

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Proteínas como microrreactores en fotoquímica

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO/A: Vicente Tomás Monje López

TUTOR/A: María Consuelo Jiménez Molero

COTUTOR/A: Miguel Ángel Miranda Alonso

Curso Académico: 2013-2014

VALENCIA, lunes 30 de Junio de 2014



Proteínas como microrreactores en fotoquímica

Resumen

Las proteínas se consideran macromoléculas únicas por su compleja estructura espacial y la diversidad de funciones que desempeñan en los sistemas biológicos. Desde hace algunos años se conocen con detalle muchas de esas estructuras y mecanismos por los que algunas de ellas hacen gala de unas propiedades físicas, químicas y biológicas que no se dan en ningún otro compuesto químico. En este trabajo se ha planteado utilizar los sitios de unión de la albúmina sérica humana y bovina como microrreactores. Tienen un alto grado de similitud de secuencia y una estructura tridimensional muy parecida. Cada una posee dos cavidades distintas formadas por aminoácidos con marcado carácter apolar. En estas regiones de la proteína (llamadas sitio I y sitio II) se unen multitud de moléculas de naturaleza hidrofóbica, como hormonas esteroideas, ácidos grasos, fármacos, etc. Será en estas cavidades donde presumiblemente se producirá la fotorreacción.

Se ha elegido como molécula de estudio el ácido fenofíbrico, un fármaco utilizado para disminuir los niveles de triglicéridos en sangre. Esta molécula tiene propiedades fotoquímicas interesantes ya que tiene como cromóforo la benzofenona. Este cromóforo tras absorber un fotón de luz promueve electrones al estado energético excitado singlete con un rendimiento cuántico de cruce intersistemas que es prácticamente la unidad.

El estado excitado triplete es muy sensible al microambiente que lo rodea. Se ha utilizado esta propiedad para obtener información sobre el tipo de interacción que hay entre la proteína y el ácido fenofíbrico que se une a ella. Los tiempos de vida del estado excitado triplete del ácido fenofíbrico unido a la proteína resultaron ser hasta 30 veces más largos que en disolución acuosa, indicando que en los sitios de unión de HSA y BSA existen condiciones que favorecen la prolongación del tiempo de vida de dicho estado excitado. Entre estos factores cabe destacar las restricciones conformacionales o la dificultad que tiene el oxígeno presente en la disolución para penetrar en el sitio activo.

Se han estudiado las propiedades fotofísicas del complejo fármaco-proteína así como su reactividad fotoquímica en experimentos de irradiación en fotorreactor. La fotoreactividad del ácido fenofíbrico dentro de la proteína ha resultado ser menor que la de

este libre en disolución. La distribución de los fotoproductos resultó ser distinta tanto entre las proteínas y el medio libre, así como entre la proteína humana y la bovina.

Palabras clave: proteínas, albúmina sérica, sitio de unión, ácido fenofíbrico, fotorreactividad, fotólisis de destello láser, estado excitado triplete.

Autor: Vicente Tomás Monje López

Localidad: Valencia, Junio de 2014

Tutor académico: María Consuelo Jiménez Molero

Cotutor: Miguel Ángel Miranda Alonso

Tipo de licencia: Creative commons (Reconocimiento, No Comercial, Sin obras derivadas)

Proteins as microreactors in photochemistry

Abstract

Proteins are macromolecules considered unique because of its complex spatial structure and diversity of roles in biological systems. Some years ago many of these structures are known in detail, and also the mechanisms which some of them boast physical, chemical and biological properties that are not found in any other chemical compound. In this work it has been proposed to use the binding sites of human and bovine serum albumin as microreactors. These proteins have a high degree of sequence similarity and a very similar three-dimensional structure. It has been well characterized that each protein contains two well-defined cavities (site I and site II) composed of aminoacids of polar and non-polar nature; these cavities are able to accommodate molecules of different nature, such as steroid hormones, fatty acids, drugs, etc. It is in these cavities where the photoreaction will occur.

Fenofibric acid has been used as a model probe to study its interaction and photoreactivity within proteins. Its main pharmacological function is to reduce the triglyceride blood levels. This molecule has interesting photochemical properties due to the high intersystem crossing efficiency to reach the triplet excited state; thus, its photoreactivity will take place from this excited state.

The triplet excited state is very sensitive to the surrounding microenvironment. This property has been used to get information on the type of interaction between the protein and fenofibric acid. The lifetimes of the excited triplet state of fenofibric acid bound to the protein were found to be up to 30 times longer than in aqueous solution. This effect can be attributed to a slower deactivation *via* non-radiative processes, due to important restrictions in the degrees of freedom inside the protein binding sites, where the microenvironment may protect the triplet excited state from attack by reagents such as oxygen or other FA molecules.

We have studied the photophysical properties of the drug-protein interactions and its photochemical reactivity. The photoreactivity of fenofibric acid within the protein was resulted lower than in free solution. The resulting distribution of photoproducts differs

between proteins and thus free medium. Moreover, it was also observed different distribution of photoproducts between human and bovine albumins.

Keywords: protein, serum albumin binding site, fenofibric acid, photoreactivity, laser flash photolysis, excited triplet state.

Author: Vicente Monje Tomás López

Location: Valencia, June 2014

Academic Tutor: Maria Consuelo Jiménez Molero

Cotutor: Miguel Angel Alonso Miranda

License type: Creative commons (Attribution, Non comercial, No Derivate Works)

Agradecimientos

Cada vez que nos enfrentamos a lo desconocido nuestra mente inconscientemente trata de protegernos, quizá esta sea una adaptación natural para que no entremos en nuevos hábitats en los que no podremos desenvolvernos con la misma agilidad y destreza que en el original. No obstante el ser humano tiene la capacidad de ir en contra de su instinto. Es de hecho, lo que muchos llaman curiosidad, intención de explorar, inquietud, descubrimiento... Estas son palabras que describen la esencia de la naturaleza humana. La frase de aliento que daría a cualquier persona que flaquea en el camino de la vida simplemente sería: "Sé un ser humano".

Gracias a mis padres por haber hecho posible que llegue tan lejos, gracias por animarme en mis momentos de flaqueza. Su apoyo y consejo han sido para mí más importante de lo que nunca imaginarían.

Gracias a mi hermano por enseñarme la otra cara de la vida, estoy seguro de que llegarás muy lejos. Ahora empieza tu propia historia.

Gracias a Soledad Martínez Puche, mi abuela, una mujer llena de la sabiduría que otorga la edad. Una guía desde mi más tierna infancia quiero dirigirme especialmente a ella porque mío es el futuro, pero suyos, los recuerdos.

Gracias a mis amigos, prácticamente desde que supimos hablar han sido como hermanos, salvando que dormíamos bajo techos diferentes. Las experiencias y aventuras que vivimos juntos han hecho que sepa el camino que quiero seguir.

Gracias a Ana Monserrat Martínez por ayudarme a darme cuenta de que la elección ya estaba hecha cuando yo empezaba a hacerle la pregunta. Para mi eres una referencia, un apoyo y una persona de la que no me quiero olvidar aunque pasen los años.

Gracias a Dani, Neus, Oscar, Raul, Chris, Yameiri, Manolo y tantos otros por ser tan geniales, por amenizar los somnolientos lunes y por no perder nunca la paciencia. Se que no os gusta que lo diga, pero una vez más, gracias.

Gracias a mis tutores de trabajo Chelo Jiménez y Miguel Ángel Miranda por la oportunidad que me habéis brindado al aceptar a un biotecnólogo en el equipo. A pesar del poco tiempo que nos conocemos os habéis ganado toda mi admiración y respeto tanto como profesionales como personas.

Finalmente quiero dar las gracias a Nacho Vayá, mi gran maestro. Me has enseñado mucho más que fotoquímica, quizá más de lo que nunca se pueda aprender en un aula. Gracias por no perder nunca el ánimo mientras tenías un pupilo al que enseñarle todo y por nunca descartar una idea. Contigo he aprendido a sentir la misma ilusión por la ciencia.

A la gente de ciencia

Abreviaturas y símbolos

HSA	Albúmina sérica humana
BSA	Albúmina sérica bovina
FA	Ácido fenofíbrico
LFP	Fotólisis de destello láser
PBS	Tampón fosfato pH 7'4
DCM	Diclorometano
HAc	Ácido acético
t	Tiempo medio de vida del estado triplete
A	Coficiente del término exponencial de la ecuación de desaparición

Indice

1. Introducción	1
1.1. Generalidades	1
1.2. Proteínas como microrreactores	2
1.3. Albúminas séricas	3
1.4. Ácido fenofíbrico como molécula de estudio	6
1.5. Fotoquímica y fotofísica	11
2. Objetivos	14
3. Material y métodos	15
4. Resultados y discusión	21
5. Conclusiones	35
6. Referencias	36

Anexos:

Anexo 1: Identificación y caracterización del ácido fenofíbrico y sus fotoproductos

Anexo 2: Fotólisis de destello láser

Anexo 3: Rectas de calibrado para HPLC analítico de FA y sus fotoproductos

Indice de figuras

1. Introducción	
Figura 1.1. Cambio de conformación de la hexoquinasa	2
Figura 1.2. Estructura terciaria de HSA	4
Figura 1.3. Estructura terciaria de BSA	5
Figura 1.4. Ácido fenofíbrico.	6
Figura 1.5. Fotodegradación de FA en PBS	9
Figura 1.6. Distribución de los fotoproductos	9
Figura 1.7. Fotoconversión de FA con diferentes atmósferas	10
Figura 1.8. Diagrama de Jablonsky modificado	12
2. Objetivos	
3. Materiales y métodos	
4. Resultados y discusión	
Figura 4.1. Espectro UV-vis de FA, HSA y BSA	21
Figura 4.2. Cromatograma de FA y sus fotoproductos	22
Figura 4.3. Porcentaje de fotoproductos tras 40 min en PBS y atmósfera de aire ²³	
Figura 4.4. Proporción de fotoproductos tras 20 y 40 minutos de irradiación	24
Figura 4.5. Cinética de reacción del fotoproducto 1	25
Figura 4.6. Cinética de reacción del fotoproducto 2	26
Figura 4.7. Cinética de reacción del fotoproducto 3	26
Figura 4.8. Cinética de reacción de FA	27
Figura 4.9. Irradiación de FA en PBS irradiado a distintos tiempos	28
Figura 4.10. Señal del estado triplete cuando FA libre y unido a HSA	29
Figura 4.11. Porcentaje de FA: libre, unido al sitio II y unido al sitio I	33
5. Conclusiones	
6. Referencias	

Índice de tablas

1. Introducción

Tabla 1.1. Tiempos característicos de los principales procesos fotofísicos.	12
--	----

2. Objetivos

3. Materiales y métodos

4. Resultados y discusión

Tabla 4.1. Tiempos de vida (μs) del estado excitado triplete	31
--	----

Tabla 4.2. Porcentaje de FA libre, unido al sitio I y unido al sitio II	32
--	----

5. Conclusiones

6. Referencias

1. Introducción

1.1 Generalidades

Las proteínas son las biomoléculas de mayor diversidad en la naturaleza y constituyen un elevado porcentaje del peso de la célula. Se encuentran en todas las estructuras y compartimentos celulares, regulando y posibilitando prácticamente todas las reacciones que en ellos ocurren (Alberts *et al.* 2002). También son secretadas fuera de la célula por lo que se encuentran en prácticamente todos los tejidos del organismo.

La diversidad y abundancia de la que hacen gala responde a la enorme variedad de funciones que se les atribuyen y es provista por la enorme cantidad de combinaciones posibles entre los 20 aminoácidos que las forman. Desde el punto de vista estructural, las proteínas pueden ser consideradas como polímeros lineales formados por aminoácidos. Estos difieren entre sí solamente en la naturaleza de sus cadenas laterales, y es esta variedad de grupos funcionales la que dota a las proteínas de su potencia como herramientas biológicas (Branden y Tooze, 1999).

La estructura tridimensional de las proteínas se define por tres factores:

- Posición de los aminoácidos en la estructura primaria, que posibilita o impide las interacciones entre los aminoácidos o partes de los mismos.
- Fuerzas de atracción o repulsión entre los residuos aminoacídicos.
- Naturaleza del medio en el cual se encuentran la proteína, bien sea en medio acuoso (proteínas globulares), bien en medio lipofílico (proteínas de membrana).

La suma de los tres define el plegamiento de la proteína permitiendo la aparición de dominios funcionales, partes o regiones de la proteína con una función determinada (Barrett y Davies, 2004).

A pesar de tener una estructura espacial determinada, no podemos considerar a las proteínas como rígidos cúmulos de material con una superficie químicamente reactiva. Disponen de zonas móviles estructuradas de manera muy precisa, cuyas acciones mecánicas están acopladas con eventos químicos. Entre las actividades que pueden desempeñar encontramos la unión a ligandos, sitios catalíticos en el caso de los enzimas, anclaje proteína-proteína, reconocimiento y anclaje de secuencias de DNA o transporte de moléculas lipófilas (Nelson & Cox, 2007).

1.2 Proteínas como microrreactores

Entre todos los tipos de proteínas existe un tipo encargado de catalizar y regular reacciones, sin en el cual estas reacciones se darían a velocidades tan lentas que no serían compatibles con los requerimientos biológicos; estas proteínas son las enzimas. No es de extrañar que sea uno de los conjuntos más diversos dentro de la ya variada familia de las proteínas dada la naturaleza tan distinta de las moléculas sobre las que actúan, los sustratos, y la cantidad de procesos químicos que pueden catalizar (Datta & Halder, 2014).

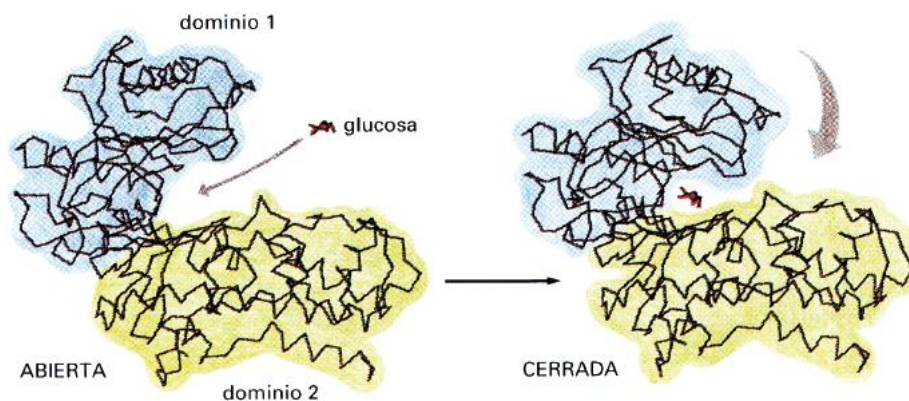


Figura 1.1. Cambio de conformación de la hexoquinasa causado por la unión de la glucosa. La unión de la glucosa cambia la conformación de la proteína desde un estado *abierto* donde se produce la unión a un estado *cerrado* donde se produce la catálisis (Alberts *et al.* 2002).

Al margen de esta actividad de los enzimas que implica unión y cambio de conformación para catalizar las reacciones, se puede utilizar el entorno químico que proporcionan las cavidades de unión a sustrato de las proteínas como un microrreactor. En este microrreactor se química, por ejemplo, por luz, y comparar el efecto producido por el microambiente en la selectividad y la reactividad de los productos obtenidos (Luisi *et al.* 2013).

En el interior de las cavidades la molécula tiene restringidos sus grados de libertad de movimiento formando una especie de matriz estática. Esta rigidez tiene importantes efectos en la reactividad de las moléculas. Si se trata de una ciclación interna y la cavidad de la proteína fuerza a la molécula a que los grupos que tienen que reaccionar estén próximos entre sí, la velocidad a la que se genera el producto de reacción ciclado es mayor que en disolución (Marin *et al.*, 2012). También se han reportado cambios en la selectividad química de la reacción (Marin *et al.*, 2011). A pesar de su importancia en la comprensión de la naturaleza de los sitios de unión y catalíticos, este campo ha sido poco explotado.

1.3 Las albúminas séricas

En este trabajo se ha elegido la albumina sérica humana (HSA) y bovina (BSA) como proteínas modelo por su gran uso en diversos estudios en el campo de la biomedicina, la bioquímica y la fotofísica. Además, se conocen perfectamente su estructura primaria (secuencia de aminoácidos), secundaria y terciaria (están descritas las estructuras de rayos X), su función fisiológica y las moléculas con las que interactúan (Svenson *et al.* 1985).

La albúmina sérica es una proteína sintetizada y secretada por el hígado, circula por la sangre (de ahí su nombre) y puede encontrarse en casi todos los tejidos del cuerpo. Ayuda a mantener el pH y la presión osmótica en la sangre (Sugio *et al.* 1999).

