodiazepina
- CDZ:** Clordiazepòxid
- CHCl<sub>3</sub>:** Cloroform
- CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:** Diclorometà
- CDCl<sub>3</sub>:** Cloroform deuterat
- CD<sub>3</sub>CN:** Acetonitril deuterat
- CPZ:** Clorpromazina
- DDD:** Dosi Diària Definida
- DEM:** Demoxepam
- DES-CDZ:** Desmetilclordiazepòxid
- DHD:** Dosi Diària Definida per a 1000 habitants/dia
- DMSO:** Dimetilsulfòxid
- DS:** Desviació estàndard
- GABA:** Àcid Gamma-amino butíric
- GndCl:** Hidroclorur de guanidina
- HPLC:** Cromatografia líquida d'elevada resolució
- IC<sub>50</sub>:** Mitat de la concentració inhibidora màxima
- NRU:** *Neutral Red Uptake* o Assaig de Roig Neutre
- PBS:** Tampó fosfat salí
- PEC:** Pressupost d'execució per contracta
- PEM:** Pressupost d'execució material
- PIF:** Factor fotoirritant
- <sup>13</sup>C-RMN:** Ressonància Magnètica nuclear de carboni
- <sup>1</sup>H-RMN:** Ressonància Magnètica nuclear d'hidrogen

**SDS:** Dodecil sulfat sòdic

**SNC:** Sistema Nerviós Central

**UV:** Radiacions Ultraviolades

**UVA:** Radiacions Ultraviolades A

**UVB:** Radiacions Ultraviolades B

**UV-Vis:** Radiacions Ultraviolades-visibles

$\lambda$ : Longitud d'ona

$\delta$ : Desplaçament químic

## **RESUM**

El clordiazepòxid és un fàrmac que pertany al grup de les benzodiazepines i s'utilitza per a tractar problemes associats a l'ansietat. En relació amb la biotransformació de fàrmacs, aquesta s'associa a una major facilitat per a ser eliminats de l'organisme i, en general, els converteix en menys tòxics. No obstant això, per a alguns fàrmacs existeixen evidències de la generació de metabòlits reactius durant el procés de biotransformació, arribant en algunes ocasions a ser els metabòlits més tòxics i reactius que el mateix fàrmac original.

En el present treball s'ha extret el clordiazepòxid de comprimits de l'ansiolític comercial Huberplex. S'han estudiat les seues propietats fotofísiques, fotoquímiques i fotobiològiques, amb la finalitat d'obtenir informació sobre una possible fotosensibilització deguda a aquest fàrmac. A més a més, s'ha realitzat una caracterització fotofísica i fotoquímica d'un dels seus metabòlits principals, el demoxepam.

En aquest context, s'observaren diferències en els espectres d'absorció del fàrmac i del metabòlit. El fàrmac absorbeix fins a longituds d'ona majors en l'UVA. Per una altra banda, la fluorescència d'ambdós compostos va resultar ser pràcticament nul·la. Pel que respecta a la fotoreactivitat en dissolucions (en PBS, cloroform i acetonitril) s'observà la degradació del compost, donant lloc a fotoproducte(s) l'estructura química del(s) qual(s) es troba per determinar. L'evolució de les irradiacions es monitoren per espectroscòpia d'absorció, fluorescència i <sup>1</sup>H-RMN.

Fent referència als assajos en medi cel·lular, es va realitzar un assaig de viabilitat cel·lular de captació del roig neutre (NRU) per tal d'avaluar la possible fototoxicitat del fàrmac. Així, el factor de fotoirritació calculat va indicar l'elevat potencial fototòxic d'aquest fàrmac.

Tenint en compte aquests resultats, es prosseguí a investigar si el CDZ i el DEM podien donar lloc a fotoal·lèrgia, utilitzant com a sistemes model albúmina sèrica humana i CDZ o DEM. En primer lloc, es va estudiar la possible formació de complexos intermoleculars entre la proteïna i el substrat mitjançant espectroscòpia d'absorció UV-Vis i fluorescència. No s'observaren interaccions significatives en els espectres d'absorció, però sí en els de fluorescència. Després, s'irradiaren les mescles ASH-CDZ i ASH-DEM. Per al CDZ, es va observar una lleugera fotodegradació però no fotounió covalent. Per al metabòlit, podria estar ocorrent fotodegradació i també unió covalent, tot i que per a ambdós substrats es tracta de resultats preliminars que haurien de ser confirmats amb experiments addicionals.

**Paraules Clau:** Clordiazepòxid; demoxepam; fototoxicitat; fotoestabilitat;

## **RESUMEN**

El clordiazepòxid es un fàrmaco que pertenece al grupo de las benzodiazepinas y se utiliza para tratar problemas asociados a la ansiedad. En relación a la biotransformación de fármacos, esta se asocia a una mayor facilidad para ser eliminados del organismo y generalmente los convierte en menos tóxicos. Sin embargo, para algunos fármacos existen evidencias de la generación de metabolitos reactivos durante este proceso de biotransformación, llegando en algunos casos a ser los metabolitos más tóxicos que el propio fármaco original.

En el presente trabajo se ha extraído el clordiazepòxid de comprimidos del ansiolítico comercial Huberplex. Se han estudiado sus propiedades fotofísicas, fotoquímicas y fotobiológicas, con el fin de obtener información acerca de una posible fotosensibilización debida a este fármaco. Además, se ha realizado una caracterización fotofísica y fotoquímica de uno de sus metabolitos principales, el demoxepam.

En este contexto, se observaron diferencias en los espectros de absorción del fármaco y del metabolito. El fármaco absorbe hasta longitudes de onda mayores en el UVA. Por otra parte, la fluorescencia de los dos compuestos resultó ser prácticamente nula. Respecto a la fotoreactividad en disolución (en PBS, cloroformo y acetonitrilo) se observó la degradación del compuesto, dando lugar a fotoproducto(s) cuya estructura química está por determinar. La evolución de las irradiaciones se monitorizó por espectroscopia de absorción, fluorescencia y RMN-1H.

Respecto a los ensayos en medio celular, se realizó un ensayo de viabilidad celular de captación del rojo neutro (NRU) para evaluar la posible fototoxicidad del fármaco. Así, el factor de fotoirritación calculado indicó el alto potencial fototóxico de este fármaco.

Teniendo en cuenta estos resultados, se procedió a investigar si CDZ y DEM pueden dar lugar a fotoalergia, usando como sistemas modelo albúmina sérica humana y CDZ o DEM. En primer lugar, se estudió la posible formación de complejos intermoleculares entre la proteína y el sustrato mediante espectroscopia de absorción UV-Vis y fluorescencia. No se observaron interacciones significativas en los espectros de absorción, pero sí en los de fluorescencia. Posteriormente se irradiaron las mezclas ASH-CDZ y ASH-DEM. Para CDZ, se observó ligera fotodegradación pero no fotounión covalente. Para el metabolito, podría estar ocurriendo fotodegradación y también unión covalente, aunque para ambos sustratos se trata de resultados preliminares que deberían ser confirmados con experimentos adicionales.

**Palabras Clave:** Clordiazepòxid; demoxepam; fototoxicidad, fotoestabilidad;



## **ABSTRACT**

Chlordiazepoxide is a drug that belongs to benzodiazepines family. It is used to treat problems associated with anxiety. The biotransformation of drugs is associated with a better clearance from the body and generally it makes them less toxic. However, for some drugs there is evidence of the generation of reactive metabolites during the biotransformation process; thus, in some cases, the metabolites are more toxic than the parent drug.

In the present work, chlordiazepoxide has been extracted from commercially available tablets of anxiolytic Huberplex. Its photophysical, photochemical and photobiological properties have been studied, in order to obtain information about a possible photosensitization due to this drug. In addition, a photophysical and photochemical characterization of one of its main metabolites, demoxepam, has been carried out.

In this context, differences were observed in the absorption spectra of the drug and the metabolite. The absorption spectrum of the drug reaches longer wavelengths in the UVA region. On the other hand, the fluorescence of the two compounds is negligible. Concerning the photoreactivity in solution (in PBS, chloroform and acetonitrile), degradation of the compound was observed, giving rise to photoproduct(s) whose chemical structure remains still undetermined. The evolution of the irradiations was monitored by absorption spectroscopy, fluorescence and <sup>1</sup>H-NMR.

Regarding the assays in cellular medium, the neutral red uptake cell viability test (NRU) was carried out to evaluate the possible phototoxicity of the drug. Thus, the calculated photoirritation factor indicated a high phototoxic potential for this drug.

Taking into account these results, we proceeded to investigate whether CDZ and DEM can lead to photoallergy, using CDZ or DEM and human serum albumin as model protein. First, the possible formation of intermolecular complexes between the protein and the substrates was studied using UV-Vis absorption spectroscopy and fluorescence techniques. No significant interactions were detected in the absorption spectra, but they were observed in the fluorescence spectra. Then, the ASH-CDZ and ASH-DEM mixtures were irradiated. For CDZ, low photodegradation and non-covalent photobinding were observed. For the metabolite, photodegradation and covalent photobinding could be occurring, although for both substrates, these are preliminary results that should be confirmed with additional experiments.

**Keywords:** Chlordiazepoxide; demoxepam; phototoxicity, photostability;

Estudi fotoquímic i fotofísic de l'ansiolític clordiazepòxid i el seu metabòlit demoxepam.

---

## Índex General

### ÍNDIX DE LA MEMÒRIA TÈCNICA

1. OBJECTIUS.....	3
2. JUSTIFICACIÓ.....	4
2.1 HISTÒRIC DE PUBLICACIONS RELACIONADES AMB EL CLORDIAZEPÒXID	6
3. INTRODUCCIÓ.....	8
3.1 BENZODIAZEPINES .....	8
3.1.1 USOS DE LES BENZODIAZEPINES. ....	10
3.2 CLORDIAZEPÒXID.....	16
3.2.1 METABÒLITS DEL CDZ.....	17
3.3 ALBÚMINA SÈRICA .....	20
3.3.1 ALBÚMINA SÈRICA HUMANA.....	20
3.4 FOTOQUÍMICA I FOTOFÍSICA .....	22
3.4.1 MECANISME D'INETRACCIÓ DELS PROCESSOS FOTOQUÍMICS I FOTOFÍSICS.....	24
3.5 AGENTS FOTOSENSIBILITZADORS.....	27
3.5.1 FOTODESCOMPOSICIÓ DE FÀRMACS .....	28
4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL .....	31
4.1 INSTRUMENTACIÓ .....	31
4.1.1 REACTIUS I DISSOLVENTS.....	31
4.1.2 MATERIALS.....	32
4.1.3 EQUIPS.....	33
4.2 PROCEDIMENT EXPERIMENTAL.....	35
4.2.1 OBTENCIÓ DEL CLORDIAZEPÒXID .....	35
4.2.2 PREPARACIÓ DE MOSTRES .....	35
4.2.3 ESTUDI DE LA FOTODEGRADACIÓ EN DIFERENTS DISSOLVENTS.....	36
5. RESULTATS I DISCUSSIÓ .....	39
5.1 CARACTERITZACIÓ ESTRUCTURAL DEL CLORDIAZEPÒXID.....	39
5.2 ESTUDI DE LA FOTODEGRADACIÓ EN DIFERENTS DISSOLVENTS.....	41
5.2.1 ESPECTRES D'ABSORCIÓ I D'EMISSIÓ .....	41
5.2.2 IRRADIACIONS DELS COMPOSTOS EN DIFERENTS DISSOLVENTS.....	42
5.2.3 FOTOTOXICITAT CEL·LULAR .....	49
5.2.4 ESPECTRES D'INTERACIÓ DEL FÀRMAC I EL SEU METABÒLIT AMB L'ÀLBUMINA SÈRICA HUMANA .....	52
6. PLA DE FUTUR.....	56

7. CONCLUSIÓ .....	57
8. BIBLIOGRAFIA .....	58

## ÍNDEX DEL PRESSUPOST

1. PRESSUPOST .....	63
1.1. PRESSUPOST PARCIAL .....	63
1.1.1. ENGINYERIA .....	63
1.1.2. EQUIPS .....	64
1.1.3. MATERIAL FUNGIBLE .....	65
1.1.4. MATERIAL NO FUNGIBLE .....	67
1.1.5. REACTIUS I DISSOLVENTS .....	71
1.2. PRESSUPOST D'EXECUCIÓ DEL MATERIAL .....	72
1.3. PRESSUPOST GENERAL O PRESSUPOST BASE DE LICITACIÓ .....	73

## ANNEX

A ESPECTRE CDZ EN ACETONITRIL .....	iii
B CARACTERITZACIÓ FOTOFÍSICA, FOTOQUÍMICA I FOTOBIOLÒCIGA .....	iv
B1 TAULES PER A L'ESTUDI DE LA INTERACCIÓ COMPOST-PROTEÏNA .....	iv
B2 ASSAIG NRU .....	v
B3 IRRADIACIÓ COMPOST-PROTEÏNA .....	vi
C SEGURITAT .....	vii
C1 ACETAT D'ETIL .....	vii
C2 ACETONITRIL .....	viii
C3 ÀCID ACÈTIC .....	ix
C4 DICLORMETÀ .....	x
C5 DIMETILSULFÒXID .....	xii
C6 TAMPÓ SALÍ DE FOSFAT .....	xii

## Llista de Figures de la Memòria Tècnica

Figura 1: Síntesi de benzoheptoxidiazines dissenyada en el laboratori Sternbach .....	8
Figura 2: Estructura de la quinazolina obtinguda en el laboratori Sternbach .....	8
Figura 3: Obtenció de la primera benzodiazepina a partir d'una quinazolina .....	9

Figura 4: Estructura de les primeres 1,4-benzodiazepines sintetitzades amb activitat farmacològica (amb el nom comercial del fàrmac i l'any de llançament entre parèntesis).....	9
Figura 5: Mecanismes de fotosensibilitat induïda per fàrmacs (Ph: fàrmac fototòxic; ROS: espècies reactives d'oxigen).....	12
Figura 6: Estructura del neurotransmissor GABA.....	14
Figura 7: Complex receptor GABA <sub>A</sub> -BDZ-ions Cl <sup>-</sup> . S'observen les cinc subunitats i alguns lligands que tenen afinitat amb el complex.....	15
Figura 8: Estructura bàsica d'una 1,4-benzodiazepina.....	16
Figura 9: Estructura del CDZ, dels seus metabòlits (DES-CDZ i DEM) i els seus fotoproductes (OX CDZ, OX DEM i OX DES-CDZ).....	18
Figura 10: Possible procés a seguir en un sistema biològic iniciat per un fàrmac després d'absorbir energia de la llum.....	19
Figura 11: A) Estructura de l'Albúmina Sèrica Humana (ASH). B) Estructura de l'ASH unida a una molècula (groc).....	21
Figura 12: Representació dels dominis I, II i III de l'ASH.....	21
Figura 13: Esquema dels possibles processos fotoquímics i fotofísic a desenvolupar a partir de l'absorció de llum en una molècula.....	23
Figura 14: A) Representació d'un orbital en l'estat fonamental (S <sub>0</sub> ), B) Representació d'un orbital en estat singlet excitat (S <sub>i</sub> ), C) Representació d'un orbital en estat triplet excitat (T <sub>i</sub> ).....	24
Figura 15: Diagrama de Jablonski: Descripció esquemàtica dels diferents processos fotofísics que poden desenvolupar-se després de l'excitació inicial des de l'estat fonamental.....	25
Figura 16: Possibles vies o camins a seguir per a desactivar una molècula excitada.....	27
Figura 17: Dos camins per a produir fototoxicitat: El camí directe i l'indirecte. El directe es produeix quan un compost fototòxic inestable reacciona amb molècules endògens, mentre que l'indirecte és desenvolupa quan les molècules endògenes s'enllacen a fotoproductes de compostos fototòxics.....	28
Figura 18: Fotodescomposició farmacològica del CDZ.....	30
Figura 19: Espectre <sup>1</sup> H del clordiazepòxid.....	39
Figura 20: Espectre <sup>13</sup> C del clordiazepòxid.....	40
Figura 21: Espectre d'absorció del CDZ i del DEM 20 μM en diferents dissolvents.....	41
Figura 22: A) Espectre d'emissió de fluorescència del CDZ i DEM a l'excitar a 260 nm, B) Espectre d'emissió de fluorescència del CDZ i DEM a l'excitar a 305 nm. Totes dues dissolucions s'han preparat amb una concentració de 20 μM en PBS.....	42
Figura 23: Estructura química de la oxaziridina.....	43
Figura 24: A) Espectre d'absorció en irradiar una dissolució 20 μM de CDZ en cloroform. B) Espectre d'emissió de fluorescència en irradiar una dissolució 20 μM de CDZ en cloroform excitant a 295 nm.....	43

Figura 25: A) Espectre d'absorció en irradiar una dissolució 20 µM de CDZ amb acetonitril, B) Espectre d'emissió de fluorescència a l'excitar a 295 nm una dissolució 20 µM de CDZ en acetonitril.....	44
Figura 26: Registre d'absorció en irradiar una dissolució 20 µM de CDZ en PBS.....	44
Figura 27: Espectre d'absorció d'una irradiació monocromàtica en espectrofluorímetre d'una dissolució 20 µM de CDZ en PBS.....	45
Figura 28: Espectre de <sup>1</sup> H-RMN en irradiar una dissolució 1 mg/mL de CDZ en CDCl <sub>3</sub> .....	45
Figura 29: Espectre de <sup>1</sup> H-RMN obtingut en irradiar 1 min una dissolució 1 mg/mL de CDZ en CDCl <sub>3</sub> .....	47
Figura 30: Espectre de <sup>1</sup> H-RMN obtingut en irradiar 30 min una dissolució 1 mg/mL de CDZ en CDCl <sub>3</sub> .....	47
Figura 31: Espectre d'absorció de la irradiació de 20 µM de DEM en PBS.....	48
Figura 32: A) Espectre d'emissió de fluorescència en excitar a 260 nm, B) Espectre d'emissió de fluorescència en excitar a 305 nm. Ambdues pertanyen a la irradiació d'una dissolució 20 µM de DEM en PBS.....	49
Figura 33: Representació de la viabilitat cel·lular en funció del logaritme neperià de la concentració de A) CPZ, B) SDS, C) CDZ. En les tres gràfiques, la línia negra representa el fàrmac en condicions d'obscuritat i la violeta el fàrmac en condicions d'exposició a la llum.....	50
Figura 34: Representació del PIF obtingut per a cada fàrmac analitzat en l'assaig NRU.....	51
Figura 35: A) Plaques del fàrmac CDZ en absència i en presència de radiació UVA respectivament. B) Plaques dels controls CPZ i SDS en absència i presència de radiació UVA respectivament.....	51
Figura 36: Espectre d'absorció per a diferents concentracions d'ASH en PBS.....	52
Figura 37: A) Espectre d'absorció del CDZ amb diferents concentracions d'ASH, B) Espectre d'absorció del DEM amb diferents concentracions d'ASH. Les dissolucions s'han preparat per a una concentració 20 µM de cada compost en PBS i diferents concentracions d'una dissolució d'ASH en PBS.....	52
Figura 38: A) Espectre d'emissió de fluorescència on es compara la fluorescència de dissolucions CDZ-ASH amb l'obtinguda al sumar les fluorescències de CDZ i ASH per separat, excitant a 295 nm, B) Espectre d'emissió de fluorescència del CDZ-ASH excitant a 310 nm. Tots dos per a dissolucions amb diferent concentració de proteïna.....	53
Figura 39: A) Espectre d'emissió de fluorescència on es compara la fluorescència de dissolucions DEM-ASH amb l'obtinguda al sumar les fluorescències de DEM i ASH per separat, excitant a 295 nm, B) Espectre d'emissió de fluorescència del DEM-ASH excitant a 310 nm. Tots dos per a dissolucions amb diferent concentració de proteïna.....	53
Figura 40: A) Espectre d'absorció de la proteïna sense filtració i amb filtratge abans i després d'irradiar en el fotoreactor, B) Espectre d'emissió de fluorescència excitant a 310 nm de la proteïna sense filtració i amb filtratge abans i després d'irradiar en el fotoreactor.....	54
Figura 41: A) Espectre d'absorció de la interacció ASH-CDZ sense filtració i amb filtratge abans i després d'irradiar en el fotoreactor, B) Espectre d'absorció de la interacció ASH-DEM sense filtració i amb filtratge abans i després d'irradiar en el fotoreactor.....	55

Figura 42: A) Espectre d'emissió de fluorescència excitant a 310 nm de la interacció ASH-CDZ sense filtració i amb filtratge abans i després d'irradiar en el fotoreactor, B) Espectre d'emissió de fluorescència excitant a 310 nm de la interacció ASH-DEM sense filtració i amb filtratge abans i després d'irradiar en el fotoreactor.....55

## Llista de Taules de la Memòria Tècnica

Taula 1: DDD en mg d'ansiolítics consumits en Espanya durant el 2017.....	5
Taula 2: Fonts artificials de les radiacions ultraviolades.....	13
Taula 3: Principals benzodiazepines ansiolítiques segons la vida mitjana.....	15
Taula 4: Efectes secundaris de l'administració de clordiazepòxid.....	17
Taula 5: Temps dels principals processos fotofísics.....	25
Taula 6: Mecanismes d'actuació de cada procés fotofísic descrit en el diagrama de Jablonski.....	26
Taula 7: Valors de IC50 en l'obscuritat, en l'exposició a la llum UVA i PIF dels fàrmacs.....	50

## Llista de Gràfiques de la Memòria Tècnica

Gràfica 1: Evolució temporal del consum d'ansiolítics en Espanya des de l'any 2000 fins al 2020.....	5
Gràfica 2: Àrees principals en les que es troben publicats els 28004 documents sobre el CDZ.....	6
Gràfica 3: Evolució del nombre de publicacions anuals sobre investigacions que impliquen el CDZ com a fàrmac d'estudi.....	7

## Llista de Processos de la Memòria Tècnica

Procés 1: Possibles vies de desenvolupament d'un procés fotoquímic.....	26
-------------------------------------------------------------------------	----

## Llista de Taules del Pressupost

Taula 8: Taula de referències per a la realització del pressupost.....	64
Taula 9: Cost Total Enginyeria.....	65
Taula 10: Cost del pressupost dels equips (1/2).....	65

Taula 11: Cost del pressupost dels equips (2/2).....	66
Taula 12: Cost del pressupost del material fungible (1/2).....	66
Taula 13: Cost del pressupost del material fungible (2/2).....	67
Taula 14: Cost del pressupost del material no fungible (1/5).....	67
Taula 15: Cost del pressupost del material no fungible (2/5).....	68
Taula 16: Cost del pressupost del material no fungible (3/5).....	69
Taula 17: Cost del pressupost del material no fungible (4/5).....	70
Taula 18: Cost del pressupost del material no fungible (5/5).....	71
Taula 19: Cost del pressupost dels reactius i dissolvents (1/2).....	71
Taula 20: Cost del pressupost dels reactius i dissolvents (2/2).....	72
Taula 21: Pressupost d'execució material (PEM).....	72
Taula 22: Resum del Pressupost base de licitació.....	73

## Llista de Figures de l'Annex

Figura 42: Espectre de $^1\text{H}$ del clordiazepòxid amb $\text{CD}_3\text{CN}$ com a dissolvent.....	iii
---------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

## Llista de Taules de l'Annex

Taula 23: Dissolucions a preparar per a l'assaig CDZ-ASH.....	iv
Taula 24: Dissolucions a preparar per a l'assaig DEM-ASH.....	iv
Taula 25: Dissolucions a preparar amb diverses concentracions d' ASH.....	iv
Taula 26: Volum de dissolució de estoc a afegir per a cada concentració en funció del compost.....	v
Taula 27: Càlcul de les alíquotes a preparar de cada compost a partir de la dissolució de estoc de cadascun.....	vi
Taula 28: Volum de dissolució de fàrmac i de proteïna que cal incorporar en cada mostra.....	vii



# **MEMÒRIA** **TÉCNICA**



## 1. OBJECTIUS

El present Treball de Fi de Màster s'ha desenvolupat en el Departament de Química de la Universitat Politècnica de València (UPV) i, en col·laboració amb la Unitat mixta d'investigació IIS UPV-La Fe de l'Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia. Aquest treball té per objectiu principal investigar la possible fototoxicitat del fàrmac clordiazepòxid, així com comparar el comportament del metabòlit (demoxepam, DEM) amb el fàrmac principal. Per a això, s'assoliran les següents pautes:

- Realitzar un estudi fotofísic mitjançant espectroscòpies d'absorció UV-Vis i fluorescència del CDZ i del DEM.
- Analitzar la fotoestabilitat del fàrmac i del seu metabòlit.
- Avaluar la fototoxicitat mitjançant un assaig *Neutral Red Uptake* (NRU).
- Estudiar la interacció del CDZ i del DEM amb la proteïna transportadora albúmina sèrica humana (ASH).
- Investigar la possible fotounió de CDZ i DEM amb l'albúmina sèrica humana.

Els objectius acadèmics que es pretén aconseguir al realitzar aquest projecte són els següents:

- Realitzar un projecte individual en l'àmbit de la Enginyeria Química en el qual es puguin aplicar els coneixements apresos durant la formació acadèmica, tant en el grau d'enginyeria química com en el màster d'enginyeria química.
- Ampliar els coneixements adquirits fins al moment en l'àmbit de la química i la biologia mitjançant el desenvolupament del projecte.
- Millorar la capacitat de recerca d'informació, d'anàlisi de dades i de síntesi d'informació amb l'ajuda de ferramentes de recerca bibliogràfica avançada i de tractament de dades.

## 2. JUSTIFICACIÓ

En les últimes dècades, els esforços realitzats en l'àmbit de la medicina han permès conèixer l'origen i la causa de moltes malalties, així com poder desenvolupar tractaments adequats per a prevenir i tractar dites malalties i diversos fàrmacs que permeten la curació o millora d'aquestes. Aquest fet és possible gràcies a gaudir d'una societat industrialitzada amb un mercat globalitzat.

Segons estudis d'àmbit internacional, els psicofàrmacs són un dels grups farmacològics més prescrits en la majoria de països desenvolupats, destacant a Espanya un augment considerable i sostingut des dels anys noranta. En l'enquesta realitzada per l'observatori de drogues i addiccions per al pla nacional en relació amb l'alcohol i drogues, s'estima que l'evolució de la prevalença del consum d'hipnosedants, amb recepta o sense, alguna vegada en la vida va ser en 2013, 2015 i 2017 de 22,2%, 18'7% i el 20'8% respectivament (Toral et al., 2019).

Un informe de la Societat Espanyola de Salut Pública i Administració Sanitària de 2014 fa referència al canvi en la utilització dels psicofàrmacs amb un augment progressiu, especialment d'ansiolítics i antidepressius. Aquests fàrmacs constitueixen a l'inici del segle XXI, el tercer grup terapèutic més utilitzat a Espanya, després dels analgèsics i els antiinflamatoris, sent un 37% superior a la mitjana europea (Toral et al., 2019).

És conegut que els ansiolítics són fàrmacs que, consumits de manera crònica, produeixen tolerància i dependència. Alguns estudis els relacionen amb el risc de fractures de maluc, accidents automobilístics, i deterioració de la memòria. Les benzodiazepines i els hipnòtics són fàrmacs que s'usen per a tractar l'insomni, l'ansietat i com a coadjuvant en alguns tipus de dolor crònic. No obstant això, en les guies de pràctica clínica de maneig d'ansietat i dolor no són recomanacions de primera opció (Toral et al., 2019).

En tot cas són fàrmacs que, d'utilitzar-se, l'indicat són períodes curts de dos a quatre setmanes en fase aguda o com a coadjuvant de tractaments per a problemes de salut mental greus. Es tracta d'una mesura d'ús racional de recursos terapèutics per a evitar intervencions inadequades o amb risc potencial per als pacients (Toral et al., 2019).

Segons l'última actualització de la Base de Dades Clíniques d'Atenció Primària (BDCAP) del Ministeri de Sanitat el 64.5% DHD (Dosi Diària Definida per 1000 habitants i dia) de medicaments consumits en Espanya durant el 2017 foren ansiolítics. Aquest grup de medicaments és el segon més utilitzat dins dels psicofàrmacs, al qual el precedeixen els antidepressius (98'8 DHD) i en tercer lloc es trobaven els hipnòtics i sedants (42'2 DHD) (AEMPS, 2014).

Aquestes dades fan referència a la població de quaranta anys o superior destacant que el consum és el doble en dones que en homes així com hi ha un augment de DHD en persones amb un nivell de renda més baix respecte d'altres amb major nivell de renda (AEMPS, 2014).

Com que el clordiazepòxid i els seus metabòlits pertanyen al grup de les benzodiazepines i, aquestes són medicaments de caràcter ansiolític, s'analitzarà l'evolució del consum dels mateixos en els últims anys. La quantitat de Dosi Diària Definida (DDD) en mg d'ansiolítics més consumits en 2017 en Espanya segons el Ministeri de Salut Mental és la que s'observa a continuació (AEMPS, 2014).

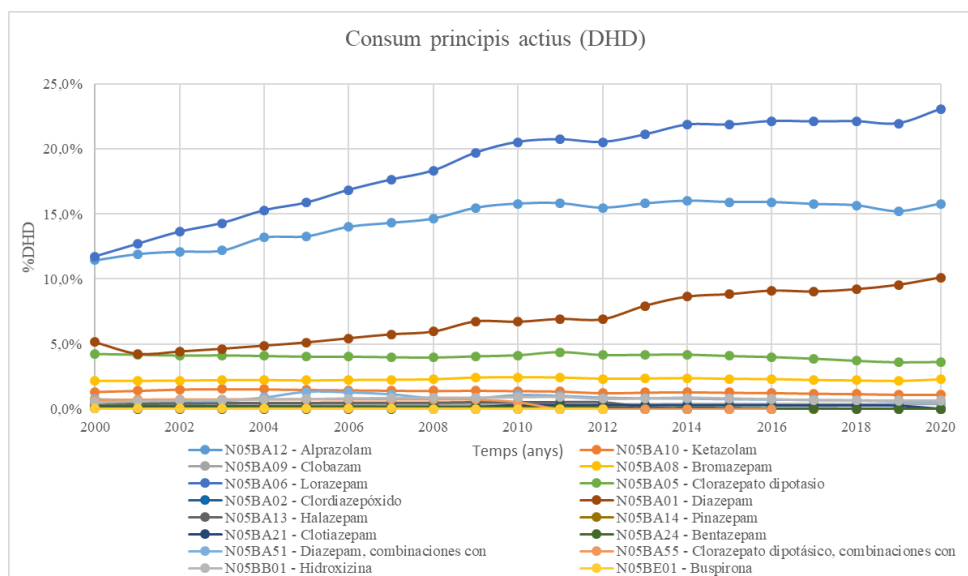
**Taula 1:** DDD en mg d'ansiolítics consumits en Espanya durant el 2017.

Font: Félix Miguel García, María Cruz Calvo Reyes, I. R. C. (2020, diciembre). Salud mental en datos: prevalencia de los problemas de salud y consumo de psicofármacos y fármacos relacionados a partir de los registros clínicos de atención primaria. BDCAP-Series 2. BDCAP-Serie 2, 76.

[https://www.mscbs.gob.es/estadEstudios/estadisticas/estadisticas/estMinisterio/SIAP/Salud\\_mental\\_datos.pdf](https://www.mscbs.gob.es/estadEstudios/estadisticas/estadisticas/estMinisterio/SIAP/Salud_mental_datos.pdf)

N05B Ansiolítics	DDD (mg)
<b>N05BA- Derivats de la benzodiazepina</b>	
N05BA01 - Diazepam	10
N05BA02 - Clordiazepòxid	30
N05BA05 - Clorazepat dipotàssic	20
N05BA06 - Lorazepam	2,5
N05BA08 - Bromazepam	10
N05BA09 - Clobazam	20
N05BA10 - Ketazolam	30
N05BA12 - Alprazolam	1
N05BA13 - Halazepam	100
N05BA14 - Pinazepam	20
N05BA21 - Clotiazepam	10
N05BA24 - Bentazepam	75
N05BA51 - Diazepam, combinacions	10
<b>N05BB- Derivats del difenilmetà</b>	
N05BB01 - Hidroxizina	75

L'evolució del consum d'ansiolítics principals des del 2000 fins a l'actualitat en funció de la Dosi Diària Definida per 1000 habitants i dia és la que s'observa en la Gràfica 1.



