



Universidad de Oviedo

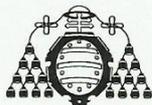
MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

“Estudio de la interacción entre seroalbúminas animales y cloranfenicol mediante técnicas de fotoluminiscencia molecular”

Laksmi Ruiz Medina

Julio 2014, Oviedo



Dra ROSANA BADÍA LAÍÑO, Profesora Titular del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

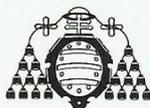
CERTIFICA:

Que el presente Trabajo, titulado **“Estudio de la interacción entre seroalbúminas animales y cloranfenicol mediante técnicas de fotoluminiscencia molecular”**

ha sido realizado por la licenciada **LAKSMI-DASI RUIZ MEDINA**, en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo bajo su dirección, constituyendo el Trabajo de Fin de Máster del interesado en el curso académico 2013-14, y cuya presentación autorizo.

Oviedo, 25 de JUNIO de 2014

Fdo: ROSANA BADÍA LAÍÑO



Dr. ALFONSO FERNÁNDEZ GONZÁLEZ, Técnico de los Servicios Científico
Técnicos de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo, titulado **“Estudio de la interacción entre seroalbúminas
animales y cloranfenicol mediante técnicas de fotoluminiscencia molecular”**

ha sido realizado por la licenciada **LAKSMI-DASI RUIZ MEDINA**, en el Departamento
de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo bajo su dirección, constituyendo
el Trabajo de Fin de Máster del interesado en el curso académico 2013-14, y cuya
presentación autorizo.

Oviedo, 25 de JUNIO de 2014

Fdo: ALFONSO FERNÁNDEZ GONZÁLEZ

Índice

I.	OBJETIVO	1
II.	INTRODUCCIÓN.....	2
II.A.	Seroalbúminas.	2
II.A.1.	Introducción.....	2
II.A.2.	Estructura.....	2
II.A.3.	Función	4
II.A.4.	Metabolismo.....	4
II.B.	Interacción de los antibióticos con las albúminas.....	6
II.B.1.	Importancia de las proteínas en el mecanismo de acción de los antibióticos.....	6
II.B.2.	Cloranfenicol: Mecanismo de acción.....	6
II.B.3.	Efectos secundarios.....	8
II.C.	Espectroscopía de luminiscencia molecular para el estudio de las interacciones proteína-analito.....	8
II. C.1.	Fundamentos.....	8
III.	DESARROLLO EXPERIMENTAL	18
III.A.	Materiales.....	18
III.A.1.	Reactivos y disoluciones.	18
III.A.2.	Aparatos e instrumentos.	19
III.B.	Protocolos de medida.....	19
III.B.1.	Medidas de absorción UV-VIS.....	19
III.B.2.	Medidas de fluorescencia.....	20
III.B.3.	Medidas de fosforescencia.....	21
III.B.4.	Medidas de “quenching” de la fluorescencia.....	21
III.B.5.	Medidas de “quenching” de la fosforescencia.....	22
III.B.6.	Medida de tiempos de vida de fluorescencia y fosforescencia.....	22
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
IV.A.	Características espectroscópicas de las proteínas.....	23
IV.A.1.	Medidas de absorción UV-VIS. Espectros.....	23
IV.A.2.	Medidas de fluorescencia.....	23
IV.A.3.	Medidas de fosforescencia.....	26
IV.B.	Características espectroscópicas del antibiótico.....	27
IV.B.1.	Medidas de absorción UV-VIS.....	27
IV.B.2.	Medidas de fluorescencia.....	28

IV.C. Estudio de “ <i>quenching</i> ” de la fluorescencia de las seroalbúminas.....	28
IV.C.1. Determinación del mecanismo de “ <i>quenching</i> ”.....	30
IV.C.2. Características del fenómeno de asociación.....	33
IV.D. Estudio de “ <i>quenching</i> ” de la fosforescencia.....	37
IV.E. Medidas de tiempos de vida de fluorescencia y fosforescencia.....	40
IV.E.1. Tiempos de vida de fluorescencia.....	40
IV.E.2. Tiempos de vida de fosforescencia.....	41
V. CONCLUSIONES.....	43
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	44

I. OBJETIVO

El análisis fluorimétrico, y en menor medida el fosforimétrico, han alcanzado actualmente una gran difusión, tal como demuestra el gran número de publicaciones existentes hasta la fecha, debido a que se presentan como herramientas muy útiles en el campo de la farmacología, bioquímica y medicina para el estudio de la unión entre medicamentos y distintos receptores o proteínas.

En este proyecto el objetivo es emplear las técnicas de fotoluminiscencia para estudiar la interacción entre un antibiótico modelo, el cloranfenicol, y diferentes seroalbúminas animales (bovina, porcina, de oveja y de conejo). Así mismo, se pretende caracterizar el mecanismo por el cual interacciona el cloranfenicol y determinar si existen diferencias en el proceso de unión de acuerdo con la naturaleza de la albúmina.

II. INTRODUCCIÓN

II.A. Seroalbúminas.

II.A.1. Introducción.

La seroalbúmina o albúmina sérica es una de las proteínas solubles más abundante en el cuerpo de todos los vertebrados, constituyendo más del 50% del total de proteínas del plasma sanguíneo.

Las propiedades, la estructura y la unión a ligandos de la albúmina, constituyen el principal interés de la química, bioquímica y farmacología de esta proteína. (1, 2).

II.A.2. Estructura.

La familia de las albúminas se caracteriza por presentar un patrón repetido de tres dominios helicoidales grandes, estabilizados mediante un patrón de múltiples enlaces disulfuro que no aparece en otras proteínas. Los tres dominios son homólogos y los puentes disulfuro involucran la participación de residuos cisteínas adyacentes. En todos los mamíferos de los que se conoce la secuencia peptídica de sus albúminas se ha comprobado que éstas contienen 35 cisteínas, las cuales forman 17 puentes disulfuro (2). Cada dominio presenta cinco o seis puentes disulfuros internos (3, 4). Los enlaces disulfuros son típicos de proteínas extracelulares y contribuyen a la estabilidad de las proteínas plasmáticas en la circulación (2).

Los dominios homólogos normalmente son denominados I, II, y III, comenzando desde el amino terminal. Cada dominio es el resultado de otros dos subdominios (IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB) como se muestra en la siguiente figura (5, 6):

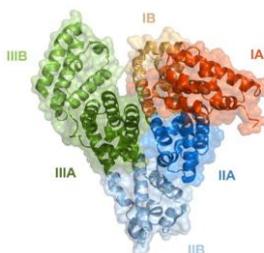


Figura 1. Dominios y subdominios de la estructura secundaria de las seroalbúminas, representado por la estructura molecular de la seroalbúmina bovina.

Aunque los tres dominios son homólogos poseen diferentes funciones en cuanto a la unión de ligandos (2).

En cuanto a la composición aminoacídica de la familia de las albúminas la característica más llamativa es el bajo contenido en triptófano, apareciendo en la secuencia de estas proteínas únicamente uno o dos residuos. También la baja cantidad de residuos de metioninas, isoleucinas y glicinas es típica de estas proteínas en mamíferos. En cambio, son abundantes los aminoácidos: cisteína, leucina, ácido glutámico y lisina. El gran número de residuos ionizados le da a la albúmina una carga total elevada, normalmente presentan 185 iones por molécula a pH 7, lo cual ayuda a la solubilidad de la proteína. Al haber un mayor número de residuos ácidos respecto a aminoácidos básicos, la carga neta de las albúminas es negativa (2).

En todos los mamíferos aparece de forma invariable un único triptófano en el bucle¹ largo número 4 (de los nueve bucles que presentan las albúminas), en la secuencia Lys-Ala-Trip-X-Val-Ala-Arg. En vaca, oveja y cerdo, un segundo triptófano aparece en un sitio homólogo en el bucle largo 3. La tirosina aparece sobre todo en los bucles 3 y 6 y la fenilalanina en el bucle 3 (2). Estos aminoácidos, triptófano (trp, W), tirosina (tyr, Y) y fenilalanina (phe, F) son los que contribuyen a la fluorescencia de las proteínas (7).

Las albúminas en las que nos centramos este trabajo son: seroalbúmina bovina, porcina, de oveja y de conejo. Sus secuencias aminoacídicas se muestran en el Anexo I señalando los residuos de triptófano, aminoácido que presenta una elevada eficiencia cuántica (0.20) y que tiene el mayor coeficiente de extinción molar (9).

Sus estructuras terciarias son muy similares. A continuación se muestran sus conformaciones 3D (10,11):

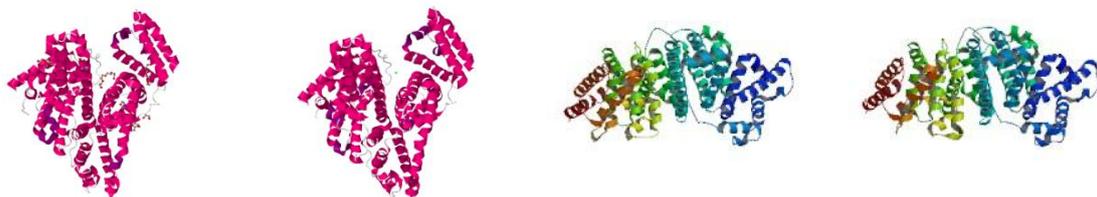


Figura 2. Seroalbúminas de conejo, vaca, cerdo y oveja, de izquierda a derecha.

¹ Bucle: segmento de polipéptido de estructura secundaria irregular que sirve de conexión entre estructuras secundarias regulares como las hélices- α (8).

II.A.3. Función.

Las seroalbúminas tienen un importante papel en el transporte y la disposición de ligandos endógenos y exógenos en la sangre (12). Son las invaginaciones de la molécula y sus regiones hidrofóbicas las que le proporcionan a la seroalbúmina sus excelentes propiedades de unión (13). Estas proteínas presentan una buena capacidad de unión a agua, Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , ácidos grasos, hormonas, bilirrubina y fármacos (14). Las interacciones fuertes de las seroalbúminas con los fármacos pueden suponer una disminución de las concentraciones de los estos en el plasma, mientras que interacciones débiles pueden dar lugar a distribuciones pobres del mismo. Como consecuencia investigar la unión entre fármacos y seroalbúminas es de gran interés en farmacología y farmacodinámica (12).

Además, las seroalbúminas son los mayores transportadores de zinc en el plasma (se unen, por lo general, al 80% de zinc plasmático) y son las proteínas más importantes en la regulación de la presión osmótica coloidal de la sangre² (14, 15).

II.A.4. Metabolismo.

Las albúminas son sintetizadas en el hígado por todos los hepatocitos, los cuales no las acumulan en su interior si no que las secretan rápidamente (13). Esta función de síntesis es llevada a cabo por un complejo específico ribosoma-mRNA el cual está unido al complejo del retículo endoplasmático en los hepatocitos (16). Allí, las seroalbúminas se sintetizan como cadenas únicas, por lo que no requieren de mecanismos de ensamblaje de cadenas. Además, sólo están compuestas por aminoácidos, sin presentar ni grupos prostéticos ni otras adiciones. Por tanto, no son glicoproteínas, siendo unas de las pocas proteínas plasmáticas carentes de grupos carbohidratos. Esto se debe a que las albúminas generalmente carecen de la secuencia Asn-X-Ser/Thr necesaria para que se produzca la glicosilación de las proteínas (2).

Como se trata de una proteína destinada a la secreción, la albúmina recientemente formada pasa por el canal de cisternas de secreción (Figura 3) donde se pliega para alcanzar su estructura terciaria formándose para ello los 17 enlaces disulfuro (16) de los que se habló en el apartado “I.A.2.Estructura”.

² Presión osmótica coloidal de la sangre: es la fuerza debida a las proteínas plasmáticas que permite mantener el fluido en el interior de los capilares al compensar la presión de filtración capilar (15).

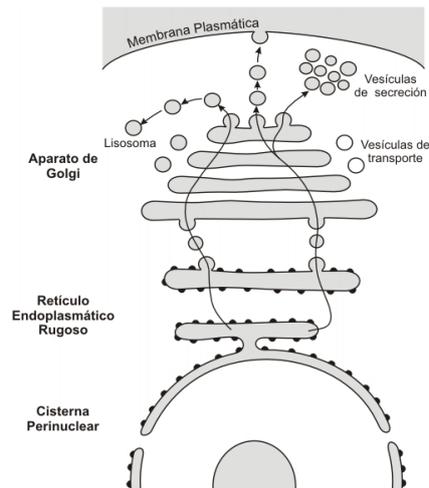


Figura 3. Proceso de secreción de las proteínas al medio extracelular.

Aproximadamente se requieren 30 minutos desde que se ensambla la proteína hasta que se libera a la circulación sistémica (16). Las tasas absolutas de síntesis de albúmina parecen ser bastante constantes en varias especies, situándose en torno a 200mg/Kg/día (16).

Una vez en el sistema sanguíneo las seroalbúminas se equilibran entre compartimentos intravasculares y extravasculares lentamente (5 % por hora), de modo que las albúminas, en su totalidad, son intercambiadas diariamente con el compartimento extracelular (17). Es en este espacio extracelular es en el que hay mayor cantidad de esta proteína, encontrándose sólo un 40% de seroalbúminas en el compartimento intravascular (17,18).

La síntesis de albúmina se ve afectada por diversos factores, entre ellos se encuentran los siguientes (16):

- Nutrición: la incorporación de nitrógeno es el aspecto más importante en la regulación de la producción de albúmina.
- Balance de hormonas: hormonas como la tiroidea y la cortisona en exceso estimulan la síntesis de la misma.
- Presión osmótica.

La concentración de esta proteína en la sangre es el resultado de la síntesis, el volumen de distribución, el intercambio entre espacios intra y extravasculares y de la descomposición de la misma (18).

Su vida media es de aproximadamente 20 días (18) y su catabolismo ocurre en un compartimento, probablemente en el endotelio vascular de los tejidos o en zonas adyacentes a éste (19), en rápido equilibrio con el compartimento vascular pero sin predominar este proceso catabólico en ningún órgano (20). Se sabe que el 10% del catabolismo de la seroalbúmina tiene lugar en el riñón (20).

II.B. Interacción de los antibióticos con las albúminas.

II.B.1. Importancia de las proteínas en el mecanismo de acción de los antibióticos.

