



Universidad de Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

**“El triptófano como sonda luminiscente intrínseca:
Caracterización del enlace seroalbúmina bovina-antibiótico”**

Jing Chiu Chong Cheung

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 **“El triptófano como sonda luminiscente intrínseca: Caracterización del enlace seroalbúmina bovina-antibiótico”**

ha sido realizado por el licenciado **JING CHIU CHONG CHEUNG**, 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 **“El triptófano como sonda luminiscente intrínseca:
Caracterización del enlace seroalbúmina bovina-antibiótico”**

ha sido realizado por el licenciado **JING CHIU CHONG CHEUNG**, 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

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a los tutores del presente Trabajo Fin de Máster, los doctores Rosana Badía Laíño y Alfonso Fernández González, su guía, comprensión y benevolencia en la realización del mismo

La realización del Máster no hubiera sido viable sin las facilidades dadas por Derline Clinic para compaginar horarios laborales y escolares. No menos importante ha sido la cesión de muestras del medicamento experimental Fotoenticine® para aumentar el rango de antibióticos estudiado.

También tienen un lugar primordial en este apartado todos los compañeros integrantes del Grupo Analítico de Reconocimiento Molecular (RECO-MOL) que crean un entorno idóneo para la práctica científica.

No podía faltar una mención a los profesores y compañeros del Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas sin cuya presencia la experiencia no hubiera sido tan gratificante.

Finalmente, no quiero olvidarme de familiares y amigos por su apoyo a lo largo del curso.

谢谢

OBJETIVOS

Las seroalbúminas o albúminas séricas son las proteínas solubles más abundantes del sistema circulatorio, su concentración en el plasma sanguíneo está entre el 52 y el 60 %. Estas proteínas globulares poseen funciones muy destacables a nivel biológico y farmacocinético ya que son capaces de enlazarse reversiblemente con una gran variedad de ligandos exógenos relativamente insolubles. Ya que su función principal es el transporte juegan un rol dominante en la eficacia y disponibilidad de los medicamentos.

Por tanto, profundizar en el conocimiento de las interacciones proteína-antibiótico permite mejorar el entendimiento de la distribución de los mismos desde su incorporación en el organismo hasta su acceso al órgano diana.

Entre los biopolímeros, las proteínas son las únicas macromoléculas que presentan luminiscencia intrínseca útil, debido a la presencia en su estructura de tres aminoácidos aromáticos: la fenilalanina la tirosina y el triptófano. Entre ellos, el triptófano es el fluoróforo dominante aunque está presente en un número muy pequeño de residuos. Debido a que la luminiscencia es muy sensible a los cambios en el microentorno, las interacciones entre las proteínas y otros compuestos producen modificaciones en sus características espectrales.

En este contexto, el objetivo de este Trabajo de Fin de Máster es estudiar qué tipo de interacciones se producen entre las albúminas séricas y los antibióticos empleando el triptófano como sonda luminiscente intrínseca.

Para ello se estudiarán:

- las propiedades ópticas de triptófano, proteína y antibiótico, mediante espectroscopía UV-VIS y técnicas luminiscentes a temperatura ambiente.
- las modificaciones espectrales observadas en la sonda luminiscente como consecuencia de la interacción proteína-antibiótico, empleando como proteína modelo la seroalbúmina bovina.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. La espectroscopía de luminiscencia molecular para el estudio de las interacciones proteína-analito.....	9
1.1.1. Fundamentos de la luminiscencia molecular.....	9
1.1.2. Estudio de las interacciones proteínas-analito.....	11
1.1.3. Empleo del triptófano como sonda luminiscente intrínseca.....	12
1.2. Antibióticos.....	13
1.2.1. Origen y clasificación.....	13
1.2.2. Mecanismo de acción.....	15
1.2.3. Interacción con la seroalbúmina bovina.....	17
1.2.4. Antibióticos estudiados en el presente trabajo.....	19
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	21
2.1. Materiales.....	21
2.1.1. Reactivos.....	21
2.1.2. Aparatos e instrumental.....	21
2.2. Protocolos de medida.....	23
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
3.1. Características espectroscópicas de la seroalbúmina bovina.....	24
3.1.1. Medidas de absorción UV-VIS.....	24
3.1.2. Medidas de fluorescencia.....	24
3.1.3. Medidas de fosforescencia.....	27
3.2. Características espectroscópicas de los antibióticos.....	28
3.2.1. Medidas de absorción UV-VIS.....	28
3.2.2. Medidas de fluorescencia.....	29
3.3. Estudio del “quenching” de la fluorescencia de la SAB y caracterización del fenómeno de asociación.....	30
3.3.1. Fundamentos.....	30
3.3.2. Determinación del mecanismo de “quenching”.....	33
3.3.3. Cálculo de la constante de unión entre la SAB y los antibióticos.....	40

3.3.4. Determinación de los modos de unión.....	44
3.4. Investigación conformacional.....	45
3.5. Estudio del “quenching” de la fosforescencia de la SAB.....	48
4. CONCLUSIONES	50
5. BIBLIOGRAFÍA	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Diagrama de energía parcial para un sistema fotoluminiscente	9
Figura 2 Estructura química de: a) fenilalanina, b) tirosina, c) triptófano.....	12
Figura 3 Línea temporal de la edad de oro del descubrimiento de antibióticos (1940-1960) y edad dorada de la química medicinal con antibióticos.....	14
Figura 4 Esquema de regiones de ataque por parte de algunos antibióticos.....	16
Figura 5 Estructuras tridimensionales de las seroalbúminas humana y bovina.....	18
Figura 6 Estructura química de la bencilpenicilina	19
Figura 7 Estructura química de la cefalexina	19
Figura 8 Estructura química del cloranfenicol	19
Figura 9 Estructura química de la clortetraciclina	20
Figura 10 Estructura química de la nafcilina	20
Figura 11 Estructura química del Fotoenticine®.....	20
Figura 12 Espectro de absorción de una disolución 10^{-5} M de SAB	24
Figura 13 Espectro de excitación y emisión fluorescente de una disolución 2×10^{-5} M de triptófano.....	25
Figura 14 Espectro de excitación y emisión fluorescente de una disolución 2×10^{-5} M de tirosina.....	25
Figura 15 Espectro de excitación y emisión fluorescente de una disolución 2×10^{-5} M de fenilalanina ..	26
Figura 16 Espectro de excitación y emisión fluorescente de una disolución 10^{-5} M de SAB.....	26
Figura 17 Espectro de emisión fluorescente de una disolución 10^{-5} M de SAB con excitación a 280 y 295 nm.....	27
Figura 18 Espectro de fosforescencia de 10^{-5} M SAB con aditivos	28
Figura 19 Espectro de fosforescencia de 10^{-5} M SAB sin aditivos	28
Figura 20 Espectros de absorción de antibióticos en estudio.....	29
Figura 21 Espectro de excitación y emisión de una disolución 10^{-5} M de Fotoenticine.....	30
Figura 22 Quenching de SAB con bencilpenicilina a $\lambda_{exc}=295\text{nm}$	31
Figura 23 Quenching de SAB con cefalexina a $\lambda_{exc}=295\text{nm}$	31
Figura 24 Quenching de SAB con cloranfenicol a $\lambda_{exc}=295\text{nm}$	31
Figura 25 Quenching de SAB con nafcilina a $\lambda_{exc}=295\text{nm}$	32
Figura 26 Quenching de SAB con clortetraciclina a $\lambda_{exc}=295\text{nm}$	32

Figura 27 Quenching de SAB con fotoenticine a $\lambda_{exc}=295\text{nm}$	32
Figura 28 Gráficos de Stern-Volmer para el “quenching” de la SAB por antibióticos.	34
Figura 29 Gráfico Stern Volmer a diferentes temperaturas para el quenching de BSA con bencilpenicilina	35
Figura 30 Gráfico Stern Volmer a diferentes temperaturas para el quenching de BSA con cloranfenicol	35
Figura 31 Gráfico Stern Volmer a diferentes temperaturas para el quenching de BSA con clortetraciclina	35
Figura 32 Gráfico Stern Volmer a diferentes temperaturas para el quenching de BSA con fotoenticine	36
Figura 33 Gráfico Stern Volmer a diferentes temperaturas para el quenching de BSA con nafcilina	36
Figura 34 Curva de decaimiento de la fluorescencia de una disolución 10^{-5} M.....	37
Figura 35 Gráfico de cociente de tiempos de vida frente a concentración de cefalexina.....	38
Figura 36 Gráfico de cociente de tiempos de vida frente a concentración de clortetraciclina.....	38
Figura 37 Gráfico de cociente de tiempos de vida frente a concentración de nafcilina.....	38
Figura 38 Gráfico de cociente de tiempos de vida frente a concentración de cloranfenicol.....	39
Figura 39 Gráfico de cociente de tiempos de vida frente a concentración de fotoenticine.....	39
Figura 40 Gráfico de cociente de tiempos de vida frente a concentración de bencilpenicilina	39
Figura 41 Gráfico doble logaritmo de Stern Volmer a diferentes temperaturas para el quenching de BSA con bencilpenicilina	41
Figura 42 Gráfico doble logaritmo de Stern Volmer a diferentes temperaturas para el quenching de BSA con cloranfenicol.....	41
Figura 43 Gráfico doble logaritmo de Stern Volmer a diferentes temperaturas para el quenching de BSA con clortetraciclina.....	41
Figura 44 Gráfico doble logaritmo de Stern Volmer a diferentes temperaturas para el quenching de BSA con fotoenticine	42
Figura 45 Gráfico doble logaritmo de Stern Volmer a diferentes temperaturas para el quenching de BSA con nafcilina.....	42
Figura 46 Espectros de fluorescencia sincrónica de la interacción entre SAB y bencilpenicilina, cefalexina y cloranfenicol.....	46
Figura 47 Espectros de fluorescencia sincrónica de la interacción entre SAB y clortetraciclina, nafcilina y fotoenticine.	47
Figura 48 Gráfico de Stern Volmer para el quenching de fosforescencia de la interacción antibiótico-SAB	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Principales grupos de antibióticos y representantes de estos	14
Tabla 2 Máximos de absorbancia de los antibióticos en estudio	29
Tabla 3 Constantes de “quenching” de fluorescencia para la interacción de antibióticos con SAB.....	34
Tabla 4 Constantes y sitios de unión a diferentes temperaturas para los sistemas antibióticos-SAB en fluorescencia	43
Tabla 5 Parámetros termodinámicos correspondientes a los sistemas antibiótico-SAB	45
Tabla 6 Constantes de “quenching” de fosforescencia para la interacción de antibióticos con SAB	48
Tabla 7 Constantes y sitios de unión para los sistemas fosforescentes antibióticos-SAB.....	49

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La espectroscopía de luminiscencia molecular para el estudio de las interacciones proteína-analito.

1.1.1. Fundamentos de la luminiscencia molecular.

La luminiscencia abarca diferentes procesos que suceden entre la absorción y la emisión de luz por parte de una sustancia. Todos estos procesos están recogidos en el diagrama de la **Figura 1** [1].

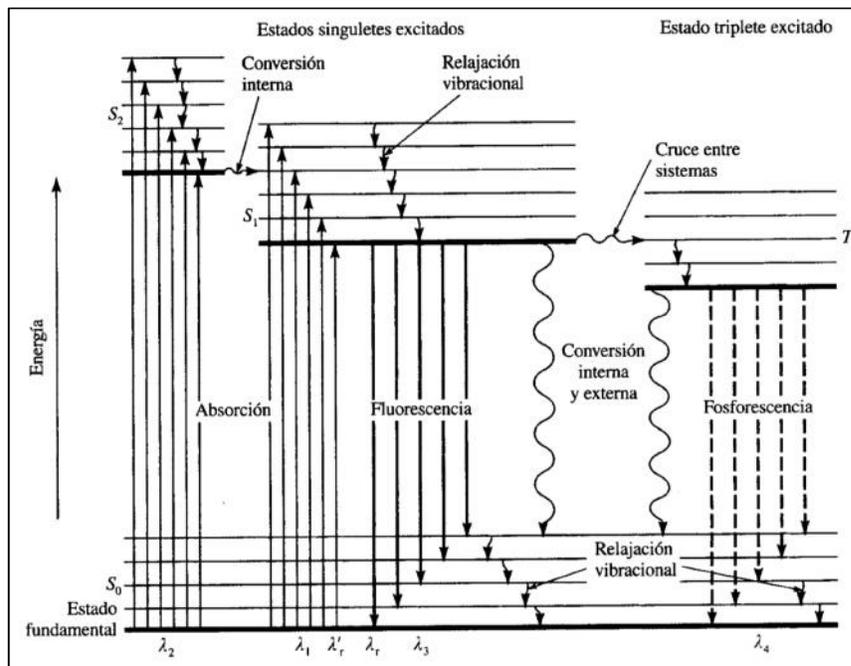


Figura 1 Diagrama de energía parcial para un sistema fotoluminiscente

En el diagrama los estados electrónicos singuletes fundamental y excitados, primero y segundo, están representados por S_0 , S_1 y S_2 respectivamente. Cada uno de estos niveles de energía electrónica se subdivide en varios niveles de energía vibracional. Las transiciones entre estados se indican como líneas verticales que ilustran la naturaleza instantánea de la absorción de la luz. A temperatura ambiente la energía térmica no es suficiente para que la población de los estados vibracionales excitados sea significativa. La absorción y emisión ocurre fundamentalmente en las moléculas con la energía vibracional más baja [2].

Tras la absorción de luz, donde un fluoróforo es excitado hasta algún nivel vibracional de S_1 o S_2 ocurren diversos procesos. De forma general, las moléculas de fases condensadas se relajan al nivel vibracional más bajo de S_1 . Este proceso es conocido como conversión interna y ocurre en un intervalo de tiempo inferior a 10^{-12} s. Como los tiempos de vida de la fluorescencia son cercanos a 10^{-8} s, la conversión interna se completa antes del inicio de los fenómenos de emisión. Por consiguiente, la emisión de fluorescencia sucede desde un estado excitado en equilibrio térmico, es decir, el estado de energía vibracional más bajo de S_1 .

Las moléculas del estado S_1 pueden sufrir también una conversión de espín al primer estado triplete, este fenómeno se denomina cruce intersistemas. La fosforescencia es la emisión desde el estado T_1 , y está desplazada hacia mayores longitudes de onda (menores energías) respecto a la fluorescencia. La transición desde T_1 a un estado singlete fundamental está prohibida, y como resultado las constantes de emisión son de varios órdenes de magnitud inferiores a los de la fluorescencia (10^3 a 10^0 s $^{-1}$), siendo los tiempos de vida del orden de los milisegundos a los segundos. La fosforescencia no suele verse en disoluciones a temperatura ambiente debido a la existencia de diversos procesos de desactivación que compiten con la emisión como desactivaciones no radiacionales y procesos de "quenching".

Hay que mencionar que la barrera entre fluorescencia y fosforescencia no es siempre clara. Existen complejos de metales de transición con ligandos orgánicos que presentan estados singlete-triplete mixtos con tiempos de vida intermedios entre los nanosegundos y los milisegundos.

Las técnicas de luminiscencia molecular han sufrido un crecimiento espectacular en las últimas décadas en las ciencias bioquímicas y biofísicas. Su uso está completamente extendido en la biotecnología, diagnósticos médicos, secuenciación de ADN, análisis forenses y genéticos... [2]

La fluorescencia molecular es posiblemente la herramienta de espectroscopía de luminiscencia molecular más utilizada. Ello se debe a que posee una buena selectividad y no precisa de marcadores radioactivos, caros y de manejo complicado, empleados en la mayoría de las medidas bioquímicas.

1.1.2. Estudio de las interacciones proteínas-analito.

Las interacciones entre las proteínas y diferentes ligandos forman las bases de los procesos fundamentales para la comunicación y regulación en y entre las diferentes estructuras de un organismo vivo [3]. Las investigaciones sobre los distintos aspectos de las interacciones de diferentes analitos con proteínas abarcan la naturaleza molecular de las mismas, sus funciones biológicas e incluso significancia farmacológica en el caso de medicamentos. Es un campo de estudio que afecta a las ciencias de la salud, la bioquímica y la medicina clínica.

Las metodologías empleadas para el estudio de los diversos aspectos de la interacción proteína-analito pueden dividirse fundamentalmente en [4]:

1. Separación de la proteína libre y la unida a una fracción del ligando.
2. Detección de un cambio en las propiedades fisicoquímicas de los ligandos.
3. Detección de un cambio en el comportamiento fisicoquímico de la proteína enlazada

Además, la conjunción con métodos de separación pueden permitir en este estudio la descripción no sólo de las características de las zonas de enlace primarias de alta afinidad si no también de los lugares secundarios de enlace con baja afinidad.

Las interacciones moleculares son examinadas habitualmente mediante técnicas espectroscópicas de luminiscencia ya que estos métodos son muy sensibles y fáciles de usar. Presentan ventajas sobre otros enfoques convencionales como las cromatografías de afinidad o exclusión por tamaños, ultrafiltración, ultracentrifugación y diálisis de equilibrio que sufren de poca sensibilidad, largos tiempos de análisis y empleo de concentraciones de proteínas que exceden mucho las constantes de disociación de los complejos proteína-analito [5] [6].

Durante las últimas décadas ha existido un gran interés por los estudios de las interacciones entre medicamentos y biomacromoléculas [7]. La determinación de sus enlaces, especialmente a proteínas tisulares y plasmáticas, es obligatoria en los estudios farmacológicos y toxicológicos [8]. Aunque la información obtenida de todas estas investigaciones es muy útil cabe recordar que puede no ser del todo cierta y siempre es necesario realizar estudios in vivo para contrastar los datos.