**Gràfica 1:** Evolució temporal del consum d'ansiolítics en Espanya des de l'any 2000 fins al 2020.

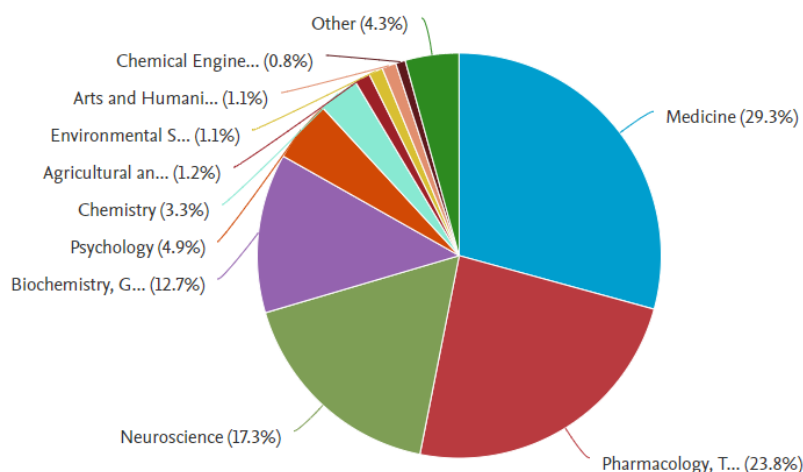
Font: AEMPS. (2021). Utilización de medicamentos ansiolíticos e hipnóticos en España @ [www.aemps.gob.es](http://www.aemps.gob.es). Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. <https://www.aemps.gob.es/medicamentos-de-uso-humano/observatorio-de-uso-de-medicamentos/informes-ansioliticos-hipnoticos/>

S'observa com els únics fàrmacs amb un consum rellevant són el lorazepam, alprazolam, diazepam, clorazepat dipotàssic i bromazepam, de major a menor consum respectivament.

## 2.1 HISTÒRIC DE PUBLICACIONS RELACIONADES AMB EL CLORDIAZEPÒXID

Segons la base de dades bibliogràfiques de resums i cites d'articles de revistes científiques Scopus de l'empresa Elsevier, el clordiazepòxid apareix en un total de 28004 documents des de l'any 1952 fins a l'actualitat, 2021.

Aquests articles es classifiquen segons l'àrea d'investigació pertinent del dit article o revista sent les àrees més comunes de publicació la medicina; farmacologia; neurociència; bioquímica, genètica i biologia molecular; psicologia; química; ciències agrícoles i biològiques; ciències mediambientals; arts i humanitats; enginyeria química; física i anatomia o ciències dels materials. Els documents publicats en aquesta base de dades sobre el CDZ o que contenen aquest en els seus estudis es classifiquen segons les següents àrees d'interès.

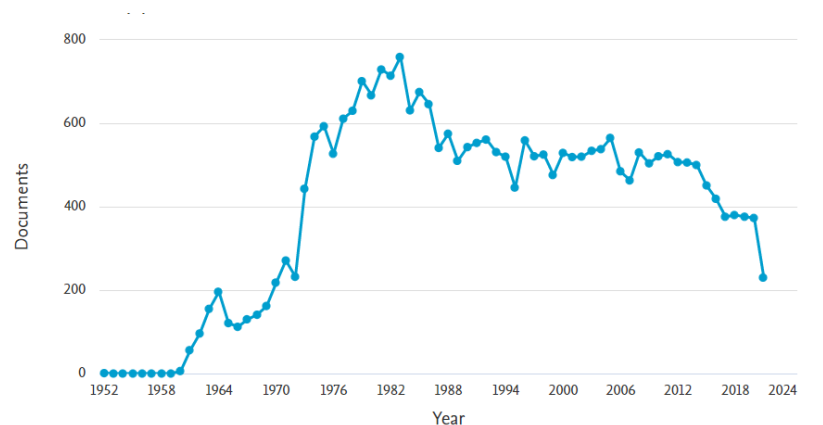


**Gràfica 2:** Àrees principals en les que es troben publicats els 28004 documents sobre el CDZ.

Font: Scopus. (n.d.). Scopus - Analyze searc results/Chlordiazepoxide. Elsevier.  
<https://www.scopus.com/term/analyzer.uri?sid=c3844d9cc3c689970c5a63c0e9825b58&origin=resultslist&src=s&s=Chlordiazepoxide&sort=plf-f&sdt=a&sot=a&sl=16&count=28004&analyzeResults=Analyze+results&txGid=89ce421680880d03dae414e2b4c7128>

8

Per últim, s'observa l'evolució del nombre de publicacions anuals sobre el CDZ arreu del món des del primer article publicat en 1952 fins al últim, pertinent a l'any actual, 2021.



**Gràfica 3:** Evolució del nombre de publicacions anuals sobre investigacions que impliquen el CDZ com a fàrmac d'estudi.

Font: Scopus. (n.d.). Scopus - Analyze searc results/Chlordiazepoxide. Elsevier.

<https://www.scopus.com/term/analyzer.uri?sid=c3844d9cc3c689970c5a63c0e9825b58&origin=resultlist&src=s&s=Chlordiazepoxide&sort=plf->

[f&sdt=a&sot=a&sl=16&count=28004&analyzeResults=Analyze+results&txGid=89ce421680880d03dae414e2b4c71288](https://www.scopus.com/term/analyzer.uri?sid=c3844d9cc3c689970c5a63c0e9825b58&origin=resultlist&src=s&s=Chlordiazepoxide&sort=plf-f&sdt=a&sot=a&sl=16&count=28004&analyzeResults=Analyze+results&txGid=89ce421680880d03dae414e2b4c71288)

8

En la Gràfica 3 s'observa una primera creixuda important d'estudis basats en el CDZ a partir de l'any 1960 fins al 1964 perquè no fou fins al 1958 quan es patentà aquest medicament. Des del 1964 fins al 1970 la pendent ascendent de documents publicats a l'any és minúscula, ja que es passa d'uns 200 documents/any en 1964 fins a 250 documents/any en 1970. En els anys setanta, s'observa que aquest fàrmac es prescriu ràpidament com a principal medicament per combatre l'ansietat. Per tant, la publicació d'investigacions a partir d'aquest període van en augment fins als anys noranta. El descens del nombre d'articles a partir dels anys noranta coincideix amb la disminució de la prescripció d'aquests a causa que es demostra que el fàrmac és fotosensible.

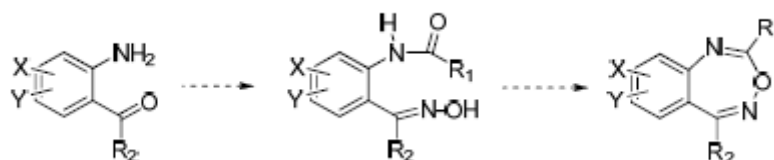
### 3. INTRODUCCIÓ

#### 3.1 BENZODIAZEPINES

En 1988 Evans i els seus col·laboradors van difondre que les benzodiazepines eren “estructures privilegiades”, entenent-se com a tals els fragments moleculars singulars capaços de subministrar lligands per a diferents receptors demostrant-se, ja que en funció del tipus de receptor, que per a un mateix nucli estructural presenten un comportament diferent (Legarén, 2010).

Per tot açò, les 1,4-benzodiazepines constitueixen l'esquelet bàsic d'un gran nombre de compostos biològics actius. Aleshores, en funció de les modificacions estructurals que sofrisca l'estructura química, afavoriran més o menys al desenvolupament de moltes i diverses activitats des de l'àmbit agrícola fins a la medicina especialitzada (Legarén, 2010).

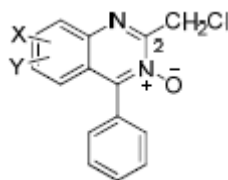
La primera vegada que es van preparar, aïllar i caracteritzar aquest tipus de molècules va ser en els anys cinquanta en el laboratori de Leo Sternbach, lloc en què es descobriren les mateixes de forma causal durant l'estudi de les benzoheptoxidiazines com a agent tranquil·litzant (Legarén, 2010), tal com s'observa en la Figura 1.



**Figura 1:** Síntesi de benzoheptoxidiazines dissenyada en el laboratori Sternbach.

Font: Legerén Molina, M. L. (2010). *Síntesis y evaluación biológica de nuevas benzodiazepinas*. Universidad de Santiago de Compostela, Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico. <http://hdl.handle.net/10347/2839>

Dissenyant la síntesi d'aquest compost per tal d'aconseguir una extracció expeditiva i eficaç s'observà que en compte d'obtenir les benzoheptoxidiazines s'obtingué el que posteriorment s'anomenaria quinoxolines (Figura 2). Per consegüent, el laboratori Sternbach decidí reestructurar la seva síntesi centrant-se en les quinoxolines per la seva àmplia activitat farmacològica (Legarén, 2010).



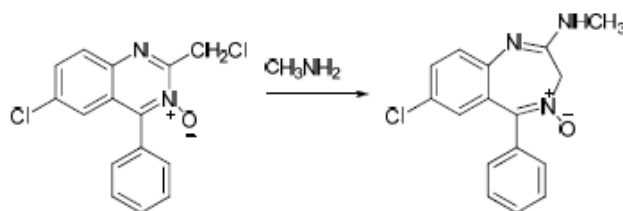
**Figura 2:** Estructura de la quinoxolina obtinguda en el laboratori Sternbach.

Font: Legerén Molina, M. L. (2010). *Síntesis y evaluación biológica de nuevas benzodiazepinas*. Universidad de Santiago de Compostela, Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico. <http://hdl.handle.net/10347/2839>

Partint de l'estructura de la Figura 2 i afegint metilamina per tal de substituir la posició 2 de la molècula i aconseguir una amina alcalina amb una elevada possibilitat de variació en la cadena. Sorprenentment, observaren que no es produïa la substitució de la posició 2, sinó que s'obtenia la



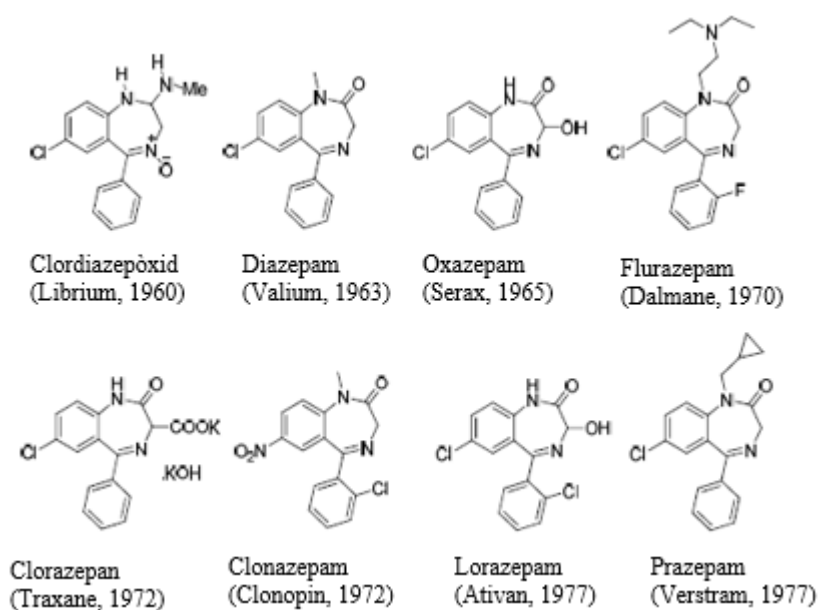
benzodiazepina oxigenada coneguda comercialment com a clordiazepòxid (Legarén, 2010), tal com s'observa en la Figura 3.



**Figura 3:** Obtenció de la primera benzodiazepina a partir d'una quinazolina.

Font: Legerén Molina, M. L. (2010). *Síntesis y evaluación biológica de nuevas benzodiazepinas*. Universidad de Santiago de Compostela, Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico. <http://hdl.handle.net/10347/2839>

Atés de la benzodiazepina obtinguda, es realitzaren diversos estudis en relació amb l'estructura-activitat, així com la introducció de diverses variacions en el nucli bàsic del compost amb la finalitat d'assolir una major quantitat d'anàlegs potencialment actius. Amb els resultats obtinguts s'obtingueren les primeres 1,4-benzodiazepines que a poc a poc anaren introduint-se al mercat farmacèutic actuant principalment com a principals ansiolítics, hipnòtics i antiepilèptics (Legarén, 2010). Els primers exemples d'1,4-benzodiazepines s'observen en la Figura 4.



**Figura 4:** Estructura de les primeres 1,4-benzodiazepines sintetitzades amb activitat farmacològica (amb el nom comercial del fàrmac i l'any de llançament entre parèntesis).

Font: Legerén Molina, M. L. (2010). *Síntesis y evaluación biológica de nuevas benzodiazepinas*. Universidad de Santiago de Compostela, Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico. <http://hdl.handle.net/10347/2839>

En 1960 les 1,4-benzodiazepines es van introduir en els processos clínics amb la introducció del CDZ fabricat en el laboratori Librium. Les substitucions als anells A (benzé que conté el clor com a radical) i el C (fenil) van desenvolupar aplicacions patents que van tindre lloc en 1958, i les consegüents investigacions clíniques i toxicològiques del component primari, el CDZ, va permetre

introduir al mateix al mercat en 1960. Aquest considerable fet va permetre que en menys de tres anys dels primers estudis farmacològics s'introduiria el medicament en el mercat (Ellis i Oeste, 1983).

El CDZ va ser la primera benzodiazepina a adquirir l'aprovació de l'Administració d'Aliments i Medicaments per al seu ús com a anticonvulsiu, relaxant muscular, hipnòtic i sedant. El seu major ús és com a ansiolític o en tractaments de síndrome d'abstinència d'alcohol (AWS) (Sarris i Limoges, 2019).

### 3.1.1 USOS DE LES BENZODIAZEPINES.

Les BDZ es poden utilitzar per a tractar diversos tipus de trastorns i dependències. Entre aquests es troben els usos antiepilèptics, els ansiolítics, els hipnòtics, els sedants, els d'abstinència alcohòlica, els de cuidats intensius, els de trastorns musculars, els de manies agudes, els d'usos veterinaris i els no terapèutics.

1. **Ús antiepilèptic.** Les benzodiazepines són potents anticonvulsius i com a tal tenen propietats que ajuden al maneig d'un quadre epilèptic. Les més comunes per a tractar aquest símptoma són el diazepam i el lorazepam (Herrera et al., 2021).
2. **Ús ansiolític.** Aquestes BDZ són utilitzades per al control temporal de l'ansietat severa. Per tant, s'administra per via oral comunament, a més a més, es pot utilitzar per via intravenosa en un atac de pànic sever. El fàrmac més comú és el clordiazepòxid (Herrera et al., 2021).
3. **Ús hipnòtic.** L'ús hipnòtic es deu als forts efectes sedatius, tanmateix, moltes vegades s'utilitzen per a tractar problemes d'insomni. Si són de llarga duració, els efectes persisteixen durant tot el dia, però si són de duració intermèdia, els efectes no solen perdurar l'endemà de l'administració del medicament. Si es prenen per un període llarg de temps, poden crear dependència i tolerància a aquestes. Exemples són el nitrazepam, el temazepam o britizolam (Herrera et al., 2021).
4. **Ús sedant.** Aquestes solen administrar-se prèviament a una cirurgia per a produir una disminució de l'ansietat i amnèsia davant la situació que genera la incomoditat per sotmetre's a una operació. Un exemple d'aquest tipus és el lorazepam (Herrera et al., 2021).
5. **Ús en cuidats intensius.** És útil en la Unitat de Cuidats Intensius (UCI) en pacients que reben ventilació mecànica o presenten dolors aguts (Herrera et al., 2021).
6. **Ús en AWS.** Les BDZ són segures i efectives en aquests síndromes en el procés de desintoxicació de l'alcohol i provocant que els principis d'abstinència desapareguen. Els més comuns són el clordiazepòxid i el diazepam (Herrera et al., 2021).
7. **Ús en trastorns musculars.** Com que les benzodiazepines tenen propietats relaxants sobre els músculs són aptes per al control d'espasmes musculars en el cas del tètan i altres com el síndrome de les cames inquietes (Herrera et al., 2021).
8. **Ús en manies agudes.** Els episodis maníacs formen part del trastorn de bipolaritat, aleshores, les BDZ són útils per al control a curt termini de les manies agudes fins a assolir l'efecte neurolèptic o del liti. És eficaç perquè produeix una ràpida tranquil·lització de l'individu. Els més utilitzats són el clonazepam i el lorazepam (Herrera et al., 2021).
9. **Ús veterinari.** Les BDZ s'utilitzen en la pràctica veterinària igual que en la humana. El midazolam i el diazepam solen prescriure's amb finalitat anestèsica per a calmar l'ansietat i

l'agitació. Destacar que el diazepam també es prescriu per a tractar pors en els animals (Herrera et al., 2021).

- 10. Ús no terapèutic.** Com que les BDZ utilitzen i abusen de l'activació de vies de gratificació dopaminèrgiques del Sistema Nerviós Central (SNC), aleshores, qui abusa d'aquestes desenvolupa un elevat grau de tolerància, així com una elevació de la dosi a nivells efímers. La tolerància i la dependència es crea ràpidament en sotmetre's durant tres setmanes seguides al fàrmac. Si mes no, es poden desenvolupar complicacions com abscessos, cel·lulitis, tromboflebitis, trombosi venosa profunda, hepatitis B i C, VIH o SIDA (Herrera et al., 2021).

### 3.1.2 FOTOSENSIBILITAT DE LES BDZ

La Organització Mundial de la Salut (OMS) defineix una reacció adversa a un medicament (RAM) com “una resposta a un fàrmac que és nociu i no intencionat, i que es produeix en les dosis normalment utilitzades en l'ésser humà per a la profilaxis, el diagnòstic o la teràpia d'una malaltia, o les modificacions de la fisioteràpia.” La majoria de les RAM són predicibles, no immunològiques, generalment dependents de la dosi i relacionades amb la farmacologia del fàrmac (Kowalska et al., 2021).

La fotosensibilitat pertany al tipus més comú de reaccions farmacològiques adverses relacionades amb la pell. Les reaccions cutànies degudes a la fotosensibilitat ocorren quan el medicament, siga subministrat per via sistèmica o per aplicació tòpica, augmenten amb la sensibilitat als rajos ultraviolats (UV) del Sol i altres fonts de llum (Kowalska et al., 2021), (Momin et al., 2021).

Perquè una erupció cutània d'un medicament es considere fotosensible es deuen complir els següents criteris:

- Ocorre únicament en el context de la radiació (Blakely et al., 2019).
- El medicament o algun dels seus metabòlits deuen estar presents en la pell en el moment de la radiació (Blakely et al., 2019).
- El fàrmac i/o els seus metabòlits deuen poder absorbir la radiació visible i la UV (Blakely et al., 2019).

De forma general, la reacció comença a causa de canvis bioquímics que s'experimenten en els teixits humans a causa d'un subministrament d'alguna substància externa a conseqüència de l'exposició solar. Tenint en compte les causes i mecanismes, les reaccions fotoal·lèrgiques i fototòxiques es diferencien entre la fotosensibilitat induïda per fàrmacs (Kowalska et al., 2021), (Momin et al., 2021).

Les reaccions fotoal·lèrgiques són reaccions de fotosensibilitat mediada immunològicament i s'aplica a les respostes d'hipersensibilitat retardada (mediada per cèl·lules) i immediata (mediada per humoral) a un agent fotosensibilitzant. Aquest tipus de reaccions, es diferencien per complir cinc característiques (Kowalska et al., 2021).

- a) No aparèixer en la primera exposició al fotosensibilitzador.
- b) Necessitat d'un període d'incubació per a la memòria immunològica després de la primera exposició.
- c) Reaccions creuades entre fàrmacs molecularment semblants.

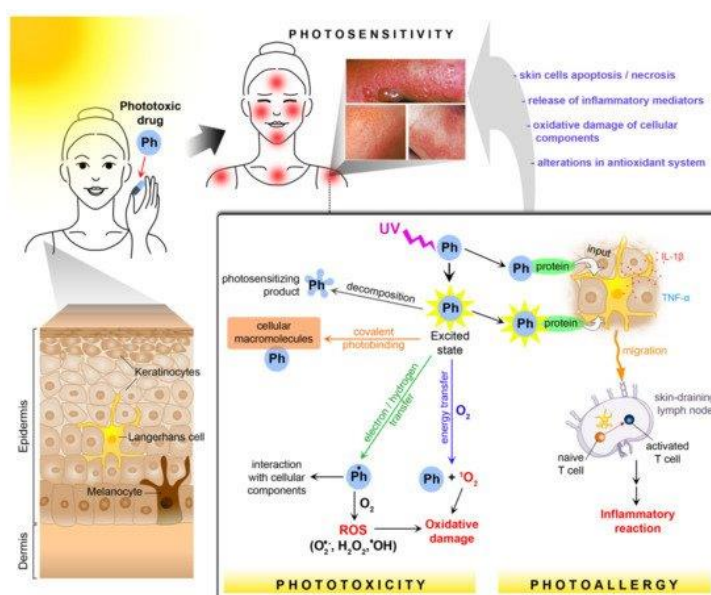
- d) El requisit indispensable d'una dosi baixa de fàrmac per a una reacció.
- e) Alteració química del fotosensibilitzador i unió covalent amb un portador.

Aleshores, l'esdeveniment clau en el mecanisme patològic de la fotoal·lèrgia és la fotounió del fàrmac o del seu metabòlit a la proteïna transportadora que condueix a la formació d'un fotoantígen complet (Kowalska et al., 2021).

Per una altra banda, les reaccions fototòxiques per fàrmacs són molt més freqüents que les anteriors, aquestes no es regeixen pel sistema immunitari sinó que representen com a resultat un dany cel·lular directe per compostos fotoactivats mitjançant una via no immunològica. Les característiques típiques d'aquest tipus de reaccions són cinc (Kowalska et al., 2021).

- a) La seva aparició després de la primera exposició a un fotosensibilitzador.
- b) La seva aparició de minuts a hores després de l'exposició a la llum solar.
- c) La necessitat d'una elevada concentració de fàrmac.
- d) Un efecte dependent de la dosi.
- e) Absència de reaccions creuades entre fàrmacs estructuralment semblants.

Les reaccions de fototoxicitat es poden dividir en reaccions dependents d'oxigen (fotodinàmiques) o independents d'oxigen (no fotodinàmiques). El risc de reaccions fototòxiques i fotoal·lèrgiques fa referència a diversos centenars de fàrmacs antiinflamatoris no esteroides, fàrmacs utilitzats en la farmacoteràpia de malalties cardiovasculars, fàrmacs que actuen sobre el SNC, antidiabètics i anticancerígens (Kowalska et al., 2021), (Blakely et al., 2019).



**Figura 5:** Mecanismes de fotosensibilitat induïda per fàrmacs (Ph: fàrmac fototòxic; ROS: espècies reactives d'oxigen).

Font: Kowalska, J., Rok, J., Rzepka, Z., & Wrześniok, D. (2021). Drug-induced photosensitivity—from light and chemistry to biological reactions and clinical symptoms. *Pharmaceuticals*, 14(8), 30. <https://doi.org/10.3390/ph14080723>

L'aparició de reaccions de fotosensibilitat induïdes per fàrmacs depenen de les propietats del medicament com de la exposició a la radiació UV. Els fàrmacs fotosensibilitzants són compostos que absorbeixen radiació, la qual consta de tres components si prové del sol: llum ultraviolada (UV) (180-380 nm), llum visible (380-700 nm) i rajos infrarojos (IR) (700 nm - 3 µm). El percentatge de cadascuna de les tres components és 6'8%, 38'9 % i 54'3 % respectivament. Tanmateix, la llum ultraviolada es divideix en tres regions: UVC (180-280 nm), UVB (280-320 nm) i UVA (320-380 nm). D'aquestes sols arriben a la pell la UVB i la UVA en un 5% i un 95% respectivament, ja que la UVC és la part més energètica i s'absorbeix en la capa d'ozó (Kowalska et al., 2021). En la Taula 2, s'observen les fonts artificials de radiacions ultraviolades.

**Taula 2:** Fonts artificials de les radiacions ultraviolades.

Font: Kowalska, J., Rok, J., Rzepka, Z., & Wrześniok, D. (2021). Drug-induced photosensitivity—from light and chemistry to biological reactions and clinical symptoms. *Pharmaceuticals*, 14(8), 30. <https://doi.org/10.3390/ph14080723>

Font	Espectre emès de longituds d'ones
<b>Làmpades germicides per a esterilització i desinfecció</b>	UVC
<b>Arcs de soldadura</b>	Espectre complet ultraviolat (UVA, UVB, UVC)
<b>Làmpades halògenes d'halogenurs metàl·lics i tungsté d'elevada potència</b>	Espectre complet ultraviolat (UVA, UVB, UVC)
<b>Làsers UV i díodes emissors de llum (LEDs)</b>	UVA/UVB/UVC
<b>Làmpades solars, llits solars i llits d'autobronzejat</b>	UVA + UVB
<b>Làmpades de fototeràpia utilitzades per a afeccions mèdiques i dentals</b>	UVA o UVA + UVB
<b>Fotocurat UV</b>	UVA
<b>Làmpades UVA de "llum negra"</b>	UVA
<b>Làmpades UVA utilitzades per a inspeccions de materials en la indústria, verificació de bitllets i com a trampes d'insectes</b>	UVA

A més a més, els fàrmacs amb tendència fotosensibilitzant solen distribuir-se en teixits exposats a la llum, tindre un baix pes molecular (entre 300 Da i 500 Da) i configuracions planes poliaromàtiques o policíclics amb halògens i heteroàtoms. Generalment, els fàrmacs fotosensibilitzants absorbeixen en un rang delimitat de radiació electromagnètica que inclou la llum visible i la ultraviolada i presenten un coeficient d'extinció molar (MEC) superior a 1000 L·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>. Molts, contenen una resta aromàtica clorada que els permet la dissociació de l'àtom de clor de l'estructura aromàtica quan es desenvolupa la radiació UV, per aquest motiu es formen radicals lliures que poden reaccionar amb lípids, proteïnes i amb l'ADN. Aquesta característica es troba present en les benzodiazepines amb tendència a la fotosensibilitat (Kowalska et al., 2021), (Momin et al., 2021).

Les benzodiazepines, en general, no solen diagnosticar-se com a causa potencial de la fotosensibilitat. Tanmateix, en molts estudis s'ha demostrat que l'alprazolam, tetrazepam, clorazepat,

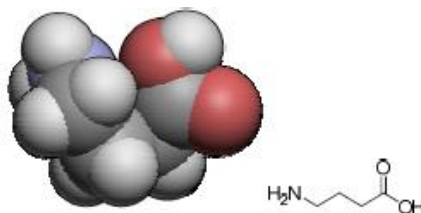
clobazam i el clordiazepòxid són cinc excepcions de benzodiazepines que causen reaccions fototòxiques en exposar-se a la llum. Destaca el fet que tots els fàrmacs fotosensibles són lipofílics, és a dir, que permeten la seva acumulació en la pell i, consegüentment, que s'absorbeixi la radiació UV o visible (Momin et al., 2021).

### 3.1.3 MECANISME D'ACTUACIÓ DE LES BDZ

L'activitat de les BDZ es deu principalment a la interacció d'aquestes amb una gran varietat de receptors instal·lats en el cos humà, a més a més, influeix la modulació al·lostèrica que exerceixen les BDZ amb els neurotransmissors implicats en nombrosos processos com ara la serotonina, la dopamina, l'acetilcolina o el AMP cíclic entre altres (Legarén, 2010).

Així i tot, destaca la interacció de les BDZ amb els receptors del sistema GABA (àcid gamma-amino butíric), és a dir, de receptors fisiològics. Açò es deu al fet que l'acció molecular de les BDZ es basa en fixar-se de forma específica en un lloc concret del complex molecular en el receptor GABA, de manera que es produeix una modulació al·lostèrica en el complex (Legarén, 2010).

El GABA és el neurotransmissor inhibitor més important del SNC i es localitza en gran part d'aquest. L'estructura del mateix s'observa en la Figura 6:



**Figura 6:** Estructura del neurotransmissor GABA.

Font: Legerén Molina, M. L. (2010). *Síntesis y evaluación biológica de nuevas benzodiazepinas*. Universidad de Santiago de Compostela, Servicio de Publicacións e Intercambio Científico. <http://hdl.handle.net/10347/2839>

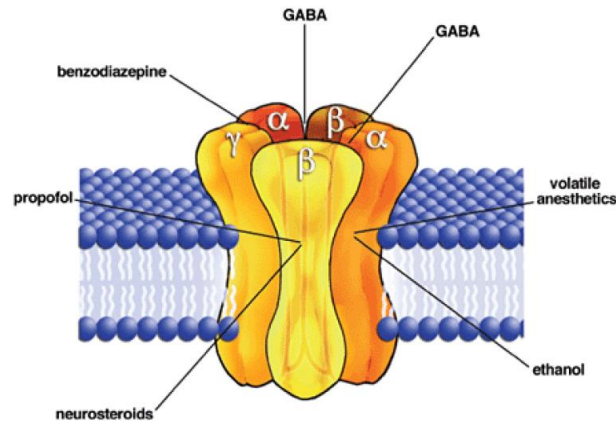
Aquest neurotransmissor es caracteritza per estar format per tres tipus de receptors diferents (Legarén, 2010):

- GABA<sub>A</sub> que es caracteritza per la implicació del mateix en tots els processos relacionats amb la neuroquímica de l'ansietat.
- GABA<sub>B</sub> que es caracteritza per estar relacionat amb la modulació de diversos trastorns motors.
- GABA<sub>C</sub> que es caracteritza per contenir una implicació funcional desconeguda fins al moment.

Com que el més interessant des del punt de vista del CDZ és el GABA<sub>A</sub> cal profunditzar amb aquest. Es tracta d'un receptor associat a canals iònics i que es caracteritza per ser una proteïna pentamèrica transmembranal amb cinc subunitats que formen un canal iònic permeable als ions clorur (Legarén, 2010).

Quan els ions clorurs penetren el canal poden produir variacions en la polarització i en la transmissió de l'impuls nerviós. Puig que a banda del poder de permeabilitat de ions clorur contenen

llocs de fixació de moduladors al·lostèrics, s'afavorirà l'obertura del canal a l'unir en aquests les BDZ (Legarén, 2010).



**Figura 7:** Complex receptor  $GABA_A$ -BDZ-ions  $Cl^-$ . S'observen les cinc subunitats i alguns lligands que tenen afinitat amb el complex.

Font: Legerén Molina, M. L. (2010). *Síntesis y evaluación biológica de nuevas benzodiazepinas*. Universidad de Santiago de Compostela, Servicio de Publicacións e Intercambio Científico. <http://hdl.handle.net/10347/2839>

Aquest tipus de receptors, tal com s'observa en la Figura 7, estan formats per tres tipus de subunitats, dues  $\alpha$ , dues  $\beta$  i una  $\gamma$ . A la vegada, aquestes subunitats poden tindre diversos tipus de subunitats sent la combinació més abundant  $\alpha_1$ ,  $\beta_2$  i  $\gamma_2$  perquè es caracteritza per la seva afinitat amb les BDZ.

### 3.1.4 CLASSIFICACIÓ DE LES BDZ

Les benzodiazepines es poden classificar segons el temps de vida útil de les mateixes en BDZ d'acció curta, BDZ d'acció intermèdia i BDZ d'acció llarga. El temps de vida d'un fàrmac s'entén com el temps que un producte farmacèutic es deu mantenir estable, és a dir, mantenint més de 90 % del seu potencial inicial en condicions d'emmagatzemament correctes (López, 2011).

