



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



Universidad Nacional de Tucumán

Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia



Interacción y fotorreactividad de antibióticos con macromoléculas biológicas y ambientales

Lic. Hugo Alejandro Pérez

Tesis para optar al grado académico superior de

Doctor en Ciencias Químicas



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



HONORABLE CONSEJO DIRECTIVO

Dra. Patricia Eugenia Álvarez

Dra. María Inés Gómez

Bioq. Farm. Ana María del Valle González

Dra. María Eugenia Mónaco

Dra. Carolina Serra Barcellona

Dra. María José Rodríguez Vaquero

Farm. Verónica Pastoriza

Sr. Walter Ricardo Gómez

Sr. Francisco Andrés Díaz

Srta. Ivana Micaela Núñez

Sr. Gonzalo Andrés Lascano

DECANA

Dra. Silvia Nelina González

VICE-DECANO

Dr. Edgardo Hugo Cutin

SECRETARIA DE ASUNTOS ACADEMICOS

Dra. Marta Elena Cecilia

JEFA DEL DEPARTAMENTO POSGRADO

Lic. Marta Quinteros



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



DEPARTAMENTO DE POSGRADO

AUTORIDADES:

DIRECTOR:

Dr. Sergio Enrique Pasteris

CONSEJO TITULAR:

Dra. Inés del Carmen Ramos

Dra. María Carolina Navarro

Dra. Maria Cristina Gaudioso

Dra. Paula Andrea Vincent

Dra. Maria Cristina Rubio

Suplentes

Dra. Maria Graciela Benzal

Dra. Clara del Valle Silvia de Ruiz

Dra. María Inés Nieva Moreno

REPRESENTANTE DE POSGRADO

ANTE LA SECRETARÍA DE POSGRADO DE LA UNT

Dra. Paula Andrea Vincent



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO
ACADÉMICO SUPERIOR DE DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

DOCTORADO EN CIENCIAS QUIMICAS

Acreditado y Categorizado acreditada A - Resolución CONEAU N° 708-13

Directora:

Dra. Aída Ben Altabef

Vice Directora

Dra. Florencia Fagalde

Comité Académico:

Dra. Florencia Fagalde

Dra. Carola Schuff

Dra. Margarita Villeco



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE BIOQUIMICA QUIMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



TRABAJO DE POSGRADO TITULADO:

**Interacción y fotorreactividad de antibióticos con macromoléculas
biológicas y ambientales.**

TESISTA:

Lic. Hugo Alejandro Pérez

DIRECTOR:

Dr. Faustino Eduardo Morán Vieyra

DIRECTOR ASOCIADO

Dr. Néstor Eduardo Katz

COMISION DE SUPERVISION:

Dra. Florencia Fagalde

Dr. Claudio Darío Borsarelli



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMAN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA QUÍMICA Y FARMACIA
Ayacucho 471 - T. E. 0054 381 4107215 - FAX 0054 381 4248169
T4000CAN – San Miguel de Tucumán – República Argentina



El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Cinética y Fotoquímica (LACIFO) del Instituto de Bionanotecnología del NOA (INBIONATEC) dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y de la Universidad Nacional de Santiago del Estero (UNSE), bajo la dirección del Dr. Faustino Eduardo Morán Vieyra y la dirección asociada del Dr. Néstor Eduardo Katz.

De acuerdo al Programa de Posgrado en Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Tucumán (UNT), acreditado y categorizado A-Doctorado, según Resolución N°: 115/03, ante la Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU), se presenta este trabajo de tesis doctoral a consideración de las autoridades de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia (FBQF) de la Universidad Nacional de Tucumán para optar al título académico superior de Doctor en Ciencias Químicas.

San Miguel de Tucumán, 14 de Septiembre de 2016.

A mi familia por estar siempre a mi lado

A mi esposa y mis hijos

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas aquellas personas que de alguna manera han colaborado con el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Especialmente,

A mis padres Hugo y María, por ser el ejemplo más importante de mi vida y creer incondicionalmente en mí. Por su confianza y apoyo, así como por inculcarme sus principios y esforzarse en mi educación y bienestar, y estar siempre a mi lado. Por enseñarme que en la vida siempre hay que saber de todo y lo más importante, que la grandeza de un hombre no se mide por sus grados ni reconocimientos, si no por lo que entrega a los demás. Porque todo lo que soy se lo debo a ellos.

A mis hermanas Sandra y Andrea por su amor, paciencia, peleas y alegrías que compartimos en la casa. A mi cuñado Claudio, por cuidar de mi hermana y ser una excelente persona. A mis sobrinas Fátima, Candelaria y Ailen que con sus presencias alegraron mi vida.

A mi esposa Magui, mi amiga, mi compañera, my Rosa. Por su amor, paciencia y comprensión. Por apoyarme siempre en los momentos más difíciles y por haber hecho todo lo posible para que este proyecto llegase a su fin. Por todo lo que nos queda por vivir.

A mis hijos Alejandro y Sebastián, por el cariño que me entregaron desde aquel primer día en que los tuve en mis brazos. Por regalarme sus sonrisas y sus llantos, por permitirme aprender y formarme en esta nueva etapa de ser padre. Por transformar mi mundo en un segundo al escuchar decirme “PAPÁ” y lo más importante...por ser mis pilares.

Al Dr. Eduardo Morán, que con su dedicación y empeño ha contribuido a mi formación científica, dirigiéndome en esta tesis. Por apoyarme, comprenderme y alentarme en este camino.

Al Dr. Néstor E. Katz, por aceptar ser co-director y su apoyo en esta tesis.

Al Lic. Rodrigo y al Dr. Ricardo, mis amigos y hermanos que la ciencia me brindo. Por todo los momentos vividos dentro y fuera de los laboratorios.

A la Dra. Ana Ledesma, por su apoyo para el cálculo y análisis de espectros ATR-FTIR.

A mis compañeras y amigas de laboratorio, Pilar, Mariana, Ana y Valentina por esos alegres momentos al trabajar juntos. Y especialmente al grupo “CHITO”.

A mis demás compañeros de laboratorios, Lorena por haber confiado en mí desde el inicio de mi formación científica, Juan Manuel, Valeria, Pauli, Inés, Javier, Marcelo, Fernanda y Vero.

A todos mis amigos que la ciencia sin querer puso en mi camino. Por ayudarme y brindarme su amistad por sus palabras de aliento y por los buenos momentos compartidos.

A los miembros de la Comisión de Seguimiento: Dr. Claudio D. Borsarelli, por recibirme en su laboratorio y brindarme la posibilidad de realizar este trabajo, y especialmente a la Dra. Florencia Fagalde, por toda la ayuda administrativa. A todos los integrantes, gracias por el tiempo dedicado en el seguimiento de este trabajo de tesis.

A todo el personal del área de posgrado de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán.

A la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Santiago del Estero por la formación académica brindada.

Al CONICET, por el otorgamiento de la beca que me permitió dedicarme en forma exclusiva a este trabajo de tesis.

A todos, GRACIAS

Resumen

En este trabajo de tesis se estudiaron propiedades espectroscópicas, fotofísicas y fotoquímicas de antibióticos de amplio espectro como lo son las Fluoroquinolonas (FQs). Así como su interacción con macromoléculas biológicas y ambientales tanto en soluciones homogéneas como micelas inversas de AOT, principalmente mediante el uso de técnicas espectroscópicas UV-visible y de fluorescencia, tanto de régimen estacionario como dinámico.

Esta tesis comienza con una sección de Introducción general de los antibióticos FQs (**Cap. 1**). Luego se presentan los resultados experimentales organizados en tres secciones.

En la primera parte se focalizó el estudio fotofísico de las Fluoroquinolonas con la proteína Lisozima (Lyz) en solución homogénea (**Cap. 2**). Los resultados indicaron que las FQs forman un complejo en el estado fundamental con Lyz, sin involucrar los estados excitados tanto singulete como triplete de los antibióticos. Además que la fuerza y naturaleza de la interacción depende del pH del medio.

Por otro lado, el estudio fotoquímico de las FQs (**Cap. 3-5**) determinó que se fotodegradan mediante dos vías: Desfluorinación y Degradación del anillo piperazina y que el complejo formado, FQs-Lyz, disminuye el rendimiento cuántico de fotodegradación de los antibióticos (Φ_{FC}). Dicho efecto protector no produce foto-oxidación de los Trp situados en la proteína, y no afecta la estructura secundaria ni la actividad lítica de la enzima. Además, se determinó que ciprofloxacina (Cpx) fotolizada disminuye su actividad antibiótica, siendo mayor el efecto en bacterias Gram positivas. La presencia de Lyz no tiene ningún efecto, ya sea antagonico ni sinérgico sobre la actividad de la Cpx.

En la segunda parte se enfocó el estudio fotofísico y fotoquímico de las FQs con Lyz en Micelas Inversas de AOT, para mimetizar un sistema confinado. Los resultados indicaron que las FQs son estabilizadas y ubicadas en el interior acuoso de la micela, donde sienten un medio ácido ($pH \approx 5,4$). Además se observó que las Tyr presentes en Lyz contribuyen en el espectro de fluorescencia, indicando cambios conformacionales de la proteína cuando se incorpora en micelas inversas (**Cap. 6**). Por otro lado, se determinó que no existe interacción entre las FQs y Lyz cuando se encuentran en soluciones micelares. Se demostró además, que la fotoquímica de las FQs en micelas inversas proviene del estado excitado triplete de los antibióticos y que la proteína interacciona con el triplete de Cpx, disminuyendo su fotoconsumo en $W16$ (**Cap. 7**).

Por último (**Cap. 8**), se abordó el estudio fotofísico y fotoquímico de las FQs con el Ácido Húmico (AH). Los resultados indicaron que las FQs forman complejos con AH en el estado

fundamental. La interacción FQs-AH no involucra el estado excitado singulete del AH. Se demostró también que el estado triplete del AH tiene un efecto fotosensibilizador sobre la degradación de Cpx cuando son irradiados a 360 nm; y que este efecto depende de la concentración del AH, alcanzando su máxima capacidad en 10 mg/l.

Abreviaturas y símbolos

FQs	Fluoroquinolonas
Cpx	Ciprofloxacina
Nor	Norfloxacina
Lev	Levofloxacina
Cpx-Lyz	Complejo Ciprofloxacina-Lisozima
Lyz	Lisozima
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
mo	Solución bacteriana de micrococos luteus
MOS	Materia orgánica del suelo
MOD	Materia orgánica disuelta
SH	Sustancias Húmicas
AH	Ácidos Húmicos
AHA	Ácido Húmico Aldrich
Tris	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
AOT	1,4-bis (2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio
M	Concentración molar
μM	Concentración en micromolar
s	Segundos
μs	microsegundos
ns	nanosegundos
nm	Nanómetros
Abs	Absorbancia
$\varepsilon_{\text{máx}}$	Coeficiente de extinción molar
$\lambda_{\text{máx}}$	Longitud de onda máxima
λ_{ex}	Longitud de onda de excitación
Φ_{F}	Rendimiento cuántico de fluorescencia

Φ_{FC}	Rendimiento cuántico de fotoconsumo
Φ_{Δ}	Rendimiento cuántico de producción de oxígeno singulete
$\Phi_{O_2^{\bullet-}}$	Rendimiento cuántico de producción de radical anión superóxido
Φ_{CES}	Rendimiento cuántico de cruce entre sistemas
ATMM	Ancho total a la mitad del máximo
MEE	Matrices de excitación-emisión
τ	Tiempo de vida estado excitado singulete
τ^T	Tiempo de vida del estado excitado triplete
f	Contribución fraccional
K_{SV}	Constante de Stern-Volmer
K_S	Constante de asociación
k_q	Constante de velocidad bimolecular de desactivación de estados excitados singulete
k_q^T	Constante de velocidad bimolecular de desactivación de estados excitados triplete
k_{obs}	Constante cinética observada
k_{C_F}	Constante cinética de desfluorinación
k_{NH2}	Constante cinética de ruptura del anillo piperazina
1O_2	Oxígeno molecular singulete
$O_2^{\bullet-}$	Radical anión superóxido
DAS	Espectros Asociados a los Decaimientos
ATR-FTIR	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier con accesorio de reflectancia total Atenuada.
W	Relación molar agua/surfactante

Contenido

1	Introducción	9
1.1	Generalidades sobre las quinolonas y fluoroquinolonas	9
1.2	Clasificación de Fluoroquinolonas (FQs)	10
1.3	Relación estructura-actividad	12
1.4	Mecanismo de acción de las Quinolonas	13
1.5	Propiedades ácido-base en las fluoroquinolonas	14
1.6	Propiedades fotosensibilizadoras de las fluoroquinolonas	14
1.7	Fenómenos de fototoxicidad y fotoalergia	15
1.8	Interacción fármaco-proteína	16
1.9	Contaminación ambiental de Fluoroquinolonas	16
1.10	Alcances y Objetivos	17
2	Interacción de Fluoroquinolonas con la Proteína Lisozima	21
2.1	Estructura de Fluoroquinolonas	21
2.2	Aspectos experimentales	22
2.2.1	Materiales	22
2.2.2	Métodos	23
2.3	Efecto del buffer Tris en las propiedades fotofísicas de las FQs	24
2.3.1	Espectros de absorción UV	24
2.3.2	Espectros de emisión de fluorescencia	25
2.3.3	Fluorescencia resuelta en el tiempo	26
2.3.4	Estado Triplete en solución acuosa	27
2.4	Interacción de las fluoroquinolonas con la proteína Lisozima	30
2.4.1	Propiedades fotofísicas de la proteína Lisozima	30
2.4.2	Efecto del pH en los espectros de absorción y emisión de FQs	32
2.4.3	Interacción entre FQs y Lyz, espectros de absorbancia	34
2.4.4	Interacción entre FQs y Lyz, espectros de fluorescencia	35

2.4.5	Interacción entre FQs y Lyz, fluorescencia resuelta en el tiempo	37
2.4.6	Parámetros termodinámicos	38
2.4.7	Modelado Docking	40
2.4.8	Interacción entre el estado excitado triplete de FQs y Lyz, LFP	42
2.4.9	Interacción entre el estado excitado triplete de FQs y $^3\text{O}_2$	45
2.4.10	Determinación del rendimiento cuántico de formación de $^1\text{O}_2$, (Φ_Δ)	47
2.4.11	Determinación del rendimiento cuántico de formación de $\text{O}_2^{\cdot-}$	49
2.5	Conclusiones Parciales	50

3 Propiedades fotoquímicas de Fluoroquinolonas con la Proteína

Lisozima	53
3.1 Aspectos experimentales.....	53
3.1.1 Materiales.....	53
3.1.2 Métodos	53
3.2 Fotodegradación de Fluoroquinolonas	54
3.2.1 Fotólisis estacionaria.....	54
3.2.2 Cinética de fotoconsumo	57
3.3 Productos de Fotodegradación	59
3.3.1 Efecto de ácido ascórbico en el fotoconsumo de Cpx	59
3.3.2 Determinación de las vías de fotodegradación.	60
3.3.3 Estudios mediante fluorescencia	61
3.3.4 Espectros Asociados a los Decaimientos (DAS) en soluciones fotolizadas de FQs	62
3.3.5 DAS de soluciones fotolizadas de FQs-Lyz	65
3.3.6 Estudio mediante ATR-FTIR	65
3.3.7 Estudio mediante ATR-FTIR, Cpx-Lyz	72
3.4 Conclusiones parciales	75

4 Efecto fotosensibilizador de Ciprofloxacina sobre Lisozima.....

4.1 Aspectos experimentales.....	80
4.1.1 Materiales.....	80

4.1.2	Métodos	80
4.2	Espectros Asociados a los Decaimientos (DAS)	81
4.3	Estudio mediante ATR-FTIR	84
4.3.1	Estructuras secundarias	84
4.3.2	Análisis de Bandas mediante IR	86
4.3.3	Estructura secundaria de Lisozima	87
4.4	Conclusiones parciales	89
5	Actividad antibacteriana de Fluoroquinolonas y Actividad lítica de Lisozima	93
5.1	Aspectos experimentales	95
5.1.1	Materiales	95
5.1.2	Métodos	95
5.2	Ensayo cualitativo de la actividad antibacteriana de Cpx	95
5.3	Actividad lítica de Lyz	97
5.3.1	Ensayo de la actividad de lisozima	98
5.4	Conclusiones parciales	100
6	Propiedades fotofísicas de FQs y Lyz en Micelas Inversas de AOT	103
6.1	Micelas	103
6.1.1	Micelas inversas	104
6.2	Aspectos experimentales	106
6.2.1	Materiales	106
6.2.2	Métodos	106
6.3	Propiedades fotofísicas de Fluoroquinolonas en Micelas Inversas	107
6.3.1	Espectros de absorbancia UV	107
6.3.2	Espectros de emisión de fluorescencia	108
6.3.3	Fluorescencia resuelta en el tiempo	112
6.4	Propiedades fotofísicas de Lisozima en Micelas Inversas	114
6.4.1	Espectros de absorbancia UV	114

6.4.2	Espectros de emisión de fluorescencia	115
6.4.3	Fluorescencia resuelta en el tiempo	116
6.5	Conclusiones parciales	119
7	Estudio fotofísico y fotoquímico de la interacción entre FQs y Lyz en micelas inversas de AOT	123
7.1	Aspectos experimentales.....	123
7.1.1	Materiales.....	123
7.1.2	Métodos	123
7.2	Interacción entre FQs y Lyz en micelas inversas de W 16	124
7.2.1	Espectros de absorbancia.....	124
7.2.2	Espectros de fluorescencia	124
7.2.3	Interacción entre FQs y Lyz, fluorescencia resuelta en el tiempo	126
7.3	Interacción entre FQs y Lyz en micelas inversas de W 25	127
7.4	Fotoestabilidad de FQs en presencia de Lyz en micelas inversas de W 16	128
7.4.1	Fotodegradación de Fluoroquinolonas. Espectroscopía de Absorción.....	128
7.4.2	Cinética de fotoconsumo	129
7.4.3	Fotodegradación de Fluoroquinolonas en función de oxígeno.....	131
7.4.4	Fotodegradación de Fluoroquinolonas. Espectroscopía de Fluorescencia.....	132
7.4.5	Fotodegradación de Fluoroquinolonas. Fluorescencia resuelta en el tiempo...	133
7.4.6	Fotodegradación de Fluoroquinolonas con Lyz.....	135
7.4.7	Fotodegradación de FQs en Argón en función de la concentración de Lyz	137
7.5	Estudio fotoquímico de la interacción entre FQs y Lyz en micelas inversas de W 25	138
7.6	Conclusiones parciales	141
8	Interacción de Fluoroquinolonas con Ácidos Húmicos.....	145
8.1	Materia orgánica del suelo, Sustancias Húmicas y Ácidos Húmicos	145
8.1.1	Estructura y propiedades de las sustancias húmicas	146
8.1.2	Transformación de xenobióticos (Fluoroquinolonas) en aguas superficiales ...	149
8.2	Aspectos experimentales.....	151

8.2.1	Materiales	151
8.2.2	Métodos	151
8.3	Propiedades Fotofísicas de Ácidos Húmicos	152
8.3.1	Espectros de absorción UV	152
8.3.2	Espectros de fluorescencia	152
8.4	Efecto de las FQs en la propiedades fotofísicas AHA	154
8.4.1	Interacción entre AHA y FQs, espectros de absorbancia.....	154
8.4.2	Interacción entre AHA y FQs, espectros de fluorescencia.....	155
8.4.3	Matrices Excitación-Emisión de AHA en presencia de FQs.....	158
8.4.4	Interacción entre AHA y FQs, fluorescencia resuelta en el tiempo	159
8.5	Propiedades fotosensibilizadoras del Ácido Húmico sobre las FQs	161
8.5.1	Fotólisis estacionaria	161
8.5.2	Efecto de la concentración de O ₂	163
8.5.3	Efecto de la concentración de Ácido Húmico	164
8.5.4	Mecanismo de fotointeracción entre AHA y FQs.....	165
8.6	Conclusiones parciales.....	165
9	Conclusiones	169
10	Detalles experimentales.....	173
10.1	Materiales.....	173
10.1.1	Reactivos de uso general.....	173
10.1.2	Reactivos específicos	173
10.2	Métodos e instrumentos.....	173
10.2.1	Preparación de soluciones.....	173
10.2.2	Espectroscopia UV-Visible.....	174
10.2.3	Espectroscopia de fluorescencia estacionaria	175
10.2.4	Espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo.....	176
10.2.5	Experimentos de Láser Flash Fotólisis	178
10.2.6	Espectros infrarrojos con transformada de Fourier	179
10.3	Cálculos teóricos	181

10.3.1	Docking molecular.....	181
10.3.2	AutoDock	182
10.3.3	Archivos de entrada para cálculos docking	183
10.3.4	Optimización de la estructura del ligando usando Gaussian 09	183
11	Publicaciones	187
11.1	Trabajos en preparación	187
11.2	Trabajos Presentados a Congresos	187
12	Referencias	191

Capítulo 1

Introducción: Antibióticos

Fluoroquinolonas

1 Introducción

La quimioterapia antimicrobiana comenzó en los años treinta con las sulfonamidas y durante el siglo veinte, se produjeron grandes cambios, tanto en los tipos de infecciones observados como en la susceptibilidad y resistencia de los gérmenes a los antimicrobianos. Esto significó no sólo una búsqueda de fármacos que fuesen más efectivos, sino una mayor preocupación por perfeccionar métodos, técnicas y procedimientos que hicieran más eficiente la terapéutica antimicrobiana. Entre los nuevos fármacos descubiertos, las quinolonas, y más tarde las fluoroquinolonas (FQs), enriquecieron y fortalecieron la terapia antimicrobiana. Sin duda alguna, las fluoroquinolonas, con un mecanismo de acción único, un amplio espectro de actividad y con una menor posibilidad de desarrollo de resistencia, han resultado de gran utilidad¹. La evolución observada durante el transcurso del siglo veinte, permitió a los antimicrobianos salvar millones de vidas, reduciendo la morbilidad y la mortalidad de enfermedades que, previo a su aparición, se pensaba que eran incurables².

Sin embargo, cabe señalar que los antimicrobianos no sólo son utilizados para tratar infecciones en el hombre, sino que también son empleados en animales, en la agricultura, en la acuicultura y en el sector forestal³⁻⁶. Otra área de aplicación es en la ingeniería genética, donde se utilizan como marcadores genéticos^{5,7}, además han sido herramientas esenciales en la dilucidación de las funciones celulares en la que ellos intervienen y algunos antibióticos también son de gran beneficio en la quimioterapia del cáncer^{8,9}.

La quimioterapia antimicrobiana, es definida como un procedimiento terapéutico que consiste en el tratamiento de las infecciones producidas por bacterias mediante fármacos denominados antibióticos. Son producidos por microorganismos (hongos, actinomicetos, bacterias) y, en consecuencia, son de origen natural. También se utilizan sustancias químicas producidas en el laboratorio mediante síntesis orgánica y se denominan agentes quimioterápicos^{8,9}. En rigor, los términos antimicrobiano y antibacteriano, como el de antibiótico y quimioterápico, son diferentes desde el punto de vista académico. Sin embargo en la presente tesis, los términos antibacteriano, antimicrobiano, antibiótico y quimioterápico, serán utilizados como sinónimos.

1.1 Generalidades sobre las quinolonas y fluoroquinolonas

Las quinolonas, también llamadas 4-quinolonas o ácidos carboxílicos quinolónicos, comprenden un amplio grupo de agentes antimicrobianos sintéticos. El primer fármaco de esta clase, el ácido nalidíxico, fue sintetizado en 1962 mediante una modificación de un compuesto aislado durante la producción del antimalárico cloroquina. Su espectro antibacteriano está limitado a Enterobacteriaceae, y debido a limitaciones en su absorción y distribución, este

fármaco es efectivo solamente en el tratamiento de infecciones del tracto urinario, ya que se elimina por vía renal alcanzando altas concentraciones en orina.

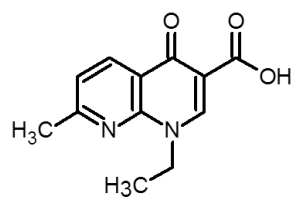
Las primeras cuatro quinolonas, derivadas del Ácido nalidíxico y con estructuras similares, fueron el Ácido pipemídico (piridopirimidina), el Ácido oxolínico, la Flumequina (fluoroquinolona) y el Cinoxacino (cinolona), y como su predecesor se emplearon para el tratamiento de las infecciones urinarias por Gram negativos¹⁰. En 1980, la adición de una molécula de flúor en posición 6 y de un anillo de piperazina en posición 7 de la estructura quinolónica básica, incrementó su capacidad de absorción y distribución en tejidos y actividad antibacteriana quinolónica, ganando efectividad contra organismos como *Pseudomonas aeruginosa* y cocos Gram positivos^{11,12}. Surgen así las fluoroquinolonas, derivadas de naftiridinas o de quinolinas. Desde entonces el número de moléculas sintetizadas llega a 10.000, derivadas de cualquiera de las estructuras básicas que conforman el grupo de las quinolonas. Muchas de ellas se han empleado con éxito y seguridad para el tratamiento de infecciones tanto urinarias como sistémicas, pero otras han mostrado efectos secundarios graves que han obligado a su desuso¹³.

En razón de esta variabilidad química, es posible definir las quinolonas como antimicrobianos formados por un anillo heteroaromático biciclístico que combina el núcleo β piridona, ácido carboxílico y un anillo aromático que puede ser naftiridina, quinolina, cinolina o piridopirimidina¹³.

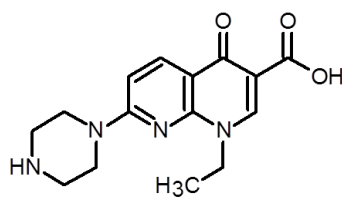
1.2 Clasificación de Fluoroquinolonas (FQs)

En forma general, las quinolonas pueden clasificarse en tres generaciones:

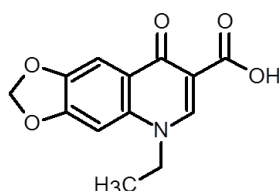
Primera generación: comprende los compuestos quinolónicos originales como el ácido nalidíxico, ácido oxolínico, ácido pipemídico y cinoxacino. Estas moléculas se caracterizan por una pobre biodisponibilidad oral, una limitada distribución en tejidos y un limitado espectro de acción, restringido a *Escherichia coli* y algunos organismos Gram negativos.



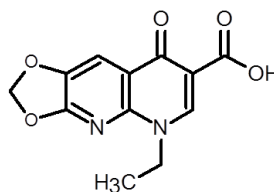
Acido Nalidixico



Acido Pipemídico



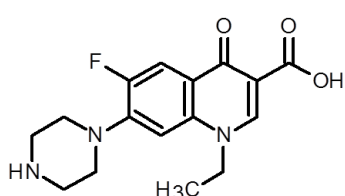
Acido Oxolínico



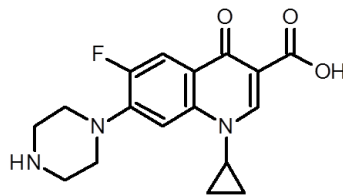
Cinoxacino

Figura 1.1 Quinolonas de 1^o generación.