Los volúmenes aparentes de distribución y las relaciones de eliminación de los medicamentos están significativamente afectados por los tipos de enlace formados entre los medicamentos

y las proteínas [9]. Por consiguiente, es posible obtener información de las características estructurales que determinan la efectividad terapéutica [10].

1.1.3. Empleo del triptófano como sonda luminiscente intrínseca.

Las aplicaciones bioquímicas de luminiscencia emplean a menudo la fluorescencia y fosforescencia intrínsecas de las proteínas. Entre los biopolímeros, las proteínas son únicas mostrando luminiscencia intrínseca útil. Los lípidos, membranas y sacáridos son esencialmente no fluorescentes y la fluorescencia intrínseca del ADN es demasiado débil para ser utilizada. Los tres aminoácidos aromáticos que forman parte de las proteínas (fenilalanina, tirosina y triptófano) son fluoróforos, su estructura puede observarse en la **Figura 2**. Estos aminoácidos son relativamente poco comunes en las proteínas. El triptófano que es el fluoróforo dominante, está presente en una concentración menor del 1 % en las proteínas. El pequeño número de residuos es probablemente el resultado del alto coste metabólico asociado a su síntesis. Una proteína puede poseer sólo uno o unos pocos residuos de triptófano, lo que facilita la interpretación de los espectros. Si todos los aminoácidos fueran fluorescentes la emisión protéica sería muy compleja.

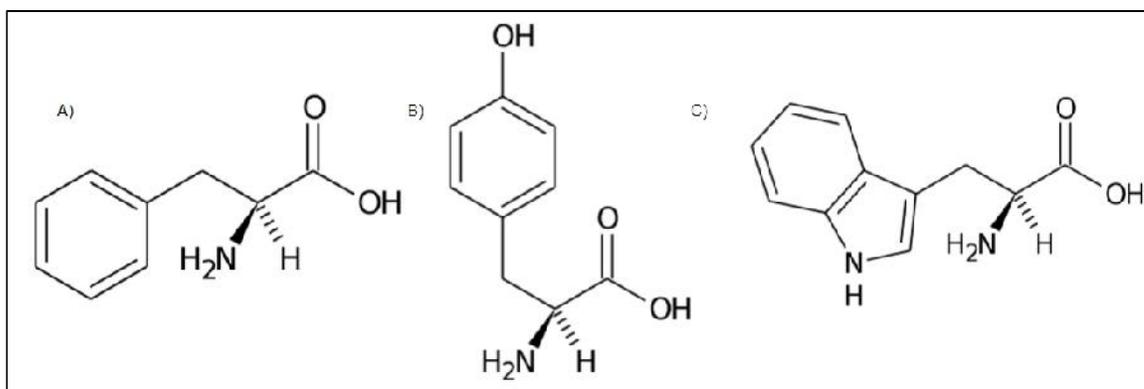


Figura 2 Estructura química de: a) fenilalanina, b) tirosina, c) triptófano

Una característica valiosa de la fluorescencia intrínseca de las proteínas es la alta sensibilidad del triptófano a su entorno local. Cambios en los espectros de emisión del triptófano suelen ocurrir como respuesta a transiciones conformacionales, asociaciones de subunidades, enlaces con sustratos o desnaturalizaciones. Estas interacciones pueden afectar al entorno próximo al anillo indólico. La tirosina y el triptófano exhiben altas anisotropías que son sensibles a las conformaciones de las proteínas y el grado de movimiento durante el tiempo de vida del estado excitado. Además, el triptófano presenta una sensibilidad única al “quenching” colisional debido a la tendencia del estado excitado del indol a donar electrones. Esta desactivación puede ser

provocada externamente por la adición de desactivantes o por grupos cercanos propios de la proteína. Por lo tanto, el uso de espectros de emisión, anisotropía y "quenching" del triptófano permiten el estudio de la estructura y función de la proteína a la que pertenecen [2].

Por desgracia, el triptófano exhibe un factor que complica la interpretación de su luminiscencia. Ello se debe a la presencia de dos estados excitados casi isoenergéticos (1L_a y 1L_b) con propiedades espectrales complejas. Sin embargo, a día de hoy el conocimiento que se posee sobre él es mucho mayor que el de cualquiera de las sondas extrínsecas que se utilizan [11].

En los últimos 60 años se han escrito más de 10000 artículos sobre la fluorescencia del triptófano o del indol que han permitido conocer con gran exactitud los fenómenos fotofísicos de los mismos. Si unimos este conocimiento a la capacidad de incluir residuos de triptófano en la secuencia de aminoácidos de casi cualquier proteína y de la alta sensibilidad de la emisión del triptófano hacen de él una sonda casi ideal para el estudio de las funciones, estructuras y dinámicas de las proteínas.

1.2. Antibióticos.

1.2.1. Origen y clasificación.

Los antibióticos o antimicrobianos son compuestos químicos empleados para el eliminar o inhibir el crecimiento de organismos infecciosos. Pueden tener un origen sintético o natural a partir de cultivos de microorganismos. Existen también agentes semisintéticos que consisten en modificaciones de la estructura química de compuestos obtenidos naturalmente.

En 1929 se descubrió el primer antibiótico con aplicaciones clínicas [12]. La penicilina supuso desde su introducción como agente terapéutico una revolución en el tratamiento de patologías infecciosas. Desde entonces se han descubierto decenas de familias de antimicrobianos que tratan afecciones provocadas por bacterias, hongos, parásitos y virus (ver **Figura 3**). Desde 1962 no se han introducido nuevas clases estructurales de antibióticos, lo que implica un vacío serio de innovación en la considerada era genómica [13]. De todos modos, la búsqueda de nuevos antibióticos cobrará cada vez más importancia debido al creciente aumento de casos de resistencia a los mismos.

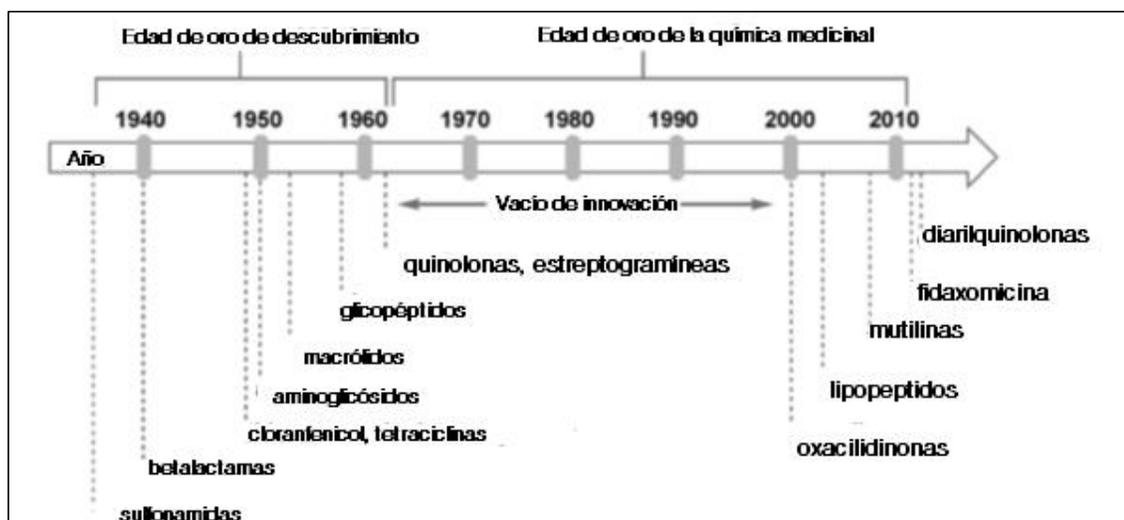


Figura 3 Línea temporal de la edad de oro del descubrimiento de antibióticos (1940-1960) y edad dorada de la química medicinal con antibióticos.

Los antibióticos se han clasificado tradicionalmente según su efecto antibacteriano. Pueden ser bactericidas si ejercen una acción letal para la bacteria y en caso de que sólo inhiban transitoriamente su crecimiento son denominados bacteriostáticos. Los límites de ambos conceptos son difusos [14]. Cada grupo trabaja preferentemente de una manera u otra, aunque existen algunos capaces de actuar de ambos modos dependiendo de su afinidad por la diana o de su concentración.

Dada la amplia cantidad de antibióticos existentes es posible clasificar los grupos principales con interés clínico según su mecanismo de acción y estructura química [15]. Existen muchos antibióticos categorizados en otras familias de medicamentos debido a su polifuncionalidad. En la **Tabla 1** se recogen los principales representantes de cada familia de antimicrobianos:

Tabla 1 Principales grupos de antibióticos y representantes de estos

Mecanismo de acción	Grupo	Antimicrobianos representativos	
Inhibición de la síntesis de la pared microbiana	-lactámicos	Penicilinas	Naturales: penicilina G, penicilina V Resistentes a penicilinasas: cloxacilina, oxacilina, meticilina Aminopenicilinas: ampicilina, amoxicilina Carboxipenicilinas: carbenicilina, ticarcilina Ureidopenicilinas: piperacilina, mezlocilina
		Cefalosporinas	1ª generación: cefazolina, cefalotina 2ª generación: cefuroxima, cefoxitina, cefotetran, cefixima, cefamandol 3ª generación: cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidina, cefixima, cefpodoxima 4ª generación: cefepima, ceftiproma

		Monobactams	Aztreonam
		Carbapenems	Imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem
	Glucopéptidos		Vancomicina, telcoplanina
	Bacitracina		Bacitracina
	Isoxazolidinonas		Cicloserina
	Fosfonopéptidos		Fosfomicina
Alteración de la membrana citoplasmática	Polimixinas		Polimixina B, polimixina E (colistina)
	Lipopéptidos		Daptomicina
	Ionóforos		Tirocidinas
	Formadores poros		Gramiciclinas
Inhibición de la síntesis proteica	Ácido fusídico		Ácido fusídico
	Aminoglucósidos		Gentamicina, tobramicina, ampicacina, netilmicina
	Anfenicoles		Cloranfenicol , tiamfenicol
	Estreptograminas		Clindamicina, lincomicina
	Macrólidos		14 átomos de carbono: eritromicina, claritromicina, roxitromicina
			15 átomos de carbono: azitromicina
			16 átomos de carbono: espiramicina, josamicina, midecamicina
			Cetólidos: telitromicina
	Mupirocina		Mupirocina
	Oxazolidinonas		Linezolid
	Tetraciclinas		Tetraciclina , doxiciclina, minociclina
	Gliciliclinas		Tigeciclina
Alteración del metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos	Quinilonas		1ª generación: ácido nalidixico, ácido piperimídico
			2ª generación: norfloxacino
			3ª generación: ciprofloxacino, levofloxacino
			4ª generación: moxifloxacina, gemifloxacina
	Rifamicinas		Rifampicina
	Nitroimidazoles		Metronidazol, ornidazol, tinidazol
	Nitrofuranos		Nitrofurantoína, furazolidona
Bloqueo de la síntesis de factores metabólicos	Sulfonamidas	Trimetoprima	Cotrimoxazol
	Diaminopiridinas	Sulfametoxazol	
Inhibidores de -lactamasas		Ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam	

1.2.2. Mecanismo de acción.

Los mecanismos de acción de los antibióticos son muy diferentes entre sí y los blancos a los que se dirigen se encuentran en distintos lugares de la célula atacada. Estas zonas de ataque antimicrobiano son las siguientes:

- Pared bacteriana
- Membrana bacteriana
- Síntesis de proteínas
- Síntesis de ácidos nucleicos

En la **Figura 4** se representa un esquema de estructuras bacterianas que incluye pared, membranas, ribosoma y ácidos nucleicos, conjuntamente con las drogas más comunes y las regiones de acción dentro de la estructura microbiana [16].

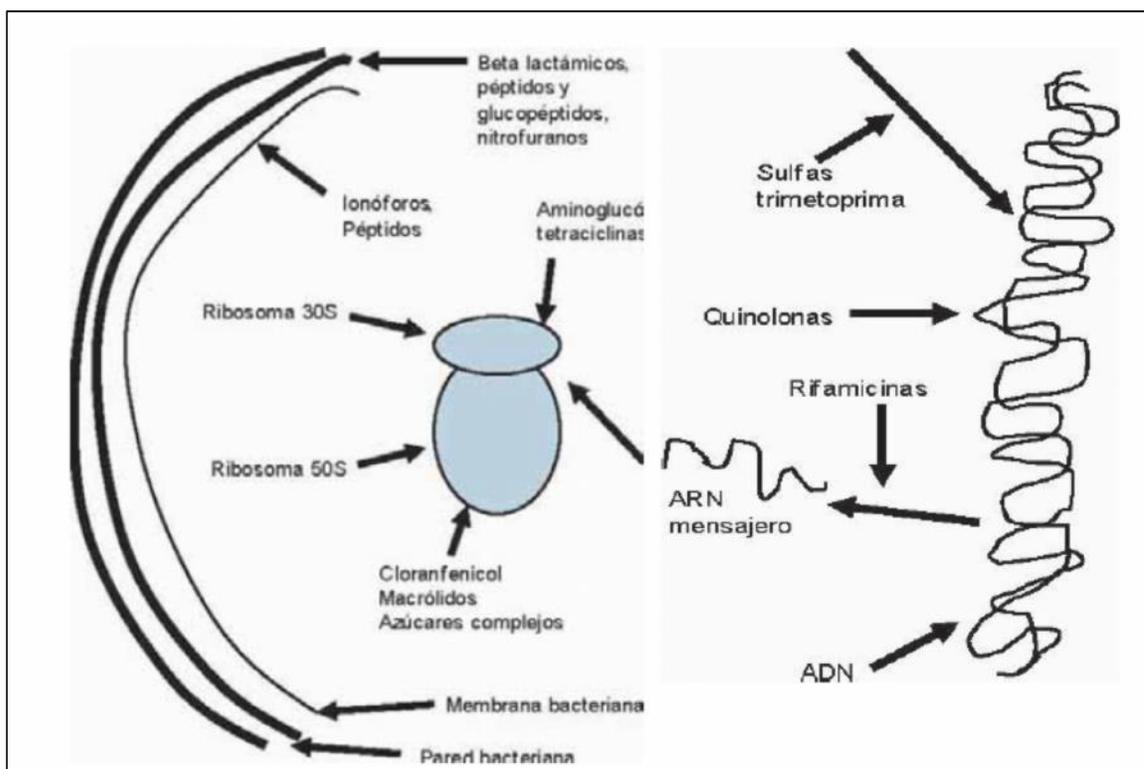


Figura 4 Esquema de regiones de ataque por parte de algunos antibióticos.

Los antibióticos que atacan la pared bacteriana desempeñan su labor a través del bloqueo de su síntesis. La lisis bacteriana se logra por defectos en la pared celular provocada por interferencias en la síntesis de peptidoglicanos (elementos esenciales de la constitución de la pared). Desarrollan su función solamente frente a microorganismos que están en crecimiento activo. En este grupo se encuentran los beta lactámicos, glucopéptidos (vancomicina, teicoplanina y avoparcina), bacitracina y estreptograminas (virginiamicina, quinupristina-dalfopristina).

Las polimixinas (polimixina B y colistín) son péptidos catiónicos que disrumen la porción fosfolipídica de la membrana celular bacteriana debido a su actividad detergente.

Existe una gran cantidad de antibióticos que actúan sobre los ribosomas que son los encargados de la síntesis de proteínas. Se incluyen en esta familia los aminoglucósidos y aminociclitolos, tetraciclinas, cloranfenicol y sucedáneos, lincosamidas y macrólidos. El proceso de interferencia es muy complejo y cada antibiótico puede atacar a blancos diferentes del ribosoma. Los aminoglucósidos y aminociclitolos actúan a nivel de la subunidad 30 S del ribosoma,

provocando errores en la lectura de la información dada por el ARN mensajero. Así la proteína sintetizada no será útil por contener errores en su secuencia. Además tienen también la capacidad de inducir alteraciones de las membranas. Otros compuestos que se unen a la porción 30 S son las tetraciclinas actuando de modo similar. En cambio, el cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol tienen como diana la subunidad 50 S del ribosoma, actúan inhibiendo la transpeptidasa e impidiendo la formación de los péptidos. Las lincosamidas y macrólidos, con la porción 50 S como blanco, inhiben la traslocación. Todos estos mecanismos suspenden e interrumpen la síntesis de proteínas.

Otros agentes actúan sobre los ácidos nucleicos. Entre ellos se ubican las sulfamidas y trimetoprima que impiden la síntesis de purinas. Impidiendo el superenrollamiento de las cadenas de ADN por inhibición de la girasa tenemos a las fluoroquinolonas y novobiocina. Los nitroimidazoles, como dimetridazol, metronidazol y tinidazol impiden la reparación de las cadenas de ADN. Por último, los nitrofuranos, imposibilitan la lectura codónica ADN-ARN mensajero.

1.2.3. Interacción con la seroalbúmina bovina

Las seroalbúminas o albúminas séricas son las proteínas solubles más abundantes del sistema circulatorio, su concentración en el plasma sanguíneo está entre el 52 y el 60 %. Son sintetizadas por las células parenquimatosas del hígado y exportadas como proteínas no glicosiladas. Tiene un tiempo de vida medio en circulación de 19 días [17].