La mayoría de los fármacos se unen a las proteínas u otros materiales biológicos, tales como la albúmina; α 1-ácido glicoproteína; lipoproteínas; α -, β - y γ -globulinas; y eritrocitos. Por tanto, cuanto mayor es el grado de unión de los fármacos a estos compuestos biológicos menor es la cantidad de ellos libre en el plasma. Es bien sabido que, al menos para moléculas pequeñas, únicamente el fármaco libre, no unido a material biológico, se distribuye en el espacio extravascular y es responsable de la actividad farmacológica y/o efectos secundarios. Para los antibióticos, en particular, la reducción de las concentraciones de fármaco libre (activo), como resultado de la unión a proteínas conlleva la disminución de la actividad antimicrobiana. En teoría, este efecto es más pronunciado para los antibióticos con una amplia unión a proteínas. La mayoría de los estudios que evalúan el efecto de la unión a proteínas sobre la potencia que un antibiótico tiene contra cierto patógeno han mostrado que se producen cambios en el MIC³ respectivo. En este estudio el antibiótico con el que se ha trabajado es el cloranfenicol (21).

II.B.2. Cloranfenicol: Mecanismo de acción.

El cloranfenicol fue aislado por primera vez en 1947 a partir de cultivos de *Streptomyces venezuelae*, pero ahora es producido sintéticamente. Pertenece al grupo de las anfetaminas y sus derivados. Estos son compuestos orgánicos que contienen o derivan de 1-fenil-propan-2-amina. Su fórmula química es C₁₁H₁₂Cl₂N₂O₅, tiene una

³ MIC: es la concentración más baja del antibiótico que impide el crecimiento visible de una bacteria en una placa de cultivo con disoluciones seriadas de antibiótico (23).

estructura relativamente simple (Figura 4) y es el primer antibiótico de amplio espectro⁴ que fue descubierto (22).

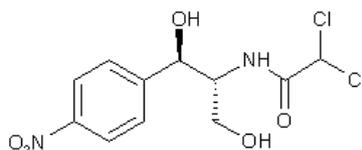


Figura 4. Estructura química del cloranfenicol.

Se puede administrar por diversas vías siendo la oral y la intramuscular las que producen mayor biodisponibilidad, 80% y 70% respectivamente. Una vez en el sistema sanguíneo entre un 50 y un 60% del cloranfenicol se une a proteínas plasmáticas (22).

El cloranfenicol es principalmente bacteriostático⁵, pero puede ser bactericida⁶ en altas concentraciones o cuando se utiliza contra organismos altamente susceptibles. Al ser soluble en lípidos puede difundir a través de la membrana celular bacteriana. Una vez en el citoplasma, se une reversiblemente a la proteína L16⁷ de la subunidad 50S de los ribosomas bacterianos (22). Allí, el cloranfenicol inhibe la actividad de la peptidil-transferasa⁸ al bloquear el sitio A⁹ del ribosoma (Figura 5). Esto impide la unión del siguiente peptidil-tRNA cargado, con lo que se imposibilita la transferencia de aminoácidos a las crecientes cadenas de péptidos, inhibiendo de este modo la formación del enlace péptido y la síntesis de proteínas posterior (26).

La unión al sitio A del ribosoma es posible debido a que las características estructurales del cloranfenicol le permiten formar enlaces de hidrógeno. Los grupos implicados en estas uniones son: el grupo nitro mediante los oxígenos, el grupo OH del carbono 1, el grupo carboxilo y el grupo OH del carbono 3, el cual es crucial para la actividad antibacteriana (26).

⁴ Antibióticos de amplio espectro: aquellos que son efectivos frente a un gran número de gérmenes Gram (+) y Gram (-) y frente a gérmenes no incluidos en la clasificación de Gram (legionellas, chlamydias, etc) (23).

⁵ Bacteriostático: agente que impide el crecimiento de las bacterias (24).

⁶ Bactericida: agente que causa la muerte de las bacterias (24).

⁷ Proteína L16: los ribosomas procariotas están constituidos por dos subunidades de tamaño diferente, una 30S y otra 50S. La subunidad 50S contiene una molécula de ARNr 5S, otra 23S y 34 proteínas que se designan de L1 a L34 (25).

⁸ Peptidil transferasa: enzima que cataliza la formación del enlace peptídico en los ribosomas (27).

⁹ Sitio A del ribosoma: la estructura tridimensional del ribosoma contiene tres sitios de unión, A (correspondiente al aa-tRNA inicial), P (ocupable por el peptidil-tRNA) y E (sitio de salida del tRNA libre) (28).

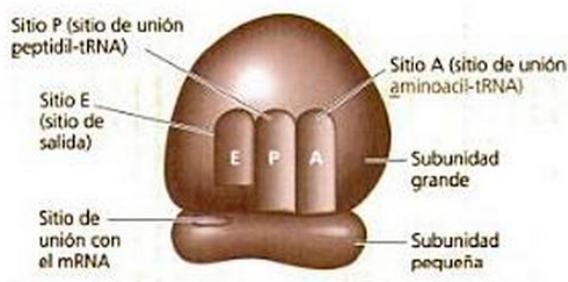


Figura 5. Sitios de unión en el ribosoma.

La vida media del cloranfenicol en adultos con función hepática y renal normal es de entre 1,5 y 3,5 horas y su metabolismo es hepático.

II.B.3. Efectos secundarios.

La similitud entre los ribosomas de las bacterias y los ribosomas mitocondriales de células animales hace que el cloranfenicol pueda afectar a la síntesis de proteína en las mitocondrias. Esto puede tener consecuencias graves, como daños en la médula ósea (si se ven afectadas las mitocondrias óseas), por lo que en humanos, se suele reservar este antibiótico únicamente para el tratamiento de infecciones graves y potencialmente mortales (por ejemplo, fiebre tifoidea) (22, 26).

II.C. Espectroscopía de luminiscencia molecular para el estudio de las interacciones proteína-analito.

II. C.1. Fundamentos.

La luminiscencia molecular hace referencia al fenómeno por el cual algunas moléculas emiten luz al pasar de un estado excitado a un estado fundamental. Dependiendo de cómo sean excitadas las moléculas, la luminiscencia molecular se puede dividir en: fotoluminiscencia (cuando se excita con fotones), quimioluminiscencia (se excita con energía química) y electroquimioluminiscencia (cuando la electricidad es la energía inicial entrante que después es transformada en energía química) (29). En este trabajo nos centramos en la fotoluminiscencia.

II.C.1.1. Absorbancia.

El paso de un haz de energía radiante electromagnética a través de un medio transparente conlleva una absorción parcial de dicha energía. Los átomos, iones o

moléculas de la muestra absorben fotones del haz alterando su estado, de forma que la especie pasa de un estado fundamental a un estado excitado. El estado excitado puede consistir en alguno de los procesos siguientes:

- Transición de un electrón a un nivel energético superior.
- Cambio en el modo de vibración de la molécula.
- Modificación de su estado de rotación.

Para cada una de los procesos anteriores es necesaria una determinada cantidad de energía, siendo ésta muy diferente en cada uno de los tres casos. En general, las transiciones que requieren más cantidad de energía son las que suponen la promoción de electrones a niveles energéticos superiores. Por su parte, las que necesitan menor energía son las que conllevan alteraciones en los modos de rotación (5).

La región del espectro que se corresponde con el ultravioleta-visible es en la que se producen las absorciones que se deben a la promoción de un electrón a algún nivel energético superior. Para que dicha promoción suceda el analito debe tener niveles de energía con déficit de electrones, difiriendo con una cantidad adecuada de energía respecto a otros niveles ya ocupados (5).

Estas transiciones ocurren en la capa de valencia en el caso de compuestos orgánicos. En ellos, los electrones implicados en la absorción son tanto los que se encuentran formando enlaces entre átomos como los que no forman enlaces. Estos últimos, en general, se encuentran alrededor de ciertos átomos como nitrógeno, oxígeno y halógenos. Para que estos electrones participen en el proceso de absorción, debe coincidir exactamente la energía de los fotones incidentes y la diferencia de energía entre el estado fundamental y uno de los estados excitados de la especie.

Las transiciones posibles que pueden sufrir los electrones al ser excitados por energía radiante son las que se muestran en la figura 6.

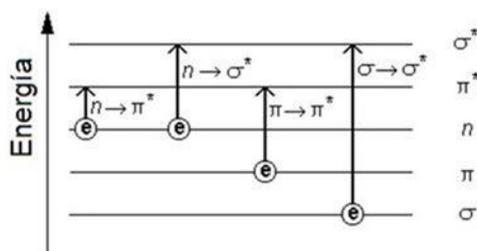


Figura 6. Transiciones electrónicas en las que participan los orbitales π , n y σ .

En el caso de trabajar en la región del ultravioleta-visible, la energía sólo es suficiente para que se produzcan las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$, las cuales implican grupos funcionales característicos del analito. Además, en esta región, y en el caso de sustancias orgánicas, las bandas del espectro de absorción son anchas. Esto se debe a que se produce la superposición de las transiciones vibracionales y rotacionales de menor energía sobre las electrónicas (5).

Es muy útil el conocimiento de las longitudes de onda a las que absorbe cada especie puesto que como las diferencias de energía son características de cada una sirve para caracterizarlas.

II.C.1.2. Fenómenos de fluorescencia y fosforescencia.

Los procesos que ocurren entre la absorción de luz y la emisión de la misma por una molécula son descritos gráficamente por el diagrama de Jablonski (Figura 7) (7). En este diagrama se muestra como un electrón puede pasar del estado fundamental, S_0 , a un nivel vibracional o rotacional del estado excitado, S_1 o S_2 , por absorción de luz. El electrón puede perder la energía que tomó del haz mediante diversos mecanismos. Dentro de estos mecanismos encontramos las desactivaciones no radiantes que se pueden clasificar en los siguientes tipos:

- Relajación vibracional, ocurre desde un nivel vibracional alto a otro inferior dentro del mismo estado electrónico (por ejemplo, dentro de S_1). Ocurre en un tiempo de entre 10^{-14} y 10^{-11} s (5).
- Conversión interna: ocurre entre estados del mismo número cuántico de espín (30) desde el nivel vibracional inferior de un estado electrónico (por ejemplo S_2) al nivel vibracional de misma energía de otro estado electrónico (por ejemplo S_1). Tiene la misma duración que la relajación vibracional (5).
- Cruce intersistemas: ocurre entre niveles de diferente multiplicidad, es decir, entre estados de diferente número cuántico de espín (por ejemplo de S_1 a T_0) (5, 30).
- Desactivación de la fluorescencia o ““*quenching*””.

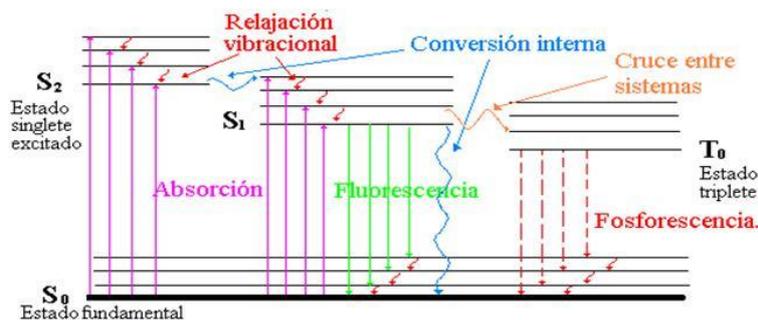


Figura 7. Diagrama de Jablonski. El estado fundamental y los estados electrónicos primero y segundo son designados por S₀, S₁, y S₂, respectivamente.

Otro tipo de desactivación posible son las emisiones radiantes: fluorescencia y fosforescencia.

La fluorescencia tiene lugar cuando un electrón tras absorber luz se encuentra en el estado excitado singlete y regresa al estado fundamental emitiendo un fotón. El regreso al estado fundamental está permitido puesto que el electrón en estado excitado está emparejado por espín opuesto a un electrón del estado fundamental. Generalmente, las tasas de emisión de fluorescencia son de 10^{-8} s (7). Como la relajación vibracional y la conversión interna necesitan sólo entre 10^{-14} y 10^{-11} s, la fluorescencia normalmente se produce desde el estado vibracional inferior del estado excitado S₁ hasta cualquiera de los niveles vibracionales del estado fundamental (S₀) (5, 7).

Por su parte, la fosforescencia es emisión de luz que se produce cuando el electrón en el orbital del estado triplete excitado (T₀) tiene un espín de la misma orientación que el del electrón del estado fundamental (S₀). Por tanto, la transición al estado fundamental es prohibida y la tasa de emisión de fosforescencia es lenta, de 10^3 a 10^0 s⁻¹, así que los tiempos de vida típicos de la fosforescencia son de milisegundos a segundos. Esto implica que la fosforescencia no suele verse en soluciones de fluidos a temperatura ambiente puesto que existen muchos procesos de desactivación que compiten con la emisión, tales como decaimiento no radiactivo explicados anteriormente o procesos de “*quenching*”. Estos procesos de “*quenching*” pueden deberse a impurezas o a la presencia de oxígeno incluso a bajas concentraciones (7). Esto hace que sea necesario emplear determinados reactivos en las disoluciones si se quiere ver la fosforescencia a temperatura ambiente (7).

Tanto la emisión de radiación fluorescente como la fosforescente pueden ser medidas y utilizadas para la identificación o determinación de moléculas orgánicas, es

decir para análisis cualitativos (5, 31). Así mismo, ambas se pueden emplear para hacer estudios cuantitativos (5,32).

II.C.1.3. Espectros de excitación y de emisión.

Los datos espectrales de fluorescencia y fosforescencia se presentan generalmente como espectros de emisión. Éstos son la distribución de longitud de onda de una emisión medida a una longitud de onda de excitación constante única y se muestran gráficamente representando la intensidad de fluorescencia frente a la longitud de onda (nanómetros). Se ha de tener en cuenta que los espectros de emisión grabados en diferentes instrumentos pueden ser distintos debido a las sensibilidades a la longitud de onda de cada uno de los instrumentos (7).

Un espectro de excitación, a la inversa que un espectro de emisión, muestra la dependencia de la intensidad de emisión, medido a una sola longitud de onda de emisión, al barrer las diferentes longitudes de onda de excitación. Estos espectros se suelen representar en escala de longitud de onda (7).

Para la mayoría de los fluoróforos los rendimientos cuánticos y los espectros de emisión son independientes de la longitud de onda de excitación. Como resultado, el espectro de excitación de un fluoróforo puede ser superponible en su espectro de absorción. Sin embargo, rara vez se observan tales espectros de absorción y excitación idénticos porque la intensidad de excitación es diferente en cada longitud de onda (12).

II.C.1.4. “Quenching” de la fluorescencia.

Las muestras con las que se trabaja en este estudio están en disolución, esto supone que exista la posibilidad de que se produzcan interacciones entre el fluoróforo y otras moléculas denominadas “quencher” o desactivantes presentes en la misma (5).

En los procesos de emisión los fluoróforos permanecen en el estado excitado durante periodos de tiempo lo suficientemente amplios como para que se puedan producir dichas interacciones. Éstas pueden conllevar un “quenching” de la fluorescencia del analito, esto es, una disminución de la intensidad de emisión (5, 7).