En el contexto biológico, la albúmina es una proteína transportadora que forma complejos con diferentes moléculas poco solubles en medio acuoso aumentando el abanico de moléculas bioactivas que pueden viajar de un extremo a otro dentro del organismo, entre las cuales se encuentran hormonas esteroideas, fármacos y ácidos grasos entre otros (Peters, 1995; Carter & Ho in, 1994). La unión de moléculas a proteínas las retira del medio por lo que reduce su actividad biológica, pero prolonga la vida media por estar menos expuestas a agentes degradantes (Kwing, 1985).

La capacidad que tienen las albúminas de ayudar a la solubilización de sustratos de naturaleza apolar es debida a la presencia de dos sitios de unión como estableció Sudlow en 1975 y que precisó en 1975. Estos sitios son en realidad cavidades en la estructura globular de la proteína formados por aminoácidos lipófilos, que permiten la inserción y estabilización de moléculas por fuerzas de interacción hidrófoba y Van der Waals. De esta manera la molécula apolar viaja en el seno del biopolímero, y este en el interior del medio acuoso ya está completamente disuelto debido a la abundancia de grupos polares en superficie y azúcares añadidos post-traduccionalmente.

1.3.1. Albúmina sérica humana

Es una proteína globular que constituye alrededor del 60% del total de proteína en la sangre. Posee una masa molecular promedio de 66500 Da y consta de 585 aminoácidos, entre los cuales se forman un total de 17 puentes disulfuro; existe un tiol libre (Cys-34) y un único triptófano (Trp-214). Cuando se irradia la proteína a 295 nm absorben todos los aminoácidos

aromáticos, pero el triptófano tiene una energía de emisión más baja que absorbe la radiación proveniente de los demás, por lo que sólo vemos su emisión (X. M & Carter, 1992). Según análisis cristalográficos de rayos-X de HSA, la cadena polipeptídica se dobla formando una hélice de dimensiones aproximadas de 80 x 80 x 30 Å, con cerca del 67% de α -hélice, un 10% de lámina- β y un 23% de cadena extendida.

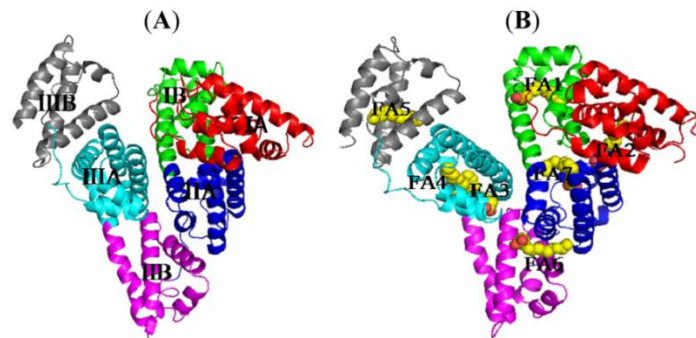


Figura 1.2. (A) Estructura tridimensional de la albúmina sérica humana. (B) localización de las moléculas unidas (amarillo) a la proteína (Lucas *et al*, 2004).

1.3.2 Albúmina sérica bovina

Está compuesta por 583 (Hirayama *et al*. 1990) y su secuencia peptídica presenta una similitud del 76% con respecto a HSA. Sin embargo, BSA posee dos residuos de triptófano en lugar de uno. El primer triptófano, homólogo a HSA, se encuentra en la posición 213, mientras que el segundo se encuentra en la posición 134. Este Trp-134 posee 7 residuos de tirosina (Tyr) próximos, cosa que no ocurre con el residuo de Trp en la posición 213 (En HSA, el Trp-214 tampoco tiene residuos de Tyr próximos). Esta diferencia en la aromaticidad vecinal puede contribuir a que existan diferencias en las propiedades de los dos triptófanos de BSA. El mayor número de triptófanos y grupos aromáticos tiene influencia a nivel macroscópico se observa mayor absorción a 295 nm en la proteína bovina así como mayores rendimientos de fluorescencia.

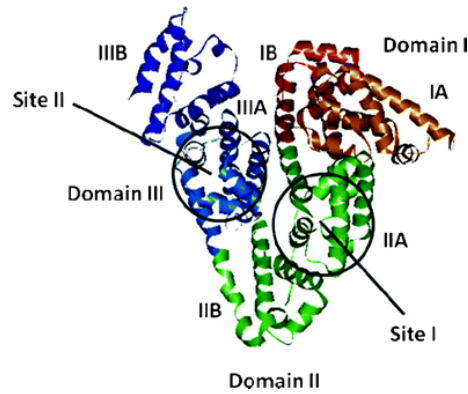


Figura 1.3. Estructura tridimensional de la albúmina sérica bovina. Se indican las regiones donde están localizados los sitios de unión principales.

1.3.3 Sitios de unión

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

Ambas albúminas tienen dos cavidades formadas por aminoácidos hidrofóbicos pero estas no son iguales entre sí. Las diferencias entre ellas provienen de la sustitución de ciertos aminoácidos de carácter apolar por otros distintos pero igualmente apolares (Curry *et al.* 1998). Existen por tanto diferencias en la cavidad donde se va a producir la reacción (Vayá *et al.* 2006), estas diferencias provienen de:

- Diferencias entre proteínas: Diferencia de composición de los sitios de unión en HSA y BSA
- Diferencias dentro de una misma proteína: Sitio I y sitio II tienen diferentes tamaños y diferentes capacidades de interacción con moléculas

En el *sitio I*, las interacciones que predominan son mayoritariamente de tipo hidrofóbicas. (Lapicque *et al.* 1993) Algunas evidencias sugieren que el sitio I es flexible y de gran tamaño (moléculas grandes, como la bilirrubina, interaccionan en él). Esto puede ocasionar que sea más difícil observar estereoselectividad en la interacción con los sustratos. Los aminoácidos que tienen mayor relevancia para la interacción con sustratos como los fármacos son el Trp-214 y la Arg-218.

El *sitio II* es de menor tamaño y menos flexible que el *sitio I* (He *et al.* 1992). Por esta razón, se cree que las interacciones estereoselectivas se pueden observar en mayor grado en esta cavidad. El ejemplo clásico se observa con el L-triptófano, cuya afinidad por el *sitio II* es 100 veces mayor que la del isómero D. Las interacciones que predominan son de tipo puente de hidrógeno y electrostáticas (Lapicque *et al.* 1993). Los aminoácidos Arg-410 y Tyr-411 desempeñan un papel importante en la interacción con los ligandos.

1.4 Ácido fenofíbrico como molécula de estudio

Se ha elegido el ácido fenofíbrico (AF) como molécula de estudio por ser un fármaco del que se posee conocimiento previo de su reactividad fotoquímica y sus propiedades fotofísicas, así como por la alta afinidad que tiene por los sitios de unión de ambas albúminas (superior al 99%). Esta molécula es también interesante porque no hay ningún trabajo previo donde se haya estudiado su interacción con la proteína.

El ácido fenofíbrico se administra en forma de profármaco, el fenofibrato. Entre sus usos principales se destacan el tratamiento de la hipertriglicemia y algunos tipos de dislipidemias mixtas (VADEMECUM, Fenofibrato).

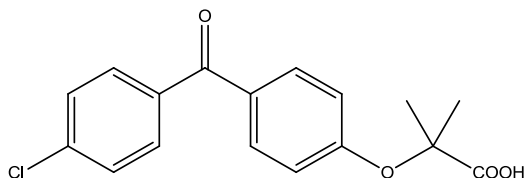


Figura 1.4. Ácido fenofíbrico.

1.4.1 Farmacocinética

La concentración plasmática máxima se alcanza entre las 2 y 4 horas después de la administración oral. Presenta interferencias en la absorción si se toma junto a comida, fenómeno éste que mejora en determinadas presentaciones galénicas como las nanopartículas. El ácido fenofíbrico está fuertemente asociado a la albúmina plasmática (más del 99%); probablemente esto se deba a su estructura química en la que destaca su cromóforo altamente apolar, la benzofenona (Lucas *et al.* 2004).

Después de la administración oral, el fenofibrato es rápidamente hidrolizado en su metabolito activo, el ácido fenofíbrico. Esta hidrólisis es total, no se ha detectado fenofibrato inalterado en el plasma. La eliminación se realiza esencialmente por vía urinaria, siendo esta casi total en 6 días. El fenofibrato se elimina principalmente en forma de ácido fenofíbrico y de su derivado glucuroconjugado.

Estudios farmacocinéticos, después de la administración de dosis única y tratamiento continuo, indican una ausencia de acumulación. El ácido fenofíbrico no se elimina por hemodiálisis. La semivida plasmática de eliminación del ácido fenofíbrico es del orden de 20 horas (AGENCIA ESPAÑOLA DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS, fenofibrato).

1.4.2 Farmacodinámica

Para comprender su mecanismo de acción, cabe recordar que los PPAR, que son receptores nucleares que unen ligandos naturales o sintéticos, forman heterodímeros con otro receptor nuclear y de esta forma regulan, es decir, aumentan o inhiben, la expresión de ciertos genes.

Los fibratos se unen específicamente a los PPAR alfa (existen PPAR alfa, beta y gamma) y, al estimular estos receptores, se estimulan muchas vías metabólicas, entre ellas la beta oxidación de los ácidos grasos. Al disminuir la disponibilidad de ácidos grasos, disminuye la secreción de triglicéridos y se reduce el nivel de estos últimos en el plasma.

Por otra parte, la estimulación de los PPAR alfa inhibe la expresión de APO C3, que inhibe la lipasa lipoproteica, por lo que aumenta el catabolismo de los triglicéridos y disminuye el nivel de éstos en el plasma (Cuevas, 2002).

Además, los PPAR alfa activados por fibratos actúan per se en forma directa sobre la lipasa lipoproteica y estimulan su expresión y, por lo tanto, su actividad: se acelera el catabolismo de los triglicéridos y se disminuye su nivel plasmático. Por último, los PPAR alfa pueden estimular la expresión de APO A1 y APO A2, que son los principales componentes proteicos de HDL, e incrementan el nivel de éste (Najib, 2002).

Los fibratos tienen también efectos extralipídicos y hoy se sabe que, en parte, éstos son mediados por PPAR. Por ejemplo, se ha demostrado que, al estimular el PPAR alfa, los fibratos reducen la expresión de endotelina-1, que es un potente vasoconstrictor, lo que

determina una mejoría de la función endotelial. También por este mecanismo, los fibratos reducen la expresión de citoquinas, especialmente de la IL-1 y la IL-6, de modo que también se podría atribuir a estos fármacos un efecto antiinflamatorio. Se sabe, además, que, mediante PPAR- α , algunos fibratos pueden reducir la expresión del fibrinógeno; de esta manera podrían ejercer un efecto antitrombótico (Fichtenbaum & Gerber, 2002).

Así, por medio de PPAR alfa, los fibratos regulan el metabolismo lipídico y otros factores, lo que los convierte en fármacos útiles para la prevención cardiovascular en cierto tipo de pacientes.

1.4.3 Reactividad fotoquímica.

Al igual que otros fármacos el fenofibrato tiene algunos efectos secundarios, entre ellos respuestas fotoalérgicas caracterizadas por erupciones eritematovesiculares o eccematosas (Leroy *et al.* 1990; Merino *et al.* 1990; Serrano *et al.* 1992; Vargas *et al.* 1992; Gould *et al.* 1995; Marguery *et al.* 1995; Leenutaphong *et al.* 1995). Sin embargo el fenofibrato es solo el profármaco, la forma farmacológicamente activa es el ácido fenofíbrico, que es rápidamente producido por hidrólisis del enlace éster. Como se ha mencionado anteriormente no se detecta la presencia del profármaco en el suero sanguíneo por lo que la desesterificación debe producirse rápida y eficazmente.

Los efectos secundarios de FA son: daño al DNA (Marguery *et al.* 1998), peroxidación de ácidos grasos, hemólisis de eritrocitos (Bosca & Miranda, 1998) y liberación de mediadores inflamatorios por queratinocitos y fibroblastos (Terencio *et al.* 1998). Estos fenómenos no deseados se producen cuando FA recibe luz ultravioleta, ya que su cromóforo (benzofenona) es capaz de absorber fotones en ese rango de longitudes de onda.

Se ha estudiado la fotoreactividad del fármaco en disolución acuosa obteniéndose los fotoproductos que se muestran en la figura 1.5. Cada uno de ellos se testó en un ensayo de toxicidad *in vitro*, en el cual se halló que sólo aquellas moléculas que conservaban la benzofenona intacta producían peroxidación de ácidos grasos y hemólisis de glóbulos rojos (Miranda *et al.* 1994).

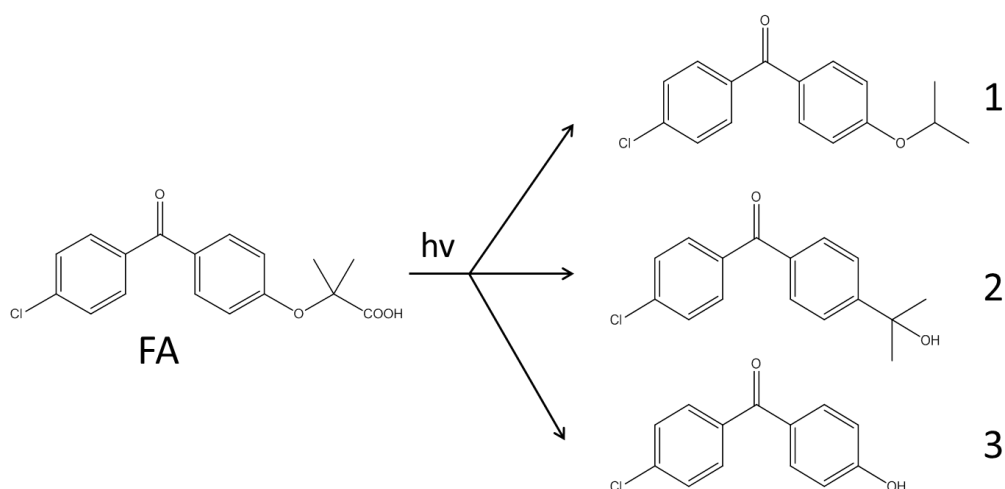


Figura 1.5. Fotodegradación de FA en PBS. 1, 2 y 3 son los tres fotoproductos principales.

En investigaciones previas se ha estudiado cómo afecta la cantidad de oxígeno disuelto en el medio de reacción a la distribución y tipo de las especies químicas obtenidas. Esta realidad debe ser tomada en cuenta ya que en el sitio activo de una proteína la concentración de determinadas moléculas clave en el curso de las reacciones químicas no son iguales que en el medio libre (Vayá *et al.* 2014a).

En la figura 1.6 se muestra cómo afecta la concentración de oxígeno disuelto en el medio a la selectividad de la reacción (Bosca & Miranda, 1999). Cuando la disolución se purga con argón (0/2) el fotoproducto 3 apenas se origina mientras que su presencia es significativa (10.2/25) cuando la disolución se purga con oxígeno puro. El incremento de oxígeno presente ralentiza la reacción necesitándose 25 minutos para llegar al 25% de conversión mientras que sólo se requieren 2 minutos para alcanzar ese punto cuando no hay oxígeno en el medio. El efecto generado por O_2 se comprobó haciendo uso de un agente desactivante de estados excitados triplete (como es el naftaleno, NP). Así, en presencia de NP se necesitó más tiempo para alcanzar el mismo grado de conversión.

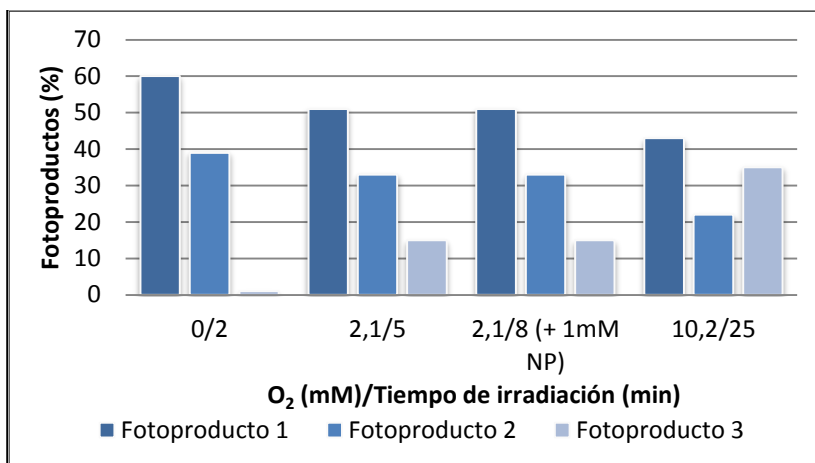


Figura 1.6. Distribución de los fotoproductos tras la fotólisis en metanol de la sal de sodio de FA (25% de conversión) con concentraciones diferentes de oxígeno.

En la figura 1.7 se aprecia que la presencia de oxígeno disminuye el rendimiento de la reacción. Este fenómeno se confirma ya que la adición de otro agente capaz de desactivar el estado excitado triplete, como es NP, genera el mismo resultado. Por tanto, queda demostrado que el oxígeno actúa de una forma similar, siendo capaz de disminuir el rendimiento de fotorreactividad.