Estas extraordinarias proteínas globulares poseen funciones muy destacables a nivel biológico y farmacocinético. Son capaces de enlazarse reversiblemente con una gran variedad de ligandos endógenos y exógenos relativamente insolubles aunque su función principal es el transporte de metabolitos como nutrientes, hormonas, ácidos grasos y fármacos. Además de mantener la presión osmótica coloidal de la sangre, juegan un rol dominante en la eficacia y disponibilidad de los medicamentos ya que incrementan la solubilidad aparente de los compuestos farmacológicos en el plasma [18-22].

La afinidad de enlace de cualquier sustancia con las seroalbúminas es uno de los factores más importantes que determinan su farmacocinética (tiempos de absorción, distribución, metabolismo y excreción) y biodisponibilidad [23]. Un valor moderado de afinidad permite que la absorción y distribución del medicamento a los diferentes tejidos sea factible.

En el presente trabajo se emplea la seroalbúmina bovina (SAB) como representante de la familia de las albúminas séricas por su bajo coste y similitud con la albúmina humana (SAH). Sus secuencias son un 80% homólogas, tienen un patrón de puentes disulfuro idéntico y sus estructuras terciarias se parecen en un 76%.

La seroalbúmina bovina está formada por 582 aminoácidos en los que se encuentran 20 residuos tirosínicos y dos triptófanos localizados en las posiciones 134 y 212. El Trp-134 está situado en la superficie de la molécula y el entorno del Trp-212 es similar al del Trp-214 de la SAH (ver **Figura 5**) [24].

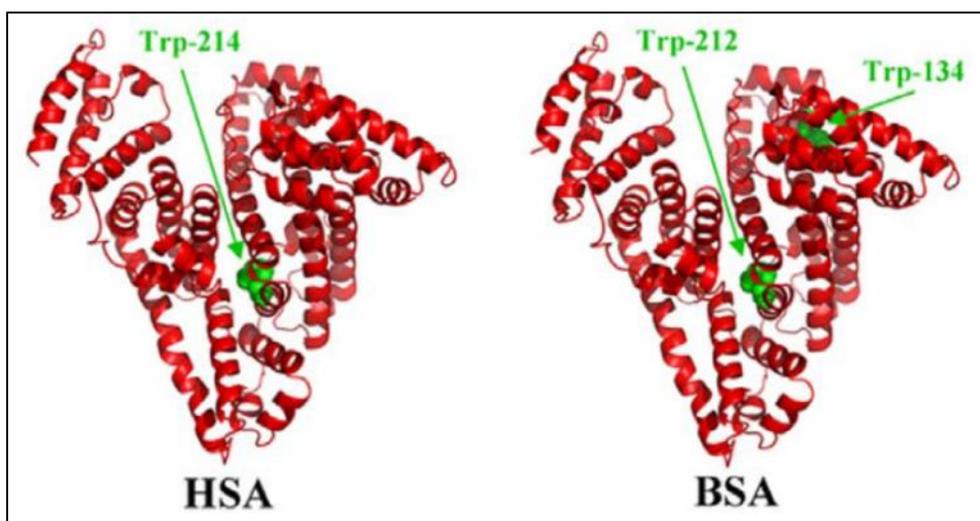


Figura 5 Estructuras tridimensionales de las seroalbúminas humana y bovina.

La estructura contiene tres dominios α -helicoidales homólogos que ensamblados forman una molécula con forma de corazón. Cada dominio contiene 10 hélices y está dividido en seis hélices antiparalelas y cuatro subdominios unidos mediante 17 puentes disulfuro [25].

Existen dos lugares de enlace principales localizados en el subdominio IIA y IIIA. El primero tiene mayor capacidad que el segundo, que es más estrecho. El segundo sitio presenta menor flexibilidad que el primero ya que la zona de enlace está afectada fuertemente por la estereoselectividad de la misma. La afinidad de unión del primer sitio se debe principalmente a interacciones hidrofóbicas; en cambio, en el segundo sitio tienen lugar una combinación de interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno y electrostáticas [26].

1.2.4. Antibióticos estudiados en el presente trabajo.

Los antibióticos seleccionados para el presente trabajo son bencilpenicilina (BEN), cefalexin (CEF), cloranfenicol (CLF), clortetraciclina (CTC), nafcilina (NAF) y Fotoenticine® (FOT).

La bencilpenicilina es el antibiótico betalactámico de referencia de la familia de las penicilinas. Su estructura se puede observar en la **Figura 6**. Es un bactericida que bloquea la reparación y la síntesis de la pared celular bacteriana.

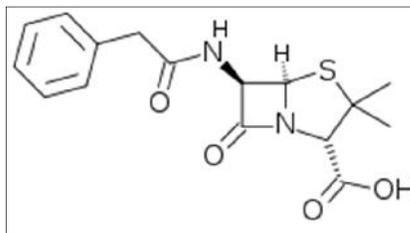


Figura 6 Estructura química de la bencilpenicilina

La cefalexina pertenece a la primera generación de cefalosporinas. Actúa fundamentalmente sobre bacterias Gram positivas, y algunas Gram negativas. Como se ve en la **Figura 7** pertenece también a la familia de los betalactámicos. Inhibe la síntesis de la pared bacteriana bloqueando las transpeptidasas.

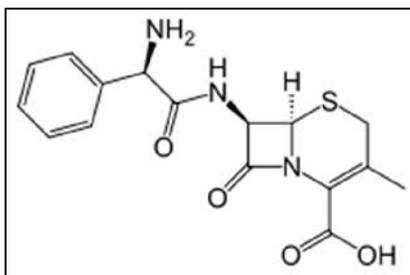


Figura 7 Estructura química de la cefalexina

El cloranfenicol es un antibiótico bacteriostático de amplio espectro, interfiere en la síntesis proteica bacteriana. Pertenece al grupo de los anfenicoles. Fue aislado a partir de la bacteria *Streptomyces venezuelae* y actualmente se produce sintéticamente. En la **Figura 8** se presenta su estructura química.

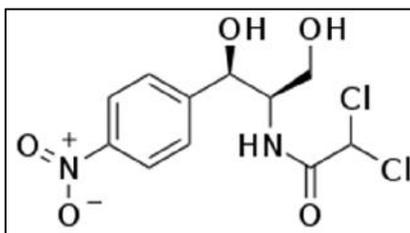


Figura 8 Estructura química del cloranfenicol

La clortetraciclina fue la primera tetraciclina en ser descubierta. Pertenece a la familia de las tetraciclinas (ver **Figura 9**). Tiene una gran actividad frente a numerosos gérmenes. Tiene un amplio espectro de acción bacteriostática y actúa interfiriendo la síntesis proteica bacteriana.

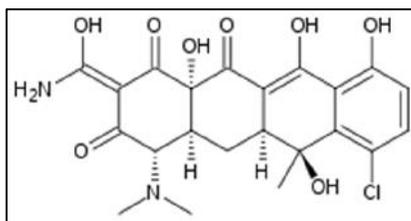


Figura 9 Estructura química de la clortetraciclina

La nafcilina es un antibiótico betalactámico (**Figura 10**), forma parte del grupo de las penicilinas, actúa inhibiendo la síntesis de mucopéptidos en la pared celular. Bloquea enzimas citoplasmáticas y favorece la formación de paredes defectuosas estructural y osmóticamente.

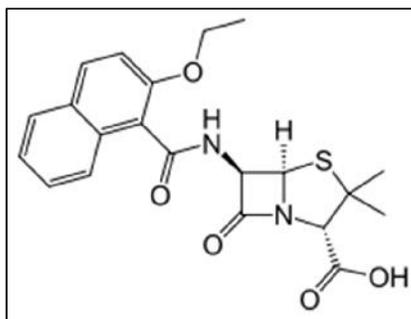


Figura 10 Estructura química de la nafcilina

El Fotoenticine® es un medicamento experimental dirigido a tratamientos fotodinámicos de células cancerosas. Tras su activación radiacional forma oxígeno singlet que destruye por apoptosis las células diana. Es la sal trisustituida con N-Metil-D-glucamina de Chlorin-e6. Su anillo porfirínico (ver **Figura 11**) tiene actividad antimicrobiana por lo que forma parte de los nuevos medicamentos polifuncionales.

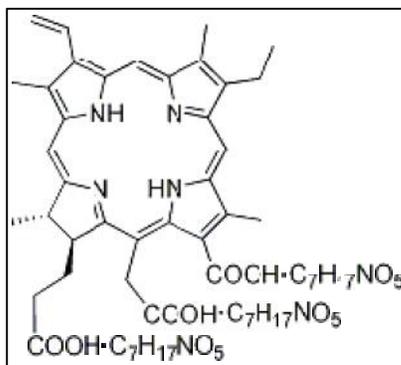


Figura 11 Estructura química del Fotoenticine®.

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1. Materiales.

2.1.1. Reactivos.

La seroalbúmina bovina (Sigma) fue disuelta diariamente en agua destilada para obtener una disolución madre de concentración 10^{-4} M.

Las disoluciones acuosas de los aminoácidos fenilalanina (Sigma), tirosina (Sigma) y triptófano (Sigma) se prepararon con una concentración de 2×10^{-3} M.

Las disoluciones patrones de los antibióticos bencilpenicilina (Fluka), cefalexin (Sigma), clo-ranfenicol (Aldrich), clortetraciclina (Sigma) y nafcilina (Sigma) fueron preparadas disolviendo la cantidad necesaria de los mismos en agua destilada para obtener concentraciones de 10^{-2} M. Estas disoluciones fueron estables durante un tiempo superior a 3 semanas manteniéndolas refrigeradas y en envases topacio a 4°C . Las disoluciones de trabajo se prepararon diariamente por dilución de las soluciones patrón con agua destilada.

La muestra del medicamento experimental Fotoenticine® (NTC) se presentaba en disolución acuosa con concentración 7.14 mg/mL y siguió para él un tratamiento análogo al resto de antibióticos.

Para las medidas de fosforescencia se emplearon disoluciones madre de yoduro de potasio (Sigma) y sulfito sódico anhidro (Probus) en disolución acuosa de concentraciones 5M y 2M respectivamente. La disolución de sulfito sódico fue preparada diariamente.

Todos los reactivos utilizados son de grado analítico.

2.1.2. Aparatos e instrumental.

Los espectros de absorción fueron registrados con un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 900 UV/VIS/NIR (Reino Unido). Es un equipo dotado de un sistema óptico de doble haz y doble monocromador, con fuentes de wolframio-halógeno (VIS/NIR) y deuterio (UV) y

como detectores un fotomultiplicador R6872 (UV-VIS) y un PbS refrigerado (NIR). Se empleó para el registro de los espectros el software UV Winlab. Se utilizaron cubetas de cuarzo estándar de 1 cm de paso óptico y para la corrección de las señales de fondo de absorción se usaron los blancos apropiados.

Se empleó un espectrofotómetro de fluorescencia Varian Cary Eclipse (Australia) para realizar las medidas de caracterización fluorimétrica y fosforimétrica, así como los espectros de "quenching" de fosforescencia. Este equipo posee una lámpara flash de Xenón y un tubo fotomultiplicador como detector. Además posee un paquete propio de software adaptado a cada tipo posible de medida. Se emplean cubetas de cuarzo de fluorescencia estándar de 10 mm de paso óptico.

Las medidas de "quenching" de fluorescencia a temperatura controlada y de tiempos de vida de fluorescencia fueron realizadas en un espectrómetro de fluorescencia Edinburgh Instruments FLSP920 Series (Reino Unido) dotado del software F900. Es un sistema modular cuyos componentes son intercambiables según las medidas a realizar y son los siguientes:

- Fuentes: Lámpara continua de xenón Xe900 para medidas de fluorescencia y diodo emisor de luz pulsada de picosegundos de 299.6 nm para medidas de tiempo de vida de fluorescencia
- Monocromadores de excitación y emisión.
- Sistema óptico
- Cámara de muestra termostatazada.
- Detectores *single photon counting PMT* para medidas de fluorescencia y *microchannel plate photomultipliers MCP-PMTs* para medidas de tiempos de vida.

Para las pesadas de reactivos se emplearon una balanza analítica Mettler AE163 (Suiza) y un granatario Mettler Toledo PG802-S (Suiza). Además se utilizó material volumétrico y fungible apropiado a la naturaleza de los experimentos.

2.2. Protocolos de medida.

Las medidas de absorción se realizaron con disoluciones 10^{-5} M de SAB y antibióticos. Se registraron los espectros entre 200 y 700 nm a temperatura ambiente.

Los estudios de fluorescencia se realizaron con disoluciones de concentración 10^{-5} M para los analitos solos. Para el estudio de "quenching" y de tiempo de vida se emplearon disoluciones con una cantidad fija de SAB (10^{-5} M) y diferentes concentraciones de los antibióticos de interés preparadas en matraces de 10 mL.

Las condiciones de medida en el caso del empleo del fluorímetro Varian Cary Eclipse fueron $\lambda_{exc}=295$ nm, los anchos de las rendijas de emisión y excitación se fijaron en 5 nm y se midieron los espectros en el rango de 300 a 700 nm, además se empleó un suavizado con un filtro Savitzky-Golay con $n=5$. Para los espectros registrados en el equipo Edinburgh Instruments FLSP920 se usó la misma longitud de excitación, el mismo rango de medida pero rendijas de emisión y excitación de 3 nm. Además se controló la temperatura gracias al uso de una celda de medida termostataada.

Para las medidas de tiempos de vida de fluorescencia se empleó la longitud de excitación del láser de 299.6 nm, longitud de emisión a 345 nm, rango de 100 ns, temperatura controlada a 25°C y como codición de parada 20000 cuentas. Se empleó Ludox como blanco del error instrumental.

En las medidas de fosforescencia se utilizaron muestras con diferentes concentraciones de antibiótico y concentración fija de SAB preparadas directamente en la cubeta de medida a temperatura ambiente. También se añaden alícuotas de KI y de Na_2SO_3 para obtener una concentración de 0.2 M de ambos en un volumen final de 2.5 mL. Tras la adición del sulfito de sodio es necesario tapar la cubeta para que la desoxigenación química realizada surta efecto y realizar inmediatamente las medidas. Los anchos de las rendijas de emisión y excitación se fijaron en 20 nm, gate time de 0.1 ms, gate time de 5000 ms, y se midieron los espectros en el rango de 300 a 700 nm suavizados con un filtro Savitzky-Golay $n=5$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Características espectroscópicas de la seroalbúmina bovina.

3.1.1. Medidas de absorción UV-VIS.

La seroalbúmina bovina presenta un máximo de absorción a 279 nm tal y como se observa la **Figura 12**. Este espectro fue realizado con una disolución acuosa 10^{-5} M de SAB. Los residuos de triptófano, tirosina y fenilalanina son los responsables de la absorción en el intervalo comprendido entre 250-310 nm.

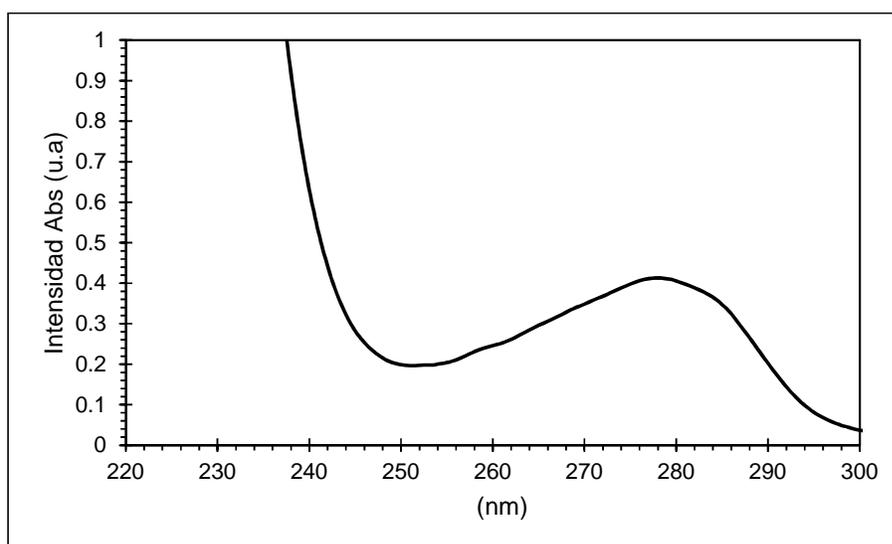


Figura 12 Espectro de absorción de una disolución 10^{-5} M de SAB

3.1.2. Medidas de fluorescencia.

Los aminoácidos triptófano, tirosina y fenilalanina son los responsables de la fluorescencia intrínseca de la seroalbúmina bovina, al igual que la de todas las proteínas que los contengan en su estructura primaria. Estos aminoácidos emiten en solución acuosa con máximos en 362, 304 y 282 nm, respectivamente (ver **Figura 13**, **Figura 14** y **Figura 15**, donde los espectros se han realizado en las mismas condiciones experimentales).

Sin embargo, la emisión de la SAB proviene fundamentalmente de los residuos de tirosina y triptófano. Ello es debido a la pequeña eficiencia cuántica de la fenilalanina; por consiguiente, su emisión apenas es observable. La emisión de fluorescencia observada en la **Figura 16**, tras haber excitado a la longitud de onda del máximo de absorción (279 nm), confirma esta hipótesis.