Los procesos por los que se puede producir el “quenching” son diversos, por ejemplo: reorganizaciones moleculares, transferencia de energías; colisiones entre moléculas, formación de complejos o mecanismos no moleculares, tales como la

atenuación del haz de luz incidente por el propio fluoróforo o por otras especies que absorben (5, 7).

En muestras biológicas es el contacto molecular entre fluoróforo y desactivante el causante de la desactivación de la emisión fluorescente. Este contacto puede ser debido a los encuentros producidos por la difusión, que es el “*quenching*” dinámico, o debido a la formación de complejos, que es el “*quenching*” estático (5, 7).

Debido a la estrecha distancia de interacción requerida para la desactivación, la magnitud del “*quenching*” es sensible a factores moleculares que afectan la tasa y probabilidad de contacto, incluyendo el apantallamiento estérico e interacciones carga-carga (7).

II.C.1.4.1. Determinación del mecanismo de “quenching”.

Para determinar cuál de los dos mecanismos de “*quenching*” (estático o dinámico) tiene lugar se emplea la ecuación de Stern-Volmer que relaciona la intensidad de la fluorescencia con la concentración de desactivante (Ecuación 1) (5):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (\text{Ecuación 1})$$

En esta expresión F_0 es la intensidad de fluorescencia en ausencia de desactivante, F la intensidad de fluorescencia en presencia de quencher, K_{SV} es la constante de “*quenching*” de Stern-Volmer, K_q es la constante de “*quenching*” bimolecular, τ_0 es el tiempo de vida promedio del fluoróforo en ausencia del desactivante y $[Q]$ es la concentración del desactivante. El tiempo de vida de fluorescencia promedio de biopolímeros (τ_0) es 10^{-8} s (5).

La constante de “*quenching*” de Stern-Volmer (K_{SV}) indica la sensibilidad de un fluoróforo por un desactivante. Si el fluoróforo se encuentra protegido en la molécula será parcial o totalmente inaccesible para el desactivante y como consecuencia, normalmente, el valor de K_{SV} será bajo. Por el contrario, los valores de esta constante son altos cuando el fluoróforo se encuentra libre en la disolución o si está situado en la superficie de la molécula (7).

La constante de “*quenching*” bimolecular (K_q) indica si el proceso de desactivación es dinámico o estático. De modo que los valores de esta constante superiores a $2,0 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ implican que el “*quenching*” es estático (5).

Los valores de estas dos constantes (K_{sv} y K_q) se obtienen por regresión lineal a partir de la ecuación de Stern-Volmer, representando F_0/F vs $[Q]$. Si el resultado es lineal, en general, es indicativo de que sólo hay un tipo de fluoróforos, y son todos igualmente accesibles para el desactivante. En el caso de que haya dos poblaciones de fluoróforos, y uno de ellos no sea accesible para el desactivante el gráfico de Stern-Volmer se desvía de la linealidad (7). Sin embargo, es importante tener en cuenta que el hecho de presentar linealidad no sirve para diferenciar entre el mecanismo de “*quenching*” (dinámico o estático). Si es posible corroborar el tipo de “*quenching*” haciendo el estudio a diferentes temperaturas, obteniendo a cada una de ellas constantes con diferentes valores.

La diferencia en los valores se debe a que el “*quenching*” dinámico depende del proceso de difusión y el “*quenching*” estático depende de la estabilidad de los complejos formados. Al aumentar la temperatura, la difusión se ve favorecida y los complejos se desestabilizan, con lo que la constante (K_{sv}) en caso de “*quenching*” dinámico aumenta y en caso de “*quenching*” estático disminuye (5, 7).

II.C.1.4.2. Caracterización del fenómeno de asociación.

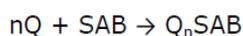
II.C.1.4.2.1 Cálculo de la constante de unión entre cloranfenicol y seroalbúminas.

El valor de la constante de unión (K_b) y el número de sitios de unión (n) se pueden determinar, en caso de que el “*quenching*” sea estático, a partir de la ecuación modificada de Stern-Volmer (Ecuación 2) representando gráficamente el doble logaritmo $\text{Log} (F_0 - F)/F$ vs $\text{Log} [Q]$ (5):

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_b + n \log [Q] \quad (\text{Ecuación 2})$$

Esta ecuación surge del siguiente razonamiento:

La reacción de desactivación que tiene lugar cuando una proteína (SAB) presenta n sitios de unión para el desactivante (Q) es la siguiente:



En la reacción entre la proteína y el desactivante, la constante de unión entre ambas moléculas (K_b) se define por la siguiente relación:

$$K_b = \frac{[Q_nSAB]}{[Q]^n[SAB]}$$

siendo [Q] y [SAB] las concentraciones molares de desactivante y de proteína no unidas, respectivamente.

La concentración de moléculas de desactivante unidas a la proteína es:

$$[Q_nSAB] = [SAB_0] - [SAB]$$

siendo [SAB₀] la cantidad inicial de biomoléculas.

Atendiendo a lo descrito anteriormente y teniendo en cuenta que la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la concentración de proteínas:

$$\frac{[SAB]}{[SAB_0]} = \frac{F}{F_0}$$

se llega a la ecuación modificada de Stern-Volmer (Ecuación 2).

II.C.1.4.2.2. Determinación de la fracción de fluoróforo accesible.

Para determinar la fracción de fluoróforo accesible al desactivante (f_a) nos basamos en el método desarrollado por Lehrer (33) que se basa en la ecuación de Stern-Volmer (33). Según este método, en ausencia de desactivante, la fluorescencia total de la macromolécula (F_0) se debe a la contribución de tanto de los fluoróforos expuestos al medio (F_{0a}), y que son accesibles (F_{0b}), como de los no accesibles:

$$F_0 = F_{0a} + F_{0b}$$

La adición de desactivante afectará solo a la fracción de fluoróforo accesible:

$$F = \frac{F_{0a}}{1 + K [Q]} + F_{0b}$$

Las dos expresiones anteriores permiten llegar a la ecuación final (Ecuación 3):

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a K [Q]} + \frac{1}{f_a} \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde K es la constante de “quenching” de Stern-Volmer de la fracción accesible. A partir de esta ecuación se puede representar $F_0/\Delta F$ en función de $1/[Q]$, siendo [Q] la concentración de desactivante, y se obtiene una recta. De la intercepción de esta recta con el eje de ordenadas ($1/f_a$) se puede determinar la fracción molar de fluoróforo accesible al desactivante (f_a) (15).

II.C.1.4.2.3. Determinación de los modos de unión. Fuerzas de interacción entre la proteína y el antibiótico.

Normalmente, las moléculas pequeñas se unen a macromoléculas a través de cuatro modos de unión: enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, e interacciones electrostáticas e hidrófobas (34). Para confirmar cuál de estas fuerzas actúa son importantes los parámetros termodinámicos entalpía (ΔH) y entropía (ΔS) de reacción. Los valores de estos parámetros se determinan, trabajando dentro de un rango de temperaturas en el que no se degraden las proteínas, a partir de la ecuación de van't Hoff (35):

$$\ln K = \frac{-\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R}$$

donde K es la constante de unión a la temperatura T, y R es la constante de los gases. Los valores de ΔH_0 y ΔS_0 se calculan a partir de la pendiente y la intersección de la representación gráfica del $\ln K$ frente a $1/T$. La variación de energía Gibbs (ΔG_0) se calcula según la ecuación (35):

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0$$

La magnitud y el signo de estos parámetros termodinámicos asociados a interacciones individuales que se pueden dar en procesos de asociación de proteínas sirven para confirmar el modo de unión (5) y han sido descritos por Ross y Subramanian (18). Según estos autores, un valor positivo ΔH se suele tomar como prueba de que la unión se produce por interacciones hidrofóbicas; valores positivos de ΔS y negativos de ΔH son indicativo de que son las fuerzas electrostáticas específicas entre especies iónicas en solución acuosa las responsables de la unión; valores negativos de ΔH y de ΔS indican que la unión se debe a las fuerzas de van der Waals y la formación de enlaces de hidrógeno (35). Además, el signo negativo para la energía de Gibbs (ΔG_0) significa que el proceso de interacción es espontáneo (5).

II.C.1.5. “Quenching” de la fosforescencia.

La fosforescencia puede ser observada en la mayoría de proteínas trabajando a temperatura ambiente cuando el oxígeno es eliminado de la disolución (37).

El mecanismo por el que determinadas moléculas desactivan la fosforescencia del triptófano de las proteínas es interesante para el estudio de la dinámica de las proteínas. La interacción puede reflejar cierta exposición del residuo de triptófano al

solvente, la penetración del desactivante a la matriz proteica o ciertos comportamientos debidos al despliegue de la proteína (37).

Las interacciones entre proteína y medicamentos normalmente son caracterizadas por estudios de fluorescencia de los residuos triptófano de la cadena peptídica (38). Sin embargo, los estudios de “*quenching*” de la fluorescencia están limitados por la escala de tiempo en la que transcurre la fluorescencia, nanosegundos. El mayor tiempo de vida de la fosforescencia, en algunos casos, en el orden de los segundos, permite medidas de reacciones que ocurren más despacio y proporciona más pruebas de la habilidad de ciertos desactivantes para interaccionar con triptófanos difícilmente accesibles (37, 39).

Además de la presencia de oxígeno, estos largos tiempos de vida de la fosforescencia (5) y la presencia de moléculas pequeñas como agua o aminoácidos también dificultan la medida de la fosforescencia (5). En la bibliografía se indica que para mejorar la señal de la fosforescencia se pueden añadir átomos pesados a la disolución de trabajo, por ejemplo, adición de yoduro potásico (KI). Esta mejora en la señal se debe a que los átomos pesados aumentan la velocidad de los cruces entre sistemas (40). Así mismo, se habla del empleo de sulfito de sodio para desoxigenar la muestra y evitar el “*quenching*” no deseado que provoca el oxígeno (39,41).

III. DESARROLLO EXPERIMENTAL

III.A. Materiales.

III.A.1. Reactivos y disoluciones.

Los reactivos utilizados se muestran en la tabla I.

Reactivo		Peso molecular (Da)	Pureza (%)	Casa comercial
Aminoácido	L-Tirosina	181,2	98	SIGMA
	L-Triptófano	204,2	98	
	L-Fenilalanina	165,2	98	
Albúmina	Bovina	69293	96	SIGMA
	Porcina	69692	98	
	Oveja	69188	100	
	Conejo	68910	99	
Antibiótico	Cloranfenicol	323,13	98	ALDRICH
Yoduro de potasio	KI	166,01	99,5	NORMAPUR
Sulfito de sodio	Na ₂ SO ₃	126,04	98	PROBUS

Tabla I. Reactivos empleados en el estudio.

Con estos reactivos se prepararon las disoluciones empleadas en el estudio de las interacciones entre albúminas animales y cloranfenicol sin purificación alguna.

Las disoluciones madre de aminoácidos se prepararon a una concentración $2,1 \times 10^{-3}$ M. A partir de éstas, se obtuvieron las disoluciones diluidas 2×10^{-5} M con las que se realizaron las correspondientes medidas de fotoluminiscencia molecular.

En el caso de las albúminas, para las cuatro empleadas, se prepararon disoluciones madre 1×10^{-4} M. De ellas se tomaron alícuotas del volumen necesario cada día para realizar los ensayos con concentraciones 1×10^{-5} M.

La disolución madre de cloranfenicol se preparó con una concentración 1×10^{-3} M. A partir de ella se prepararon diariamente las disoluciones trabajo.

Tanto para las disoluciones madre de las albúminas como para la de antibiótico el máximo período de estabilidad fue de 15 días conservándolas durante este tiempo en nevera a 4°C.

La disolución de yoduro de potasio y la de sulfito de sodio se prepararon a concentraciones 5 M y 2 M respectivamente. La disolución de sulfito de sodio se preparó diariamente.

Para la preparación de todas las disoluciones se empleó agua destilada.

III.A.2. Aparatos e instrumentos.

Los instrumentos empleados se detallan a continuación:

- Un espectrofluorímetro Agilent Varian Cary Eclipse cuya fuente de excitación es una lámpara pulsada de Xenón (80pulsos/s). La anchura de pulso es de entre 2 y 3 microsegundos. El instrumento se encuentra conectado a un ordenador para el análisis y almacenamiento de datos mediante el software Agilent Cary WinFLR. Se empleó para medidas de fluorescencia de caracterización de las moléculas a temperatura ambiente y para hacer medidas de fosforescencia.
- Un espectrofluorímetro de tiempo resuelto (time-resolved spectrofluorimeter) de Edimburgh Instruments (modelo FLSP920) para medidas de fluorescencia tanto estacionaras como resueltas en el tiempo. Permite la obtención de espectros sincrónicos, de emisión y de excitación, termostatación de la muestra, medida de disoluciones y de sólidos, análisis de polarización de fluorescencia y determinación de tiempos de vida hasta el orden de los nanosegundos. Se empleó para el estudio de quenching trabajando a temperatura controlada y para el estudio de los tiempos de vida de fluorescencia trabajando con el láser/led como fuente y el detector MCP (Microchannel Plate Detector).
- Un espectrofotómetro visible-ultravioleta-infrarrojo cercano Perkin Elmer Lambda 900. Presenta como fuente una lámpara de deuterio y de halógeno tungsteno. El equipo está conectado a un ordenador que tiene el software UV WinLab para el tratamiento de datos. El detector de este equipo es un fotomultiplicador R6872.

III.B. Protocolos de medida.

III.B.1. Medidas de absorción UV-VIS.

III.B.1.1. Medida de las albúminas.

Para obtener los espectros de absorción en el equipo de doble haz (Perkin Elmer Lambda 900), en primer lugar se requiere tener una línea de base. Para ello, se emplea agua destilada en cada una de las dos cubetas, tanto en la de muestra como en la de referencia. Tras ello, se mantiene la cubeta de referencia con el disolvente y en la cubeta de muestra se van introduciendo y midiendo cada una de las disoluciones de albúmina

(bovina, porcina, de oveja y de conejo) 1×10^{-5} M. El barrido de longitudes de onda se hace desde 400 nm hasta 200 nm.

III.B.1.2. Medidas del antibiótico

En este caso se procede de la misma manera que en el caso de las albúminas pero trabajando con una disolución de cloranfenicol 1×10^{-5} M.

III.B.2. Medidas de fluorescencia.

III.B.2.1. Medidas de aminoácidos.