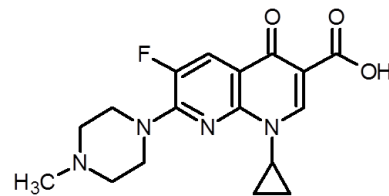
Segunda generación: la primera de las fluoroquinolonas, fue desarrollada en 1980. Estas moléculas mostraron un incremento de la actividad antibacteriana contra Enterobacteriaceae y gérmenes Gram negativos (como *P. aeruginosa*) y algo de actividad contra cocos Gram positivos. Los cambios estructurales asociados a esta segunda generación incrementaron también su biodisponibilidad oral y distribución sistémica. Dentro de esta categoría encontramos quinolonas como norfloxacin, ciprofloxacina, enrofloxacin, danofloxacina y marbofloxacina.



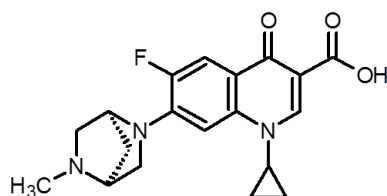
Norfloxacin



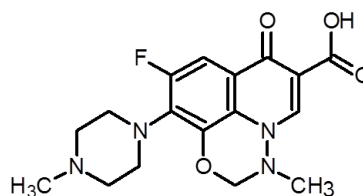
Ciprofloxacina



Enrofloxacin



Danofloxacina



Marbofloxacina

Figura 1.2 Quinolonas de 2^o generación.

Tercera generación: esta generación mantiene las características favorables de la segunda generación, mientras muestran un aumento de actividad contra bacterias Gram positivas, anaerobios y micobacterias. Estos fármacos también poseen una excelente biodisponibilidad oral y una prolongada persistencia en el tiempo. La tercera generación tiene menor toxicidad sobre el sistema nervioso central y menor interacción con el sistema del citocromo P450^{11,12}. Aquí se incluyen: difloxacin, orbifloxacin, levofloxacin, esparfloxacin, moxifloxacin, grepafloxacin y gatifloxacin, entre otros.

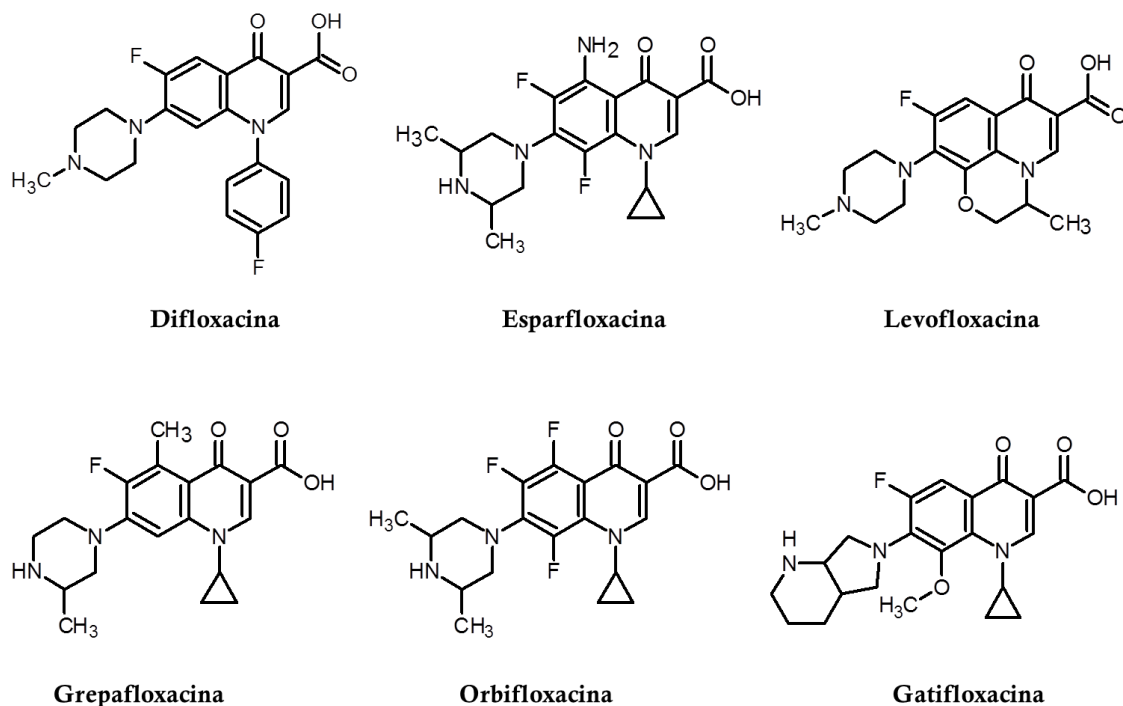


Figura 1.3 Quinolonas de 3^o generación.

1.3 Relación estructura-actividad

Desde el descubrimiento de los efectos terapéuticos del ácido nalidíxico, se iniciaron modificaciones estructurales en el núcleo y en los sustituyentes de las quinolonas, con el fin de mejorar su potencia y espectro antibacteriano y reducir los efectos adversos. Desde esa fecha, han sido sintetizados varios de estos compuestos. Diversos estudios han mostrado que hay varios componentes en el núcleo de las quinolonas que, cuando son manipulados, pueden incrementar su actividad antibacteriana. El núcleo incluye un grupo etilo en posición N-1, un grupo carboxílico en C-3, un átomo de oxígeno en C-4 y un átomo de flúor en C-6. De todos ellos, la adición del átomo de flúor en posición 6 fue el cambio que amplió substancialmente el espectro de acción de las quinolonas¹⁴. Esta modificación también aumentó la biodisponibilidad oral y la penetración en tejidos de dichas moléculas. Como resultado de este descubrimiento, hoy todas las 4-quinolonas comercializadas para uso clínico están

halogenadas en posición 6. Algunas también están halogenadas en posición 8. La diferencia estructural entre las FQs depende de los sustituyentes en las posiciones 1, 5, 7 y 8 respectivamente (**Figura 1.4**)

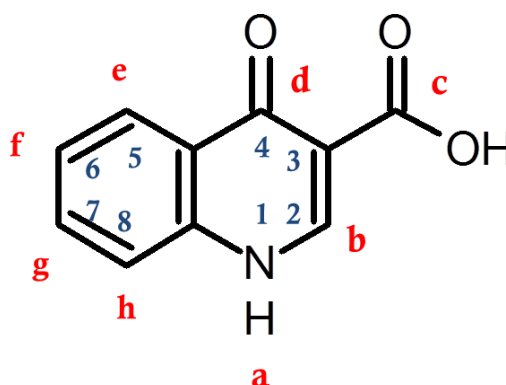


Figura 1.4 Relación entre la estructura y las propiedades farmacológicas¹⁵.

- a)** Influencia la potencia y la farmacocinética¹⁶⁻¹⁸.
- b)** Lugar que no altera las propiedades de la FQs^{16,19,20}.
- c) y d)** Esencial para la unión de las girasas y el transporte a través de la membrana^{17,21}.
- e)** Aumenta la actividad contra los microorganismos gram (+) y gram (-)^{22,23}.
- f)** Enlace C-F; controla la girasa y la potencia antibacteriana¹⁶.
- g)** Ejerce influencia sobre el espectro de acción, la potencia y la farmacocinética^{16,18}.
- h)** Controla la farmacocinética^{19,22}.

1.4 Mecanismo de acción de las Quinolonas

Las quinolonas son los únicos antibacterianos conocidos cuyas moléculas blanco son las topoisomerasas bacterianas II (ADN-girasa) y IV. Estas enzimas mantienen el ADN en un estado adecuado de enrollamiento en las regiones cromosómicas con o sin actividad de replicación. De esta manera, las fluoroquinolonas inhiben la actividad de la ADN-girasa impidiendo la reparación del ADN y la recuperación de su forma superenrollada con lo que aumenta su volumen y detiene la multiplicación celular.

1.5 Propiedades ácido-base en las fluoroquinolonas

El hecho que en las fluoroquinolonas existan equilibrios ácido-base es debido a sus grupos amino y a los ácidos carboxílicos lo cual hace muy complejo su estudio. A través de numerosas técnicas como potenciometría, espectrofluorimetría, espectroscopía ultravioleta (UV) y resonancia magnética nuclear (RMN) se ha mostrado que el grupo carboxilato y la posición (4') del anillo piperazina son los lugares de protonación más significativos²⁴⁻²⁶.

La presencia del grupo carboxílico determina que las fluoroquinolonas tengan un carácter ácido, mientras que la introducción de un grupo amino como el piperazilo, incorpora carácter básico.

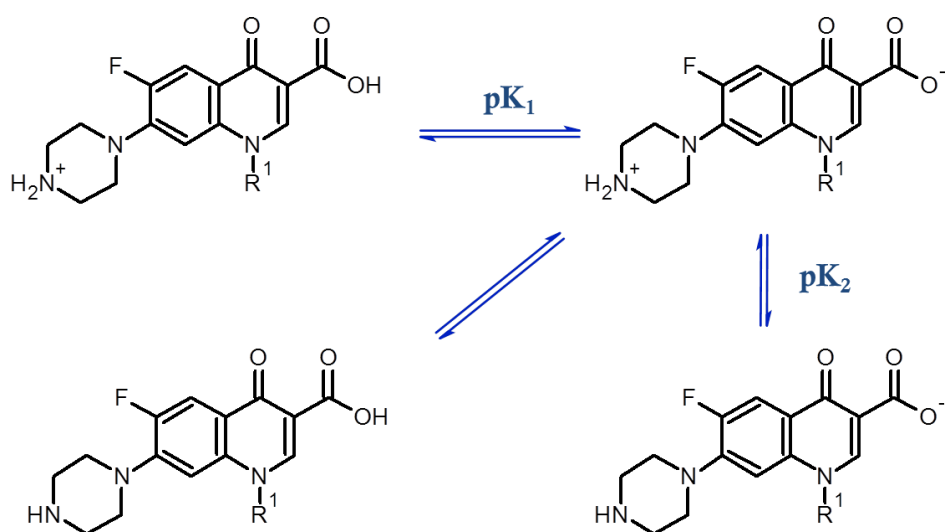


Figura 1.5 Equilibrio ácido-base de fluoroquinolonas en función del pH^{24} .

Como consecuencia, en solución acuosa y en términos ácido-base las quinolonas de primera generación sólo pueden ser neutras o aniónicas mientras que las fluoroquinolonas con grupos amino como el anillo piperazilo presentan especies catiónica, zwitteriónica, aniónica y neutra (Figura 1.5).

1.6 Propiedades fotosensibilizadoras de las fluoroquinolonas

El sol es una central termonuclear que produce una gran radiación electromagnética, aunque sólo llegan a la superficie de la tierra longitudes de onda comprendidas entre los 290 y 5000 nm, gracias a que la capa de ozono estratosférica detiene las radiaciones más peligrosas (UV-C). La energía radiante está constituida por un 56% de rayos infrarrojos (800 nm - 5000 nm), 39% de luz visible (400 nm - 800 nm) y 5% de radiación ultravioleta o UV (290 nm - 400 nm). Estos últimos divididos en:

- UVA (320-400 nm) que constituyen el 98% de los rayos UV, atraviesan el vidrio y penetran hasta la epidermis, pero su energía decrece en función de la longitud de onda. Existe una UVA larga o UVA I (340-400 nm) y una corta o UVA II (320-340 nm).
- UVB (290-320 nm), que representan el 2% de los rayos UV, tienen una energía altísima y son detenidos por el vidrio y la epidermis.
- UVC (100-280 nm) que es absorbida por la capa de ozono y no alcanza a la tierra. De gran energía y capacidad destructiva. Se emplea artificialmente para esterilización²⁷.

Las proteínas y los ácidos nucleicos pueden absorber directamente la radiación UVB que se la considera más perjudicial. Sin embargo, la UVA puede inducir cambios fotoquímicos cuando existe un segundo tipo de moléculas llamadas fotosensibilizadores que tras absorber luz, son capaces de modificar biomoléculas. En este sentido, las fluoroquinolonas son capaces de absorber radiación UVA y parte de la porción visible generando estados excitados, los cuales pueden reaccionar con oxígeno molecular o biomoléculas como las proteínas, generando especies reactivas de oxígeno (ERO, ej. O_2^{\bullet} , H_2O_2 , HO^{\bullet} , 1O_2) y/o iones radicales o radicales libres de residuos de aminoácidos (ej. radicales tirosilo Tyr^{\bullet} y triptonilo Trp^{\bullet}) que inducen reacciones secundarias no-fotoquímica sobre las biomoléculas induciendo estrés oxidativo molecular y/o celular²⁸⁻³⁰.

Por lo tanto, la exposición de un paciente a la luz solar en el curso de un tratamiento con alguna quinolona puede producir una reacción de fototoxicidad que se presentará en forma de eritema o de erupción más o menos grave. Se ha observado que las FQs más fototóxicas son las 6,8-dihalogenadas como Lomefloxacin (Lfx) y Fleroxacin (Flx). Estudios *in vivo* e *in vitro* han puesto de manifiesto que estas moléculas además de ser fototóxicas son fotocarcinogénicas^{31,32}.

1.7 Fenómenos de fototoxicidad y fotoalergia

Las fluoroquinolonas presentan una variedad de efectos secundarios que incluyen la fototoxicidad, las alteraciones dermatológicas y las tendinopatías^{33,34}. La fotosensibilidad a agentes exógenos es una reacción cutánea anormal, resultado de la combinación de una sustancia química, generalmente un metabolito de un fármaco administrado tópicamente, oral o parenteralmente y la exposición a radiaciones lumínicas. Estas radiaciones pueden ser naturales por el sol o artificiales por lámparas especialmente diseñadas para tal fin.

En la actualidad existen varios reportes referidos al desarrollo de fotoalergias que involucran un intermediario formado durante la reacción fotoquímica entre las drogas veterinarias y proteínas³⁵⁻³⁹. Estas alteraciones surgen como consecuencia de la absorción directa de la radiación solar por parte de moléculas y macromoléculas celulares (ejemplo,

riboflavina, proteínas, DNA, porfirinas, etc), y también por xenobióticos, como medicamentos, colorantes textiles, cosméticos, óxidos metálicos, etc. Las consecuencias de la transformación fotoquímica de drogas no sólo reside en la pérdida de su actividad antibiótica⁴⁰, sino que también los fotoproductos formados pueden inducir reacciones secundarias “oscuras” que produzcan efectos no deseados.

1.8 Interacción fármaco-proteína

El conocimiento de las interacciones fármaco/proteína es fundamental para comprender la biodistribución, el metabolismo, la eliminación y el efecto farmacológico de los fármacos en el organismo.

Generalmente, las interacciones más significativas que tienen lugar entre un sustrato y los aminoácidos del centro activo de la proteína son de naturaleza iónica, por enlaces de hidrógeno o tipo Van der Waals.

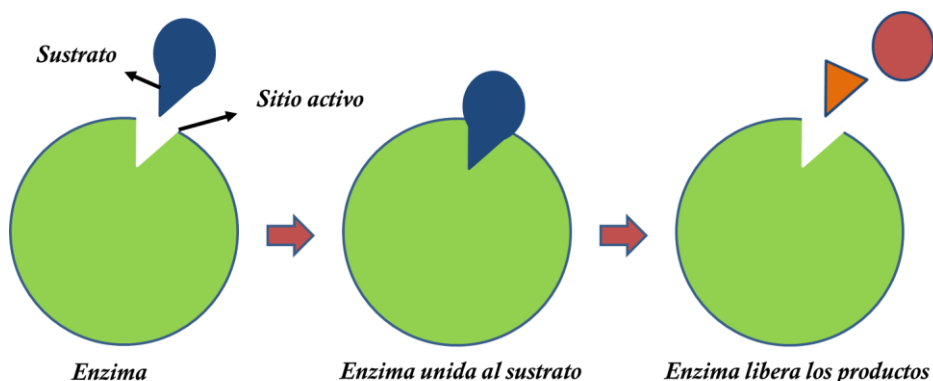


Figura 1.6 Esquema de la unión enzima-sustrato.

Las proteínas pueden interaccionar con una gran variedad de sustratos, como iones metálicos, vitaminas, ácidos grasos, fármacos, etc. Aquellas que son susceptibles de interaccionar con fármacos forman parte de las denominadas dianas farmacológicas o blancos farmacológicos. Entre ellas se encuentran algunas enzimas y las proteínas transportadoras. En la **Figura 1.6** se muestra de forma esquemática la interacción entre un sustrato y el sitio de unión de la proteína.

1.9 Contaminación ambiental de Fluoroquinolonas.

El impacto de los antibióticos sobre la salud humana y animal desde el siglo pasado ha sido revolucionario para extender y mejorar la calidad de vida. Sin embargo, existe una tendencia mundial de uso indiscriminado de antibióticos, con la consecuencia negativa de generar resistencia microbiana y de alto impacto negativo sobre el ecosistema, ya que la mayoría de

ellos son poco biodegradables⁴¹. Esto último trae como consecuencia una continua dispersión y acumulación de sustancias en el ambiente, las cuales pueden alterar el ecosistema, resultando perjudiciales para la vida humana y silvestre. Por más que se tomen todos los recaudos posibles para disminuir la emisión de contaminantes producidos por la actividad humana, es virtualmente imposible prevenir ningún tipo de contaminación del ambiente

Además, en países en vías de desarrollo como la Argentina, los antibióticos pueden obtenerse fácilmente sin receta y en muchos casos adquirirse incluso en mercados callejeros, sin ningún tipo de control o restricción. En este sentido, la degradación fotoquímica por acción solar es el mayor proceso de transformación fisicoquímica de drogas farmacéuticas en el medioambiente³⁵⁻³⁸.

Los contaminantes orgánicos pueden fotodegradarse (*fotólisis*) mediante procesos *directos* e *indirectos*. En *fotólisis directa* la absorción de radiación es producida por el propio contaminante, generando estados excitados que se descomponen unimolecularmente o que reaccionan bimolecularmente con otros sustratos presentes en el medio^{42,43}. En cambio, en *fotólisis indirecta* la absorción de luz se produce por una molécula denominada *sensibilizador*, que mediante algún mecanismo de *transferencia de energía* ó *de carga* se producen intermediarios secundarios (iones radicales, estados tripletes, etc.) que inducen la degradación del contaminante^{44,45}. Muchos constituyentes de medios biológicos y acuáticos, tales como riboflavina (Vitamina B2) y ácidos húmicos (AH), pueden actuar como sensibilizadores para promover la fotodegradación indirecta de contaminantes⁴⁶⁻⁴⁸. Sin embargo, solo en los últimos años se ha comenzado a estudiar los procesos de fotodegradación de antibióticos en medios acuosos y suelos⁴⁹⁻⁵², y por tanto es actualmente una temática de alto impacto ambiental. No obstante, son muy escasos aun los estudios sobre fotoquímica de antibióticos en presencia de biomoléculas^{53,54}.

1.10 Alcances y Objetivos

Por todo lo expuesto arriba es que se considera de suma importancia la caracterización de los procesos fotoquímicos directos e indirectos que involucren a antibióticos y su interacción con macromoléculas, como proteínas y ácidos húmicos, es de relevancia para conocer sus mecanismos de degradación, persistencia, función antibiótica, etc., tanto en medios biológicos y ambientales⁵⁵. En este aspecto, existen pocos estudios en donde se interprete el mecanismo de reacción fotoquímica de una droga de uso veterinario y las proteínas presentes en alimentos como un sistema fisicoquímico complejo^{56,57}. En este sentido el estudio fotoquímico del sistema droga-proteína en medios microheterogéneos como micelas inversas pueden ser muy útiles como modelos que simulen una matriz alimentaria.

Es por ello que el **Objetivo general** de este plan de trabajo es el estudio de la interacción y fotorreactividad de antibióticos en medios biológicos y ambientales, mediante el uso de diversas técnicas espectroscópicas.

Específicamente se planea el estudio de Fluoroquinolonas utilizados en salud humana y animal, en soluciones acuosas de macromoléculas biológicas (proteínas de leche, ej. lisozima) y ambientales (sustancias húmicas) bajo diferentes condiciones, pH, presencia de moléculas sensibilizadoras, en soluciones micelares, etc., para caracterizar la fotoquímica de estos sistemas conjugados antibiótico-macromolécula expuestos a radiación UV y visible

En principio, se espera que la información obtenida en el marco de este trabajo de tesis doctoral pueda relacionarse con la funcionalidad de algunas drogas farmacéuticas y compuestos relacionados en sistemas biológicos, alimentos, y ambiente sometidas a la radiación solar, para la caracterización de su fotoestabilidad y persistencia en aguas superficiales, foto-inducción de precursores de especies oxidantes, pérdida de funcionalidad proteica y valor nutricional en alimentos como la leche, etc.

Resultados 1-Capítulo 2

Propiedades Fotofísicas de Fluoroquinolonas con Lisozima en solución homogénea

2 Interacción de Fluoroquinolonas con la Proteína Lisozima

2.1 Estructura de Fluoroquinolonas

Las quinolonas son antibióticos obtenidos por síntesis⁵⁸⁻⁶⁰. El núcleo central de su estructura es el anillo 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína. En su estructura básica las fluoroquinolonas (FQs) se distinguen de su predecesor, el ácido nalidíxico, en adicionar uno (en posición 6) o más átomos de flúor. La adición de Flúor, aumenta la capacidad de penetración al interior de la célula bacteriana y la afinidad por la enzima Topoisomerasa II o ADN-girasa.

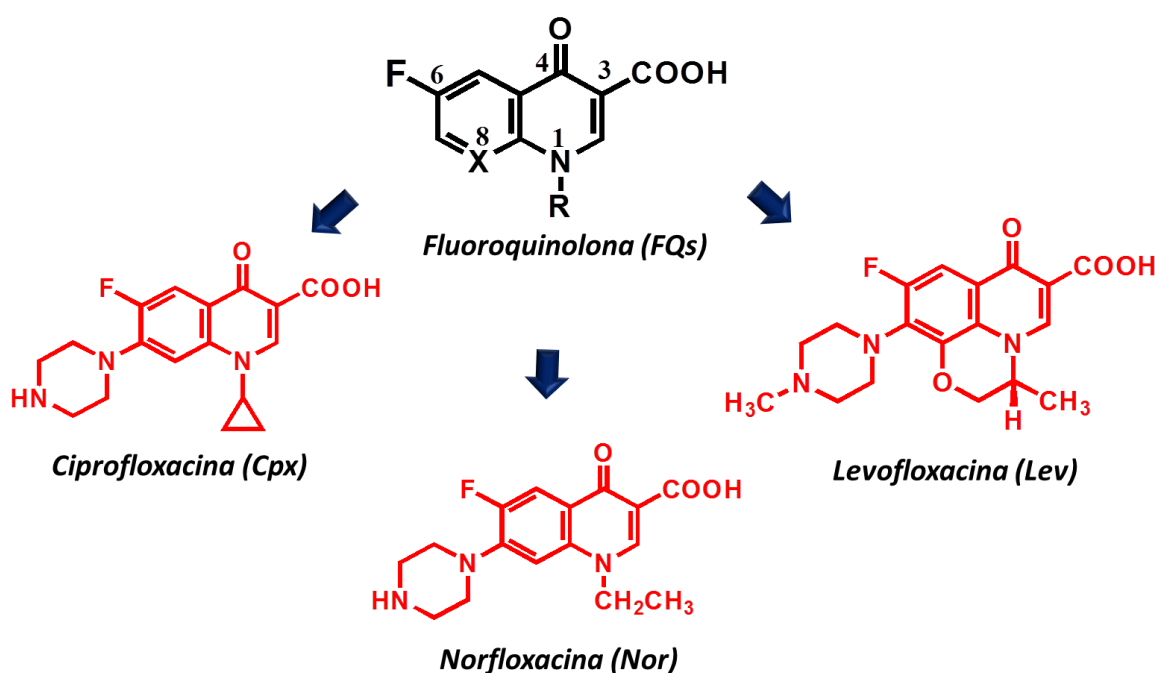


Figura 2.1 Estructura general de las FQs (color negro) y las tres FQs estudiadas (color rojo).

La diferencia estructural entre las diferentes FQs está basada en los cambios hechos en posición 1, 5, 7 y 8. Ello explica la diferente actividad, vida media y toxicidad de los distintos componentes de la familia y ha llevado a clasificar las quinolonas en primera, segunda y tercera. En este caso, además del átomo de flúor se adiciona un anillo de piperazina en posición 7 de la estructura. La **Figura 2.1** muestra la estructura general de las FQs y la estructura de las 3 fluoroquinolonas estudiadas en este trabajo de tesis.

Propiedades Fotofísicas de Fluoroquinolonas

Cuando una solución de FQs absorbe radiación electromagnética entre 200 y 360 nm, se produce la excitación de electrones y son promovidos desde un orbital de enlace o de no-enlace (si lo hubiera) a orbitales de antienlace, representados como $\pi \rightarrow \pi^*$ o $n \rightarrow \pi^*$,

respectivamente. Diversos procesos pueden desencadenarse a partir de allí, tal como se representan en la **Figura 2.2**.

Para analizar detalladamente las transiciones involucradas, la Figura 2.2 muestra el diagrama de Jablonski que esquematiza los procesos unimoleculares que involucran los estados electrónicamente excitados por absorción monofotónica de la radiación. En este diagrama, las curvas de energía de niveles vibrónicos (vibracionales + electrónicos) de los diferentes estados de una molécula (S_n = singulete, T_n = triplete, con $n = 0$ estado fundamental, $n = 1, 2, 3 \dots$ 1er, 2do, 3er estado excitado, respectivamente) se representan en forma simplificada mediante líneas horizontales gruesas para los niveles electrónicos y líneas horizontales finas para los niveles vibracionales.

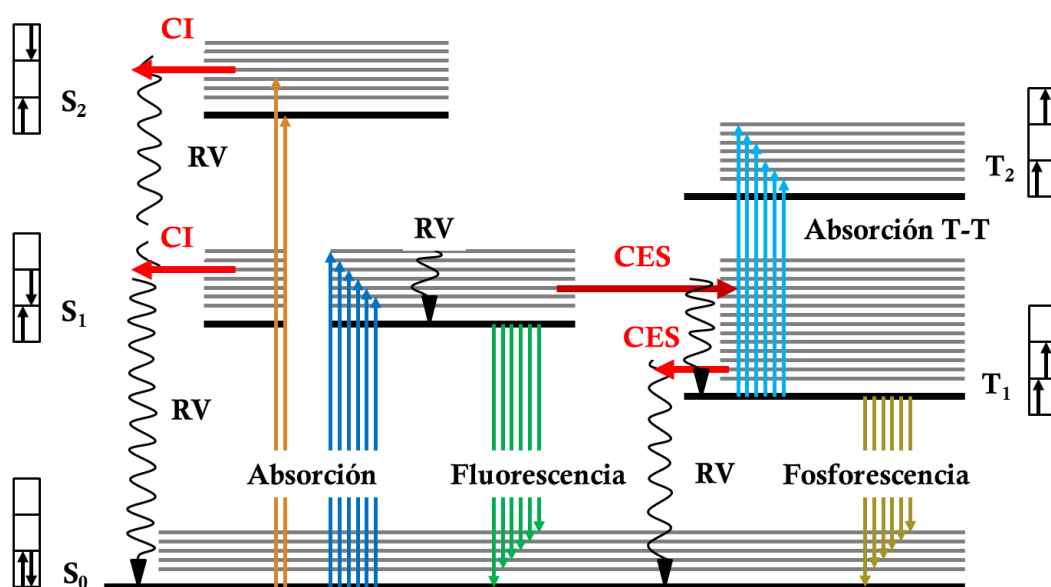


Figura 2.2 Diagrama de Jablonski representando los diferentes procesos que pueden ocurrir tras la absorción de un fotón. Las líneas horizontales gruesas representan los estados electrónicos y las finas a los niveles vibracionales. Los procesos radiativos (absorción y emisión) se representan con flechas de línea recta y los no radiativos por flechas de trazo curvo. **CI**: Conversión Interna. **CES**: Cruce entre Sistemas. **VR**: Relajación Vibracional. S_i y T_i indican estados de multiplicidad Singulete y Triplete, respectivamente.