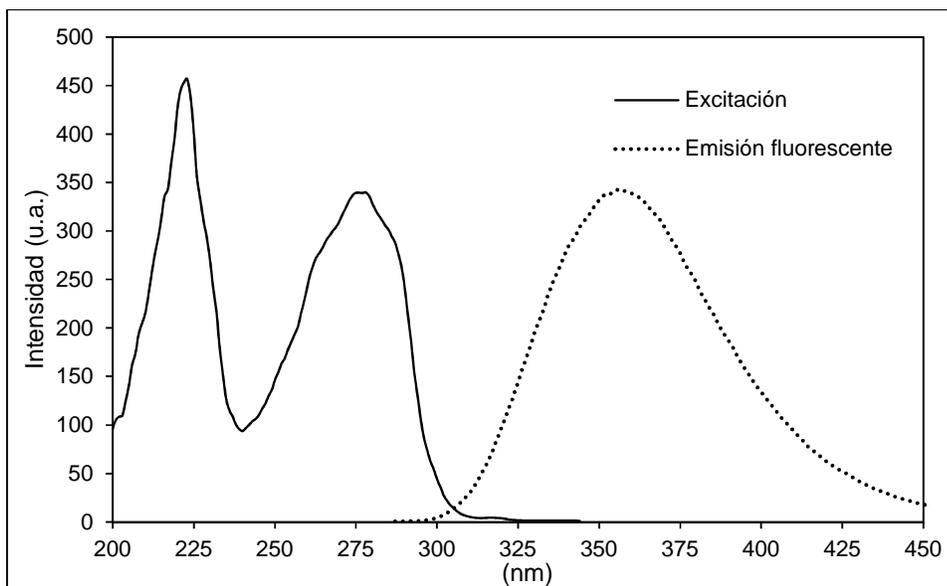


Figura 13 Espectro de excitación y emisión fluorescente de una disolución 2×10^{-5} M de triptófano

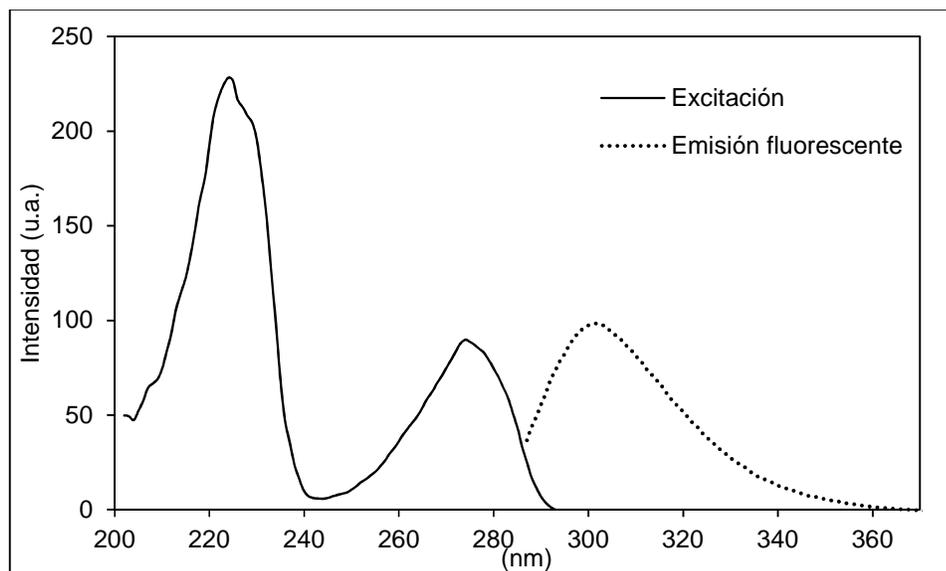


Figura 14 Espectro de excitación y emisión fluorescente de una disolución 2×10^{-5} M de tirosina

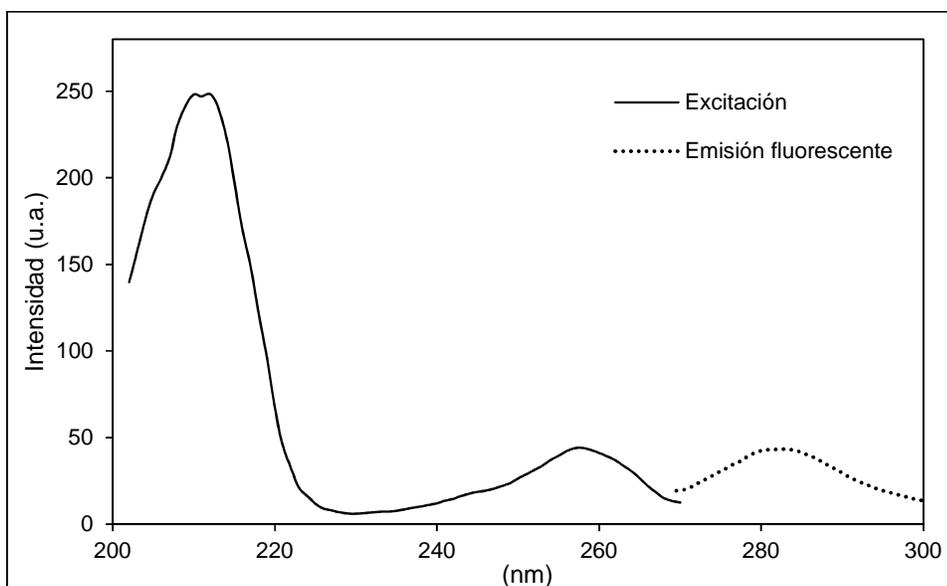


Figura 15 Espectro de excitación y emisión fluorescente de una disolución 2×10^{-5} M de fenilalanina

Se puede obtener de forma selectiva la emisión de fluorescencia de los residuos de triptófano de la SAB excitando a longitudes de onda comprendidas entre 295-305 nm ya que la tirosina no absorbe a más de 292 nm, tal y como se observa en la **Figura 14**. El espectro de fluorescencia de la **Figura 17** indica una disminución de la intensidad de la señal de fluorescencia al emplear una longitud de excitación de 295 nm, esto confirma la selectividad de la emisión. Esto demuestra la viabilidad de poder emplear el triptófano como sonda fluorescente intrínseca en las proteínas ya que el poder aislar su emisión permite estudiar los cambios que se producen en su microentorno mediante medidas luminiscentes.

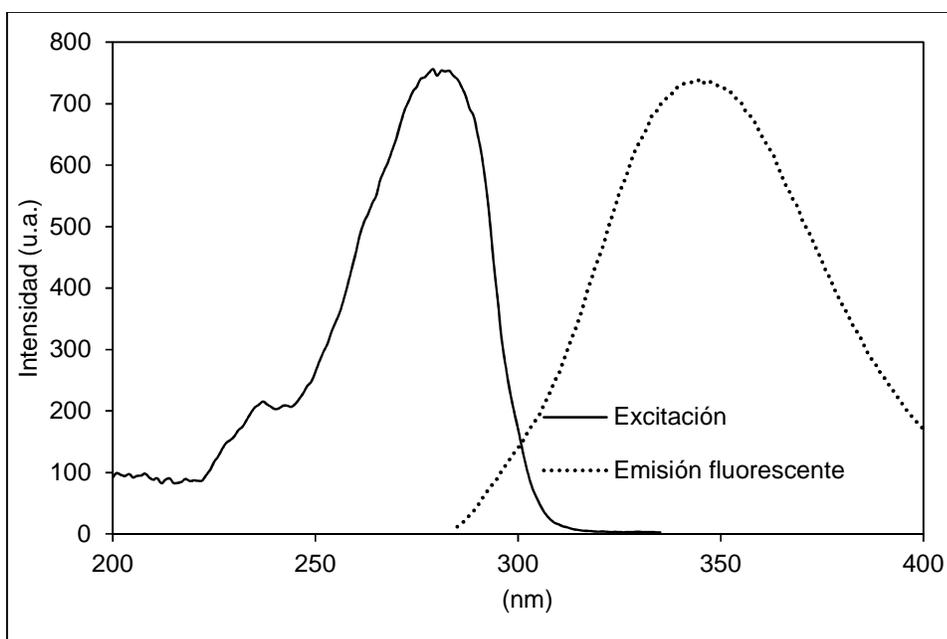


Figura 16 Espectro de excitación y emisión fluorescente de una disolución 10^{-5} M de SAB.

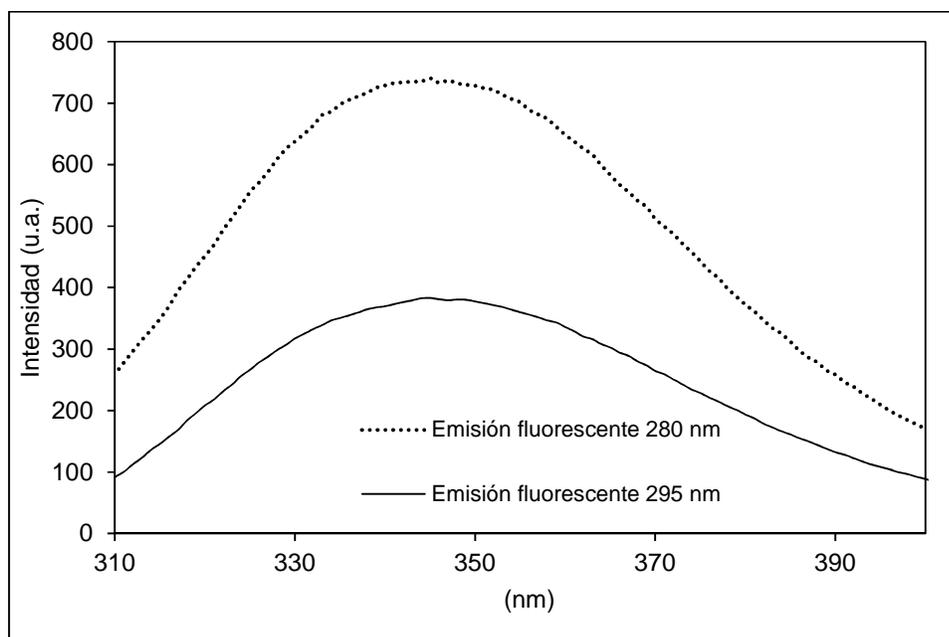


Figura 17 Espectro de emisión fluorescente de una disolución 10^{-5} M de SAB con excitación a 280 y 295 nm.

3.1.3. Medidas de fosforescencia.

La emisión de fosforescencia a temperatura ambiente suele ser débil debido a que es una transición prohibida pero altamente selectiva debido al número escaso de moléculas que exhiben este tipo de luminiscencia. En el presente trabajo se ha empleado un desoxigenante químico como el sulfito de sodio para eliminar el oxígeno molecular disuelto, que actúa como “quencher” del estado triplete [27]. Además otro parámetro que afecta a la intensidad de la señal fosforescente es la presencia de átomos pesados en el medio que favorezcan la población del estado excitado triplete [28], esto se logra adicionando yoduro de potasio a la muestra. En las **Figura 18** y **Figura 19** se pueden observar la diferencia de intensidad de la señal de fosforescencia en presencia y en ausencia de estos aditivos, respectivamente.

Como se puede observar en las figuras se obtiene una señal analíticamente útil y que también puede servir como herramienta para el estudio del microentorno de estas macromoléculas.

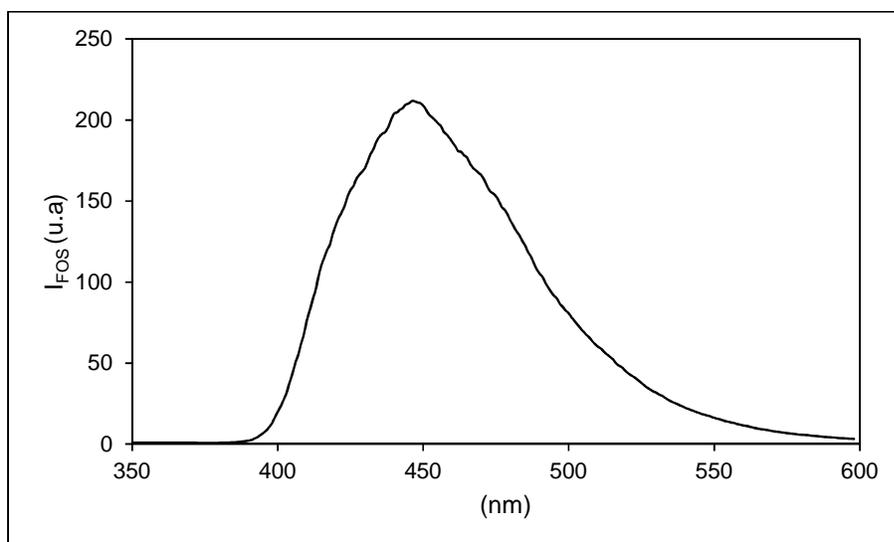


Figura 18 Espectro de fosforescencia de 10^{-5} M SAB con aditivos

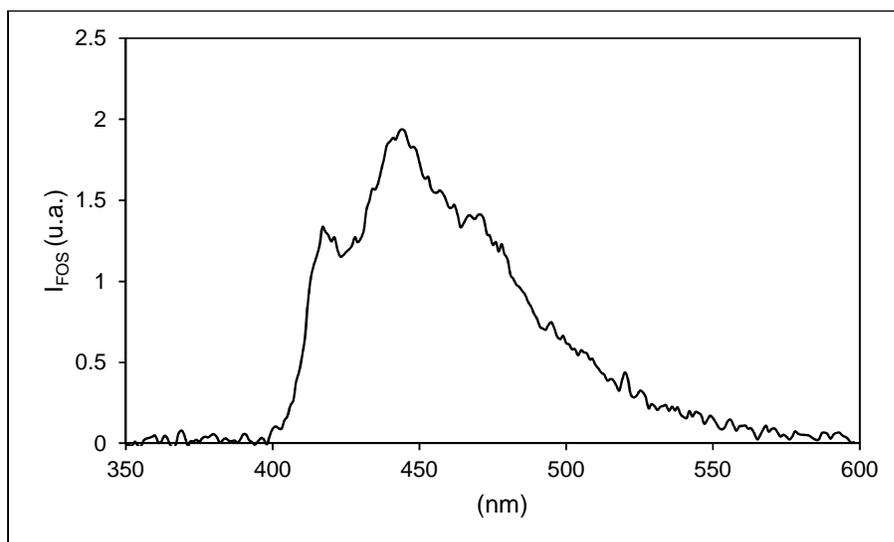


Figura 19 Espectro de fosforescencia de 10^{-5} M SAB sin aditivos

3.2. Características espectroscópicas de los antibióticos.

3.2.1. Medidas de absorción UV-VIS.

Se realizaron espectros de absorción de disoluciones 10^{-5} M de los antibióticos involucrados en el presente trabajo para su caracterización (ver **Figura 20**).

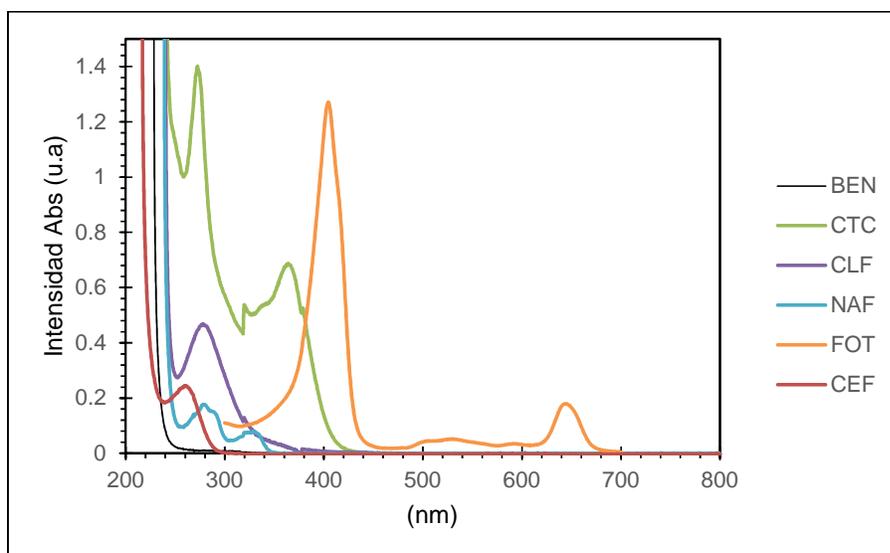


Figura 20 Espectros de absorción de antibióticos en estudio

En la **Tabla 2** se recogen las longitudes de onda correspondientes a los máximos de absorción para cada compuesto analizado.

Tabla 2 Máximos de absorción de los antibióticos en estudio

Antibiótico	abs (nm)
Bencilpenicilina	210
Clortetraciclina	275, 367
Cloranfenicol	283
Nafcilina	273
Fotoenticine	406, 650
Cefalexina	269

3.2.2. Medidas de fluorescencia.

De todos los antibióticos en estudio solamente se registraron espectros de emisión fluorescente para el Fotoenticine® (ver **Figura 21**). Presenta un máximo de emisión fluorescente a longitud de onda de 673 nm.