Las albúminas estudiadas presentan sólo tres aminoácidos con fluorescencia intrínseca: la fenilalanina, la tirosina y el triptófano. Con el fin de determinar las longitudes de onda de emisión y excitación propias de estos aminoácidos se hicieron medidas con el espectrofotometro Cary Eclipse a temperatura ambiente comenzando con un barrido sincrónico de disoluciones de cada aminoácido 1×10^{-5} M. El valor de Delta empleado fue de 50 nm, la longitud de onda de comienzo del barrido fue 200 nm y la de finalización 400 nm. Las rendijas de excitación y emisión fueron de 5 nm. A partir del espectro proporcionado por este barrido, se obtuvieron posteriormente los máximos de excitación y de emisión para cada aminoácido (mostrados en el apartado de “Resultados y discusión”).

III.B.2.2. Medidas de albúminas.

Las medidas de fluorescencia para caracterizar las albúminas también se llevaron a cabo con el espectrofotometro Cary Eclipse a temperatura ambiente. Se midieron disoluciones 1×10^{-5} M de cada albúmina, preparadas a partir de la dilución de las disoluciones madre 1×10^{-4} M. Las longitudes de onda de excitación empleadas fueron 275 nm (zona del espectro donde contribuyen los tres aminoácidos: fenilamina, tirosina y triptófano) y 295 nm (zona en la que solo contribuye el triptófano). Para todas las albúminas se emplearon rendijas de excitación y emisión de 5 nm.

III.B.2.3. Medidas de cloranfenicol.

Las medidas se realizaron a temperatura ambiente con el espectrofotometro Cary Eclipse. Se empleó una disolución de cloranfenicol 1×10^{-5} M, preparada a partir de la disolución madre 1×10^{-3} M.

Para la determinación de los máximos de excitación y emisión propios del antibiótico en primer lugar se hizo un barrido sincrónico, con un valor de Delta de 50 nm, y en la región del espectro que abarca desde 200 nm hasta 500 nm. Las rendijas empleadas fueron de 10 nm. A partir del espectro obtenido en este barrido se obtuvieron los máximos de excitación y emisión del cloranfenicol.

Para estudiar el solapamiento entre el espectro del antibiótico y los espectros de las albúminas, se trabajó con rendijas de 5 nm. Se excitó la disolución de cloranfenicol 1×10^{-5} M a dos longitudes de onda: 295 nm (donde contribuye sólo el triptófano) y a 279 nm que es la longitud de onda de excitación de la albúmina obtenida en el paso anteriormente explicado (“Medidas de fluorescencia de las albúminas”).

III.B.3. Medidas de fosforescencia.

Para realizar las medidas de fosforescencia de las albúminas se emplea el espectrofotómetro Cary Eclipse y se trabaja a temperatura ambiente. En este caso las disoluciones de trabajo, con un volumen final de 2,5 ml, se prepararon en la propia cubeta a partir de las disoluciones madre. Se emplearon 250 μ L de albúmina 10^{-4} M, 80 μ L de KI 5 M y 200 μ L de Na_2SO_3 2 M para conseguir una concentración final de albúmina en la disolución trabajo de 10^{-5} M. La longitud de onda de excitación empleada fue 295 nm (sólo presenta fosforescencia el triptófano) y las rendijas de entrada y salida fueron de 20 nm (puesto que con rendijas inferiores no se observa fosforescencia).

III.B.4. Medidas de “quenching” de la fluorescencia.

Para estudiar el “quenching” de la fluorescencia se empleó el espectrofotómetro de tiempo resuelto de Edimburgh Instruments (modelo FLSP920). En primer lugar se mide un blanco, que consiste en una disolución que sólo contiene albúmina 10^{-5} M. Posteriormente se llevan a cabo las medidas de disoluciones con una concentración fija de albúmina 10^{-5} M y concentraciones crecientes de cloranfenicol: 5×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 3×10^{-5} M, 7×10^{-5} M y 1×10^{-4} M. Para prepararlas se emplean matraces de 10 ml, en los que sobre 1ml de albúmina 10^{-4} M se añaden las diferentes concentraciones de antibiótico y se enrasa con agua destilada. Se hacen estas medidas a diferentes temperaturas: 22°C, 27°C, 32°C, 37°C y 42°C. La longitud de onda de excitación

empleada es de 295 nm y la de emisión 345 nm. La rendija de excitación es de 3nm y la de emisión de 1nm.

III.B.5. Medidas de “quenching” de la fosforescencia.

Se empleó el espectrofotómetro Cary Eclipse trabajando a temperatura ambiente. Las disoluciones de trabajo se preparan directamente en la cubeta de medida. En primer lugar se mide un blanco preparado con 250 μL de albúmina 10^{-4} M, 80 μL de KI 5 M, 200 μL de Na_2SO_3 2 M y 1970 μL de agua destilada (volumen total: 2,5 ml). Posteriormente se realizan medidas de disoluciones preparadas con concentraciones crecientes de cloranfenicol: 10^{-7} M, 5×10^{-7} M, 9×10^{-7} M, 5×10^{-6} M, 9×10^{-6} M y 5×10^{-5} M; manteniendo fija una concentración 10^{-5} M de albúmina. La longitud de onda de excitación empleada fue 295 nm con rendijas de excitación y emisión a 20 nm.

III.B.6. Medida de tiempos de vida de fluorescencia y fosforescencia.

Los tiempos de vida de fluorescencia se midieron con el espectrofotómetro de Edimburgh Instruments (modelo FLSP920) a temperatura ambiente. En primer lugar se realiza una medida de referencia durante 20 minutos con una solución muy diluida de sílice coloidal (LUDOX). Posteriormente se miden dos disoluciones de cada albúmina preparadas en la propia cubeta. La primera sólo contiene albúmina 10^{-5} M y la siguiente contiene, además de la albúmina 10^{-5} M, cloranfenicol 3×10^{-5} M. Estas disoluciones se miden durante 10 minutos. La longitud de onda de excitación con la que se trabaja es de 299,6 nm (longitud de onda correspondiente al láser empleado), la de emisión es de 345 nm y $\Delta\lambda$ tiene un valor de 15 nm.

Los tiempos de vida de fosforescencia se midieron con el espectrofotómetro Cary Eclipse trabajando a temperatura ambiente. Se trabajó con dos disoluciones de cada albúmina: una disolución 1 (volumen 2,5 ml) que contenía 250 μL de albúmina 10^{-4} M, 80 μL KI 5 M, 200 μL Na_2SO_3 2 M y 1970 μL de agua destilada, y una disolución 2 (volumen de 2,5 ml) que contenía 250 μL de albúmina 10^{-4} M, 80 μL KI 5 M, 200 μL Na_2SO_3 2 M, 125 μL de cloranfenicol 10^{-4} M y 1845 μL de agua destilada.

Las longitudes de onda de excitación y emisión empleadas fueron 295 nm y 445 nm, respectivamente. Éstas son las longitudes de onda a las que se excita y emite el tritófano. Las rendijas de excitación y emisión fueron de 20 nm.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.A. Características espectroscópicas de las proteínas.

IV.A.1. Medidas de absorción UV-VIS. Espectros.

En este proyecto se ha trabajado con cuatro seroalbúminas diferentes: bovina, porcina, de conejo y de oveja. Para llevar a cabo su caracterización en primer lugar se estudió su absorbancia en la región UV-Vis (ver protocolo de medida III.B.1.1.). Se obtuvieron los espectros de absorción con disoluciones 10^{-5} M de cada una de las albúminas. En la figura 8 se muestran los espectros obtenidos para las distintas proteínas en estudio.

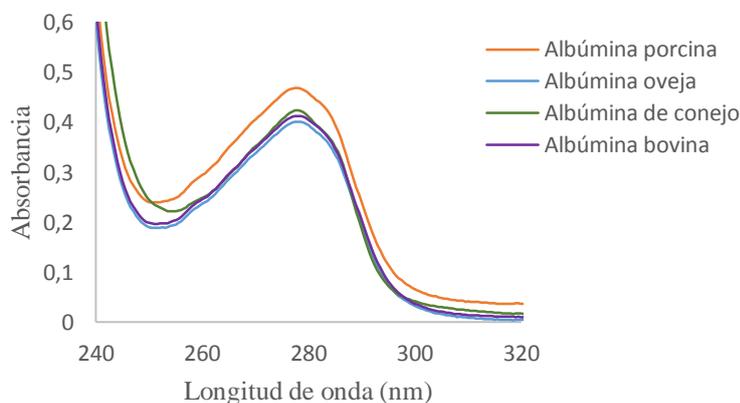


Figura 8. Espectros de absorción de disoluciones de albúminas 10^{-5} M.

Los picos de absorción se observan entre 250 nm y 310nm, lo cual se debe a la presencia de los aminoácidos triptófano, tirosina y fenilalanina. Los máximos de absorción de las cuatro albúminas se encuentran a 278 nm. Estos valores están en concordancia con los ya publicados (7).

IV.A.2. Medidas de fluorescencia.

Las seroalbúminas presentan en su estructura aminoácidos que tienen propiedades fluorescentes, estos son el triptófano, la tirosina y la fenilalanina, como se indicó en la introducción.

Se llevaron a cabo las medidas de fluorescencia (ver protocolo de medida III.B.2.1.) con disoluciones 10^{-5} M de estos aminoácidos para determinar sus espectros de excitación y de emisión, dichos espectros se muestran en la figura 9.

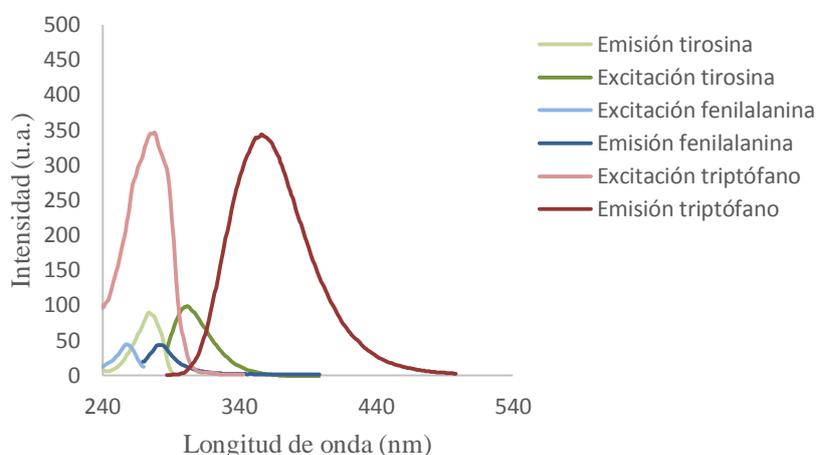


Figura 9. Espectros de excitación y emisión de la fenilalanina, la tirosina y el triptófano

Los máximos de excitación y emisión obtenidos se muestran en la tabla II:

Aminoácido	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)
Trp	278	356
Tyr	274	302
Phe	257	281

Tabla II. Longitudes de onda de excitación y emisión del triptófano, la tirosina y la fenilalanina.

Como consecuencia de presentar estos tres aminoácidos en su cadena peptídica las albúminas tienen fluorescencia intrínseca.

Para una solución de albúmina pura, se ve una señal de fluorescencia fuerte a longitudes de onda de excitación de entre 275 nm y 295 nm (42). Si se excitan las disoluciones de albúmina 10^{-5} M a una longitud de onda de 275 nm (ver protocolo de medida III.B.2.2), se obtiene el espectro correspondiente a la contribución de los tres aminoácidos fluorescentes tal y como se muestra en la figura 10.

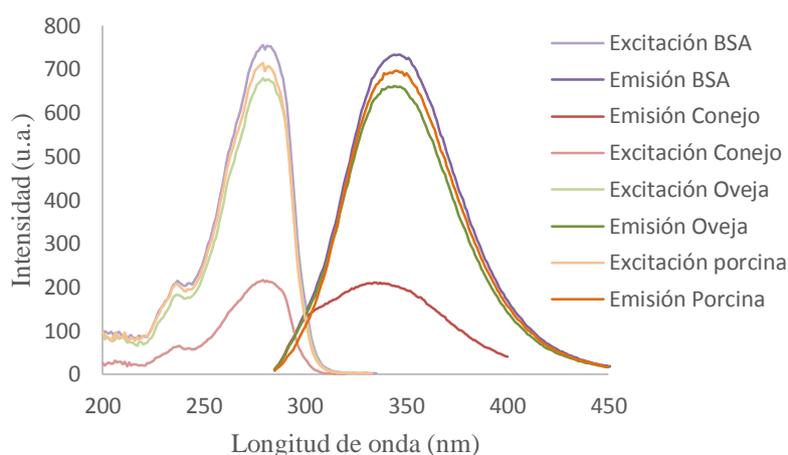


Figura 10. Espectros de excitación y emisión de las seroalbúminas bovina, porcina, de conejo y de oveja, excitando a 275nm.

Los máximos de excitación y emisión se recogen en la tabla III.

Albúmina	λ_{em} (nm)	λ_{exc} (nm)
Bovina	347	279
Oveja	344	279
Porcina	345	279
Conejo	335	279

Tabla III. Longitudes de onda de emisión y de excitación obtenidas para las cuatro albúminas.

Tal como se puede observar en la figura 11, en el caso de excitar las muestras de albúmina a una longitud de onda de 295 nm, se obtienen los espectros de fluorescencia correspondientes únicamente a los residuos de triptófano. Por tanto, la intensidad de emisión es menor que en el caso de excitar a 275 nm. La diferencia entre los espectros obtenidos utilizando cada una de las longitudes de onda de excitación (275 nm y 295 nm) se muestran en la figura 11.

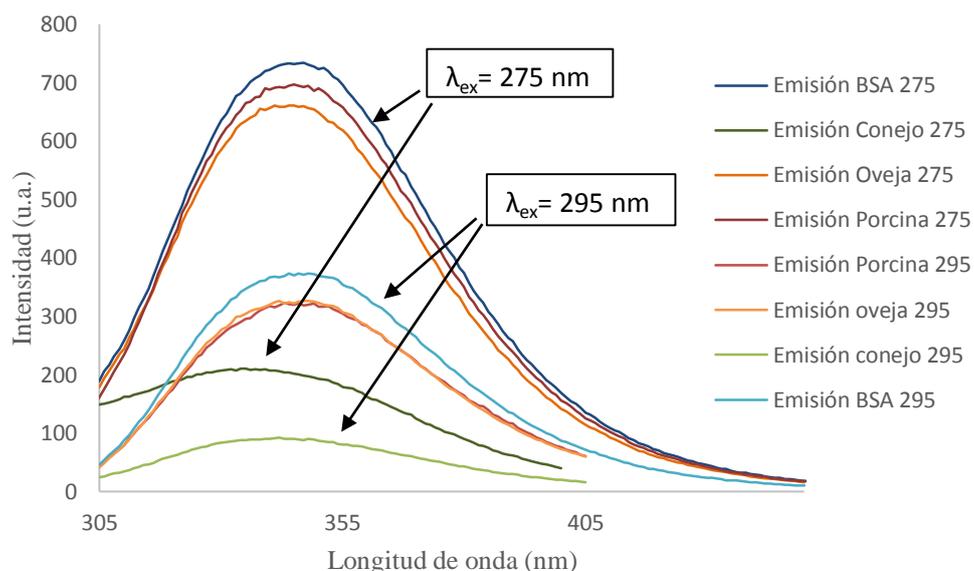


Figura 11. Comparación de los espectros de emisión de las cuatro seroalbúminas excitando a 275 nm y a 295 nm.