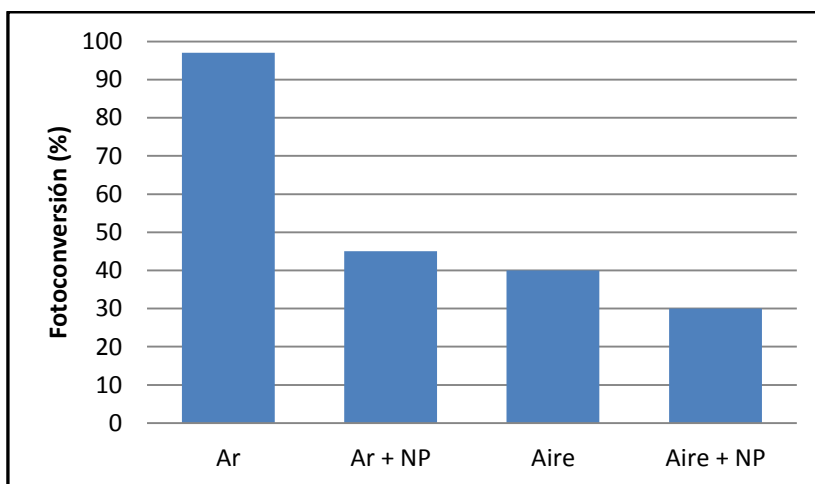


Figura 1.7. Fotoconversión de FA purgado con argón (Ar) o aire ambos en ausencia o presencia de NP.

1.5 Fotoquímica y fotofísica

La fotoquímica es una rama de la ciencia cuyo objeto de estudio son los procesos físicos y químicos que se derivan de la absorción de fotones.

Cuando se dice que una molécula absorbe luz, esta absorción la hace normalmente un cromóforo que forma parte de su estructura. Los electrones del cromóforo pasan a un estado superior de energía que llamamos estado excitado, Debido al incremento de energía, la molécula tenderá a desactivarse para volver al estado energético de menor energía (estado fundamental).

Una molécula en estado excitado tiene dos formas principales de relajación:

- Los **procesos fotoquímicos** hacen referencia a las modificaciones que sufre la molécula en su estructura o conformación cuando se encuentra en el estado excitado, lo que conocemos como fotorreactividad.
- Los **procesos fotofísicos** son aquellos en los que la estructura molecular no se ve afectado por el paso al estado excitado. Son transiciones en las que se producen interconversiones entre estados excitados o entre un estado excitado y el estado fundamental.

A continuación se muestra un diagrama de Jablonsky modificado (Ver figura 1.8) con los procesos fotofísicos más comunes, los cuales pueden ser de naturaleza radiante y no radiante:

Un proceso radiante implica la emisión de radiación electromagnética desde el estado electrónicamente excitado para regresar al estado electrónico fundamental. Son fenómenos radiantes la absorción, fluorescencia, fosforescencia

En un proceso no radiante, la población del estado inicialmente excitado se transfiere a otro estado sin que le acompañe ninguna emisión. Son fenómenos no radiantes la conversión interna, el cruce intersistemas y la relajación vibracional.

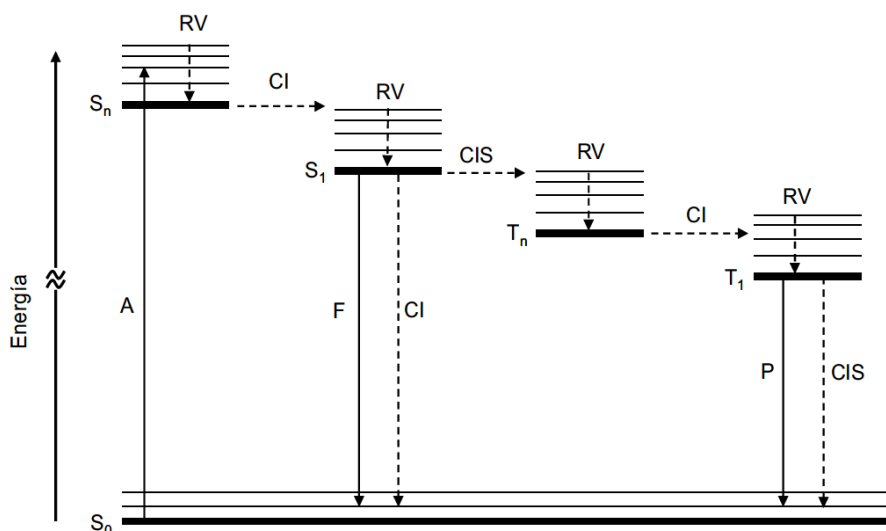


Figura 1.8. Diagrama de Jablonsky modificado, donde se encuentran representados los diferentes niveles de energía (S = singlete y T = triplete) y los procesos posteriores a la absorción de luz (**A**): **F** = fluorescencia; **P** = fosforescencia; **CI** = conversión interna; **CIS** = cruce intersistemas; **RV** = relajación vibracional. Las flechas continuas representan procesos fotofísicos radiantes y las discontinuas procesos no radiantes.

En la tabla X se muestra el tiempo aproximado en que tienen lugar los procesos anteriormente descritos.

Proceso fotofísico	Tiempo (s)
Absorción	10^{-15}
Relajación vibracional	10^{-12} - 10^{-10}
Tiempo de vida del estado excitado S ₁	10^{-10} - 10^{-7}
Conversión interna	10^{-11} - 10^{-9}
Cruce intersistemas	10^{-10} - 10^{-8}
Tiempo de vida del estado excitado T ₁	10^{-6}

Tabla 1.1. Tiempos característicos de los principales procesos fotofísicos.

Entre las características del estado excitado triplete se cuenta la sensibilidad a ser desactivado por moléculas del reactivo, oxígeno disuelto en el medio, o aumento de la vida media por disminución de su movilidad (que impide que se relaje por aumento de su energía vibracional) (Vayá *et al.* 2014b).

Miranda *et al.* han establecido una metodología mediante el uso de la técnica de fotólisis de destello láser (FDL, ver anexo 2) que utiliza el estado excitado triplete de la

Introducción

molécula que se une a la cavidad hidrofóbica de una proteína como sensor del microentorno que rodea a la molécula (Jiménez *et al.* 2005).

2. Objetivos

Objetivo general

Investigar el uso de proteínas como microrreactores y las propiedades que estas presentan en comparación con las reacciones que tienen lugar en disolución.

Objetivos concretos

Estudiar las reacciones fotoquímicas que tienen lugar en el interior de las cavidades de las albúminas séricas tanto humana como bovina. Determinar si existe selectividad en la formación de fotoproductos, aparición de nuevas especies y compararlo con los resultados obtenidos en disolución acuosa.

Además, nos hemos propuesto estudiar el entorno en el que se produce la reacción, es decir, en los sitios de unión de la proteína. La herramienta utilizada será la técnica de fotólisis de destello láser, la cual ya ha sido previamente utilizada para este tipo de estudios.

Finalmente, también nos planteamos como objetivo determinar la distribución de FA en cada uno de los sitios de unión y asociarla con los resultados obtenidos en los estudios de fotoreactividad.

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Reactivos

El ácido fenofibrico se compró a Aldrich (CDS003219-1G). La albúmina sérica humana (A1887-25G) y bovina (A7030-10G) se compraron a Sigma con el 99% de pureza y libre de ácidos grasos. Es importante que no tenga esta fuente de contaminación porque se van a realizar ensayos de formación del complejo fármaco-proteína. El tampón fosfato se obtuvo disolviendo una tableta (Sigma P4417-100TAB) en 200 mL de agua miliQ (Milipore Elix).

Todos los disolventes orgánicos de alta pureza y de calidad HPLC se compraron a Scharlau. El ácido acético glacial (HAc) empleado en la acidificación del acetato de etilo empleado en el análisis por HPLC (0.15%) se compró a Scharlau.

3.1.2 Equipos

Centrífuga:

Hettich Mikro 22R, con capacidad para 6 tubos Falcon de 50mL y posibilidad de refrigerar las muestras hasta -20°C.

Espectrofotómetro:

Jasco, V-630 con una amplitud de longitudes de onda de 200 a 900 nm

Fluorímetro:

Espectros de emisión se registraron utilizando un espectrofluorómetro JASCO FP-8500 provisto de un monocromador en la longitud de onda variable 200-900 nm.

Fotólisis de destello láser:

Sistema de excitación láser de excímero de XeCl ($\lambda_{exc} = 308$ nm, ~ 17 ns de pulso con una potencia ~ 20 mJ por pulso), sistema de detección lámpara de Xe. La longitud de onda de observación fue seleccionada con un monocromador Oriel 77200 y la señal fue amplificada con un sistema de tubo fotomultiplicador Oriel. La señal fue registrada con un osciloscopio Tektronix TDS-640A y transferida a un ordenador. Todos los experimentos fueron hechos con una cubeta de 10×10 mm² de cuarzo con una capacidad de 4 mL y en atmósfera de aire.

Fotorreactor:

Materiales y métodos

Las irradiaciones se llevaron a cabo en un fotorreactor Luzchem LZG-ORG1 con 10 lámparas de 8 W cada una y una banda de emisión con $\lambda_{\max} = 300$ nm. Se irradiaron disoluciones de concentración 10^{-3} M se irradiaron utilizando tubos de pyrex y en atmósfera de aire, oxígeno y nitrógeno.

Instrumentación análisis de las muestras de irradiación:

HPLC analítico Waters conectado a un detector UV-vis PDA Waters 2996. Se utilizó un flujo isocrático ($0,8 \text{ mL min}^{-1}$) de Acetato de etilo (0.15 % HAc)-Hexano (30-70-0.15 v / v) como eluyente, y una columna de fase directa Teknokroma Kromasil 100 Si, $5 \mu\text{m}$ (25 x 0,46 cm).

Intrumentación preparativa para purificación de crudos de irradiación:

Sistema de HPLC preparativo Jasco: desgasificador Jasco DG-2080-54, mezclador Jasco LG-2080-04, bomba PU-2080 plus y detector Jasco UV-1575. Se utilizó un flujo isocrático (2 mL min^{-1}) de Acetato de etilo-Hexano (30-70 v / v) como eluyente y una columna de fase directa Teknokroma Tracer Excel 120 Si, $5 \mu\text{m}$ (25 x 1.0 cm).

Cromatografía de gases-espectrometría de masas:

Cromatógrafo HP-6890 Series con una columna HP 19091S-433 (5% fenil metil siloxano) capilar de $30\text{m} \times 250 \mu\text{m} \times 0.25 \mu\text{m}$, inyector automático Agilent technologies 7683 Series y un detector Agilent 5973 Network (mass selective detector), bomba de alto vacío Edwards G1099-80024. El método consiste en calentar la muestra a analizar a 100°C durante 3 minutos y a continuación subir la temperatura con una rampa de $30^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta llegar a 280°C donde se mantiene durante 15 minutos.

Espectrómetro de resonancia magnética nuclear (RMN):

Bruker avance III (400 MHz). Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón se realizaron usando cloroformo deuterado como disolvente, con TMS como referencia. Los desplazamientos de las señales están expresados en partes por millón (ppm).

3.2 Métodos

3.2.1 Preparación de patrones

Como se ha comentado en la introducción, la irradiación de ácido fenólfíbrico (FA) en medio acuoso tamponado (PBS, pH 7.4) a 300 nm da como fotoproductos los tres compuestos que se muestran en la Figura 1.5. Como no se pueden adquirir comercialmente fue necesario obtenerlas haciendo irradiaciones preparativas FA.

Se probaron diferentes disolventes para la irradiación (acetonitrilo, metanol y PBS), en diferentes atmósferas (aire, oxígeno y nitrógeno). La condición más efectiva para obtener los fotoproductos 1 y 2 fue la disolución de FA en PBS a una concentración de 1mg/mL (primer y tercer pico de HPLC, respectivamente). Sin embargo, la más efectiva para obtener el fotoproducto 3 fue en medio metanol a una concentración de 1mg/mL (tercer pico de HPLC preparativo).

Se favoreció la disolución de FA mediante la inmersión en baño de ultrasonidos durante 1 minuto. En aquellas irradiaciones que se hicieron en atmósfera de nitrógeno u oxígeno se dejó burbujear durante al menos 15 minutos. El tiempo total de irradiación fue de 80 minutos. Cuando el disolvente utilizado no fue agua este se evaporó por destilación a vacío para concentrar el crudo de reacción. De las irradiaciones hechas en PBS se realizaron tres extracciones líquido-líquido consecutivas con el mismo volumen de diclorometano (DCM), de esta manera se consigue tener reactivos y productos en un disolvente fácilmente evaporable. Posteriormente se eliminó todo resto de agua añadiendo Na_2SO_4 anhidro, se filtró la disolución a vacío y se procedió a la evaporación del DCM por destilación a vacío en el rotavapor.

Una vez eliminados los disolventes orgánicos mediante destilación a vacío, este se redisolvió en acetato de etilo de calidad HPLC, se filtró la disolución con un filtro Teknokroma de teflón de 0.22 μm y fue purificado por HPLC preparativo. El cromatograma resultante se asemeja al de la figura 4.2 en la cual se pincharon todos los fotoproductos puros. A cada una de las fracciones del crudo se le hizo un análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), los cromatogramas y espectros de masas se muestran en el anexo 1.

Tras separar y purificar los fotoproductos de reacción del crudo de irradiación, se procedió a medir los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-H^1) utilizando cloroformo deuterado como disolvente (ver anexo 1).

Una vez identificados los fotoproductos 1, 2 y 3 se hizo la cuantificación en masa de cada uno tras haber secado perfectamente cualquier traza de disolvente (15 horas a vacío). Conocida la masa obtenida de cada fotoproducto así como su masa molecular relativa, se procedió a la preparación de rectas de calibrado patrón haciendo uso del HPLC analítico. Para ello se partió de una disolución inicial de concentración 10^{-3} M y se prepararon diluciones seriadas partiendo de la dilución anterior con el fin de reducir el error experimental. Así, se prepararon diluciones de concentración 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M y 10^{-5} M. Cada disolución se analizó por HPLC analítico, se midió el área de cada pico y se tabuló relacionando área y concentración, obteniéndose así 4 rectas patrón correspondientes a FA y a los fotoproductos 1, 2 y 3.

Cada una de las series de productos y concentraciones se analizó por HPLC analítico, se hizo una medida del área del único pico que aparecía y se tabuló relacionando área con concentración de la disolución obteniéndose las 4 rectas patrón: FA y sus tres fotoproductos (Ver anexo 7.2).

3.2.2 Ensayos de fotoreactividad

Se prepararon disoluciones equimolares de fármaco y proteína 10^{-3} M, utilizando tanto albúmina sérica humana como bovina. Se obtuvieron tres series de muestras:

- Disolución de FA en PBS.
- Disolución de FA y HSA en PBS a una relación molar 1:1.
- Disolución de FA y BSA en PBS a una relación molar 1:1.

De cada una de las series se prepararon 25 mL de disolución madre que se dispensó en distintos tubos de ensayo (3.5 mL/tubo). Es importante que los tubos sean de pyrex porque, a diferencia del vidrio normal, este filtra longitudes de onda menores de 300 nm por lo que nos aseguramos que no estamos irradiando la proteína y que se irradia selectivamente el fármaco. Cada disolución se irradió en el fotorreactor multilámpara (λ_{max} 300 nm) durante intervalos de tiempo totales de 0, 2'5, 5, 10, 20, 40 y 80 minutos.

Materiales y métodos

Para cada tiempo de irradiación se cogió el tubo correspondiente de cada serie y se dejó el resto de tubos en el fotorreactor para continuar con las irradiaciones. Se irradian los restantes según la progresión: 0, 2'5, 5, 10, 20, 40 y 80 minutos.

Ejemplo de metodología:

Se retira el tubo de t= 0 min, se irradian las muestras 2'5 min y se retiran los tubos de t=2'5 min; se irradia 2'5 min más y se retiran los tubos de t=5 min, y así sucesivamente hasta llegar a 80 min.

La importancia de dispensar la disolución madre en tubos independientes radica en que FA forma agregados sólidos insolubles al ir progresando la reacción. Si tuviésemos toda la disolución a irradiar en un solo recipiente, al extraer las distintas alícuotas tras cada irradiación, podríamos no coger una muestra homogénea representativa de la concentración real que hay de fotoproductos y de producto de partida no reaccionado, con lo cual se cometería un error experimental mayor.

Los tubos que solo contienen FA en PBS se extraen mediante extracción líquido-líquido con DCM, utilizando volúmenes equivalentes al PBS (unos 3 mL por extracción). La extracción se realiza tres veces consecutivas. Después de cada extracción, se seca el DCM con Na₂SO₄ anhidro, se filtra a vacío y se elimina el disolvente orgánico por destilación a vacío con el rotavapor. El crudo restante se redisuelve en 2 mL de acetato de etilo de calidad HPLC. Cada muestra se analiza en HPLC analítico para determinar las áreas de los picos correspondientes a cada especie química (fotoproductos y producto de partida sin reaccionar).