**Taula 3:** Principals benzodiazepines ansiolítiques segons la vida mitjana.

Font: Legaria, M. G. F. de. (2008). *Ansiolíticos e hipnóticos*. Profesor Manuel Gurpegui - Catedrático y Director Del Departamento de Psiquiatria de La Universidad de Granada. <https://manuelgurpegui.es/ansioliticos-e-hipnoticos-clases-ansioliticos/>

Nombre farmacológico	Nombre comercial	Equivalente de 5 mg/día de diazepam	Dosis típica	Efecto principal
<b>De acción corta</b> (menos de 12 horas)				
Oxacepam	Adumbran, Psiqiwax	15	30-60	A
Lorazepam	Idalprem, Orifidal	1	2-3	A
Alprazolam	Trankimazin	0,5	0,75-3	A
Benzazepam	Tiadipona	12,5	75	A
<b>De acción intermedia</b> (de 12 a 23 horas)				
Clordiazepóxido	Librium	15	45	A
Clotiazepam	Distensan	5	10	A
Clonazepam	Rivotril	0,5	1-4	E, A
Tetrazepam	Myolastan		50	R
Bromazepam	Lexatin	3	4,5	A
Alprazolam de liberación retardada	Trankimazin Retard	0,5	1-4	A
<b>De acción larga</b> (24 horas o más)				
Diazepam	Valium, Diacepán	5	5-10	A, R, H, E
Clorazepato dipotásico	Tranxilium, Dorken	10	15-30	A
Ketazolam	Marcen, Sedotime	15	30	A
Clobazam	Clarmyl, Nolafren	10	10-20	A, E

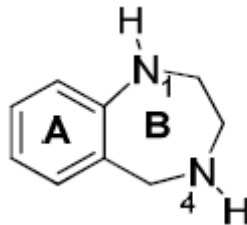
Les d'acció curta o vida curta es caracteritzen per romandre poc de temps en l'organisme (menys de 12 hores), puix que no seran útils per a tractar trastorns d'ansietat prolongats en el temps. Nogensmenys, tenen la capacitat d'actuar ràpidament pel que seran aptes per a combatre l'aparició de símptomes ansiosos com l'ansietat o les dificultats per a agafar el son. En conjunt, aquests fàrmacs solen provar un nivell d'efectes secundaris elevat (Mimenza, 2018).

Les d'acció intermèdia o de vida intermèdia es caracteritzen per actuar de forma prematura però menys ràpid que les de vida curta i durant un període més extens que aquestes. La seva duració sol ser de 12 a 24 hores en l'interior de l'organisme (Mimenza, 2018).

Les d'acció llarga o vida llarga són aquelles que romanen en l'organisme durant més de 24 hores i el seu efecte no s'observa fins un temps després a l'administració de la dosi. Per consegüent, romandre molt de temps en l'organisme pot desenvolupar l'acumulació dels efectes de la dosi del fàrmac fent que l'organisme experimente efectes sedants no desitjables. Si més no, són útils en el tractament de trastorns d'ansietat (Mimenza, 2018).

### 3.1.5 1,4-BENZODIAZEPINES

Les benzodiazepines són el grup de medicaments més utilitzat a causa de la baixa toxicitat i elevada eficàcia que presenten. Aquests composts es caracteritzen per comptar amb una estructura basada en un anell benzènic (A) fusionat en un compost de 7 esclavons contenint dos nitrògens (B), tal com s'observa en la Figura 8. La posició relativa entre aquests nitrògens determinarà el tipus de benzodiazepines; en el cas del CDZ aquests anells es disposen en la posició 1 i 4 de l'anell B, aleshores es tractarà d'una 1,4-benzodiazepina (Legarén, 2010).



**Figura 8:** Estructura bàsica d'una 1,4-benzodiazepina.

Font: Legarén Molina, M. L. (2010). *Síntesis y evaluación biológica de nuevas benzodiazepinas*. Universidad de Santiago de Compostela, Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico. <http://hdl.handle.net/10347/2839>

Convé ressaltar, que aquest tipus de benzodiazepines no es poden deixar d'administrar de forma brusca per culpa del fet que poden presentar el doble de possibilitats de reaparició dels síndromes tractats després del seu ús (Nahum, 2020).

## 3.2 CLORDIAZEPÒXID

El clordiazepòxid és un medicament que pertany al grup de les benzodiazepines i s'utilitza principalment com a hipnotitzant o tranquil·litzant. Inicialment el CDZ s'anomenava metamindiazepòxid i es comercialitza baix el nom de Klopoxid, Libritabs, Librium, Mesural, Multum, Novapam, Risolid, Silibrin, Sonimen, Tropium i Zetran. Com ja s'ha anomenat anteriorment, va ser patentada en 1958 i aprovat el seu ús en els Estats Units en 1960. Sol trobar-se



en forma de píndola de 5, 10 o 25 mg i se subministra de forma oral entre 1 i 4 dosis diàries (Corneliessen et al., 1980).

El seu ús principal recau en el tractament de problemes d'ansietat pel fet que conté propietats amnèsiques, anticonvulsives, ansiolítiques, sedants i relaxants. Tanmateix, també s'utilitza per a tractar problemes d'insomni, trastorns del pànic i en individus amb síndrome d'abstinència alcohòlica o abstinència als opiàcids. Fins i tot, s'ha utilitzat per tractar problemes gastrointestinals procedents de malalties com la de Crohn o la colitis ulcerosa (Corneliessen et al., 1980).

El mecanisme d'acció recau en actuar sobre el receptor GABA tipus A produint un efecte inhibitori prolongat, de mode que es bloqueja l'augment de l'activitat elèctrica anormal del cervell que procedeix del tronc de l'encèfal. Diversos estudis demostren que actua sobre el sistema límbic, el qual podria explicar els efectes emocionals que té el medicament relacionats amb la disminució de la por i l'agressió (Corneliessen et al., 1980).

Aquest fàrmac està destinat a utilitzar-se en períodes de temps curts, al voltant de quatre setmanes puix que més temps implica possibles problemes de tolerància i dependència, en persones que es troben sotmeses a un nivell excessiu d'estres que dificulta poder desenvolupar una vida normal (Herrera et al., 2021).

Per una altra banda, el CDZ presenta interacció amb altres substàncies com vitamines, somnífers, alcohol, relaxants musculars, anticonceptius orals, etc, que poden causar un efecte repressor sobre el SNC (Mimenza, 2018). Els efectes secundaris que poden aparèixer en subministrar CDZ són els següents:

**Taula 4:** Efectes secundaris de l'administració de clordiazepòxid.

Font: Nahum Montagud Rubio. (2020). Clordiazepóxido: características y efectos secundarios de este fármaco. *Psicología y Mente*. <https://psicologiymente.com/psicofarmacologia/clordiazepoxido>

Efectes secundaris lleus	Efectes secundaris intermedis	Efectes secundaris severos
Somnolència	Agitació o excitació motora	Caminar arrossegant els peus
Cansament	Nerviosisme	Trastorn de l'equilibri
Marejos	Cefalea	Confusions
Debilitat muscular	Atàxia	Tremolors
Boca seca	Diplopia	Febre
Molèsties estomacals	Vertigen	Problemes per a respirar i tragar
Diarrees	Estrenyiment	Urticària
Trastorn de l'apetit	Problemes d'orina	Icterícia en la pell i els ulls
	Visió borrosa	Ritme cardíac irregular
	Canvis en el desig sexual	Retraïment afectiu
		Reducció de l'estat d'alerta
		Coma
		Depressió

### 3.2.1 METABÒLITS DEL CDZ

El CDZ té diversos metabòlits farmacològicament actius. En primer lloc, es troba el desmetilclordiazepòxid o norclordiazepòxid (DES-CDZ), no obstant això, aquest es pot metabolitzar en demoxepam (DEM), desmetildiazepam o nordiazepam (DES-DZP) i en oxazepam (OZP). Quan el fàrmac es subministra en dosis repetides es pot donar lloc a l'acumulació d'aquest i dels seus

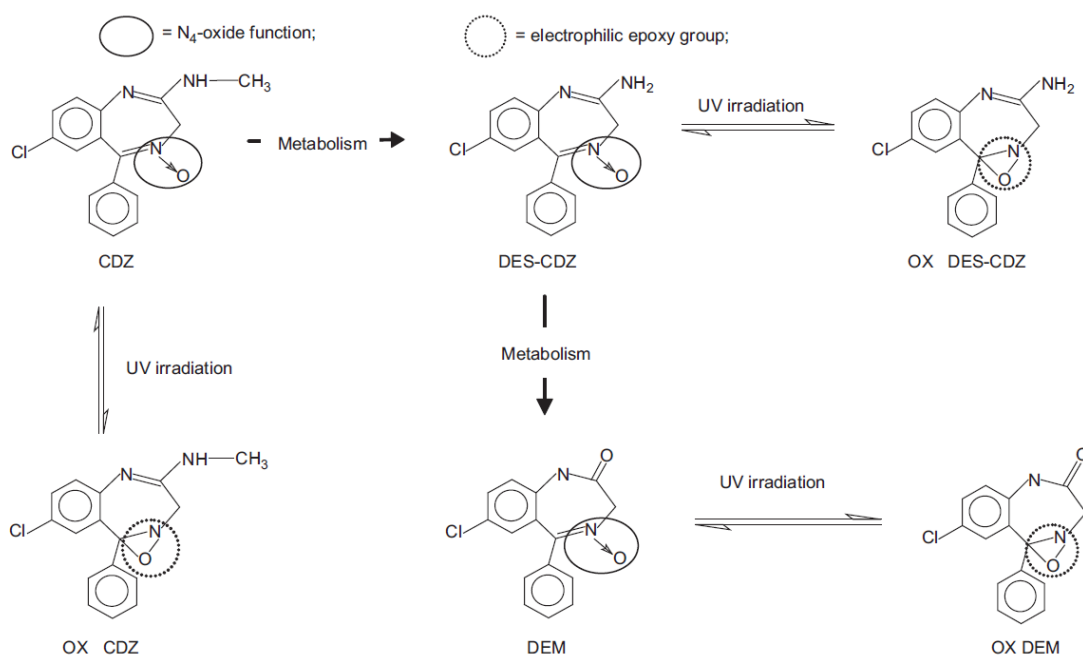
metabòlits i consegüentment augmentar el risc de toxicitat (Pedersen et al., 2020). El DEM pertany al grup de metabòlits de fase I.

Ara bé, únicament el DES-CDZ i el DEM són específics del CDZ, en canvi, el DES-DZP i el OZP són comuns en moltes benzodiazepines. Ben cert, un 1% de la dosi de CDZ s'excreta en l'orina sense sofrir cap canvi, aleshores, es podrà detectar el DEM i el OZP conjugat fàcilment (Sarris i Limoges, 2019).

La permanència dels metabòlits en la sang i en el plasma humà depèn de quatre factors: en primer lloc es troba el règim de dosificació, a continuació l'eficiència metabòlica, en tercer lloc la vida mitjana del CDZ i dels metabòlits i, en última instància, el temps de recollida de la mostra (Sarris i Limoges, 2019).

Destaca el fet que el DES-CDZ és fàcilment detectable en el plasma després d'administrar una dosi de clordiazepòxid, tanmateix, el DEM no és detectable de forma consistent amb petites dosis de CDZ. Però a grans dosis la detecció d'ambdós metabòlits és efectiva (Sarris i Limoges, 2019).

Quan el CDZ i els seus dos metabòlits principals es sotmeten a radiacions UV i elevades longituds d'ona poden fotoisomeritzar-se en derivats d'oxaziridina com ara la oxaziridina del clordiazepòxid (OX CDZ), la oxaziridina del demoxepam (OX DEM) i la oxaziridina del desmetilclordiazepòxid (OX DES-CDZ). Aquest mecanisme d'acció es pot observar en la Figura 9.



**Figura 9:** Estructura del CDZ, dels seus metabòlits (DES-CDZ i DEM) i els seus fotoproductes (OX CDZ, OX DEM i OX DES-CDZ).

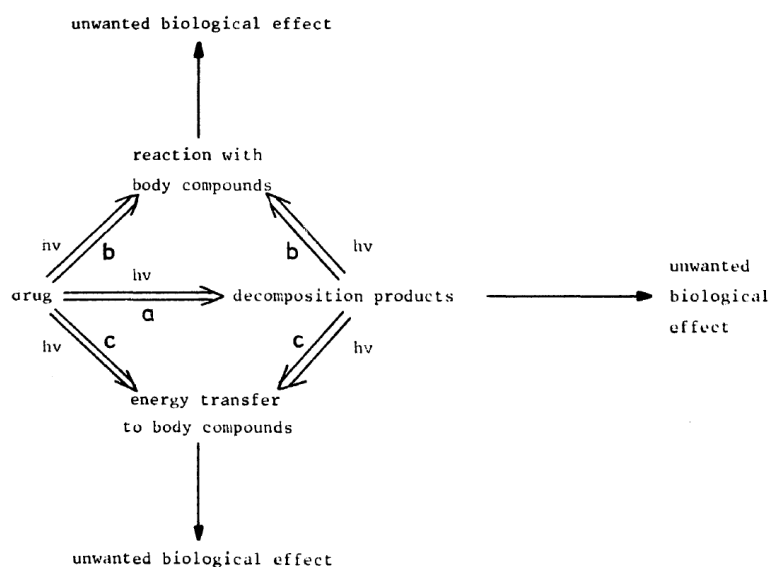
Font: Ouédraogo, M., Maeschalck, E. De, Soentjens-Werts, V., & Dubois, J. (2009). *In vitro* cytotoxicity study of oxaziridines generated after chlordiazepoxide, demoxepam, and desmethylchlordiazepoxide UV irradiation. *Drug and Chemical Toxicology*, 32(4), 417–423. <https://doi.org/10.1080/01480540903130666>

Els derivats d'oxaziridina formats es troben implicats en efectes fototòxics que apareixen en la pell dels éssers humans. És important destacar que el N<sub>4</sub>-òxid característic del CDZ i dels seus metabòlits es transforma en un grup epòxid electrofílic inestable en sotmetre aquests a radiacions UV. Aquest grup epòxid es pot trencar fàcilment i és susceptible d'unir-se de forma irreversible a biomacromolècules com ara la proteïna plasmàtica, o bé, per a oxidar diverses molècules essencials com el glutatió (GSH) o altres compostos que continguin el grup SH (Ouédraogo et al., 2009).

Després de subministrar una dosi de CDZ i exposar l'organisme a rajos solars (UVA) apareixen diversos danys en òrgans com la pell, el fetge o els ronyons els quals han sigut demostrats en assajos amb rates, bacteris i llevats. Per tant, es pot suposar que les oxaziridines i els seus derivats són agents citotòxics potencials als quals se'ls aplica radiació UV a elevada longitud d'ona (Ouédraogo et al., 2009).

En conseqüència, la fototoxicitat es produeix si apareix un efecte biològic no desitjat després d'una reacció fotoquímica. La molècula excitada a conseqüència de l'absorció de llum inicia aquest procés fotoquímic, el qual, pot seguir tres vies diferents: la primera consisteix en la dissociació del fàrmac en radicals lliures o en una reacció d'isomerització, la segona consisteix en una reacció amb una altra molècula i la tercera en un procés en què el medicament transfereix energia a una altra molècula per mitjà de la qual el receptor assoleix un estat excitat (Corneliessen i Beijersbergen van henegouwen, 1979).

Aquest procés s'observa en la Figura 10 on la lletra a representa el primer procés possible, la b el segon i la c el tercer.



**Figura 10:** Possible procés a seguir en un sistema biològic iniciat per un fàrmac després d'absorbir energia de la llum.

Font: P.J.G. CORNELISSEN, G. M. J. B. V. H. and K. W. G. (1979). Photochemical decomposition of 1,4-benzodiazepines. Chlordiazepoxide. *International Journal of Pharmaceutics.*, 3(4-5), 205-220.  
[https://doi.org/10.1016/0378-5173\(79\)9000-8](https://doi.org/10.1016/0378-5173(79)9000-8)

A més a més, amb aquesta molècula acceptadora procedent de la tercera via d'acció es pot procedir a repetir el procés patit des de la molècula inicial. Els productes procedents de la primera via poden desencadenar efectes biològics no desitjats a causa de les propietats fisiològiques no desitjades provinents de reaccions amb components del cos humà. A més a més, a banda de provocar efectes biològics també poden transferir lliurement energia a altres molècules. Tanmateix, si es segueix la segona via, es produiran efectes secundaris no desitjats (Corneliessen i Beijersbergen van henegouwen, 1979).

La fototoxicitat provindrà de la tercera via en la qual es produeixen els fotoproductes del fàrmac o dels seus metabòlits en irradiar-los amb llum UV a elevades longituds d'ona. L'aparició de la fototoxicitat es troba fortament relacionada amb la formació del fotoproductes derivats de la oxaziridina i la magnitud de l'efecte pot dependre de la reactivitat química d'aquestes. Com que els metabòlits del CDZ també presenten fototoxicitat, és d'elevada importància tindre en consideració

aquest fet a l'hora d'utilitzar el clordiazepòxid amb un ús terapèutic d'extensió prolongada perquè el medicament i els metabòlits es trobaran en concentracions rellevants i de forma constant en l'organisme (Corneliessen et al., 180).

### 3.3 ALBÚMINA SÈRICA

L'albúmina sèrica (AS) és una proteïna sintetitzada que circula per la sang i es pot trobar en diversos teixits del cos. A més a més, s'encarrega de mantenir la pressió osmòtica de la sang i el pH. L'estructura principal consta d'una única cadena polipeptídica amb una massa molecular aproximada de 67 kDa que conté nou logos dobles formats per un total de disset ponts disulfur que envolten als residus de la cisteïna adjacent. Aquesta proteïna es compon de tres dominis homòlegs (I, II, III) enter els quals poden interaccionar substrats de diferent naturalesa, i cadascun d'ells es troba format per dos subdominis (A i B) (Bueno, 2009), (Monje, 2014).

L'AS és un tipus de proteïna transportadora que transporta substrats que interactuen en el centre actiu de la mateixa per mitjà del plasma. Els substrats que pot transportar són de naturalesa endògena (com ions inorgànics, àcids grassos, bilirubina, vitamines, hormones o enzims) o exògena (com esteroides o fàrmacs). A més a més, també transporta la  $\alpha$ -glicoproteïna àcida que és la proteïna encarregada del transport de fàrmacs bàsics o neutres per l'organisme (Bueno, 2009), (Arques, 2020).

Ben cert és, que forma complexos amb molècules poc solubles en medis aquosos de forma que augmenta la diversitat de molècules que poden viatjar d'un extrem a l'altre dins de l'organisme. Al mateix temps, el fet d'estar les molècules unides a la proteïna fa que aquestes disminueixen la seva activitat biològica, la toxicitat, però al mateix temps augmenta el temps de vida útil pel fet d'estar menys exposades i augmenta la protecció enfront de l'oxidació (Bueno, 2009), (Monje, 2014).

Les cavitats que tenen les AS en l'estructura globular estan formades per aminoàcids lipòfils que permeten la introducció i estabilització de les molècules per forces d'unió Van der Waals i d'interacció hidrofòbica (Monje, 2014).

Les albúmines sèriques poden ser de diversos tipus d'éssers vius com humans (ASH), porcs (ASCe), rates (ASR), ovelles (ASB), conills (ASC) i gossos (ASP) entre altres. Les més utilitzades en estudis farmacocinètics i farmacodinàmics són l'ASH i l'ASB per el baix cost i la fàcil adquisició. Molts estudis utilitzen aquestes proteïnes procedents dels diversos animals per l'elevada semblança en la seqüència d'aminoàcids respecte a la dels humans (Bueno, 2009).

Malgrat això, molts fàrmacs i els seus metabòlits presenten diferent unió a l'AS com és el cas de la bilirubina. Per consegüent, és necessari estendre estudis farmacocinètics i farmacodinàmics a albúmines d'altres espècies diferents de la humana (Bueno, 2009).

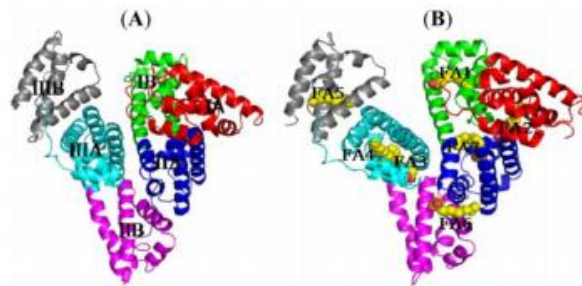
#### 3.3.1 ALBÚMINA SÈRICA HUMANA

L'ASH és la proteïna més abundant en el plasma i es secreta en el fetge. Consisteix en una cadena polipeptídica sense grups prostètics ni altres additius amb una massa molecular aproximada de 66.5 kDa, i es troba en una concentració aproximada de 35 a 52 g/L. Com que té una capacitat d'unió al lligand significativa, es pot dir que és la proteïna de transport de fàrmacs més important (Ouédraogo et al., 2009), (Yasrebi et al., 2019), (AEMPS, 2012).

Al marge d'això, l'ASH es troba a la sang, en l'exhalació de certes superfícies, en diversos fluids cel·lulars com els teixits o els ulls i en molts altres fluids animals (Bueno, 2009).

Les principals funcions de l'ASH són regular la pressió osmòtica col·loïdal de la sang i transportar una àmplia gamma de molècules de fàrmacs als seus objectius (Yasrebi et al., 2019), (AEMPS, 2012).

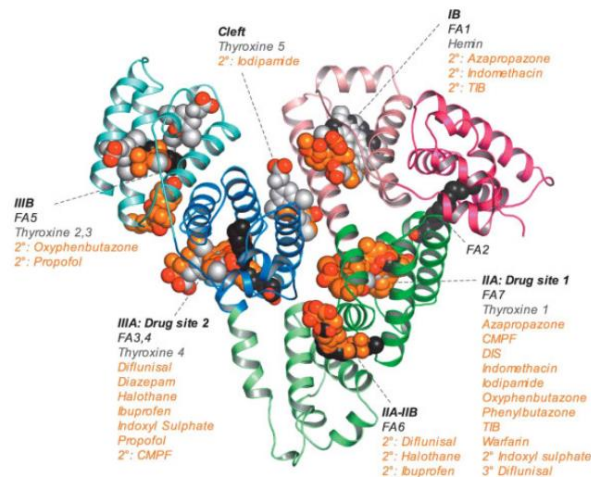
La estructura principal consta d'una única cadena polipeptídica amb 585 aminoàcids, entre els quals es formen un total de disset ponts disulfur, existint un únic tiol lliure (Cys-34) i un únic triptòfan (Trp-214). Aquesta proteïna es compon de tres dominis homòlegs (I, II, III) entre els quals poden interaccionar substrats de diferent naturalesa, i cadascun d'ells es troba format per dos subdominis (A i B). Alhora, la cadena polipeptídica es dobla formant una hèlix de dimensions 80x80x30Å amb prop del 67% de la  $\alpha$ -hèlix, un 10% de la làmina- $\beta$  i un 23% de cadena estesa (Ouédraogo et al., 2009), (Bueno, 2009), (AEMPS, 2012).



**Figura 11:** A) Estructura de l'Albúmina Sèrica Humana (ASH). B) Estructura de l'ASH unida a una molècula (groc).

Font: Monje López, V. T. (2014). *Proteínas como microrreactores en fotoquímica* [Universidad Politécnica de Valencia]. <https://riunet.upv.es/handle/10251/40430>

En la Figura 12 s'observen els dominis I, II i III de l'ASH i la ubicació dels mateixos en aquesta. Tanmateix, es poden observar els fàrmacs característics que s'uneixen en cadascuna d'aquestes regions de la proteïna.



**Figura 12:** Representació dels dominis I, II i III de l'ASH.

Font: Bueno Alejo, C. J. (2009). *Interacción Fármaco-proteína en estados excitados* [Universidad Politécnica de Valencia]. Departamento de Química Instituto de Tecnología Química. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/6565>

Quan s'irradia l'ASH a 295 nm absorbeix tots els aminoàcids aromàtics tot i que el triptòfan (TRP-214) com que té una energia d'emissió més baixa absorbeix radiacions provinents dels altres. Per aquest motiu, del TRP-214 sols es pot observar l'emissió del mateix. Per una altra banda, es coneix que l'ASH actua com a portadora de diversos fàrmacs en el plasma, el coneixement del tipus d'interacció entre aquest i els diferents compostos és molt important perquè ens proporciona informació sobre les formes en les quals els medicaments es poden transferir. La interacció entre un fàrmac i una proteïna de transport com és l'ASH és un factor clau en la biodisponibilitat dels fàrmacs. Una de les tècniques més emprades a l'hora d'avaluar la formació del complex fàrmac-proteïna és la fluorescència. Aquest procés consisteix a estudiar la interacció de l'ASH amb diversos fàrmacs mitjançant el seguiment de l'excitació de la fluorescència quan es forma el complex fàrmac-albúmina (Bueno, 2009), (Monje, 2014), (AEMPS, 2012).

La síntesi d'ASH és hepàtica i té una vida mitjana de disset dies. Els intercanvis de compartiments intravasculars i intersticials són constants, i el 40% de les reserves totals d'albúmina romanen en el sector intravascular. Aquesta síntesi s'estimula amb la disminució de la pressió col·loidal osmòtica i la ingestió d'insulina i d'aminoàcids. Els factors que dificulten la síntesi i disminució el seu rendiment són l'elevada pressió osmòtica, la desnutrició, la inflamació, la diabetis, les malalties hepàtiques i la sèpsia. L'ASH es degrada en la pell, els ronyons, els músculs i el fetge. El nivell fisiològic de l'ASH es troba entre 3'5 i 5 g/dl encara que segons l'assaig aquest ombrall pot variar. En general el nivell fisiològic és més elevat en homes que en dones i disminueix moderadament amb l'edat (AEMPS, 2012).

Les principals propietats fisiològiques inclouen el transport de partícules i fàrmacs endògens i exògens, activitat antiinflamatòria, antioxidant, anticoagulant i antiagregant plaquetària i un paper important en els intercanvis de líquids entre els sectors intravasculars i intersticial. No obstant això, l'ASH també disminueix la expressió de l'ARN missatger i de la proteïna de l'òxid nítric sintasa II del miocardi, la qual modula la producció d'àcid nítric i la inflamació del miocardi. Tanmateix, conté el 80% dels tiols del plasma, els quals s'encarreguen d'eliminar les espècies reactives d'oxigen i nitrogen (AEMPS, 2012).

En efecte, les AS, en general, posseeixen diversos dominis d'unió amb substrats, existint dos llocs específics d'unió o centre actiu característics per a molècules orgàniques petites. En les ASH aquests centres actius es coneixen com a lloc I (o lloc de les warfarines) i lloc II (o lloc del diazepam) segons Sudlow en 1975. La diferència entre el lloc I i el II prové de la substitució de certs aminoàcids de caràcter apolar per altres diferents però de la mateixa polaritat. Destaca que en el lloc I les interaccions predominants són de tipus hidrofòbic, a més, es pot suposar que és un lloc de dimensions elevades, ja que molècules com la bilirubina es depositen en ell, i que és flexible. Per tant, l'elevada dimensió pot evitar problemes d'estereoselectivitat en la interacció amb substrats. Si més no, destaquen els aminoàcids Trp-214 i la Arg-218 amb la interacció fàrmac-substrat. Pel que respecta al lloc II, aquest és menor quant a dimensions i flexibilitat respecte del lloc I. Així doncs, aquest centre actiu presentarà més problemes d'estereoselectivitat. En aquesta cavitat destaquen les interaccions de tipus pont d'hidrogen i electroestàtiques. Els aminoàcids que desenvolupen un paper important en el lloc II pel que fa a la interacció fàrmac amb els lligands són l'Arg-410 i el Tyr-411 (Monje, 2014).

### 3.4 FOTOQUÍMICA I FOTOFÍSICA

La fotoquímica molecular és la ciència relacionada amb la descripció física i química dels processos que deriven de l'absorció de fotons, en termes d'un model mecànic concret basat en estructures moleculars i amb les seves propietats implícites (Lara, 2005).

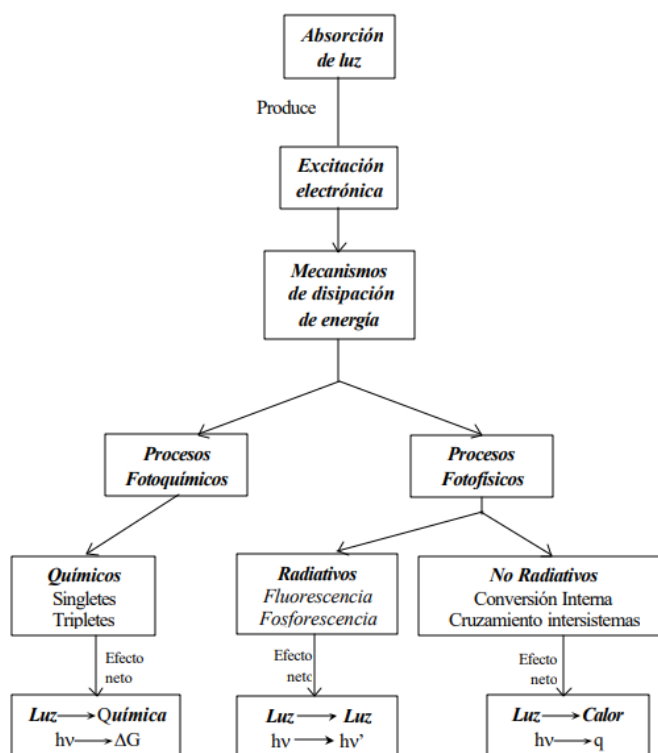
La part 'foto' representa la utilització d'un fotó com a iniciador d'una reacció mentre que la 'molecular' fa referència a l'ús de la molècula com a unitat crucial per a parametritzar, sistematitzar i visualitzar processos fotoquímics a nivell microscòpic (Lara, 2005).

Aquest tipus de reaccions poden ocórrer a molt baixes temperatures i en totes les fases. Del mateix mode, poden ser molt ràpides del nivell de picosegons o nanosegons com és el cas de processos fotofísics com la fluorescència o la conversió interna (Lara, 2005).

De forma general, les reaccions fotoquímiques s'inicien mitjançant radiacions ultraviolades (UV) a una longitud d'ona entre 200 i 350 nm, o mitjançant llum visible a una longitud d'ona entre 350 i 400 nm. L'energia lumínica no es distribueix a l'atzar dins de la molècula sinó que s'absorbeix selectivament per grups cromòfors (grups que es caracteritzen per ser grups químics no saturats amb electrons en orbitals  $\pi$  o  $n$  i són capaços d'excitar-se i absorbir energia com per exemple els grups  $-C=C-$ ,  $-C=O-$  o  $-N=N-$ ) (Lara, 2005).

Per tot açò, es pot admetre que les reaccions fotoquímiques són regió-selectives perquè depenen de la naturalesa (encara que aquesta pot dependre de la longitud d'ona que s'utilitza per a iniciar la reacció) i la localització dels grups cromòfors en la molècula (Lara, 2005).

A continuació, en la Figura 13 es presenta un esquema general dels processos fotoquímics i fotofísics que es poden desenvolupar quan una molècula absorbeix llum.



**Figura 13:** Esquema dels possibles processos fotoquímics i fotofísic a desenvolupar a partir de l'absorció de llum en una molècula..

Font: Lorente, C. (2003). *Fotofísica y propiedades fotosensibilizadoras de pterinas en solución acuosa* [Universidad Nacional de La Plata]. <https://doi.org/10.29327/523696.1-1>

Per consegüent, un procés fotoquímic no té una naturalesa fotofísica perquè la molècula inicial i la final no coincideix.

### 3.4.1 MECANISME D'INETRACCIÓ DELS PROCESSOS FOTOQUÍMICS I FOTOFÍSICS

Quan un fotó s'aproxima a una molècula es produeix una interacció entre el camp elèctric associat a la molècula i el camp elèctric associat a la radiació. Per consegüent, la molècula absorbirà el fotó, el qual deixarà d'existir i transferirà la seva energia a la molècula, cosa que es produirà una variació en l'estructura electrònica de dita molècula (Lara, 2005), (Lorente, 2003).

Un procés fotofísic és diferència d'un fotoquímic en què el primer suposa únicament un canvi en l'estat quàntic de la molècula sense produir cap modificació en la seva naturalesa química, mentre que el segon no té per què implicar un canvi en l'estat quàntic, però sempre acaba en una espècie química definida i diferent a la molècula de partida (Lara, 2005), (Lorente, 2003).