2.2 Aspectos experimentales

2.2.1 Materiales

Las soluciones de fluoroquinolonas en buffer Tris 10 mM fueron preparadas con agua ultra pura, tal como se indica en el capítulo 10 de Técnicas Experimentales. En todos los casos, la concentración final de FQs en la solución fue $\approx 10 \mu\text{M}$, excepto para los experimentos de Laser Flash Fotolisis donde la concentración fue $\approx 70 \mu\text{M}$.

2.2.2 Métodos

Espectroscopia UV- Visible estacionaria

Los espectros de absorción se registraron en un espectrofotómetro UV-visible Hewlett Packard 8453. Los espectros de emisión, en un espectrofluorómetro Hitachi F-2500, en celdas de cuarzo de 1 cm, con rendijas de excitación y emisión de 5 nm y con $\lambda_{\text{ex}} = 330$ nm.

Espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo por recuento de fotones individuales correlacionado temporalmente (TCSPC)

Estos experimentos fueron realizados en un aparato Tempro-01 de Joriba Jovin Yvon, utilizando una fuente de excitación pulsada ultra rápida de 340 (± 15) nm, Nanoled®, 1Mhz. Ver capítulo 10. La longitud de onda de emisión fue seleccionada con un monocromador de 12 nm de ancho de banda de emisión. Todas las medidas fueron realizadas en solución saturada de aire y a temperatura ambiente.

Determinación de los tiempos de vida de tripletes (τ^T) por LFP

Las muestras fueron excitadas a $\lambda_{\text{ex}} = 355$ nm (láser Nd-YAG, fwhm 8 ns, 4 mJ/pulso) y se registró el decaimiento de los estados excitados por detección en la región de ≈ 610 nm. Las señales obtenidas fueron un promedio de 5 – 10 disparos. Las muestras fueron saturadas con diferentes gases (Argón, Aire y Oxígeno) utilizando una corriente permanente de los mismos durante 30 – 40 minutos, y a través de un burbujeador conteniendo el solvente correspondiente a la solución a analizar. Todas las medidas se realizaron dentro del rango lineal de ΔAbs vs intensidad del láser.

Todas las medidas descriptas anteriormente se realizaron por triplicado.

Resultados y discusiones.

2.3 Efecto del buffer Tris en las propiedades fotofísicas de las FQs

Debido a que todos los experimentos se realizarían en soluciones acuosas de pH controlado utilizando la solución reguladora (buffer) 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (Tris), se estudió el efecto de dicho buffer sobre las propiedades fotofísicas de las FQs, ya que Fasani y colaboradores reportaron que existe interacción entre las FQs y los buffer fosfatos y sulfitos^{61,62}. El mismo efecto observaron Lorenzo y colaboradores cuando trabajaron con Sarafloxacina (Sfx) en soluciones de buffer fosfato⁶³.

2.3.1 Espectros de absorción UV

Los espectros de absorción de Cpx, Nor y Lev en solución de NaCl 10 mM a pH 7,4 (con el agregado de NaOH para llegar a dicho pH) son caracterizados por una intensa banda de absorción en la región 260-280 nm ($\epsilon_{\text{máx}} \approx 3,0-2,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) correspondiente a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$; y una banda menos intensa a 320-400 nm ($\epsilon_{\text{máx}} \approx 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) correspondiente a la transición $n \rightarrow \pi^*$. La posición e intensidad de las bandas por debajo de 250 nm son más dependientes de la estructura molecular. La Figura 2.3A muestra los espectros característicos de las FQs.

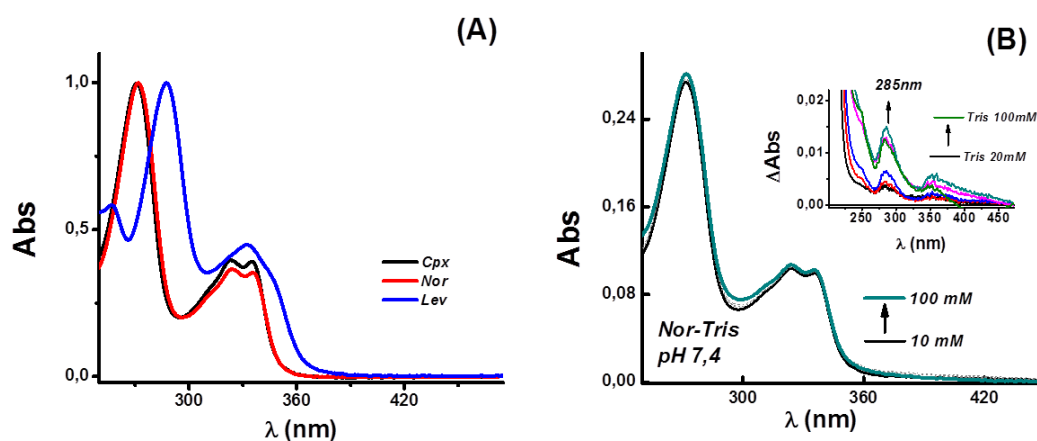


Figura 2.3 Espectros de absorción UV normalizados característicos de Cpx (línea negra), Nor (línea roja) y Lev (línea azul) (A); espectro de absorción de Nor (7 μM) en función de la concentración de Tris, inserto espectros diferencia (B).

El incremento en la concentración del buffer Tris, no produce cambios significativos en los espectros de Cpx y Lev, pero si en Nor, observándose un leve aumento en la región 300 nm, como lo confirman los espectros diferencia mostrados en los insertos de la Figura 2.3B. Dichos cambios de absorbancia no se ajustan al modelo de Benesi-Hildebrand para el cálculo de la constante de asociación entre Nor y Tris.

2.3.2 Espectros de emisión de fluorescencia

En solución acuosa, todas las FQs presentan fluorescencia, con $\lambda_{\text{max}} \approx 410$ nm, excepto Lev que presenta un máximo de emisión en 450 nm. Esto se debe a la presencia del anillo oxacino en la posición 8, el cual estabiliza el estado excitado debido al efecto donador de electrones. El valor del rendimiento cuántico de fluorescencia de estas moléculas, $\Phi_F \approx 0,11$, es independiente de la longitud de onda de excitación. Lo cual indica que luego de la excitación de S_0 , la molécula pasa a diferentes estados excitados (S_3 , S_2 , etc., dependiendo de la λ_{ex}) y la emisión se produce desde el estado S_1 (flechas verdes en el diagrama de Jablonski Figura 2.2), debido a procesos de relajación vibracional (RV), $S_3 \rightsquigarrow S_2$, $S_2 \rightsquigarrow S_1$.

Los espectros de emisión fueron corregidos por efecto de filtro interno, usando el valor de absorbancia a la longitud de onda de excitación ($\lambda_{\text{ex}} = 330$ nm), utilizando la **ecuación 2.1**. Donde F_{corr} y F_{obs} representan la fluorescencia corregida y observada respectivamente, y ΔA_{ex} y ΔA_{em} la absorbancia a la longitud de onda de excitación y emisión. En general, se observa que las intensidades (y/o áreas) de emisión para todas las FQs disminuyen, indicando que existe un efecto de inhibición (*quenching*) de la fluorescencia por el buffer Tris, Figura 2.4.

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \times \text{antilog} \left(\frac{\Delta A_{\text{ex}} + \Delta A_{\text{em}}}{2} \right) \quad \text{Ec. 2.1}$$

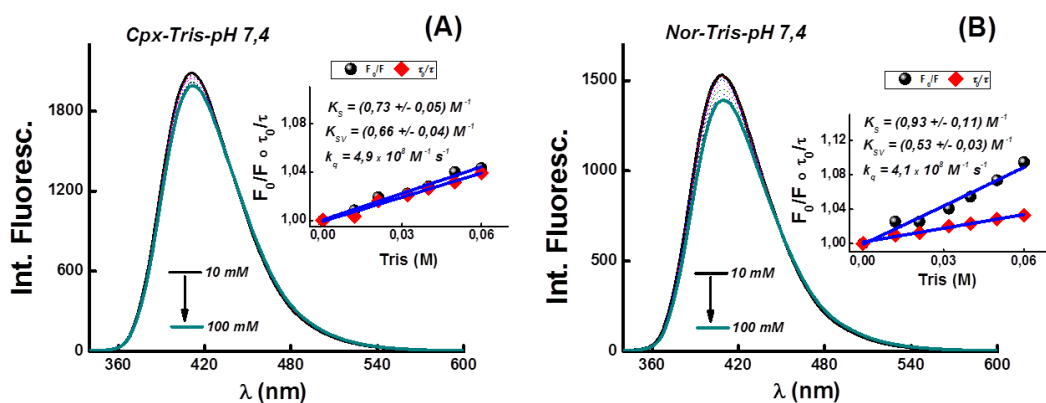


Figura 2.4 Espectros de Fluorescencia de FQs 10 μM : Cpx (A) y Nor (B) en función de la concentración de Tris en solución de NaCl 10 mM a pH 7,4. Inserto gráfico de Stern-Volmer.

Las variaciones observadas fueron analizadas utilizando la ecuación de Stern-Volmer, **ecuación 2.2**. Dicha ecuación se utiliza para calcular la constante de asociación (K_{SV}) entre una molécula fluorescente (fluoróforo) y una molécula capaz de desactivar la emisión del fluoróforo (*quencher*), bajo la suposición de que el mecanismo de quenching es estático. El

modelo supone una interacción uno a uno entre las moléculas del sistema para concentraciones de quencher menores a 1 mM⁶⁴.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad \text{Ec.2.2}$$

Donde F_0 y F son la intensidad de fluorescencia antes y después de la adición del quencher, respectivamente, K_{SV} es la constante de quenching de Stern-Volmer, k_q es la constante de velocidad bimolecular, $k_q = K_{SV}/\tau_0$ y τ_0 es el tiempo de vida promedio.

Los diferentes mecanismos de quenching de fluorescencia generalmente son clasificados como: *Quenching Dinámico*, resultado de la colisión de moléculas excitadas, o *Quenching Estático*, debido a la formación de un complejo en el estado fundamental entre el fluoróforo y el quencher. Con el fin de confirmar el mecanismo de quenching inducido por Tris, se midió los tiempos de vida en estado excitado singulete (τ) de las FQs.

2.3.3 Fluorescencia resuelta en el tiempo

En solución acuosa saturada con aire los decaimientos de fluorescencia de Cpx, Nor y Lev (10 μ M), fueron monoexponenciales e independientes de la longitud de onda de emisión, y con tiempos de vida ($\tau \approx 1,3$ ns) acordes a los reportados en literatura^{29,65}. En presencia del buffer Tris se observó una disminución en los tiempos de vida, con un menor efecto en el caso de Nor, **Figura 2.5**. El ajuste de los datos se realizó utilizando la **ecuación 2.3**, la cual implica un modelo multi-exponencial. Este modelo supone que el decaimiento es la suma de los decaimientos mono-exponenciales:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i \exp\left(-t/\tau_i\right) \quad \text{Ec. 2.3}$$

Donde n es el número de decaimiento exponenciales individuales, τ_i y α_i son el tiempo de vida y la amplitud de la intensidad de fluorescencia en el momento $t = 0$ de cada decaimiento, respectivamente

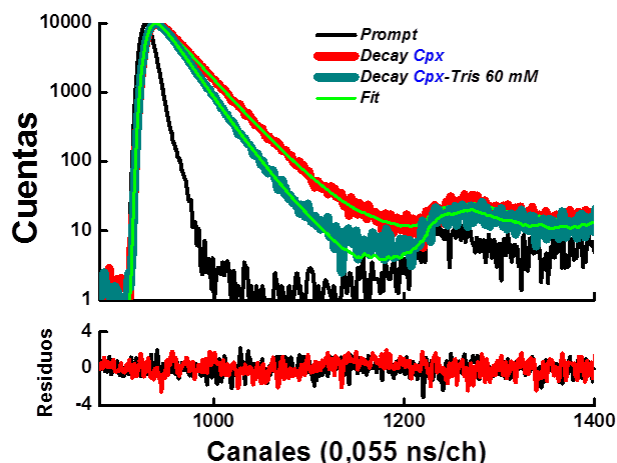


Figura 2.5 Efecto del buffer Tris en los decaimientos de fluorescencia de Cpx en solución de NaCl 10 mM a pH 7,4. Utilizando un nanoled con $\lambda_{ex} = 340$ nm y recolectando la señal a 410 nm.

En el caso de Cpx y Lev el mecanismo de Quenching fue netamente dinámico. Pero para Nor, se tuvo que aplicar un modelo combinado, Estático-Dinámico, para ajustar los datos, **ecuación 2.4**.

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_{SV}[Q]) \times (1 + K_S[Q]) \quad \text{Ec. 2.4}$$

Donde F_0 y F son la fluorescencia del fluoróforo en ausencia y presencia del quencher Q, K_{SV} es la constante de Stern-Volmer y K_S la constante de asociación. En el caso de Nor, la desactivación de la fluorescencia ocurre por dos mecanismos, uno debido a la formación de un complejo en el estado fundamental Nor-Tris, y otro debido a la colisión del estado excitado de Nor con el buffer Tris. La **Tabla 2.1** muestra los valores de las constantes y tiempos de vida en estado singulete.

Tabla 2.1 Valores de constantes de quenching K_{SV} , K_S y k_q de FQs por Tris, ajustados mediante la ecuación de Stern-Volmer y tiempos de vida del estado excitado singulete.

FQs	K_{SV} / M^{-1}	K_S / M^{-1}	τ / ns	$k_q / M^{-1}s^{-1}$
Cpx	$0,66 \pm 0,04$	-	$1,34 \pm 0,10$	$4,9 \times 10^8$
Nor	$0,53 \pm 0,03$	$0,93 \pm 0,10$	$1,29 \pm 0,10$	$4,1 \times 10^8$
Lev	$4,66 \pm 0,18$	-	$6,15 \pm 0,11$	$7,6 \times 10^8$

2.3.4 Estado Triplete en solución acuosa

Tal como se mostró en la Figura 2.2, en solución acuosa neutra, la excitación de las FQs lleva a las moléculas a estados excitados $S_n \geq 1$. Por relajación vibracional (RV), estos estados

decaen de manera no radiactiva al estado S_1 y desde este relajan a través de la emisión de fluorescencia.

Pero en FQs, existe otro proceso altamente eficiente, el cruce entre sistemas (CES o ISC, $\Phi_{\text{CES}} \approx 0,5$). Se trata de una transición no-radiactiva entre dos niveles vibracionales isoenergéticos de estados electrónicos de diferente multiplicidad de espín ($S_1 \rightarrow T_n$) y que permite la población de los estados T_1 de las FQs. Este estado excitado relaja al estado fundamental S_0 en un tiempo de microsegundos (μs). A través de Espectroscopia de Absorción de Transitorios inducida por láser (o en ingles Laser-Flash Photolysis LFP) con excitación láser a 355 nm, se registraron los decaimientos de los estados excitados tripletes de Cpx, Nor y Lev ($\approx 70 \mu\text{M}$) en solución de NaCl 10 mM, pH 7,4, saturada con Argón, en la región de 600 nm aproximadamente. Las señales obtenidas fueron promediadas sobre un total 10 disparos del láser.

La Figura 2.6 muestra el efecto del buffer Tris sobre el decaimiento de la señal del triplete de Cpx a 610 nm, observándose una disminución del tiempo de vida de 5,4 a 2,4 μs .

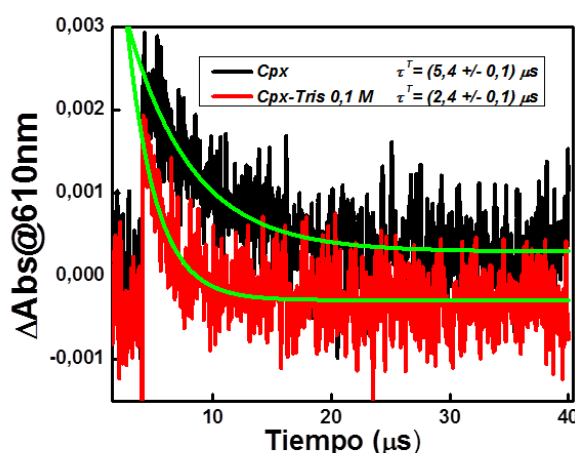


Figura 2.6 Tiempos de vida del estado excitado triplete de Cpx ($\approx 70 \mu\text{M}$) en solución de NaCl 10 mM, pH 7,4, saturada con Argón, en ausencia (línea negra) y presencia (línea roja) de buffer Tris. Datos recolectados a 610 nm.

Las constantes de Quenching bimolecular del estado excitado triplete de las FQs por Tris fueron determinadas utilizando la ecuación modificada de Stern-Volmer, **ecuación 2.5**.

$$\frac{1}{\tau^T} = \frac{1}{\tau_0^T} + k_q^T [Q] \quad \text{Ec. 2.5}$$

En la Figura 2.7A se observa un moderado quenching de Nor por el buffer Tris. El quenching es más eficiente en el caso de Lev, obteniéndose constante con un orden de magnitud mayor (Figura 2.7B) que las otras FQs.

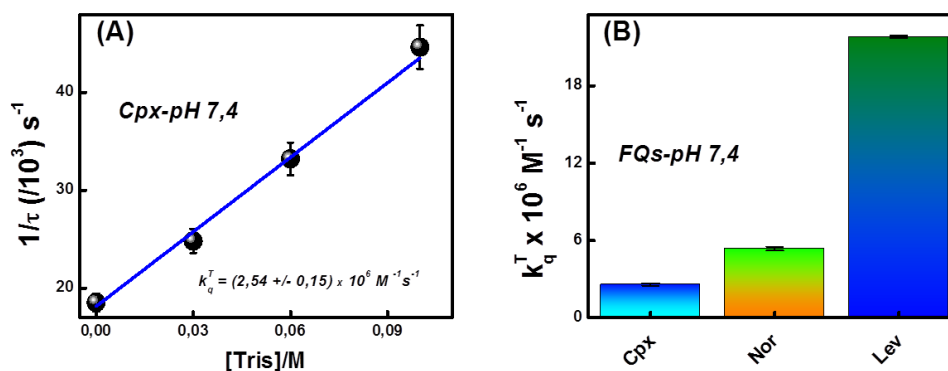
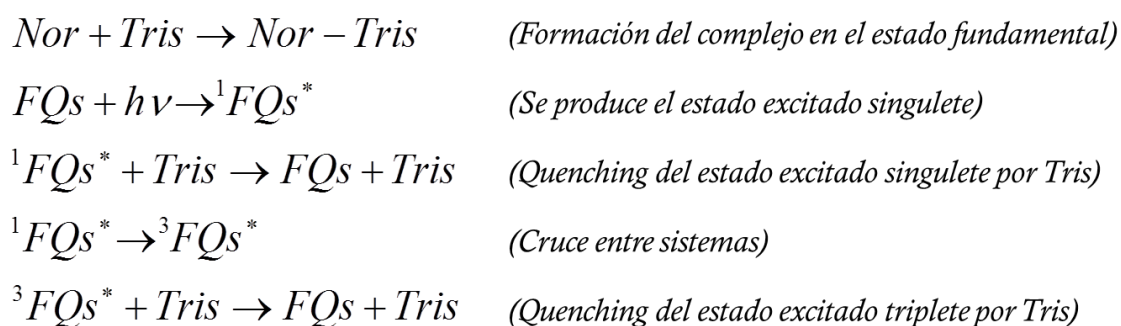


Figura 2.7 Quenching de los tiempos de vida en estado excitado triplete de Cpx en función de la concentración del buffer Tris, datos ajustados mediante la ecuación 2.5 (A). Constantes de Quenching bimolecular del estado excitado triplete de FQs por el buffer Tris (B).

A partir de los resultados obtenidos, el mecanismo de interacción entre las FQs y el buffer Tris puede resumirse en el Esquema 1:



Esquema 1 Mecanismo de interacción entre las FQs y el buffer Tris.

Por lo determinado anteriormente, se eligió trabajar en concentraciones bajas del buffer Tris (10 mM) a fin de minimizar su efecto sobre las propiedades fotofísicas de las FQs.

2.4 Interacción de las fluoroquinolonas con la proteína Lisozima

2.4.1 Propiedades fotofísicas de la proteína Lisozima

La Lisozima, también conocida como muramidasa (N-acetil muramidaglicano hidrolasa), fue descubierta en 1922 por Alexander Fleming. Es la primera proteína que se dispuso de su secuencia por cristalografía de rayos-X, además la primera enzima a la que se determinó su mecanismo enzimático gracias a David Phillis en 1966⁶⁶. Desde su descubrimiento esta proteína tiene un papel muy importante en los modelos enzimáticos, y en muchos aspectos de la biología moderna, incluyendo la química de proteínas, cristalografía, resonancia magnética nuclear (NMR), inmunología y plegamiento de proteínas.

Se encuentra en muchos organismos como virus, insectos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos, produciéndose en multitud de tejidos y fluidos, incluyendo huevos de aves, leche humana, lágrimas, saliva. La lisozima de clara de huevo de gallina, posee una cadena polipeptídica de 129 aminoácidos (14,6 kD) unida entre sí por cuatro enlaces disulfuro⁶⁷. La molécula tiene una forma más o menos helicoidal 30x30x45Å. Hay α hélices y algunas regiones de la cadena tienen conformación de β lámina extendida y estructura desordenada, **Figura 2.8.**

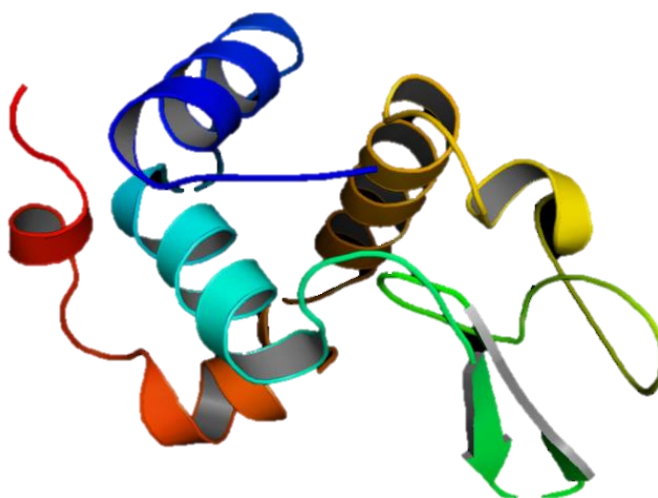


Figura 2.8 Estructura de la proteína Lisozima.

Los aminoácidos aromáticos, triptófano (Trp), tirosina (Tyr) y fenilalanina (Phe), son moléculas cuya fluorescencia intrínseca sirven para determinar la conformación de la proteína, la dinámica y las interacciones intermoleculares. De los tres aminoácidos, los triptófano (Trp 28, Trp 62, Trp 63, Trp 108, Trp 111 y Trp 126) son los más importantes espectroscópicamente, puesto que la fluorescencia de estos residuos puede proporcionar información valiosa sobre las interacciones con sustrato o inhibidor. Por tal motivo,

numerosos estudios se han realizado sobre la espectroscopia de fluorescencia de esta Lyz. Los Trp 62 y Trp 63 están dispuestos a lo largo de un lado del sitio activo y el Trp 108 está en el lado opuesto. El Trp 28 y Trp 111 toman posiciones en la región de la matriz hidrófoba y Trp 123 se encuentra separado de los demás⁶⁸. La Figura 2.9 representa el espectro de absorbancia y fluorescencia de Lyz 12 μ M en solución de buffer Tris.

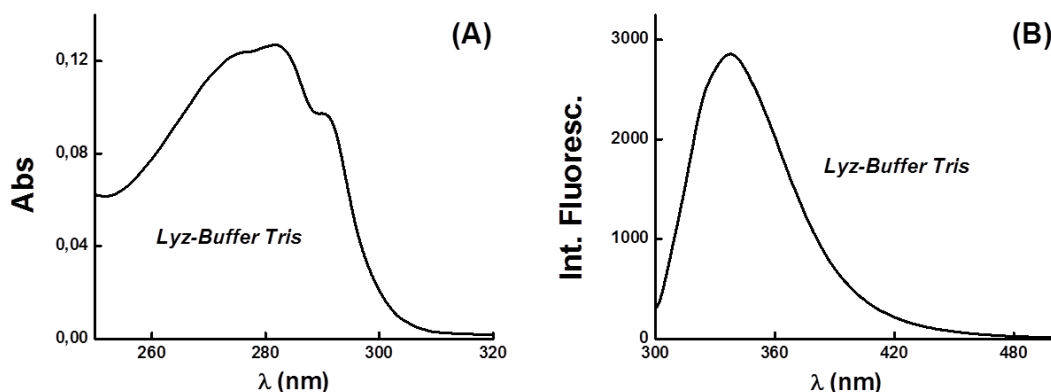


Figura 2.9 Espectro de absorbancia (A) y espectro de Fluorescencia con $\lambda_{ex} = 280$ nm de Lyz 12 μ M en solución buffer Tris 10 mM a pH 7,4.

Los estados excitados singulete de los Trp 63 y Trp 123 son extremadamente desactivados debido a una transferencia de electrón (*foto-electron transfer*) por interacción con los enlaces disulfuros, Cys(76)-Cys(94) y Cys(6)-Cys(127), adyacentes a ellos, respectivamente⁶⁹. Por lo tanto, es razonable considerar que estos residuos de triptófano no contribuyen significativamente a la fluorescencia de lisozima. En un trabajo pionero, mediante estudios espectroscópicos de fluorescencia de Lyz, Imoto y colaboradores informó que el 80% de la fluorescencia de Lyz es debido a Trp 62 y Trp 108⁷⁰. Por lo tanto, resultados que impliquen modificaciones en la fluorescencia de Lyz por alguna perturbación, pueden estar relacionado con modificaciones en el sitio activo de la proteína. Pero, en cambio, el otro 20% de la fluorescencia total, que se puede atribuir a Trp 28 y Trp 111, debe ser capaz de proporcionar información sobre la región de la matriz hidrófoba.