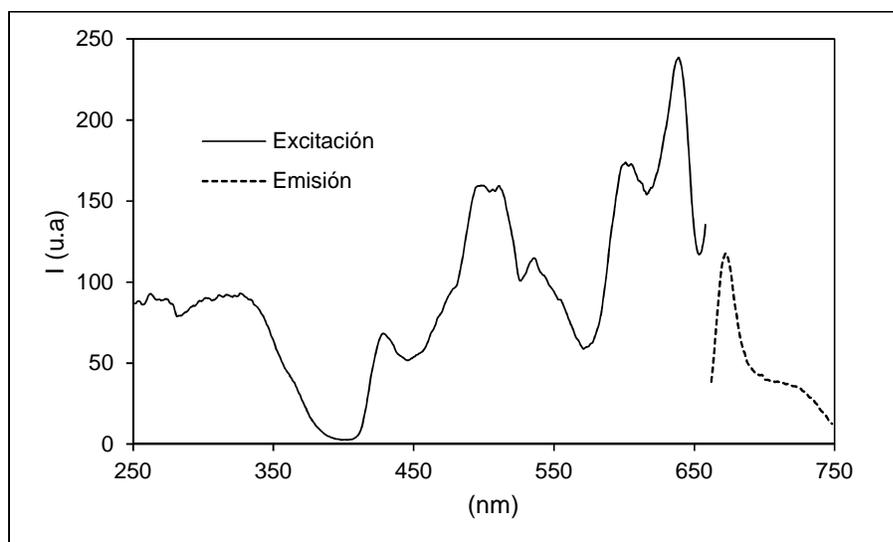


Figura 21 Espectro de excitación y emisión de una disolución 10^{-5} M de Fotoenticine

3.3. Estudio del “quenching” de la fluorescencia de la SAB y caracterización del fenómeno de asociación.

3.3.1. Fundamentos

Los fluoróforos en disolución son capaces de interactuar con otras moléculas presentes en la misma. Debido a estas posibles interacciones puede producirse el fenómeno conocido como “quenching” de fluorescencia, que consiste en una pérdida de emisión fluorescente.

La desactivación puede ser generada por una amplia gama de interacciones moleculares tales como reacciones del estado excitado, reorganizaciones moleculares, transferencia de energía, formación de complejos y colisiones entre moléculas.

Es necesario que exista contacto molecular entre el fluoróforo y el desactivante para que se produzca el “quenching” de fluorescencia, ya sea de tipo dinámico o estático. Por ello, este fenómeno ha sido una de las fuentes de información más empleadas de las interacciones en sistemas bioquímicos.

En las **Figura 22 a Figura 27** podemos observar que la adición de concentraciones crecientes de antibióticos sobre una concentración fija de seroalbúmina bovina ocasiona una gradual reducción en la intensidad de fluorescencia, excepto para la nafcilina que aumenta con concentraciones bajas del antibiótico aunque después desciende.

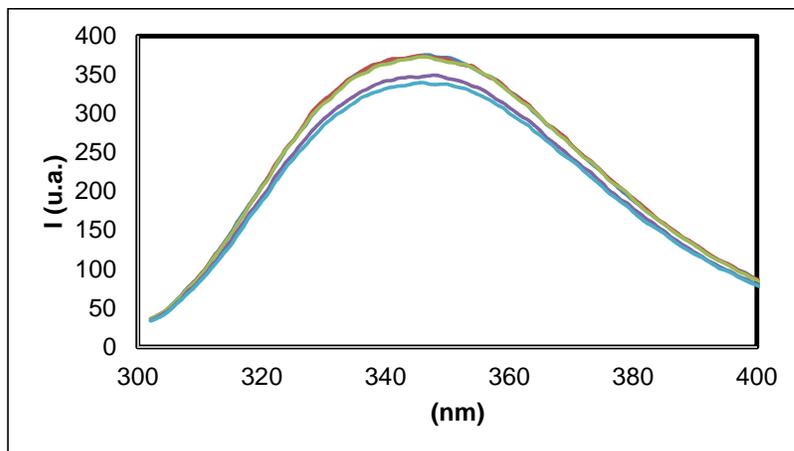


Figura 22 Quenching de SAB con bencilpenicilina a $\lambda_{exc}=295\text{nm}$

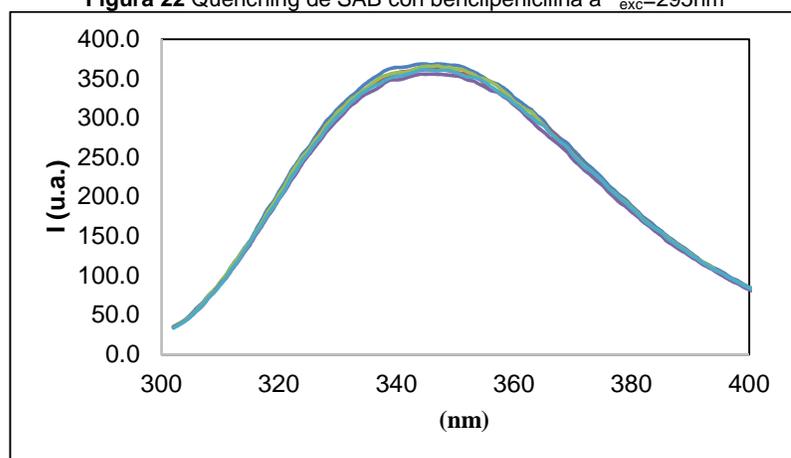


Figura 23 Quenching de SAB con cefalexina a $\lambda_{exc}=295\text{nm}$

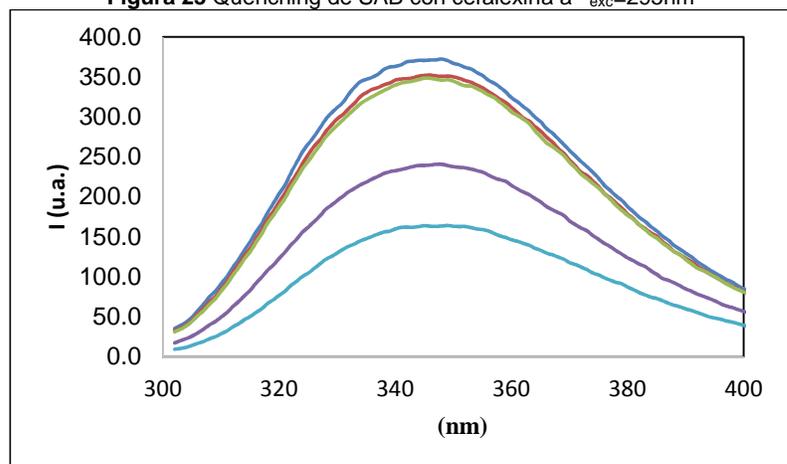


Figura 24 Quenching de SAB con cloranfenicol a $\lambda_{exc}=295\text{nm}$

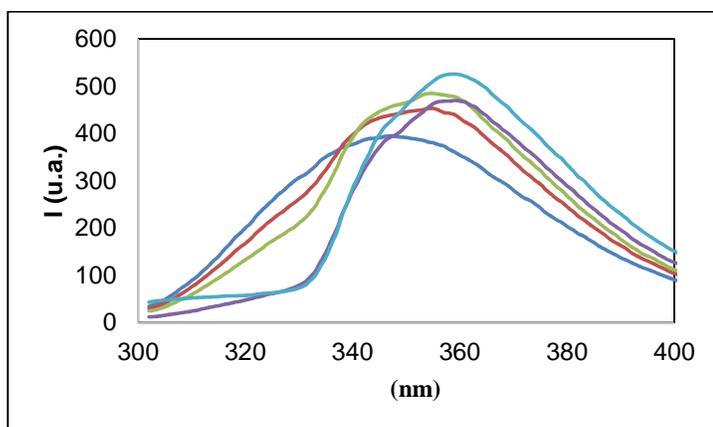


Figura 25 Quenching de SAB con nafcilina a $\lambda_{exc}=295\text{nm}$

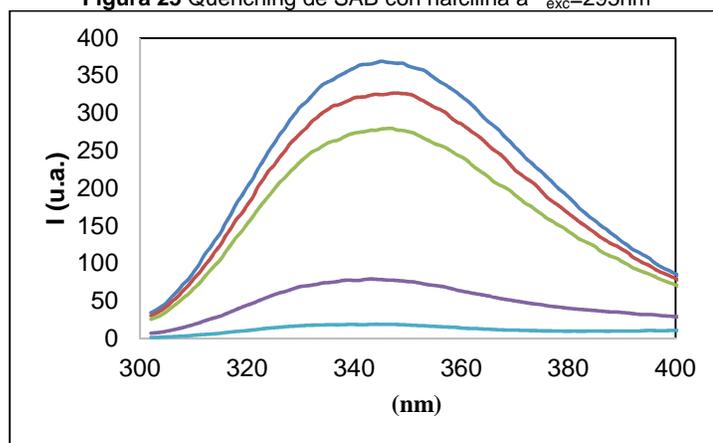


Figura 26 Quenching de SAB con clortetraciclina a $\lambda_{exc}=295\text{nm}$

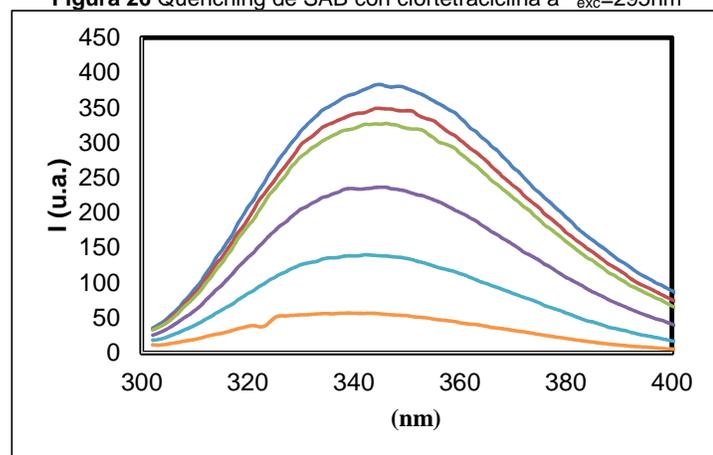


Figura 27 Quenching de SAB con fotoenticine a $\lambda_{exc}=295\text{nm}$

No se percibe un desplazamiento significativo en la longitud de onda de emisión de la SAB excepto para la nafcilina pero la desactivación sucede. Por lo tanto podemos concluir que la presencia de una interacción entre los antibióticos y la SAB induce la desactivación de la fluorescencia intrínseca de la proteína.

Tras confirmar la existencia del mecanismo de "quenching" se pasó a examinar que las variaciones en la intensidad de fluorescencia están relacionadas con un fenómeno de unión.

3.3.2. Determinación del mecanismo de "quenching".

El mecanismo de interacción entre desactivantes y macromoléculas fluorescentes se puede dividir en dos modelos: "quenching" estático y "quenching" dinámico.

El "quenching" estático o asociativo se origina por la formación de un complejo no fluorescente entre el fluoróforo y el desactivante. Tras la absorción de energía por parte del complejo, éste regresa inmediatamente al estado fundamental sin emisión de un fotón.

Cuando la desactivación es resultado de los choques entre un desactivante y el fluoróforo (durante el tiempo de vida del estado excitado del mismo) se considera que el "quenching" es dinámico o colisional. Además, al igual que en el "quenching" estático no hay emisión de un fotón al volver el fluoróforo a su estado fundamental.

El proceso se puede analizar mediante la ecuación de Stern-Volmer [2]

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q]$$

donde F_0 y F representan las intensidades de fluorescencia en ausencia y presencia del desactivante respectivamente, K_q es la constante de "quenching" bimolecular, K_{SV} es la constante de "quenching" de Stern-Volmer, τ_0 es el tiempo de vida promedio de SAB en ausencia del desactivante y $[Q]$ es la concentración del desactivante.

La constante de "quenching" K_q nos permite distinguir el "quenching" estático del dinámico. Por consiguiente, aplicando la ecuación de Stern-Volmer se puede determinar K_{SV} por regresión lineal de un gráfico de $(F_0-F)/F$ vs $[Q]$ y a partir de K_{SV} es posible hallar K_q .

El valor máximo de K_q de varios desactivantes con los biopolímeros es $2,0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [29] para "quenching" dinámico y el tiempo de vida de fluorescencia de biopolímeros es 10^{-8} s [30]. En la **Figura 28** se pueden observar los gráficos de Stern-Volmer para los sistemas antibiótico-SAB. En la **Tabla 3** se presentan los valores de K_{SV} y $K_q (=K_{SV}/\tau_0)$ a 27°C obtenidos a excepción de los de cefalexina, los datos adquiridos presentaban problemas intrínsecos del sistema y no de las medidas en sí que no los hacían aptos para la discusión a realizar.

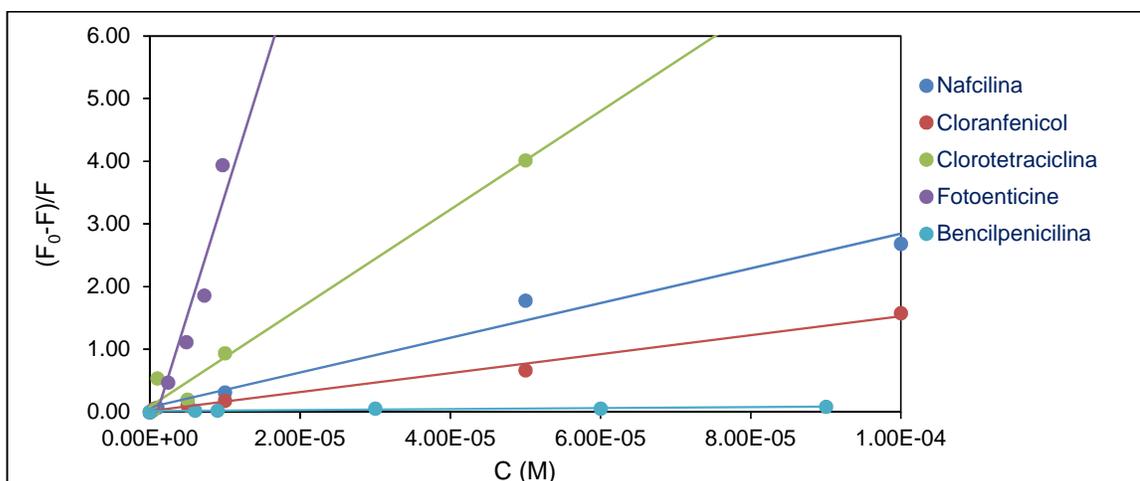


Figura 28 Gráficos de Stern-Volmer para el "quenching" de la SAB por antibióticos.

Tabla 3 Constantes de "quenching" de fluorescencia para la interacción de antibióticos con SAB

Antibiótico	NAF	CLF	CTC	BEN	FOT
$K_{SV} (L \cdot mol^{-1}) \times 10^{-4}$	2.8±0.2	1.5±0.1	8.1±0.3	0.17±0.03	247± 21
$K_q (L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1})$	2.77 x10 ¹²	1.52 x10 ¹²	8.11 x10 ¹²	1.74 x10 ¹¹	2.6 x10 ¹⁴
R ²	0.9784	0.9919	0.9950	0.9572	0.9707

Como todos los valores de K_q calculados son mayores que $2,0 \times 10^{10} Lmol^{-1}s^{-1}$, la desactivación de la fluorescencia sucede debido a una interacción específica entre los antibióticos y la SAB, es decir, la formación de complejos explica el mecanismo de "quenching". Además la desactivación provocada por colisiones es insignificante en el rango de concentraciones analizado.

Es posible diferenciar también entre "quenching" estático y dinámico comparando las constantes obtenidas a distintas temperaturas. La difusión es un factor determinante en el "quenching" colisional, un aumento de la temperatura implica un aumento en los coeficientes de difusión y ello haría aumentar la constante de "quenching". En cambio, mayores temperaturas reducen la estabilidad de los complejos y, por consiguiente, la constante de "quenching" asociativo disminuiría.

De la **Figura 29** a la **Figura 33** se exponen las gráficas de Stern-Volmer obtenidas a cinco temperaturas diferentes (22, 27, 32, 37 y 42° C).