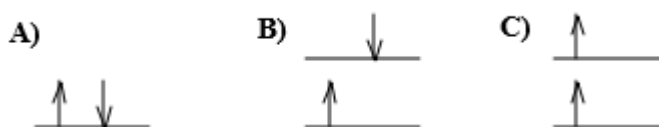
Existeixen diverses vies de desexcitació electrònica, malgrat que la més favorable dependrà del tipus de molècula i de la naturalesa de l'estat excitat. Aquestes vies solen ser molt ràpides i es classifiquen en tres categories (Lara, 2005), (Lorente, 2003):

1. **Processos radioactius.** Impliquen emissió electromagnètica des de l'estat excitat per a tornar a l'estat fonamental.
2. **Processos no radioactius.** L'estat excitat es transfereix a un altre estat de menor energia de la mateixa molècula sense implicar cap emissió.
3. **Processos de quenching.** Procés de desexcitació bimolecular o trimolecular que implica la transferència d'energia de la molècula inicialment excitada a altres partícules mitjançant xocs inelàstics.

Les emissions radioactives emeses per a passar d'un estat excitat a un fonamental impliquen principalment dos transicions radioactives, per una banda, la fluorescència i, per l'altra, la fosforescència (Lara, 2005), (Lorente, 2003).

En la fluorescència, la molècula (que es troba en l'estat excitat singlet) emet un fotó i assoleix l'estat fonamental. La fosforescència apareix quan l'espí de l'estat que emet és diferent de l'estat inferior. Ara bé, la fosforescència pot ocórrer tot i que el més comú és que es desenvolupe una transició de menor intensitat i de forma lenta (Lara, 2005), (Lorente, 2003).

En la majoria de les molècules orgàniques l'estat fonamental es representa pel símbol  $S_0$ . L'estat excitat singlet és l'estat de menor energia dins dels estats excitats amb la mateixa multiplicitat espín i es representa pel símbol  $S_i$ . L'absorció de radiació electrònica promou l'electró a un orbital de major energia, quan no hi ha variació de spin, l'estat electrònic excitat assolit continua sent un singlet, però quan es produeix un canvi de spin, l'estat excitat assolit serà un triplet i es representarà per  $T_i$  (Lorente, 2003).



**Figura 14:** A) Representació d'un orbital en l'estat fonamental ( $S_0$ ), B) Representació d'un orbital en estat singlet excitat ( $S_i$ ), C) Representació d'un orbital en estat triplet excitat ( $T_i$ ).

Font: Lara, I. G. (2005). Estudio AB inicio de mecanismos de reacción en sistemas moleculares fotosensibles [Universitat Rovira i Virgili]. <https://www.tdx.cat/handle/10803/9075#page=2>

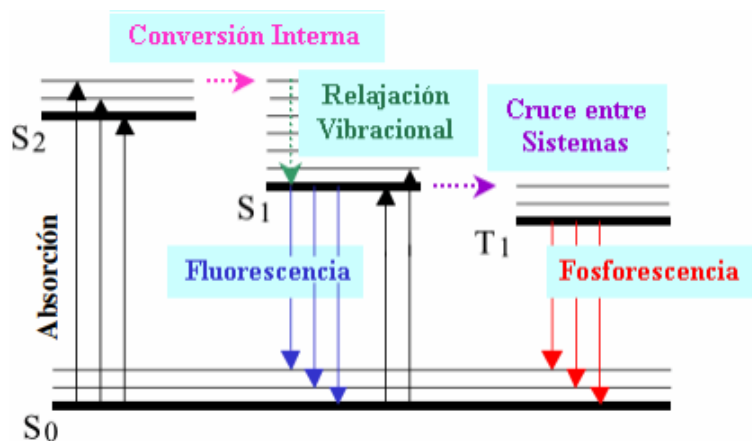


Les desexcitacions pertinents a la segona categoria, processos no radioactius, impliquen la conversió d'un estat quàntic molecular en un altre sense emetre una radiació. No obstant això, no totes les radiacions que no emeten radiació són no radioactives, però s'utilitza aquest terme per a definir transicions entre estats quàntics d'una molècula a una altra sense necessitat de perturbacions externes (Lara, 2005).

Aleshores, en el diagrama de la Figura 15, aquestes radiacions es representen horitzontalment i representen conversions d'un estat a un altre sense canvis d'energia en la molècula, mentre que les radioactives es representen de forma vertical i suposen canvis de l'energia total de la molècula a causa de l'absorció o emissió d'un fotó (Lara, 2005), (Lorente, 2003).

Igual que en les radiacions radioactives es pot diferenciar entre fluorescència i fosforescència, en les no radioactives es diferencia entre conversió interna (CI) i encreuament intersistemes (CIS). La CI suposa la transferència de població entre estat d'igual multiplicitat, mentre que la CIS implica la transferència de població entre estat de diferent multiplicitat (Lara, 2005), (Lorente, 2003).

Les transicions horitzontals entre estats, per CI o CIS, deixen a la molècula amb un excés d'energia vibracional. En solució, aquesta energia és ràpidament retirada per col·lisions amb molècules del dissolvent, en un procés conegut com a relaxació vibracional (RV) (Lorente, 2003).



**Figura 15:** Diagrama de Jablonski: Descripció esquemàtica dels diferents processos fotofísics que poden desenvolupar-se després de l'excitació inicial des de l'estat fonamental.

Font: Lara, I. G. (2005). Estudio AB inicio de mecanismos de reacción en sistemas moleculares fotosensibles [Universitat Rovira i Virgili]. <https://www.tdx.cat/handle/10803/9075#page=2>

Els temps de duració dels diferents processos que s'observen en la Figura 15 s'observa en la Taula 5.

**Taula 5:** Temps de vida dels principals processos fotofísics.

Font: Limones Herrero, D. (2015). Fotoquímica de compuestos heteroaromáticos tricíclicos en medios biomiméticos [Universitat Politècnica de València.]. <https://doi.org/10.4995>

Procés fotofísic	Temps de vida (s)
Absorció (A)	$10^{-15}$
Relaxació vibracional (RV)	$10^{-12} - 10^{-10}$
Temps de vida de l'estat excitat S <sub>1</sub>	$10^{-10} - 10^{-7}$
Conversió Interna (CI)	$10^{-11} - 10^{-9}$
Creuament intersistemes (CIS)	$10^{-10} - 10^{-8}$
Temps de vida de l'estat excitat T <sub>1</sub>	$10^{-7} - 10^{-5}$

El mecanisme d'actuació de cada un dels fenòmens que s'observen en el diagrama de Jablonski, Figura 15, són els presents en la Taula 6:

**Taula 6:** Mecanismes d'actuació de cada procés fotofísic descrit en el diagrama de Jablonski.

Font: Limones Herrero, D. (2015). Fotoquímica de compuestos heteroaromáticos tricíclicos en medios biomiméticos [Universitat Politècnica de València.]. <https://doi.org/10.4995>

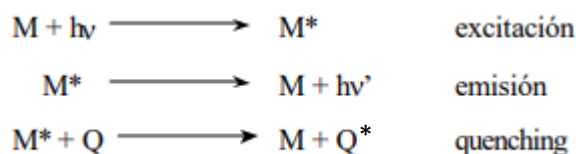
Procés	Mecanisme
<b>Absorció (A)</b>	Permeses: $S_0 + hv \rightarrow S_n$ No permeses: $S_0 + hv \rightarrow T_n$
<b>Fluorescència (F)</b>	$S_1 \rightarrow S_0 + hv$
<b>Fosforescència (P)</b>	$T_1 \rightarrow S_0 + hv$
<b>Conversió Interna (CI)</b>	$S_n \rightarrow S_1 + calor$ o bé, $T_n \rightarrow T_1 + calor$
<b>Creuament intersistemes (CIS)</b>	$S_1 \rightarrow T_1 + calor$ o bé, $T_1 \rightarrow S_0 + calor$

Pel que respecta als processos de *quenching*, aquests ocorren quan es troba una altra molècula capaça de reaccionar amb l'estat excitat, apareix un nou camí de desactivació que competeix amb l'emissió. Aquesta molècula es coneix com a *quencher* o desactivant (Q) (Lorente, 2003).

Destacar el fet que la transferència d'energia d'una molècula excitada a un Q es pot realitzar des de l'estat excitat singlet o triplet. A més, per a que es desenvolupe un procés *quenching* és condició indispensable que l'energia de l'estat excitat de la molècula siga superior a l'energia de l'estat excitat del Q.

Una quantitat de molècules excitades ( $M^*$ ) són capaces d'interaccionar amb un Q i desactivar-se sense emetre radiació. Aquest procés involucra la transferència d'energia d'una molècula excitada a una altra mitjançant una col·lisió, de mode que la intensitat de radiació es reduirà. Al marge d'això, la presència del Q augmenta la velocitat de decaïment de l'emissió. Per tant, les mesures d'intensitat de l'emissió i la dependència en el temps depenen de la velocitat de reacció de  $M^*$  i de Q (Lorente, 2003).

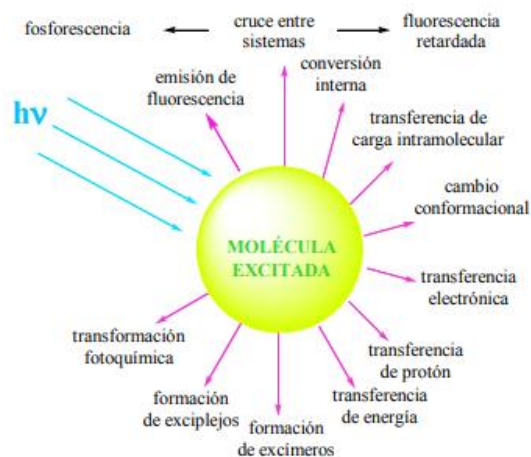
Els possibles processos que es poden desenvolupar en un procés fotoquímic molecular són els següents:



**Procés 1:** Possibles vies de desenvolupament d'un procés fotoquímic

Font: Lorente, C. (2003). Fotofísica y propiedades fotosensibilizadoras de pterinas en solución acuosa [Universidad Nacional de La Plata]. <https://doi.org/10.29327/523696.1-1>

A mode de recopilació, podem trobar l'esquema present en la Figura 16, on es resumeixen els possibles camins i vies a seguir per a desactivar molècules excitades.



**Figura 16:** Possibles vies o camins a seguir per a desactivar una molècula excitada.

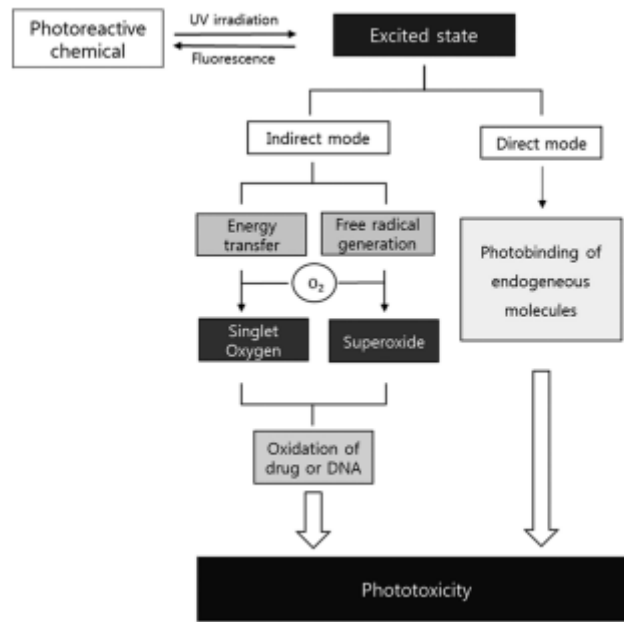
Font: Jiménez Jiménez, M. B. (2010). RECEPTORES FLUOROGÉNICOS COMO SENSORES PARA DICARBOXILATOS [UNIVERSIDAD DE SALAMANCA]. <https://doi.org/10.2307/j.ctvcb5d3q.7>

### 3.5 AGENTS FOTOSENSIBILITZADORS

Es sap que la radiació ultraviolada (UV) indueix diversos tipus d'efectes fotònics nocius, com ara l'estrès oxidatiu, foto(geno)toxicitat, fotocarcinogènesis, fotoal·lèrgia i inflamació en la pell humana i els teixits oculars. Les radiacions UV que arriben a la superfície terrestre són UVA (320-400 nm) i UVB (290-320 nm), les quals són components importants de la llum solar que arriben a la superfície de la terra i desencadenen reaccions de fotosensibilització que condueixen al mal cel·lular (Quereshi et al., 2021).

Els UVB són més nocius que els UVA i poden provocar danys en l'ADN, principalment formació de dímers de pirimidina de ciclobutà (CPD), estrès oxidatiu, immunosupressió i inflamació aguda. La llum visible de la radiació solar genera i provoca danys en l'ADN. En general, els queratinòcits en la pell humana passen regularment per diferenciació, proliferació i apoptosi. La pell sembla estar enriquida amb una sèrie d'antioxidants enzimàtics i moleculars que formen un mecanisme de defensa complex i inhibeixen o atenuen el mal oxidatiu. Les ROS (espècies reactives d'oxigen) provoquen estrès oxidatiu i malson quan el mecanisme de defensa biològic es veu aclaparat i les cèl·lules comprometen la seua capacitat antioxidant. La sobreproducció de ROS causa danys oxidatius de lípids, proteïnes i àcids nucleics. Els queratinòcits reaccionen directament amb la UV i alliberen activadors proinflamatoris, com l'enzim ciclooxigenasa (COX) i diversos tipus de citocines (Kowalska et al., 2021), (Quereshi et al., 2021).

La reacció de fototoxicitat del fàrmac es produeix com a resultat de la descomposició fotoquímica (deguda a l'acció directa de la radiació UV, provocant un dany tòxic directe en la molècula) i de la generació d'espècies transitòries del fàrmac (les quals poden arribar a formar les ROS, qui finalment produirà el dany oxidatiu de la cèl·lula). La fotodegradació dels fàrmacs pot provocar la falta del potencial farmacològic desitjat i, en algunes ocasions, pot conduir a la generació de fotoproductes nocius (Kowalska et al., 2021), (Quereshi et al., 2021).



**Figura 17:** Dos camins per a produir fototoxicitat: El camí directe i l'indirecte. El directe es produeix quan un compost fototòxic inestable reacciona amb molècules endògenes, mentre que l'indirecte es desenvolupa quan les molècules endògenes s'enllacen a fotoproductes de composts fototòxics.

Font: Kim, K., Park, H., & Lim, K. M. (2015). Phototoxicity: Its mechanism and animal alternative test methods. *Toxicological Research*, 31(2), 97–104. <https://doi.org/10.5487/TR.2015.31.2.097>

### 3.5.1 FOTODESCOMPOSICIÓ DE FÀRMACS

En alguns fàrmacs s'han identificat positivament un o més fotoderivats i els fotosensibilitzadors que, encara que no han canviat, fotocatalitzen les degradacions de biomolècules. Les precaucions contra la fotodegradació dels medicaments emmagatzemats són fàcils de prendre, però els canvis induïts per la llum després que el pacient ha pres el medicament poden produir efectes secundaris greus, típicament eritema, edema i formació de vesícules de cremades solars exagerades (Greenhill i McLelland, 1990).

La llum solar penetra en la pell a una profunditat suficient per a aconseguir la sang que circula pels capil·lars superficials. S'han descrit dos tipus de fotosensibilitat com a resultat de substàncies químiques estranyes que circulen en el torrent sanguini, a saber, fototoxicitat i fotoal·lèrgia. En fototoxicitat, l'estat excitat de la molècula del fàrmac pot induir mal cel·lular d'almenys una d'aquestes tres formes: en induir la formació de radicals en una molècula endògena, en convertir l'oxigen de la seua base (triplet) a l'estat singlet altament tòxic, o per transferència d'electrons, pot generar el radical superòxid molt reactiu. La fototoxicitat ocorre només en àrees de pell exposades a la llum i es caracteritza per l'alleujament dels símptomes quan es retira el fàrmac. Pot ser eficaç amb una sola dosi en combinació amb l'exposició al sol (o a la llum ultraviolada). Amb una dosi prou alta, la resposta fototòxica pot obtindre's de tots els individus exposats (Greenhill i McLelland, 1990).

Exemples de fàrmacs que poden generar oxigen singlet ( $^1\text{O}_2$ ) són cloroquina, furosemida, àcid nalidíxico i naproxè. Els generadors de superòxids ( $\text{O}^{2-}$ ) són clorpromazina, mercaptopurina, algunes tetraciclins i psoralens, en convertir l'oxigen de la seua base (triplet) a l'estat singlet altament tòxic, o per transferència d'electrons, pot generar el radical superòxid molt reactiu (Greenhill i McLelland, 1990).

Algunes benzodiazepines que pertanyen al grup dels tranquil·litzants i hipnòtics, com per exemple el clordiazepòxid (A en la Figura 18) i el nitrazepam, han demostrat ser fototòxics. En el cas del clordiazepòxid, no sols el fàrmac presenta fototoxicitat, sinó que els seus dos metabòlits el DES-CDZ i el DEM (E en la Figura 18). El primer d'aquests, està format per N-desmetilació del fàrmac i aquesta es seguida d'una desaminació oxidativa per a donar lloc a la formació del DEM. Conseqüentment, ambdós metabòlits retenen el grup N-òxid, el qual és el causant de la fototoxicitat (Greenhill i McLelland, 1990).

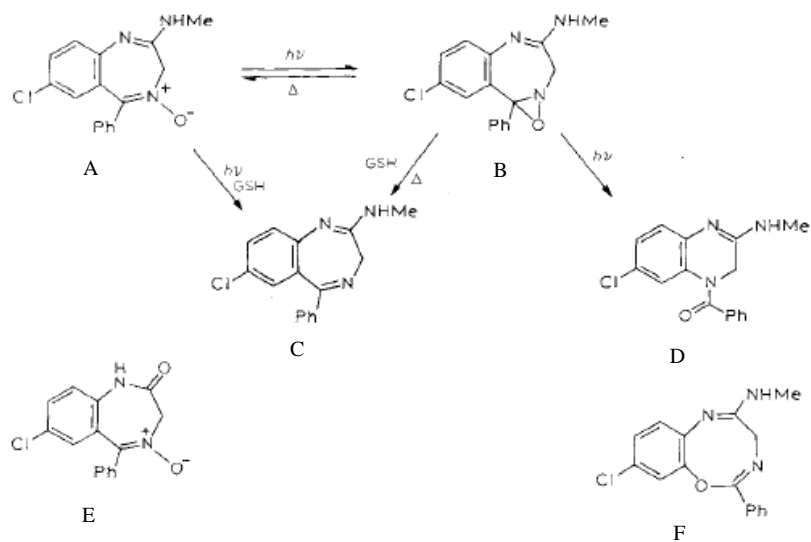
Alguns estudis demostren que a l'irradiar els tres composts, el fàrmac i els dos metabòlits, en isopropanol a 350 nm durant uns minuts, tots els composts formen oxazirines. Si els estudis es realitzen en metanol o metanol-aigua, i s'irradien els tres composts a 254, 300 i 350 nm durant aproximadament 50 minuts s'observa que la variació de la longitud d'ona d'irradiació no altera els productes derivats de la irradiació però sí les proporcions de la mescla de reacció. De mode que inicialment es forma oxaziridina (B en la Figura 18), però aquesta es converteix en quinoxalina (D en la Figura 18) i en benzoxadiazozina (F en la Figura 18). Destaca el fet que a l'irradiar a 350 nm el 80% del CDZ es converteix en oxaziridina amb tan sols traces dels productes de fotòlisi secundaris (Greenhill i McLelland, 1990).

En efecte, es deu al fet que la oxaziridina té una absorció d'UV insignificant a aquesta longitud d'ona. Si s'afegeix glutatió (GSH) al medi de reacció, la velocitat de descomposició augmenta i sols s'obtenen els productes alternatius, és a dir, la benzodiazepina reduïda (C en la Figura 18) i un conjugat (Greenhill i McLelland, 1990).

La taxa més gran de reacció indica la participació de dos estats excitats. Per una banda, es troba l'estat excitat que produeix oxaziridina, la qual pot reaccionar tèrmicament amb el GSH posteriorment. Per l'altra banda, es troba l'estat excitat que reacciona directament amb el GSH. L'obtenció fotosintètica dels dos fotoproductes derivats de la oxaziridina s'ha escalat i patentat a partir de la irradiació de banda ampla del CDZ (Greenhill i McLelland, 1990).

Dels estudis s'extrau que el desoxiclordiazepòxid (393 en la Figura 18) no presenta cap de les propietats fototòxiques del CDZ inicial. En canvi, el CDZ, el DES-CDZ, el DEM i el diazepam-4-òxid resulten ser tots fototòxics per a una preparació de cèl·lules bacterianes. A més a més, existeix una relació entre la fototoxicitat dels N-òxids i la toxicitat en l'obscuritat de les seves oxaziridines. Les formes reduïdes dels quatre composts no s'ha demostrat que siguin fototòxiques (Greenhill i McLelland, 1990).

Els estudis cinètics demostren que la oxaziridina s'uneix covalentment a la proteïna plasmàtica. La vida mitjana d'aquesta en presència d'elevades concentracions de proteïna és aproximadament de 30 minuts. Pel que, té temps no sols d'unir-se a les biomolècules de la superfície de la pell, sinó també per a atacar els òrgans interns. En conjunt, aquesta és l'explicació del mal renal i hepàtic observat en organismes en els quals prèviament s'ha subministrat una dosi de CDZ (Greenhill i McLelland, 1990).



**Figura 18:** Fotodescomposició farmacològica del CDZ.

Font: Greenhill, J. V., & McLelland, M. A. (1990). Photodecomposition of Drugs. *Progress in Medicinal Chemistry*, 27(C), 51–121. [https://doi.org/10.1016/S0079-6468\(08\)70289-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6468(08)70289-3)

## 4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

### 4.1 INSTRUMENTACIÓ

A continuació, s'enumeren els dissolvents, els reactius, els materials i els equips utilitzats per a sintetitzar el clordiazepòxid i caracteritzar fotofísica i fotoquímicament aquest i el seu metabòlit demoxepam.

#### 4.1.1 REACTIUS I DISSOLVENTS

- Acetat d'etil grau HPLC, Scharlau 2.5 L.
- Acetonitril deuterat, Sigma Aldrich 10 mL.
- Acetonitril grau analític (ACS), Scharlau, 250 mL.
- Àcid acètic glacial grau anhidrid (ACS), Scharlau 100 mL.
- Aigua Milli-Q (Milipore Elix).
- Albúmina sèrica humana, Sigma Aldrich 10 g.
- Cloroform-d, deuterat, Sigma Aldrich 10 mL.
- Cloroform grau analític (ACS), Scharlau 2.5 L.
- Clorpromazina, CPZ, Sigma Aldrich, 10 mg.
- Demoxepam-Acetonitrilo, Fisher 1 mg/mL.
- Diclorometà grau analític (ACS), Scharlau 2.5 L.
- Diclorometà grau HPLC, Scharlau 2.5 L.
- Dimetilsulfòxid grau analític, Scharlau 1L.
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) amb roig fenol, Gibco 500 mL.
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) sense roig fenol, Gibco 500 mL.
- Etanol grau analític (ACS), Scharlau 1L.
- Hidroclorur de guanidina, Sigma Aldrich 500 g.
- Hurberplex, Librium, 10 mg.
- Solució de tripsina-EDTA 0'25%-0'02%, Gibco, 100 mL
- Sulfat de dodecil, SDS, Fisher científics 100 g
- Sulfat de magnesi anhidrid extrapur, Scharlau 1 Kg.
- Tampó de fosfat salí (PBS), Sigma Aldrich 100 Tabletes.
- Tint de roig neutre, Sigma-Aldrich 100 mL.

#### 4.1.2 MATERIALS

- Adaptador C2 tubs 50 mL Falcon.
- Adaptador d'expansió-reducció esm. H-24/29 M-19/26.
- Adaptador amb oliva en 90° 29/32.
- Agulla estèril BD Microbalança TM.
- Bany d'aigua termostàtica d'acer inoxidable Clifton.
- Banyera de plàstic estèril per a laboratori.
- Bata de laboratori.
- Càmera Neubauer.
- Cristal·litzador de Pyrex.
- Cubeta de quars de 4 mL.
- Embut de decantació de 250 mL.
- Embut de filtració.
- Extractor Soxhlet de 50 mL.
- Eppendorf 1.5 mL.
- Filtres Sephadex G-25.
- Flascó ISO transparent de vidre de 500 mL.
- Flascó cultiu cel·lular de 50 mL.
- Graella per a tubs eppendorf, cubetes i tubs RMN.
- Guants d'un sol ús.
- Joc de morter i mà d'àngata.
- Matràs aforat de fons redó de 50 i 125 mL.
- Matràs Erlenmeyer de coll estret de 250 mL.
- Matràs esfèric fons redó de tres colls.
- Microespàtula cullera plana.
- Multiplaca per a cultiu cel·lular. SARSTEDT. "N° orificis: 96". Àrea de cultiu (cm<sup>2</sup>): 0,29. Vol. de mig recomanat (ml): 0,2. Fons: Pla. Superfície: Hidrofílica.
- Paper d'alumini.
- Paper de filtre.
- Parafilm.
- Pinces d'acer inoxidable.



- Pinces de subjecció.
- Pipeta automàtica de 10, 25, 200, 1000 i 5000 µL.
- Pipeta electrònica o multicanal (8 canals) de 250 mL.
- Pipeta graduada de vidre de 10 mL.
- Pipeta Pasteur.
- Pipetejador automàtic professional amb bateria híbrida de metall-niquel.
- Proveta graduada de 10, 50, 100 i 250 mL.
- Puntetes de pipetes de 10, 25, 200, 1000 i 5000 µL.
- Safata de poliestirè de 0'8 L.
- Suport de cautxú.
- Vas de precipitats de 100, 250 i 500 mL.
- Vials de vidre transparent per a emmagatzemar mostres de 6, 13'5 i 22'5 mL.
- Taps de rosca.
- Taps de goma tipus septum.
- Taps septum d'injecció.
- Tetina de goma làtex per a succionar.
- Ulleres de seguretat.
- Tubs d'assaig de Pyrex de 25 mL.
- Tubs Falcon de 50 mL.
- Tubs de RMN.
- Xeringa de plàstic estèril sense agulla de 2 i 5 mL.

#### 4.1.3 EQUIPS

- Balança analítica.
- Bany d'ultrasons.
- Centrífuga: Hettinch Mikro 22R, amb capacitat per a 6 tubs Falcon de 50 mL.
- Congelador.
- Cronòmetre.
- Equip de cromatografia líquida d'elevada resolució (HPLC): Desgasificador Jasco DG-2080-54, mesclador quaternari de gradient unitari Jasco LG-2080-04, bomba intel·ligent HPLC plus PU-2080 i detector UV/Vis Jasco UV-1575.

- Espectrofluorímetre: JASCO FP-8500 equipat d'un SCE-846 i una làmpada de Xenó de 150 W, aquest està previst d'un monocromador en la longitud d'ona variable entre 200 i 900 nm.
- Espectrofotòmetre: UV-vis JASCO V-650 amb una amplitud de longitud d'ona variable entre 200 i 900 nm.
- Espectrofotòmetre de microplaques Halo LED 96.
- Espectròmetre de ressonància magnètica nuclear (RMN): espectròmetre Bruker Avance III (400 Hz) i Magnet System 400 Ascend/R.
- Fotoreactor: Fotoreactor Luzchem LZG-ORG1 previst de 10 làmpades col·locades 5 en un lateral de l'equip, i 5 en l'altre. Cada làmpada té una potència de 8 W, les longituds d'emissió d'ona màximes de cadascuna són de 254, 300 i 350 nm. Tanmateix, aquest equip compta amb un sistema de ventilació per tal de refrigerar les mostres i d'un agitador magnètic per a afavorir l'homogeneïtzació d'aquestes.
- Frigorífic.
- Incubadora de ganivet cel·lular.
- Microscopi monocular.
- Placa d'agitació magnètica.
- Rotavapor.
- Sistema de purificació d'aigua Milli-Q.

## 4.2 PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

A continuació es descriurà la obtenció del clordiazepòxid, la preparació de mostres, els experiments de fotodegradació en diferents dissolvents, els assajos de fototoxicitat en medi cel·lular i les irradiacions en presència d'albumina sèrica humana del fàrmac i, en algunes ocasions, del seu metabòlit demoxepam.

### 4.2.1 OBTENCIÓ DEL CLORDIAZEPÒXID

Segons la bibliografia, el CDZ s'obté a partir de la síntesi pionera aconseguida per L.H. Sternbach i E. Reader en 1957 (Svobodová et al., 2019) a partir del 2-amino-5-clorobenzofenona.

En aquest treball es presenta l'extracció del CDZ a partir del medicament comercial Hurberplex, el qual es distribueix en 20 càpsules que contenen 10 mg de clordiazepòxid hidrocloreur cadascuna. A més, cada píndola conté 38,7 mg de lactosa, 45,7 mg de sacarosa, 5 mg de midó de blat i 1,5 mg de groc ataronjat S (E-110) (AEMPS, 2021).

En primer lloc, s'agafen tres píndoles i es netegen amb aigua Milli-Q, per tal d'eliminar la fina capa de color groc ataronjat que la protegeix de la llum i, una vegada netes i seques, es piquen en un morter.

L'extracció consta de dos parts: una extracció sòlid-líquid (extracció Soxhlet), seguida d'una extracció líquid-líquid (L-L). Per començar, s'introdueix la pols obtinguda en un paper de filtre i es tanca a mode de sac per evitar que la pols s'escapi. Així doncs, es procedeix a realitzar la extracció S-L.

Per a l'extracció Soxhlet s'introdueixen 50 mL de diclorometà ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) en un matràs de fons redó. Aquest es connecta a un tub d'extracció tipus Soxhlet en l'interior del qual es disposarà el paper de filtre amb la pols del fàrmac. Després de 12 hores d'extracció a la temperatura d'ebullició del  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (40 °C), es deixa refredar la mescla extreta a temperatura ambient.

Després, es passa la mescla pel rotavapor per a eliminar completament el dissolvent. A continuació, s'afegeixen 30 mL de diclorometà i es realitza un llavat amb 30 mL d'aigua Milli-Q. La fracció orgànica es recupera, addicionant sulfat de magnesi anhidre per tal d'eliminar l'excés d'aigua, es filtra i rotaevapora, recollint un sòlid blanquinós com a producte final.

### 4.2.2 PREPARACIÓ DE MOSTRES

Una vegada comprovat que el compost extret era el CDZ per comparació de les dades espectroscòpiques amb les de la bibliografia (Cornelissen i Beijersbergen Van Hrnegouwen, 1979), (Haran i Touchagues, 1980) es procedeix a realitzar una dissolució mare de  $10^{-3}$  M utilitzant com a dissolvent cloroform. A partir d'aquesta dissolució mare s'obtidran alíquotes a partir de la següent equació de dilució:

$$C_0 \cdot V_0 = C_F \cdot V_F \quad (\text{Eq 1})$$

On  $C_0$  és la concentració de la dissolució de referència ( $10^{-3}$  M),  $V_0$  és el volum que volem extreure d'aquesta per a realitzar l'alíquota,  $C_F$  és la concentració de l'alíquota i  $V_F$  el volum final de

la dissolució que es vol realitzar. En tots els assajos s'ha fixat  $V_F$  a 3 mL, que és el volum de dissolució que cap en una cubeta de quars. Per una altra banda, es preparen seguint el mateix procediment que en el cas del cloroform dissolucions mare del CDZ utilitzant acetonitril i PBS com a dissolvent.

El demoxepam ve en ampolles d'1mg/mL dissolt en acetonitril, pel que s'agafarà aquesta concentració com a concentració de referència i es faran alíquotes a partir del contingut de les ampolles. En aquesta ocasió la dissolució de referència serà  $3 \cdot 5 \cdot 10^{-3}$  M.

Més endavant, es prepararan alíquotes de 20  $\mu$ M, tant del CDZ com del DEM, en 3 mL de PBS (tampó fosfat salí a pH = 7'5) per a registrar els espectres d'absorció i emissió de fluorescència, ja que es tracta d'una dissolució aquosa salina similar a l'entorn cel·lular.