Por otro lado, como se mencionó en el capítulo 1, existe la interacción antibiótico-proteína y es de gran interés en los campos de la medicina, la química y la biología⁷¹⁻⁷⁵. Por lo tanto, en esta parte del capítulo se investigó la interacción de las FQs con lisozima mediante métodos espectroscópicos y de modelación molecular en condiciones fisiológicas simuladas. Este estudio podría proporcionar información básica para entender el transporte de FQs en el cuerpo.

2.4.2 Efecto del pH en los espectros de absorción y emisión de FQs

La Figura 2.10 muestra los espectros de absorbancia y fluorescencia de Cpx (12 μ M) en solución Tris 10 mM en función del pH. El resto de las fluoroquinolonas presentan un comportamiento muy similar.

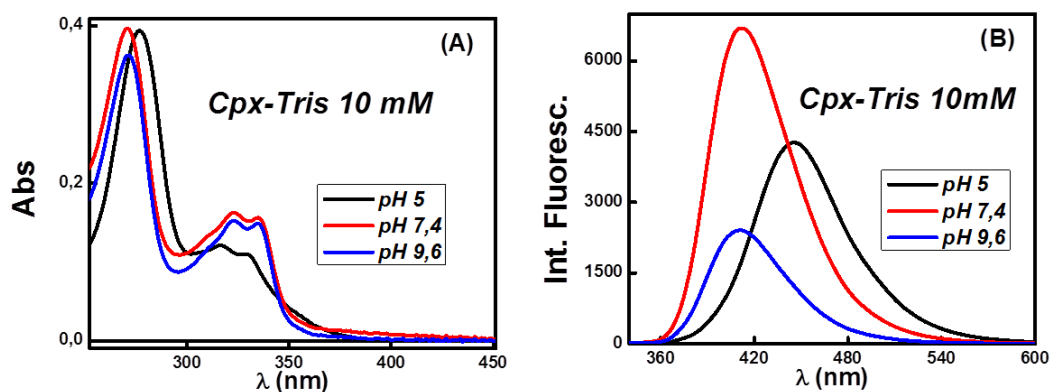


Figura 2.10 Espectros de absorción UV (A) y de Fluorescencia con $\lambda_{ex} = 330$ nm (B) de Cpx (12 μ M) en Tris 10 mM a diferentes pH.

Tal como se reporta en literatura el cambio en el pH induce cambios en los espectros de absorción de las FQs^{24-26,76}. En la **Figura 2.10A** se observa un desplazamiento hipsocrómico (desplazamiento hacia longitudes de onda más cortas y por lo tanto de mayor energía) y una disminución en su intensidad en la banda centrada entre 250-300 nm, yendo de condiciones ácidas a básicas. Mientras que se registra un efecto batocrómico (desplazamiento hacia longitudes de onda más largas) y un aumento en la intensidad en la región comprendida entre 320-340 nm del espectro de absorción de Cpx.

En la **Figura 2.10B** se representa los espectros de emisión de FQs para tres valores de pH; ácido, neutro y básico. Se observa un gran corrimiento de Stokes (≈ 30 nm) de los espectros de emisión de Cpx en medios acuosos neutros. El mismo efecto ocurre con las otras FQs y fue atribuido al cambio en la geometría del estado emisor con respecto al estado fundamental del zwitterión. La existencia de un plano de geometría fuera del plano del grupo piperazilo, puede inducir planaridad en el estado excitado debido al cambio en el momento dipolar (cambio del grupo piperazilo de no plano en el fundamental a plano en el estado excitado)⁷⁷.

Asimismo, el cambio de pH modifica los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) de las FQs, Figura 2.11. Valores altos de Φ_F se presenta únicamente en soluciones neutras y moderadamente ácidas, siendo mucho más bajos en medios básicos que ácidos. Este comportamiento está de acuerdo con la existencia de una fluorescencia significativa de las

formas zwitteriónicas y catiónicas y con una baja capacidad de emisión a partir de los aniones²⁵.

Estos cambios podrían explicarse por la ionización sucesiva de la molécula de quinolona. Las fluoroquinolonas, que tienen dos grupos funcionales ionizables (el anillo piperazina y el ácido carboxílico en las posiciones 7 y 3, respectivamente), pueden existir en solución en la forma protonada, FQH_2^+ (en medio ácido), en la forma sin carga, FQH (en equilibrio con su forma zwitteriónica, FQH^\pm) (en medios ligeramente ácido y neutro) y como un anión FQ^- (en medios alcalinos).

A fin de estudiar la influencia de la acidez del medio en la fluorescencia de las FQs, se partió de una solución ácida de FQs en Tris-Cl (Trizma clorhídrico) y se modificó el pH mediante la adición de pequeños volúmenes de una disolución de Trizma Base. En la **Figura 2.11** se muestra la variación de los rendimientos cuánticos de fluorescencia del antibiótico Cpx en Tris 10 mM, en función de la acidez del medio.

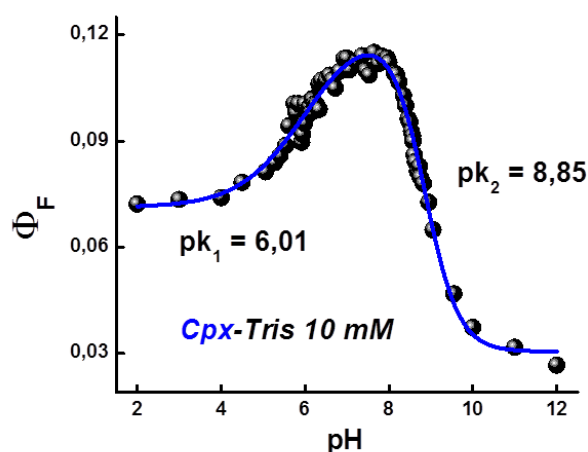


Figura 2.11 Influencia de la acidez del medio en el rendimiento cuántico de fluorescencia de Cpx (12 μ M) en solución Tris 10 mM.

Se determinó las constantes de ionización de Cpx, Nor y Lev a partir de los datos de rendimientos cuánticos de fluorescencia tomados para cada fluoroquinolona. Los valores de pK_a , junto con los valores de pK_a reportados en la literatura se resumen en la [Tabla 2.1](#). Como se puede observar en el cuadro, los resultados están en un buen acuerdo con la literatura.

Tabla 2.2 Valores de pK_a de las FQs.

FQs	$pK_1 \pm SD$	$pK_2 \pm SD$		
	Literatura		Literatura	
Cpx	$6,07 \pm 0,08$	$6,09^{26,75}$	$8,61 \pm 0,05$	$8,74^{26,75}$
Nor	$6,22 \pm 0,02$	$6,30^{26,75}$	$8,51 \pm 0,08$	$8,38^{26,75}$
Lev	$5,92 \pm 0,03$	$6,05^{26,75}$	$8,67 \pm 0,06$	$8,28^{26,75}$

La Figura 2.12, muestra la distribución de especies en función del pH para los antibióticos Cpx, Nor y Lev, como una representación de la fracción molar de las especies catiónica, neutra y aniónica.

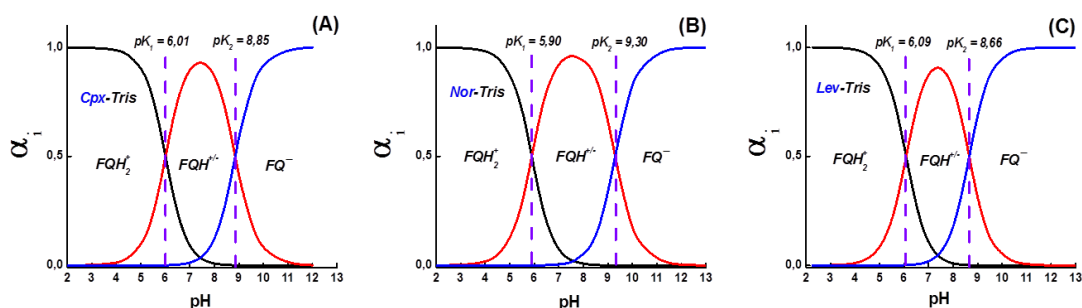


Figura 2.12 Fracción molar de las formas catiónica (FQH_2^+), neutra (FQH^\pm) y aniónica (FQ^-) en solución Tris 10 mM para: (A) Cpx, (B) Nor y (C) Lev.

2.4.3 Interacción entre FQs y Lyz, espectros de absorbancia

Los espectros de absorbancia de las FQs (10 μ M) muestran que, el aumento creciente de la concentración de Lyz tanto en medio ácido como neutro y básico, produce un ligero aumento en los espectros de absorbancia en la región 340-460 nm, como se muestran en los espectros diferencia mostrados en los insertos de la Figura 2.13. Esto estaría indicando la interacción entre estas moléculas en el estado fundamental, pero dichos cambios no se ajustan al modelo de Benesi-Hildebrand ni con otros modelos, para obtener la constante de formación del complejo. El mismo comportamiento se observa con todas las FQs estudiadas en esta tesis.

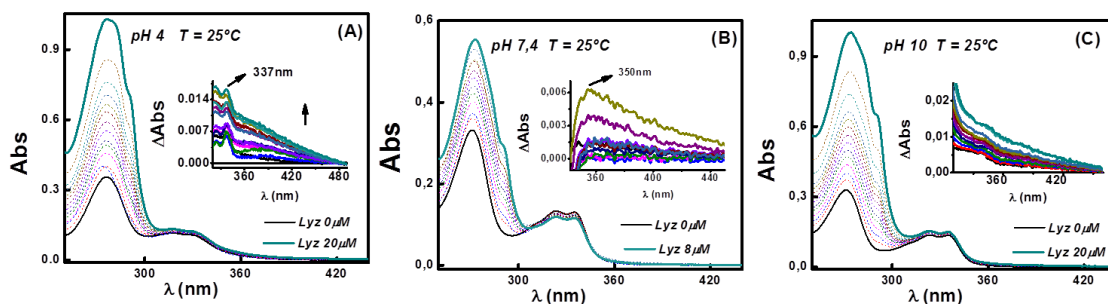


Figura 2.13 Espectro de absorción de Cpx 10 μM en función de la concentración de Lyz en solución Buffer Tris 10 mM, inserto espectros diferencia. A) pH 4, B) pH 7.4 y C) pH 10.

2.4.4 Interacción entre FQs y Lyz, espectros de fluorescencia

Las mediciones de fluorescencia se han utilizado ampliamente para estudiar el mecanismo de asociación de moléculas pequeñas a las proteínas. Los pequeños cambios en el espectro UV de las FQs por el agregado de Lyz son más notorios en los espectros de fluorescencia. La interacción de FQs con Lyz fue evaluada excitando la solución a 330 nm (donde solo absorben las FQs) y registrando la emisión entre 350-650 nm.

La luminiscencia de FQs en soluciones de pH ácidos y neutros indica que, con el incremento de concentración de Lyz, existe una disminución en la intensidad de fluorescencia del antibiótico, tal como se observa en la Figura 2.14. Estos resultados ponen de manifiesto el quenching entre las FQs y Lyz, y mediante la ecuación de Stern-Volmer se obtuvo las constantes de asociación (ecuación 1.2).

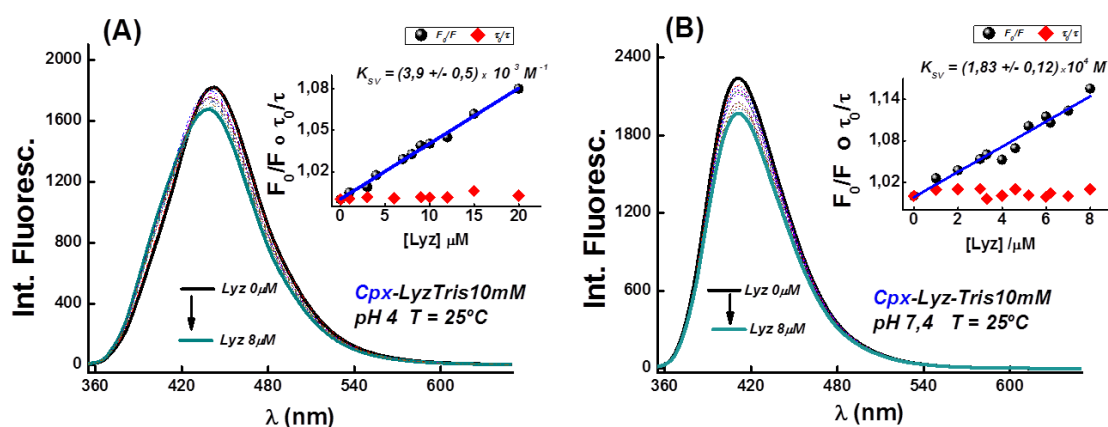


Figura 2.14 Espectros de Fluorescencia con $\lambda_{ex} = 330 \text{ nm}$ de la solución de Cpx 10 μM en Tris 10 mM, en función de la concentración de Lyz: pH ácido (A) y neutro (B). Insertos gráficos de Stern-Volmer, los valores de K_{SV} se obtuvieron utilizando la ecuación 2.2.

En soluciones de pH básico ocurre un fenómeno completamente diferente, la intensidad de fluorescencia de las FQs aumenta con el incremento de la concentración de Lyz. Debido a que no se produce una disminución de la señal, los datos no pueden ajustarse con la ecuación 2.2. Para interpretar este fenómeno, se utiliza la ecuación de Rawel ^{78,79}, **Ecuación 2.6**, que al igual que el modelo de Stern-Volmer supone una interacción uno a uno entre las moléculas del sistema.

$$\Delta F = \frac{\Delta F_{\max} \times [Lyz]}{K_D + [Lyz]} \quad \text{Ec. 2.6}$$

Donde ΔF representa la diferencia entre la emisión del complejo proteína-FQs y la FQs sola, ΔF_{\max} es la fluorescencia máxima observado cuando la proteína se satura con FQs, y K_D es la constante de disociación, con $K_A = 1/K_D$.

Para el cálculo de ΔF , se utilizó el máximo de emisión de las FQs en las soluciones de pH = 10. Los datos obtenidos de este modo, para diferentes concentraciones de proteína añadida a una cantidad fija de FQs, fueron evaluados utilizando la ecuación 2.6. La **Figura 2.15** muestra el comportamiento de la intensidad de fluorescencia del antibiótico con el agregado de Lyz.

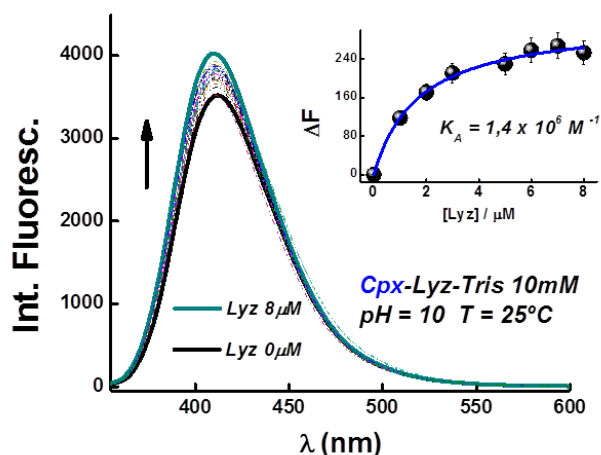


Figura 2.15 Espectro de Fluorescencia de la solución de Cpx 10 μ M en Tris 10 mM a pH básico, en función de la concentración de Lyz. Inserto ajuste de datos de fluorescencia recogidos a 410 nm utilizando ecuación 2.6.

Con el propósito de determinar si la interacción entre las FQs y Lyz involucran los estados excitados de los antibióticos, se realizaron experimentos de fluorescencia resuelta en el tiempo.

2.4.5 Interacción entre FQs y Lyz, fluorescencia resuelta en el tiempo

En solución buffer Tris 10 mM saturada con aire los decaimientos de fluorescencia de Cpx, Nor y Lev en los diferentes pH, fueron monoexponenciales, indicando la presencia de un solo estado emisor. En la Figura 2.16 se observa como el agregado creciente de Lyz no afecta los tiempos de vida de las FQs, indicando que no existe interacción entre el estado excitado singlete de las FQs con la proteína.

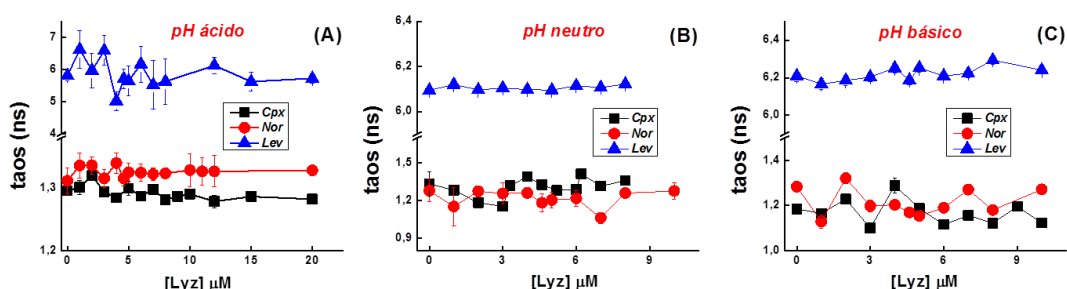
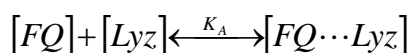


Figura 2.16 Efecto de la concentración de Lyz en los tiempos de vida del estado excitado singlete de las FQs (10 μM) en solución Tris 10 mM, utilizando un nanoled con $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ y recolectando los datos en la longitud de onda de máxima emisión de las FQs: pH ácido (A), pH neutro (B) y pH Básico.

Por lo tanto, el mecanismo de quenching de las FQs con la Lyz tanto en medio ácido como neutro es netamente estático. Indicando que la disminución de la señal de fluorescencia se debe a la formación de un complejo FQs-Lyz en el estado fundamental y no a partir de un mecanismo de quenching dinámico.



En medio básico, con los datos de fluorescencia se obtienen valores de K_A mayores que en los otros dos medios (un orden de magnitud mayor en el caso de Cpx), lo que indica que la unión entre la FQs y Lyz es diferente con respecto al medio ácido y neutro. El aumento de la fluorescencia de FQs con Lyz, significa que el antibiótico se encuentra en una región de diferente rigidez o micro viscosidad. Los valores de las constantes de asociación entre FQs y Lyz en los diferentes pH y los tiempos de vida del estado excitado singlete se detallan en la **Tabla 2.3**.

Tabla 2.3 Valores de constantes de asociación entre FQs y Lyz, y tiempos de vida del estado excitado singulete de los antibióticos (τ).

FQs	pH ácido		pH neutro		pH básico	
	$K (\times 10^{-3})/M^{-1}$	τ/ns	$K (\times 10^{-3})/M^{-1}$	τ/ns	$K (\times 10^{-3})/M^{-1}$	τ/ns
<i>Cpx</i>	$3,9 \pm 0,5$	$1,29 \pm 0,04$	$18,0 \pm 0,1$	$1,33 \pm 0,05$	1480 ± 300	$1,18 \pm 0,01$
<i>Nor</i>	$16,0 \pm 1,0$	$1,31 \pm 0,02$	$7,8 \pm 1,1$	$1,28 \pm 0,10$	60 ± 22	$1,28 \pm 0,04$
<i>Lev</i>	$14,0 \pm 1,0$	$5,81 \pm 0,17$	$0,7 \pm 0,1$	$6,09 \pm 0,10$	46 ± 12	$6,21 \pm 0,02$

2.4.6 Parámetros termodinámicos

Generalmente, la fuerza que actúa entre una molécula pequeña y una macromolécula incluye principalmente: *punto de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, electrostática y las interacciones hidrofóbicas*. Los signos y magnitudes de los parámetros termodinámicos (ΔH y ΔS) pueden dar una idea de las principales fuerzas que participan en la reacción.

Ross y Subramanian⁸⁰ han relacionado las magnitudes de los parámetros termodinámicos con los distintos tipos de interacciones involucrados en la asociación de moléculas pequeñas con proteínas. Es decir, si $\Delta H < 0$ y $\Delta S < 0$, las interacciones de Van der Waals y punto de hidrógeno juegan papeles principales en la reacción. Si $\Delta H > 0$ y $\Delta S > 0$, las interacciones hidrofóbicas son predominantes. Y por último las fuerzas electrostáticas son más importantes cuando $\Delta H < 0$ y $\Delta S > 0$.

Con el fin de poder deducir que tipo de interacciones actúan entre las FQs y la Lyz, se evaluó el efecto de la temperatura sobre la formación del complejo FQs-Lyz. Mediante la ecuación de Van't-Hoff, **ecuación 2.7**, es posible obtener tanto la entalpía como la entropía de formación del complejo. La **Figura 2.17** muestra el ajuste de los datos experimentales utilizando la ecuación de Van't-Hoff.

$$R \ln K = \Delta S - \frac{\Delta H}{T} \quad \text{Ec. 2.7}$$

Donde K es la constante de asociación, R la constante de los gases, ΔH la entalpía, ΔS entropía del sistema y T la temperatura. En todos los casos el signo de la energía libre (ΔG) es negativa, lo que indica que el proceso de interacción entre las FQs y Lyz es espontáneo. Los valores de los parámetros termodinámicos se detallan en la Tabla 2.4 y en base a estos resultados se deduce que en medio ácido y neutro, predominan las fuerzas electrostáticas tanto

para Cpx como para Nor. Para Lev, en medio ácido actúan las interacciones de Van der Waals y puente hidrógeno, y en medio neutro las interacciones hidrofóbicas. En medio básico los valores positivos de ΔH y ΔS para todas las FQs sugieren que las fuerzas de interacción hidrofóbicas son predominantes en la interacción.

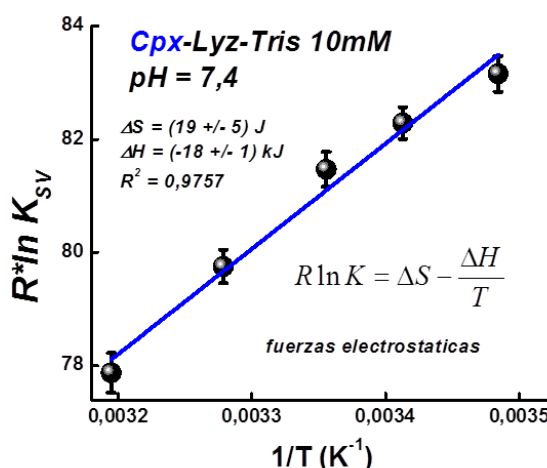


Figura 2.17 Representación de las constantes de unión entre FQs y Lyz en función de la temperatura. Ajuste de los datos con la ecuación 2.7.

Tabla 2.4 Parámetros termodinámicos de asociación entre FQs y Lyz.

FQs	Acido		Neutro		Básico	
	$\Delta H/\text{kJ}$	$\Delta S/\text{J}$	$\Delta H/\text{kJ}$	$\Delta S/\text{J}$	$\Delta H/\text{kJ}$	$\Delta S/\text{J}$
<i>Cpx</i>	-17 ± 3	10 ± 3	-18 ± 1	19 ± 5	142 ± 11	594 ± 160
<i>Nor</i>	-5 ± 1	64 ± 17	-20 ± 2	7 ± 2	-	-
<i>Lev</i>	-51 ± 4	-91 ± 24	96 ± 8	378 ± 99	47 ± 4	246 ± 65

Los resultados mostrados en la Tabla 2.4 sugieren que, para el caso de Cpx y Nor la fuerza impulsora de la interacción es la contribución entrópica, la cual favorece el cambio de energía libre. Este fenómeno se puede explicar con la base de que, cuando las moléculas de antibióticos se unen a la proteína generan un ΔS positivo, dicho cambio está dado por la liberación de las moléculas de agua que forman parte de la capa de hidratación de la enzima (la cual ayudan a estabilizarla)⁸¹. La expulsión de las aguas de hidratación hace una contribución entrópica favorable a la unión del complejo FQs-Lyz.

En el caso del antibiótico Lev en medio ácido, se observa una disminución de la entropía acompañada de un proceso exotérmico. Esto se debe a que predomina un aumento de la rigidez de la proteína cuando se asocia con Lev, lo que genera un costo entrópico al sistema. Esto se relaciona con un impedimento rotacional y traslacional para el complejo Lev-Lyz, y en general por una disminución en los grados de libertad. Un comportamiento similar fue descrito por Ross y col. para el sistema fármaco-ADN⁸⁰. Para medios neutros y básicos, si bien el cambio entálpico es positivo, predomina el término entrópico a 25°C, $T\Delta S$, con un valor de ΔG promedio de -22,5 kJ/mol.

Con el propósito de tener una idea más clara con respecto al sitio de unión y a los tipos de interacciones que estarían involucrados en la formación del complejo FQs-Lyz se realizaron cálculos teóricos, los cuales serán explicados a continuación.

2.4.7 *Modelado Docking*

Los estudios de modelado molecular fueron llevados a cabo a fin de explorar los posibles sitios de unión entre Lisozima y Ciprofloxacina usando el programa AutoDock (vers. 4.2) con el uso de las herramientas AutoDock Tools (ADT). Se modelaron dos estructuras cristalinas de Lyz (PDB ID: 3M3U y 2LYZ) bajadas a partir de RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>) y usadas eliminando sólo las moléculas de agua. La estructura 3D de la especie zwitteriónica de Cpx fue generada con el programa Gaussian View y el campo de fuerza fue optimizado con el programa Gaussian 09 al nivel de teoría B3LYP/Lanl2dz en solución acuosa, considerando el modelo de continuo polarizable (PCM). Los cálculos docking fueron realizados usando como método el algoritmo de genérico de Lamarckian (LGA). A partir de los resultados obtenidos, el mejor resultado (ej. La estructura con mayor población y menor energía de docking) fue elegido para representar el modo de enlace más favorable predicho por Autodock. Para las simulaciones se consideraron una caja grillada que encierra el sitio activo de la proteína con 60, 60, 80 Å de dimensiones y un espaciado de 0,375 Å. Los mapas de grillado para la función scoring fueron calculados usando el programa AutoGrid y para los otros parámetros fueron asignados los valores por default dados por el programa AutoDock. Las salidas del cálculo docking fueron visualizadas con el programa PyMol.

Los resultados de docking molecular predicen que la especie zwitteriónica de Cpx se aproxima por el sitio activo de Lyz con una alta tasa de probabilidad, por lo cual este sitio fue seleccionado como el de enlace. Una exploración en este sitio permitió obtener el histograma de los diferentes clusters tal como se muestra en la **Figura 18**. Como se puede observar, el cluster más poblado con casi 30 conformaciones tiene la segunda energía de enlace más baja (-

7,57 kJ/mol), por lo que se ha seleccionado este cluster para analizar el mejor modo de unión entre estas moléculas⁸².