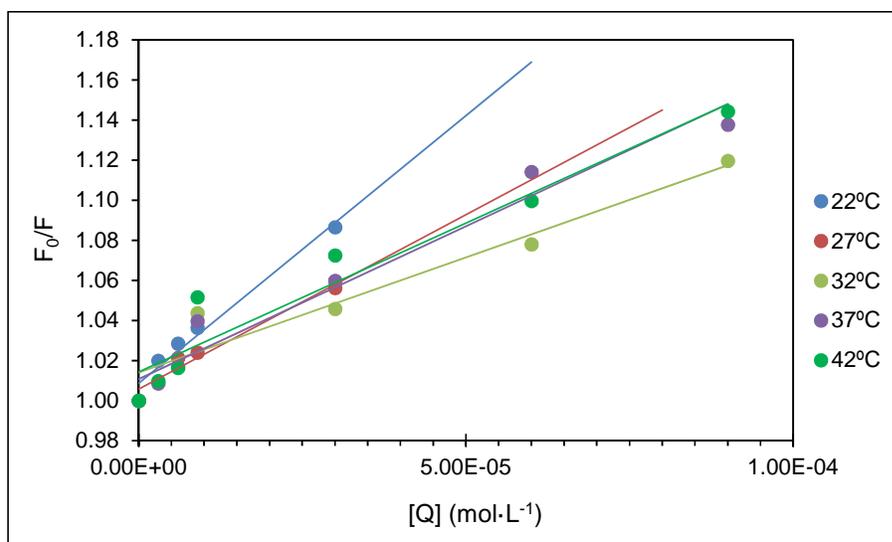


Figura 29 Gráfico Stern Volmer a diferentes temperaturas para el quenching de BSA con benzilpenicilina

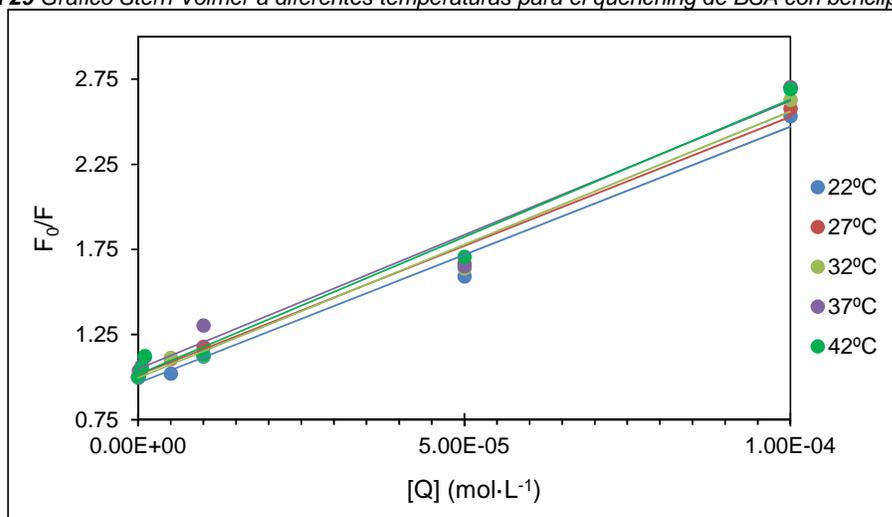


Figura 30 Gráfico Stern Volmer a diferentes temperaturas para el quenching de BSA con cloranfenicol

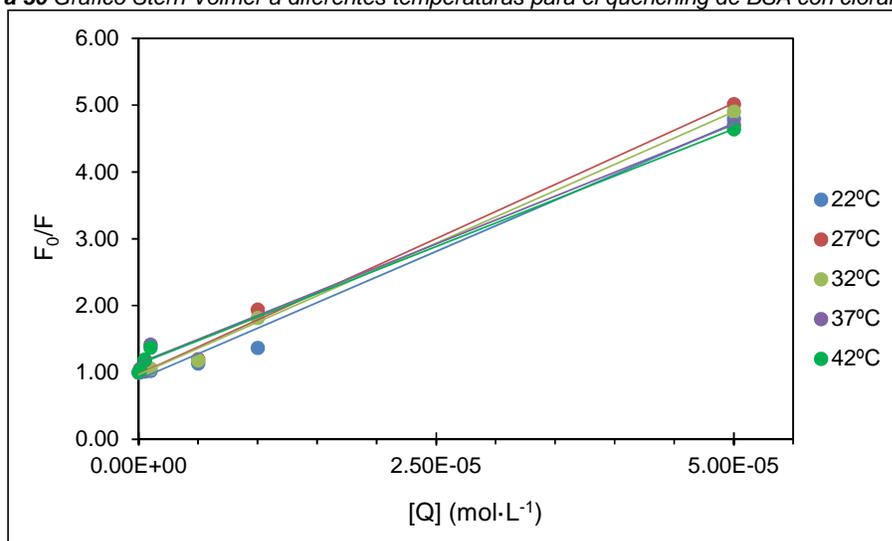


Figura 31 Gráfico Stern Volmer a diferentes temperaturas para el quenching de BSA con clortetraciclina

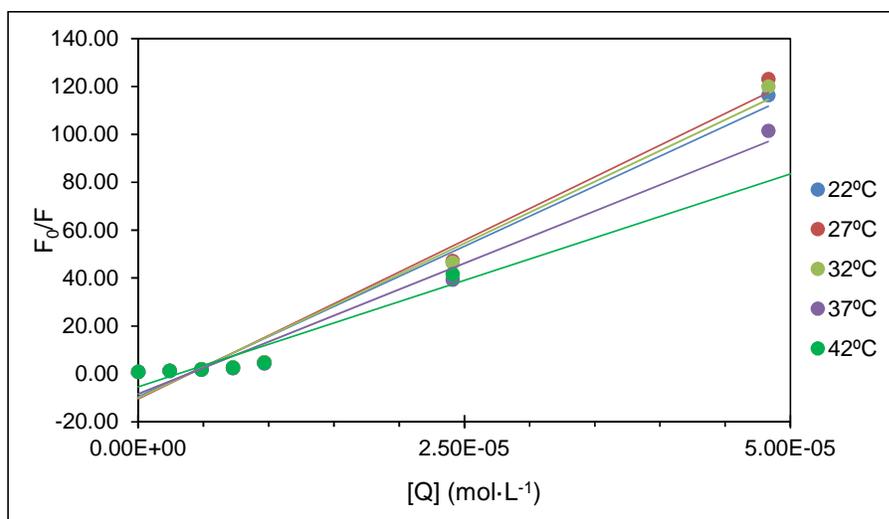


Figura 32 Gráfico Stern Volmer a diferentes temperaturas para el quenching de BSA con fotoenticine

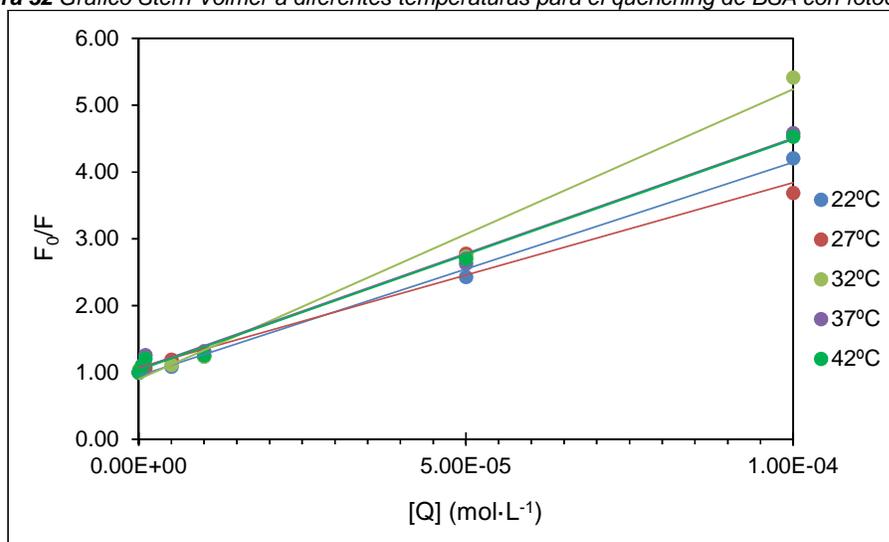


Figura 33 Gráfico Stern Volmer a diferentes temperaturas para el quenching de BSA con nafcilina

En todos los casos se observa una disminución de la constante de “quenching” con el aumento de la temperatura; esto confirma el mecanismo de “quenching” estático.

Otra manera de diferenciar un proceso de “quenching” dinámico y uno estático es analizar la dependencia de los tiempos de vida de fluorescencia con la concentración del desactivante.

Se puede deducir que para “quenching” dinámico el cociente de los tiempos de vida de fluorescencia en ausencia y presencia de quencher (τ_f^0 / τ_f) es igual al cociente de los correspondientes rendimientos cuánticos de fluorescencia (ϕ_f^0 / ϕ_f). Por lo tanto, puede escribirse la siguiente ecuación para describir la dependencia de los tiempos de vida de fluorescencia con la concentración de “quencher”:

$$\frac{\tau_f^0}{\tau_f} = 1 + K_q \tau_f^0 [Q]$$

En cambio, la fluorescencia observada en “quenching” estático proviene del fluoróforo “libre”, es decir, aquel que no forma parte del complejo no emisor. Esta fracción permanece inalterada, y su tiempo de vida de fluorescencia medido es igual al tiempo de vida en ausencia del quencher (τ_0). En definitiva, el cociente de tiempos de vida de fluorescencia (τ_0 / τ) no muestra dependencia con la concentración del quencher:

$$\frac{\tau_f^0}{\tau_f} = 1$$

Por consiguiente, midiendo el tiempo de vida τ_f a distintas concentraciones del quencher y luego realizando las gráficas de (τ_f^0 / τ_f) frente a $[Q]$ se puede diferenciar de manera sencilla entre un proceso de “quenching” de tipo dinámico y otro estático. Se obtienen curvas lineales con pendientes idénticas a las constantes K_{SV} encontradas en las gráficas de Stern-Volmer obtenidas de las medidas de intensidad de fluorescencia y una línea horizontal.

A partir de gráficos de curvas de decaimiento de la fluorescencia como el mostrado en la **Figura 34** es posible obtener los tiempos de vida. El tratamiento matemático necesario para obtener los tiempos de vida se realizó mediante el software FAST.

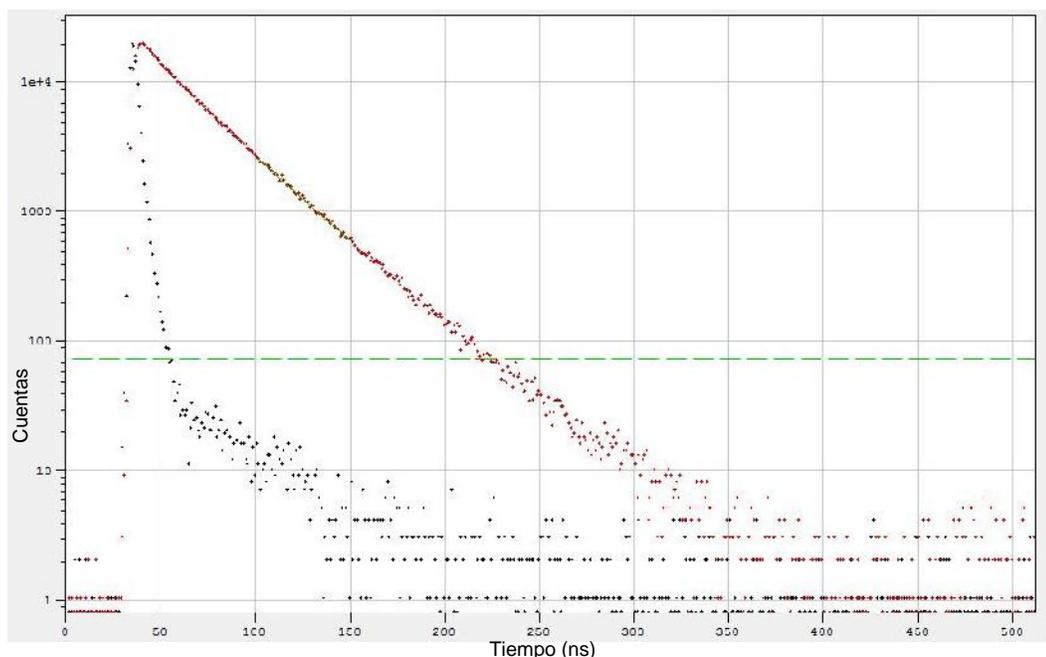


Figura 34 Curva de decaimiento de la fluorescencia de una disolución $10^{-5} M$

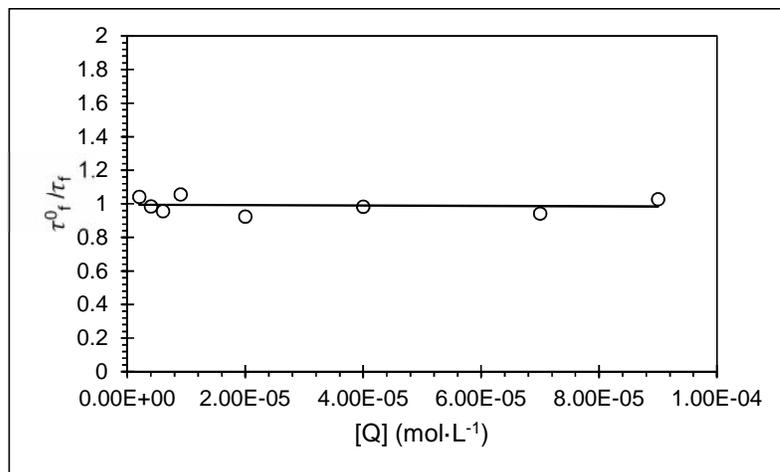


Figura 35 Gráfico de cociente de tiempos de vida frente a concentración de cefalexina

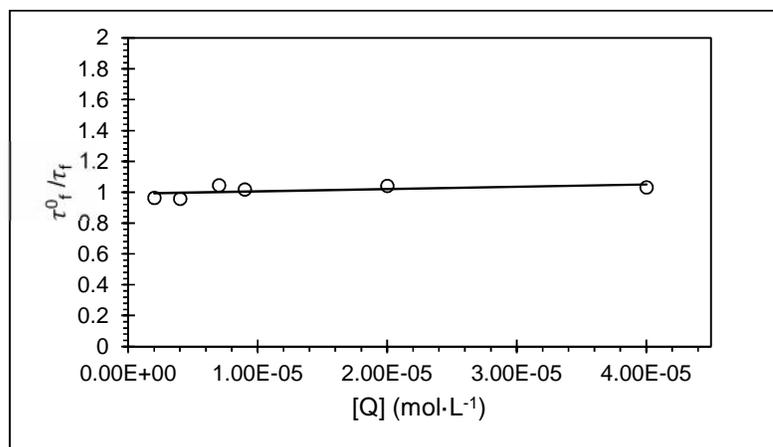


Figura 36 Gráfico de cociente de tiempos de vida frente a concentración de clortetraciclina

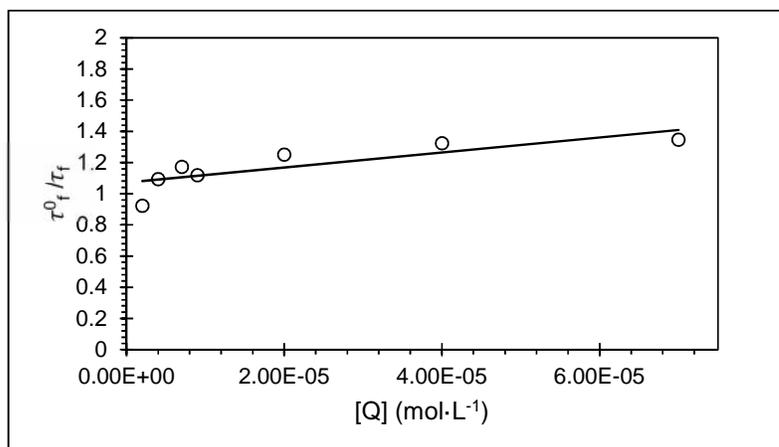


Figura 37 Gráfico de cociente de tiempos de vida frente a concentración de nafcilina

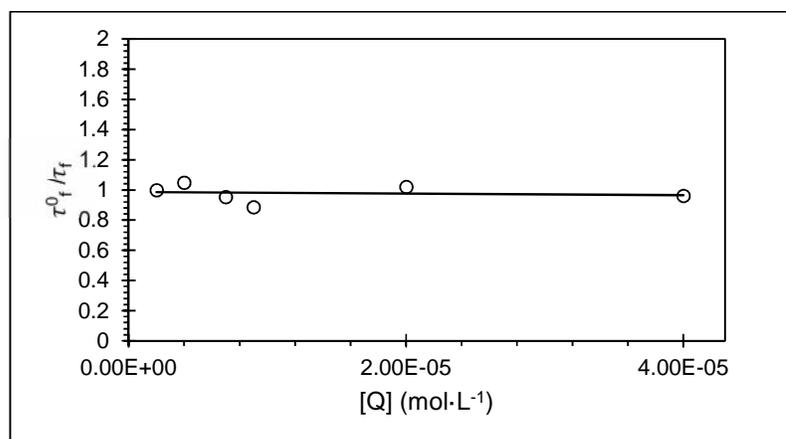


Figura 38 Gráfico de cociente de tiempos de vida frente a concentración de cloranfenicol

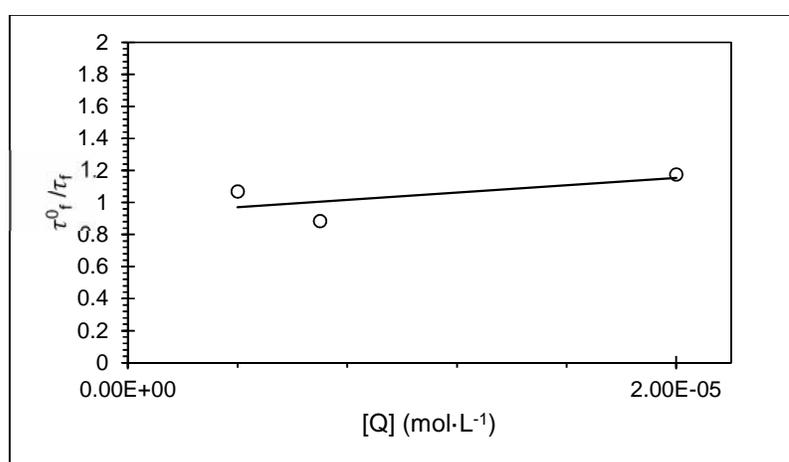


Figura 39 Gráfico de cociente de tiempos de vida frente a concentración de fotoenticine

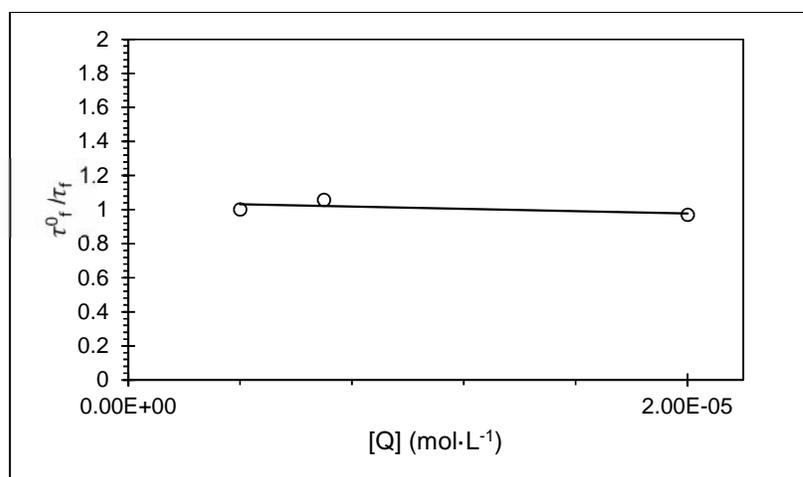


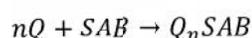
Figura 40 Gráfico de cociente de tiempos de vida frente a concentración de bencilpenicilina

Se observa una línea horizontal en todos los análisis realizados (ver **Figura 35** a **Figura 40**); por tanto, el mecanismo de "quenching" estático es el predominante, lo que vuelve a confirmar los resultados obtenidos con las anteriores metodologías.