Los máximos de emisión y excitación en el caso de excitar a 295 nm se muestran en la tabla IV donde se observan ligeros desplazamientos de los máximos hacia el rojo como consecuencia del mayor peso de la banda de emisión del triptófano sobre el resto de la proteína.

Albúmina	λ_{em} (nm)
Bovina	348
Oveja	347
Porcina	343
Conejo	342

Tabla IV. Longitudes de onda de emisión obtenidas para las albúminas al excitar a 295 nm, longitud de onda de excitación del triptófano.

IV.A.3. Medidas de fosforescencia.

La fosforescencia aporta información complementaria a la fluorescencia para caracterizar las biomoléculas estudiadas. Por tanto, se llevaron a cabo medidas de fosforescencia (ver protocolo de medida III.B.3.) de disoluciones 10^{-5} M de cada albúmina a temperatura ambiente utilizando una longitud de onda de excitación de 295 nm, donde sólo contribuye el triptófano. Para las medidas de fosforescencia se emplearon disoluciones de IK y Na_2SO_3 para obtener una mayor eficiencia cuántica. La

presencia de iones yoduro favorecen el cruce intersistema al actuar como átomo pesado, mientras que el sulfito de sodio se emplea como agente químico de desoxigenación ya que la presencia de oxígeno desactiva el estado triplete. Los espectros obtenidos se muestran en la figura 12.

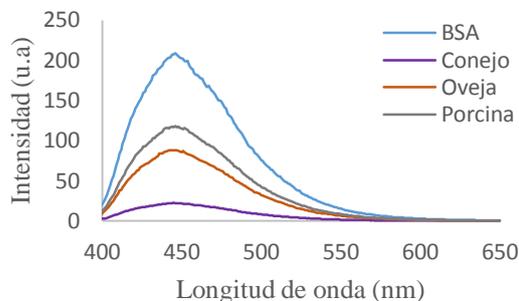


Figura 12. Espectros de fosforescencia de las cuatro albúminas (Bovina, porcina, de oveja y de conejo) a temperatura ambiente.

Los máximos de emisión de cada albúmina se recogen en la tabla V.

Albúmina	λ_{em} (nm)
Bovina	446
Porcina	446
Oveja	445
Conejo	445

Tabla V. Máximos de emisión de fosforescencia para cada albúmina excitando a 295nm.

Estos datos están en concordancia con los ya reportados (39).

IV.B. Características espectroscópicas del antibiótico.

IV.B.1. Medidas de absorción UV-VIS.

Con el fin de caracterizar el antibiótico empleado, se llevó a cabo una medida de absorbancia de una disolución 10^{-5} M de cloranfenicol (ver protocolo de medida III.B.1.2.) obteniéndose un máximo de absorción a 273 nm (Figura 13).

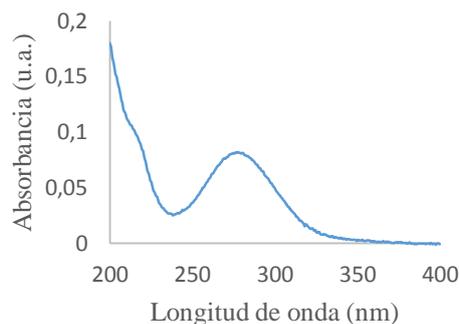


Figura 13. Medida de absorbancia del cloranfenicol.

IV.B.2. Medidas de fluorescencia.

Para determinar las longitudes de onda de emisión y excitación propias del cloranfenicol se llevaron a cabo medidas de fluorescencia de una disolución 10^{-5} M de antibiótico (ver protocolo de medida III.B.2.3.). En las condiciones operatorias empleadas y a las concentraciones de trabajo no se observa ninguna banda luminiscente, sólo aparecen unos picos de muy escasa intensidad correspondientes al Raman del agua.

IV.C. Estudio de “*quenching*” de la fluorescencia de las seroalbúminas.

Si bien el antibiótico en estudio no posee propiedades luminiscentes intrínsecas se sabe que interacciona con las albúminas, las cuales participan mayoritariamente en su transporte a través del flujo sanguíneo (22). Dado que la fluorescencia es una técnica que puede dar información sobre el microentorno del fluoróforo se procedió a estudiar el efecto de la presencia de antibiótico en las disoluciones de seroalbúmina.

Estudios preliminares demuestran que la presencia del antibiótico produce un efecto desactivante de la luminiscencia de las distintas seroalbúminas fenómeno que se conoce comúnmente como “*quenching*” de la fluorescencia.

Para estudiar más en profundidad el “*quenching*” de la fluorescencia de las cuatro albúminas (bovina, porcina, de oveja y de conejo) se trabajó con una concentración constante de albúmina (10^{-5} M) y se fue variando la concentración de antibiótico (ver protocolo de medida III.B.4.). En primer lugar se trabajó con temperatura controlada, a 22°C.

En la figura 14 se observa el efecto de añadir concentraciones crecientes de cloranfenicol a concentraciones fijas de cada una de las albúminas.

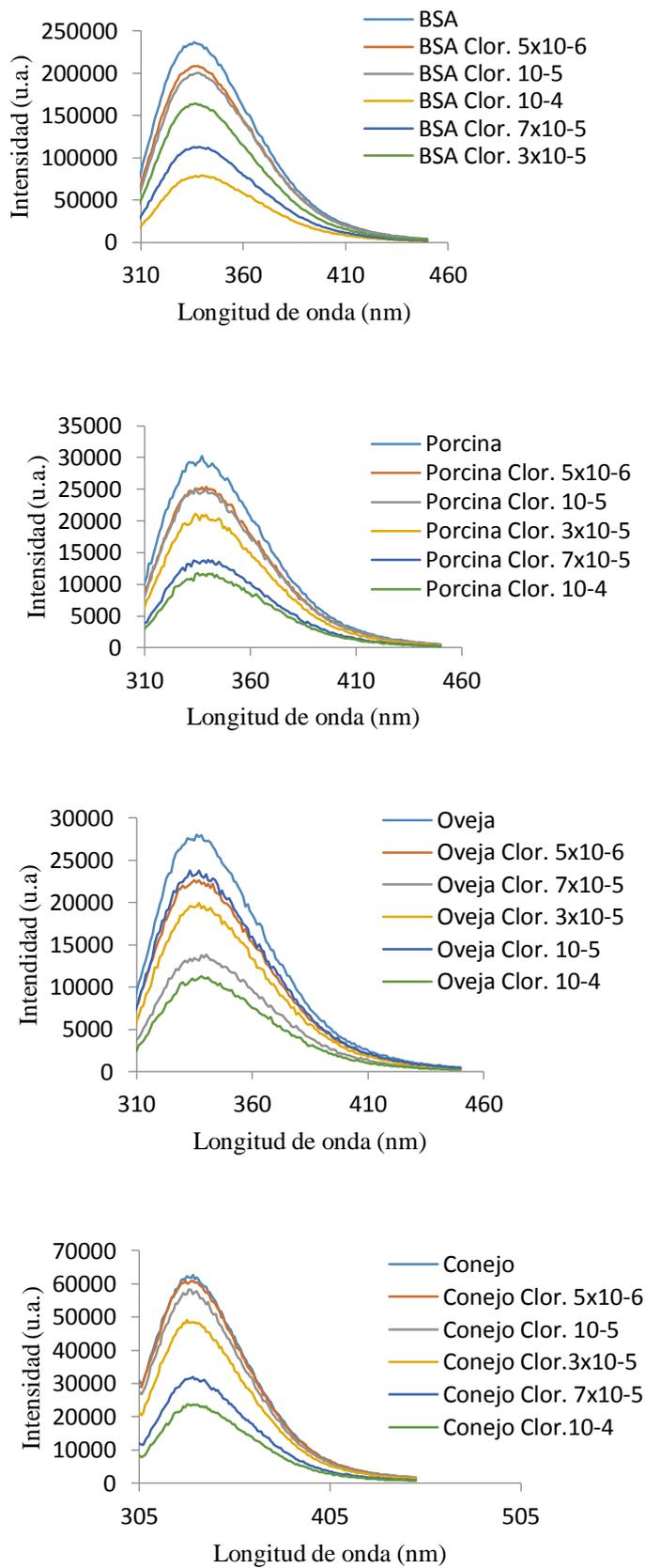


Figura 14. “*Quenching*” de la fluorescencia de las albúminas trabajando con concentraciones crecientes de cloranfenicol a 22°C.

En la figura 14 cada albúmina se indica con el nombre del animal al que corresponde (excepto la bovina que aparece como BSA) y el cloranfenicol aparece como “Clor.” seguido de su concentración molar.

Se observa como al aumentar la concentración de antibiótico disminuye la intensidad de la fluorescencia de las albúminas. Además, no se observa desplazamiento de la longitud de onda máxima de emisión. Esto indica que se produce una interacción entre cada una de las albúminas y el antibiótico dando lugar a la desactivación de la fluorescencia intrínseca que tienen estas proteínas.

Para confirmar una relación directa entre el fenómeno de unión entre albúmina y antibiótico y la disminución de la fluorescencia intrínseca de las proteínas se debe llevar a cabo un estudio del mecanismo de “*quenching*”.

IV.C.1. Determinación del mecanismo de “quenching”.

Para determinar el mecanismo de desactivación se representan los gráficos de Stern-Volmer (Ecuación 1) para cada una de las albúminas estudiadas, trabajando a 22°C. Estos gráficos se muestran en la figura 15.

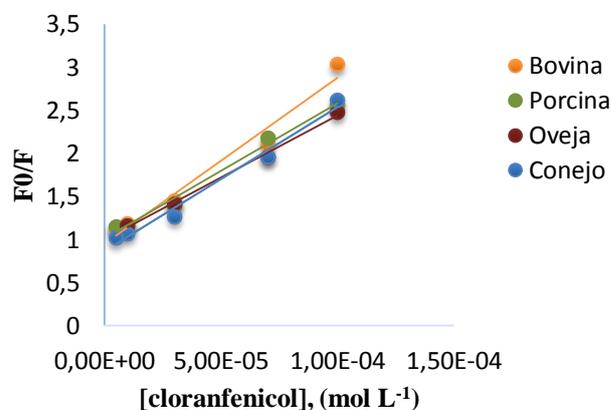


Figura 15. Gráficos de Stern-Volmer para las cuatro albúminas trabajando con concentraciones crecientes de cloranfenicol a 22°C.

A partir de esta representación se obtienen los valores de la constante de quenching bimolecular (K_q) y de la constante de quenching de Stern-Volmer (K_{sv}). Estos valores se recogen en la tabla VI:

Albúmina	$K_{sv} (L mol^{-1}) \cdot 10^4$	$K_q (L mol^{-1} s^{-1}) \cdot 10^{12}$	r^2
BSA	$1,92 \pm 0,2$	1,92	0,9546
Porcina	$1,57 \pm 0,0$	1,57	0,9903
Oveja	$1,44 \pm 0,0$	1,44	0,9956
Conejo	$1,67 \pm 0,1$	1,67	0,9851

Tabla VI. Constantes de quenching bimolecular y constante de Stern-Volmer para la interacción de cada albúmina con cloranfenicol a 22°C.

El “*quenching estático*” puede distinguirse del dinámico a través de la constante K_q ya que de acuerdo a la literatura para “*quenching dinámico*” el valor máximo de K_q con biopolímeros es de $2,0 \times 10^{10} Lmol^{-1}s^{-1}$ (5). Se puede observar como con las cuatro albúminas se obtienen valores de la constante de quenching bimolecular (K_q) mayores de $2,0 \times 10^{10} Lmol^{-1}s^{-1}$. Esto indica que el mecanismo de “*quenching*” es estático, es decir, debido a una interacción específica entre cada albúmina y el cloranfenicol en el estado fundamental. Por tanto, el principal motivo de “*quenching*” es la formación de complejos albúmina-antibiótico siendo poco significativo el “*quenching*” dinámico en las condiciones en las que se ha realizado el estudio.

Otra manera de corroborar los resultados obtenidos respecto a la naturaleza del “*quenching*” es obteniendo las constantes de “*quenching*” a diferentes temperaturas. En la figura 16 se muestran las gráficas de Stern-Volmer obtenidas a distintas temperaturas (22°C, 32°C y 42°C).

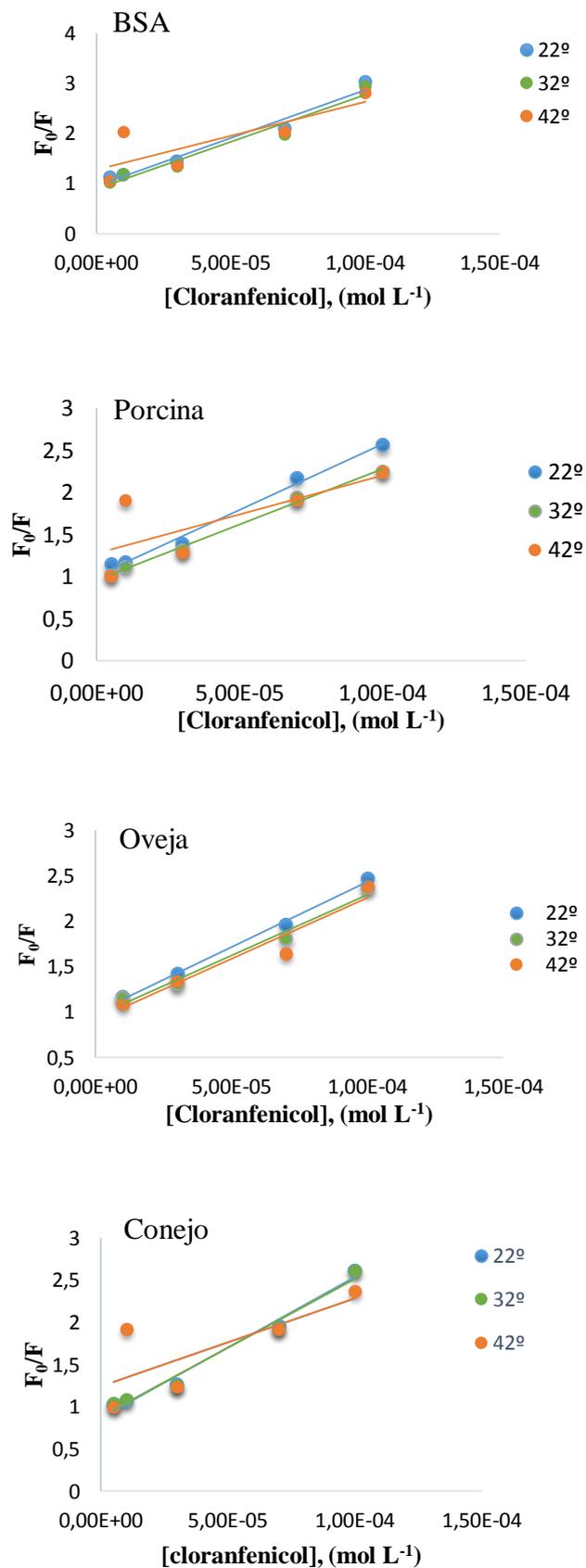


Figura 16. Gráficos de Stern-volmer para las cuatro albúminas trabajando a concentraciones crecientes de antibiótico y con diferentes temperaturas.