## 4.2.3 ESTUDI DE LA FOTODEGRADACIÓ EN DIFERENTS DISSOLVENTS

### 4.2.3.1 ESPECTRES D'ABSORCIÓ I D'EMISSIÓ

En primer lloc, es realitzen els espectres d'absorció per tal de determinar la zona en la qual el compost és fotoactiu i seleccionar les longituds d'ona d'irradiació adequades. A continuació, es registren els espectres d'emissió de fluorescència a les longituds d'ona establertes, per tal d'observar si la fluorescència és una propietat que ens permeti seguir l'evolució dels substrats quan s'irradien.

### 4.2.3.2 SEGUIMENT DE LES IRRADIACIONS

Tot seguit, s'irradiarà en diferents dissolvents, tant el CDZ com el DEM, amb la finalitat d'estudiar la seva fotoestabilitat/fotodegradació sota diferents condicions.

Per tal d'estudiar la fotoestabilitat del CDZ es realitzaren irradiacions en diferents condicions.

Per una banda, es van irradiar en un fotoreactor utilitzant 10 làmpades que emeten una longitud d'ona centrada en 350 nm dissolucions 20  $\mu$ M de fàrmac en cloroform, acetonitril i PBS seguint el curs de la reacció per espectroscòpia d'absorció i d'emissió de fluorescència.

Per una altra banda, es van irradiar dissolucions de concentració 20  $\mu$ M en PBS monocromàticament a una longitud d'ona de 350 nm en temps d'irradiació final de 5 h i, també, es va seguir el curs de la reacció per espectroscòpia d'absorció i d'emissió de fluorescència.

Finalment, es va irradiar el CDZ en el fotoreactor equipat de 10 làmpades que emeten una longitud d'ona centrada en 350 nm una dissolució de concentració 1 mg/mL de CDZ en  $CDCl_3$ , ja que a aquesta concentració es possible seguir la irradiació per RMN.

En el cas del DEM, s'irradià en el fotoreactor equipat de 10 làmpades que emeten una longitud d'ona centrada en 350 nm d'una dissolució 20  $\mu$ M en PBS del metabòlit. El curs de la reacció es seguí per espectroscòpia d'absorció i d'emissió de fluorescència.

### 4.2.3.3 ASSAJOS DE FOTOTOXICITAT CEL·LULAR

La fototoxicitat del CDZ es va avaluar realitzant l'assaig de viabilitat cel·lular NRU (*Neutral Red Uptake* o Captació de Roig Neutre en la Unitat mixta d'investigació IIS UPV-La Fe. L'assaig es va dur a terme seguint el procediment descrit per la guia OECD 432 (OECD, 2019) amb la diferència

d'utilitzar cèl·lules HaCaT (queratinòcits humans) en compte de 3T3 perquè les HaCaT són cèl·lules de la pell humana, tot i que s'ha observat que els resultats obtinguts són idèntics utilitzant ambdós tipus de cèl·lules (Svobodová et al., 2019). Com a control positiu i negatiu s'ha utilitzat la SDS i el CPZ respectivament. Recalcar, que tots els processos es realitzaran en una vitrina de bioseguretat per a assegurar condicions d'esterilitat.

El primer pas correspon amb la sembrada de cèl·lules en plaques de 96 orificis transparents, en les quals se sembren  $2 \cdot 10^4$  cèl·lules/orifici en quatre plaques, de les quals dues s'exposaran a radiacions UVA i les altres dues es mantindran en condicions d'obscuritat. En els extrems s'introduirà PBS perquè les condicions de temperatura i humitat d'aquests són diferents de la dels interns i es pot desenvolupar un creixement cel·lular desigual en aquests. Les quatre plaques s'homogeneitzaran perfectament i s'incubaran durant 24 h a 37 °C, 100% d'humitat relativa i 5% CO<sub>2</sub>.

Passades les 24 hores d'incubació, es reemplaça el medi de les plaques per medi fresc sense roig fenol i, tot d'una, es tracten les plaques addicionant les concentracions de CPZ, SDS i CDZ en els rangs de concentració indicats en les Taules 26 i 27 de l'annex B2. Per tal d'elaborar una corba dosi-resposta adequada, s'ha d'incloure almenys una concentració que provoqui mort cel·lular total en condicions d'obscuritat i una altra que assegure viabilitat cel·lular al voltant del 100% en condicions UVA. Destacar que les concentracions del control es fan utilitzant PBS com a dissolvent i les del CDZ utilitzen DMSO com a dissolvent. Per consegüent, cal afegir la mateixa concentració de DMSO que la incorporada en la resta de la placa que conté el fàrmac en els orificis que contenen el control negatiu per tal de considerar el possible efecte citotòxic d'aquest.

A continuació, es procedeix a incubar durant 1 h en les mateixes condicions que el dia anterior i s'irradia en el fotoreactor les plaques UVA, amb una dosi de 5 J/cm<sup>2</sup> sobre una safata amb gel per evitar recalfament, mentre que les de l'obscuritat es mantenen en l'incubador. Finalment, s'introdueix un nou medi de cultiu a les quatre plaques i es deixen incubar 24 h més.

Passades les 24 hores, es procedeix a realitzar l'assaig de captació de roig neutre. Per a això, es procedeix a afegir 20 µL d'una dissolució que conté roig neutre (0.33 g/L) a cada orifici de la placa. Tot seguit, es deixen incubar durant 2 h més les plaques en l'incubador.

Després, es trauen les plaques de l'incubador, es retira el medi de cada orifici de la placa i es realitza un llavat amb PBS. A continuació, s'afegeixen 100 µL d'una dissolució de decolorant preparada aviat que conté 50% (V/V) d'aigua Milli-Q, 49'5 % (V/V) d'etanol absolut i 0'5% (V/V) d'àcid acètic. Finalment, es duen les plaques a mesurar l'absorbància a 550 nm mitjançant l'espectrofotòmetre de plaques "Synergy H1 multi-mode".

A partir de les dades d'absorbància obtingudes, s'obtenen els percentatges de viabilitat cel·lular, tant en condicions d'obscuritat com després de la irradiació UVA en presència de fàrmac i dels controls. A partir dels percentatges, s'elaboren les corbes dosi-resposta per al CDZ, CPZ i SDS. Una vegada establides les corbes, es procedeix a calcular els valors de IC<sub>50</sub> (concentració de fàrmac que redueix a la meitat el creixement cel·lular). Finalment, s'obtingué el Factor de Fotoirritació (PIF) mitjançant l'equació següent:

$$PIF = \frac{IC_{50} \text{obscuritat}}{IC_{50} \text{UVA}} \quad (\text{Eq 2})$$

D'acord amb la guia OECD 432 (OECD, 2019), un compost serà considerat fototòxic quan el valor del PIF siga superior a 5, probablement fototòxic si el PIF oscil·la entre 2 i 5, i no fototòxic si és inferior a 2.

#### 4.2.3.3.1 Dades estadístiques

Les dades obtingudes de l'assaig NRU es representen com la mitja  $\pm$  la desviació estàndard extreta dels resultats obtinguts de tres experiments diferents. S'analitzaran les dades i es desenvoluparà un mètode de regressió mitjançant el *software* GraphPad Prism. La significació estadística s'obté a partir de la prova t-Student considerant valors de p inferiors a 0'05 com a significatius (\*\*\*) $p < 0'001$ ).

#### 4.2.3.4 ASSAJOS EN PRESENÇA D'ASH

Per tal d'analitzar si el clordiazepòxid i el seu metabòlit demoxepam poden produir fotoal·lèrgia, es procedeix a estudiar si existeix fotounió covalent fotoquímica entre els composts i l'albumina sèrica humana, la qual s'utilitza com a proteïna model.

En primer lloc, es prepararan diferents mostres que continguin la mateixa concentració de CDZ o de DEM i concentracions creixents d'ASH per tal de veure si hi ha alguna interacció supramolecular entre el substrat i la proteïna. Aleshores, es prepararan un total de catorze mostres amb les composicions indicades en les Taules 23, 24 i 25 de l'annex B1 tenint en compte que el volum restant fins a completar un total de 3 mL de dissolució correspon a volum de PBS.

Posteriorment, es prepararan tres dissolucions que continguin les composicions de CDZ, DEM i ASH descrites en la Taula 28 de l'annex B3 tenint en compte que el volum restant fins a assolir 6 mL correspon a volum de PBS.

Una vegada preparades les tres dissolucions, es registraran els espectres d'absorció i fluorescència a una longitud d'ona d'excitació de 305 nm de totes les dissolucions preparades i es dividí cada mostra en dues de 3 mL. D'aquestes sis mostres resultants, es reservà una de cada composició en obscuritat mentre que l'altra s'irradià en un fotoreactor equipat amb deu làmpades que emeten a una longitud d'ona de 350 nm durant 30 minuts. Paral·lelament a la irradiació, es va realitzar un calibrat inicial de les sis columnes de Sephadex<sup>®</sup> G-25 afegint un total de 25 mL de PBS en cadascuna.

Tot seguit, es registraran novament els espectres d'absorció i d'emissió de fluorescència de les sis mostres i s'afegiren 1'72 grams d'hidroclorur de guanidina (GndCl) 6 M a cadascuna amb la finalitat de desnaturalitzar la proteïna.

Després, es procedeix a realitzar una cromatografia d'exclusió per grandària fent servir una columna de Sephadex<sup>®</sup> G-25 amb la finalitat d'observar si existeix fotounió del clordiazepòxid o el seu metabòlit demoxepam amb l'albumina sèrica humana.

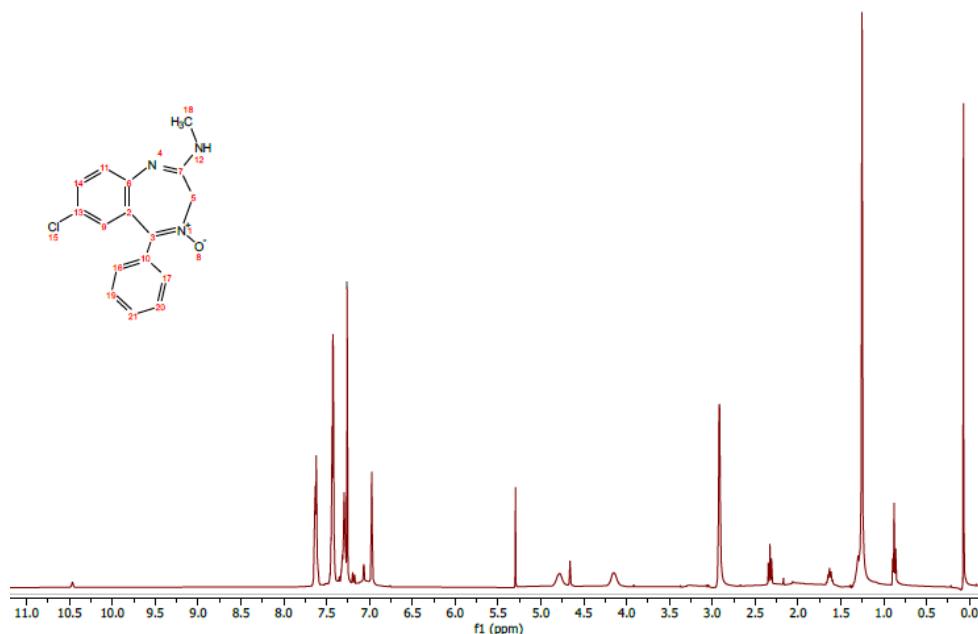
Finalment, s'enrasaren 2'5 mL de les dissolucions que contenen la GndCl dissolta en cada columna i, una vegada enrasats, s'introdüïren 3'5 mL de PBS en cada columna per tal de recollir aquesta última dilució com a mostra final i es van registren els espectres d'absorció i d'emissió de fluorescència d'aquestes. S'aplicà el factor de dilució necessari per tal de poder comparar els espectres abans i després de filtrar.

## 5. RESULTATS I DISCUSSIÓ

En aquest apartat s'exposaran els resultats obtinguts dels assajos realitzats segons els procediments experimentals descrits en l'apartat 4.2.

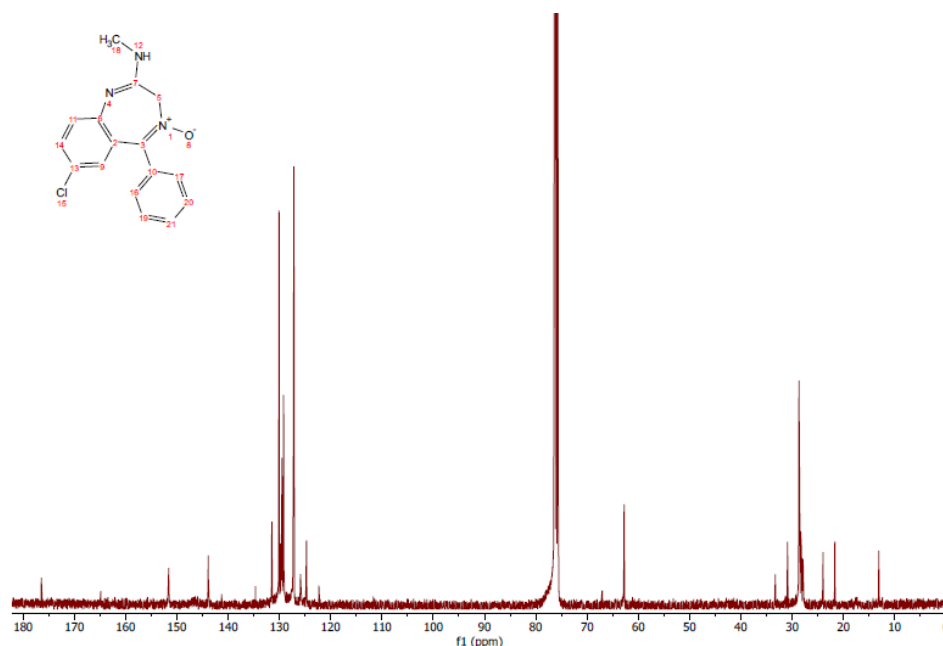
### 5.1 CARACTERITZACIÓ ESTRUCTURAL DEL CLORDIAZEPÒXID

Per començar, s'exposaran els espectres de  $^1\text{H}$ -RMN i  $^{13}\text{C}$ -RMN del producte extret del Huberplex, registrats en l'espectròmetre de ressonància magnètica nuclear, amb la finalitat de comparar-los amb les dades espectroscòpiques del clordiazepòxid de la literatura. Els resultats obtinguts s'han tractat amb el *software* MestReNova-14.2, obtenint les dades de desplaçament químic, multiplicitat, integració i constant d'acoblament.



**Figura 19:** Espectre  $^1\text{H}$  del clordiazepòxid.

En l'espectre de la Figura 19 s'observen els següents senyals per a  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7'63 (dd,  $J = 6'5, 3'1$  Hz, 2H), 7'43 (dd,  $J = 5'1, 1'7$  Hz, 4H), 7'02 (m, 2H), 4.78 (s, 1H), 4.15 (s, 1H), 2.95 – 2.88 (m, 3H).



**Figura 20:** Espectre  $^{13}\text{C}$  del clordiazepòxid.

En l'espectre de la Figura 20 s'observen els següents senyals per a  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  151'61, 143'87, 134'67, 131'67, 131'48, 129'76, 129'73, 129'21, 129'18, 127'25, 127'18, 125'89, 124'45, 62'77, 27'89.

Es pot deduir que mitjançant el procés d'extracció descrit en la metodologia per a la síntesi del CDZ (9-cloro-5-hidroxi-N-metil-6-fenil-2,5-diazabicyclo[5.4.0]undeca-1,6,8,10-tetraen-3-imina segons la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)) s'ha obtingut dit compost amb certes impureses que es poden observar en el rang de 0-3 ppm en la Figura 19.

Destacar, en la Figura 19 el CDZ té huit protons aromàtics en el rang de 7'7 a 6'9 ppm igual que es menciona en la bibliografia (Cornelissen i Beijersbergen Van Henegouwen, 1979), (Haran i Tuchagues, 1980). Els protons que s'observen en 4'78 i 4'25 ppm corresponen al grup  $\text{CH}_2$  representant pel C5 en la molècula del CDZ. S'observa que en utilitzar  $\text{CDCl}_3$  com a dissolvent es desdoblen els dos protons en dos senyals, no obstant això, en l'annex A, utilitzant  $\text{CD}_3\text{CN}$  com a dissolvent, destaca que aquests dos protons s'observen com a un únic senyal.

Aquest fet es demostra en la bibliografia (Cornelissen i Beijersbergen Van Henegouwen, 1979), on s'indica que en funció del dissolvent es pot observar un parell de doblets o un únic senyal. Finalment, els tres protons corresponents al rang 2'95-2'88 ppm corresponen als protons del grup  $\text{CH}_3$  corresponents al C18 de la molècula de la figura corresponent al CDZ descrita en l'espectre de RMN.

Pel que respecta a l'espectre de  $^{13}\text{C}$  de la Figura 20, els senyals descrites corresponen a les posicions C7, C3, C6, C10, C21, C17, C16, C9, C20 C19, C13, C2, C5 i C18 de la molècula corresponent al CDZ descrita en la figura de l'espectre respectivament. Aquesta assignació és correspon amb la descrita en la bibliografia Haran i Tuchagues, 1980).

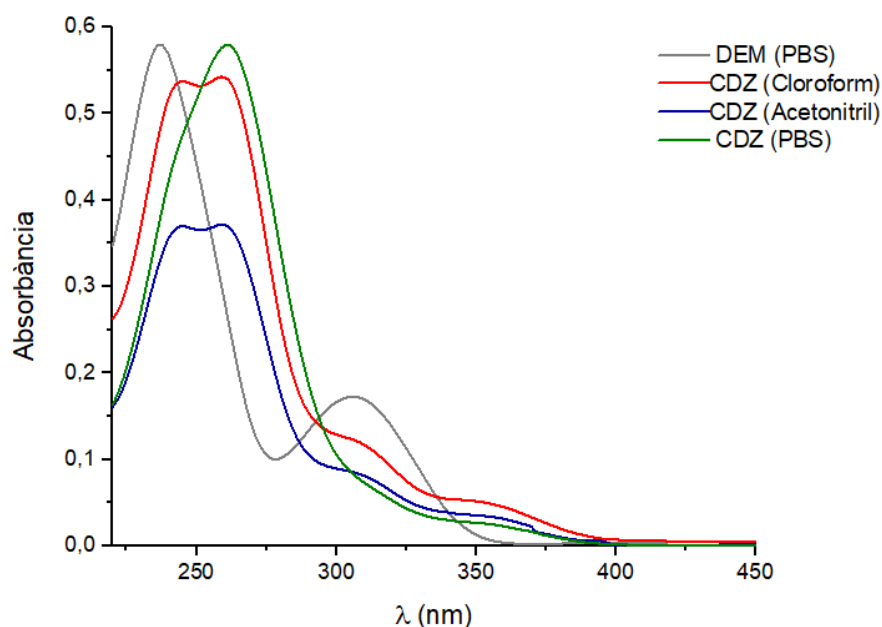


## 5.2 ESTUDI DE LA FOTODEGRADACIÓ EN DIFERENTS DISSOLVENTS

En aquest apartat es presentaran els resultats obtinguts seguint el procediment experimental descrit en l'apartat 4.2.3. Les dades recollides de l'espectrofotòmetre d'absorció i de l'espectrofluorímetre s'han tractat amb el *software* OriginPro 2021 versió 9.8, els espectres de RMN s'han analitzat amb el *software* MestReNova-14.2 i la viabilitat cel·lular s'analitzarà amb el *software* GraphPad Prism.

### 5.2.1 ESPECTRES D'ABSORCIÓ I D'EMISSIÓ

El primer pas per a estudiar la fotodegradació del clordiazepòxid i del seu metabòlit demoxepam es realitzar els espectres d'absorció d'ambdós compostos per tal d'esbrinar on irradiar-los. Aquests es poden observar a continuació (Figura 21).



**Figura 21:** Espectre d'absorció del CDZ i DEM 20 µM en diferents dissolvents.

De la Figura 21 s'obté que el CDZ en cloroform i acetonitril presenta màxims d'absorbància en 240 nm, 260 nm, 310 nm i 360 nm, en PBS presenta un màxim en 260 nm i 360 nm, per contra, el DEM presenta màxims d'absorbància a 240 nm i 310 nm. Així doncs, el fàrmac absorbeix a longituds d'ona majors que el seu metabòlit, en la zona d'UVA, pel què és capaç d'absorbir més eficientment la radiació solar.

A la vista dels espectres d'absorció obtinguts, es realitzarà l'anàlisi d'emissió de fluorescència excitant a 260 nm, 295 nm o a 305 nm ambdós compostos segons es crega convenient.

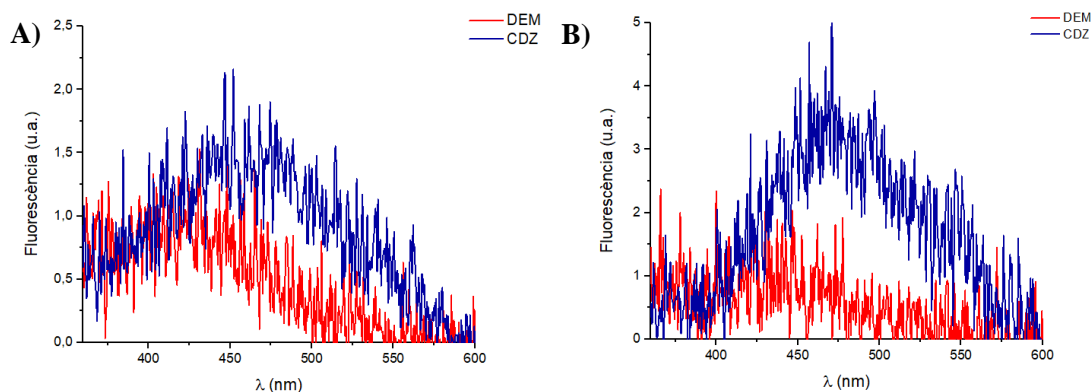
Es pot obtenir el coeficient d'absorció molar del CDZ i del DEM a partir de la llei de Lambert-Beer, la qual és una expressió que relaciona l'absorbància de la mostra amb la seva concentració mitjançant l'expressió:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (\text{Eq 3})$$

On  $I_0$  e  $I$  són les intensitats del feix de llum monocromàtic abans i després de passar per la mostra, respectivament;  $l$  és la distància recorreguda per la llum en el medi absorbent (cm);  $c$  és la concentració de la substància en el medi (mol/L) i  $\varepsilon$  és el coeficient d'absorció molar, el qual depèn de la naturalesa de la substància absorbent, de la longitud d'ona del feix de llum i de la temperatura. La relació lineal entre absorbància i concentració sols es compleix per a valor d'absorbància baixos (Brunatti i Martín, 2015), (De la Torre, 2002).

Calculem el coeficient d'absorció molar de cada compost tenint en compte el valor de 'l'absorbància a la màxima longitud d'ona per a ambdós compostos observada en la Figura 21 (0'58 per al DEM i 0'54 per al CDZ cloroform, 0'35 per al CDZ acetonitril i 0'58 per al CDZ en PBS), assumint  $l = 1$  cm i aplicant l'Eq 2. Aleshores, s'obté que  $\varepsilon_{\text{CDZ\_cloroform}} = 27000 \text{ (M}\cdot\text{cm)}^{-1}$  a 260 nm,  $\varepsilon_{\text{CDZ\_acetonitril}} = 17500 \text{ (M}\cdot\text{cm)}^{-1}$  a 260 nm,  $\varepsilon_{\text{CDZ\_PBS}} = 29000 \text{ (M}\cdot\text{cm)}^{-1}$  a 260 nm i  $\varepsilon_{\text{DEM}} = 29000 \text{ (M}\cdot\text{cm)}^{-1}$  a 245 nm.

A partir dels espectres d'absorció de la Figura 21, es procedeix a analitzar si els compostos foren fluorescents i, en cas de ser-ho, poder prosseguir les posteriors reaccions per fluorescència. Els espectres de fluorescència d'ambdós compostos es realitzaran en PBS excitant a 260 nm, ja que es la zona de màxima emissió i, per consegüent, s'aconseguirà major irradiació i excitant a 305 nm, per ser la segon zona de màxima emissió i, a més a més, cobrir el comportament en la zona de les radiacions UVA. Aquests espectres es poden observar a continuació (Figura 22):



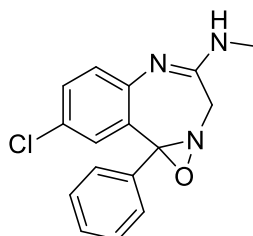
**Figura 22:** A) Espectre d'emissió de fluorescència del CDZ i DEM a l'excitar a 260 nm, B) Espectre d'emissió de fluorescència del CDZ i DEM a l'excitar a 305 nm. Totes dues dissolucions s'han preparat amb una concentració de 20  $\mu\text{M}$  en PBS.

De les gràfiques 22A i 22B, s'extreu que cap compost emet una fluorescència significativa, sent la d'ambdós fàrmacs menyspreable.

## 5.2.2 IRRADIACIONS DELS COMPOSTOS EN DIFERENTS DISSOLVENTS

En primer lloc, s'irradià una dissolució de clordiazepòxid 20  $\mu\text{M}$  en cloroform en un fotoreactor amb les característiques descrites adés en l'apartat 4.2.

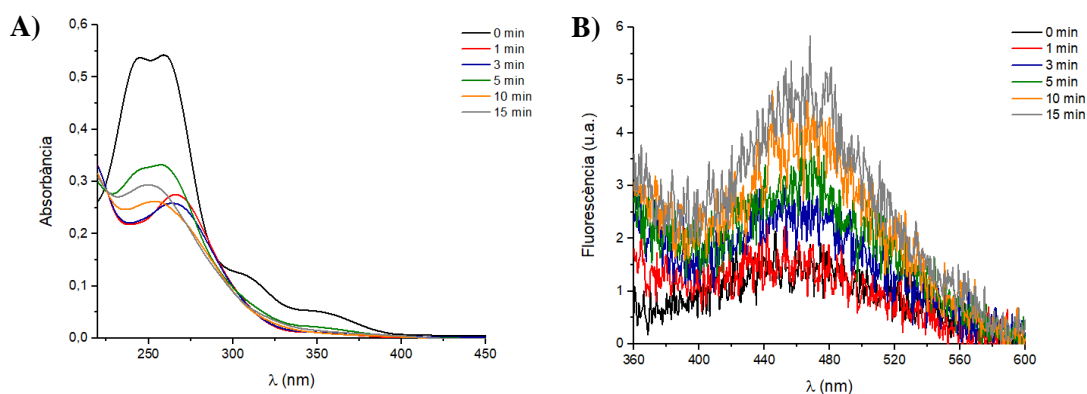
S'establí un màxim d'irradiació de 30 minuts perquè segons la bibliografia a partir dels 20 minuts d'irradiació el CDZ dona lloc a una oxaziridina (Cornelissen i Beijersbergen Van Henegouwen, (1979) l'estructura de la qual es pot observar en la Figura 23:



**Figura 23:** Estructura química de la oxaziridina.

Font: Elaboració pròpia a partir de (Greenhill, J. V., & McLelland, M. A. (1990). *Photodecomposition of Drugs. Progress in Medicinal Chemistry*, 27(C), 51–121. [https://doi.org/10.1016/S0079-6468\(08\)70289-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6468(08)70289-3)).

Durant el transcurs de la irradiació del CDZ en cloroform, es registraren els espectres d'absorció i d'emissió de fluorescència en diferents instants de temps. Els espectres d'emissió de fluorescència es van registrar a 295 nm perquè per poder esbrinar la posterior viabilitat cel·lular seria necessari excitar en un rang de longitud d'ona que inclogués les radiacions UVA.

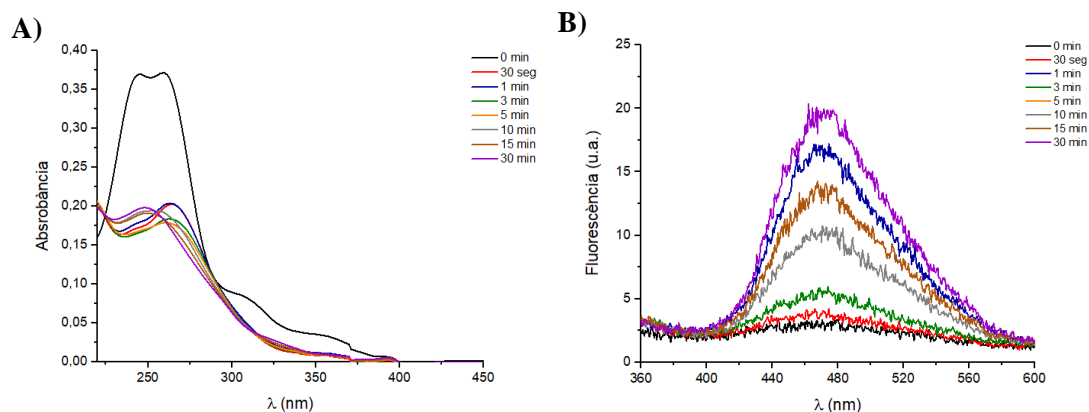


**Figura 24:** A) Espectre d'absorció en irradiar una dissolució 20 μM de CDZ en cloroform. B) Espectre d'emissió de fluorescència en irradiar una dissolució 20 μM de CDZ en cloroform excitant a 295 nm.

En la Figura 24A s'observa que la forma i la posició dels màxims de l'espectre varien amb el temps, desapareguent les bandes que es troben a longituds d'ona majors (entre 300 i 400 nm). El major canvi s'observa en el primer minut d'irradiació. Es pot observar que el fàrmac no es fotoestable i, per tant, està sofrint una fotodegradació.

La Figura 24B correspon al registre d'emissió de fluorescència on la intensitat d'emissió excitant a 295 nm és menyspreable. No obstant això, a mesura que avança el temps d'irradiació s'observa un molt lleuger augment de la intensitat d'emissió.

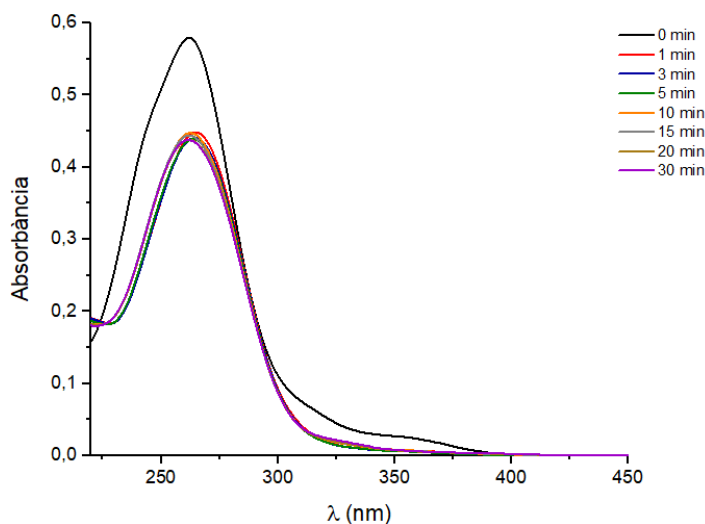
A la vista de que el CDZ no es estable en cloroform, es prosseguí a realitzar el mateix procediment anterior però partint d'una dissolució de CDZ en acetonitril. Els resultats dels espectres d'absorbància i d'emissió de fluorescència assolits s'observen en la Figura 25.



**Figura 25:** A) Espectre d'absorció en irradiar una dissolució 20 μM de CDZ amb acetonitril, B) Espectre d'emissió de fluorescència a l'excitar a 295 nm una dissolució 20 μM de CDZ en acetonitril.

En la Figura 25A s'observa el mateix comportament que en la figura 24A però amb una major rapidesa, on s'observa un desplaçament hipsocròmic a mesura que avança la cinètica de la reacció. En aquesta ocasió es manté un punt isobèstic en tots els espectres registrats. Destacar, que en la Figura 25B, el comportament és semblant al de la Figura 24B.