3.3.3. Cálculo de la constante de unión entre la SAB y los antibióticos.

La ecuación modificada de Stern-Volmer relaciona la intensidad de "quenching" de fluorescencia y la concentración del desactivante de los mecanismos de "quenching" estático. [31-35]

Cuando existen n sitios de unión para desactivantes (Q) por proteína (SAB), la reacción de "quenching" se representa como:



la constante de unión para el enlace proteína-desactivante (K_b) está determinada por:

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

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

Siendo SAB_0 la cantidad inicial de biomoléculas, entonces,

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

la intensidad de fluorescencia es proporcional a la concentración de proteínas [36] como especifica la siguiente relación:

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

entonces,

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_b + n \log [Q]$$

en consecuencia, se pueden aplicar los datos de intensidad de fluorescencia para evaluar la constante de unión y el número de sitios de unión [37].

Los valores de K_b y n a diferentes temperaturas se calcularon a partir de la curva de regresión doble logarítmica. A continuación, se mostrarán los gráficos doble logarítmicos (**Figura 41** a **Figura 45**) del efecto que producen los antibióticos sobre la fluorescencia de SAB a diferentes temperaturas

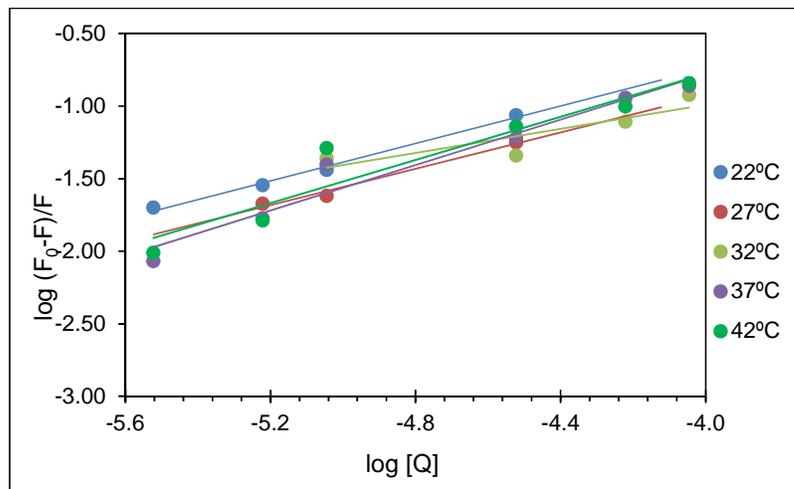


Figura 41 Gráfico doble logaritmo de Stern Volmer a diferentes temperaturas para el quenching de BSA con bencilpenicilina

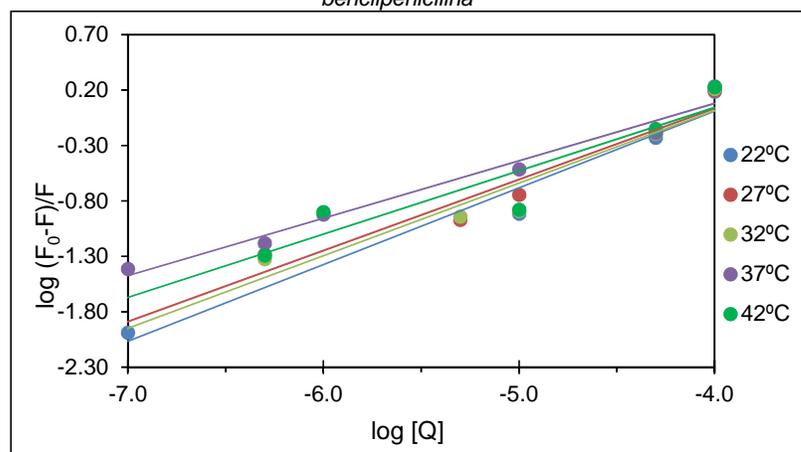


Figura 42 Gráfico doble logaritmo de Stern Volmer a diferentes temperaturas para el quenching de BSA con cloranfenicol

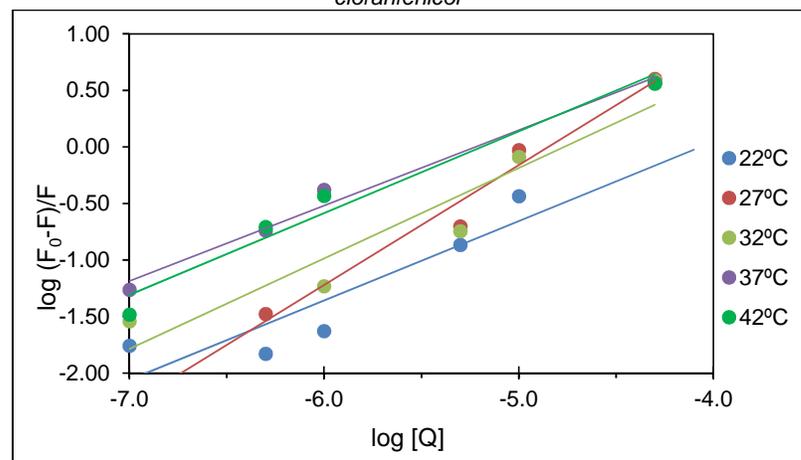


Figura 43 Gráfico doble logaritmo de Stern Volmer a diferentes temperaturas para el quenching de BSA con clortetraciclina

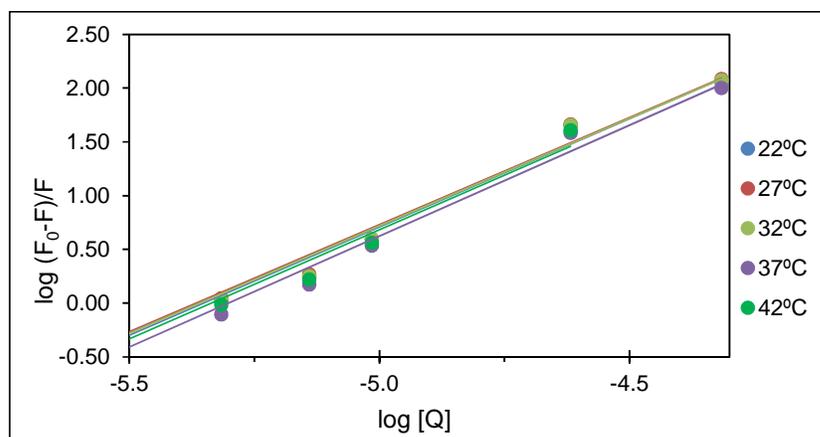


Figura 44 Gráfico doble logaritmo de Stern Volmer a diferentes temperaturas para el quenching de BSA con fotoenticine

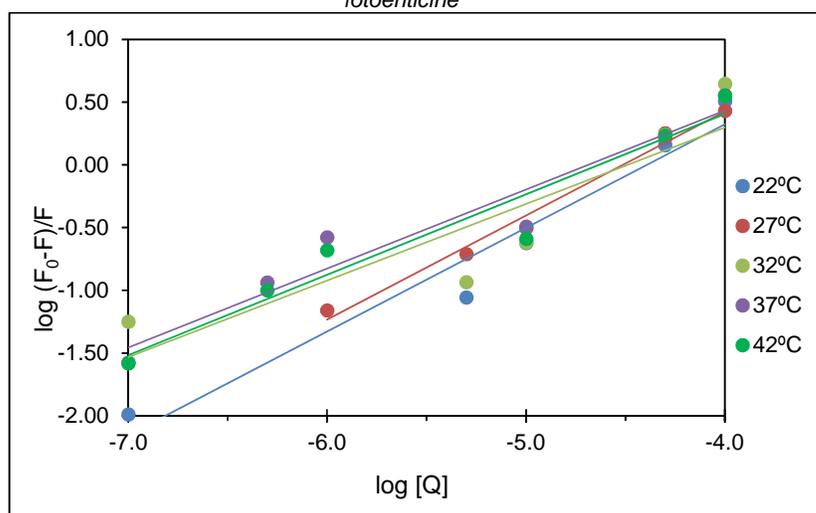


Figura 45 Gráfico doble logaritmo de Stern Volmer a diferentes temperaturas para el quenching de BSA con nafcilina

La fracción accesible al fluoróforo (*f*) puede determinarse mediante la siguiente ecuación [38]:

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a K_a [Q]} + \frac{1}{f_a}$$

F es la diferencia de la intensidad de fluorescencia en ausencia y presencia de desactivante presente a la concentración [*Q*], *f_a* es la fracción inicial de fluorescencia la cual es accesible al desactivante y *K_a* es la constante efectiva de “quenching” para los fluoróforos accesibles.

Cuando existen sitios en la proteína que están accesibles al desactivante y otros que no lo están se emplea esta ecuación. En este caso, la fluorescencia total de la proteína puede distribuirse en:

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

La intensidad de la fracción accesible disminuye en presencia del desactivante según la ecuación de Stern-Volmer,

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

donde K es la constante de "quenching" de Stern-Volmer de la fracción accesible.

Restando a la expresión para F la correspondiente a F_0 y reordenando se llega a la ecuación mencionada al comienzo.

La relación de F_0/F con el valor recíproco de la concentración del desactivante $[Q]^{-1}$ muestra una tendencia lineal.

En la **Tabla 4** se resumen los valores de K_b , n y f_a hallados de este modo a diferentes temperaturas:

Tabla 4 Constantes y sitios de unión a diferentes temperaturas para los sistemas antibióticos-SAB en fluorescencia

ANTIBIÓTICO	TEMPERATURA				
	22°C	27°C	32°C	37°C	42°C
Bencilpenicilina					
K_b (mol·L ⁻¹)	68.4	37.7	4.67	2.23x10 ²	1.58 x10 ²
n	0.64	0.63	0.42	0.78	0.74
f_a	0.09	0.08	0.09	0.86	0.50
Cloranfenicol					
K_b (mol·L ⁻¹)	5.95 x10 ²	3.92 x10 ²	4.33 x10 ²	1.42 x10 ²	2.10 x10 ²
n	0.69	0.64	0.66	0.52	0.57
f_a	0.32	0.29	0.26	0.25	0.42
Clortetraciclina					
K_b (mol·L ⁻¹)	7.24 x10 ²	1.39 x10 ⁵	6.56 x10 ³	3.08 x10 ³	5.75 x10 ³
n	0.70	1.06	0.80	0.67	0.72
f_a	0.04	2.00	0.21	1.13	-2.93
Fotoenticine					
K_b (mol·L ⁻¹)	5.97 x10 ¹⁰	4.87 x10 ¹⁰	5.36 x10 ¹⁰	8.71 x10 ¹⁰	6.78 x10 ¹⁰
n	2.01	1.99	2.00	2.06	2.03
f_a	-3.86	-4.68	-4.22	-2.63	-2.74
Nafcilina					
K_b (mol·L ⁻¹)	4.22E x10 ³	5.51 x10 ³	5.51 x10 ²	8.82 x10 ²	9.32 x10 ²
n	0.83	0.83	0.61	0.63	0.64
f_a	0.30	0.90	0.31	1.01	0.63

Los valores de n próximos a 1 sugieren la existencia de un único sitio de unión en SAB para los antibióticos en estudio, a excepción del fotoenticine que se obtiene un valor de 2 e infiere dos sitios de unión.

La relación entre la constante de unión y la temperatura para las interacciones de bencilpenicilina, cloranfenicol y nafcilina con la SAB disminuye con el incremento de la temperatura (en temperaturas por debajo de 37°C, lo que nos indica que puede existir degradación de la seroalbúmina a a partir de esa temperatura); sin embargo, para la interacción entre fotoenticine con SAB sucede lo contrario (la constante de unión aumenta con la elevación de la temperatura). De estos resultados se puede inferir que la interacción bencilpenicilina/ cloranfenicol/ clortetraciclina/ nafcilina-SAB ocurre de manera exotérmica y el proceso de interacción fotoenticine-SAB es endotérmico.

En el caso de los factores de accesibilidad, los valores negativos observados para los antibióticos clortetraciclina y fotoenticine indican que considerar que no todo el luminóforo está accesible al desactivante, no es una buena aproximación en el estudio de la desviación de los datos de la ecuación de Stern Volmer.

3.3.4. Determinación de los modos de unión.

En disolución acuosa entre una molécula pequeña (ligando) y una macromolécula (receptor) existe una fuerza de unión dependiente del tipo de interacción que suceda, que comprende la formación de puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals, fuerzas electrostáticas e interacciones hidrofóbicas [39].

Los modos de unión pueden determinarse mediante los parámetros termodinámicos, variación de entalpía (ΔH) y de entropía (ΔS), para la reacción de unión. Valores de $\Delta H > 0$ y $\Delta S > 0$ conllevan una interacción hidrofóbica; $\Delta H < 0$ y $\Delta S < 0$ indican la presencia de fuerzas de van der Waals o el establecimiento de enlaces por puentes de hidrógeno; y $\Delta H < 0$ con $\Delta S > 0$ propone la existencia de una fuerza electrostática [40].

Para ello se analizó la dependencia de la constante de unión con la temperatura. Se seleccionaron temperaturas diferentes para el estudio.

La ecuación de Van 't Hoff relaciona los parámetros termodinámicos del siguiente modo:

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

donde K es la constante de unión a la temperatura correspondiente y R es la constante universal de los gases. La variación de entalpía (ΔH) se obtiene representando $\ln K$ frente a $1/T$. El cambio en la energía libre (ΔG) puede calcularse mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T\Delta S$$

En la **Tabla 5** se muestran los valores obtenidos.

Tabla 5 Parámetros termodinámicos correspondientes a los sistemas antibiótico-SAB

Antibiótico	G ^{22°C} (kJ·mol ⁻¹)	G ^{27°C} (kJ·mol ⁻¹)	G ^{32°C} (kJ·mol ⁻¹)	G ^{37°C} (kJ·mol ⁻¹)	G ^{42°C} (kJ·mol ⁻¹)	H (kJ·mol ⁻¹)	S (J·K ⁻¹ ·mol ⁻¹)
Bencilpenicilina	-10.981	-7.774	-4.567	-1.360	1.847	-200.202	-0.641
Cloranfenicol	-15.998	-15.167	-14.335	-13.504	-12.673	-65.049	-0.166
Clortetraciclina	-33.074	-28.625	-24.177	-19.728	-15.279	-295.559	-0.890
Fotoentice	-59.455	-61.221	-62.987	-64.753	-66.518	44.731	0.353
Nafcilina	-20.535	-19.603	-18.670	-17.738	-16.805	-75.558	-0.187

Valores negativos de G indican espontaneidad en los procesos de unión. La formación de los complejos de bencilpenicilina/ cloranfenicol/ clortetraciclina/ nafcilina-SAB transcurren gracias a reacciones espontáneas y exotérmicas, acompañadas con valores negativos de S . Los enlaces de hidrógeno como las fuerzas de van der Waals tienen un papel crucial en el proceso de unión a SAB [41] tal y como señalan los valores negativos de H y S .

Existe una fuerte contribución del efecto hidrofóbico en la formación del complejo fotoentice-SAB debido a que tanto H como S son positivas.

3.4. Investigación conformacional.

El empleo de fluorescencia sincrónica es habitual en la obtención de información sobre los cambios en el microentorno molecular de los fluoróforos de las proteínas en presencia de una molécula desactivante.

Realizando barridos simultáneos, con una diferencia fija de longitudes de onda (λ), entre los monocromadores de excitación y emisión de un espectrofluorímetro se obtienen los espectros de fluorescencia sincrónica [42-44].

Los espectros de fluorescencia sincrónica de SAB revelan las diferencias en el microentorno molecular de las cercanías de sus cromóforos. Empleando $\lambda = 60$ nm se obtiene información característica del entorno de los residuos de triptófano y si se utiliza $\lambda = 15$ nm se puede indagar sobre el entorno de los residuos de tirosina presentes en la SAB [45].

En las **Figura 46** y **Figura 47** se muestran los espectros de fluorescencia sincrónica de SAB con diferentes concentraciones de los antibióticos en estudio y registrados con $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ y $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$.