Los tubos que contienen FA en presencia de proteína deben ser tratados de manera diferente para eliminar la proteína y poder analizar el crudo de reacción por HPLC. Para ello se siguió el siguiente protocolo: el contenido de cada tubo se depositó en un tubo Falcon para centrífuga de 50 mL, se añadió acetona a -20°C en un volumen 4 veces superior al de la disolución de PBS irradiada, se dejó a -20°C durante una hora, transcurrido este tiempo se centrifugó a 6000 rpm durante 20 min, al finalizar se extrajo el sobrenadante y se filtró utilizando filtros de teflón de 0.22 µm de diámetro

de poro, la mezcla de PBS y acetona se evaporó hasta que sólo queda la fase acuosa. A partir de este punto se realizaron extracciones líquido-líquido siguiendo el mismo protocolo que para las disoluciones de FA en PBS.

Del cromatograma de cada muestra analizada por HPLC analítico (FA libre, FA con HSA y FA con BSA; a diferentes tiempos) se determinó el área de cada pico. Haciendo uso de las rectas de calibrado anteriormente descritas, se obtuvo la concentración de fotoproductos y de producto de partida (FA) sin reaccionar.

3.2.3 Fotólisis de destello láser

Esta técnica consiste en la generación de especies excitadas mediante un haz excitador (láser pulsado de elevada intensidad) y el registro de la absorción de estas especies excitadas mediante un haz analizador. El espectro de absorción que se mide es el de UV-vis pudiéndose obtener además la evolución temporal de la absorción.

Procedimiento:

Se preparan tres series de muestras a una concentración de FA de 2.5×10^{-5} M. En este caso se varía la relación fármaco/proteína, según la serie 1:0, 1:0.2, 1:0.4, 1:0.6, 1:0.8, 1:1, 1:1.2, 1:1.4, 1:1.6 y 1:2. Para cada una de estas relaciones molares se prepararon 8 mL de disolución. Se siguió éste procedimiento ya que FA puede degradarse con facilidad generando los fotoproductos descritos, los cuales también son capaces de absorber luz ultravioleta. Así, para evitar realizar medidas de FDL sobre una muestra de FA/proteína degradada, se preparó un volumen suficiente para poder reemplazar la disolución al menos dos veces.

4. Resultados y discusión

4.1 Fotoquímica: Estudios de fotoreactividad.

Uno de los objetivos principales de este trabajo es investigar cómo afecta la presencia de una proteína al desarrollo de una reacción fotoquímica. Para ello se hicieron irradiaciones preparativas a distintos tiempos con FA libre en disolución, y complejoado con cada una de las proteínas.

Se seleccionó una longitud de onda de irradiación a la que FA absorbiese fotones pero no así la proteína como se muestra en la figura 4.1. Se utilizaron lámparas no monocromáticas de longitud de onda de emisión máxima 300 nm, con una banda de longitudes de onda de emisión relativamente ancha (± 20 nm). Las proteínas pueden absorber fotones de longitudes de onda menores de 300 nm, lo cual pretendemos evitar. Para ello, las irradiaciones se realizaron utilizando de tubos de pyrex. Este tipo especial de vidrio bloquea la radiación de longitudes de onda menores de 300 nm previniendo la absorción de la proteína. De esta manera se irradiará selectivamente al fármaco.

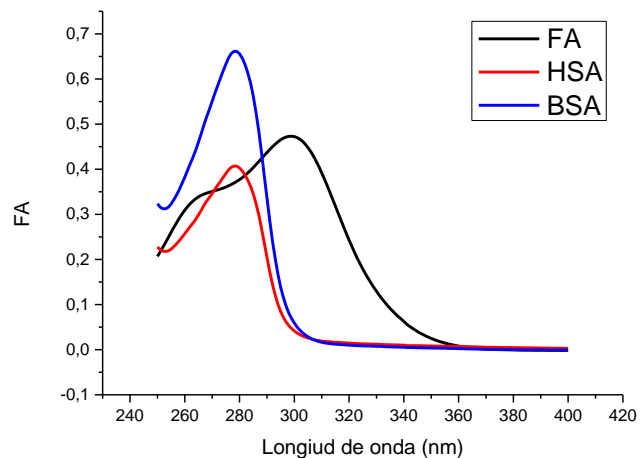


Figura 4.1. Espectro UV-vis de FA, HSA y BSA, todos a una concentración $2,5 \times 10^{-5}$ M.

Dada la cercanía de máximos de absorción de las proteínas, FA y sus fotoproductos (ver anexo 1), no se pudo monitorizar el desarrollo de la reacción mediante el uso de espectros de absorción de UV-vis. Por esta razón, para hacer un buen seguimiento de la desaparición de FA y la aparición de sus fotoproductos se tuvo que recurrir a realizar extracciones tras cada tiempo de irradiación (Ver apartado 3.2.2 Ensayos de fotoreactividad).

Resultados y discusión

El análisis de las concentraciones de FA y los tres fotoproductos se hizo mediante HPLC analítico con una columna de fase directa y eluyente una mezcla 70-30 v / v de hexano/acetato de etilo con 0.15% de HAc. Fue necesaria la adición de un pequeño porcentaje de ácido para mejorar la migración de FA en la fase estacionaria, ya que éste tiene naturaleza ácida e interacciona fuertemente con la columna, dando anchuras de pico considerables. Tras la adición del 0.15% de HAc, mejoró mucho la resolución del cromatograma de FA, obteniéndose picos de mucha menor anchura, lo cual facilitó el análisis cuantitativo de los resultados. En la figura 4.2 se muestra el cromatograma resultante tras analizar una muestra compuesta por FA y sus tres fotoproductos puros.

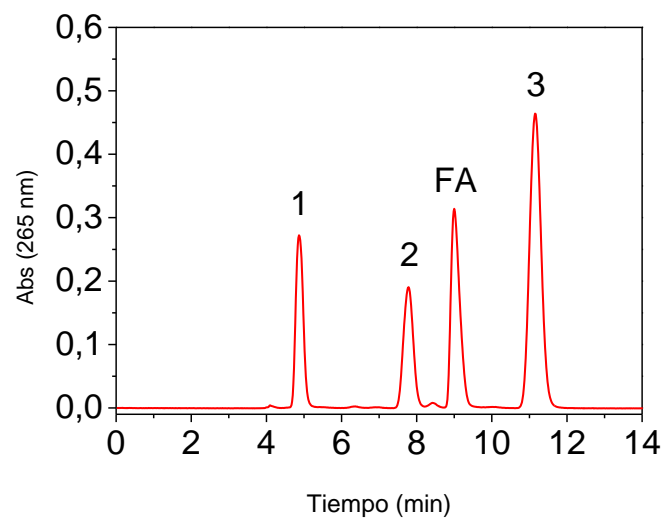


Figura 4.2. Cromatograma de disolución equimolar de FA y sus fotoproductos.

Como punto de partida se realizaron irradiaciones de FA en PBS y atmósfera de aire para identificar los fotoproductos formados y determinar la proporción en que se producían estos (figura 4.3). El fotoproducto que se forma en menor proporción en disolución de PBS es el fotoproducto 3, mientras que el fotoproducto 1 es el mayoritario. Según estudios previos (Miranda *et al.* 1994) sabemos que FA sufre una descarboxilación cuando este se encuentra en su forma aniónica. La descarboxilación origina un radical libre que reacciona rápidamente con un protón del medio para dar el fotoproducto 1. Dados los rendimientos de reacción este proceso debe ser el más favorable, mientras que el fotoproducto 2 proviene de la formación de un epóxido (Miranda *et al.* 1994) que resulta en la transposición del oxígeno hacia la parte externa de la molécula.

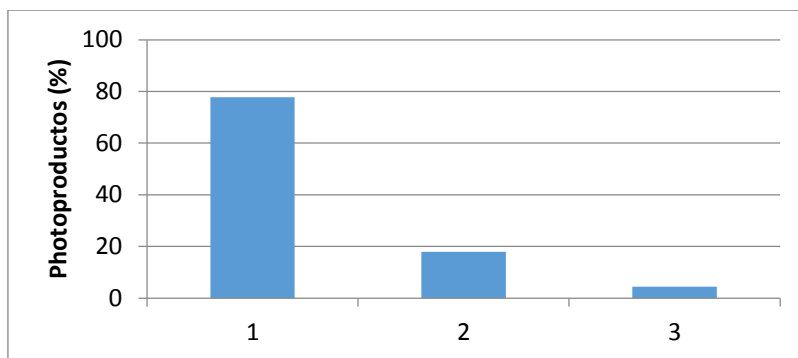


Figura 4.3. Proporción de fotoproductos tras 40 minutos de irradiación de FA en PBS y atmósfera de aire.

Se comparó la fotorreactividad de FA en disolución de PBS con la obtenida en presencia de HSA y BSA. Para ello se hicieron irradiaciones en disolución de PBS y en disolución de PBS con HSA o BSA. Se siguió la evolución temporal de la reacción para estudiar la cinética de la misma. Se comprobó que los fotoproductos obtenidos en medio libre (FA disuelto en PBS) eran los mismos que en presencia de proteína. Los tiempos de retención en HPLC y espectros de absorción en el rango UV-vis coinciden.

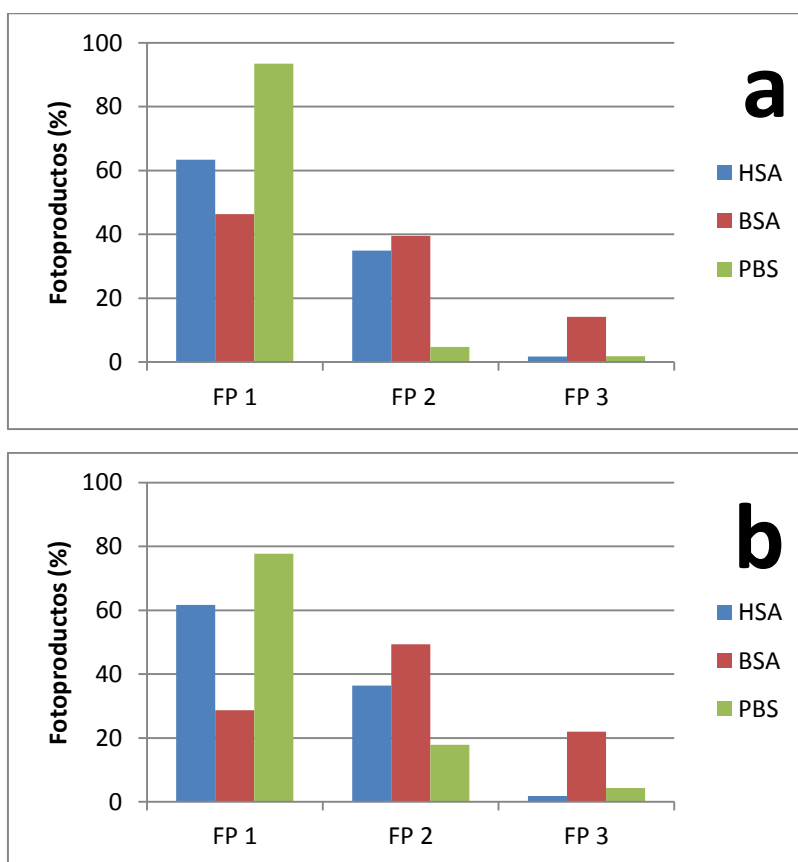


Figura 4.4. a) Proporción de los diferentes fotoproductos tras 20 minutos de irradiación. b) Proporción de los diferentes fotoproductos tras 40 minutos de irradiación.

Resultados y discusión

La selectividad de la reacción varía considerablemente dependiendo de si la reacción se hace en medio acuoso o en presencia de proteína. Además, se observó una diferencia clara en la fotorreactividad de FA en presencia de HSA y BSA. Mientras que a los 20 minutos la reacción se ha estabilizado con HSA, en PBS y BSA continúa hasta los 40 minutos.

En PBS y BSA la cantidad de fotoproducto 1 parece llegar a un máximo a los 20 minutos para después disminuir aumentando 2 y el 3, una posible hipótesis es que tanto el fotoproducto 1 se esté degradando para producir el 2 y en menor medida el 3. Probablemente esta se deba a las pequeñas diferencias de aminoácidos que forman los sitios de unión que provocan modificaciones en el microambiente tales como, restricción del espacio disponible, densidad de carga, puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals.

En general, la cantidad de fotoproductos formados en la reacción varía en gran medida si comparamos FA en disolución o en presencia de proteína (figura 4.4). La tendencia es que en proteína FA reacciona menos mientras que en medio libre lo hace más. A continuación se muestran las gráficas de evolución de la concentración de fotoproductos.

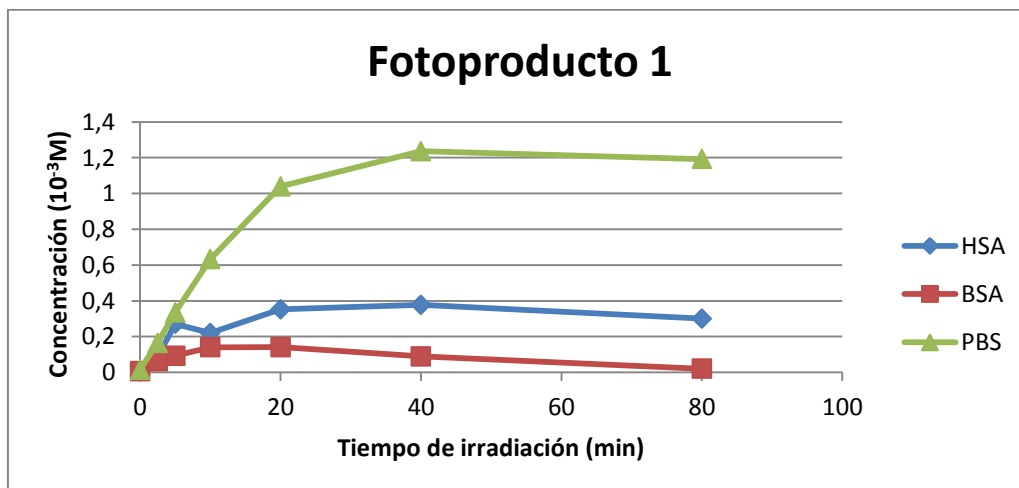


Figura 4.5. Cinética de reacción del fotoproducto 1.

En este caso hay una gran diferencia entre la cantidad de fotoproducto producida en medio libre y las dos proteínas, siendo aun así menor la reactividad en la proteína bovina que en la humana.

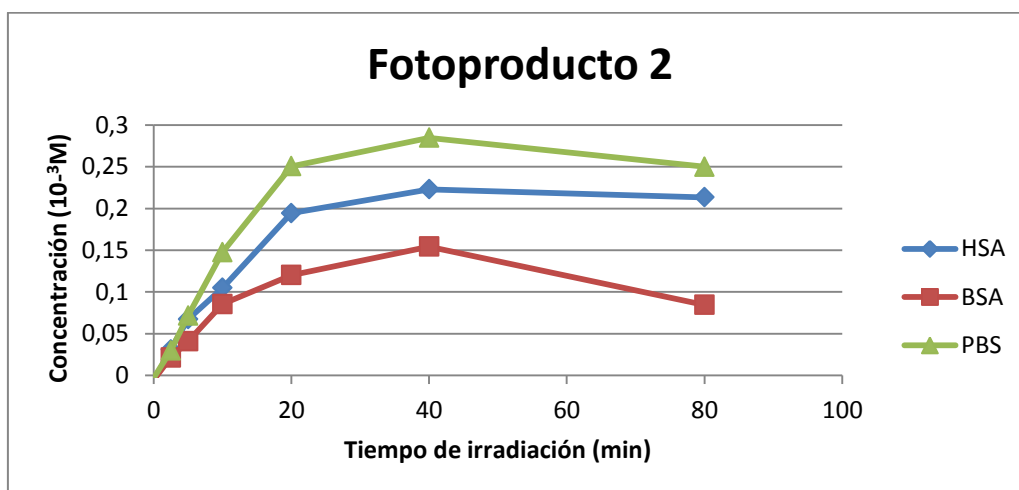


Figura 4.6. Cinética de reacción del fotoproducto 2.

Esta molécula exhibe un comportamiento más parecido entre el disolvente acuoso y las proteínas, aunque de nuevo es la albúmina bovina la que menos reactividad presenta, llegando incluso a ser importante la degradación de esta molécula pasados los 40 minutos de irradiación.