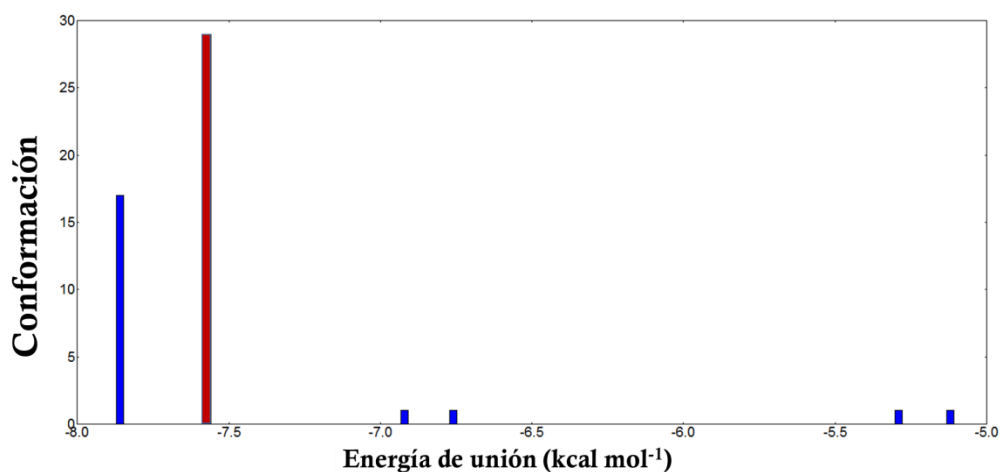


Figura 18 Histograma de los diferentes clusters cuando la especie zwitteriónica de Cpx se aproxima por el sitio activo de Lyz. Con rojo se resalta el cluster con mayor conformación.

Los resultados obtenidos para el mejor modo de enlace entre Cpx y Lyz se muestran en la **Figura 19**. A partir de la figura se puede observar que el antibiótico ingresa por el lado del anillo de piperazina, en las proximidades de los residuos Trp 62 y Trp 63, quedando el anillo de fluoroquinolona dirigida hacia el exterior del sitio activo de la proteína.



Figura 19 Representación de la aproximación de Cpx por el lado del anillo piperazina hacia la proteína Lyz.

Como podemos observar en la **Figura 2.20**, la molécula de Cpx está rodeada de 8 residuos más próximos, de los cuales 3 son residuos Hidrofóbicos (Ile 96, Ala 107, Gln 57), 3 son residuos Hidrofílicos (Trp 62, Trp 63, Trp 108) y 2 son residuos iónicos (Asp 52, Glu 35). Es importante destacar que los anillos de Cpx están más adyacentes hacia los residuos hidrofílicos, por lo que las fuerzas de atracción electrostática serían las que contribuyen en mayor proporción a la interacción. Además los cálculos docking predicen dos tipos de interacciones puente hidrógeno entre los átomos de H del grupo NH_2^+ de Cpx con los grupos C=O de Glu 35 a una longitud de enlace de 2,0 Å y del residuo Gln 57 a una longitud de 2,2 Å. La formación de estos puente de hidrogeno pueden contribuir a la estabilización del sistema por fuerzas hidrofóbicas.

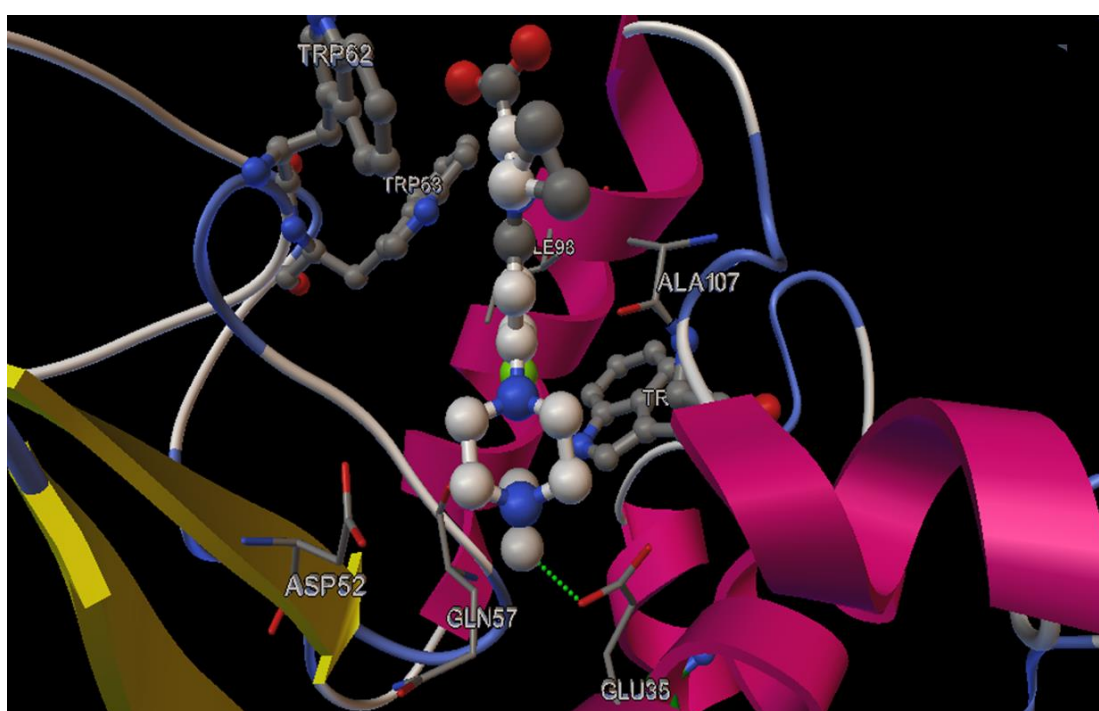


Figura 2.20 Sitio de unión Cpx zwitterión (pelotas y tubos), residuos del sitio de interacción. Los residuos de Trp 62, 63 y 108 son mostrados como pelotas. Las líneas verdes punteadas representan interacción puente hidrogeno predicho por el docking

Estos resultados teóricos son consistentes con los obtenidos experimentalmente en el apartado anterior, donde los valores de ΔH y ΔS predicen que los tipos de interacción entre Ciprofloxacina y Lisozima involucran fuerzas electrostáticas y fuerza hidrofóbicas con la presencia de interacciones puente hidrógeno.

2.4.8 Interacción entre el estado excitado triplete de FQs y Lyz, LFP

La excitación por radiación UV del estado fundamental S_0 de las FQs induce la formación del estado singulete excitado S_1 , el cual mediante entrecruzamiento de sistema ($\Phi_{ISC} \approx 0,5-0,2$)²⁹

genera la eficiente población del estado triplete T_1 . Como todo estado excitado triplete, en soluciones desoxigenadas, las FQs se caracterizan por poseer un tiempo de vida de relajación al estado fundamental S_0 en microsegundos.

Se utilizó el mismo protocolo que en los experimentos de LFP realizados para determinar la interacción de los estados excitados tripletes de las FQs con el Tris (ver página 24), excitación de laser a 355 nm, concentración de FQs $\approx 70 \mu\text{M}$ en solución de buffer Tris (10 mM a pH 7,4). La **Figura 2.21A** muestra los espectros de absorción de transitorios de soluciones de Cpx y con la presencia de Lyz. Se destaca una banda en la región del visible que va desde 400-750 nm, característica de las FQs^{25,65,83}.

Los espectros de transitorios representan la diferencia de absorción entre el estado excitado triplete y el estado singulete fundamental $\Delta A_{TS}(\lambda, t)$ de las FQs, **ecuación 2.8**.

$$\Delta A_{TS}(\lambda, t) = A_T(\lambda, t) - A_{S_0}(\lambda) = l(\varepsilon_T^\lambda - \varepsilon_{S_0}^\lambda)C_T(t) = l\Delta\varepsilon_{TS}C_T(t) \quad \text{Ec. 2.8}$$

Donde $A_{S_0} = l\varepsilon_{S_0}^\lambda C_{S_0}$ es la absorción del estado fundamental de la solución de FQs antes del disparo del láser ($t < 0$), mientras que la absorbancia post-disparo del láser ($t > 0$) es $A_T = l\varepsilon_{S_0}^\lambda (C_{S_0} - C_T) + l\varepsilon_T^\lambda C_T$.

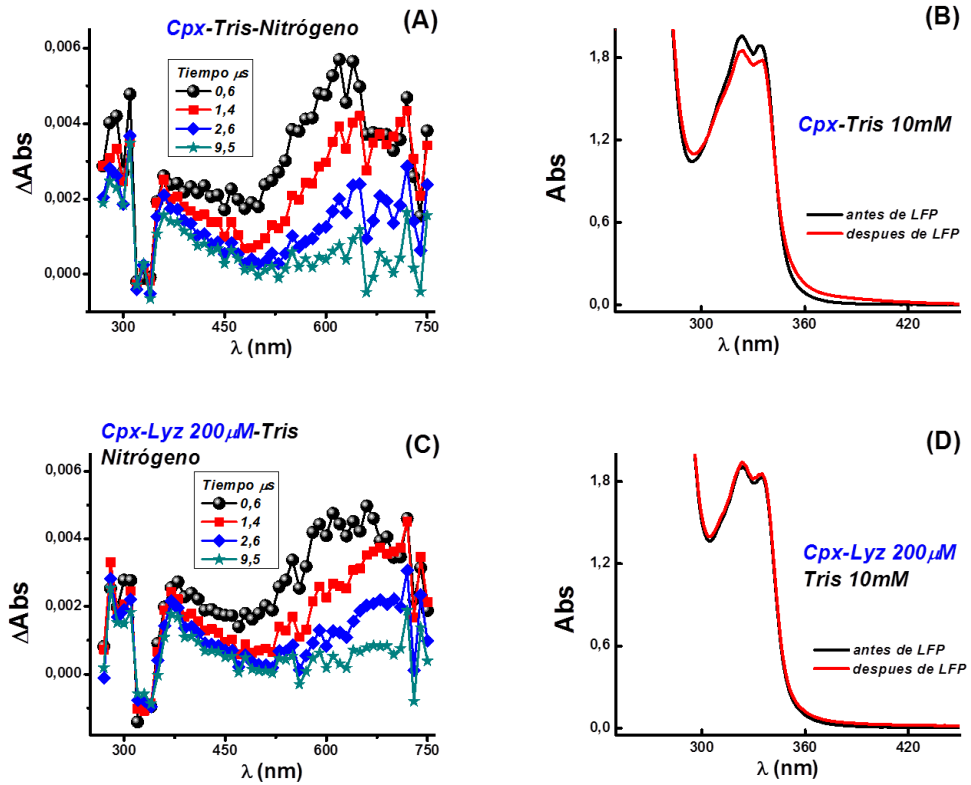


Figura 2.21 Espectro de absorción triplete-triplete de Cpx ($\approx 70 \mu\text{M}$) en solución buffer Tris 10 mM. Con excitación del láser a $\lambda_{exc} = 355 \text{ nm}$, $\approx 4 \text{ mJ pulso}^{-1}$ (A) y en presencia de Lyz = 200 μM (C). Espectros de absorción estacionario de Cpx antes (B) y después de la incidencia del láser (D).

El espectro diferencia $\Delta A_{TS}(\lambda, t)$ de las FQs muestra un punto isobéstico alrededor de 340 nm, además de las bandas de absorción debido al blanqueo del estado fundamental con máximo a 330 nm (banda de absorción negativa) por la formación de los estados excitados. Las bandas de absorción positivas en el visible a $\lambda > 360$ nm corresponden a la absorción de estados transitorios como el estado excitado triplete, ya que el estado fundamental S_0 de las FQs no absorbe luz a longitudes de onda mayores. En particular la banda de absorción de la transición de menor energía $T_1 \rightarrow T_2$ de las FQs se produce entre 600-750 nm con máximos vibracionales en 610-650 nm, aproximadamente.

Los espectros de absorción de transitorios de las FQs a tiempos de monitoreo $\tau_{\text{obs}} < 10$ μs después del pulso laser de excitación no presentan cambios significativos cuando la Lyz se encuentra presente. En los espectros de absorción estacionarios, la presencia de Lyz impide la fotodegradación de las FQs debido a la incidencia del láser (**Figura 2.21B**).

Los tiempos de vida de estados excitados tripletes (τ^T) de FQs decaen en el rango de microsegundos (ver **Tabla 2.5**). La **Figura 2.22**, representa como la presencia de Lyz a una solución de Cpx no afecta significativamente su τ^T . Este fenómeno se observó para todas las FQs estudiadas.

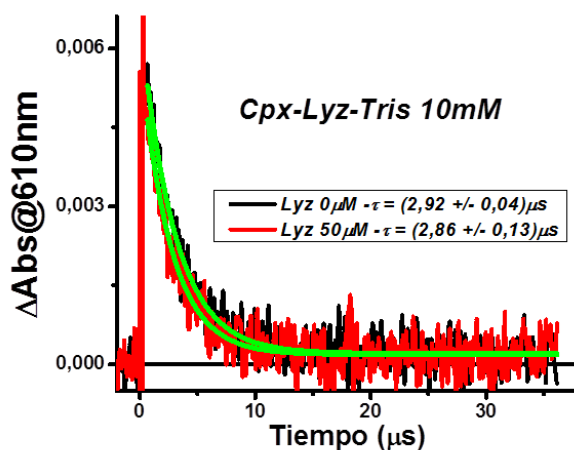


Figura 2.22 Decaimiento de los tiempos de vida del estado excitado triplete de Cpx ($\approx 70 \mu\text{M}$) en solución de buffer Tris 10 mM, en atmósfera saturada de nitrógeno: en ausencia (línea negra) y presencia de Lyz 200 μM (línea roja). La muestra fue excitada a 355 nm y las señales se registraron a 610 nm.

Tabla 2.5 Tiempos de vida del estado excitado triplete de FQs ($\approx 70 \mu\text{M}$) en función de la concentración de Lyz.

$[Lyz] \mu\text{M}$	$\tau^T / \mu\text{s}$		
	<i>Cpx</i>	<i>Nor</i>	<i>Lev</i>
0	$2,92 \pm 0,04$	$3,26 \pm 0,06$	$2,87 \pm 0,06$
50	$2,86 \pm 0,13$	$3,38 \pm 0,08$	$2,87 \pm 0,07$
100	$3,24 \pm 0,16$	$3,29 \pm 0,05$	$2,85 \pm 0,10$
150	$2,75 \pm 0,20$	$3,27 \pm 0,06$	$2,76 \pm 0,16$
200	$2,64 \pm 0,24$	$3,26 \pm 0,06$	$2,81 \pm 0,11$

2.4.9 Interacción entre el estado excitado triplete de FQs y $^3\text{O}_2$

El oxígeno molecular ($^3\text{O}_2$) juega un papel preponderante en los procesos fotofísicos y fotoquímicos. Es importante por su abundancia (21% en la atmósfera) y por sus propiedades especiales que incluyen: **1**- la multiplicidad de spin, **Figura 2.23** ($^3\Sigma_g^- = ^3\text{O}_2$) lo cual favorece los procesos de cruce entre sistemas por su estructura electrónica, **2**- posee estados excitados de baja energía que pueden ser poblados por procesos de quenching por transferencia de energía con otros estados excitados y **3**- se reduce con relativa facilidad a superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)⁸⁴. Estas características hacen que sea muy reactivo y por lo tanto, un excelente desactivador (quencher) de estados excitados.

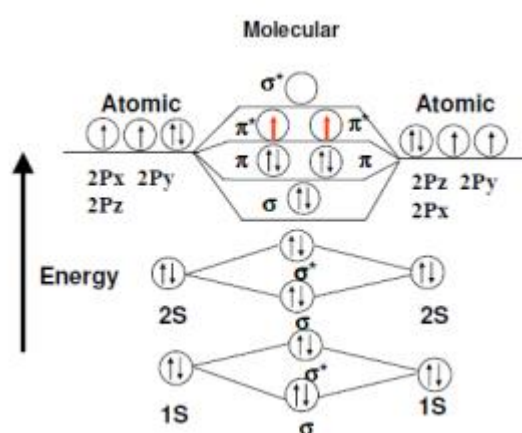


Figura 2.23 Diagrama de energía del oxígeno molecular en su estado fundamental. Los electrones π^* se encuentran desapareados (flechas rojas).

La desactivación se lleva a cabo a través de un proceso bimolecular, en que el estado excitado y el desactivante deben estar en contacto, **Figura 2.24**.

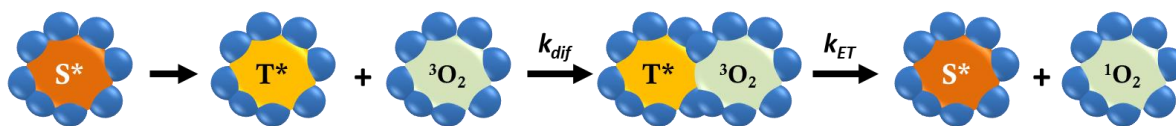


Figura 2.24 Representación de la desactivación de estados excitados de FQs por O_2 en solución. En el caso de FQs, el estado excitado singlete (S^*) por cruce entre sistema pasa al estado triplete (T^*) que reacciona con el oxígeno molecular para formar oxígeno molecular singlete (1O_2) y S regresa al estado fundamental. Las esferas azules representan a las moléculas de solvente.

Por lo tanto, la eficiencia estará determinada por la velocidad de difusión del *quencher*, su concentración en la solución, y por el tiempo de vida del estado excitado de la molécula que puede potencialmente ser desactivada. La constante de difusión de oxígeno en agua y en solvente orgánico es $\sim 10^9$ y $\sim 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-2}$, respectivamente. El tiempo de vida de los estados tripletes de FQs en solución saturada de argón en solvente acuoso es $\sim 3 \mu\text{s}$. Por lo tanto, el oxígeno se convierte en un poderoso agente desactivador de estos estados transitorios.

Para determinar la influencia del O_2 en el estado excitado triplete de las fluoroquinolonas, se saturaron las muestras con Argón y Oxígeno durante 30–40 minutos. Se registraron los decaimientos de los estados excitados por detección en la región $\approx 600 \text{ nm}$, región en donde absorbe el estado triplete de las FQs y se utilizó la ecuación 2.5 para ajustar los datos. En la **Figura 2.25** se observa un eficiente quenching ($k_q^T \approx 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) de los estados tripletes de las FQs por la concentración de O_2 disuelto en la solución.

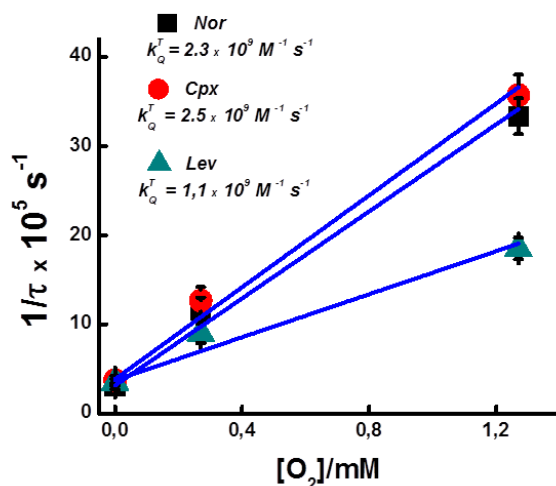
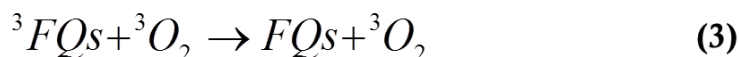
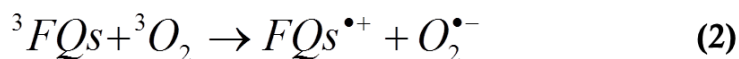
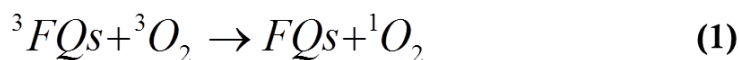


Figura 2.25 Representación del quenching de los tiempos de vida en estados excitados triplete de FQs ($\approx 70 \mu\text{M}$) en solución de buffer Tris 10 mM, en función de la concentración de O_2 disuelto en la solución. Los datos fueron ajustados con la ecuación 2.5

Las posibles reacciones entre el estado excitado triplete de las FQs y el oxígeno molecular son: transferencia de energía (TE) con la formación de oxígeno singlete (1O_2), transferencia de

electrones para formar el anión superóxido y el radical catión FQs (2), quenching físico (3), **Esquema 2.** De hecho el oxígeno singlete y el radical anión superóxido fueron observados irradiando la luz en soluciones de FQs^{85,86}.



Esquema 2 Procesos de desactivación de FQs en estado excitado triplete con 3O_2 .

Dado que el quenching del estado triplete de las FQs con el oxígeno es muy eficiente, se evaluó la capacidad de formación de oxígeno singlete a través del proceso de fotosensibilización.

2.4.10 Determinación del rendimiento cuántico de formación de oxígeno singlete 1O_2 , (Φ_Δ)

El proceso de fotosensibilización es la transformación fotoquímica o fotofísica de una entidad molecular como resultado de la absorción de radiación de un fotosensibilizador⁸⁷. Debido a que las FQs pueden producir estos cambios sobre otras moléculas, se las denomina sensibilizadores o fotosensibilizadores.

En presencia de oxígeno molecular, un fotosensibilizador puede llevar a cabo dos procesos: **a)** de transferencia de electrones, conocido como mecanismo Tipo I, o **b)** de transferencia de energía o Tipo II, con formación de especies reactivas de oxígeno tales como radical hidropéroxilo y anión superóxido ($HO_2^{\bullet}/O_2^{\bullet-}$) y oxígeno singlete 1O_2 , respectivamente⁸⁸, **Figura 2.26.**

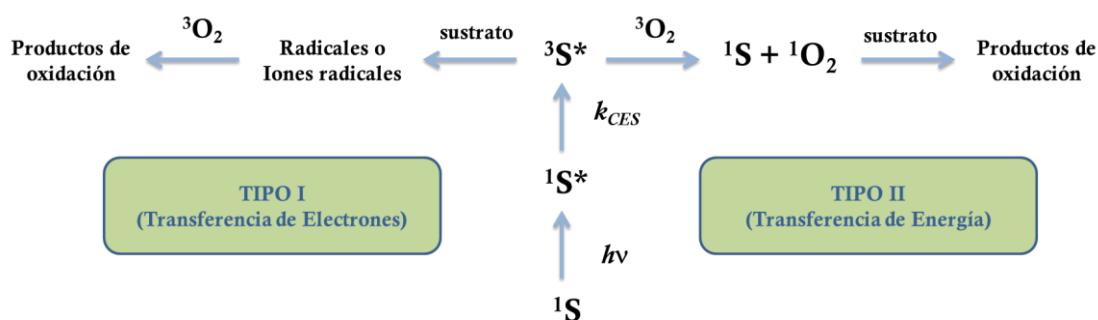


Figura 2.26 Procesos oxidativos del tipo I y II, fotosensibilizados por una molécula S (fotosensibilizador), que en este trabajo representa a las fluoroquinolonas Cpx, Nor y Lev.

Se determinó el rendimiento cuántico de formación de $^1\text{O}_2$ utilizando como actinómetro de referencia al complejo de rutenio tris bipiridilo [tris (2, 2'-bipyridyl) rhutenium (II) chloride] (Rubpy, $\Phi_\Delta = 0,41$) disuelto en buffer Tris 10 mM en agua deuterada, de la misma absorbancia a la λ_{ex} que las FQs estudiadas. Muestra y sensibilizador fueron excitados a $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$ y se detectó la señal de fosforescencia del $^1\text{O}_2$ formado (1270 nm). **Figura 2.27.**

Las señales de decaimiento de $^1\text{O}_2$ fueron ajustadas utilizando la función monoexponencial dada en la **ecuación 2.9**, donde τ_Δ es el tiempo de vida de $^1\text{O}_2$ generado, I_∞ es la intensidad de fosforescencia a $t \sim \infty$ y I_0 es la intensidad de fosforescencia a $t \sim 0$, y es el valor que debe obtenerse para el cálculo de Φ_Δ .

$$I_t = I_\infty + I_0 \times \exp\left(-\frac{t}{\tau_\Delta}\right) \quad \text{Ec. 2.9}$$

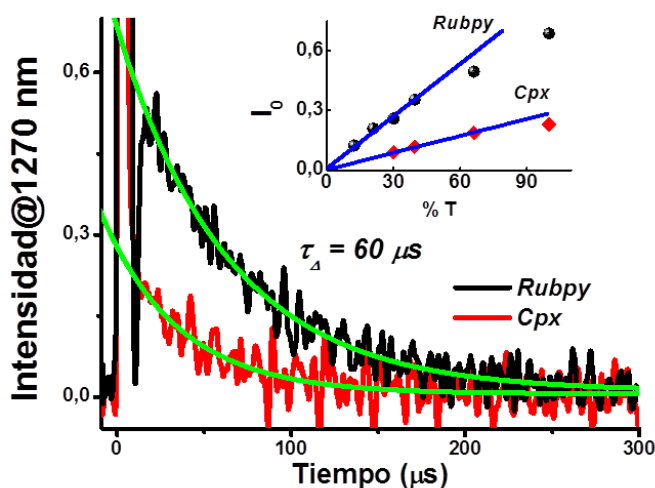
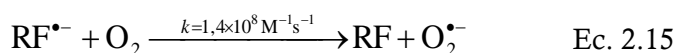
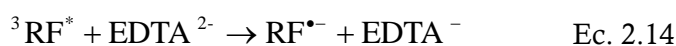


Figura 2.27 Señal de fosforescencia de $^1\text{O}_2$ formado por excitación laser de Rubpy y Cpx, ambas en solución buffer Tris 10 mM en D_2O pD 7,4. Inserto: variación de I_0 en función de % T (actinometría).

Una vez obtenidos los valores de I_0 , el valor de Φ_Δ se obtuvo aplicando la **ecuación 2.10**. Donde $I_0(X)$ y $I_0(R)$, indican el valor de intensidad de fosforescencia a tiempo cero para muestra y referencia, respectivamente.

$$\Phi_X = \Phi_R \times \frac{I_0(X)}{I_0(R)} \times \frac{Abs_{355}(R)}{Abs_{355}(X)} \quad \text{Ec. 2.10}$$

Los valores de Φ_Δ de las FQs muestran sólo pequeñas variaciones a pesar de las diferencias estructurales. Estos resultados están representados en la **Figura 2.28**.



El $\text{O}_2^{\bullet-}$ producido de esta manera, reacciona con el NBT según las ecuaciones anteriores. De esta manera es posible confirmar la formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ por comparación de las cinéticas de formación de la especie coloreada en la reacción de referencia y en nuestro sistema compuesto por Cpx en las mismas condiciones de iluminación, tal como muestra la **Figura 2.29**.

Comparando las pendientes iniciales de las cinéticas de producción de MF^+ a 580 nm, es posible calcular el rendimiento cuántico relativo de formación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ por Cpx. El valor obtenido es $\Phi_{\text{O}_2^{\bullet-}} = 5,3 \times 10^{-5}$, el cual es unas 200 veces menor que el sistema RF y EDTA.