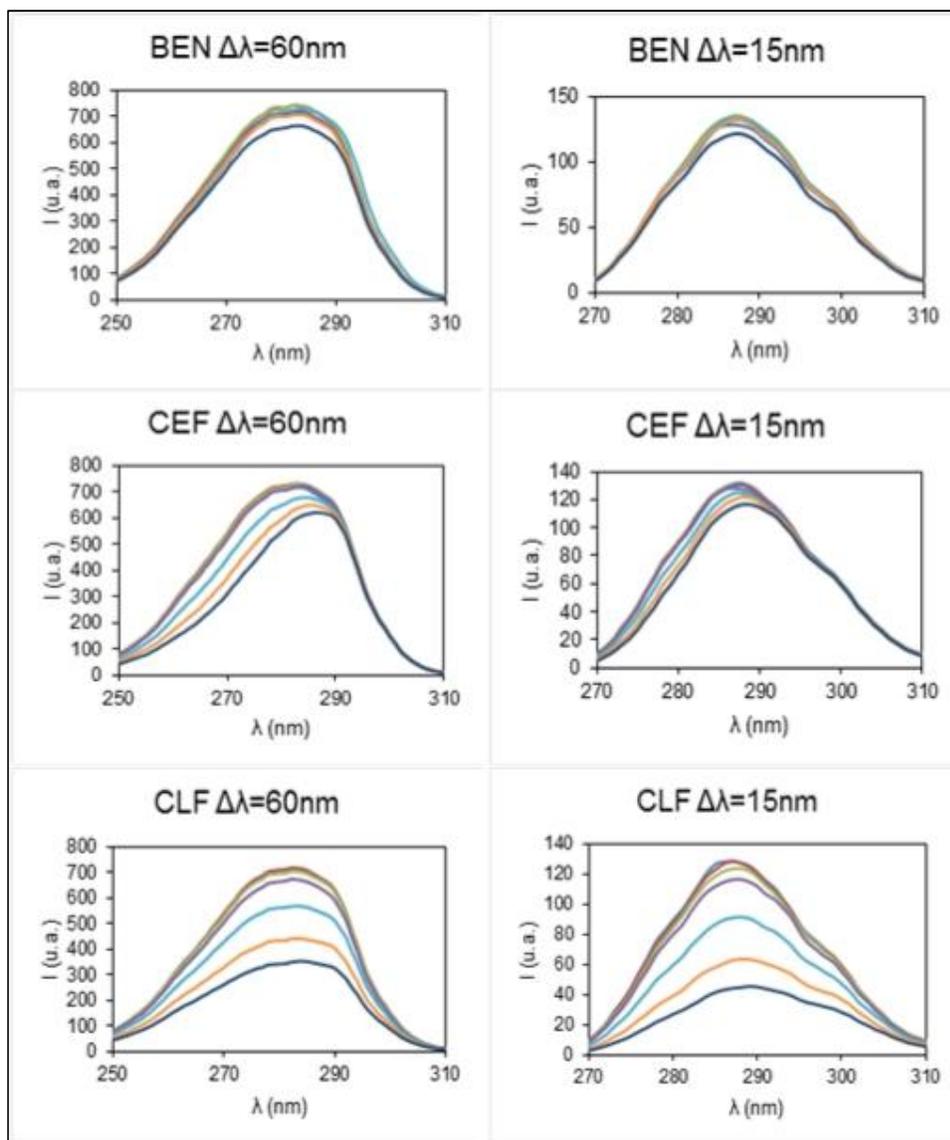


Figura 46 Espectros de fluorescencia sincrónica de la interacción entre SAB y bencilpenicilina, cefalexina y cloranfenicol

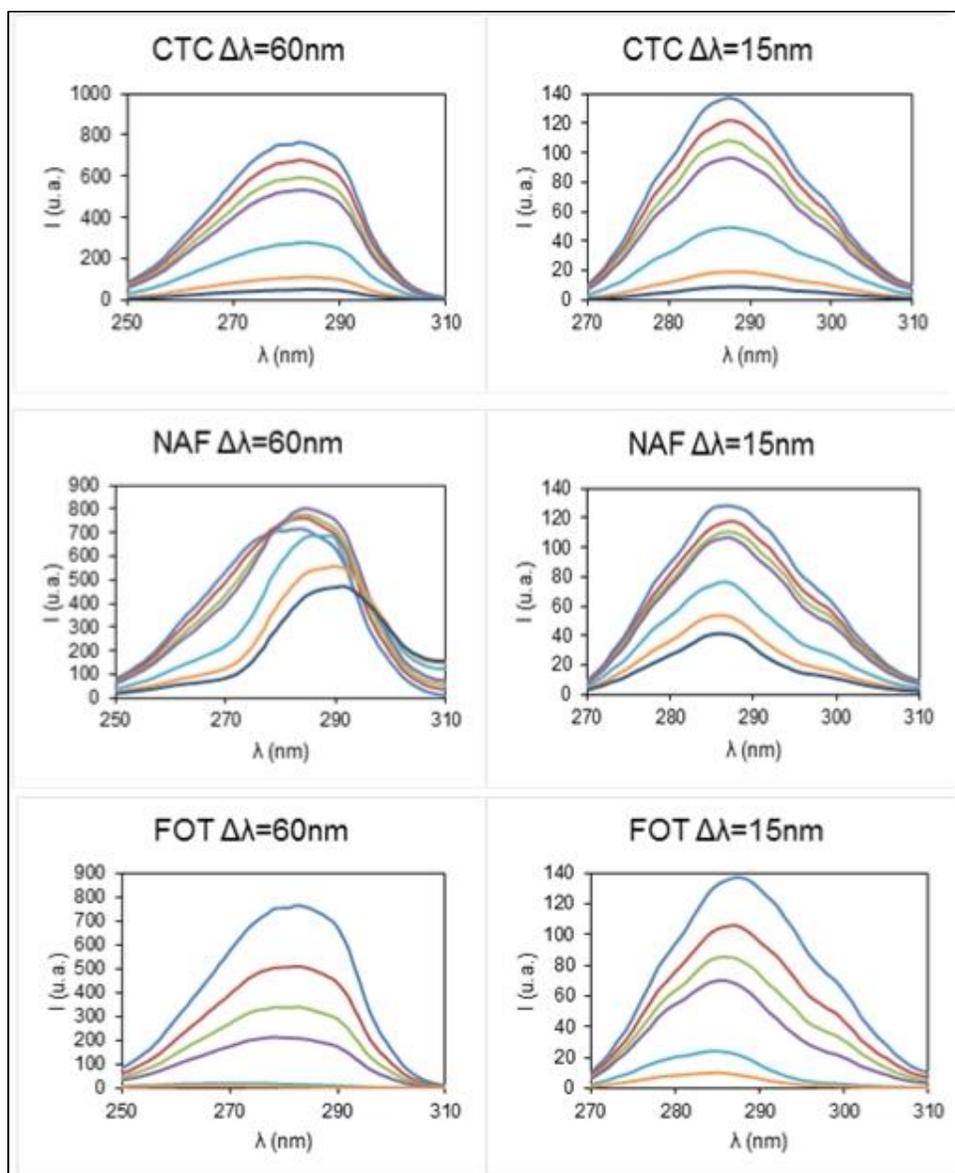


Figura 47 Espectros de fluorescencia sincrónica de la interacción entre SAB y clortetraciclina, nafcilina y fotoentincine.

Cuando $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$, la adición de los antibióticos conduce a un descenso significativo en la intensidad de la fluorescencia sincrónica excepto para la bencilpenicilina y la cefalexina, esta última junto con el cloranfenicol, la clortetraciclina y la nafcilina sufren además un desplazamiento del pico espectral. Dicho desplazamiento, hacia la zona del rojo, sugiere que aumenta la polaridad en el microentorno de los residuos de triptófano y, entonces, la hidrofobicidad decrece con los antibióticos.

Cuando $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$, los picos de emisión no muestran un desplazamiento significativo en el rango de concentración estudiado; esto indica que los antibióticos generan un efecto casi nulo

sobre el microentorno de los residuos de tirosina siendo el fotoentice la excepción, ya que sufre un desplazamiento de su emisión hacia el azul, lo que indica desestabilización de la albúmina.

3.5. Estudio del "quenching" de la fosforescencia de la SAB

Además del estudio de los fenómenos de desactivación de la fluorescencia resulta interesante analizar los procesos que suceden en escalas de tiempo mayores de los posibles con la fluorescencia. La fosforescencia es más sensible al entorno y su observación permite obtener información adicional a la de la fluorescencia. Tanto la escala de tiempos como el hecho de que el espectro tienda al rojo permite discriminar frente a otras fuentes de fluorescencia que se pueden encontrar en los sistemas biológicos complejos.

Se sigue un tratamiento análogo al realizado con los experimentos de fluorescencia obteniéndose los resultados expuestos a continuación:

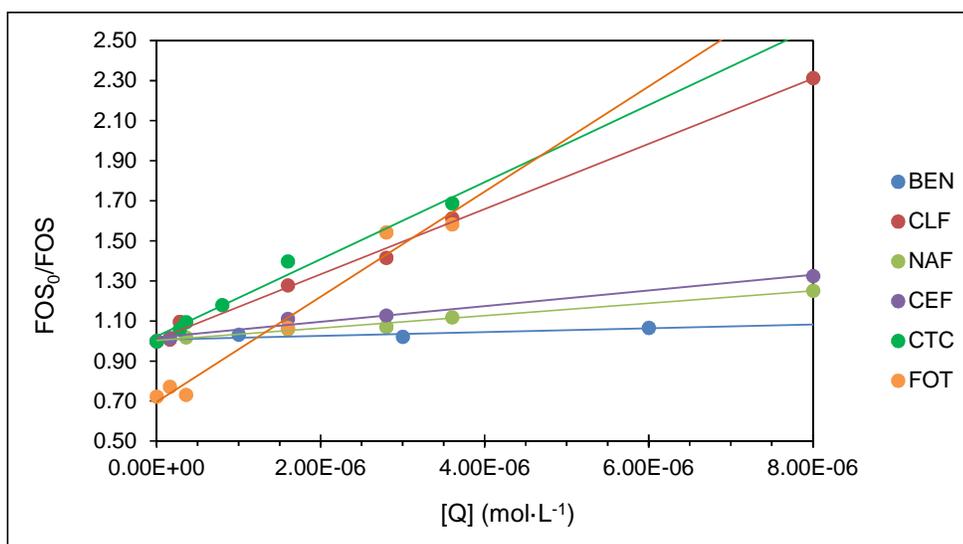


Figura 48 Gráfico de Stern Volmer para el quenching de fosforescencia de la interacción antibiótico-SAB

Tabla 6 Constantes de "quenching" de fosforescencia para la interacción de antibióticos con SAB

Antibiótico	BEN	CLF	NAF	CEF	CTC	FOT
$K_{SV} (L \cdot mol^{-1}) \times 10^4$	1.0±0.3	16.3±0.5	3.1±0.2	3.9±0.3	19.3±1.3	26.3±2.3
$K_q (L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1})$	9.46x10 ¹¹	1.63 x10 ¹³	3.09 x10 ¹²	3.92 x10 ¹²	1.93 x10 ¹²	2.63 x10 ¹³
r^2	0.8053	0.9958	0.9897	0.9797	0.9823	0.9708

Tabla 7 Constantes y sitios de unión para los sistemas fosforescentes antibióticos-SAB

Antibiótico	BEN	CLF	NAF	CEF	CTC	FOT
K_b (mol·L ⁻¹)	3.49	7.40 x10 ⁵	3.53 x10 ³	2.31 x10 ³	1.06 x10 ⁵	1.05 x10 ⁷
n	0.36	1.12	0.83	0.76	0.95	1.28
f_a	0.04	-0.11	0.23	0.31	-7.68	0.09

Tal como sucedió para los estudios por fluorescencia, los valores negativos observados para los antibióticos clortetraciclina y fotoenticine indican nuevamente que considerar que no todo el luminóforo está accesible al desactivante no es una buena aproximación en el estudio de la desviación de los datos de la ecuación de Stern Volmer.

4. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones derivadas del trabajo presentado en esta memoria podrían resumirse en tres grandes apartados:

- Se determinó que el mecanismo de “quenching” de la fluorescencia de seroalbúmina bovina debido a la presencia de los antibióticos es consistente con el modelo estático y que las reacciones de unión son espontáneas y en su mayoría exotérmicas.
- Se investigó el tipo de interacción encontrándose que tanto los enlaces de hidrógeno como las fuerzas de van der Waals tienen un papel crucial en la interacción antibiótico-SAB.
- Se obtuvieron las constantes de unión y las fuerzas de enlace para cada sistema antibiótico-SAB. A través de los espectros de fluorescencia sincrónica se verificó que la estructura secundaria de la seroalbúmina se ve afectada en mayor o menor medida como consecuencia de la presencia de antibióticos.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, *Principios de Análisis instrumental*, 5ª ed., McGrawHill
- [2] J. Lakowicz., 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer Publisher
- [3] J. Oravcova, B. Bohs, W. Lindner, *Journal of Chromatography B*, 677 (1996) 1-28
- [4] I.M. Klotz, *Ann. NY Acad. Sci.*, 226 (1973) 18.
- [5] G.M. Pacifici and A. Viani, *Clin. Pharmacokin.*, 23 (1992) 449
- [6] F. Herve, S. Urien, E. Albengres, J.-C. Duche and J.-P. Tillement, *Clin. Pharmacokin.*, 26 (1994) 44
- [7] S. Soares, N. Mateus, V. De Freitas, *J. Agri.Food Chem.* 55 (2007) 6726–6735.
- [8] Y.Q. Wang, H.M. Zhang, G.C. Zhang, W.H. Tao, Z.H. Fei., Z.T. Liu, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 43 (2007) 1869–1875
- [9] P.B. Kandagal, S. Ashoka, J. Seetharamappa, S.M.T. Shaikh, Y. Jadegoud, O.B. Ijare, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41 (2006) 393–399
- [10] B. Sebillé, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 4 (1990) 151.
- [11] P.R. Callis, *J. Mol. Struct.* (2014),
- [12] A. Fleming. *Brit J Exp Pathol.* 1929;10:226–36.
- [13] C.T. Walsh, T.A. Wencewicz, *The Journal of Antibiotics* (2014) 67, 7-22
- [14] L. Martínez-Martínez L., *Enf Infecc Microbiol Clin.* 2008;26:481–4.
- [15] J. Calvo, L. Martínez-Martínez, *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27(1):44–52
- [16] J. O. Errecalde, *Uso de antimicrobianos en animales de consumo: incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública*, FAO, Roma 2004
- [17] S. Naveenraj, S. Anandan, *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 14 (2013) 53– 71
- [18] V.T.G. Chuang, M. Otagiri, *Chirality* 18 (2006) 159
- [19] A.A. Bhattacharya, S. Curry, N.P. Franks, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 38731
- [20] D.C. Carter, J.X. Ho, *Adv. Protein Chem.* 45 (1994) 153–203
- [21] L.T. Lemiesz, B.K. Keppler, H. Kozłowski, *J. Inorg. Biochem.* 73 (1999) 123
- [22] M. Maciazek-Jurczyk, A. Sułkowska, B. Bojko, J. Rownicka, W.W. Sułkowski, *J. Mol. Struct.* 924–926 (2009) 378
- [23] S. Ercelen, A.S. Klymchenko, Y. Mely, A.P. Demchenko, *Int. J. Biol. Macromol.* 35 (2005) 231
- [24] A. Belatik, S. Hotchandani, R. Carpentier, H. A. Tajmir-Riahi, *PLoS ONE* 7(5): e36723, (2012).
- [25] V.T.G. Chuang, M. Otagiri, *Chirality* 18 (2006) 159
- [26] C. Dufour, O. Dangles, *Biochim. Biophys. Acta* 1721 (2005) 164.
- [27] M.E. Diaz-Garcia, A. Sanz-Medel, *Anal. Chem.* 58 (1986) 1436–1440.
- [28] A. Kowalska-Baron, K. Gale., S. Wysocki, *Spectrochim. Acta. A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 111 (2013) 42–48
- [29] Cao, H. W. D. W. H. & X. M., *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, (2009) 73(5), pp. 972-975

- [30] J. Lackowicz, G. Weber, *Biochemistry*, (1973), 12(21), pp. 4161-4170.
- [31] C. Dufour, O. Dangles, *Biochim Biophys Acta* (2005) 1721: 164–173
- [32] E. Froehlich, J.C. Jennings, M. R. Sedaghat-Herati, H.A. Tajmir-Riahi. *J Phys Chem B* (2009) 11: 69866993
- [33] W. He, Y. Li, C. Xue, Z. Hu, X. Chen et al. *Bioorg Med Chem* (2005). 13:1837–1845
- [34] M. Jiang, M. X. Xie, D. Zheng, Y. Liu, X.Y. Li et al. *J Mol Struct* (2004) 692: 71–80
- [35] A. Belatik, S. Hotchandani, J. Bariyanga, H.A. Tajmir-Riahi. *Europ J Med Chem* (2012) 48: 114–123
- [36] M. Yang, M. X. Q. & X. X. L. *Chinese Journal of Chemistry* (2006), 24(5), pp. 642-648
- [37] R. G. Machicote, M. E. Pacheco, L. Bruzzone. *Spectrochimica Acta Part A* 77 (2010) 466–472
- [38] V. Anbazhagan, R. Renganathan, *J. Lumin.* 128 (2008) 1454
- [39] D.A. Leckband, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29 (2000) 1
- [40] P.D. Ross, S. Subramanian, *Biochemistry* 20 (1981) 3096.
- [41] S.N. Timasheff, *Thermodynamic of protein interactions* en: H. Peeters (Ed.), *Proteins of Biological Fluids*, Pergamon Press, Oxford, 1972
- [42] F. Cui, Y. Yan, Q. Zhang, X. Yao, G. Qu, Y. Lu, *Spectrochim. Acta A* 74 (2009) 964 [43]
- [43] J. Xiao, X. Wei, Y. Wang, C. Liu, *Spectrochim. Acta A* 74 (2009) 977.
- [44] X. Pan, R. Liu, P. Qin, L. Wang, X. Zhao, *J. Lumin.* 130 (2010) 611
- [45] N. Wang, L. Ye, F. Yan, R. Xu, *Int. J. Pharm.* 351 (2008) 55