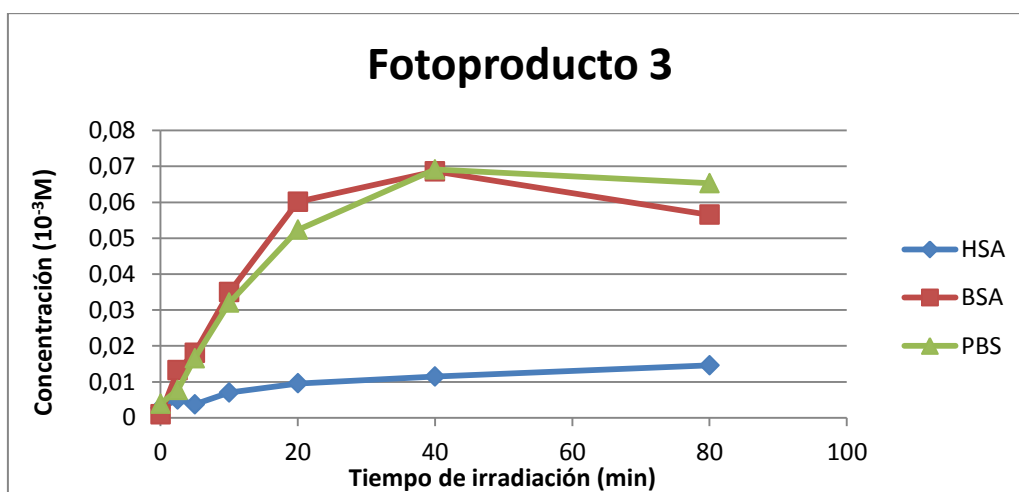


Figura 4.7. Cinética de reacción del fotoproducto 3.

El fotoproducto 3 es el de menor masa molecular relativa (232g/mol), y es el que rompe la tendencia que marcan las otras dos. Como se puede observar, el comportamiento en HSA es prácticamente igual que en los casos anteriores, sin embargo, la reacción que tiene lugar en

Resultados y discusión

BSA tiene un comportamiento prácticamente igual que en disolución. Una de las posibles explicaciones de esta inesperada similitud entre la albúmina sérica bovina y el medio libre radica en que los volúmenes de los sitios de unión entre cada proteína puedan ser diferentes. Podría deberse a que la cavidad implicada en la formación del fotoproducto 3 es más grande en el caso de BSA por lo que el comportamiento de su formación es similar al obtenido en PBS.

Podría ocurrir también que la aparente similitud entre magnitudes sea un resultado azaroso coincidencia de la suma de varios factores que conducen al mismo resultado.

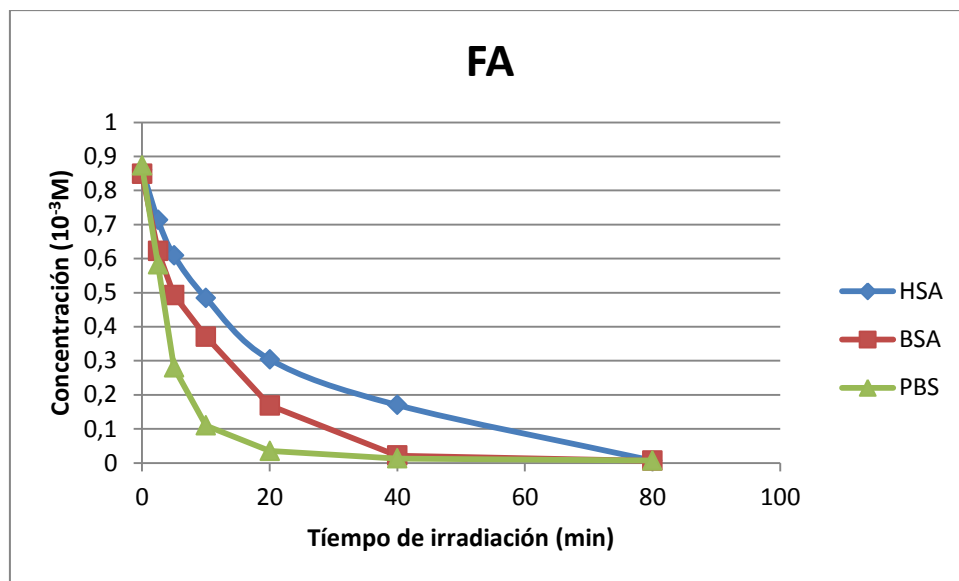


Figura 4.8. Cinética de reacción de FA.

En la figura 4.8 se aprecia claramente que la cantidad de FA disuelto en PBS cae significativamente más rápido que cuando se encuentra unido a HSA o BSA. Este efecto es normal dado que la formación de fotoproductos se da en menor medida con cualquiera de las dos proteínas que en disolución (excepto el fotoproducto 3 en BSA). Se puede deducir que FA se consume más rápidamente cuando interacciona con BSA en comparación con HSA, aunque forma menor cantidad de fotoproductos. Esto puede deberse a que FA se descomponga en el interior de BSA por otras vías que no dan lugar a los fotoproductos 1, 2 y 3.

Por último se observó que tras irradiar FA en medio acuoso (PBS, pH 7.4) libre de proteína se formaba un precipitado blanco. En los estudios cinéticos se observó que a medida que aumentaba el tiempo de irradiación, y por tanto la concentración de los fotoproductos, la cantidad de suspensión era mayor como se muestra en la figura 4.9.



Figura 4.9. Tubos de la disolución de FA en PBS irradiados a distintos tiempos. De izquierda a derecha: 0, 2'5, 5, 10, 20, 40 y 80 minutos de irradiación.

Las irradiaciones realizadas en presencia de proteína, ya sea HSA o BSA, no mostraban turbidez aún después del tiempo máximo de irradiación (80 minutos). Esto está de acuerdo con la estructura de los fotoproductos 1, 2 y 3 de naturaleza marcadamente apolar que los hace prácticamente insolubles en agua; por ello al generarse precipitan y forman esos agregados insolubles. Una vez la disolución de FA irradiado en PBS ha sido tratada durante la extracción líquido-líquido con DCM, un buen disolvente de los fotoproductos, la turbidez desaparece de la fase acuosa. Este hecho podría explicarse como el resultado de la transferencia de los fotoproductos a un disolvente por el cual los fotoproductos tienen más afinidad.

Sin embargo en las disoluciones de proteína no hay una aparición de turbidez. La explicación más plausible es que en las cavidades hidrofóbicas se da un microambiente apolar donde se une FA de manera que este al reaccionar y originar los fotoproductos correspondientes queda dentro de la cavidad y por tanto disuelto. Marin *et al.* 2011 reportó resultados similares en un ensayo de fotorreactividad con albúminas.

4.2 Fotofísica: Estudios de fotólisis de destello láser

Los datos de fotorreactividad muestran que hay diferencias en la reacción en cuanto a la cantidad de FA que reacciona y la cantidad de cada fotoproducto que se genera. Esto indica

que FA se comporta de forma diferente según se encuentre libre en disolución o complejoado con alguna de las dos proteínas estudiadas. Para investigar este comportamiento diferencial se recurrió a la técnica LFP, donde el grupo de investigación ha puesto a punto una metodología bien establecida capaz de obtener información sobre las interacciones entre proteínas y moléculas orgánicas con alto rendimiento de cruce intersistemas.

El objetivo de esta técnica es utilizar el estado excitado triplete del FA como sonda para obtener información sobre las interacciones que existen con HSA y BSA. Las propiedades de estos estados son sensibles al medio en el que se encuentran. Así pues, el estudio de los estados excitados triplete podría proporcionar información sobre la distribución del fármaco en los distintos sitios de unión de la albúmina sérica o libre en disolución. Además, el tiempo de vida del estado excitado triplete podría dar información sobre la naturaleza del complejo fármaco/HSA, así como sobre la fuerza de enlace, la existencia de restricciones conformacionales, requerimientos estereoquímicos o protección frente al ataque de O_2 y otros reactivos.

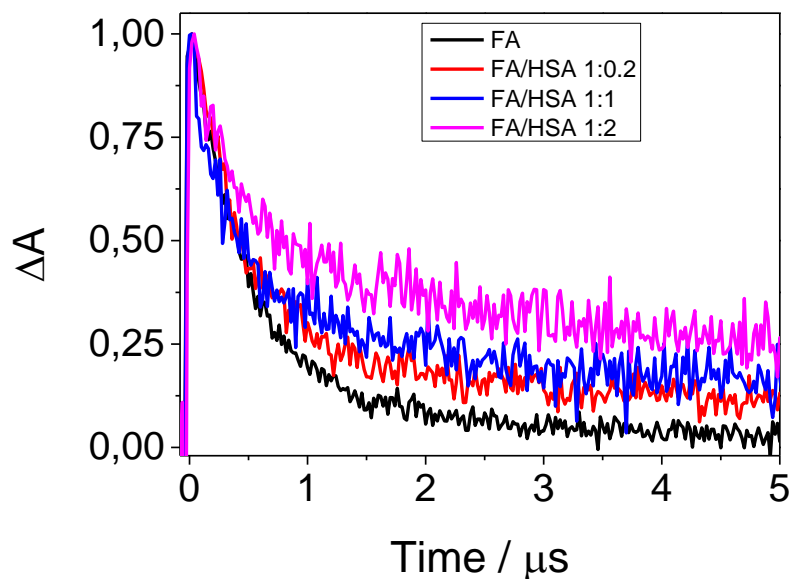


Figura 4.10. Comparación de la señal de absorción (460 nm) de estado triplete cuando FA se encuentra libre en disolución y cuando se encuentra unido a HSA a diferentes relaciones molares.

En ausencia de HSA, el espectro de absorción de la especie transitoria generada tras excitación de una disolución de FA ($2.5 \times 10^{-5} M$) en atmósfera de aire mostró un máximo a 460 nm, correspondiente al primer estado excitado triplete de FA. La desactivación de este estado excitado ($\lambda_{m\acute{a}x} = 460$ nm) siguió una ley exponencial de primer orden, cuyo tiempo de vida fue de 0,4 μs . La figura 4.10 muestra la desactivación del estado excitado triplete de FA en

disolución (en ausencia de HSA) y en presencia de HSA a distintas relaciones molares FA/HSA. Como se puede observar a medida que aumenta la cantidad de HSA en el medio la señal del triplete vive más tiempo. Este hecho se puede correlacionar con la interacción de FA con las cavidades hidrofóbicas de la proteína.

Cuando FA se encuentra en presencia de proteína la desaparición de señal del estado excitado triplete sigue una cinética exponencial de segundo o tercer orden según la relación molar que se analice.

- Si nos fijamos en relaciones molares donde la cantidad de proteína presente es insuficiente para alojar todo el FA de la disolución observamos una cinética de tercer orden. Este hecho se debe a que FA existe en disolución, poblando el sitio I y poblando el sitio II.
- A relaciones molares donde la cantidad de proteína es suficiente como para alojar todo el FA de la disolución observamos una cinética de segundo orden. Al no haber ya FA libre, dejemos de detectar su señal de triplete, viendo sólo las pertenecientes al sitio I y al sitio II de la proteína.

De la misma manera esto se produce en BSA, lo único que varía en este caso son los tiempos de vida media de la señal del estado excitado triplete.

Es de destacar el notable aumento en los tiempos de vida de triplete del FA en presencia de HSA, que se vieron incrementados hasta 35 veces con respecto al tiempo de vida de triplete de FA libre en disolución (tabla 4.1). Este hecho puede ser explicado por la mayor rigidez a la que se ve sometida la molécula de FA dentro del sitio de unión. Esta rigidez restringe el abanico de niveles energéticos vibracionales que puede adoptar la molécula, y por tanto puede limitar la capacidad de volver al estado fundamental por relajación vibracional. Por otro lado en los sitios de unión de las proteínas el entorno que rodea al fármaco puede proteger su estado excitado triplete frente a la desactivación por interacción con otras moléculas, como puede ser una segunda molécula de FA o por oxígeno (siendo especialmente importante esta última).

En este sentido, el hecho de obtener dos valores de tiempos de vida de triplete distintos cuando el FA está unido a la albúmina se correlaciona con la existencia de los dos sitios de unión en HSA y BSA (sitio I y sitio II).

Proteína	Libre(μ s)	t_1 (μ s)	t_2 (μ s)
HSA	0,405	0,78	14,14
BSA		0,81	8,7

Tabla 4.1. Tiempos de vida (μ s) del estado excitado triplete del FA libre en disolución y unido al sitio I o sitio II de unión de HSA y BSA.

Con el fin de obtener una evidencia independiente para confirmar la asignación de los sitios de unión de FA en HSA, se llevaron a cabo experimentos adicionales de FDL en presencia de sondas que se unen preferentemente al sitio I o sitio II de unión de la proteína. Así, se utilizó el ácido oleico como sonda de sitio I, mientras que se hizo uso del ácido cáprico como sonda de sitio II.

La adición de ácido cáprico, un ligando específico del sitio II (Pérez-Ruiz et al. 2011) sobre una mezcla FA/proteína dio como resultado una disminución de la contribución correspondiente a la componente de mayor tiempo de vida de triplete (tabla 4.2). Por tanto el tiempo corto corresponde con el sitio II, el de menor tamaño. La adición de ácido oleico no condujo a un resultado claro.

Condición	Libre	Sitio II	Sitio I
FA	100	-	-
FA/HSA ^[a]	0	72	28
FA/HSA/SI ^[b]	14	69	17
FA/HSA/SII ^[b]	11	65	24

[a] = relación de concentraciones 1:1

[b] = relación de concentraciones 1:1:10

Tabla 4.2. Porcentaje de FA libre, unido al sitio I y unido al sitio II bajo diferentes condiciones. **FA** ácido fenofíbrico, **HSA** albúmina sérica humana, **SI** ligando específico de sitio I (AC. Oléico), **SII** ligando específico de sitio II (Ac cáprico).

Resultados y discusión

El tamaño de las cavidades también influye en la accesibilidad que tiene tanto el disolvente como el oxígeno al interior de la cavidad (Pérez-Ruiz *et al.* 2011). Cuanto más pequeño menor concentración de desactivadores y mayor tiempo de vida del estado excitado triplete.

Una vez se confirmó la correcta asignación de los sitios de unión con los tiempos de vida obtenidos, se procedió a determinar la ocupación de los sitios de unión I y II en HSA/BSA y la proporción de FA libre en disolución de mezclas FA/Proteína a distintas relaciones molares (de 1:0 a 1:2). Para ello, se fijaron los tiempos de vida obtenidos anteriormente para cada uno de los sitios (tabla 4.1). De esta forma, la realización del ajuste multiexponencial de la desactivación, para cada una de las distintas proporciones de concentración, permitió obtener los valores de A correspondientes a la cantidad de FA libre en disolución y unido al sitio I y sitio II de cada proteína. Se observó que a una relación de concentración fármaco/proteína mayor a 1:0.8 para HSA y 1:0.6 para BSA, fueron necesarios tres valores de tiempos de vida para obtener un buen ajuste de la desactivación del triplete. La distribución de FA libre y unido a los sitios I y II de HSA y BSA se muestra en la Figura 3.4.

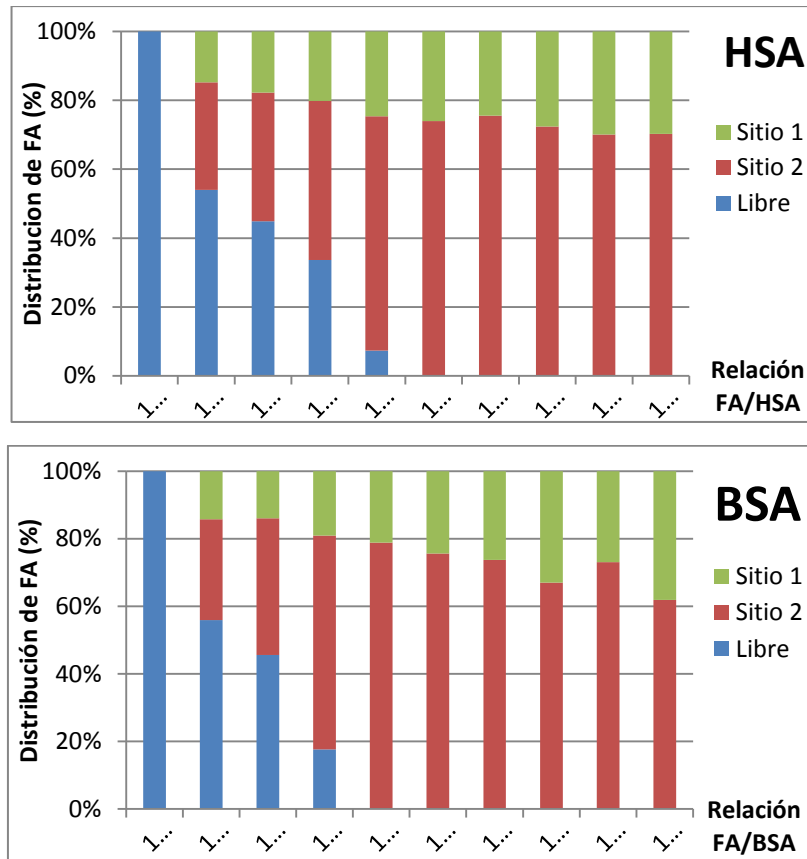


Figura 4.11. Porcentaje de FA: libre (Azul), unido al sitio II (rojo) y unido al sitio I (verde). (Arriba) complejo FA/HSA, (Abajo) complejo FA/BSA. En presencia de concentraciones crecientes de HSA (gráfica superior) y BSA (gráfica inferior).