Los valores de las constantes de “*quenching*” obtenidas a partir de los resultados correspondientes a las distintas temperaturas se muestran en la tabla VII.

Albúmina	22°C			32°C		
	k_{sv} (L mol ⁻¹) .10 ⁴	k_q (L mol ⁻¹ s ⁻¹).10 ¹²	r^2	k_{sv} (L mol ⁻¹) .10 ⁴	k_q (L mol ⁻¹ s ⁻¹).10 ¹²	r^2
Bovina	1,92 ± 0,2	1,92	0,9690	1,88 ± 0,2	1,88	0,9578
Porcina	1,57 ± 0,0	1,57	0,9903	1,31 ± 0,0	1,31	0,9949
Oveja	1,44 ± 0,0	1,44	0,9956	1,34 ± 0,1	1,34	0,977
Conejo	1,67 ± 0,1	1,67	0,9851	1,64 ± 0,1	1,64	0,9778

Albúmina	42°C		
	k_{sv} (L mol ⁻¹) .10 ⁴	k_q (L mol ⁻¹ s ⁻¹).10 ¹²	r^2
Bovina	1,36 ± 0,5	1,36	0,6586
Porcina	9,22 ± 0,4	0,92	0,5527
Oveja	1,35 ± 0,2	1,35	0,9331
Conejo	1,04 ± 0,5	1,04	0,5754

Tabla VII. Constantes de “*quenching*” para la interacción albúmina-antibiótico trabajando a diferentes temperaturas.

Ya que el “*quenching dinámico*” depende de la difusión es de esperar que la elevación de la temperatura de como resultado un aumento del coeficiente de difusión y que K_q aumente. En la tabla VII se observa como para todas las albúminas se produce una disminución de la constante del “*quenching*” con el aumento de la temperatura. Este comportamiento es de esperar si la desactivación es de carácter estático ya que la estabilidad del complejo formado disminuirá con el aumento de la temperatura. De esta manera se confirma que el “*quenching*” es estático.

IV.C.2. Características del fenómeno de asociación.

IV.C.2.1. Cálculo de la constante de unión entre el cloranfenicol y seroalbúminas

Estudiar el decrecimiento de la intensidad de fluorescencia empleando concentraciones crecientes de antibiótico, a unas temperaturas determinadas, es útil para calcular la constante de unión (K_b) y el número de sitios de unión (n) en la interacción

albúmina-antibiótico. Para ello, se emplea la ecuación modificada de Ster-Volmer (Ecuación 2) explicada en la introducción, a partir de la cual se representan las curvas de regresión doble logarítmica para cada albúmina, figura 17.

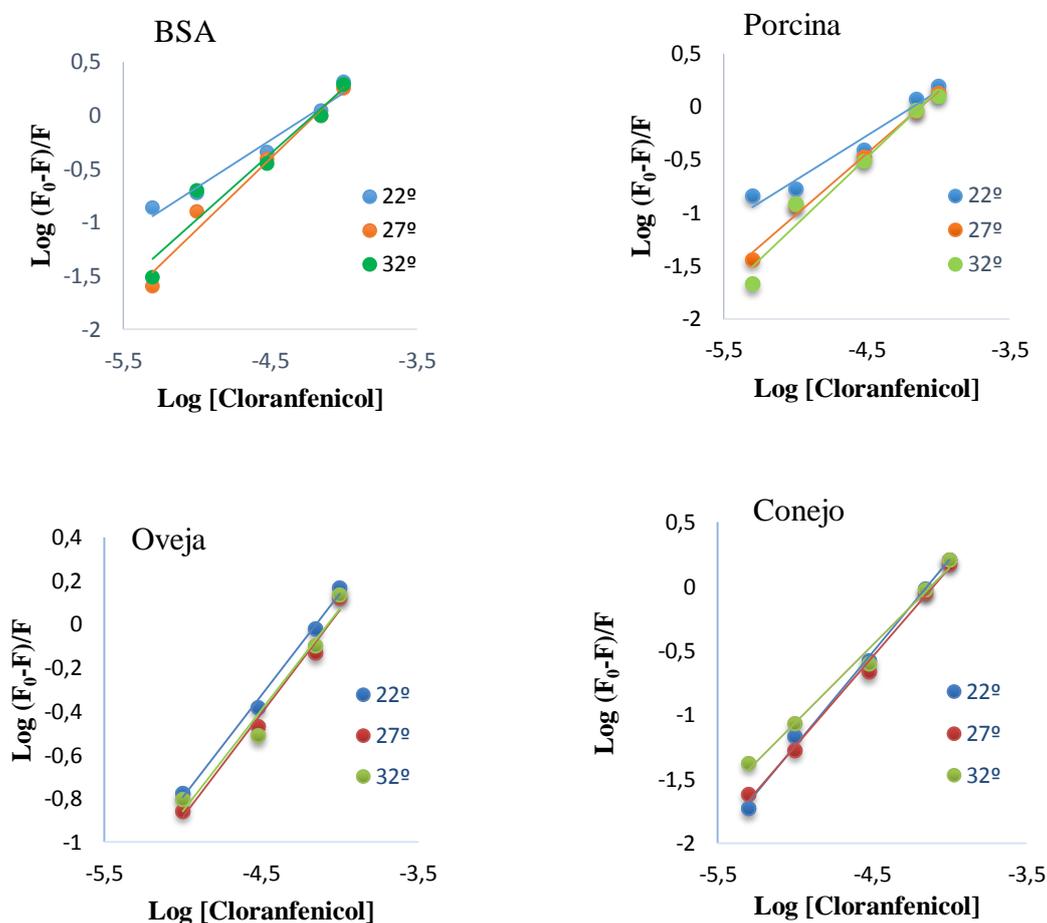


Figura 17. Representación doble logarítmica para estudiar el efecto del cloranfenicol sobre las diferentes albúminas trabajando a diferentes temperaturas.

Los valores de la constante de unión (k_b) y de los sitios de unión (n) pueden ser calculados a partir de la pendiente y ordenada al origen de las rectas de regresión de las gráficas anteriores y que se muestran en la tabla VIII:

Albúmina	22°C		27°C		32°C	
	n	k_b (mol.L ⁻¹).10 ³	n	k_b (mol.L ⁻¹).10 ³	n	k_b (mol.L ⁻¹).10 ³
Bovina	0,8885	5,82	1,3241	356	1,2273	145
Porcina	0,8415	3,26	1,1645	63,2	1,2796	188
Oveja	0,9356	7,64	0,9496	7,29	0,9293	6,13
Conejo	1,4526	1045	1,3919	514	1,2086	95,4

Tabla VIII. Valores de K_b y n para cada una de las albúminas trabajando a diferentes temperaturas.

Podemos observar como en todos los casos el valor de “ n ” es próximo a uno. Esto indica que las albúminas con las que se ha trabajado sólo presentan un sitio de unión para el cloranfenicol.

En cuanto a la dependencia de la constante de unión con la temperatura, se puede observar como en el caso de la seroalbúmina porcina, la constante de unión aumenta al incrementar la temperatura, lo cual indica que la interacción del cloranfenicol con esta albúmina ocurre de forma endotérmica. Por el contrario, en el caso de las seroalbúminas bovina, de oveja y de conejo la constante de unión disminuye con el aumento de temperatura. Esto es indicativo de que la interacción entre el cloranfenicol y estas albúminas tiene lugar de manera exotérmica.

La seroalbúmina de conejo sólo muestra un triptófano en su estructura, contribuyendo únicamente éste en la constante de unión (K_b). Las demás albúminas presentan dos residuos Trp, con lo que el valor de la constante de unión dependerá de la suma de la aportación de ambos. Esto puede explicar que el valor de K_b de la seroalbúmina de conejo sea tres órdenes de magnitud superior a las del resto de albúminas.

También se puede calcular la fracción de fluorescencia inicial accesible al desactivante (f_a) a partir de la ecuación que deriva de la de Stern-Volmer (Ecuación 3), es decir, no siempre todo el fluoróforo presente puede interaccionar con el desactivante lo que induce una pérdida de linealidad de la ecuación de Stern Volmer.

Se trabaja tanto a temperatura ambiente, 22°C, como a la temperatura corporal de los mamíferos, 37°C. Al representar $F_0/\Delta F$ frente a $[Q]^{-1}$ se obtienen las gráficas para cada albúmina presentes en la figura 18.

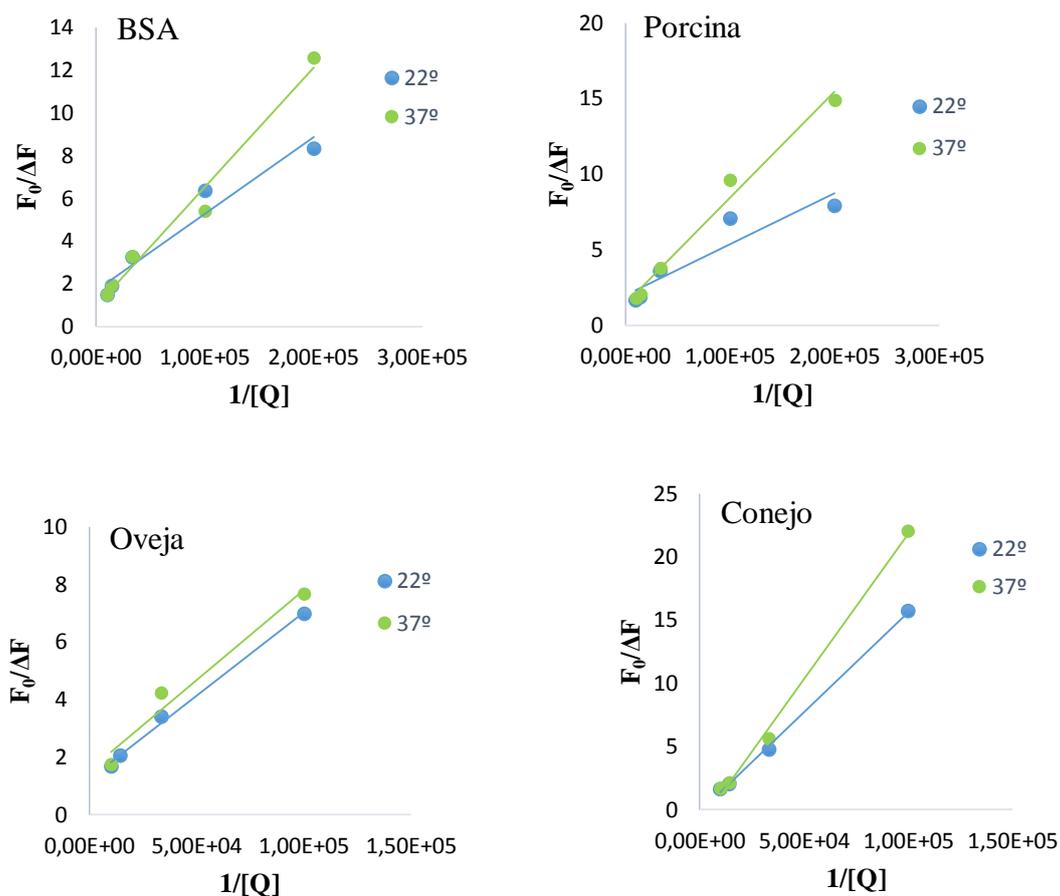


Figura 18. Representación de $F_0/\Delta F$ vs $1/[Q]$ para determinar f_a .

Las fracciones de fluorescencia inicial accesible al desactivante para cada una de las albúminas se muestran en la tabla IX.

	22°C	37°C
Albúmina	f_a	f_a
Bovina	0,58844	1,05652
Porcina	0,50306	0,71495
Oveja	0,80405	0,64143
Conejo	-0,26232	-0,83970

Tabla IX. Fracción de fluorescencia inicial accesible al desactivante para cada albúmina.

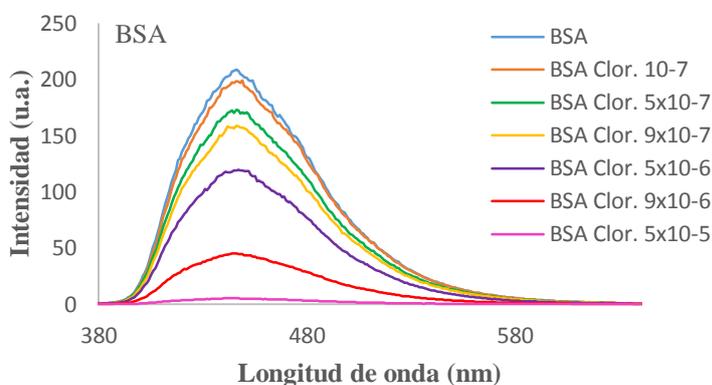
De la tabla se desprende que el comportamiento de las distintas seroalbúminas es diferente. Mientras que con el aumento de la temperatura en la albúmina bovina y la porcina aumenta la accesibilidad, en más de un 40%, el comportamiento es contrario para la albúmina de oveja, que disminuye casi un 20%. Este efecto puede ser atribuido a

ligeros cambios conformacionales que se producen en este tipo de macromoléculas con los cambios de temperatura. Por último, en el caso de la seroalbúmina de conejo, el considerar un acceso diferencial del desactivante no representa una buena opción ya que esta albúmina presenta una sola unidad de triptófano en su secuencia peptídica en lugar de dos como poseen las demás albúminas.

IV.D. Estudio de “*quenching*” de la fosforescencia

Normalmente la fosforescencia es difícil de medir a temperatura ambiente en soluciones líquidas. Esto se debe a varios motivos, entre ellos, presencia de oxígeno que la desactive (7).