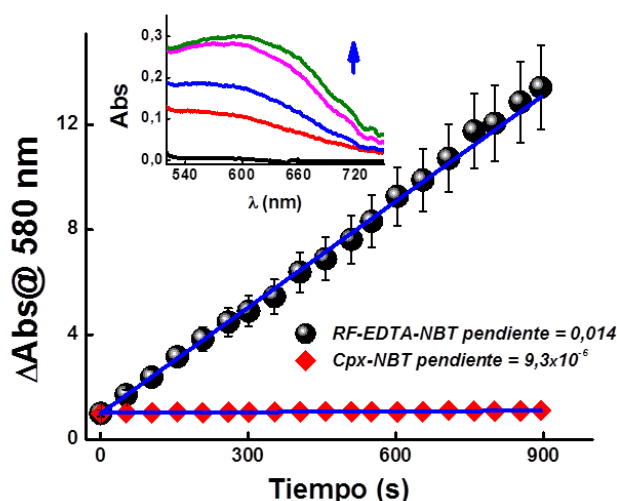


Figura 2.29 Cinéticas de reducción de NBT por $\text{O}_2^{\bullet-}$ con excitación a 330 nm. Condiciones experimentales: RF = 5 μM , EDTA = 3 mM, NBT = 35 μM , Cpx = 60 μM . Inserto se muestra el crecimiento en el tiempo de la banda de formazan MF^+ .

2.5 Conclusiones Parciales

Los resultados expuestos hasta aquí indican que el mecanismo de interacción entre las FQs y la Lyz está controlado por la formación del complejo FQs-Lyz en el estado fundamental, sin involucrar los estados excitados tanto singulete como triplete de los antibióticos.

Resultados 2-Capítulo 3

Propiedades Fotoquímicas de Fluoroquinolonas con Lisozima en solución homogénea

3 Propiedades fotoquímicas de Fluoroquinolonas con la Proteína Lisozima

Los antibióticos fluoroquinolonas son moléculas fotolábiles. Así, cambios en la estructura química base nos permite variar no solo su eficacia y su potencia farmacológica sino aumentar o disminuir su fotoestabilidad y por consiguiente sus efectos adversos. La fotodegradación de las FQs en medio neutro y acuoso da lugar a la pérdida de un átomo de flúor. Chignell y colaboradores⁹⁴ describieron por primera vez estas fotodeshalogenaciones en un estudio que realizaron sobre FQs monofluoradas (Nor, Cpx, Enx) y difluoradas (Lfx, Frx). Observaron que la Lfx era la FQs con mayor velocidad media de liberación de F y estimaron un valor de rendimiento de degradación de 0,98. Es por lo expuesto de suma importancia el estudio fotoquímico de las FQs y el efecto de la proteína en la cinética de fotodegradación.

3.1 Aspectos experimentales

3.1.1 Materiales

Las soluciones de fluoroquinolonas en buffer Tris 10 mM fueron preparadas con agua ultra pura. En todos los casos la concentración final de FQs en la solución fue $\approx 12 \mu\text{M}$, excepto para las medidas de FTIR donde fue de $60 \mu\text{M}$

3.1.2 Métodos

Espectroscopia UV- Visible estacionaria

Los espectros de absorción se registraron en un espectrofotómetro UV-visible Hewlett Packard 8453. Los espectros de emisión, en un espectrofluorómetro Hitachi F-2500, en celdas de cuarzo de 1 cm, con rendijas de excitación 20 nm y emisión de 5 nm y con $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$.

Espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo por recuento de fotones individuales correlacionado temporalmente (TCSPC)

Los experimentos fueron realizados en un aparato Tempro-01 de Joriba Jovin Yvon, utilizando una fuente de excitación pulsada ultra rápida de $340 (\pm 15) \text{ nm}$, Nanoled®, 1Mhz. La longitud de onda de emisión fue seleccionada con un monocromador de 12 nm de ancho de banda de emisión. Para la obtención de los Espectros Asociados a los Decaimientos (DAS) se registraron las señales en el rango de 340-560 nm.

Espectros Infrarrojo con Transformada de Fourier

Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en un equipo JASCO FT-IR Spectrometro, modelo FT/IR-4600, JAPON usando el accesorio de reflectancia total Atenuada (ATR PRO ONE). Para ello se registraron en el rango entre los 4000 y 500 cm^{-1} en el modo absorbancia usando 32 scans de barrido y una resolución de 4 cm^{-1} . Los datos fueron tratados con una función de anodización de Blackman-Harris con 3-term y el algoritmo Mertz para la corrección de fase. El programa Opus 7.4 fue usado para el procesamiento de los espectros experimentales.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y a temperatura ambiente.

Resultados y discusiones.

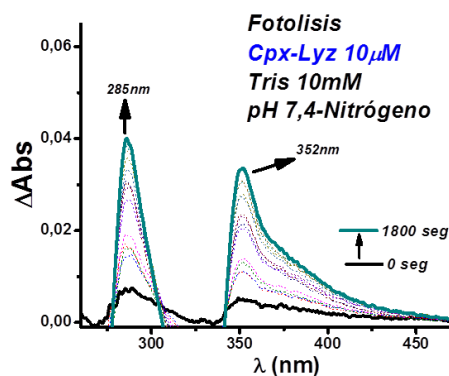
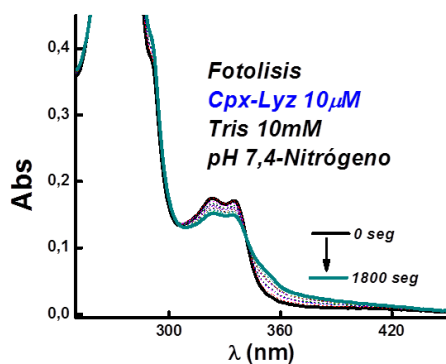
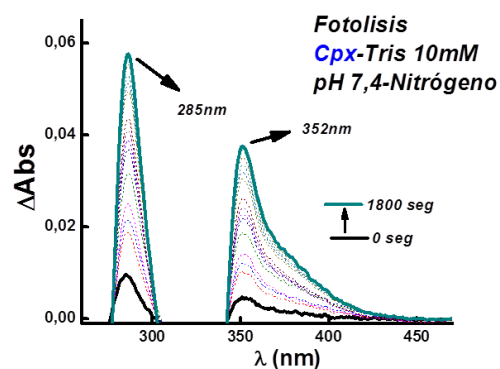
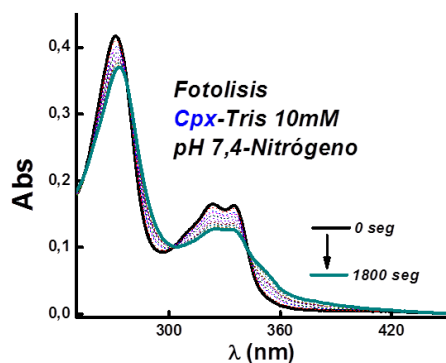
3.2 Fotodegradación de Fluoroquinolonas

3.2.1 Fotólisis estacionaria

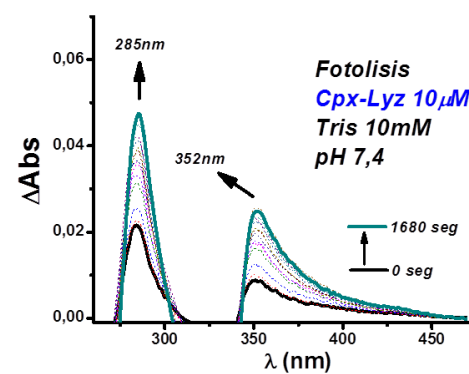
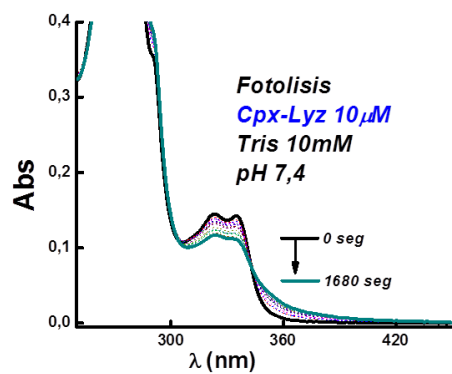
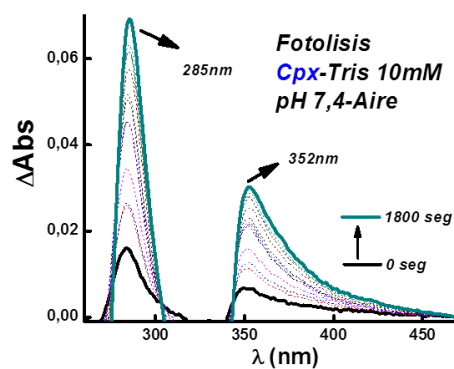
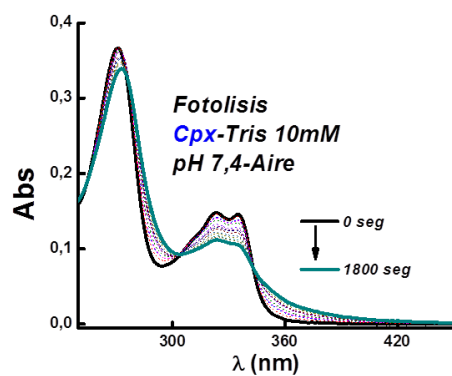
Se estudió la fotoestabilidad de las FQs, para ello se fotolizaron soluciones de FQs ($\approx 12 \mu\text{M}$) a distintas concentraciones de Lyz durante 30 minutos, en atmósfera de Nitrógeno, Aire y Oxígeno. Se utilizó el espectrofluorómetro F2500 como fuente de iluminación, seleccionando como $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$, con slit de excitación de 20 nm. Cada 2 minutos se registraron los espectros de absorción y fluorescencia. La evolución de los cambios en los espectros de absorbancia de las FQs durante la fotólisis se muestra en la **Figura 3.1**.

Las FQs consideradas se degradan bajo irradiación de la luz, destacándose la disminución de la banda centrada en 270 nm así como la banda en 330 nm. Asimismo la fotólisis genera nuevas bandas en la región de 295-310 nm y 340-370 nm las cuales pueden estar relacionadas con la formación de fotoproductos. Como puede observarse en la Figura 3.1 la presencia de Lyz disminuye el fotoconsumo de Cpx durante la fotólisis, este mismo efecto se observó en los experimentos de LFP (**Cap. 2**) donde los espectros de absorción de Cpx cambian luego de ser irradiados con el láser a $\lambda_{\text{ex}} = 335 \text{ nm}$ pero no así cuando la proteína estaba presente en la solución (Figura 2.21). Esto estaría indicando que la interacción o la formación del complejo Cpx-Lyz retarda o impide la degradación del antibiótico. El mismo efecto se observa cuando el oxígeno molecular está presente en la solución, lo cual será discutido más adelante.

Atmosfera de Nitrógeno



Atmosfera de Aire



Atmosfera de Oxígeno

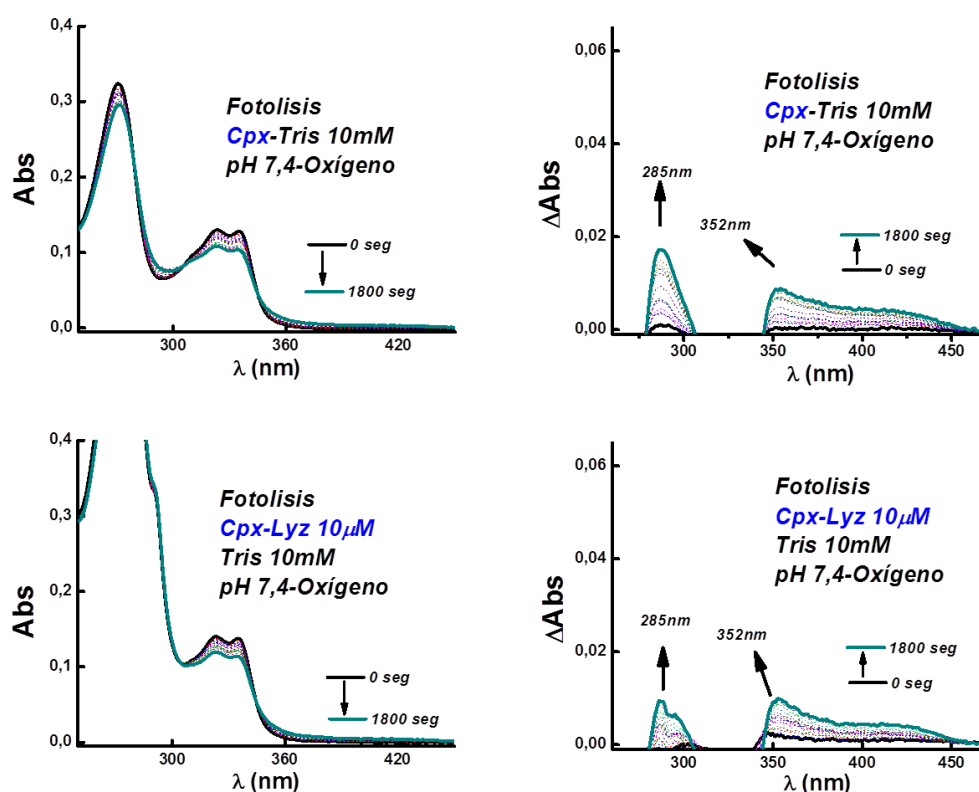


Figura 3.1 Espectros de absorción de Cpx ($\approx 12 \mu\text{M}$) en solución buffer Tris 10 mM, irradiados durante 30 minutos con $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$ en ausencia y presencia tanto de Lyz 10 μM , así como de diferentes concentraciones de oxígeno.

En la fotólisis del antibiótico Lev, en solución saturada con nitrógeno, cuando está presente la enzima Lyz se observa un fenómeno diferente a las otras FQs. En los espectros de absorción se destaca un incremento de la absorbancia en la región de 330 nm y la aparición de una nueva banda en la región de 270-310 nm y 340-370 nm, tal como se muestra en los espectros diferencia insertos en la Figura 3.2 (A). Estos cambios producidos en la fotólisis de Lev, podrían explicarse por la formación de un fotoaducto, de forma similar a lo observado por otros investigadores en el caso de la fotoestabilidad de Lomefloxacin (Lfx) unida a la proteína Albúmina Sérica Humana (HSA), para la cual reportaron la formación de un fotoaducto que puede producir fotoalergia³⁶, **Figura 3.2 (B)**.

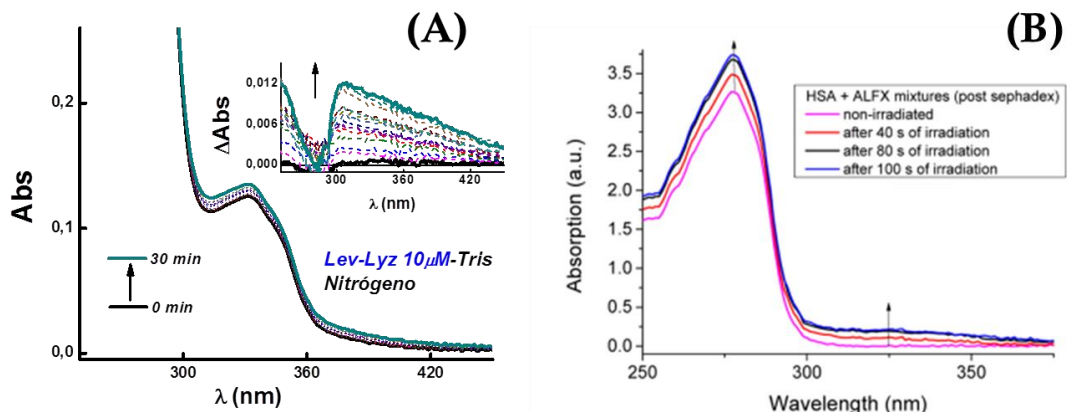


Figura 3.2 Espectros de Absorbancia registrados durante la fotólisis de Lev-Lyz en buffer Tris 10 mM pH 7,4 irradiados durante 30 minutos con $\lambda_{ex} = 330$ nm (A), Lfx-HSA imagen de la referencia³⁶ (B).

3.2.2 Cinética de fotoconsumo

Con los valores de absorbancia en la longitud de onda de 330 nm, se pudo comparar el efecto de Lyz en las velocidades iniciales de fotoconsumo de las FQs. A partir de estos datos se calcularon los rendimientos cuánticos de consumo de las FQs (Φ_{FC}), en las diferentes concentraciones de Lyz y oxígeno disuelto, con el propósito de observar el efecto de ellos en la fotoquímica de las FQs (**Tabla 3.1**).

Para ello se determinó el flujo fotónico absorbido por el soluto, $q_{n,p}$, realizando una actinometría para las condiciones de irradiación dadas. Se utilizó el ferrioxalato de potasio como actinómetro químico. Una vez irradiado el actinómetro a $\lambda_{ex} = 330$ nm se mezcla con una solución de o-fenantrolina formando un complejo coloreado que absorbe en 510 nm y mediante la **ecuación 3.1** se determina el flujo fotónico.

$$q_{n,p} = \frac{\Delta AV_1 V_2}{\phi(\lambda) \epsilon(510nm) V_2 t} \quad \text{Ec 3.1}$$

En fotoquímica es más útil el parámetro densidad de flujo fotónico ($q_{p,n}^V$), que puede definirse como el número de fotones absorbidos por el soluto por unidad de tiempo y por unidad de volumen. Si "V" es el volumen de la solución, la relación entre $q_{n,p}$ y $q_{p,n}^V$ viene dada por la **ecuación 3.2**.

$$q_{n,p}^V = \frac{q_{n,p}}{V} \quad \text{Ec. 3.2}$$

El Φ_{FC} para una reacción fotoquímica se define como el cociente entre la cantidad de reactivo consumido o de producto formado y número de fotones absorbidos. Si se mide la velocidad de desaparición de un reactivo ($\partial[R]/\partial t$) o la velocidad de aparición de un producto ($\partial[P]/\partial t$) puede calcularse el rendimiento cuántico de una reacción mediante la **ecuación 3.3**.

$$\Phi_{FC} = \frac{\partial[R]/\partial t v_{0x}}{q_{n,p}} \quad \text{Ec. 3.3}$$

Los valores de rendimientos de cuánticos de fotoconsumo de las FQs se detallan en la siguiente tabla.

Tabla 3.1 Rendimientos cuánticos de fotoconsumo para Cpx y Nor, y de fototransformación de Lev en N_2 , Aire y O_2 .

[Lyz]/ μM	Cpx			Nor			Lev		
	$\Phi_{FC}(x10^3)$			$\Phi_{FC}(x10^3)$			$\Phi_{FC}(x10^3)$		
	N_2	Aire	O_2	N_2	Aire	O_2	N_2	Aire	O_2
0	$8,60 \pm 0,02$	$5,21 \pm 0,02$	$4,40 \pm 0,02$	$1,42 \pm 0,01$	$1,61 \pm 0,03$	$0,60 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,02$	$0,72 \pm 0,15$	$0,73 \pm 0,20$
2	$6,61 \pm 0,01$	$5,10 \pm 0,02$	$2,90 \pm 0,03$	$1,26 \pm 0,02$	$0,82 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,03$	-	$1,00 \pm 0,04$	$0,11 \pm 0,05$
6	$2,60 \pm 0,04$	$3,90 \pm 0,01$	$1,61 \pm 0,02$	$1,00 \pm 0,02$	$0,64 \pm 0,01$	$0,50 \pm 0,02$	$0,31 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,01$	$0,21 \pm 0,03$
10	$3,52 \pm 0,03$	$3,10 \pm 0,01$	$1,61 \pm 0,01$	$0,51 \pm 0,02$	$0,60 \pm 0,02$	$0,41 \pm 0,01$	$1,20 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,01$	$0,80 \pm 0,01$

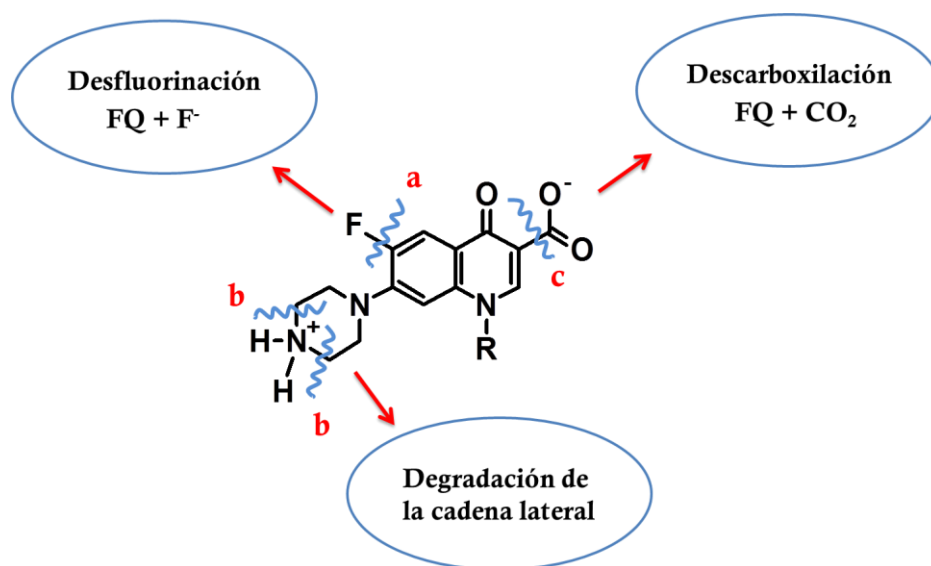
Como se puede ver en la Tabla 3.1, para Cpx y Nor a una concentración fija de oxígeno (por ejemplo en nitrógeno) los valores de Φ_{FC} disminuyen cuando está presente Lyz durante la fotólisis, indicando que la proteína puede estar cumpliendo un rol protector, disminuyendo la fotodegradación de estos antibióticos. Este fenómeno no se observa para el antibiótico Lev en nitrógeno, donde como se mencionó anteriormente la presencia de Lyz puede estar generando la formación de un fotoaducto. En cambio en aire y en solución saturada con oxígeno, se observa una disminución de los Φ_{FC} de Lev por Lyz tal como ocurre con las otras FQs.

Por otro lado, a una misma concentración de Lyz, el hecho de que el oxígeno disuelto tenga un efecto moderado sobre el Φ_{FC} sugiere que un estado excitado de corta duración está implicado en la reacción, tal como lo sugieren Monti y colaboradores, donde observaron un transitorio de 80 ns cuando irradiaron en forma intermitente (flash) una solución de enofloxacina (Enx) y lo atribuyeron al estado excitado triplete²⁵.

Además, tal como se determinó en el capítulo anterior (**Cap. 2**), existe un eficiente quenching entre el estado excitado triplete de las FQs con el oxígeno molecular ($k_q^T \approx 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Por lo que esta interacción explica el efecto del O_2 en la fotólisis y pone de manifiesto que la fotoquímica de estos antibióticos involucra la vía de los estados excitados tripletes.

3.3 Productos de Fotodegradación

La aparición de nuevas bandas de absorción y fluorescencia después de la fotoexcitación se debe a los productos generados por la fotólisis. Varios tipos de sitios moleculares fotoquímicamente lábiles han sido reconocidos (**Esquema 3**), entre los cuales el enlace carbono-flúor es particularmente importante.



Esquema 3 Procesos relevantes para la fotoquímica de las FQs. (a) proceso de desfluorinación, (b) degradación de la cadena lateral o ruptura del anillo piperazina y (c) proceso de descarboxilación.

3.3.1 Efecto de ácido ascórbico en el fotoconsumo de Cpx

La vitamina C (ácido ascórbico) es conocido por actuar como un antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo*. Tiene la capacidad de atrapar (*scavenger*) radicales activos y estables de oxígeno⁹⁵. Para dilucidar si el proceso de fotoconsumo del antibiótico viene acompañado por la generación de radicales libre, se realizó la fotólisis en las mismas condiciones de trabajo descriptas anteriormente y se agregó distintas concentraciones de ácido ascórbico. La **Figura 3.3** presenta los cambios en los espectros de absorbancia de Cpx en presencia del *scavenger*, destacándose que la presencia del ácido no influye en la fotodegradación del antibiótico (inserto en la Figura 3.3). Por lo tanto, se puede inferir, que el camino de fotoconsumo de Cpx no involucra radicales libres.

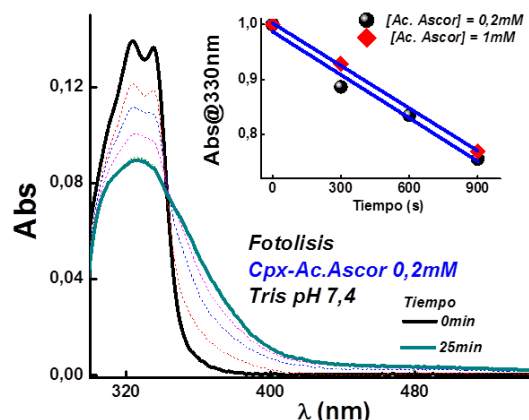
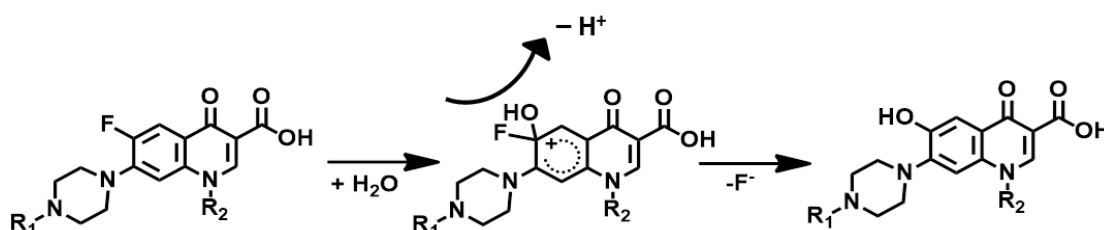


Figura 3.3 Espectro de absorción de una solución de Cpx ($\approx 12 \mu\text{M}$) en buffer Tris 10 mM irradiado durante 25 minutos con $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$ en presencia de ácido ascórbico. Inserto cinética del consumo de Cpx en 330 nm a distintas concentraciones de ácido ascórbico.

3.3.2 Determinación de las vías de fotodegradación.

La fotorreacción principal de las fluoroquinolonas en condiciones de pH neutro es la desfluorinación^{96,97}. Este proceso es debido a la fotosustitución del átomo de flúor por un grupo hidroxilo aportado por las moléculas de agua del solvente (ruta "a" en el Esquema 3) generando el correspondiente 6-hidroxiquinolona. Dicho proceso se representa en el siguiente Esquema 4.



Esquema 4 Representación del proceso de desfluorinación de FQs.

Es importante notar que las transiciones electrónicas de estos compuestos implican una transferencia de carga interna considerable, ya que contienen tanto grupos donante de electrones (en este caso el grupo dialquilamino) y aceptor de electrones (el átomo de flúor). Por lo tanto, la densidad de carga se transfiere al anillo aromático tras la excitación y esto facilita la pérdida de flúor.

Este fenómeno no puede ser un proceso homolítico, ya que la energía de disociación del enlace C-F aromático ($\approx 120 \text{ kcal M}^{-1}$) supera en gran medida la del singulete ($\approx 82 \text{ kcal M}^{-1}$, a partir de la fluorescencia) y al estado del triplete ($\approx 69 \text{ kcal M}^{-1}$, desde la fosforescencia) de estas moléculas⁹⁷.