Como se deduce de las tablas arriba mostradas el sitio II es el más poblado con un 72% frente al 28% del sitio I en HSA. En el caso de BSA se repite resultado de porcentajes de población 72% para el sitio I y 28% del sitio II. Al igual que otros fármacos con ácidos carboxílicos (Vayá *et al.* 2006) el FA tiene preferencia por el sitio II debido a que en este puede establecer algunos puentes de hidrógeno y fuerzas electrostáticas con los aminoácidos presentes en el interior de la cavidad.

Con todos los datos en conjunto, tanto provenientes de ensayos de fotoreactividad como de caracterización fotofísica podemos afirmar que hay dos hechos significativos:

Resultados y discusión

- Existe una clara diferencia en el microambiente de FA en disolución acuosa y en el interior de las dos proteínas. El estado excitado triplete presenta comportamiento similar en el sitio I en ambas proteínas, mientras que en el sitio II de HSA vive 1'6 veces más que en BSA.
- La reactividad de FA en BSA es siempre menor que en HSA excepto para el fotoproducto 3, el más minoritario de los tres en términos de concentración absoluta. En ambas proteínas, FA se fotoliza más lentamente que en PBS.

Una de las hipótesis que se puede plantear es que FA en BSA tiene mayor grado de movilidad que en HSA, esto puede deberse a una mayor amplitud en la cavidad, por ello su tiempo de vida de triplete sería más corto. Si esto fuese cierto podría plantearse la hipótesis de que FA reacciona más en BSA por tener mayor libertad de movimiento. En HSA no reaccionaría tanto porque tiene más restringidas el número de movimientos posibles. Si todo lo anterior resultase cierto podría asignarse la mayor parte de la generación del fotoproducto 3 al sitio II.

No obstante es necesario realizar ensayos de ocupación de sitios con sondas de desplazamiento e irradiaciones preparativas para tener evidencias firmes de que la reactividad se da debido al sitio II.

5. Conclusiones

Conclusiones

En presencia de HSA y HSB la fotorreacción de FA rinde los mismos fotoproductos, no obstante en proteína la fotoreactividad es menor. El fotoproducto 3 se produce con el mismo rendimiento en presencia de BSA que en PBS. Cuando se irradia FA en presencia de BSA el fotoproducto 3 alcanza los niveles que se dan en PBS, mientras que en el resto de fotoproductos (1 y 2) la fotoreactividad es menor en BSA que en HSA.

En presencia de proteína, FA interacciona con los sitios de unión en diferente proporción siendo mayor la afinidad por el sitio II.

No se ha podido determinar la reactividad específica de FA en cada uno de los sitios de unión de HSA y BSA. Se pretende realizar estudios conducentes a esta asignación.

6. Referencias

Referencias

- BARRETT, G. C. & DAVIES, J. S (2004). *Amino Acids, Peptides and Proteins*. Royal Society of Chemistry: Cambridge; Vol. 34.
- BOSCA, F. & M. A. MIRANDA (1998) *Photosensitizing drugs containing the benzophenone chromophore*. J. Photochem. Photobiol. B Biol. 43, 1–26.
- BOSCA, F., & MIRANDA, M. A. (1999). *A laser flash photolysis study on fenofibric acid*. Photochemistry and Photobiology, 70(6), 853-857.
- BRANDEN, C. & TOOZE, J. 1999. *Introduction to Protein Structure*. Taylor and Francis eds.
- BRUCE ALBERTS; DENNIS BRAY; JULIAN LEWIS; MARTIN RAFF; KEITH ROBERTS Y JAMES D. WATSON (2002). *Biología molecular de la célula*. Editorial Omega, Barcelona.
- C. K. SVENSON; M. N. WOODRUFF; J. G. BAXTER & D. LALKA (1985). *Free Drug Concentration Monitoring in Clinical Practice*. Clin. Pharmacokinet. 11, 450.
- CUEVAS, A. (2002). *Fármacos Hipolipemiantes: Estado Actual y Controversias*. Medwave. Año 2, No. 10.
- CURRY S.; MANDELKOW H.; BRICK P. & FRANKS, N. (1998). *Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites*. Nat. Struct. Biol. 5: 827-835.
- D. C. CARTER & J. X. HO IN (1994). *Advances in Protein Chemistry*. Vol. 45, Academic Press, New York, pp. 152– 203.
- DATTA, S. & HALDER, M. (2014). *A Detailed Scrutiny of the Anion Receptor Pocket in Sub-domain IIA of Serum Proteins towards Individual Response to Specific Ligands: HSA-Pocket Resembles Flexible Biological Slide-wrench unlike BSA*. J. Phys. Chem. B, 2014, 118 (23), pp 6071–6085.
- DAVID L. NELSON & MICHAEL M. (2007). *Lehninger principles of biochemistry*. Editorial Omega, Barcelona.
- FICHTENBAUM, C. J. & GERBER, J. G. (2002). *Interactions between antiretroviral drugs and drugs used for the therapy of the metabolic complications encountered during HIV infection*. Clinical pharmacokinetics, 41(14), 1195-1211.
- GOULD, J. G.; M. G. MERCURIO AND C. A. ELMETS (1995). *Cutaneous photosensitivity diseases induced by exogenous agents*. J. Am. Acad. Dermatol. 33, 551–573.
- HE, K. M. & CARTER, D. C. (1992). *Atomic structure and chemistry of human serum albumin*. Nature; 358: 29.

Referencias

- HE, X. M. & CARTER, D. C. (1992). *Atomic structure and chemistry of human serum albumin*. Nature **358**, 209 – 215
- HIRAYAMA, K.; AKASHI, S.; FURUYA, M.; & FUKUHARA, K. I (1990). *Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and frit-FAB LC/MS*. Biochem. Biophys. Res. Commun ; 173: 639.
- JIMÉNEZ, M. C.; MIRANDA, M. A.; & VAYÁ, I. (2005). *Triplet excited states as chiral reporters for the binding of drugs to transport proteins*. Journal of the American Chemical Society, 127(29), 10134-10135.
- LAPICQUE, F.; MULLER, N.; PAYAN, E. & DUBOIS, N. (1993). *Protein Binding and stereoselectivity of nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs*. Clin. Pharmacokinet. 25: 115.
- LEENUTAPHONG, V. & W. MANUSKIATTI (1996). *Fenofibrate induced photosensitivity*. J. Am. Acad. Dermatol. 35, 775–777.
- LEROY, D.; A. DOMPMARTIN & E. LORIER (1990). *Photosensitivity induced by fenofibrate*. Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. 7 136-138
- LUCAS, L. H.; PRICE, K. E. & LARIVE, K. J (2004). *Epitope Mapping and Competitive Binding of HSA Drug Site II Ligands by NMR Diffusion Measurements* Am. Chem. Soc. 126, 14258.
- LUISI, I.; PAVAN, S.; FONTANIVE, G.; TOSSI, A.; BENEDETTI, F.; SAVOINI, A. & BERTI, F. (2013). *An albumin-derived peptide scaffold capable of binding and catalysis*. PloS one, 8(2), e56469.
- MARGUERY, M. C.; F. ELSAYED; J. RAKOTONDRAZAFY; R. SAQI; G. SAMALENS; B. GORGUET & J. BAZEX (1995) *Photoallergy and photoaggravation induced by fenofibrate-cross-photoreaction and transient light reaction*. Eur. J. Dermatol. 5, 204–207.
- MARGUERY, M. C.; N. CHOUINILALANNE; J. C. ADER & N. PAILLOUS (1998). *Comparison of the DNA damage photoinduced by fenofibrate and ketoprofen, two phototoxic drugs of parent structure*. Photochem. Photobiol. 68, 679–684.
- MARIN, M.; LHIAUBET-VALLET, V.; & MIRANDA, M. A. (2011). *Site-dependent photo-fries rearrangement within serum albumins*. The Journal of Physical Chemistry B, 115(12), 2910-2915.
- MARIN, M.; LHIAUBET-VALLET, V. & MIRANDA, M. A. (2012). *Enhanced Photochemical [6 π] Electrocyclization within the Lipophilic Protein Binding Site*. Organic letters, 14(7), 1788-1791.

Referencias

- MERINO, V.; R, LLAMAS & L. IGLESIAS (1990). *Phototoxic reaction to fenofibrate*. Contact Dermatitis 23, 284.
- MIRANDA, M. A.; F. BOSCA; F. VARGAS & N. CANUDAS (1994) *Photosensitization by fenofibrate. II. In vitro phototoxicity of the major metabolites*. Photochem. Photobiol. 59, 171–174.
- MIRANDA, M. A.; BOSCA, F.; VARGAS, F. & CANUDAS, N. (1994). *Unusual (1, 2) Wittig rearrangement of a carbanion generated in neutral aqueous medium by photodecarboxylation of a phenoxyacetic acid analogue*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 78(2), 149-151.
- NAJIB, J. (2002). *Fenofibrate in the treatment of dyslipidemia: a review of the data as they relate to the new suprabioavailable tablet formulation*. Clinical therapeutics, 24(12), 2022-2050.
- PÉREZ-RUIZ, R.; ALONSO, R.; NUIN, E.; ANDREU, I.; JIMÉNEZ, M. C. & MIRANDA, M. A. (2011). *Naphthalene Triplet Excited State as a Probe for the Assessment of Drug Distribution in Binary Protein Systems*. The Journal of Physical Chemistry B, 115(15), 4460-4468.
- SERRANO, G.; J. M. FORTEA; J. M. LATASA; C. JANES; F. BOSCA & M. A. MIRANDA (1992) *Photosensitivity induced by fibric acid derivatives and its relation to photocontact dermatitis to keto-profen*. J. Am. Acad. Dermatol. 27, 204–208.
- SUDLOW, G.; BIRKETT, D. J. & WADE, D. N. (1975). *The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin*. Molecular Pharmacology, 11(6), 824-832.
- SUDLOW, G.; BIRKETT, D. J. & WADE, D. N. (1976). *Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin*. Molecular Pharmacology, 12(6), 1052-1061.
- SUGIO, S.; KASHIMA, A.; MOCHIZUKI, S.; NODA, M. & KOBAYASHI, K. (1999) Protein Eng.; 12: 439-446.
- T. C. KWING (1985). *Free drug measurements: methodology and clinical significance*. Clin. Chim. Acta, 151, 193.
- T. PETERS (1995). *All About Albumins: Biochemistry Genetics and Medical Applications*. Academic Press, San Diego.
- TERCENIO, M. C.; I. GUILLEN; M. J. GOMEZ-LECHON; M. A. MIRANDA AND J. V. CASTELL (1998) *Release of inflammatory mediators (PGE-2, IL-6) by fenofibric acid-photosensitized human ke-ratinocytes and fibroblasts*. Photochem. Photobiol. 68, 331–336.

Referencias

- VARGAS, F.; N. CANUDAS; M. A. MIRANDA & F. BOSCA (1993) Photodegradation and in vitro phototoxicity of fenofibrate, a photosensitizing anti-hyperlipoproteinemic drug. *Photochem. Photobiol.* 58, 471–476.
- VAYÁ, I.; ANDREU, I.; JIMÉNEZ, M. C. & MIRANDA, M. A. (2014a). Photooxygenation mechanisms in naproxen–amino acid linked systems. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 13(2), 224-230.
- VAYÁ, I.; BUENO, C. J.; JIMÉNEZ, M. C. & MIRANDA, M. A. (2006). Use of triplet Excited states for the study of drug binding to human and bovine serum albumins. *ChemMedChem*, 1(9), 1015-1020.
- VAYÁ, I.; LHIAUBET-VALLET, V.; JIMÉNEZ, M. C. & MIRANDA, M. A. (2014b). Photoactive assemblies of organic compounds and biomolecules: drug–protein supramolecular systems. *Chemical Society Reviews*, 43(12), 4102-4122.

Referencias web

<http://www.vademecum.es/principios-activos-fenofibrato-c10ab05#>

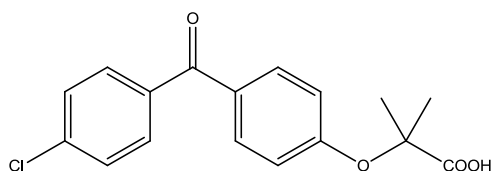
http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/72705/FT_72705.pdf

7. Anexos

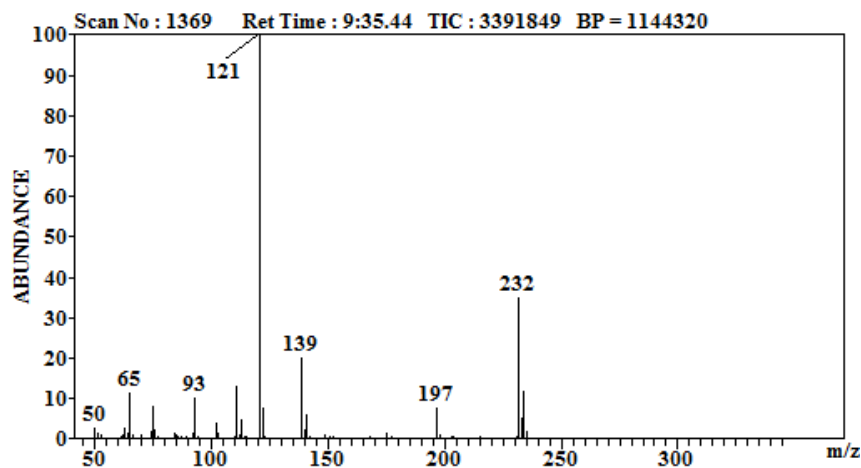
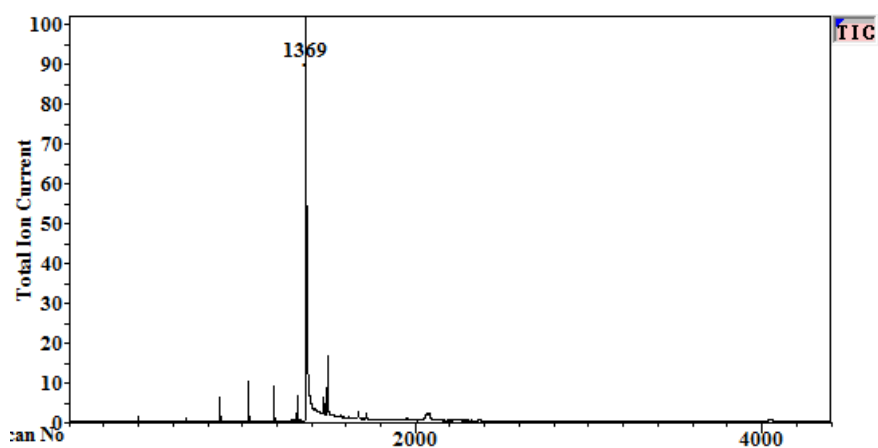
Anexo 1: Identificación y caracterización del ácido fenofibrico y sus fotoproductos.

Los fotoproductos del ácido fenofibrico no se pueden adquirir en el mercado, por ello fueron necesarias una serie de irradiaciones preparativas para poder identificar cada una de las especies que aparecían tras la irradiación de FA en presencia de proteína. Cada fracción de HPLC preparativo se analizó mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS) y resonancia magnética nuclear de protón (RMN- H^1). Además se registró su espectro de UV-vis y su cromatograma para identificaciones de mezclas de fotoproductos.