Para estudiar el “*quenching*” de la fosforescencia se trabajó con concentraciones fijas de albúmina (10^{-5} M), de yoduro de potasio (0,16M) y de sulfito de sodio (0,16 M), y se emplearon concentraciones crecientes de cloranfenicol (ver protocolo de medida II.B.5). Los resultados de la inactivación de la fosforescencia por el cloranfenicol para cada albúmina se muestran en la figura 19.



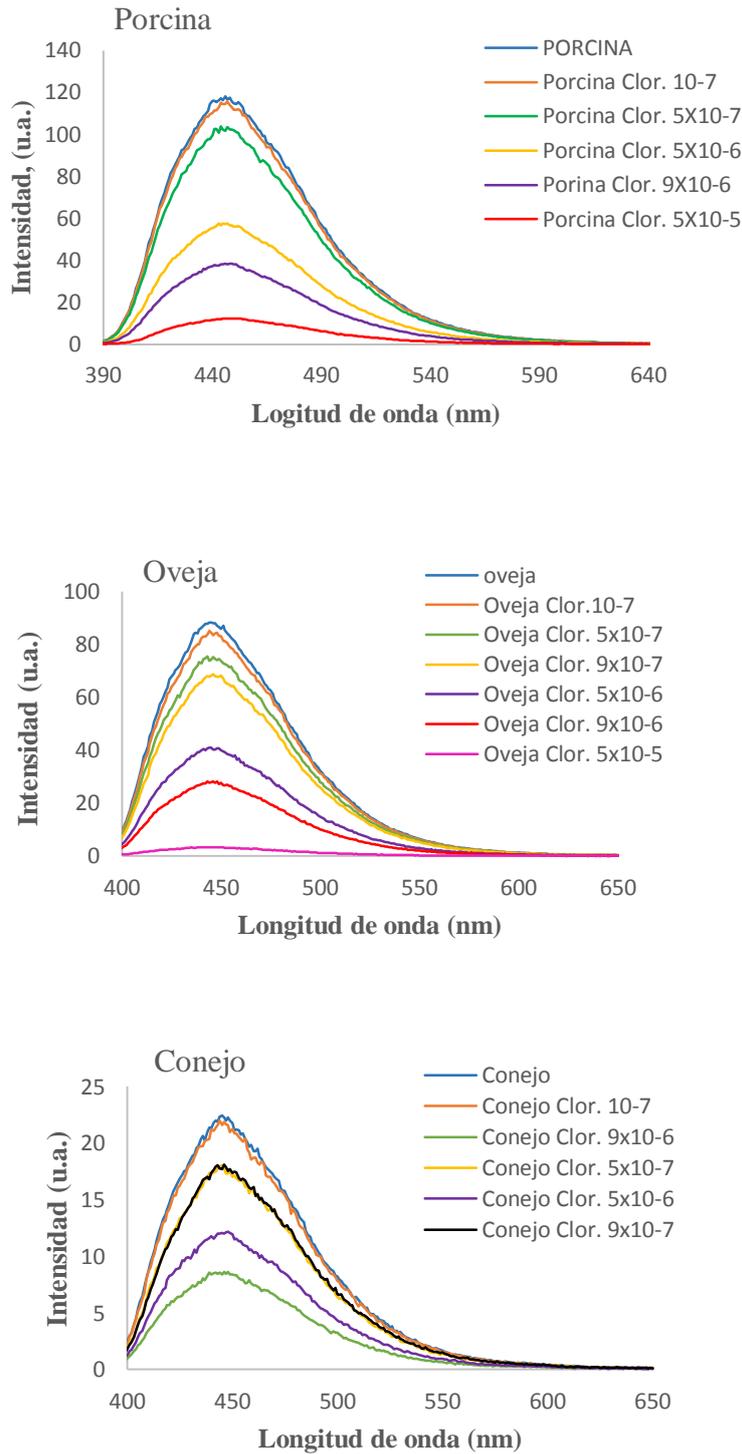


Figura 19. Espectros que muestran la desactivación de la fosforescencia de las albúminas por el cloranfenicol (Clor.).

Se puede apreciar en la figura 19 como para todas las albúminas la intensidad de la fosforescencia es menor que la que se obtenía en las medidas de fluorescencia debido a que este proceso es prohibido y la eficiencia cuántica es mucho menor. Destaca la baja

intensidad de la albúmina de conejo, debido a la presencia de un solo triptófano en su secuencia peptídica en lugar de dos como poseen las demás albúminas. Este hecho hace que no sea posible estudiar adecuadamente la desactivación puesto que el instrumento no puede discriminar entre los efectos de diferentes concentraciones de cloranfenicol.

Aunque hayamos empleado sulfito de sodio para desoxigenar las disoluciones trabajo sería necesario optimizar su concentración y el tiempo de reacción antes de la medida para cada albúmina en particular. Así mismo, los largos tiempos de vida de la fosforescencia (7) y la presencia de moléculas pequeñas como agua o aminoácidos también dificultan su medida (7).

Para estudiar la interacción antibiótico-albúmina, se representan los gráficos de Stern-Volmer, trabajando a temperatura ambiente. Estos gráficos se muestran en la figura 20.

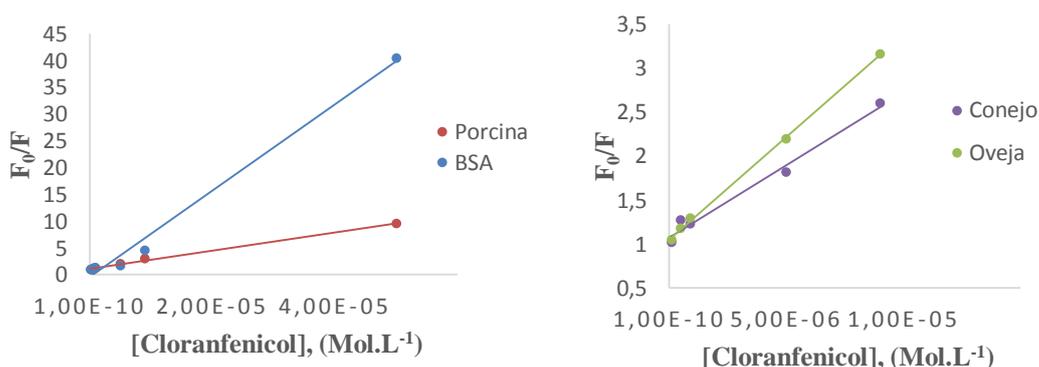


Figura 20. Gráficos de Stern-Volmer para las cuatro albúminas.

A partir de las gráficas anteriores se obtienen los valores de las constantes K_{sv} y K_q que se recogen en la tabla X.

Albúmina	K_{sv} ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$). 10^5	K_q ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). 10^{13}	r^2
Bovina	$80,73 \pm 4,2$	8,07	0,9892
Porcina	$16,98 \pm 0,4$	1,70	0,9966
Oveja	$23,35 \pm 0,4$	2,33	0,9991
Conejo	$16,48 \pm 1,2$	1,65	0,9835

Tabla X. Constantes de quenching bimolecular y constante de Stern-Volmer para la interacción de cada albúmina con cloranfenicol a temperatura ambiente.

También se puede determinar la fracción de fluorescencia inicial accesible (f_a) mediante fórmula derivada de la ecuación de Stern-Volmer explicada en la introducción (Ecuación 3).

A partir de la representación gráfica del doble logaritmo y de la representación de $F_0/\Delta F$ vs $1/f_a$ se obtuvieron los valores de n , K_b y f_a que se recogen en la tabla XI.

Albúmina	n	k_b (mol.L⁻¹).10⁵	f_a
Bovina	1,0608	8,09	0,825423
Porcina	1,0969	6,45	-0,17284
Oveja	0,8558	0,43	0,614364
Conejo	0,9408	1,01	-0,51488

Tabla XI. Valores de n y K_b para cada albúmina.

En todos los casos el valor de “ n ” es próximo a uno, indicando esto que sólo existe un lugar de unión del cloranfenicol a la albúmina.

En el caso de la seroalbúmina de conejo, como esta presenta un único triptófano, no es adecuado considerar un acceso diferencial del desactivante. Así mismo, para la seroalbúmina porcina sería mejor hacer otro tipo de aproximación.

IV.E. Medidas de tiempos de vida de fluorescencia y fosforescencia.

IV.E.1. Tiempos de vida de fluorescencia.

Se midieron tiempos de vida de fluorescencia de disoluciones que contenían sólo albúmina (10^{-5} M) y de disoluciones que contenían albúmina (10^{-5} M) y cloranfenicol 3×10^{-5} M (ver protocolo de medida III.B.6.). Los tiempos obtenidos se recogen en las tablas XII y XIII:

Albúmina (10^{-5}M)	Número de tiempos de vida	χ^2	τ_i (ns)	$\Delta\tau_i$ (ns)
Bovina	1	1.186	4.601	4.6e-5
Porcina	1	1.139	4.638	0.005
Oveja	1	0.948	4.349	0.003
Conejo	2	1.004	0.793	0.408
			4.146	0.037

Tabla XII. Tiempos de vida de fluorescencia de cada una de las disoluciones de albúmina 10^{-5} M.

Albúmina (10^{-5}M)	Número de tiempos de vida	χ^2	τ_i (ns)	$\Delta\tau_i$ (ns)
Bovina	1	1.136	4.632	0.003
Porcina	1	1.024	4.540	0.005
Oveja	1	1.048	4.156	0.005
Conejo	2	1.119	0.848	0.023
			3.721	0.001

Tabla XIII. Tiempos de vida de fluorescencia de cada una de las disoluciones de albúmina 10^{-5} M que contienen cloranfenicol 3×10^{-5} M.

Para las albúminas bovina, porcina y de oveja se obtiene un solo tiempo de vida, que en los tres casos es semejante. Sin embargo, incluso proteínas que contienen un solo residuo de triptófano a menudo muestran más de un solo tiempo de vida de fluorescencia (43), como ocurre en este caso con la seroalbúmina de conejo. Esto se puede atribuir a la existencia de múltiples conformaciones de las proteínas (43).

Se puede corroborar que este número de tiempos de vida es el adecuado para cada albúmina puesto que el parámetro “Chi cuadrado (χ^2)” en todas ellas se sitúa en valores entre 1 y 1,3. También se observa como para cada tiempo determinado el valor del error ($\Delta\tau_i$) se sitúa en general en la tercera cifra significativa, siendo por tanto un error aceptable.

El tiempo de vida de luminiscencia no debería cambiar en caso de “*quenching estático*” (39). En la tabla XIII, al emplear cloranfenicol, no se observan cambios significativos en los tiempos de vida de ninguna de las seroalbúminas.

IV.E.2. Tiempos de vida de fosforescencia

Los tiempos de vida de fosforescencia se midieron con el espectrofotómetro Cary Eclipse empleando dos disoluciones (Disolución 1 y 2, ver protocolo de medida III.B.6.), una conteniendo cloranfenicol 5×10^{-6} M y otra exenta de este antibiótico.

Los tiempos de vida de fosforescencia de cada albúmina trabajando sin antibiótico se muestran en la tabla XIV y los resultados obtenidos al añadir cloranfenicol en la disolución se recogen en la tabla XV.

Albúmina (10⁻⁵M)	τ_i (ms)
Bovina	1,652 ± 0,04
Porcina	1,184 ± 0,01
Oveja	0,773 ± 0,11
Conejo	0,379 ± 0,07

Tabla XIV. Tiempos de vida de fosforescencia para cada albúmina trabajando en ausencia de antibiótico.

Albúmina (10⁻⁵M)	τ_i (ms)
Bovina	0,807 ± 0,01
Porcina	0,687 ± 0,01
Oveja	0,641 ± 0,002
Conejo	0,293 ± 0,03

Tabla XV. Tiempos de vida de la fosforescencia para cada albúmina trabajando con cloranfenicol 5 x 10⁻⁶ M.

Los tiempos de vida de fosforescencia obtenidos (en el orden de los milisegundos) son mayores que los medidos en fluorescencia (en el orden de los nanosegundos), correspondiendo esto con la bibliografía (7).

El tiempo de vida de fosforescencia de los residuos de triptófano en proteínas, en soluciones acuosas a temperatura ambiente, puede variar en varios órdenes de magnitud en función de la flexibilidad de la estructura local y la tasa de reacciones de “*quenching*” intramolecular. Además, los aminoácidos cisteína, histidina, tirosina y fenilalanina en el ambiente del triptófano son capaces de desactivar su fosforescencia (44). Esto explica las diferencias que observamos entre los tiempos de fosforescencia de cada una de las albúminas.

En el “*quenching*” dinámico los tiempos de vida de luminiscencia disminuyen (39). En la tabla XV se observa como la adición de cloranfenicol reduce los tiempos de vida de fosforescencia de la seroalbúmina bovina y de la porcina. Esto indica que el componente estático de la fosforescencia de estas dos albúminas es de menor importancia, al contrario de lo que ocurre en el caso de las albúminas de oveja y conejo.

V. CONCLUSIONES

Entre las numerosas técnicas instrumentales de análisis, las técnicas luminiscentes, por sus características inherentes de sensibilidad y selectividad, suponen una poderosa herramienta para el estudio de la reactividad de los sistemas químicos y biológicos, permitiendo mediciones no intrusivas de sustancias en baja concentración.

Dentro de las técnicas luminiscentes, el método de “*quenching*” de la fluorescencia y/o fosforescencia es un procedimiento relativamente sencillo para estudiar las interacciones entre fármacos y macromoléculas.

En el presente trabajo, se han empleado estas técnicas para estudiar la interacción entre el cloranfenicol y diferentes seroalbúminas animales. Los resultados reportados ayudan a comprender los mecanismos mediante los cuales el antibiótico se une a las albúminas séricas.