Para corroborar que ocurra dicho mecanismo, se realizó la fotólisis Cpx ($12\ \mu\text{M}$) en solución de NaCl $10\ \text{mM}$ a la cual se le ajustó el pH a $7,4$ por la adición de pequeñas alícuotas de una solución de NaOH $0,1\ \text{M}$, **Figura 3.4**. Después de la irradiación constante (con $\lambda_{\text{ex}} = 330\ \text{nm}$) durante 30 minutos a la solución del antibiótico, se registró una disminución del pH con un valor de $6,8$, lo que da una idea que el proceso de *Desfluorinación* ocurre durante la fotólisis del antibiótico. Tal como se representa en el Esquema 4, este mecanismo de fotodegradación de Cpx viene acompañado de la hidrólisis del agua para formar la hidroquinona correspondiente, lo cual libera protones al medio y por lo tanto disminuyendo el pH de la solución.

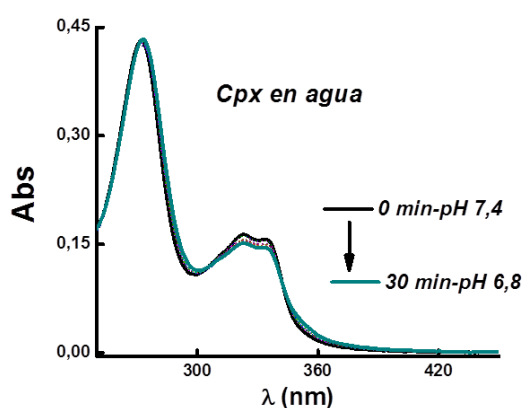


Figura 3.4 Espectros de absorción de Cpx ($12\ \mu\text{M}$) en solución de NaCl $10\ \text{mM}$ a pH $7,4$, irradiados durante 30 minutos con $\lambda_{\text{ex}} = 330\ \text{nm}$.

3.3.3 Estudios mediante fluorescencia

La **Figura 3.5** representa los espectros de fluorescencia registrados durante la fotólisis con $\lambda_{\text{ex}} = 330\ \text{nm}$ de Cpx ($\approx 12\ \mu\text{M}$) en buffer Tris $10\ \text{mM}$ pH $7,4$. Debido a que, la sustitución del átomo de Flúor (-F) por el grupo hidroxilo (-OH), que es un grupo donador de electrones, induce un ensanchamiento y corrimiento del espectro de fluorescencia en un anillo aromático⁹⁸; y dichos cambios se observan en la emisión durante la irradiación constante de Cpx, se puede suponer que la vía de *Desfluorinación* ocurre durante la fotodegradación del antibiótico, tal como se vio anteriormente.

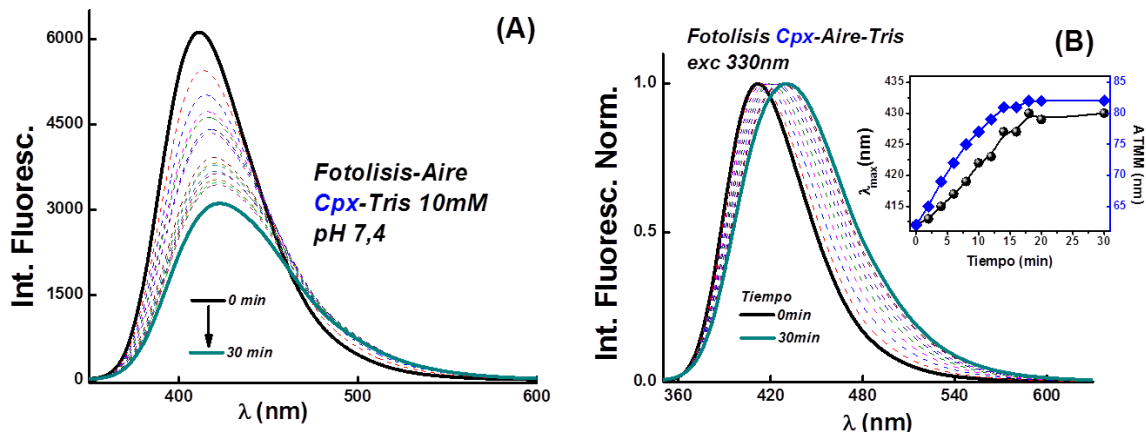


Figura 3.5 Espectros de fluorescencia de Cpx ($\approx 12 \mu\text{M}$) en buffer Tris 10 mM durante la fotólisis con $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$ (A), espectros de fluorescencia normalizados, insertos λ_{max} y ATMM (B).

Los espectros de fluorescencia normalizados al máximo de emisión registran un corrimiento hacia el rojo del espectro, como se observa en la longitud de onda de emisión (λ_{max}) y un aumento en el ancho total a la mitad del máximo (ATMM) (inserto en la Figura 3.5B). Estos experimentos revelan que la fluorescencia total del antibiótico fotolizado no se debe a una población fluorescente homogénea.

Para determinar la contribución de las especies fluorescente en el espectro de fluorescencia, se realizó espectros de fluorescencia resueltos en el tiempo.

3.3.4 Espectros Asociados a los Decaimientos (DAS) en soluciones fotolizadas de FQs

Como puede observarse en los espectros de fluorescencia normalizados de la **figura 3.6A**, el máximo de emisión se corre de 410 nm a 440 nm cuando Cpx se expone a irradiación constante a 330 nm, y por tal motivo se seleccionaron esas longitudes de onda para obtener los decaimientos. Tal como lo demuestra la Figura 3.6B, la solución del antibiótico sin fotolizar tiene un decaimiento mono-exponencial, no así la fotolizada que tiene un ajuste tri-exponencial. Evidenciando que la fluorescencia no proviene de una población homogénea sino de una mezcla de fluoróforos, tal como lo sugerían los ATMM en los experimentos de fluorescencia estacionaria.

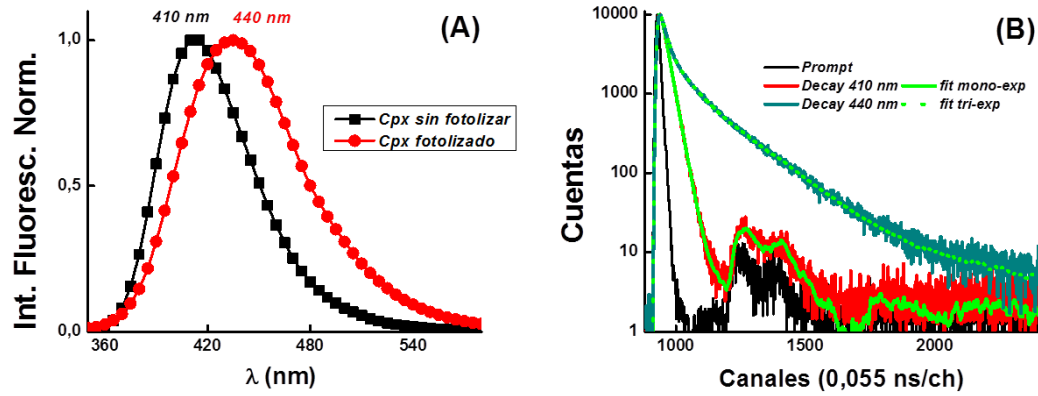


Figura 3.6 Espectros de fluorescencia normalizados de Cpx ($\approx 12 \mu\text{M}$) fotolizado con $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$ (línea y círculos rojos) y sin fotolizar (línea y cuadrados negros) (A), Ajuste de las señales de decaimiento de Cpx ($\approx 12 \mu\text{M}$) fotolizado con $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$ y sin fotolizar en solución de Tris 10 mM a pH 7,4. (B).

A fin de analizar la evolución de los espectros de emisión asociados con cada componente de decaimiento de la fluorescencia ó DAS (*Decay Associated Spectrum*), se midieron los decaimientos a cada longitud de onda de emisión entre 340 y 560 nm, cada 5 nm. Los datos obtenidos se analizaron con el modelo multi-exponencial (ecuación 2.3, ver capítulo 2). Este análisis global supone que los tiempos de vida τ_i son independientes de la longitud de onda y que la amplitud $\alpha_i(\lambda)$ depende de ella. Los valores de $\alpha_i(\lambda)$ y τ_i se pueden utilizar para determinar la contribución fraccional (f_i) de cada decaimiento, **ecuación 3.4**. Estos valores están dados por:

$$f_i = \frac{\alpha_i \tau_i}{\sum_j \alpha_j \tau_j} \quad \text{Ec. 3.4}$$

Los términos α_i y τ_i son proporcionales al área bajo la curva de cada decaimiento en el tiempo. Debido a que en fluorescencia estacionaria, el espectro de emisión corresponde a todos los fluoróforos involucrados sin poder discriminarlos, los valores de f_i representan la intensidad fraccional de cada fluoróforo en cada longitud de onda observada. De esta forma, el producto entre la contribución fraccional y el espectro de emisión estacionario da como resultado el espectro de cada componente emisor o fluoróforo, según la **ecuación 3.5**.

$$I_i(\lambda) = f_i I(\lambda) \quad \text{Ec. 3.5}$$

Donde $I_i(\lambda)$ es el espectro de emisión correspondiente a cada componente, f_i es la contribución fraccional y $I(\lambda)$ es el espectro de emisión del estado estacionario. Estos espectros $I_i(\lambda)$ son llamados espectros asociados a los decaimientos, DAS, ya que representan el espectro de

emisión del componente que emite con un tiempo de vida τ_i . La **Figura 3.7** representa el DAS de la solución fotolizada de Cpx con tres componentes que contribuyen al espectro global.

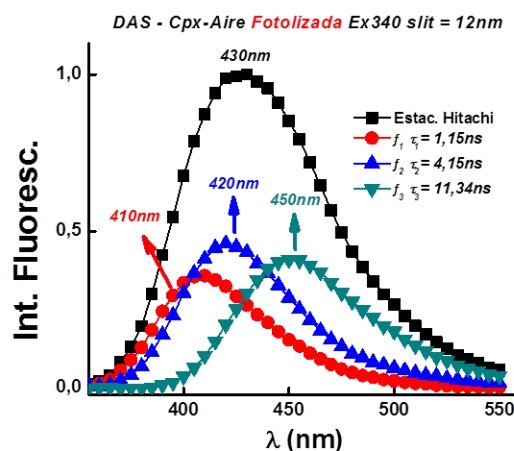


Figura 3.7 Espectro asociado a los decaimientos de la solución de Cpx ($\approx 12 \mu M$) en buffer Tris 10 mM, fotolizado con $\lambda = 330 \text{ nm}$.

En el DAS se observa que la fluorescencia de la solución fotolizada posee tres componentes. Una componente de tiempo de vida largo ($\approx 11 \text{ ns}$) con máximo en 450 nm y otros dos componentes centrados a longitudes de onda más cortas. Uno con $\tau = 1,15 \text{ ns}$ con λ_{max} en 410 nm y el otro de $\tau = 4,15 \text{ ns}$ con λ_{max} 420 nm. Analizando detalladamente las contribuciones de la emisión se observó que, comparando el espectro de fluorescencia normalizado de la componente centrada en 410 nm, coincide con el espectro de fluorescencia normalizado de Cpx sin fotolizar, **Figura 3.8**, indicando que esta podría corresponder a la fracción del antibiótico sin desfluorinar (antibiótico remanente).

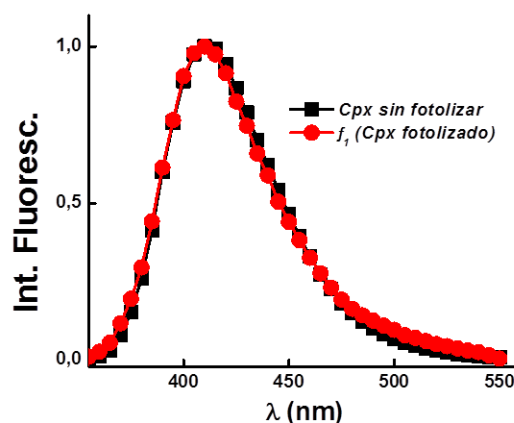


Figura 3.8 Espectros de fluorescencia normalizados de: Cpx sin fotolizar (cuadrados negros) y contribución fraccional f_1 de Cpx fotolizada (círculos rojos) con $\lambda = 330 \text{ nm}$. Ambos en solución buffer Tris 10 mM.

3.3.5 DAS de soluciones fotolizadas de FQs-Lyz

En los espectros de fluorescencia normalizados, durante la fotólisis de Cpx en presencia de Lyz (**Figura 3.9A**), se observa un efecto similar a lo registrado en la fotólisis del antibiótico cuando se encuentra en ausencia de la enzima. Ocurre un aumento en la λ_{\max} así como en el ATMM, solo que a una menor velocidad.

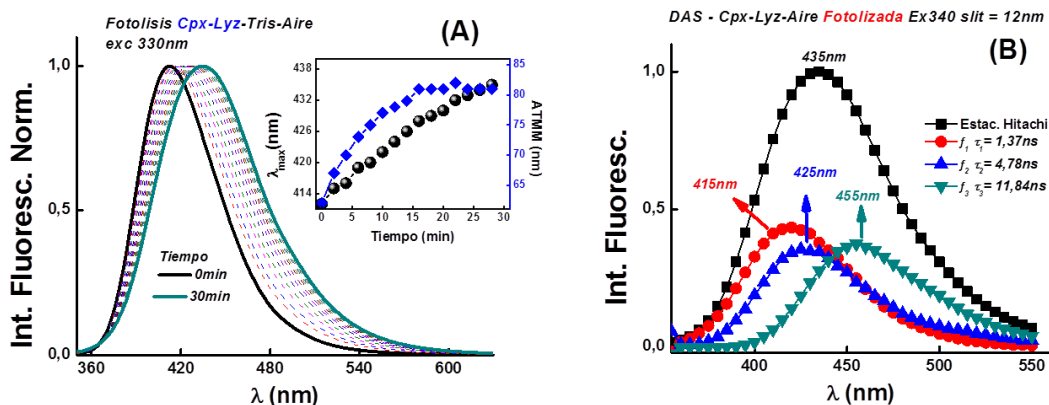


Figura 3.9 Espectros de fluorescencia normalizados durante la fotólisis con $\lambda = 330$ nm, de Cpx-Lyz (A). DAS de la solución fotolizada de Cpx-Lyz (B). Ambos en buffer Tris 10 mM.

El DAS de la solución fotolizada de Cpx-Lyz revela nuevamente tres contribuciones al espectro de fluorescencia (**Figura 3.9B**). Pero se observa un aumento en la banda correspondiente a Cpx (410-415 nm) y una disminución de la banda centrada en 420-425 nm aproximadamente. Este efecto puede estar relacionado con la disminución en el rendimiento cuántico de fotoconsumo del antibiótico, cuando está presente la proteína. Asimismo, comparando estos resultados con los obtenidos en Docking Molecular (ver **Cap. 2**) donde Cpx se aproxima a Lyz mediante el anillo piperazina, se puede atribuir que la contribución fraccional f_2 correspondiente a la banda en 420-425 nm es el fotoproducto generado por la ruptura del anillo piperazina. Por lo tanto la proteína estaría protegiendo el antibiótico de la degradación de la cadena lateral (ruta “b” en el Esquema 3).

Con estos resultados podemos inferir que la contribución fraccional f_1 de la banda centrada en 410-415 nm corresponde a Cpx remanente (sin fotodegradarse), la f_2 de la banda centrada en 420-425 nm corresponde al fotoproducto generado por la ruptura del anillo piperazina y por último que la f_3 de la banda centrada en 450-455 nm corresponde al fotoproducto de la Desfluorinación.

3.3.6 Estudio mediante ATR-FTIR

Unas gotas de la solución de Cpx ≈ 60 μ M en buffer Tris 10 mM, fueron colocadas sobre la superficie del cristal de ZnSe y secadas con corriente de aire, este procedimiento fue repetido 3

veces para asegurar la formación de un film delgado sobre la superficie del cristal. Ese protocolo de preparación de la muestra fue aplicado para todas las muestras de Cpx en solución fotolizada a distintos tiempos (0, 15, 40, 60 y 120 min).

Para realizar una asignación de bandas más confiable, las estructuras, energías y espectros vibracionales en solución acuosa fueron calculados usando el paquete de programa Gaussian09 a nivel de teoría de los funcionales de la densidad (DFT) con el método B3LYP y el conjunto de funciones base Lanl2dz, ampliamente usada para moléculas que contienen átomos de halógenos. La estructura teórica de la especie zwitteriónica en solución acuosa fue computada con el método SCRF y los efectos del solvente fueron simulados considerando la cavidad de series de esferas usando el modelo de continuo polarizable (PCM), tal como está implementad en el programa Gaussian.

Para la asignación de bandas de los espectros experimentales se tuvieron en cuenta los reportes existentes para moléculas del grupo de la fluoroquinolonas y los resultados de los cálculos teóricos. La **Tabla 3.2** muestra una comparación entre las asignaciones de bandas de infrarrojo reportadas y las bandas experimentales registradas en este trabajo y las teóricas para los principales modos de vibración de la molécula, mientras que la **Figura 3.10** muestra la comparación entre el espectro teórico y el experimental.

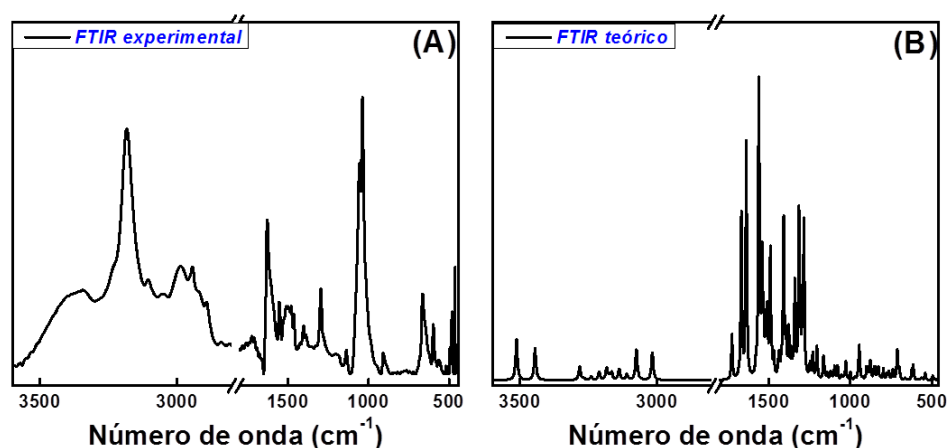


Figura 3.10 Espectros FTIR-ATR del antibiótico Cpx: experimental (A) y teórico B3LYP/Lanl2dz (B).

Tabla 3.2 Asignación de las principales bandas infrarrojo para el antibiótico Ciprofloxacina.

Muestra	99	100	101	101 teórico	102	100	103	experimental	Teórica solución
	Raman	Gotas sobre ATR			Pastilla de BrK	Pastilla de KBr	ATR	Solución acuosa ATR(zwis)	B3LYP/ Lanl2dz (Zwis)
$\nu(\text{NH})$					3406 3207(mf)	3500- 3300		3393 (h) 3343 (m)	3512 3444
$\nu(\text{CH}_2)$		3000- 2950	3204	3212(6)	3087(mf) 2987(mf) 2947(m) 2914(f) 2853(mf)	3000- 2950		3235 (h) 3106 (d) 3051 (d) 2987 (d) 2943 (d) 2894 (md)	3240 3139 3137 3109 3075 3017
$\nu(\text{CH}_2)$ grupo Ciclopropil						3100		3184 (f)	3183
$\nu(\text{C}=\text{C})$	1627(f) 1617(mf)						1628	1628 (f) 1608 (h)	1636 1576
$\nu_{\text{as}}(\text{C}=\text{O})$ carboxilato	1591(mf)		1620	1581(95)			1580	1553 (m)	1559
$\delta(\text{CH}_2)$	1499(md) 1455(d) 1448(d)				1426(mf) 1390(mf) 1364(f) 1360(f)			1512 (d) 1497 (d) 1479 (m)	1519 1516 1480
Wag (CH_2)	1364(m)				1342(mf)			1366(md)	1405
Wag (NH_2)	1455(d)							1464(m)	1467
$\nu(\text{C}-\text{O})$		1450 - 1400	1266	1297(21)		1450- 1400			
$\nu_{\text{s}}(\text{C}=\text{O})$ carboxilato	1382(mf)							1389 (d)	1376
$\nu(\text{C}-\text{N})$	1306(a) 1274(md) 1104(md) 1041(d)		1183	1180(22) 1172(88)	1323 1268(m) 1218(m) 1173(m) 1055(m)			1326 (md) 1296 (m) 1274 (h) 1204 (d) 1185 (d) 1138 (d) 1056(m)	1339 1314 1283 1205 1204 1142 1055
$\nu(\text{C}-\text{C})$ aromático	1542(md)		1413					1527 (h) 1426 (d) 1404 (d)	1529 1421 1407
$\nu(\text{C}-\text{C})$					972 903			943 (h) 909 (d) 884 (h)	945 900 891
$\nu(\text{C}-\text{F})$		1050 - 1000				1050- 1000		1036 (mf)	1028

Intensidades: *m* = muy, *d* = débil, *h* = hombro, *f* = fuerte, *m* = media, *a* = ancha, Wag (Wagging) = aleteo, ν = estiramiento del enlace, δ = deformación del enlace

Para poder realizar una comparación de los espectros registrados a los diferentes tiempos de fotólisis, los mismos fueron normalizados a la banda 1138 cm^{-1} asignada al modo de estiramiento C-N próxima al grupo carboxílico del antibiótico. Esta banda fue seleccionada debido a que el anillo quinolona no se modifica durante el tiempo de irradiación, tal como fue reportado por Zhang y col¹⁰⁴.

Debido a que Cpx se encuentra en la forma zwitteriónica al pH de trabajo (7,4), no se observa la banda característica del grupo C=O del ácido. Esto se debe a que en dicha especie el grupo carboxílico está desprotonado, de allí que el análisis vibracional para este grupo está basado en los modos de estiramiento del grupo carboxilato⁹⁹. Por lo tanto, analizando la intensidad de las bandas asignadas a los estiramientos antisimétrico y simétrico del grupo COO⁻, 1553 y 1389 cm⁻¹, respectivamente, se observó que no sufren modificaciones durante la irradiación constante del antibiótico, tal como se muestra en la **Figura 3.11A**. Estos resultados indican que el proceso de descarboxilación no ocurre durante en las condiciones experimentales de este trabajo.

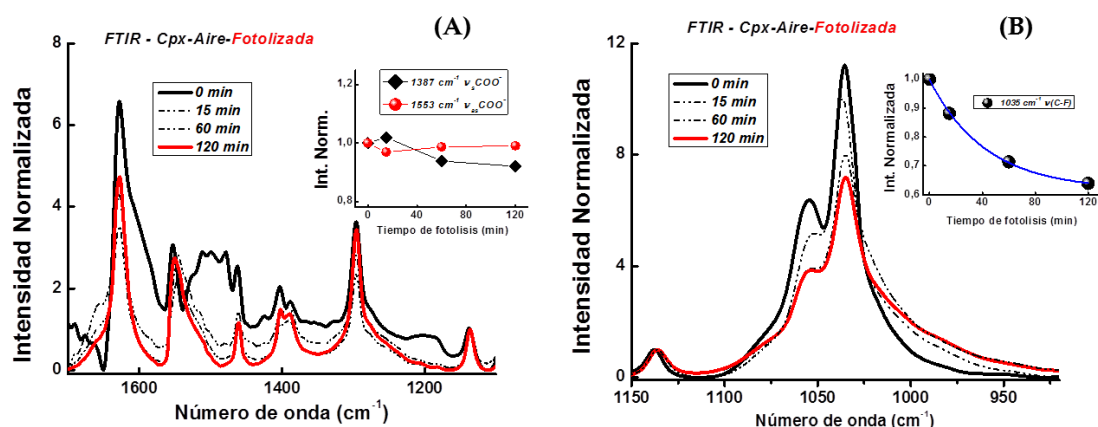


Figura 3.11 Espectros de infrarrojo para la región de estiramiento simétrico y antisimétrico del grupo COO⁻ (A). Espectros de infrarrojo para la región de la banda C-F (B). Insertos las cinéticas de fotólisis.

Por otro lado, los cambios en la región de 1700-1500 cm⁻¹ comprende a estiramientos C=C del anillo aromático y estos pueden ser debidos a la desfluorinación que sufre la molécula, ya que al romperse el enlace C-F se modificaron estos estiramientos y se desplazan hacia mayores números de onda. Este efecto es debido a que, al ser el Flúor un átomo muy electronegativo (atrae los electrones) y al estar presente en la fluoroquinolona afecta las vibraciones C=C del anillo aromático desplazando esos estiramientos hacia menores números de onda. Cuando se rompe el enlace C-F durante la fotólisis, los electrones se distribuyen nuevamente en el anillo y por lo tanto la constante de fuerza del anillo se reestablece y presenta los estiramientos C=C a mayores números de onda¹⁰⁵.

Asimismo, existe una disminución de la banda en 1035 cm⁻¹ correspondiente al estiramiento del grupo C-F, tal como lo demuestra la cinética inserta en la **Figura 3.11B**, indicando que este enlace sufre modificación durante la fotólisis y pone de manifiesto que la Desfluorinación es un mecanismo de fotodegradación del antibiótico Cpx.

Para la región comprendida entre los 3500 y 2800 cm⁻¹, se observó un decaimiento de la intensidad de la banda correspondientes a los estiramiento simétrico (3343 cm⁻¹) y

antisimétrico (3393 cm^{-1}) del grupo -NH_2^+ de la especie zwitterionica, **Figura 3.12**. Esta disminución estaría atribuido al cambio del entorno que sensa este amino debido al proceso de degradación de la cadena lateral que sufre Cpx. Antes de irradiar el antibiótico el grupo amino forma parte del anillo y además se encuentra protonado, por lo que tiene mayor momento dipolar y por lo tanto mayor intensidad de la banda en el espectro IR. Pero durante la fotólisis se produce la ruptura del anillo piperazina en el enlace C-N (camino “b” del Esquema 3), generando un grupo amino acíclico con menor momento dipolar, ya que el N recupera su par de electrones y disminuye su polaridad en el grupo -NH_2^{105} . Para el resto de las frecuencias de vibración de esta región, como ser los correspondientes a los modos de estiramiento νCH_2 y νCH no se observaron cambios significativos en las intensidades de las bandas correspondientes.

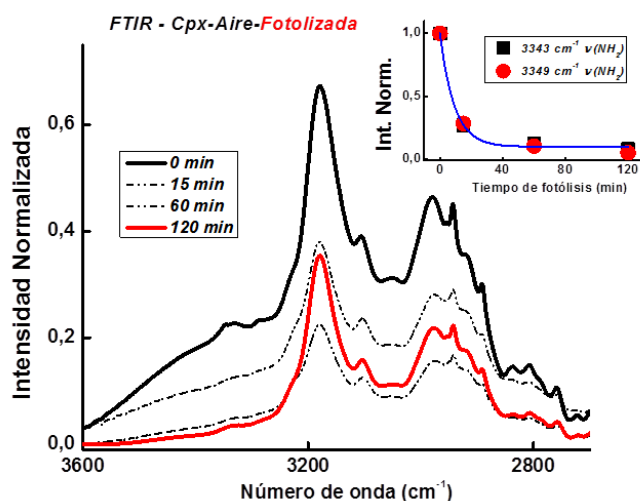


Figura 3.12 Espectros de infrarrojo para la región de estiramiento simétrico (3343 cm^{-1}) y antisimétrico (3393 cm^{-1}) del grupo NH_2 de la especie zwitteriónica de Cpx. En la figura superior se observan las cinéticas de fotólisis para los modos de estiramiento NH_2 .