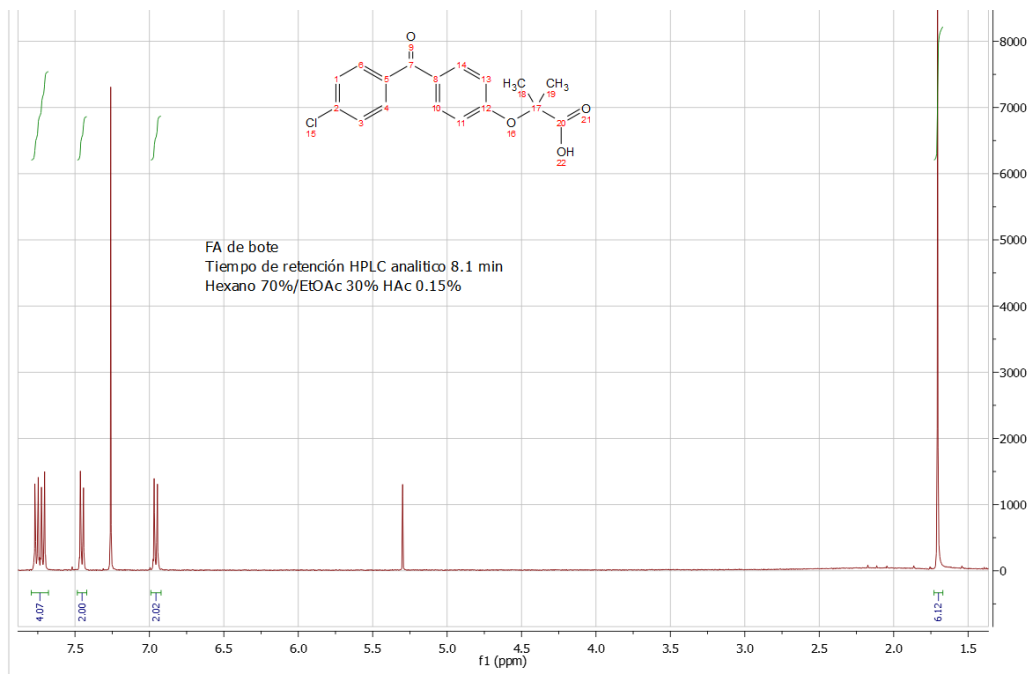
Ácido fenofibrico:



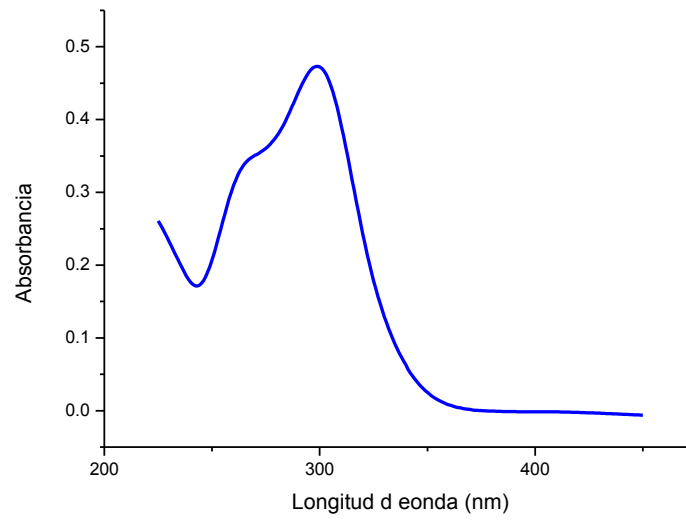
GC-MS:



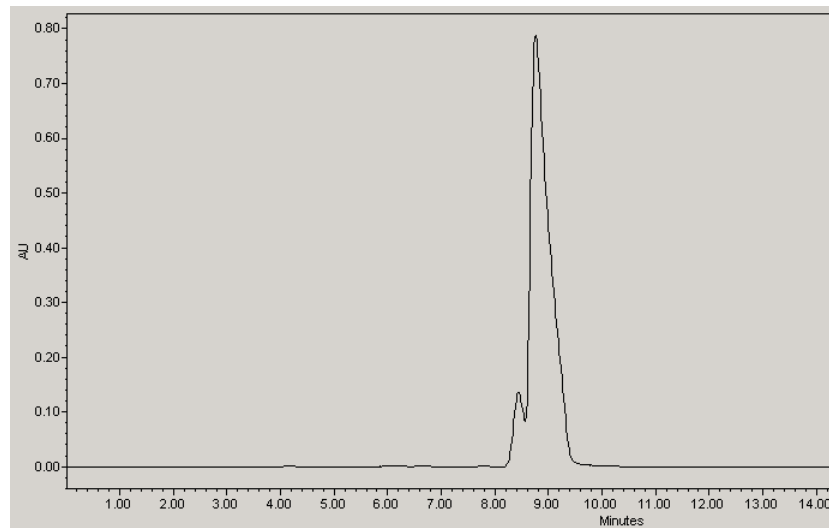
RMN-H¹:



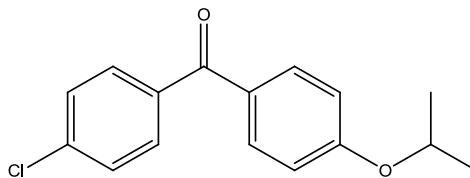
UV-vis:



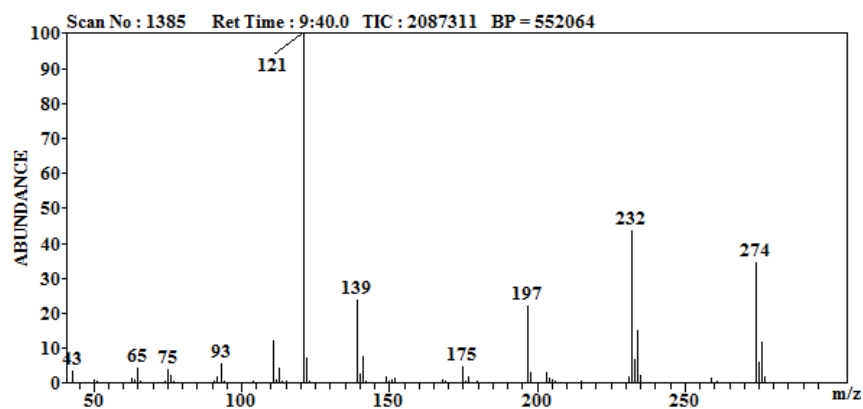
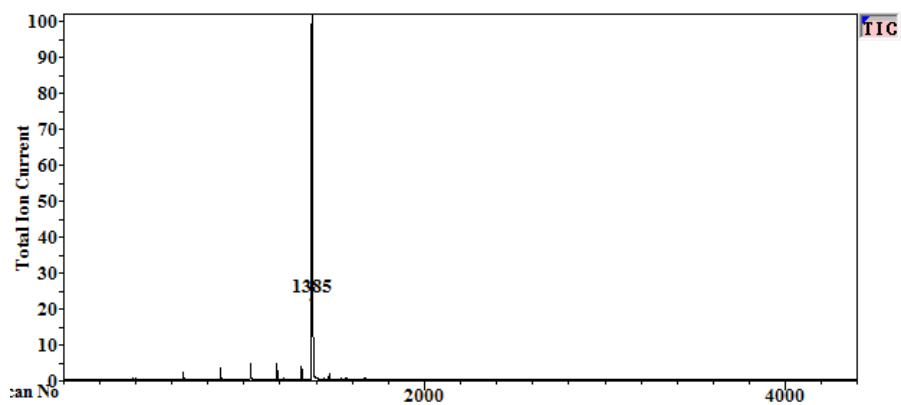
Cromatograma HPLC analítico:

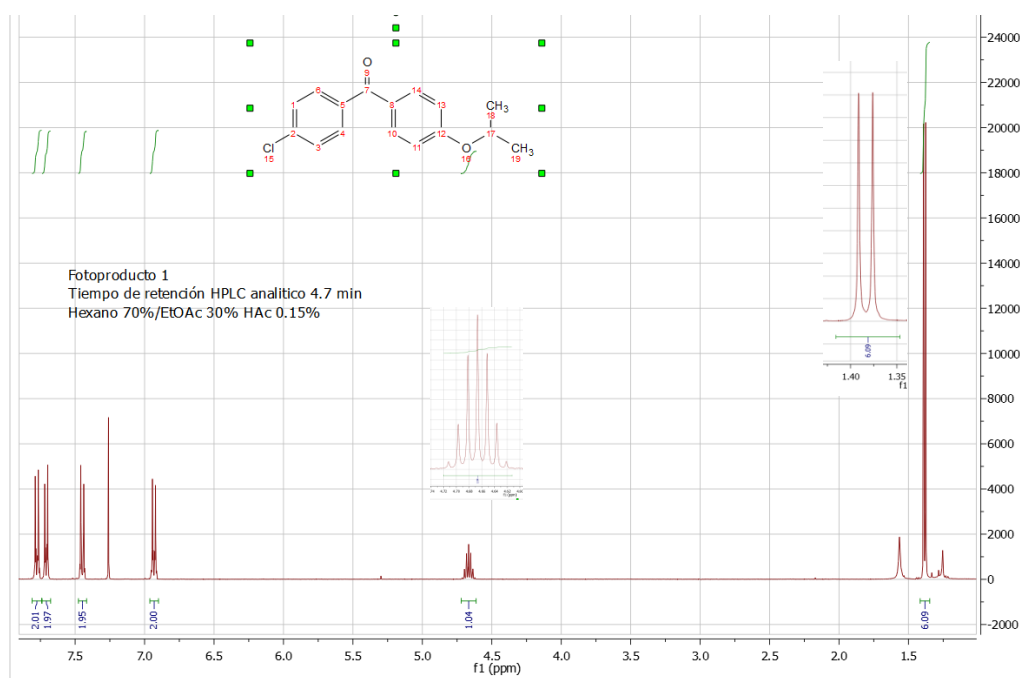
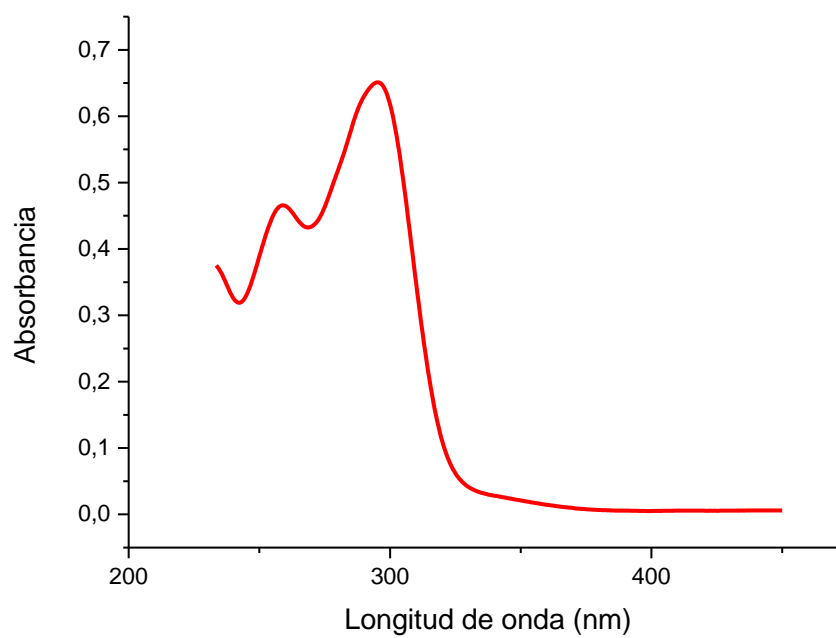


Fotoproducto 1:

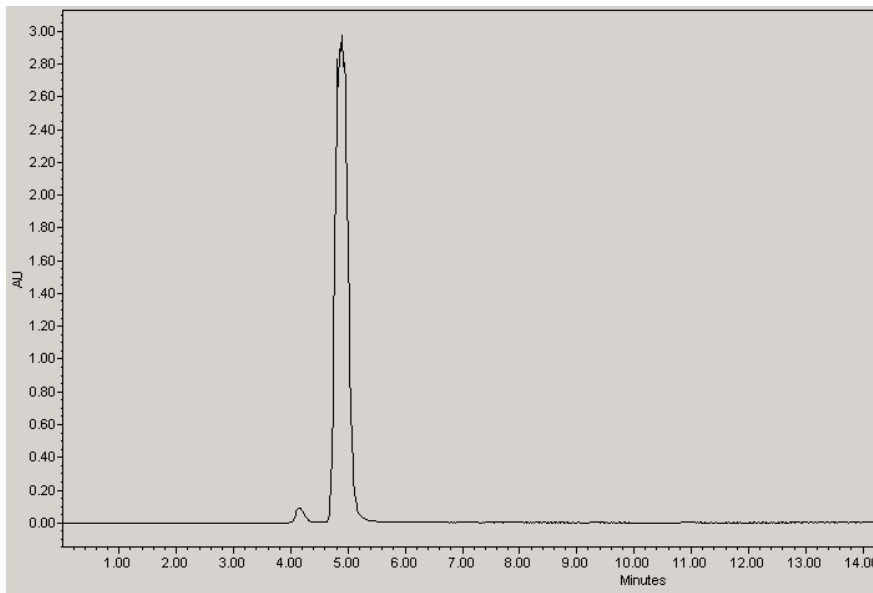


GC-MS:

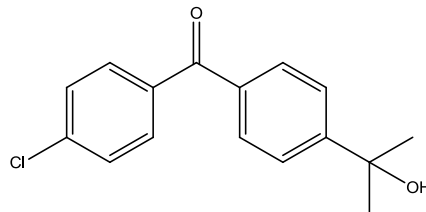


RMN- H^1 :**UV-vis:**

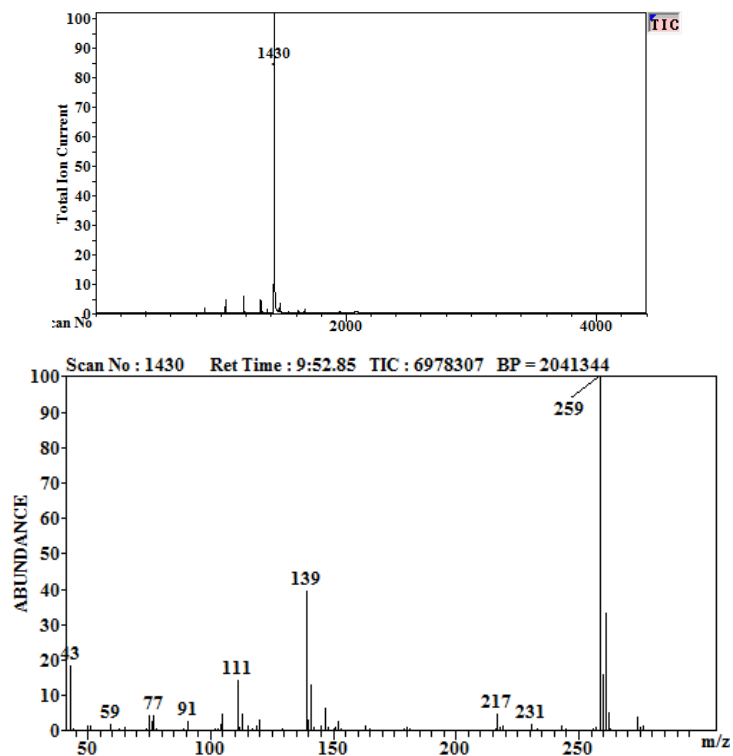
Cromatograma HPLC analítico:

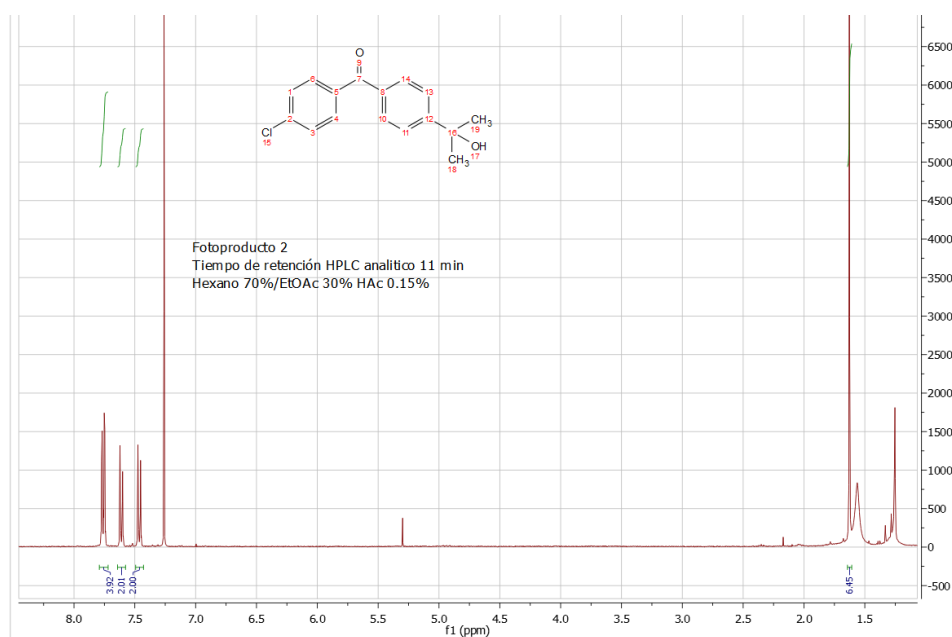
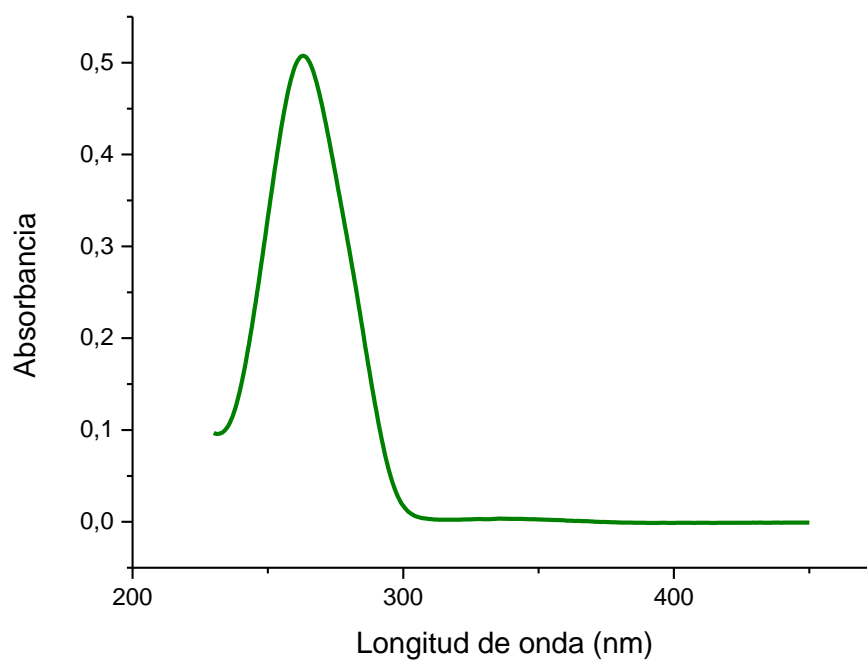