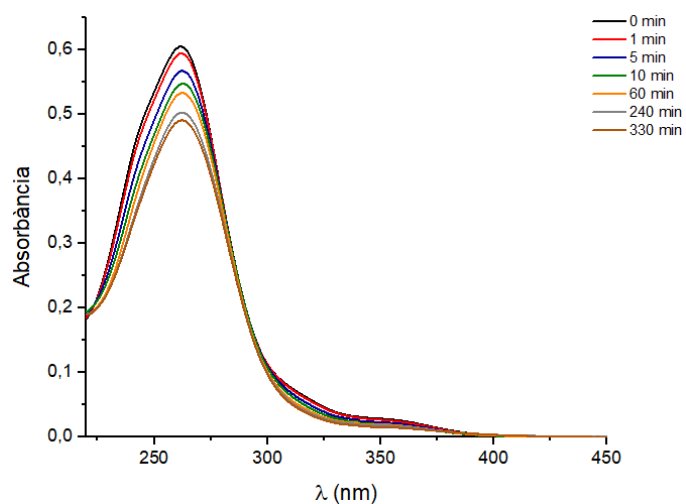
Aleshores, s'observa que el CDZ es fotodegrada en cloroform i en acetonitril. Tot seguit, es va realitzar, també, la irradiació d'una dissolució de CDZ 20 μM en PBS per a estudiar la seva fotoestabilitat en aquest dissolvent. Els resultats obtinguts de la irradiació són els mostrats en la Figura 26.



**Figura 26:** Registre d'absorció en irradiar una dissolució 20 μM de CDZ en PBS.

En la Figura 26, s'observa un canvi bruscat en el minut 1 d'irradiació, el que indica que hi ha una fotodegradació del CDZ a temps molt curts. Després, l'espectre permaneceix pràcticament invariable fins al minut 30.

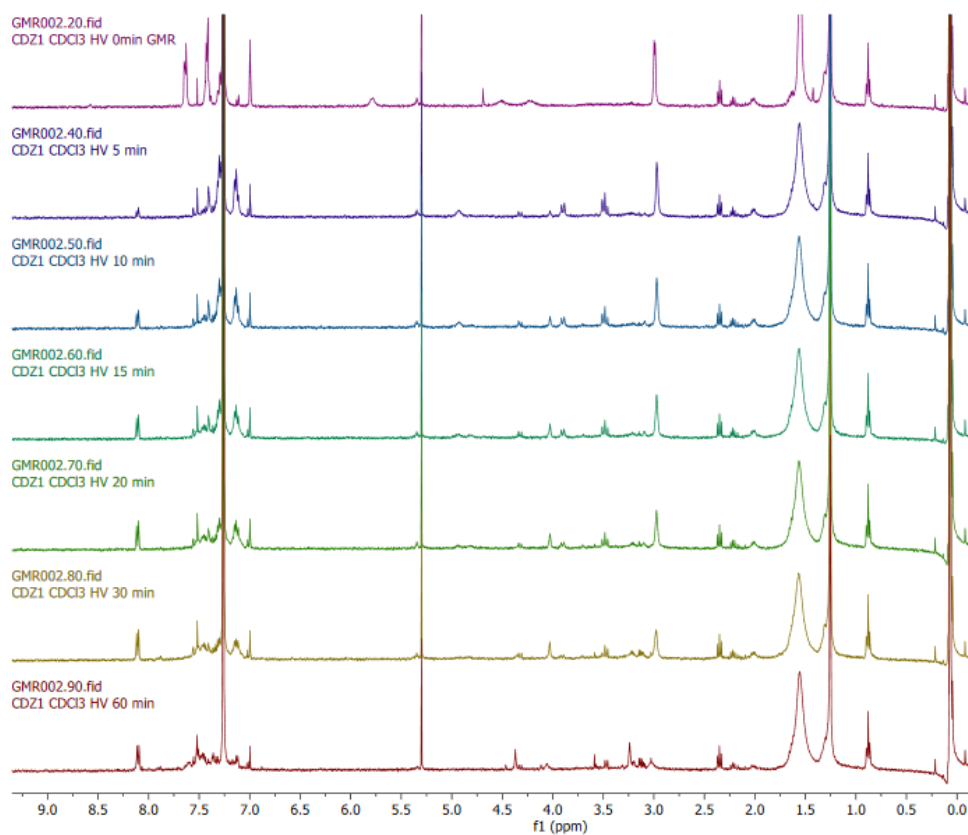
Com que s'observa una ràpida degradació inicial del fàrmac, es procedeix a realitzar una irradiació monocromàtica irradiant a una longitud d'ona de 350 nm perquè aquest tipus d'irradiacions són menys energètiques que les realitzades en el fotoreactor i, per tant, són més lentes. De la irradiació monocromàtica s'obté la Figura 27.



**Figura 27:** Espectre d'absorció d'una irradiació monocromàtica en espectrofluorímetre d'una dissolució 20  $\mu$ M de CDZ en PBS.

En la Figura 27 s'observa que en aquestes condicions la degradació és molt més lenta.

Per una altra banda, es realitza una irradiació 1 mg/mL de CDZ en  $CDCl_3$  seguida per  $^1H$ -RMN, que es pot comprovar en la Figura 28.



**Figura 28:** Espectre de  $^1H$ -RMN en irradiar una dissolució 1 mg/mL de CDZ en  $CDCl_3$ .

En la Figura 28 es poden observar els set espectres de RMN de protó obtinguts del seguiment d'una irradiació 1 mg de CDZ dissolt en 1 mL de  $\text{CDCl}_3$ . Els espectres es troben ordenats de dalt a baix de menor temps d'irradiació a major.

Indicar que els senyals per sota de 3 ppm corresponen a impureses de l'extracció del fàrmac, la que s'observa en 5'3 ppm correspon al diclorometà i la que s'observa en 7'26 ppm correspon al  $\text{CDCl}_3$ . En irradiar s'observen una sèrie de diferències respecte de l'estat inicial, el senyal que apareix sobre els 3 ppm i que correspon al grup  $\text{CH}_3$  de la molècula de CDZ va perdent intensitat a la vegada que desplaçant-se lleugerament cap a l'esquerra fins que al cap de 60 minuts d'irradiació pràcticament ha desaparegut.

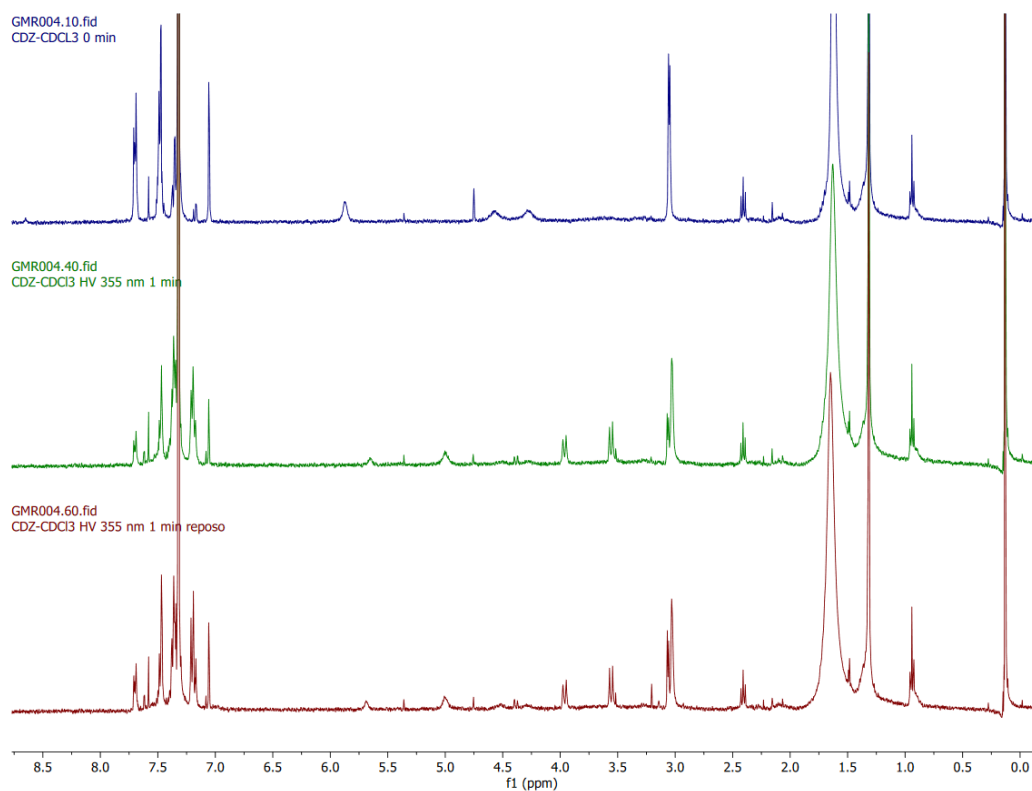
Tanmateix, el senyal entre 3'7 i 4'5 ppm que inclou el doble singlet pertinent al grup  $\text{CH}_2$  en l'estat inicial, es veu desplaçat en el rang 4'7 i 5'5 ppm a l'irradiar al cap de 5 minuts, i aquests van degradant-se fins que al cap de 15 minuts el senyal ha desaparegut completament. Per contra, a partir dels 5 minuts apareix un senyal als 8'1 ppm la qual va magnificant la seva grandària a mesura que augmenta el temps d'irradiació. Aquest senyal pot correspondre al doble doblet situat sobre 7'5 ppm en el CDZ i que s'haja desplaçat cap a l'esquerra.

A més a més, a partir dels 5 minuts d'irradiació apareix un senyal en la zona aromàtica sobre 7'2 ppm que en el cas del CDZ era insignificant, aquesta es manté fins als 30 minuts i ja no s'aprecia 60 minuts després. El mateix ocorre en la zona compresa entre 3 ppm i 5 ppm, on a partir dels 5 minuts apareix un multiplet, un doblet i un senyal singlet, de mode que el multiplet i el doblet perden intensitat a mesura que avança el temps d'exposició a la llum UV mentre que el senyal singlet augmenta la seva magnitud fins als 30 minuts d'irradiació.

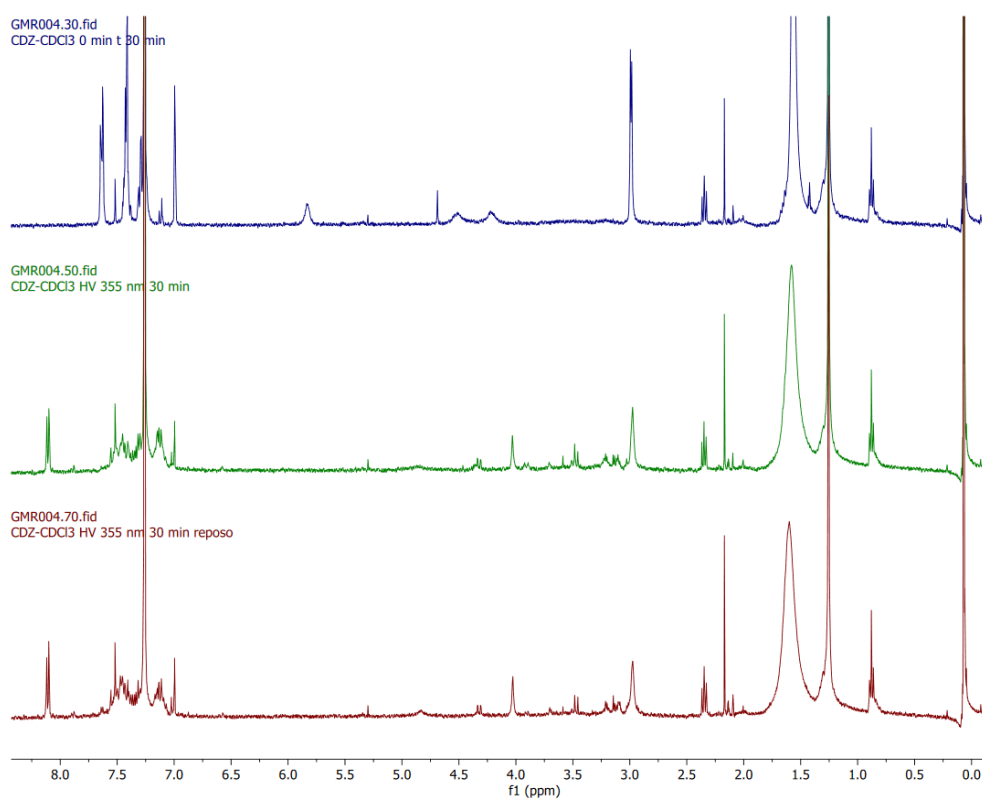
Segons la bibliografia<sup>16</sup>, la oxaziridina, presenta un senyal sobre 2'7 ppm i fa referència a 3 protons, aquesta pot referir-se al senyal que apareix sobre els 3 ppm ja en el CDZ i en totes les irradiacions fins als 30 minuts i que correspon al grup  $\text{CH}_3$ . A més a més, presenta un senyal singlet sobre els 5'5 ppm segons la bibliografia<sup>16</sup> i en la Figura 33 a partir dels 5 minuts d'irradiació podem apreciar aquest senyal fins als 30 minuts d'irradiació.

Si més no, es descriuen 8 protons aromàtics compresos entre 7 i 7'7 ppm en la dita bibliografia<sup>16</sup> i amb l'ajuda del *software* MestreNova es comprova que dels 5 minuts als 30 d'irradiació, en aquest rang hi ha 8 protons. Finalment, la bibliografia<sup>15</sup> descriu dos parells de doblets sorgits dels protons del grup metilè, els quals es poden apreciar a partir dels 5 minuts d'irradiació fins als 20 minuts aproximadament.

De tot açò, es pot concloure que el clordiazepòxid no es fotoestable i es fotodescomposa produint fotoproductes a partir dels 5 minuts d'irradiació, ja que es pot comprovar l'aparició de la oxaziridina. Per a comprovar que açò, s'agafen dues mostres de 1 mg de CDZ dissolt en 1 mL de  $\text{CDCl}_3$ , de les quals s'irradià una durant 1 minut i, l'altra 30 minuts en les mateixes condicions d'irradiació descrites en l'apartat 4.2. Els resultats obtinguts són els que s'observen a continuació.



**Figura 29:** Espectre de  $^1\text{H-RMN}$  obtingut en irradiar 1 min una dissolució 1 mg/mL de CDZ en  $\text{CDCl}_3$ .



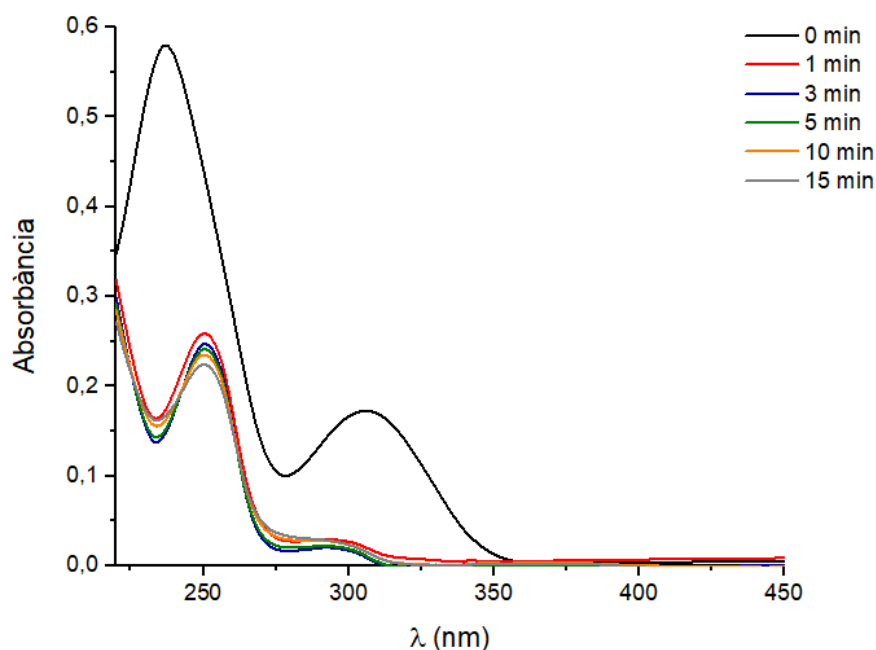
**Figura 30:** Espectre de  $^1\text{H-RMN}$  obtingut en irradiar 30 min una dissolució 1 mg/mL de CDZ en  $\text{CDCl}_3$ .

Tant en la Figura 29, com en la 30 s'observa en primer lloc el  $^1\text{H}$ -RMN corresponent al CDZ sense irradiar, l'espectre intermedi correspon al RMN de protó obtingut després d'haver irradiat 1 min i 30 minuts respectivament i, finalment, el tercer espectre correspon a un RMN de protó realitzat 24 hores després d'haver-hi realitzat la irradiació i reservat en obscuritat.

En la Figura 29, observa com els senyals descrits anteriorment corresponents a la oxaziridina ja es troben presents, és a dir, els 3 protons en 3 ppm corresponents al  $\text{CH}_3$ , els dos doblets compresos entre 3 i 4 ppm provinents del grup metilè del CDZ, el singlet característic de 5 ppm i els 8 protons aromàtics. A més a més, destaca que el senyal observada sobre 8 ppm en els 5 minuts no s'aprecia al minut d'irradiar. No obstant això, sí que s'observa com l'últim doblet aromàtic observat en el CDZ ha variat la seva estructura al minut d'irradiar i presenta un senyal semblant al observat a partir de 5 minuts en la Figura 30. S'observa com el fotoproducte format manté les seves propietats 24 hores després d'haver-se format i guardat en obscuritat.

En la Figura 29, s'observa més detalladament que l'estructura descrita per a la oxaziridina observable des del minut 1 ja no apareix. En aquesta ocasió, s'observa el doblet que apareix sobre els 8 ppm i els 3 protons característics de 3 ppm. Així doncs, es pot assumir que a partir dels 20 minuts d'irradiació s'obté algun fotoproducte diferent de la oxaziridina. Així doncs, dels espectres de RMN es pot concloure que el CDZ sofreix fotodegradació.

Per últim, es va irradiar (en les mateixes condicions descrites anteriorment en l'apartat 4.2) el DEM en PBS per observar el comportament del metabòlit i les possibles diferències respecte al fàrmac de partida. Els espectres d'absorció i d'emissió de fluorescència s'observen en la Figura 31 i 32 respectivament.

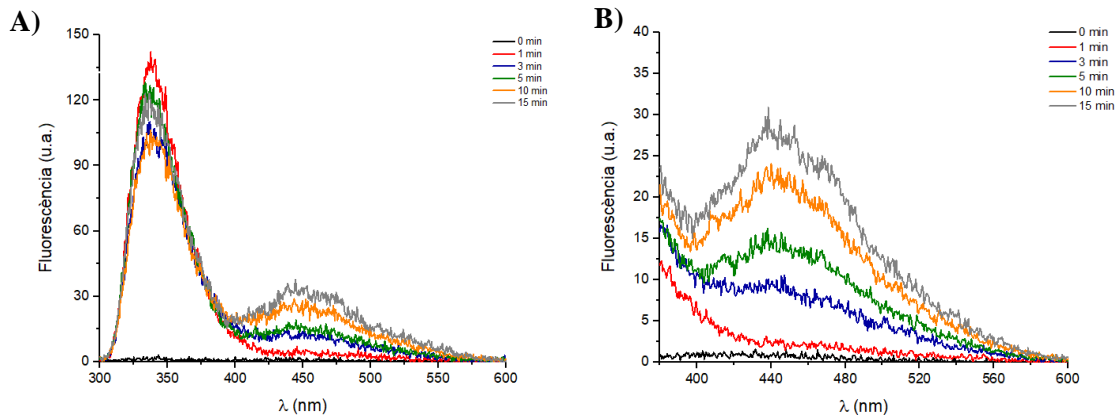


**Figura 31:** Espectre d'absorció de la irradiació de  $20\ \mu\text{M}$  de DEM en PBS.

En la Figura 31 s'observa que el DEM es degrada en PBS. L'espectre d'absorció del fàrmac inicial presenta un màxim d'absorbància en  $\lambda = 305\ \text{nm}$  i  $245\ \text{nm}$ , en canvi, en el moment en el què es sotmet la dissolució a irradiar aquesta presenta un desplaçament hipsocròmic en el qual disminueix l'absorbància a mesura que avança la reacció. Des del primer minut d'irradiació s'observa una ràpida degradació del DEM. L'espectre no varia amb temps d'irradiació superiors.



De la Figura 31, es conclou que els espectres d'emissió de fluorescència es registraran en els màxims d'emissió d'absorció, aleshores, s'excitarà a 260 nm i 305 nm cobrint així, ambdós màxims d'absorció.



**Figura 32:** A) Espectre d'emissió de fluorescència en excitar a 260 nm. B) Espectre d'emissió de fluorescència en excitar a 305 nm. Ambdues pertanyen a la irradiació d'una dissolució 20  $\mu$ M de DEM en PBS.

Tant en la Figura 32A com en la 32B, s'observa que a mesura que augmenta el temps d'exposició del fàrmac a la llum, augmenta la emissió de fluorescència per al rang de 400 nm a 600 nm. En el rang inferior a 400 nm (observable en la Figura 31A), s'observa que al minut d'irradiació s'assoleix el màxim d'emissió de fluorescència d'aquesta zona de l'espectre.

De tot açò, es pot concloure que el DEM es fotodegradable i no fotoestable, al igual que el fàrmac de partida.

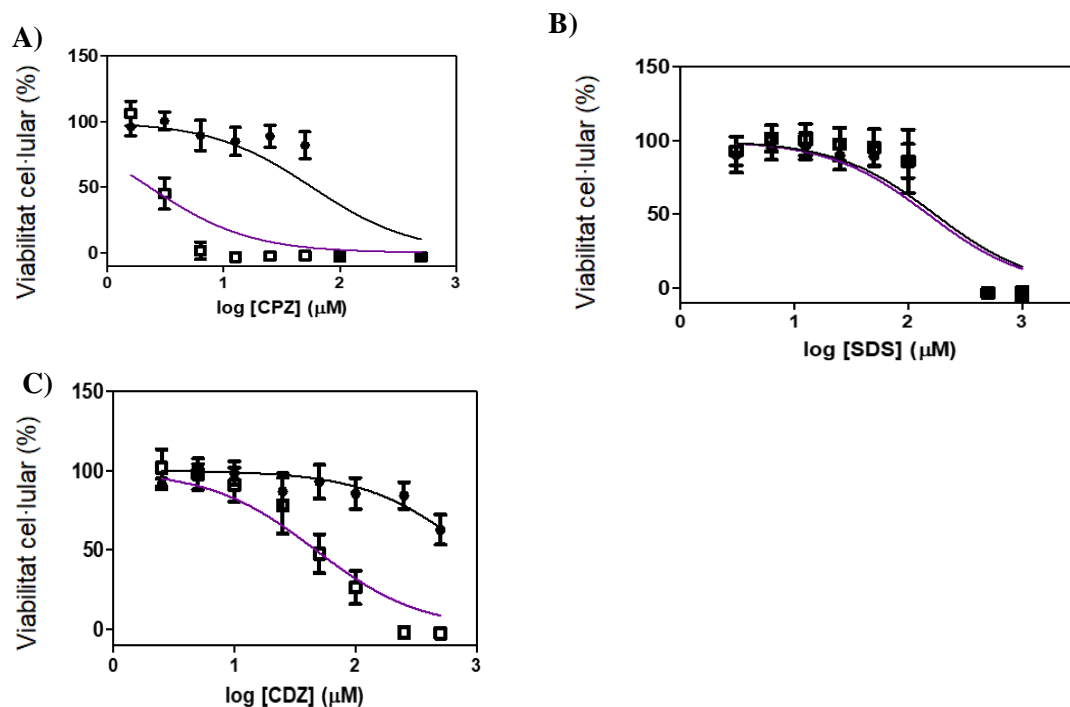
Una vegada s'esbrinà que el clordiazepòxid i el seu metabòlit demoxepam no eren estables en presència de llum i presentaven fotodegradació, es procedí a determinar si el fàrmac presentava fototoxicitat cel·lular.

### 5.2.3 FOTOTOXICITAT CEL·LULAR

Per tal d'avaluar la fototoxicitat del fàrmac CDZ s'utilitzà, com s'ha esmentat adés en la metodologia, l'assaig *in vitro* NRU. Aquest s'ha dut a terme mesurant la viabilitat cel·lular de les cèl·lules HaCaT enfront d'un rang de concentracions de CDZ descrites en l'apartat corresponent de dita metodologia.

La viabilitat s'extrau de la capacitat de les cèl·lules o no en captar el roig neutre, el qual és un indicador de tinció que sols és capaç de travessar les parets de les cèl·lules vives i emmagatzemar-se posteriorment en els lisosomes. Per tant, com major proporció de roig neutre hi haja en les cèl·lules, major serà la proporció de cèl·lules vives en aquest orifici de la placa.

A continuació, s'elaboren les corbes dosi-resposta obtingudes en l'assaig NRU per tal de poder determinar la concentració  $IC_{50}$  (Figura 33).



**Figura 33:** Representació de la viabilitat cel·lular en funció del logaritme neperià de la concentració de A) CPZ, B) SDS, C) CDZ. En les tres gràfiques, la línia negra representa el fàrmac en condicions d'obscuritat i la violeta el fàrmac en condicions d'exposició a la llum.

Els valors d'  $IC_{50}$ , tant en obscuritat com després d'irradiació, obtinguts així com el PIF calculat segons l'Eq 2 s'observen en la Taula 7.

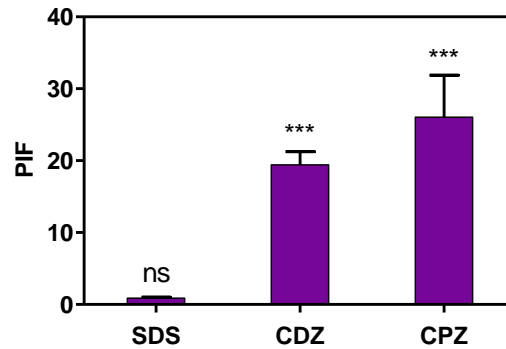
Taula 7: Recopilació dels valors d'  $IC_{50}$  en l'obscuritat, en l'exposició a la llum UVA i PIF dels fàrmacs.

Compost	$IC_{50}$ Obscuritat ( $\mu\text{M}$ )	$IC_{50}$ UVA ( $\mu\text{M}$ )	Factor de Fotoirritació (PIF) <sup>1</sup>
<b>CPZ</b>	$57 \pm 8$	$2.0 \pm 0.5$	$26 \pm 6$
<b>CDZ</b>	$> 500$	$45 \pm 12$	$> 10$
<b>SDS</b>	$149 \pm 21$	$169 \pm 2.4$	$1.0 \pm 0.1$

Les dades representen la mitjana  $\pm$  SD d'almenys tres experiments independents on CPZ i SDS són els controls utilitzats en aquest estudi.

<sup>1</sup>D'acord amb la guia OECD 432 (OECD, 2019),  $PIF < 2$  significa "no fototòxic"  $2 < PIF < 5$  significa "probablement fototòxic" i  $PIF > 5$  significa "fototòxic".

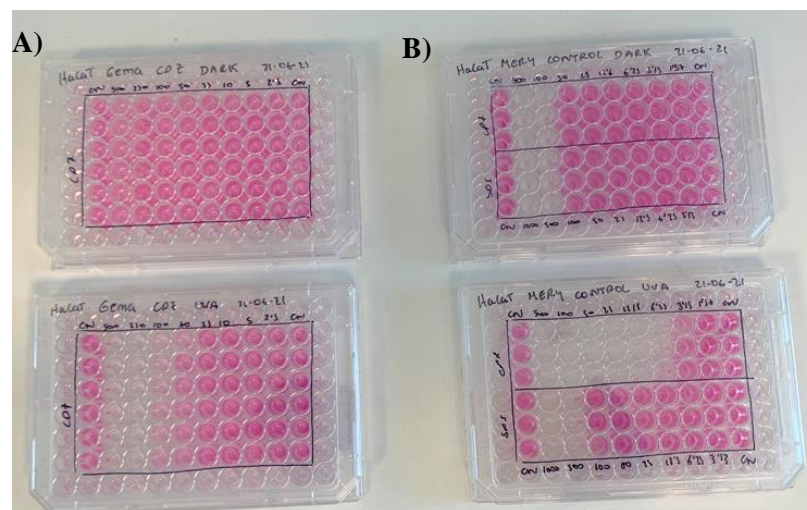
A partir de les dades obtingudes en la Taula 7 es representa el PIF de cada fàrmac (Figura 34).



**Figura 34:** Representació del PIF obtingut per a cada fàrmac analitzat en l'assaig NRU.

A la vista d'aquests resultats, podem assumir que el CDZ presenta fototoxicitat. No es pot calcular un PIF exacte perquè l'IC<sub>50</sub> assolit en condicions d'obscuritat és superior a 500 µM i, per aquesta raó, s'assumeix que el PIF tindrà un valor superior a 10.

Aquests resultats es poden comprovar en la Figura 35, en la qual s'observen les plaques irradiades i les que es mantenen en condicions d'obscuritat tant del fàrmac com dels controls.



**Figura 35:** A) Plaques del fàrmac CDZ en absència i en presència de radiació UVA respectivament. B) Plaques dels controls CPZ i SDS en absència i presència de radiació UVA respectivament.

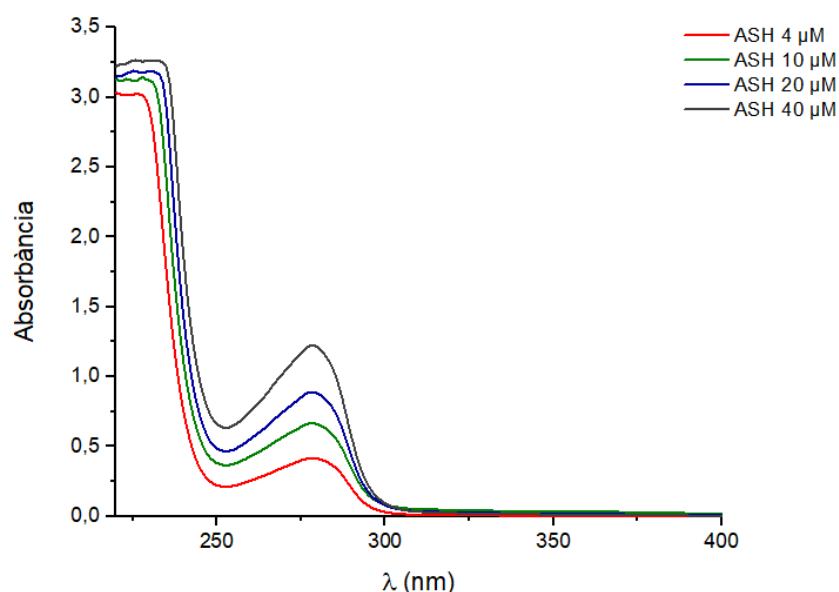
Seria convenient informar als sanitaris que tinguen en consideració aquest fet i avisen als pacients que en el cas de seguir un tractament amb aquest fàrmac és necessari protegir-se de l'exposició solar.

Una vegada s'ha determinat que el clordiazepòxid és fototòxic i provoca dany cel·lular, es procedeix a estudiar si el fàrmac i el seu metabòlit poden produir fotoal·lèrgia i, per a això, es va irradiar en presència d'albúmina sèrica humana.

### 5.2.4 ESPECTRES D'INTERACIÓ DEL FÀRMAC I EL SEU METABÒLIT AMB L'ÀLBUMINA SÈRICA HUMANA

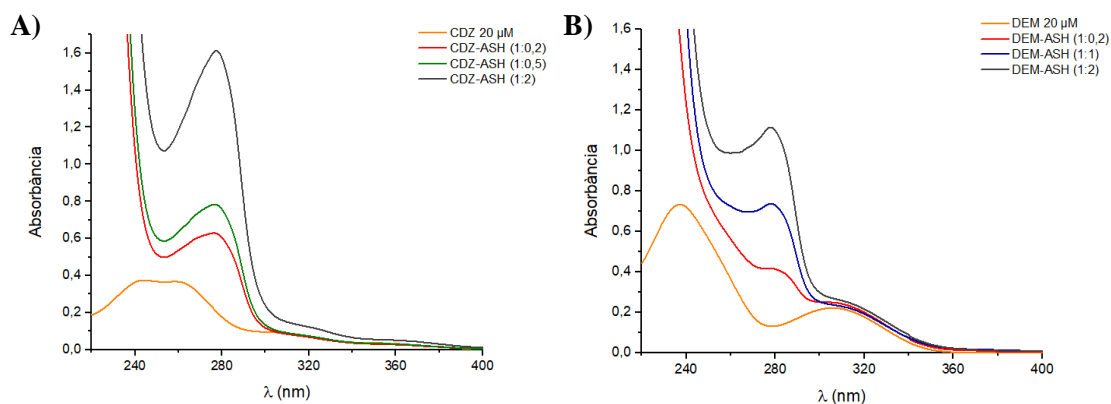
El primer pas per estudiar la possible fotounió del CDZ i DEM a una proteïna, elegint com a proteïna model l'ASH, consistí en analitzar la interacció de cadascun dels dos composts anteriors amb l'ASH. Aleshores, es registrà l'espectre d'absorció de cada mostra descrita en l'apartat 4.2.3.4.