Dentro de las conclusiones discutidas en esta memoria cabe mencionar:

1. El cloranfenicol forma complejos con las moléculas de albúminas lo que conlleva una disminución de su luminiscencia.
2. En cada albúmina existe un único sitio de enlace para la unión del cloranfenicol.
3. El antibiótico interacciona con la albúmina de vaca, de oveja y de conejo mediante una reacción exotérmica, mientras que con la albúmina porcina lo hace por reacción endotérmica.
4. Cada una de las albúminas muestra un comportamiento diferente respecto a la accesibilidad del cloranfenicol. Además, los cambios en la temperatura suponen modificaciones en la posibilidad de acceso del cloranfenicol a los triptófanos de las albúminas. Concretamente, en el caso de la albúmina de conejo, se deberían estudiar otras posibilidades para explicar el proceso de “*quenching*”, puesto que la accesibilidad de desactivante no es una buena aproximación.
5. Los resultados de las medidas de fosforescencia indican diferencias en el mecanismo de “*quenching*” respecto a lo obtenido por fluorescencia. Sin embargo, puesto que la fosforescencia es un proceso más complicado, habría que llevar a cabo estudios complementarios para interpretar bien estos resultados.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Catherine W. Johnson, Daniel L. Timmons, Pamela E. Hall, Patricia Kuby. *Essential Laboratory Mathematics: Concepts and Applications for the Chemical and Clinical Laboratory Technician*. 2ª Edición. Canadá: Delmar Cengage Learning, 2002. ISBN: 012552113.
2. Theodore Peters, Jr. *All About Albumin Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*. 1ª Edición. San Diego, California: Academic Press, 1995. ISBN: 978-0-12-552110-9.
3. European Molecular Biology Laboratory. *Protein sequence analysis & classification* [en línea]. Uk, 2014. [Consulta: 8 mayo 2014]. Disponible en: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR014760>
4. Bioinformatics Resource Portal. *PROSITE documentation PDOC00186* [en línea]. [Consulta: 4 junio 2014]. Disponible en: <http://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/prosite-search-ac?PDOC00186>
5. Grisel Machicote, Roberta. “Empleo de polímeros impresos nanoestructurados en el desarrollo de optosensores”. Directora: Liliana Bruzzone. Universidad Nacional de La Plata, Facultad de ciencias exactas, Departamento de química, 2013.
6. Karolina A. Majorek, Przemyslaw J. Porebskia, Arjun Dayala, Matthew D. Zimmermana, Kamila Jablonskaa, Alan J. Stewartd, Maksymilian Chruszcz. . *Mol Immunol*. 52 (2012) 174–182.
7. Joseph R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3ª Edición. Baltimore, Maryland, USA: Springer, 2006. ISBN: 0387312781.
8. Thomas M. Devlin. *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*. 4ª Edición. New Jersey, USA: REVERTÉ, 2004. ISBN: 8429172084, p.116.
9. David Whitford. *Proteins: Structure and Function*. 1ª Edición. John Wiley & Sons, 2005. ISBN: 0471498947.
10. Protein Data Bank. *Crystal Structure of Bovine Serum Albumin in complex with naproxen* [en línea]. [Consulta: 16 mayo 2014] Disponible en: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=4OR0&bionumber=1>
11. Protein Data Bank. *Crystal structure of Rabbit Serum Albumin* [en línea]. [Consulta: 16 mayo 2014]. Disponible en: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=3V09&bionumber=1>

12. Guang-De Yanga, Cong Lia, Ai-Guo Zenga, Yuan Zhaob, Rong Yanga, Xiao-Li Biana. *J. of Pharma. Anal.* 3 (2013) 200–204.
13. Marcus A. Rothschild M.D., Murray Oratz and Sidney S. Schreiber. *Hepatology.* 8 (1998) 385–401.
14. Universal Protein Resource. *P02769 (ALBU_BOVIN)* [en línea].[Consulta: 18 mayo 2014]. Disponible en: <http://www.uniprot.org/uniprot/P02769>
15. Carol Porth, Ruth A Hannon, Charlotte Pooler. *Porth pathophysiology: concepts of altered health states.* 1ª Edición. London, UK: Lippincott Williams & Wilkins, 2009. ISBN: 1605477818, p. 454.
16. Marcus A. Rothschild. *Plasma Protein Metabolism: Regulation of Synthesis, Distribution, and Degradation.* New York, USA: Academic Press, 1970. ISBN: 0124142028, p.200-204.
17. David H. Alpers, William F. Stenson, Beth Taylor, Dennis M. Bier. *Manual of Nutritional Therapeutics.* 1ª Edición. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. ISBN: 0781768411, p 105-106.
18. Joel D. Kopple, Shaul G Massry, Kamyar Kalantar-Zade. *Nutritional Management of Renal Disease.* 3ª Edición. London, UK: Academic Press, 2013. ISBN: 9780123919342, p. 139.
19. Stephen P. DiBartola. *Fluid, Electrolyte, and Acid-Base Disorders in Small Animal Practice.* 4ª Edition. Missouri: Saunders, 2011. ISBN: 1437706541.
20. Robert W. Schrier. *Renal and Electrolyte Disorders.* 7ª Edición. Lippincott Williams & Wilkins, 2010. ISBN: 1608310728, p.533.
21. Stephan Schmidt, Katharina Röck, Martina Sahre, Olaf Burkhardt, Martin Brunner, Maximilian T. Lobmeyer, and Hartmut Derendorf, *Anti. Ag. and Chemo.* 52 (2008) 3994–4000.
22. DrugBank. *Chloramphenicol* [en línea].[Consulta: 5 junio 2014]. Disponible en: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00446>
23. K. D. Tripathi. *Farmacología en Odontología: Fundamentos.* Madrid: Médica panamericana, 2005. ISBN: 9879500600866, p. 386.
24. G. A. Pankey1 and L. D. Sabath. *Oxford Journals.* 38 (2004) 864-870.
25. Jesús Fernandez Tresguerres, Vicente Martínez Fernández, Victor Navas Serrano. *Biotecnología aplicada a la medicina.* Madrid: Ediciones Díaz de Santos, 2013. ISBN: 8499696481, p.37.

26. Rosaleen Anderson, Paul Groundwater, Adam Todd, Alan Worsley. *Antibacterial Agents: Chemistry, Mode of Action, Mechanisms of Resistance and Clinical Applications*. 1ª Edición. UK: Wiley, 2012. ISBN: 0470972459, p. 235
27. Peter J. Russell, Paul E. Hert, Beverly McMillan. *Biology: The Dynamic Science*. 2ª Edición. Belmont, USA: Brooks/Cole, 2011. ISBN: 0538741244, p.321.
28. Julio Peretó, Ramón Sendra, Mercé Pamblanco, Carme Bañó. *Fundamentos de bioquímica*. 1ª Edición. Valencia: Universitat de València, 2007. ISBN: 9788437065663, p.167.
29. Ge Wu. *Assay Development: Fundamentals and Practices*. 1ª Edición. New Jersey: Wiley, 2010. ISBN: 0470191155, p.43.
30. Daniel C. Harris, Vicente Berenguer Navarro, Ángel Berenguer Murcia. *Análisis químico cuantitativo*. 3ª Edición. New York, USA: REVERTÉ, 2007. ISBN: 8429172246, p. 42.
31. C. A. Parker, C. G. Hatchard. *Analyst*.87 (1962) 664-676.
32. R. A. Paynter, S. L. Wellons, J. D. Winefordner. *Anal. Chem.* 6 (1974) 736–73.
33. Francisca Barceló Mairata. *Técnicas instrumentales en bioquímica y biología*. 1ª Edición. Islas Baleares: Universitat de les Isles Balears, 2003. ISBN: 84-7632-808-7, p.104.
34. C.Q. Jiang, M.X. Gao, X.Z. Meng. *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.*7 (2003) 1605–1610.
35. Guang-De Yanga, Cong Lia, Ai-Guo Zenga, Yuan Zhaob, Rong Yanga, Xiao-Li Biana. *Journal of Pharma. Anal.* 3 (2013) 200–204.
36. P.D. Ross, S. Subramanian. *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 7 (2003) 1605–1610.
37. Dorothy B. Calhoun, S. Walter Englander, Wayne W. Wright, Jane M. Vanderkooi. *Biochemistry*. 27 (1988) 8466–8474.
38. Manini Mukherjee a, Pinki Saha Sardar a, Shyamal Kr Ghorai a, Swarna Kamal Samanta a, Atanu Singha Roy b, Swagata Dasgupta b, Sanjib Ghosha. *J. of Photochem. and Photobiol. B: Biology*. 115 (2012) 93–104.
39. Ivonne Lammers, Virginie Lhiaubet-Vallet, Freek Ariese, Miguel A. Miranda, Cees Gooijer. *Spectrochim. Acta A: Mol. and Biomol. Spectrosc.* 105 (2013) 67-73.
40. Salinas Castillo, Alfonso. “Nuevas fronteras metodológicas de la fosforescencia a temperatura ambiente. fosforescencia inducida por átomos pesados y optosensores”.

Director: D. Alberto fernández gutiérrez. Universidad de Granada, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de química analítica, 2005.

41. Kulwinder Sagoo, Richard Hirsch, Pamela Johnston, David McLoskey, Graham Hungerford. *Spectrochim. Acta A: Mol. and Biomol. Spectrosc.* 24 (2014) 611-7
42. Anushree Saha, Vladislav V. Yakovlev. *J Biophotonics.* 3 (2010) 670–677.
43. Silvia Tardioli, Ivonne Lammers, Jan-Hein Hooijschuur, Freek Ariese, Gert van der Zwan, and Cees Gooijer *J. Phys. Chem. B.* 116 (2012) 7033–7039.
44. Gonnelli M1, Strambini GB. *Photochem Photobiol.* 81 (2005) 614-22.

Anexo I

Vaca 54	MKWVTFISLLLLFSSAYSR---GVFRRDT---HKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIAFSQY
Oveja 54	MKWVTFISLLLLFSSAYSR---GVFRRDT---HKSEIAHRFNDLGEENFQGLVLIAFSQY
Cerdo 54	MKWVTFISLLFLFSSAYSR---GVFRRDT---YKSEIAHRFKDLGEQYFKGLVLIAFSQH
Conejo 54	MKWVTFISLLFLFSSAYSR---GVFRRDA---HKSEIAHRFNDVGEEHFIGLVLITFSQY
Vaca 114	LQQCPFDEHVKLVNELTEFAKTCVADESHAGCEKSLHTLFGDELCKVASLRETYGDMADC
Oveja 114	LQQCPFDEHVKLVKELTEFAKTCVADESHAGCDKSLHTLFGDELCKVATLRETYGDMADC
Cerdo 114	LQQCPYEEHVKLVREVTEFAKTCVADESAENCDKSIHTLFGDKLCAIPSLREHYGDLADC
Conejo 114	LQKCPYEEHAKLVKEVTDLAKACVADESAANCDKSLHDI FGDKICALPSLRD TYGDVADC
Vaca 172	CEKQEPERNECFLSHKDDSPDLP-KLK-PDPNTLCDEFKADEKKF W GKYL YEIARRHPYF
Oveja 172	CEKQEPERNECFLNHKDDSPDLP-KLK-PEPDTLCAEFKADEKKF W GKYL YEVARRHPYF
Cerdo 172	CEKEEPERNECFLQHKNNDNPDI P-KLK-PDPVALCADFQEDEQKF W GKYL YEIARRHPYF
Conejo 173	CEKKEPERNECFLHKKDDKPDLP-PFARPEADVLCFAFH DDEKAFFGHYL YEVARRHPYF
Vaca 232	YAPELLYYANKYNGVFQECCQAEDKGACLLPKIETMREKVL TSSARQRLRCASIQKFGER
Oveja 232	YAPELLYYANKYNGVFQECCQAEDKGACLLPKIDAMREKVL ASSARQRLRCASIQKFGER
Cerdo 232	YAPELLYYAIYKDV FSECCQAADKAACLLPKIEHLREKVL T SAAQRLK CASIQKFGER
Conejo 233	YAPELLYYAQKYKAILTECCEAADKGACLT PKLDALE GKSLISAAQERLRCASIQKFGDR
Vaca 292	ALKA W SVARLSQKFPKAEFVEVTKLVTDLTKVHKECCHGDLLECADDRADLAKYICDNQD
Oveja 292	ALKA W SVARLSQKFPKADF TDVTKIVTDLTKVHKECCHGDLLECADDRADLAKYICDHQD
Cerdo 292	AFKA W SLARLSQRFPKADFTEISKIVTDLAKVHKECCHGDLLECADDRADLAKYICENQD

Conejo 293	AYKAWALVRLSQRFPKADF'TDISKIVTDLTKVHKECCHGDLLECADDRADLAKYMCEHQE
Vaca 352	TISSKLKECCDKPLLEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCKNYQEAKDAFLGS
Oveja 352	ALSSKLKECCDKPVLEKSHCIAEVDKDAVPENLPPLTADFAEDKEVCKNYQEAKDVFLGS
Cerdo 352	TISTKLKECCDKPLLEKSHCIAEAKRDELPADLNPLEHDFVEDKEVCKNYKEAKHVFLGT
Conejo 353	TISSHLKECCDKPILEKAHCIYGLHNDETPAGLPVAEAEFVEDKDVCKNYEEAKDLFLGK
Vaca 412	FLYEYSRRHPEYAVSVLLRLLAKEYEATLEECCAADDPHACYSTVFDKCLKHLVDEPQNLIK
Oveja 412	FLYEYSRRHPEYAVSVLLRLLAKEYEATLEDCCAKEDPHACYATVFDKCLKHLVDEPQNLIK
Cerdo 412	FLYEYSRRHPDYSVSLLLRIAKIYEATLEDCCAKEDPPACYATVFDKFQPLVDEPKNLIK
Conejo 413	FLYEYSRRHPDYSVVLRLRLGKAYEATLKKCCATDDPHACYAKVLDEFQPLVDEPKNLVK
Vaca 472	QNCDQFEKLGGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRSLGKVGTRCCTKPESERMPCT
Oveja 472	KNCELFEKHGEYGFQNALIVRYTRKAPQVSTPTLVEISRSLGKVGTKCCAKPESERMPCT
Cerdo 472	QNCELFEKLGGEYGFQNALIVRYTKKVPQVSTPTLVEVARKLGLVGSRCCKRPEEERLSCA
Conejo 473	QNCELYEQLGDYNFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEISRSLGKVGSKCKKHPEAERLPCV
Vaca 532	EDYLSLILNRLCVLHEKTPVSEKVTKCTESLVNRRPCFSALTPDETYVPKAFDEKLF'TF
Oveja 532	EDYLSLILNRLCVLHEKTPVSEKVTKCTESLVNRRPCFSDLTLDETYVPKPFDEKFF'TF
Cerdo 532	EDYLSLVNRLCVLHEKTPVSEKVTKCTESLVNRRPCFSALTPDETYKPKFVEGT'TF
Conejo 533	EDYLSVVLNRLCVLHEKTPVSEKVTKCCSESLVDRRPCFSALGPDETYVPKEFNAET'TF
Vaca 592	HADICTLPDTEKQIKKQTALVELLKHKPKATEEQ'KKTVMENFVAFVDKCCAADDKEACFA
Oveja 592	HADICTLPDTEKQIKKQTALVELLKHKPKATDEQ'KKTVMENFVAFVDKCCAADDKEGCFV
Cerdo 592	HADLCTLPEDEKQIKKQTALVELLKHKPHATEEQ'LR'TVLGNFAAFVQKCCAAPDHEACFA

Conejo 593	HADICTLPETERKIKKQTALVELVKHKPHATNDQLKTVVGEFTALLDKCCSAEDKEACFA
Vaca	VEGPKLVVSTQTALA---607
Oveja	LEGPKLVAQTQAALA---607
Cerdo	VEGPKFVIEIRGILA---607
Conejo	VEGPKLVESSKATLG---608