Fotoproducto 2:

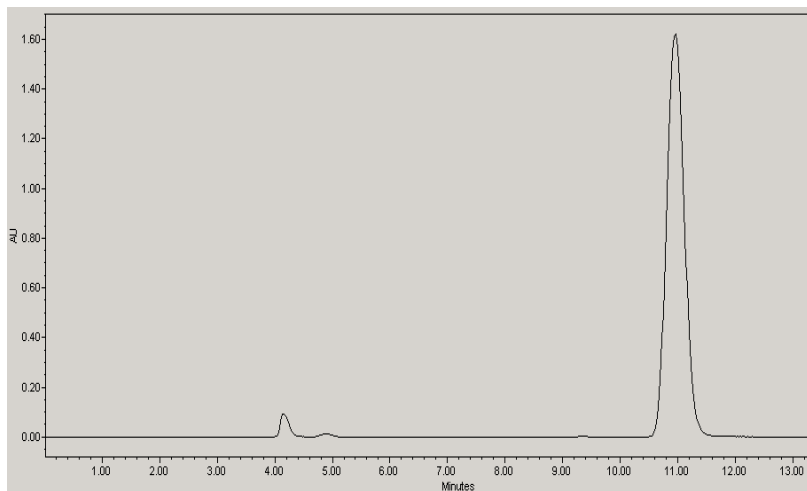


GC-MS:

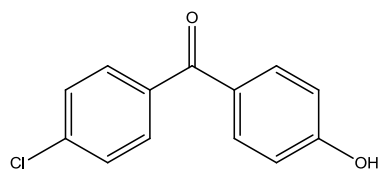


RMN-H¹:**UV-vis:**

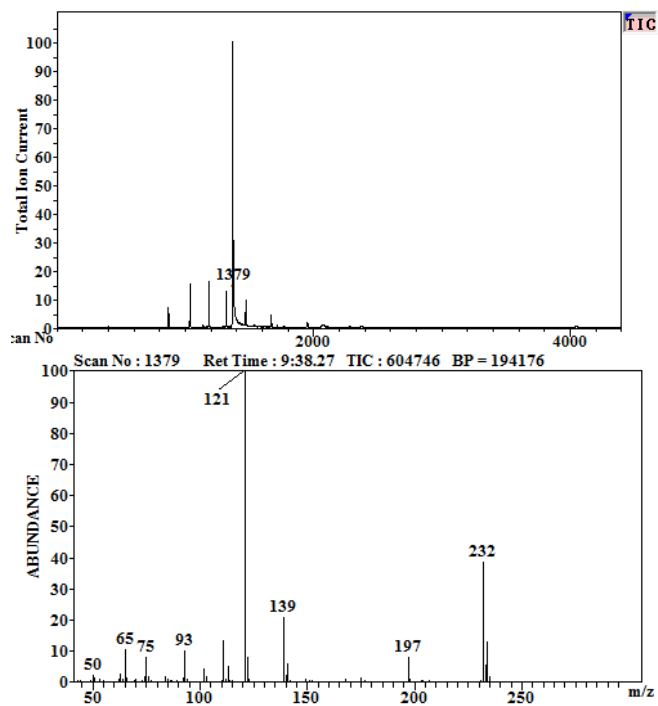
Cromatograma HPLC analítico:

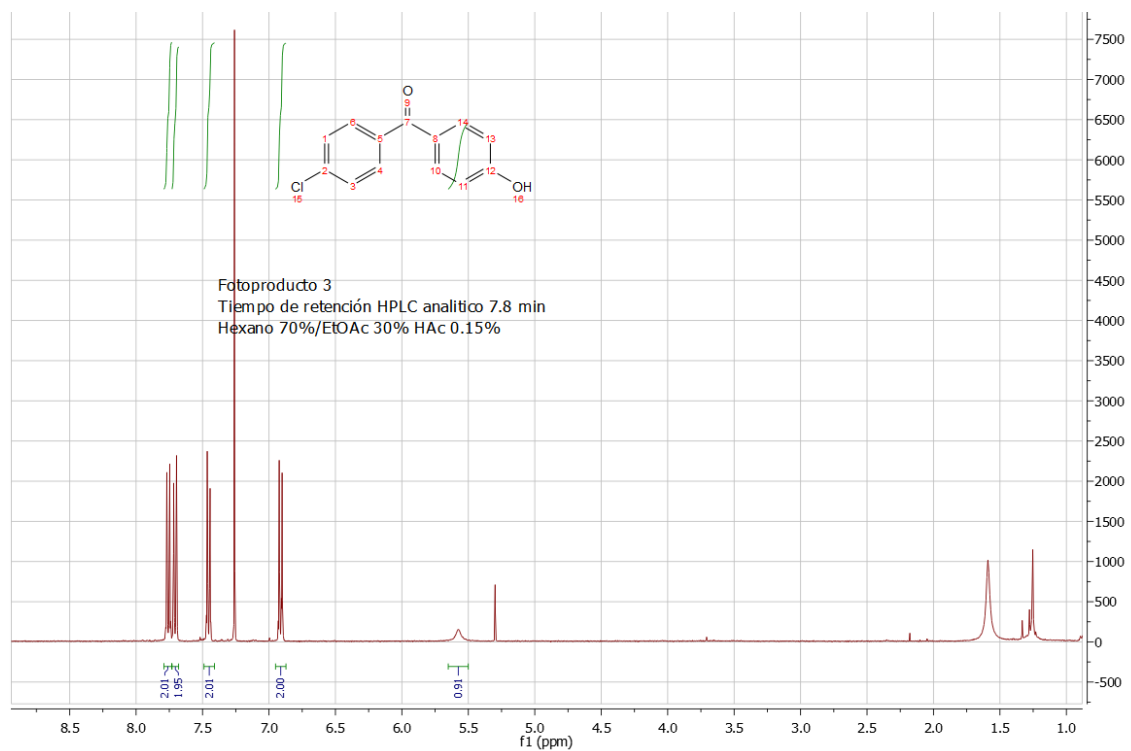
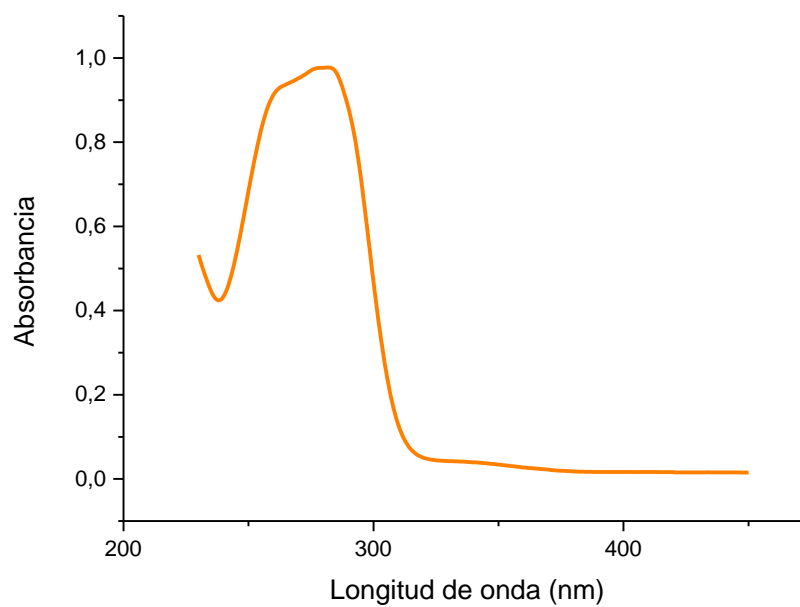


Fotoproducto 3:

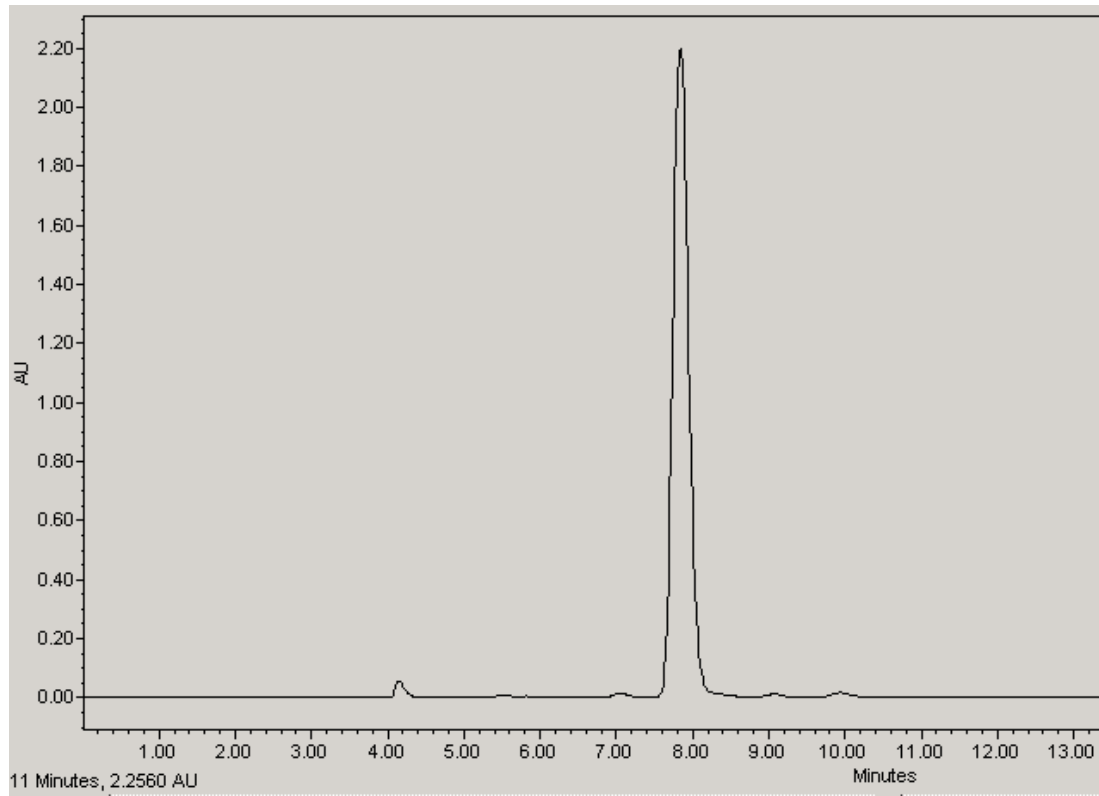


GC-MS:



RMN- H^1 :**UV-vis:**

Cromatograma HPLC analítico:



Anexo 2: Fotólisis de destello láser

Esta técnica consiste en la generación de especies excitadas mediante un haz excitador (láser pulsado de elevada intensidad) y el registro de la absorción de estas especies excitadas mediante un haz analizador. El espectro de absorción que se mide es el de UV-vis pudiéndose obtener además la evolución temporal de la absorción.

Este sistema está compuesto por (Ver Figura A.1):

- **Haz excitador:** láser pulsado de alta intensidad, se busca la longitud de onda que más absorbe la molécula es su estado fundamental (en el caso de FA 308nm).
- **Haz analizador:** lámpara de Xe que emite en el espectro UV-vis
- **Sistema de detección:** monocromador que selecciona la longitud de onda a la que se registra la absorción y fotomultiplicador que permite cuantificar la señal.
- **Sistema de resolución temporal:** Osciloscopio que permite representar la señal obtenida en función del tiempo, los datos recogidos por el osciloscopio se almacenan en un ordenador para su posterior tratamiento y análisis.

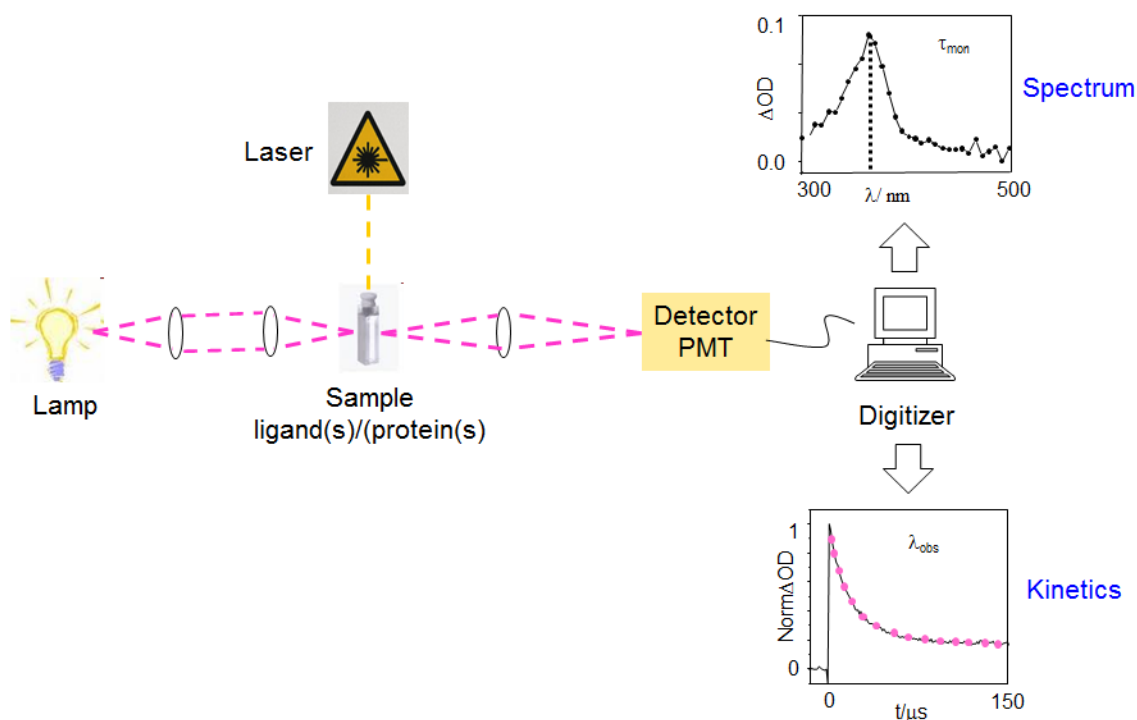


Figura A.1. Esquema de un sistema FDL

El equipo primero registra la señal cuando no ha habido pulso de haz excitador (las moléculas del fármaco están en estado fundamental) y lo toma como blanco. Seguidamente hay un pulso de haz excitador que provoca el paso de un porcentaje de las moléculas a estado excitado bien sea S_n que por procesos de desactivación no radiante y de cruce intersistemas desembocan finalmente en el estado excitado triplete de menor energía (T1). La desactivación hasta el estado triplete ocurre muy rápidamente (Ver tabla 1.1), mientras que la desactivación del triplete excitado es considerablemente más lenta.

Esto hace posible que las moléculas que se encuentran en este estado durante un lapso de tiempo considerablemente largo puedan irradiadas de nuevo por el haz analizador y su espectro registrado a una determinada longitud de onda.

El ajuste de la desaparición de la señal de triplete de FA en PBS sigue una cinética de desactivación de orden 1, según la ecuación:

$$\Delta DO = \Delta DO_0 + A_1 e^{(-t/\tau_1)}$$

Sin embargo, cuando FA se encuentra en presencia de proteína, la desactivación de su estado excitado triplete se explica por una desactivación según una función exponencial de orden superior a 1, según las ecuaciones:

Desactivación exponencial de orden dos:

$$\Delta DO = \Delta DO_0 + A_2 e^{(-t/\tau_2)} + A_3 e^{(-t/\tau_3)}$$

Desactivación exponencial de orden tres:

$$\Delta DO = \Delta DO_0 + A_1 e^{(-t/\tau_1)} + A_2 e^{(-t/\tau_2)} + A_3 e^{(-t/\tau_3)}$$

La técnica de FDL permite estudiar tanto la desactivación cinética de la especie transitoria generada como la formación de nuevas especies. También se puede construir el espectro de absorción UV-vis de la especie transitoria generada. El tipo de especies transitorias que se pueden detectar con esta técnica son estados excitados tripletes, radicales, radicales aniones o radicales cationes.

La técnica de FDL es muy útil para poder dilucidar mecanismos de reacción por el estudio de la evolución cinética de las especies transitorias formadas después de la excitación por láser, así como para obtener información sobre el microambiente en el que se encuentra la molécula.

7.3 Anexo 3: Rectas de calibrado para HPLC analítico de FA y sus fotoproductos.