Els espectres d'absorció registrats de la proteïna aïllada en funció de la concentració de la mateixa en 3 mL de PBS són els observats en la Figura 36:



**Figura 36:** Espectre d'absorció per a diferents concentracions d'ASH en PBS.

Els espectres d'absorció de les diferents dissolucions de proteïna amb el clordiazepòxid i amb el demoxepam amb diferents relacions molars, s'observen en la Figura 37:

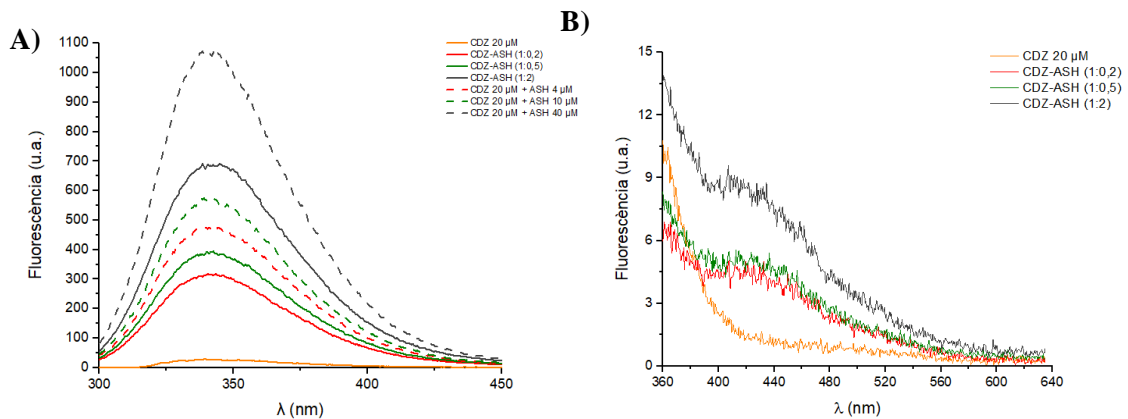


**Figura 37:** A) Espectre d'absorció del CDZ amb diferents concentracions d'ASH, B) Espectre d'absorció del DEM amb diferents concentracions d'ASH. Les dissolucions s'han preparat per a una concentració 20 μM de cada compost en PBS i diferents concentracions d'una dissolució d'ASH en PBS.

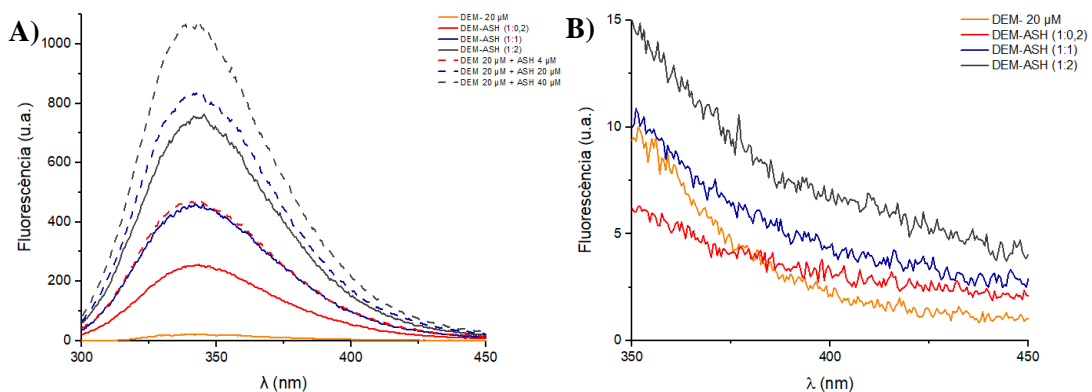
En les Figures 37A i 37B es mostren els espectres d'absorció de mescles d'ASH i CDZ o DEM a diferents relacions molars. Quan es comparen aquests espectres obtinguts amb els espectres d'absorció d'una mescla intermolecular en les mateixes proporcions (no es mostren en la figura) l'espectre resultant és coincident.

Si s'analitza el rang de 300 a 400 nm, s'observa com per a aquestes concentracions l'espectre manté la forma del CDZ i DEM inicials sense produir la formació de cap nova banda que poguera indicar interacció supramolecular entre els substrats i la proteïna.

A continuació, s'analitzen els espectres d'emissió de fluorescència de la proteïna aïllada i de les mescles fàrmac-proteïna i metabòlit-proteïna (Figures 38 i 39). Aquests, s'han registrat excitant a 295 nm i a 310 nm.



**Figura 38:** A) Espectre d'emissió de fluorescència on es compara la fluorescència de dissolucions CDZ-ASH amb l'obtinguda al sumar les fluorescències de CDZ i ASH per separat, excitant a 295 nm, B) Espectre d'emissió de fluorescència del CDZ-ASH excitant a 310 nm. Tots dos per a dissolucions amb diferent concentració de proteïna.



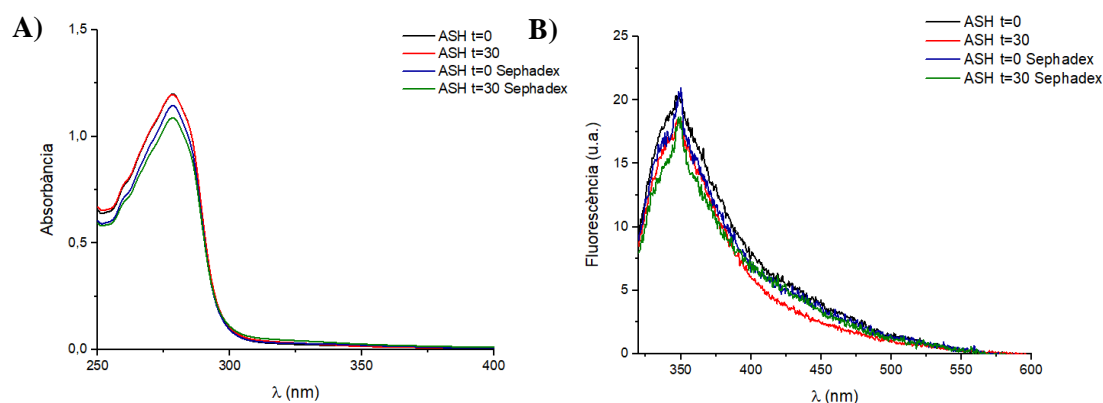
**Figura 39:** A) Espectre d'emissió de fluorescència on es compara la fluorescència de dissolucions DEM-ASH amb l'obtinguda al sumar les fluorescències de DEM i ASH per separat, excitant a 295 nm, B) Espectre d'emissió de fluorescència del DEM-ASH excitant a 310 nm. Tots dos per a dissolucions amb diferent concentració de proteïna.

Tant en la Figura 38 com en la 39, s'observà que la fluorescència de les mescles ASH-substrat no coincideix amb la fluorescència "teòrica" calculada sumant la fluorescència d'ASH més la fluorescència del substrat. Aquest fet estaria suggerint una interacció entre la proteïna i el substrat. En les Figures 38B i 39B la fluorescència és pràcticament nula, ja que en aquesta zona l'absorció es deguda al CDZ o DEM, que no són fluorescents.

Per tal d'observar si es forma una unió covalent fotoinduïda entre qualsevol dels dos composts i l'albumina sèrica humana es prosseguí a realitzar l'estudi de la formació d'un adducte entre els compostos i algun residu de l'ASH utilitzant tècniques espectroscòpiques d'absorció i emissió de fluorescència realitzant una filtració per exclusió de grandàries amb filtres de Sephadex®G-25.

Les mescles utilitzades foren les descrites en la metodologia (4.2.3.4), utilitzant com a referència dissolucions  $2 \cdot 10^{-5}$  M per als fàrmacs i  $4 \cdot 10^{-5}$  M per a la proteïna. El temps d'irradiació establert fou de 30 minuts, per a assegurar la formació màxima de fotoproducte del CDZ, com la oxaziridina o derivats de la mateixa.

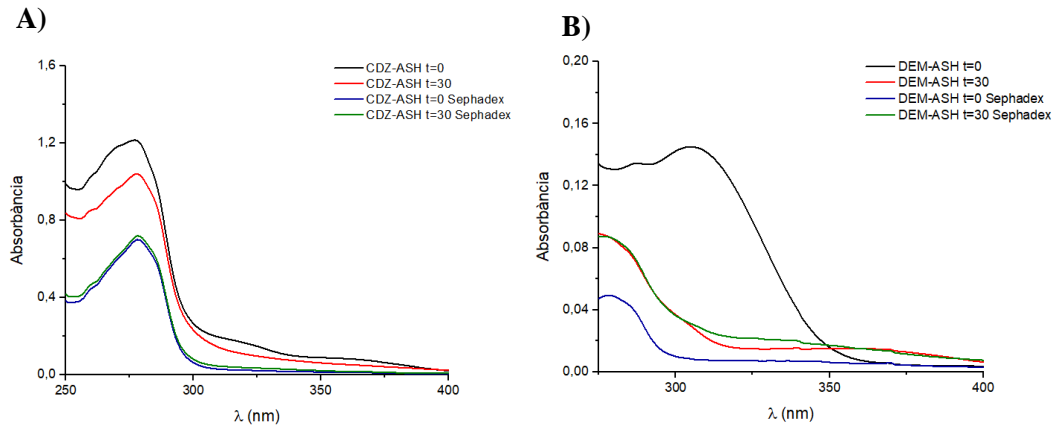
En primera instància, es va estudiar el comportament de la proteïna aïllada, com a prova en blanc.



**Figura 40:** A) Espectre d'absorció de la proteïna sense filtració i amb filtratge abans i després d'irradiar en el fotoreactor, B) Espectre d'emissió de fluorescència excitant a 310 nm de la proteïna sense filtració i amb filtratge abans i després d'irradiar en el fotoreactor.

Tant en la Figura 40A com en la Figura 40B s'observa que els espectres registrats d'absorbància i fluorescència abans de filtrar i després són els mateixos. A més a més, l'ASH no té impureses unides així com la columna és correcta. La fluorescència observada és pràcticament nul·la, com era d'esperar.

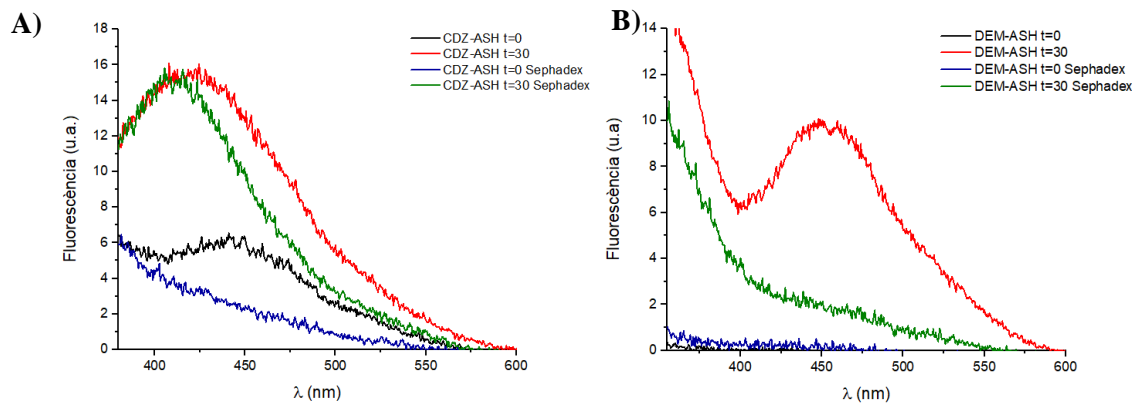
Una vegada estudiat el comportament de la proteïna irradiada i sense irradiar, es procedeix a analitzar si els composts produeixen fotounió amb aquesta o no. A continuació, es compara el comportament de la dissolució de fàrmac i proteïna amb equivalència 1:2 respectivament.



**Figura 41:** A) Espectre d'absorció de la interacció ASH-CDZ sense filtració i amb filtratge abans i després d'irradiar en el fotoreactor, B) Espectre d'absorció de la interacció ASH-DEM sense filtració i amb filtratge abans i després d'irradiar en el fotoreactor.

En la Figura 41A, s'observa que l'espectre d'absorbància de la dissolució fàrmac-proteïna abans de filtrat varia respecte de temps 0 minuts i temps 30 minuts, per tant, pareix ser que haja hagut degradació. En canvi, al filtrar la mostra s'observa com els espectres a temps 0 i 30 minuts son coincidents i amb una lleugera disminució d'absorbància respecte de les mostres sense filtrar. Per tot açò, es pot dir que no ha hagut fotounió entre el CDZ i l'ASH.

En la Figura 41B, s'observa l'espectre d'absorbància de la dissolució metabòlit-proteïna abans de filtrar varia respecte de temps 0 minuts i temps 30 minuts, pel què es pot haver dut a terme una degradació. Al filtrar ambdues mostres, els espectres de temps inicial i 30 minuts no coincideixen, a més, la forma de la banda varia pel que podria haver existit fotounió del metabòlit a la proteïna.



**Figura 42:** A) Espectre d'emissió de fluorescència excitant a 310 nm de la interacció ASH-CDZ sense filtració i amb filtratge abans i després d'irradiar en el fotoreactor, B) Espectre d'emissió de fluorescència excitant a 310 nm de la interacció ASH-DEM sense filtració i amb filtratge abans i després d'irradiar en el fotoreactor.

En la Figura 42, s'observa que els espectres de fluorescència de les dissolucions fàrmac-proteïna i metabòlit-proteïna són poc intensos i, conseqüentment, tot i que s'observen diferències en les bandes d'emissió, no permeten extreure conclusions sòlides.

Es tracta de resultats molt preliminars que cal seguir investigant. Si més no, la mostra de la dissolució metabòlit-proteïna es podria dur a realitzar-li un anàlisi per proteomètica per comprovar si realment hagut fotounió o no.

## 6. PLA DE FUTUR

Seria interessant continuar investigant en aquest tema d'investigació que s'ha quedat obert, per a poder elucidar l'estructura química del/s fotoproducte/s obtingut/s de la irradiació del CDZ. A més a més, es podria estudiar si la fototoxicitat obtinguda del assaig NRU es deguda a un dany generat a les proteïnes cel·lulars (assaig de fotooxidació de proteïnes), a danys generats per l'ADN cel·lular (assaig Comet) i/o a lípids (assaig de fotoperoxidació lipídica). Nogensmenys, es podria realitzar també un estudi complet al metabòlit per veure si aquest també es fototòxic.



## 7. CONCLUSIÓ

El present Treball de Fi de Màster tenia per objectiu realitzar un estudi de la caracterització fotofísica i fotoquímica del fàrmac clordiazepòxid (CDZ) i del seu metabòlit (DEM). Una vegada realitzats tots els experiments i estudis detallats en aquesta memòria, s'han analitzat i explicat els resultats obtinguts, dels quals s'extreuen les següents conclusions:

- Els espectres d'absorció del fàrmac i del metabòlit són diferents. El fàrmac absorbeix fins a longituds d'ona majors en l'UVA.
- La fluorescència d'ambdós compostos és pràcticament nul·la.
- Els dos substrats investigats mostraren fotodegradació, donant lloc a fotoproducte(s) l'estructura química del(s) qual(s) es troba en procés de determinació.
- El fàrmac va resultar ser fototòxic com a relleu de l'assaig de viabilitat cel·lular de captació de roig neutre (NRU).
- Els experiments preliminars sobre fotunió de fàrmac i metabòlit, utilitzant albúmina sèrica humana com a proteïna per a l'estudi de la possible fotoal·lèrgia no són conclouents.

## 8. BIBLIOGRAFIA

AEMPS. (2012). Hurbplex, ficha técnica. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios; Ministerio de Sanidad, Política e Igualdad. [https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/37794/37794\\_ft.pdf](https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/37794/37794_ft.pdf). Últim accés 4/09/2018.

AEMPS. (2014). Utilización de medicamentos ansiolíticos e hipnóticos en España durante el período 2000-2012. Ministerio de Sanidad, 1-4. <http://tinyurl.com/pk17zja>. Últim accés 1/09/2018.

AEMPS. (2021). Utilización de medicamentos ansiolíticos e hipnóticos en España @ [www.aemps.gob.es](http://www.aemps.gob.es). Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. <https://www.aemps.gob.es/medicamentos-de-uso-humano/observatorio-de-uso-de-medicamentos/informes-ansioliticos-hipnoticos/>. Últim accés 4/09/2018.

Arques, S. (2020). Serum albumin and cardiovascular disease: State-of-the-art review. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, 69(4), 192-200. <https://doi.org/10.1016/j.ancard.2020.07.012>.

Blakely, K. M., Drucker, A. M., & Rosen, C. F. (2019). Drug-Induced Photosensitivity—An Update: Culprit Drugs, Prevention and Management. *Drug Safety*, 42(7), 827-847. <https://doi.org/10.1007/s40264-019-00806-5>.

Brunatti, C. & Amrtín, A.M. (2015). Introducción a la espectroscopía de absorción molecular ultravioleta, visible e infrarrojo cercano. <http://materias.fi.uba.ar/6305/download/Espectrofotometria.pdf>. Últim accés 7/09/2021.

Bueno Alejo, C. J. (2009). Interacción Fármaco-proteína en estados excitados [Universidad Politécnica de Valencia]. In Departamento de Química Instituto de Tecnología Química. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/6565>.

CORNELISSEN, P. J. G., HENEGOUWEN VAN BEIJERSBERGEN, G. M. J., & MOHN, G. R. (1980). STRUCTURE AND PHOTOBIOLOGICAL ACTIVITY OF 7-CHLORO-1,4-BENZODIAZEPINES. STUDIES ON THE PHOTOTOXIC EFFECTS OF CHLORDIAZEPOXIDE, DESMETHYLCHLORDIAZEPOXIDE AND DEMOXEPAM USING A BACTERIAL INDICATOR SYSTEM. *Photochemistry and Photobiology*, 32(5), 653-659. <https://doi.org/10.1111>.

CORNELISSEN, P.J.G. BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, G. M. J. G. (1979). Photochemical decomposition of 1,4-benzodiazepines. Chlordiazepoxide. *International Journal of Pharmaceutics.*, 3(4-5), 205-220. [https://doi.org/10.1016 / 0378-5173 \(79\) 90004-8](https://doi.org/10.1016 / 0378-5173 (79) 90004-8).

CORNELISSEN, P.J.G. BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN, G. M. J. G. (1979). Photochemical decomposition of 1,4-benzodiazepines. Chlordiazepoxide. *International Journal of Pharmaceutics.*, 3(4-5), 205-220. [https://doi.org/10.1016 / 0378-5173 \(79\) 90004-8](https://doi.org/10.1016 / 0378-5173 (79) 90004-8).

De la Torre, F. (2002). Espectrofotometría: apuntes de espectrofotometría. <http://www.bioquimica.ucv.cl/paginas/central/bioquimica%20clinica/apuntes%20de%20espectrofotometria.pdf>. Últim accés 7/09/2018.

Ellis, G., & Oeste, G. (1983). *Progress in Medicinal Chemistry V.20* (G. E. G. Oeste (ed.); 1st ed.). Elsevier Science Publishers B.V. <https://www.elsevier.com/books/progress-in-medicinal-chemistry/ellis/978-0-444-80501-0>.

Greenhill, J. V., & McLelland, M. A. (1990). 2 Photodecomposition of Drugs. *Progress in Medicinal Chemistry*, 27(C), 51–121. [https://doi.org/10.1016/S0079-6468\(08\)70289-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6468(08)70289-3).

Haran, R., & Tuchagues, J. P. (1980). Carbon-13 and Proton NMR Studies of 1,4-Benzodiazepines. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 17(7), 1483–1488. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570170725>.

Herrera, Lucas Ramiro; Rondini, F., & Villalón, S. (n.d.). BENZODIAZEPINAS Y SU USO EN SERES HUMANOS. *Monografias.Com*. Retrieved July 22, 2021, from <https://www.monografias.com/trabajos82/benzodiazepinas/benzodiazepinas.shtml>.

Kowalska, J., Rok, J., Rzepka, Z., & Wrześniok, D. (2021). Drug-induced photosensitivity— from light and chemistry to biological reactions and clinical symptoms. *Pharmaceuticals*, 14(8), 30. <https://doi.org/10.3390/ph14080723>

Lara, I. G. (2005). Estudio AB initio de mecanismos de reacción en sistemas moleculares fotosensibles [Universitat Rovira i Virgili]. <https://www.tdx.cat/handle/10803/9075#page=2>.

Legerén Molina, M. L. (2010). Síntesis y evaluación biológica de nuevas benzodiazepinas. *Universidad de Santiago de Compostela, Servicio de Publicacións e Intercambio Científico*. <http://hdl.handle.net/10347/2839>.

López Tricas, J. M. (2011). La caducidad de los medicamentos. Retrieved August 30, 2021, from <http://www.info-farmacia.com/medico-farmaceuticos/revisiones-farmaceuticas/la-caducidad-de-los-medicamentos>.

Lorente, C. (2003). Fotofísica y propiedades fotosensibilizadoras de pterinas en solución acuosa [Universidad Nacional de La Plata]. <https://doi.org/10.29327/523696.1-1>.

Mimenza, O. C. (2018). Benzodiazepinas (psicofármaco): usos, efectos y riesgos. *Psicología y Mente*. <https://psicologiymente.com/psicofarmacologia/benzodiazepinas>.

Momin, N., Phan, P., Ali, A. A., Ali, H. I., Seeger, C. M., Joseph, M., Lerma Rangel, I., & Merlyn Joseph, C. (2021). Benzodiazepine-induced photosensitivity reactions: A compilation of cases from literature review with Naranjo causality assessment. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 00, 1–6. <https://doi.org/10.1111/phpp.12691>.

Monje López, V. T. (2014). Proteínas como microrreactores en fotoquímica [Universidad Politécnica de Valencia]. <https://riunet.upv.es/handle/10251/40430>.

Nahum Montagud Rubio. (2020). Clordiazepóxido: características y efectos secundarios de este fármaco. *Psicología y Mente*. <https://psicologiymente.com/psicofarmacologia/clordiazepoxido>.

OECD (2019). Test No. 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris.

Ouédraogo, M., Maeschalek, E. De, Soentjens-Werts, V., & Dubois, J. (2009). In vitro cytotoxicity study of oxaziridines generated after chlordiazepoxide, demoxepam, and desmethylchlordiazepoxide UV irradiation. *Drug and Chemical Toxicology*, 32(4), 417–423. <https://doi.org/10.1080/01480540903130666>.

Pedersen, S. A., Klesse, T., Findal Andreasen, M., Dalhoff, K. P., & Andersen, C. U. (2020). Active chlordiazepoxide metabolites in a patient needing life support after treatment of alcohol abstinence. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 127(5), 438–441. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13449>.

Qureshi, S., Chandra, S., Chopra, D., Dubey, D., Jain, V., Roy, S. K., & Ray, R. S. (2021). Nabumetone induced photogenotoxicity mechanism mediated by ROS generation under environmental UV radiation in human keratinocytes (HaCaT) cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 420(January), 13. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115516>.

Sarris, G. G., & Limoges, J. F. (2019). Demoxepam Derivatization and GC-MS Analysis Produces Erroneous Nordiazepam and Oxazepam Results. *Journal of Analytical Toxicology*, 43, 406–410. <https://doi.org/10.1093/jat/bkz006>.

Svobodová, A. R., Ulrichová, J., & Vostálová, J. (2019). Human keratinocyte cell line as suitable alternative model for in vitro phototoxicity testing. *An Bras Dermatol*, 94(1), 105-106. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20197620>.

Toral-López, I., Moreno-Arco, A., Cruz Vela, P., Moratalla-López, E., & Domínguez-Martín, S Expósito-Ruíz, M. (2019, February). Análisis de consumo de ansiolíticos e hipnóticos en un centro de atención primaria. *Med Fam Andal*, 20(1), 21–28. <http://www.samfyc.es>.

Yasrebi, S. A., Takjoo, R., & Riazi, G. H. (2019). HSA-interaction studies of uranyl complexes of alkyl substituted isothiosemicarbazone. *Journal of Molecular Structure*, 1193, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.04.126>.

# **PRESSUPOST**



## 1. PRESSUPOST

En aquest capítol s'estudia el pressupost necessari per a dur a terme el Treball Fi de Màster i poder determinar la seua viabilitat econòmica mitjançant el càlcul del cost que requereix dur a terme aquest projecte. Per a determinar la viabilitat, en primer lloc, es realitza un pressupost parcial de l'enginyeria, dels equips, dels reactius i dissolvents i dels materials (tant fungibles com no fungibles) utilitzats durant la realització d'aquest treball.

A partir d'aquest pressupost parcial, es procedeix a determinar la segona part, la qual consisteix en determinar el pressupost d'execució material (PEM), el pressupost d'execució per contracta (PEC) i, per últim, el pressupost general del projecte o pressupost base de licitació en base a aquests.

Per tal de realitzar aquest pressupost s'han tingut en compte els següents factors:

- Els preus del pressupost parcial no contenen l'IVA (21 %) i aquest s'aplicarà en el PEC.
- Per al càlcul del cost de l'equipament no s'ha considerat el preu de compra sinó que s'ha calculat l'amortització respecte a la vida útil de cada un d'ells tenint en compte que en un any hi ha 250 dies laborables i en cada dia laborable es desenvolupa una jornada laboral de 8 hores.
- El consum de llum, neteja, aigua, etc., s'ha inclòs en l'apartat de despeses generals.

Els recursos del pressupost s'han classificat mitjançant una referència que es resumeix a continuació en la Taula 8:

**Taula 8:** Taula de referències per a la realització del pressupost.

<i>Referència</i>	<i>Descripció de la Referència</i>
<b>EN</b>	Enginyeria
<b>EQ</b>	Equipament
<b>MTF</b>	Materials fungibles
<b>MTFN</b>	Materials no fungibles
<b>RD</b>	Reactius i dissolvents

### 1.1. PRESSUPOST PARCIAL

#### 1.1.1. ENGINYERIA

En aquest apartat es té en compte la mà d'obra, és a dir, el cost que requereixen els operaris requerits per a la realització del projecte i els honoraris dels mateixos. S'ha tingut en compte que la realització dels assajos experimentals es realitzen amb un màxim de 300 hores i que el preu d'un enginyer químic és de 30 €/h.

**Taula 9:** Cost Total Enginyeria.

Codi	Unitat (ut)	Descripció	Import		
			Preu (€/ut)	Quantitat (ut)	Cost (€)
EN1	h	Enginyer Químic	30	300	9000
EN2	h	Tècnic de Laboratori	20	100	2000
<b>Preu Total Enginyeria (€)</b>					<b>11000</b>

El pressupost de l'enginyeria del projecte ascendeix a la quantitat de: **ONCE MIL EUROS**.

### 1.1.2. EQUIPS

Per al càlcul del pressupost dels equips, s'ha realitzat un càlcul del preu per hora del material amortitzable utilitzat en aquest projecte. S'ha considerat que el període d'amortització de tots els equips utilitzats és de 15 anys excepte per a la balança digital, el cronòmetre i el sistema de destil·lació d'aigua Milli-Q que es considera de 5 anys.

Com que l'ús de cada equip utilitzat en el laboratori és de caràcter universitari es tindran en compte que en un any hi ha 250 dies hàbils i que la jornada laboral és de 8 hores al dia.

El cost d'amortització d'un equip s'obté mitjançant la següent equació:

$$Cost_{Amortització} = \frac{Cost_{equip}}{t_{amortització}} \text{ (€)} \quad (\text{Eq 4})$$

Sent el  $Cost_{Amortització}$  el cost de l'equip tenint en compte el cost d'adquisició ( $Cost_{equip}$ ) i el temps d'amortització considerat per a cada equip ( $t_{amortització}$ ). Finalment, per a obtenir el cost d'ús del equip es necessari multiplicar el temps d'ús de cada equip pel seu cost d'amortització. El quadre de pressupost parcial per als equips s'observa en la Taula 10.

**Taula 10:** Cost del pressupost dels equips (1/2).

Codi	Unitat (ut)	Descripció	Import				
			Preu (€/ut)	Temps d'ús (ut)	Cost amortització (€)	Vida útil (anys)	Cost (€)
EQ1	h	Balança Digital	3000,00	3,50	0,10000	15	0,35
EQ2	h	Bany d'ultrasons	5000,00	0,20	0,16667	15	0,03
EQ3	h	Centrífuga	6000,00	1,00	0,20000	15	0,20
EQ4	h	Cronometre	24,00	36,00	0,00240	15	0,09



**Taula 11:** Cost del pressupost dels equips (2/2).

Codi	Unitat (ut)	Descripció	Import				
			Preu (€/ut)	Temps d'ús (ut)	Cost amortització (€)	Vida útil (anys)	Cost (€)
<b>EQ5</b>	h	Espectròmetre de RMN	300000,00	30	10,00000	15	300,00
<b>EQ6</b>	h	Espectrofotòmetre JASCO V-650	10000,00	8,00	0,33333	15	2,67
<b>EQ7</b>	h	Espectrofluorímetre JASCO FP-8500	28000,00	13,00	0,93333	15	12,13
<b>EQ8</b>	h	Fotoreactor LuzChem	5000,00	20,00	0,16667	15	3,3333
<b>EQ9</b>	h	HPLC semipreparatiu Jasco PU-2080	350000,00	6,00	11,66667	15	70,00
<b>EQ10</b>	h	Incubador gabinet cel·lular	6300,00	220,00	0,21000	15	46,20
<b>EQ11</b>	h	Microscopi monocular	160,00	1,00	0,00533	15	0,01
<b>EQ12</b>	h	Placa calefactora bàsica	269,00	26,00	0,02690	5	0,70
<b>EQ13</b>	h	Rotavapor	8000,00	5	0,26667	15	1,33
<b>EQ14</b>	h	Sistema de depuració H <sub>2</sub> O Milli-Q	1000,00	1,00	0,10000	5	0,10
<b>EQ15</b>	h	Balança Digital	3000,00	3,50	0,10000	15	0,35
<b>EQ16</b>	h	Bany d'ultrasons	5000,00	0,20	0,16667	15	0,03
<b>Preu Total Equips (€)</b>							<b>437,24</b>

El cost del pressupost parcial per a l'equipament ascendeix a la quantitat de: **QUATRE-CENTS TRENTA-SET EUROS AMB VINT-I-QUATRE CÈNTIMS.**

### 1.1.3. MATERIAL FUNGIBLE

A continuació, es presenta el pressupost per als materials fungibles utilitzats en la part experimental d'aquest projecte. S'entén com a material fungible aquell que sols està destinat a un sol ús.

**Taula 12:** Cost del pressupost del material fungible (1/2).

Codi	Unitat (ut)	Descripció	Import		
			Preu (€/ut)	Quantitat (ut)	Cost (€)
<b>MTF1</b>	ut	Agulla estèril BD Microlance 1x100	3,66	8	0,29
<b>MTF2</b>	ut	Banyera de plàstic estèril per a laboratori 1x10	2,00	12	24,00
<b>MTF3</b>	ut	Bobina de paper industrial 45 kg	14,67	1	14,67
<b>MTF4</b>	ut	Caixa guants rebutjables de nitril sense pols talla S 1x100	7,07	100	7,07
<b>MTF5</b>	ut	Eppendorf 1'5 mL 1x500	15,94	45	3,59
<b>MTF6</b>	ut	Flascó tractat per a cultiu cel·lular de 50 mL	10,28	3	30,84
<b>MTF7</b>	ut	Filtre de xeringa de Niló 0'45 µm 1x100	33,00	4	1,32
<b>MTF8</b>	ut	Filtre Sephadex® G-25 mitjà	68,00	1	68,00
<b>MTF9</b>	ut	Làmina de tancament Parafilm M	28,00	0,1	2,80
<b>MTF10</b>	ut	Paper d'alumini 130 m	2,94	0,1	0,29
<b>MTF11</b>	ut	Paper de filtre 1x200	86,14	0,5	0,22
<b>MTF12</b>	ut	Multiplaca cultiu cel·lular de 96 orificis de polipropilè.	5,35	12	64,20
<b>MTF13</b>	ut	Pipeta graduada de vidre de 10 mL 1x5	23,58	10	47,16
<b>MTF14</b>	ut	Pipeta Pasteur de vidre 1x250	9,53	150	5,72
<b>MTF15</b>	ut	Punta de pipeta 0'5-20 µL 1x1000	10,50	5	0,05
<b>MTF16</b>	ut	Punta de pipeta 1-200 µL 1x1000	10,50	30	0,32
<b>MTF17</b>	ut	Punta de pipeta 100-1000 µL 1x500	8,20	150	2,46
<b>MTF18</b>	ut	Punta de pipeta 1-5 mL 1x100	15,00	50	7,50
<b>MTF19</b>	ut	Tap de centrífuga PP 50 mL	0,13	3	0,39
<b>MTF20</b>	ut	Tap de goma tipo sèptum 1x30	24,10	10	8,03
<b>MTF21</b>	ut	Tap de propilè/Vial 6 mL 1x100	15,50	5	0,78
<b>MTF22</b>	ut	Tap de propilè/Vial 13'5 mL 1x100	29,50	100	29,50
<b>MTF23</b>	ut	Tap de propilè/Vial 22'5 mL 1x100	49,50	50	24,75
<b>MTF24</b>	ut	Vial de HPLC 1x100	73,00	3	2,19
<b>MTF25</b>	ut	Vial transparent 6 mL 1x100	54,50	10	5,45
<b>MTF26</b>	ut	Vial transparent 13'5 mL 1x100	63,50	100	63,50

**Taula 13:** Cost del pressupost del material fungible (2/2).

Codi	Unitat (ut)	Descripció	Import		
			Preu (€/ut)	Quantitat (ut)	Cost (€)
MTF27	ut	Bobina de paper industrial 45 kg	14,67	1	14,67
MTF28	ut	Caixa guants rebutjables de nitril sense pols talla S 1x100	7,07	100	7,07
MTF29	ut	Eppendorf 1'5 mL 1x500	15,94	45	3,59
MTF30	ut	Flascó tractat per a cultiu cel·lular de 50 mL	10,28	3	30,84
<b>Preu Total Materials Fungibles (€)</b>					<b>454,70</b>

El cost del pressupost parcial per al material fungible ascendeix a la quantitat de: **QUATRE-CENTS CINQUANTA-QUATRE EUROS AMB SETANTA CÈNTIMS.**

#### 1.1.4. MATERIAL NO FUNGIBLE

A continuació, es presenta el pressupost per als materials no fungibles utilitzats en la part experimental d'aquest projecte. S'entén com a material no fungible aquell que està destinat a més d'un sol ús.

**Taula 14:** Cost del pressupost del material no fungible (1/5).

Codi	Unitat (ut)	Descripció	Import					
			Preu (€/ut)	Quantitat (ut)	Temps d'ús (h)	Vida útil (anys)	Cost amortització (€/h)	Cost (€)
MTNF1	ut	Adaptador C2 tubs 50 mL Falcon	1,98	2,00	260	2	0,00050	0,129
MTNF2	ut	Adaptador expansió-reducció esm. H-24/29 M-19/26	6,61	1,00	10	2	0,00165	0,017
MTNF3	ut	Adaptador amb oliva en 90 ° 29/32	6,61	1,00	24	2	0,00165	0,040
MTNF4	ut	Bata de laboratori per a dona 100% cotó talla L	20,00	1,00	300	2	0,00500	1,500
MTNF5	ut	Càmera Neubauer	130,38	1,00	1	15	0,00435	0,004

**Taula 15:** Cost del pressupost del material no fungible (2/5).

Codi	Unitat (ut)	Descripció	Import					
			Preu (€/ut)	Quantitat (ut)	Temps d'ús (h)	Vida útil (anys)	Cost amortització (€/h)	Cost (€)
MTNF6	ut	Columna HPLC fase reversa	675,00	1,00	8	2	0,16875	1,350
MTNF7	ut	Cristal·litzador Pyrex 300 mL	4,25	1,00	10	2	0,00106	0,011
MTNF8	ut	Cronòmetre	9,36	3,00	150	2	0,00702	1,053
MTNF9	ut	Cubeta de quars tipus 3 roscada, feix de llum 10 mm	357,11	6,00	100	5	0,04285	4,285
MTNF10	ut	Embut de decantació cònic amb clau de pas PTFE boca 24/29 250 mL	27,09	1,00	24	2	0,00677	0,163
MTNF11	ut	Embut de rama curta $\phi$ 50 mm	1,11	1,00	1	2	0,00028	0,000
MTNF12	ut	Espàtula cullera plana 210 mm, acer inoxidable	3,99	1,00	2	10	0,00020	0,000
MTNF13	ut	Extractor Soxhlet de vidre de borosilicat Quickfit 50 mL	127,68	1,00	24	2	0,03192	0,766
MTNF14	ut	Graella per a tubs eppendorf per a 80 puntes	3,00	1,00	3	10	0,00015	0,000
MTNF15	ut	Graella per a 16 cubetes de quars	9,59	1,00	20	10	0,00048	0,010
MTNF16	ut	Graella per a tubs de pyrex o tubs RMN d'hacer inoxidable	17,00	1,00	1	10	0,00085	0,001
MTNF17	ut	Marcador per a laboratori Edding Blau punta M	3,37	1,00	10	5	0,00034	0,003
MTNF18	ut	Marcador per a laboratori Edding Negre punta F	3,37	1,00	10	5	0,00034	0,003
MTNF19	ut	Matràs aforat de fons redó de 50 mL	3,09	1,00	24	2	0,00077	0,019

**Taula 16:** Cost del pressupost del material no fungible (3/5).

Codi	Unitat (ut)	Descripció	Import					Cost (€)
			Preu (€/ut)	Quantitat (ut)	Temps d'ús (h)	Vida útil (anys)	Cost amortització (€/h)	
MTNF20	ut	Matràs aforat de fons redó de 125 mL	4,05	1,00	24	2	0,00101	0,024
MTNF21	ut	Matràs esfèric de fons redó i tres colls de vidre borosilicat de 250 mL	333,03	1,00	3	2	0,08326	0,250
MTNF22	ut	Morter amb mà d'agata de 15 mL	116,00	1,00	1	20	0,00290	0,003
MTNF23	ut	Safata de poliestiré d'elevat impacte 0,8 L	8,65	1,00	2,25	5	0,00087	0,002
MTNF24	ut	Pinces d'acer inoxidable rectes per a dissecció	16,42	1,00	1	15	0,00055	0,001
MTNF25	ut	Pinces de subjecció universals de 4 dits	5,94	2,00	30	15	0,00040	0,012
MTNF26	ut	Pipeta automàtica de 0,5-10 µL	75,10	1,00	0,2	5	0,00751	0,002
MTNF27	ut	Pipeta automàtica de 10-100 µL	75,10	1,00	2	5	0,00751	0,015
MTNF28	ut	Pipeta automàtica de 20-200 µL	75,10	1,00	2	5	0,00751	0,015
MTNF29	ut	Pipeta automàtica de 100-1000 µL	75,10	1,00	2	5	0,00751	0,015
MTNF30	ut	Pipeta automàtica de 1-5 mL	75,10	1,00	3	5	0,00751	0,023
MTNF31	ut	Pipeta electrònica o multicanal 8 canals i de 20-200 µL	532,48	1,00	6	5	0,05325	0,319
MTNF32	ut	Pipetejador automàtic professional amb bateria híbrida de metall-niquel	568,00	1,00	3	5	0,05680	0,170
MTNF33	ut	Proveta graduada de 10 mL	3,13	1,00	1	2	0,00007	0,000

**Taula 17:** Cost del pressupost del material no fungible (4/5).

Codi	Unitat (ut)	Descripció	Import					
			Preu (€/ut)	Quantitat (ut)	Temps d'ús (h)	Vida útil (anys)	Cost amortització (€/h)	Cost (€)
MTNF34	ut	Proveta graduada de 50 mL	4,35	1,00	1	2	0,00009	0,000
MTNF35	ut	Proveta graduada de 100 mL	5,52	1,00	1	2	0,00035	0,000
MTNF36	ut	Proveta graduada de 250 mL	9,96	1,00	1	2	0,00031	0,000
MTNF37	ut	Suport de cautxu per a matraços de fons redó $\phi$ 100	5,30	3,00	30	10	0,00080	0,024
MTNF38	ut	Suport peu de plat d'acer inoxidable	31,00	1,00	36	10	0,00155	0,056
MTNF39	ut	Tap de vidre cap hex. 24/29	3,94	2,00	40	10	0,00039	0,016
MTNF37	ut	Suport de cautxu per a matraços de fons redó $\phi$ 100	5,30	3,00	30	10	0,00080	0,024
MTNF38	ut	Suport peu de plat d'acer inoxidable	31,00	1,00	36	10	0,00155	0,056
MTNF39	ut	Tap de vidre cap hex. 24/29	3,94	2,00	40	10	0,00039	0,016
MTNF40	ut	Tetina de goma làtex per a pipetes Pasteur	0,14	2,00	3	1	0,00014	0,000
MTNF41	ut	Tubs d'assaig de Pyrex	150,02	2,00	31	2	0,00075	0,023
MTNF42	ut	Tubs tipus Falcon de 50 mL 1x500	201,45	16,00	216	2	0,00161	0,348
MTNF43	ut	Tubs de quars-William per a RMN	67,60	10,00	12	2	0,02245	0,269
MTNF44	ut	Ulleres de seguretat	8,98	1,00	100	5	0,00090	0,090
MTNF45	ut	Vareta magnètica cilíndrica per a agitar $\phi$ 13/6 mm	0,61	1,00	3	2	0,00015	0,000
MTNF46	ut	Vareta magnètica cilíndrica per a agitar $\phi$ 14'5/15 mm	1,41	1,00	3	2	0,00035	0,001
MTNF47	ut	Vas de precipitats de 100 mL	1,40	3,00	20	2	0,00105	0,021

**Taula 18:** Cost del pressupost del material no fungible (5/5).

Codi	Unitat (ut)	Descripció	Import					Cost (€)
			Preu (€/ut)	Quantitat (ut)	Temps d'ús (h)	Vida útil (anys)	Cost amortització (€/h)	
MTNF48	ut	Vas de precipitats de 250 mL	2,33	3,00	30	2	0,00175	0,052
MTNF49	ut	Vas de precipitats de 500 mL	3,97	3,00	30	2	0,00298	0,089
<b>Preu Total Materials No Fungibles (€)</b>								<b>11,2</b>

El cost del pressupost parcial per als materials no fungible ascendeix a la quantitat de: **ONCE EUROS AMB DOTZE CÈNTIMS.**

### 1.1.5. REACTIUS I DISSOLVENTS

Per al càlcul del pressupost associat als reactius i dissolvents es contemplan aquells utilitzats en el laboratori al llarg del projecte.

**Taula 19:** Cost del pressupost dels reactius i dissolvents (1/2).

Codi	Unitat (ut)	Descripció	Import		
			Preu (€/ut)	Quantitat (ut)	Cost (€)
RD1	L	Acetat d'etil (HPLC), Scharlau	41,40	1,0000	41,40
RD2	mL	Acetonitril-d3, Sigma Aldrich	45,70	2,0000	21,60
RD3	mL	Acetonitril (ACS), Scharlau	43,70	2,0000	87,40
RD4	L	Àcid acètic glacial (ACS), Scharlau	43,52	0,0012	0,05
RD5	g	Albúmina sèrica humana, Sigma Aldrich	96,10	0,1600	15,38
RD6	L	Cloroform (ACS), Scharlau	72,60	0,0100	0,73
RD7	mL	Cloroform-d, Sigma Aldrich	67,71	10,5000	28,44
RD8	mg	Clorpromaziana, Scharlau	154,10	0,0040	0,62
RD9	mg/mL	Demoxepam-Acetonitrilo, Fisher	192,00	1,0000	192,00
RD10	L	Dimetilsulfòxid (ASC), Scharlau	69,55	0,0002	0,01
RD11	L	Etanol (ASC), Scharlau	4,71	0,2500	1,18
RD12	mL	Gibco™ medi cultiu cel·lular amb roig neutre, Fisher	21,80	500,0000	21,80

**Taula 20:** Cost del pressupost dels reactius i dissolvents (2/2).

Codi	Unitat (ut)	Descripció	Import		
			Preu (€/ut)	Quantitat (ut)	Cost (€)
<b>RD13</b>	mL	GibcoTM medi cultiu cel·lular sense roig neutre, Fisher	20,75	500	20,75
<b>RD14</b>	g	Hidroclorur de guadinina, Sigma Aldrich	0,33	10,3200	3,41
<b>RD15</b>	ud	Hurbeplex 10 mg, Librium	2,42	1,0000	2,42
<b>RD16</b>	mL	Solució Tripsina, Sigma Aldrich	35,96	15,0000	5,39
<b>RD17</b>	g	Sulfat de dodecil, Fisher	87,00	0,0040	0,35
<b>RD18</b>	kg	Sulfat de magnesi, Scharlau	32,25	0,1000	3,23
<b>RD19</b>	ud	Tampó de fosfat salí , Sigma Aldrich	1,41	20,0000	28,20
<b>RD20</b>	mL	Tint Roig Neutre, Scharlab	53,34	12,0000	5,12
<b>Preu Total Reactius i Dissolvents (€)</b>					<b>395,56</b>

El cost del pressupost parcial per reactius i dissolvents ascendeix a la quantitat de: **TRES-CENTS NORANTA-CINC EUROS AMB CINQUANTA-SIS CÈNTIMS.**

## 1.2. PRESSUPOST D'EXECUCIÓ DEL MATERIAL

El pressupost parcial del material s'obté mitjançant la suma dels pressupostos parcials assolits en l'apartat anterior. Així doncs, el PEM del projecte serà:

**Taula 21:** Pressupost d'execució material (PEM).

Pressupost	Cost (€)
<b>Enginyeria</b>	11000,00
<b>Equipament</b>	437,24
<b>Material fungible</b>	454,70
<b>Material no fungible</b>	11,20
<b>Reactius i dissolvents</b>	532,21
<b>Pressupost d'Execució Material (PEM) (€)</b>	<b>12435,34</b>

El preu total del pressupost d'execució material ascendeix a: **DOTZE MIL QUATRE-CENTS TRENTA-CINC EUROS AMB TRENTA-QUATRE CÈNTIMS.**



### 1.3. PRESSUPOST GENERAL O PRESSUPOST BASE DE LICITACIÓ

Per al càlcul del pressupost base de licitació es té en compte que les despeses generals (DG) són el 15 % del PEM i el benefici industrial (BI) serà el 6% del PEM, aleshores, la suma de les DG, el BI i el PEM donaran lloc al Pressupost d'Execució per Contracta (PEC). Sabent que l'IVA actualment és del 21 %, es calcula el preu d'aquesta sobre el PEC. Finalment, es calcularà el preu del pressupost base de licitació com la suma del PEC més l'IVA.

Taula 22: Resum del Pressupost base de licitació.

Concepte	Cost (€)
Pressupost d'execució material (PEM)	12435,34
15 % Despeses Generals (DG)	1865,30
6% Benefici Industrial (BI)	746,12
Pressupost d'Execució per Contracta (PEC)	15046,76
21 % IVA	3159,82
<b>Pressupost Base de Licitació (€)</b>	<b>18206,58</b>

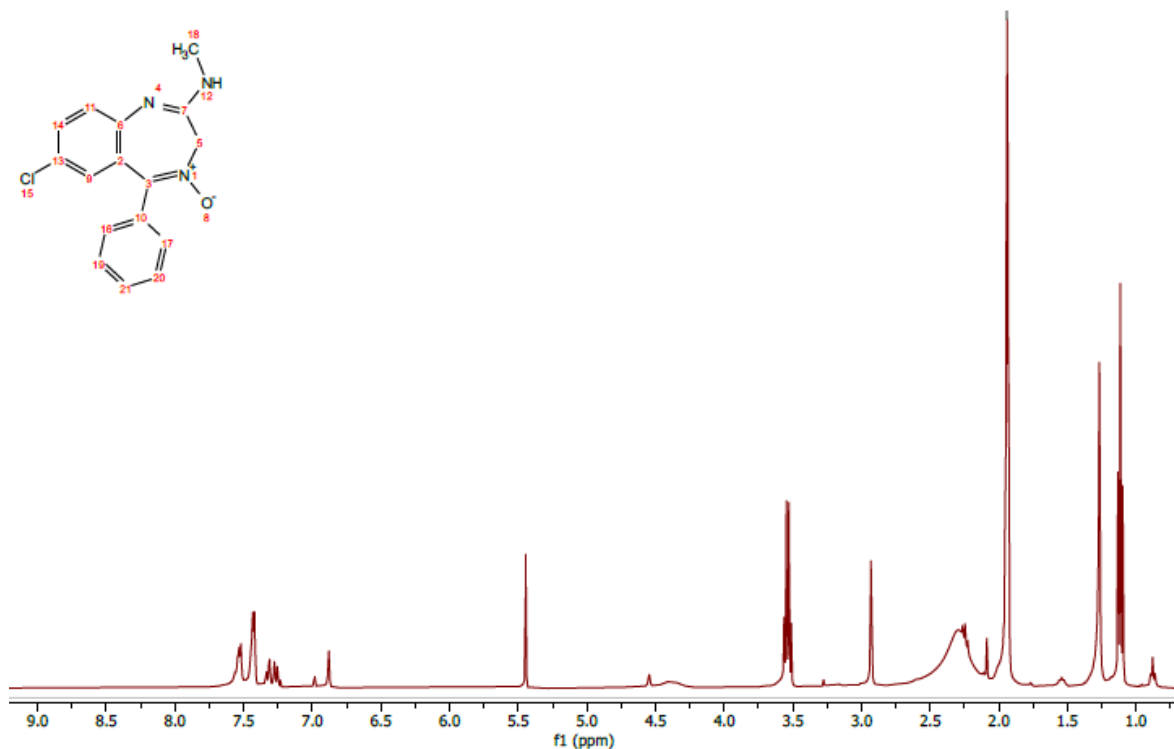
El pressupost total del projecte ascendeix a: **DIHUIT MIL DOS-CENTS SIS EUROS AMB CINQUANTA-HUIT CÈNTIMS.**

# **ANNEX**



## A ESPECTRE CDZ EN ACETONITRIL

L'espectre que s'obté al mesclar el fàrmac obtingut de la síntesi amb acetonitril deuterat com a dissolvent es el següent.



**Figura 43:** Espectre de <sup>1</sup>H-RMN del clordiazepòxid en CD<sub>3</sub>CN.

## B CARACTERITZACIÓ FOTOFÍSICA, FOTOQUÍMICA I FOTOBIOLOÈGICA

### B1 TAULES PER A L'ESTUDI DE LA INTERACCIÓ COMPOST-PROTEÏNA

**Taula 23:** Dissolucions a preparar per a l'assaig CDZ-ASH.

Concentració CDZ ( $\mu\text{M}$ )	Equivalents ASH	Concentració ASH ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{CDZ}}$ ( $\mu\text{L}$ )	$V_{\text{ASH}}$ ( $\mu\text{L}$ )	$V_{\text{Total}}$ (mL)
20	0	0	60	0	3
	0'2	4		12	3
	0'5	10		30	3
	1	20		60	3
	2	40		120	3

**Taula 24:** Dissolucions a preparar per a l'assaig DEM-ASH.

Concentració DEM ( $\mu\text{M}$ )	Equivalents ASH	Concentració ASH ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{DEM}}$ ( $\mu\text{L}$ )	$V_{\text{ASH}}$ ( $\mu\text{L}$ )	$V_{\text{Total}}$ (mL)
20	0	0	17'2	0	3
	0'2	4		12	3
	0'5	10		30	3
	1	20		60	3
	2	40		120	3

**Taula 25:** Dissolucions a preparar amb diverses concentracions d' ASH.

Equivalents ASH	Concentració ASH ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{ASH}}$ ( $\mu\text{L}$ )	$V_{\text{Total}}$ (mL)
0'2	4	12	3
0'5	10	30	3
1	20	60	3
2	40	120	3

## B2 ASSAIG NRU

En primer lloc, es van a exposar les concentracions utilitzades per a realitzar l'assaig NRU descrit en l'apartat 4.2.3.4 en les Taules 26 i 27.

**Taula 26:** Volum de dissolució de estoc a afegir per a cada concentració en funció del compost.

Compost	Concentració d'estoc (mM)	Concentració alíquota (µM)	Volum alíquota (µL)	Volum estoc (µL)
CPZ	4	500	100	12'5
		100		2'5
	1	500		5
		25		2'5
	0'5	12'5		2'5
		6'25		2'5
	0'25	3'13		1'3
		1'57		0'65
SDS	4	1000	100	25
		500		12'5
		100		2'5
	1	500		5
		25		2'5
	0'5	12'5		2'5
		0'25		6'25
	3'13			1'3
CDZ	25	500	100	2
		250		1
	10	100		1
	5	50		1
	2'5	25		1
	1	10		1
	0'5	5		1
	0'25	2'5		1

A partir de les dades de la Taula 26 es calcula les alíquotes que cal preparar a partir de la dissolució mare de 4 mM per als compostos de control i de 25 mM per al CDZ. La resta per a afegir fins al volum total serà PBS per a CPZ i SDS i DMSO per a CDZ.

**Taula 27:** Càlcul de les alíquotes a preparar de cada compost a partir de la dissolució de estoc de cadascun.

Compost	Concentració alíquota (mM)	Volum alíquota (µL)	Volum total (µL)
<b>CPZ</b>	1	25	100
	0'5	50	
	0'25	50	
<b>SDS</b>	1	50	200
	0'5	50	100
	0'25	50	100
<b>CDZ</b>	10	20	50
	5	25	
	2'5	25	
	1	20	
	0'5	25	
	0'25	25	

### B3 IRRADIACIÓ COMPOST-PROTEÏNA

Els volums de cada fàrmac i de proteïna a afegir en cada dissolució son els mostrats en la Taula 28. El volum restant fins a assolir els 6 mL de cada dissolució correspon a volum de PBS.

**Taula 28:** Volum de dissolució de fàrmac i de proteïna que cal incorporar en cada mostra.

Dissolució	V <sub>fàrmac</sub> (µL)	V <sub>ASH</sub> (µL)	V <sub>Total</sub> (mL)
CDZ-ASH (1:2)	34'4	240	6
DEM-ASH (1:2)	120	240	6
ASH		240	6

## C SEGURITAT

A continuació es detallaran els pictogrames de seguretat, les indicacions de perill i les declaracions de prudència dels reactius químics utilitzats en la realització d'aquest treball, els quals han sigut els següents: acetat d'etil, àcid acètic, acetonitril, diclormetà, dimetilsulfòxid i tampó salí de fosfat (PBS).

### C1 ACETAT D'ETIL

- **Identificació del producte:**

- Nom del producte: Acetat d'etil
- Cat No.: 268350000; 268350010; 268350025; 268350040
- Sinònim: Ester etílic de l'àcid acètic
- N° CAS: 141-78-6
- N° CE: 205-500-4
- Fórmula molecular:  $C_4H_8O_2$
- N° de registre REACH: 01-2119475103-46

- **Pictogrames de seguretat:**



- **CLP classificació**

- Perill físic:
  - Líquids i vapors molt inflamables
- Perill per a la salut:
  - Lesions o irritacions oculars greus
  - Toxicitat específica de l'òrgan blanc (única exposició)
- Perill per al medi ambient:
  - A la vista de les dades disponibles, no es compleixen els criteris de classificació

- **Indicació(ns) de perill:**

- H225 Líquid i vapors molt inflamables.
- H319 Provoca irritació ocular greu.
- H336 Pot provocar somnolència o vertigen.



- EUH066 L'exposició repetida pot provocar sequedat o formació de clivelles en la pell.
- **Declaració(ns) de prudència:**
  - P210 Mantenir allunyat de la calor, superfícies calentes, espurnes crides al descobert i altres fonts d'ignició. No fumar.
  - P240 Presa de terra i enllaç equipotencial del recipient i de l'equip receptor.
  - P243 Presa de mesures de precaució davant descàrregues elèctriques.
  - P261 Evitar respirar la pols/ el fum/ el gas/ la boira/ els vapors/ l'aerosol.
  - P280 Portar guants/peces/portes mala sort/màscara de protecció.
  - P303 + P361 + P353 EN CAS DE CONTACTE AMB LA PELL (o els pels): Llevar-se immediatament les peces contaminades. Rentar-se la pell amb aigua o dutxar-se.
  - P305 + P351 + P338 EN CAS DE CONTACTE AMB ELS ULLS: Esbandir amb aigua acuradament durant diversos minuts. Llevar les lents de contacte quan siguin presents i puga fer-se amb facilitat. Prosseguir amb la rentada.
  - P403 + P235: Emmagatzemar en un lloc ben ventilat. Mantenir en un lloc fresc.

## C2 ACETONITRIL

- **Identificació del producte:**
  - Nom del producte: Acetonitril
  - Cat No.: A955-212, A955-500, A955-1
  - Sinònim: AN; Clorur de metil
  - N° CAS: 75-05-8
  - N° CE: 200-835-2
  - Fórmula molecular: C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N
  - N° de registre REACH: : 01-2119471307-38

- **Pictogrames de seguretat:**



- **CLP classificació**
  - Perill físic:
    - Líquids inflamables
  - Perill per a la salut:
    - Toxicitat aguda oral
    - Toxicitat aguda cutània
    - Toxicitat aguda per inhalació - vapors
    - Lesions o irritacions oculars greus

- Perill per al medi ambient:
  - A la vista de les dades disponibles, no es compleixen els criteris de classificació
  
- Indicació(ns) de perill:
  - H225 Líquid i vapors molt inflamables.
  - H302 + H312 + H332 Nociu en casos d'ingesta, contacte amb la pell o inhalació.
  - H319 Provoca irritació ocular greu.
  
- Declaració(ns) de prudència:
  - P210 Mantenir allunyat de la calor, superfícies calentes, espurnes crides al descobert i altres fonts d'ignició. No fumar.
  - P261 Evitar respirar la pols/ el fum/ el gas/ la boira/ els vapors/ l'aerosol.
  - P270 No menjar, beure ni fumar durant el seu us.
  - P280 Portar guants/peces/ulleres/màscares de protecció. Llevar les peces de protecció. Llevar les ulleres o la màscara de protecció.
  - P302 + P352 EN CAS DE CONTACTE AMB LA PELL: Rentar amb aigua i sabó abundantment.
  - P304 + P312 EN CAS D'INHALACIÓ: Trucar a un CENTRE D'INFORMACIÓ TOXICOLÒGICA o a un metge si la persona es troba malament.
  - P305 + P351 + P338 EN CAS DE CONTACTE AMB ELS ULLS: Esbandir amb aigua acuradament durant diversos minuts. Llevar les lents de contacte quan siguin presents i puga fer-se amb facilitat. Prosseguir amb la rentada.
  - P403 + P235: Emmagatzemar en un lloc ben ventilat. Mantenir en un lloc fresc.

### C3 ÀCID ACÈTIC

- Identificació del producte:
  - Nom del producte: Àcid acètic glacial
  - Cat No.: A/0360/25, A/0360/27, A/0360/17AU, A/0360/PB08, A/0360/PB15, A/0360/PB17, A/0360/PB21
  - Sinònim: Àcid etanoic, àcid acètic glacial, àcid metacarboxílic
  - N° CAS: 64-19-7
  - N° CE: 200-580-7
  - Fórmula molecular: C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>
  - N° de registre REACH: : 01-2119475328-30
  
- Pictogrames de seguretat:



- **CLP classificació**

▪ **Perill físic:**

- Líquids inflamables

▪ **Perill per a la salut:**

- Corrosió o irritació cutània
- Lesions o irritacions oculars greus

▪ **Perill per al medi ambient:**

- A la vista de les dades disponibles, no es compleixen els criteris de classificació

- **Indicació(ns) de perill:**

- H226 Líquid i vapors inflamables.
- H314 Provoca cremades greus en la pell i lesions oculars greus.

- **Declaració(ns) de prudència:**

- P210 Mantenir allunyat de la calor, superfícies calentes, espurnes crides al descobert i altres fonts d'ignició. No fumar.
- P240 Connectar a terra/enllaç equipotencial del recipient i de l'equip de recepció.
- P260 No respirar el gas/els vapors/l'aerosol.
- P280 Portar guants/peces/ulleres/màscara de protecció. Llevar les peces de protecció. Llevar les ulleres o la màscara de protecció.
- P301 + P330 + P331 EN CAS D'INGESTA: Esbandir-se la boca. No provoca vòmits.
- P303 + P361 + P353 EN CAS DE CONTACTE AMB LA PELL: Llevar-se immediatament les peces contaminades. Rentar-se amb aigua i sabó abundantment.
- P304 + P312 EN CAS D'INHALACIÓ: Traslladar la víctima a l'exterior i mantenir-la en repòs en una posició còmoda per a respirar.
- P305 + P351 + P338 EN CAS DE CONTACTE AMB ELS ULLS: Esbandir amb aigua acuradament durant diversos minuts. Llevar les lents de contacte quan siguin presents i puga fer-se amb facilitat. Prosseguir amb la rentada.
- P403 + P235: Emmagatzemar en un lloc ben ventilat. Mantenir en un lloc fresc.

## **C4 DICLORMETÀ**

- **Identificació del producte:**

- Nom del producte: Diclorometà
- Cat No.: D/1857/PB17, D/1857/15, D/1857/17, D/1857/27SS, D/1857/10RSS, D/1857/21RSS, D/1857/24RSS, D/1857/25RSS, D/1857/30RSS, D/1857/34RSS, D/1857/27RSS
- Sinònim: DCM; Clorhídric de metilè
- N° CAS: 75-09-2

- N° CE: 200-838-9
- Fórmula molecular:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$
- N° de registre REACH: : No disponible

- **Pictogrames de seguretat:**



- **CLP classificació**

▪ **Perill físic:**

- A la vista de les dades disponibles, no es compleixen els criteris de classificació

▪ **Perill per a la salut:**

- Corrosió o irritació cutània
- Lesions o irritacions oculars greus.
- Carcinogenicitat.
- Toxicitat específica de l'òrgan blanc (única exposició).

▪ **Perill per al medi ambient:**

- A la vista de les dades disponibles, no es compleixen els criteris de classificació

- **Indicació(ns) de perill:**

- H315 Provoca irritació cutània.
- H319 Provoca irritació ocular greu.
- H336 Pot provocar somnolència o vertigen.
- H351 Se sospita que provoca càncer.

- **Declaració(ns) de prudència:**

- P261 No respirar la boira/els vapors/l'aerosol.
- P280 Portar guants/peces/ulleres/màscara de protecció. Llevar les peces de protecció. Llevar les ulleres o la màscara de protecció.
- P302 + P352 EN CAS DE CONTACTE AMB LA PELL: Rentar amb aigua i sabó abundantment.
- P305 + P351 + P338 EN CAS DE CONTACTE AMB ELS ULLS: Esbandir amb aigua acuradament durant diversos minuts. Llevar les lents de contacte quan siguin presents i puga fer-se amb facilitat. Prosseguir amb la rentada.
- P312 Trucar a un CENTRE D'INFORMACIÓ TOXICOLÒGICA o a un metge en cas de malestar.

### **C5 DIMETILSULFÒXID**

No es tracta d'una substància o mescla perillosa segons l'acord amb el Reglament (CE) n° 1272/2008.

### **C6 TAMPÓ SALÍ DE FOSFAT**

No es tracta d'una substància o mescla perillosa segons l'acord amb el Reglament (CE) n° 1272/2008.

Estudi fotoquímic i fotofísic de l'ansiolític clordiazepòxid i el seu metabòlit demoxepam.

---