El análisis de las intensidades de todas las bandas de estiramiento C-N de la molécula de Cpx, muestra ligeros cambios a medida que aumenta el tiempo de fotólisis para las bandas atribuidas a la banda C-N entre el anillo quinolona y el ciclopropil (1326 cm^{-1}), así como para el C-N que forma parte del anillo quinolona (1135 cm^{-1}). En cambio se observa una disminución para el estiramiento C-N del anillo de piperazina (1055 cm^{-1}), lo cual se puede relacionar con la degradación de la cadena lateral que sufre el antibiótico al ser expuesto a irradiación constante. El mismo efecto pero no tan marcado ocurre para el enlace C-N entre la piperazina y el anillo quinolona (1295 cm^{-1}). Esto puede deberse a los cambios del entorno de este enlace cuando se producen los procesos de fotodegradación de la molécula. Todo lo descrito anteriormente y los distintos enlaces C-N de Cpx se muestra en la **Figura 3.13**

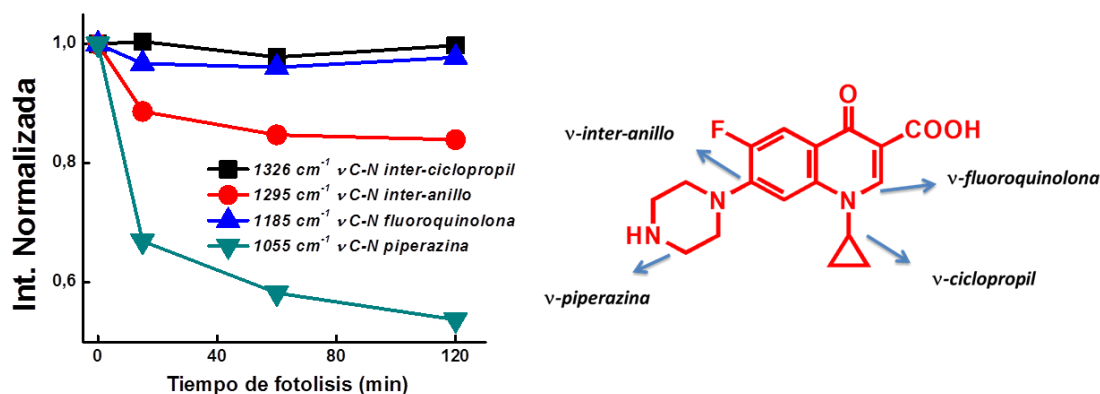


Figura 3.13 Cinéticas para la fotólisis en la región de estiramiento C-N de la especie zwitterionica de Cpx (izquierda). Estructura molecular de Cpx y los diferentes ν C-N (derecha).

El análisis de las bandas de infrarrojo revela que el principal sitio que sufre modificaciones durante la fotólisis de Cpx en solución de buffer Tris 10 mM a pH 7,4, es el anillo de piperazina, lo que fue confirmado por las cinéticas observadas para los grupos NH₂ y C-N. Estos resultados sugieren una *ruptura del anillo de piperazina* (ruta “b” en el Esquema 3), en concordancia con lo observado por otros autores, quienes proponen esta degradación de la cadena lateral cuando ocurre la foto-oxidación por transferencia de electrones en medio acuoso¹⁰⁶.

Además, observamos ligeros cambios en las intensidades de las bandas de los modos de los anillo de quinolona y ciclopropano, por lo que cabe esperar que estos sitios prácticamente no se verían afectados durante la fotólisis de Cpx. Similares conclusiones fueron reportadas por XinXin Zhang y colaboradores¹⁰⁴ durante la degradación inducida con luz visible de Cpx sobre BiOBr, donde, la fracción de piperazina fue el sitio de reacción predominante, mientras que los anillos de quinolona y ciclopropano permanecen esencialmente intactos, confirmado por estudios de HPLC.

Por otro lado, la ligera disminución de las bandas atribuidas al grupo COO⁻ con el tiempo de fotólisis indica que la degradación del antibiótico no se produciría por el proceso de *Descarboxilación* (ruta “c” en el Esquema 3). Pero si el proceso de *Desfluorinación*, ya que la banda C-F sufre modificaciones durante la fotólisis e induce cambios en las bandas C=C del anillo aromático, además hay una disminución del pH como se expuso anteriormente.

Un resultado interesante se obtuvo comparando las constantes cinéticas obtenidas por fluorescencia estacionaria, donde esta sería el consumo total del antibiótico ($k_{obs} = 2,4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) ya que no se puede discriminar las vías o mecanismos de degradación que sufre durante la fotólisis; y por FTIR la disminución de las bandas atribuidas al estiramiento C-F y C-N ($k_{C-F} =$

$3,9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y $k_{C-N} = 1,9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) **Figura 3.14**. Donde la suma de estas últimas da como resultado la k_{obs} por fluorescencia. Por lo tanto, podemos inferir que los procesos de fotodescomposición de Cpx involucran reacciones paralelas, siendo ellas la *Desfluorinación* y la *ruptura del anillo piperazina*. Esto se representa en el **Esquema 5**.

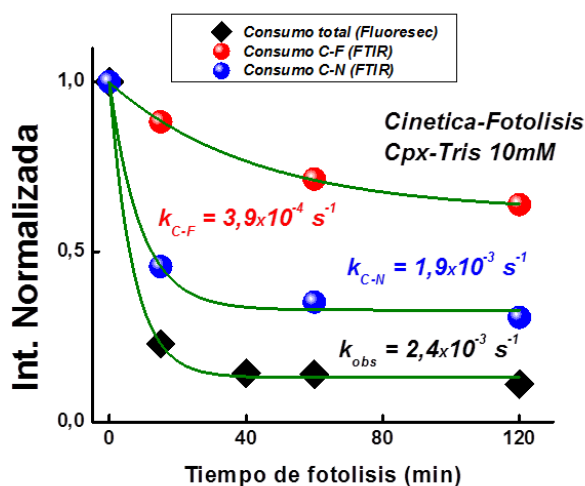
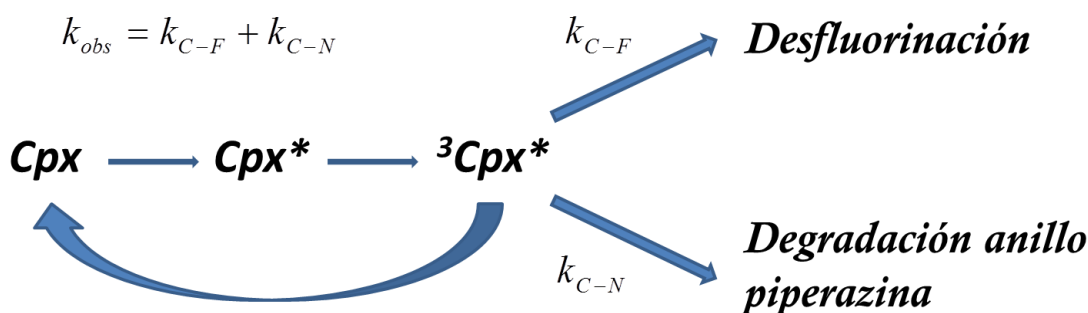


Figura 3.14 Cinéticas de fotólisis para Cpx mediante fluorescencia estacionaria y FTIR.



Esquema 5 Mecanismo de fotodegradación de Cpx.

El Esquema 5 representa los mecanismos de fotodegradación del antibiótico Cpx producidos por la fotólisis. Cuando Cpx absorbe radiación ($\lambda_{ex} = 330 \text{ nm}$ en nuestras condiciones experimentales) pasa al estado excitado singulete (Cpx^*) y luego rápidamente al estado excitado triplete (${}^3Cpx^*$), desde este último estado puede volver al fundamental (Cpx), seguir el proceso de Desfluorinación (con k_{C-F}) o el proceso de degradación del anillo piperazina (con k_{C-N}).

3.3.7 Estudio mediante ATR-FTIR, Cpx-Lyz

Se utilizó el mismo protocolo que en los experimentos de ATR-FTIR realizados para el antibiótico solo, concentración de FQs $\approx 60 \mu\text{M}$ y Lyz $\approx 150 \mu\text{M}$ en solución de buffer Tris (10 mM a pH 7,4).

A fin de poder realizar una comparación de los espectros registrados a los diferentes tiempos de fotólisis, los mismos fueron normalizados en la banda Amida I correspondiente a la banda localizada en el 1656 cm^{-1} .

Para la región comprendida entre los 3500 y 2800 cm^{-1} , no fue posible observar cambios significativos entre los distintos espectros para la fotólisis de Cpx con Lyz, ya que las bandas correspondientes a los modos de estiramiento simétrico (3339 cm^{-1}) y antisimétrico (3404 cm^{-1}) del grupo NH_2 de la especie zwitteriónica aparecen solapados con los correspondientes a la proteína. En la región de las bandas Amida I y II característica de la proteína, se puede observar un corrimiento para el modo Amida I desde los 1656 cm^{-1} para la proteína libre, hacia los 1652 cm^{-1} cuando se encuentra en presencia de Cpx y para el modo Amida II desde 1540 cm^{-1} hacia 1536 cm^{-1} . Este desplazamiento de 4 cm^{-1} en la posición de las dos bandas amida estaría indicando una fuerte interacción de la proteína con el antibiótico. Este corrimiento hacia menores números de onda podría deberse a que los enlaces $\text{C}=\text{O}$ (Amida I) y $\text{C}-\text{N}$ (Amida II) de la proteína estarían ligeramente más impedidos en su vibración en presencia de Cpx.

La intensidad de la banda localizada en 1627 cm^{-1} asignada al modo de estiramiento del grupo ceto $\nu\text{C}=\text{O}$ del anillo de fluoroquinolona disminuye a medida que aumenta el tiempo de fotólisis, con una tendencia similar a la observada para la fotólisis de Cpx sola en solución.

Debido al solapamiento de las bandas de la proteína con las bandas de la Cpx, no fue posible realizar un análisis exhaustivo de las bandas de infrarrojo entre los 1500 y 1300 cm^{-1} . Debido a ello, el análisis de las intensidades de las bandas asignadas a los estiramientos antisimétrico y simétrico del grupo COO^- , 1553 y 1387 cm^{-1} , sólo evidenció una ligera disminución en la intensidad de la banda en 1387 cm^{-1} como consecuencia de la fotólisis con una tendencia similar a la observada para la fotólisis de Cpx en solución.

El análisis de las intensidades de las bandas de estiramiento $\text{C}-\text{N}$, muestra para todos los tipos de enlaces una disminución de la intensidad a medida que aumenta el tiempo de fotólisis, observándose un efecto mayor para el estiramiento $\text{C}-\text{N}$ del anillo de piperazina, localizado a 1054 cm^{-1} , **Figura 3.15**. Esto indica que el proceso de degradación de la cadena lateral ocurre aun cuando está presente la proteína.

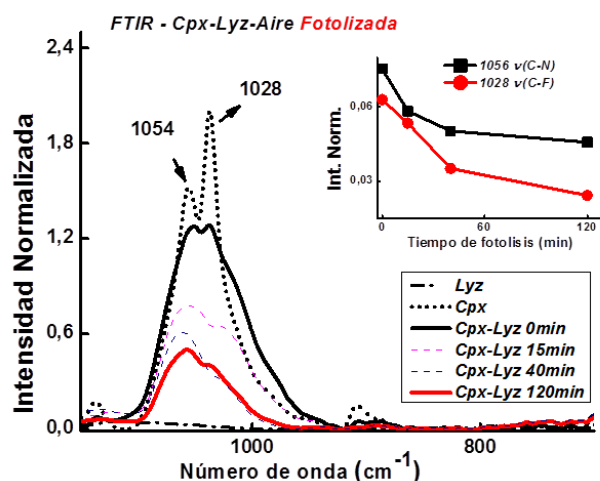


Figura 3.15 Espectros de infrarrojo para la región de estiramiento del grupo C-N y C-F de la solución fotolizada de Cpx-Lyz. Inserto, cinéticas de las bandas.

Interesantemente en este sistema se pudo observar una disminución más notoria en la intensidad de la banda localizada en 1028 cm^{-1} que fuera asignada anteriormente al modo de estiramiento C-F, tal como lo muestra la Figura 3.15.

Anteriormente se determinó que Cpx se fotodegrada mediante dos reacciones paralelas: desfluorinación y degradación de la cadena lateral. Ahora cuando está presente Lyz en la solución el anillo piperazina se encuentra estabilizado debido a que, la interacción entre estas moléculas sucede por ese sitio, tal como se muestra en la Figura 19 y Figura 2.20 de los cálculos teóricos en el Capítulo 2. Esto es demostrado en la **Figura 3.16A**, la cual destaca como la presencia de la proteína tiene un efecto protector retardando el fotoconsumo del antibiótico, comparando las cinéticas de las bandas atribuidas al grupo C-N del anillo piperazina de las soluciones fotolizadas de Cpx y Cpx-Lyz. Contrariamente, la interacción de Cpx con Lyz induce o favorece el mecanismo de la desfluorinación durante la fotólisis, tal como se observa en la cinética de la banda C-F de Cpx en ausencia y presencia de Lyz (**Figura 3.16B**).

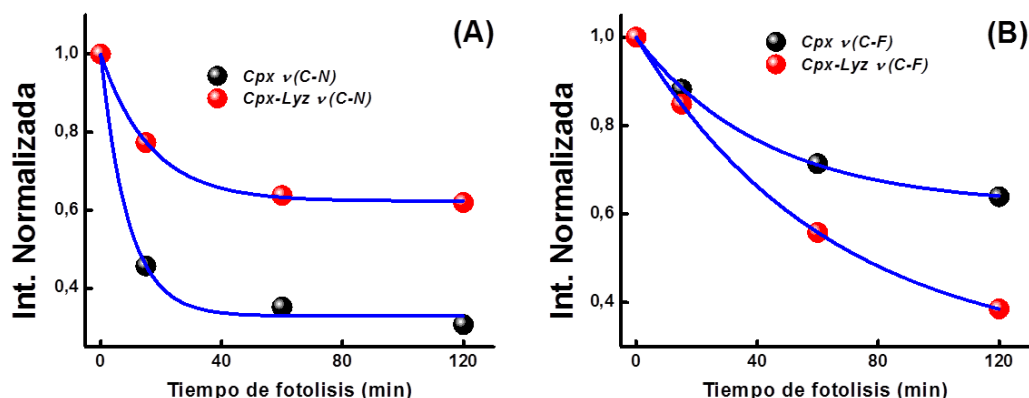


Figura 3.16 Comparación de la banda de estiramiento del grupo C-N de Cpx de las soluciones de Cpx y Cpx-Lyz fotolizadas (A), Comparación de la banda de estiramiento del grupo C-F de Cpx de las soluciones de Cpx y Cpx-Lyz fotolizadas (B).

Del mismo modo que para el antibiótico solo, se compararon las cinéticas obtenidas por fluorescencia estacionaria y por FTIR pero ahora en el sistema Cpx-Lyz. Donde nuevamente la suma de las constantes cinéticas de los enlaces C-F y C-N ($k_{C-F} = 2,6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y $k_{C-N} = 1,02 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) son muy próximas a $k_{obs} = 1,13 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, la cual representa el consumo total de Cpx en presencia de Lyz durante la fotólisis, **Figura 17**. Esto pone de manifiesto que los procesos de fotodescomposición de Cpx con la proteína siguen involucrando las reacciones paralelas *Desfluorinación* y la *ruptura del anillo piperazina* (Esquema 5).

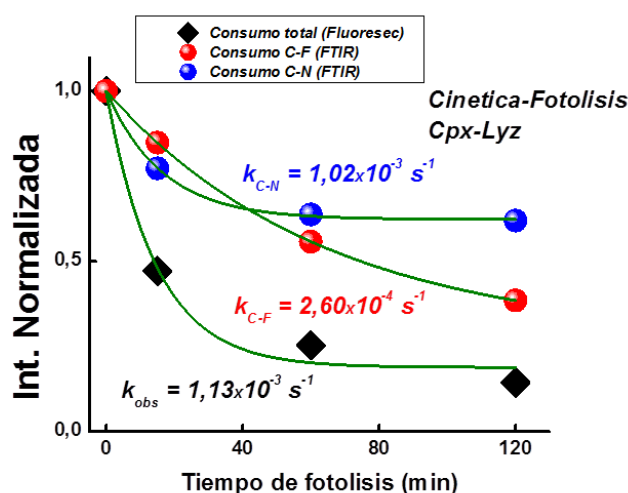


Figura 17 Cinéticas de fotólisis para el sistema Cpx-Lyz mediante fluorescencia estacionaria y FTIR.

3.4 Conclusiones parciales

Las FQs estudiadas se fotodegradan bajo irradiación a 330 nm mediante dos vías: Desfluorinación y Degradación del anillo piperazina. La presencia de Lisozima durante la fotólisis disminuye el Φ_{FC} . Este efecto protector se debe a que Lyz se encuentra unida a la FQs mediante el anillo piperazina, lo cual retarda la vía de la degradación del anillo piperazina.

Resultados 3-Capítulo 4

Efecto Fotosensibilizador de Fluoroquinolonas sobre Lisozima

4 Efecto fotosensibilizador de Ciprofloxacina sobre Lisozima

En las últimas tres décadas, reportes científicos han demostrado que una gran variedad de fármacos son reactivos bajo exposición a la luz ambiental, donde la radiación UVA representa alrededor del 90% de la radiación UV solar que llega a la superficie de la tierra. Este proceso representa uno de los factores responsables de la generación de efectos secundarios adversos¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. La radiación UVA puede generar reacciones de fotosensibilización en la piel de las personas, ya que puede penetrar en la dermis y hasta incluso puede alcanzar la sangre presente debajo de la dermis. En ambos casos, los fármacos pueden desencadenar tales reacciones actuando como fotosensibilizador.

Como se sabe las Fluoroquinolonas (FQs) son capaces de absorber la porción de radiación solar UV incidente sobre la superficie terrestre y de inducir procesos fotoquímicos. Existen varios informes donde han demostrado que las FQs pueden ser fotosensibilizadores muy eficaces, siendo las moléculas blanco más relevantes para este efecto el ADN y las proteínas^{30,110-112}.

Por tanto, la irradiación de antibióticos presentes en medios biológicos puede inducir rutas fotoquímicas que produzcan efectos no deseados, tales como fotoentrecruzamiento, envejecimiento, fotoalergia, daño celular, fotooxidación proteica, etc.

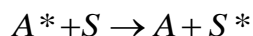
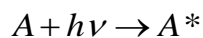
Sensibilización, definición

Se denomina fotosensibilización a todo proceso por el cual una especie química sufre una alteración fotoquímica o fotofísica como resultado de la absorción inicial de luz por otra especie química denominada fotosensibilizador (o simplemente sensibilizador)⁸⁷

La fotosensibilización y el quenching juegan un papel muy importante en muchos aspectos de la fotoquímica orgánica. La transferencia de energía intermolecular desde una especie a otra puede generar especies excitadas, que no absorbe, a la longitud de onda de excitación, produciendo cambios químicos que no son posibles por absorción directa de luz a dicha longitud de onda. Esta vía diferente de excitación puede poblar estados excitados distintos a los obtenidos por absorción directa, y por lo tanto, se pueden observar otras reacciones químicas.

Este mecanismo es responsable de reacciones fotosensibilizadas y de procesos de quenching bi-molecular de emisión. En las reacciones fotosensibilizadas una molécula transparente (S) a la longitud de onda de excitación, sufre reacción a consecuencia de su interacción con otra molécula (A) que sí absorbe a esa longitud de onda. Los procesos de quenching, implican la desactivación de la molécula que absorbe (A) por interacción con otra

molécula. Estos mecanismos de transferencia de energía y sus consecuencias pueden sintetizarse con las ecuaciones del **Esquema 6**.



Esquema 6 Procesos de transferencia de energía.

En esta reacción, S resulta “sensibilizada” por radiación de una longitud de onda no absorbida por S sino por la molécula A. La energía de excitación es obtenida por A mediante la absorción de un fotón, para generar A*, y posteriormente esa energía se transfiere a S. Por las características de esta reacción la cantidad de energía en S* debe ser menor a la absorbida por A. Así una molécula A* puede ser relajada por una molécula S adecuada.

4.1 Aspectos experimentales

4.1.1 Materiales

Las soluciones de fluoroquinolonas en buffer Tris 10 mM fueron preparadas con agua ultra pura. En todos los casos la concentración final de FQs en la solución fue $\approx 10 \mu\text{M}$.

4.1.2 Métodos

Espectroscopia UV- Visible estacionaria

Los espectros de emisión se registraron en un espectrofluorómetro Hitachi F-2500, en celdas de cuarzo de 1 cm, con rendijas de excitación y emisión de 5 nm y con $\lambda_{\text{ex}} = 280$ y 295 nm.

Espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo por recuento de fotones individuales correlacionado temporalmente (TCSPC)

Los experimentos fueron realizados en un aparato Tempro-01 de Joriba Jovin Yvon, utilizando una fuente de excitación pulsada ultra rápida de 280 (± 12) nm y 295 (± 15) nm, Nanoled®, 1Mhz. La longitud de onda de emisión fue seleccionada con un monocromador de 12 nm de ancho de banda de emisión. Para la obtención de los Espectros Asociados a los Decaimientos (DAS) se registraron las señales en el rango de 300-450 nm.

Espectros Infrarrojo con Transformada de Fourier

Los espectros de infrarrojo fueron medidos con un Thermo Scientific™ Nicolet™ 6700 FT-IR spectrometers con una resolución de 4 cm^{-1} y 64 scans de barrido y con un accesorio para ATR de cristal de ZnSe (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). El procesamiento de los espectros se realizó con el software OPUS 7.0.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y a temperatura ambiente.

Resultados y discusiones.

4.2 Espectros Asociados a los Decaimientos (DAS)

Como se mencionó en el capítulo 2, la Lisozima de clara de huevo se caracteriza por poseer 6 residuos de triptófano, tal como se representa en la **Figura 4.1**.

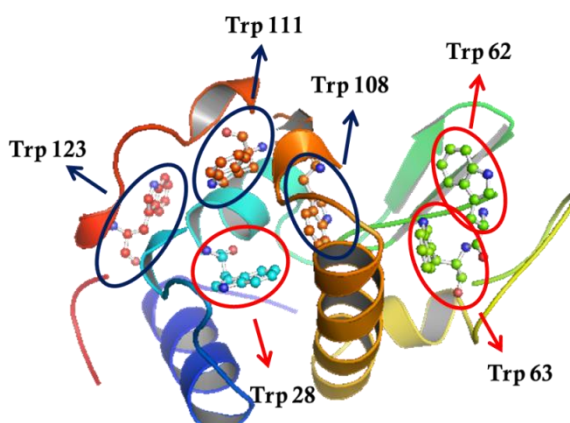


Figura 4.1 Estructura de la proteína Lisozima con los 6 residuos de aminoácidos Trp.

Estos Trp presentes en Lyz sirven como sondas fluorescentes para realizar estudios espectroscópicos. Por ello, antes de estudiar el efecto fotosensibilizador de Cpx sobre Lyz, primero se registró el decaimiento de la fluorescencia de Lyz en solución de buffer Tris 10 mM con λ_{ex} 280 nm. Se obtuvieron tres tiempos de vida (0,28 ns, 1,49 ns y 3,26 ns), **Figura 4.2A**, los cuales están acorde a los reportados en bibliografía⁶⁸.

Para la construcción del DAS de Lyz se midieron los decaimientos a cada longitud de onda de emisión entre 300 y 450 nm, cada 5 nm; y se utilizó las ecuaciones 3.4 y 3.5 del capítulo 3. Como se puede observar en la **Figura 4.2B**, el espectro de fluorescencia de Lyz tiene tres contribuciones, una componente corta de 0,28 ns centrada en 320 nm que se atribuye a los Trp 28 y Trp 111 (Trp 63 y Trp 123 están desactivados por la transferencia de electrones con los enlaces disulfuros) ubicados en una matriz hidrofóbica. Otra componente

de 1,49 ns, centrada en 335 nm, atribuida al Trp 108 en el interior de la Lyz y una última componente de 3,26 ns con máximo en 345 nm, asignada al Trp 62 que se encuentra totalmente expuesto al solvente ¹¹³. Se observa como casi el 80% del espectro de emisión está dado por los residuos Trp 62 y Trp 108 ⁷⁰.

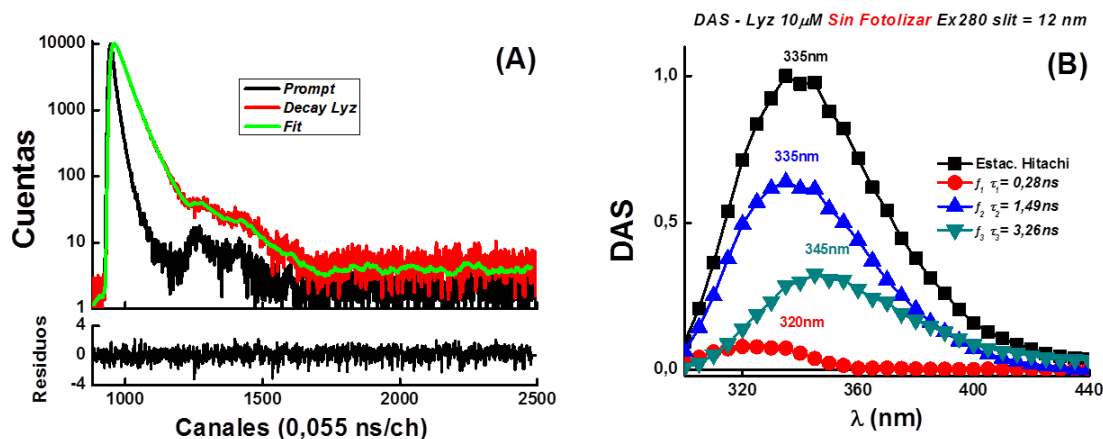


Figura 4.2 Decaimiento de la fluorescencia de Lyz 10 μ M en buffer Tris 10 mM pH 7,4 (A), DAS de solución de Lyz sin fotolizar (B).

La emisión de fluorescencia en la región de 320 nm no se atribuye a Tirosina (Tyr), debido a que en la **Figura 4.3** se observa como los espectros de fluorescencia normalizados de Lyz, así como los DAS, con longitud de onda de excitación en 280 y 295 nm, no difieren. Asimismo, Kronman y colaboradores reportaron que el rendimiento cuántico de fluorescencia de Tyr en Lyz es menor al 1% ¹¹⁴, con lo cual no contribuyen al espectro global de la enzima.

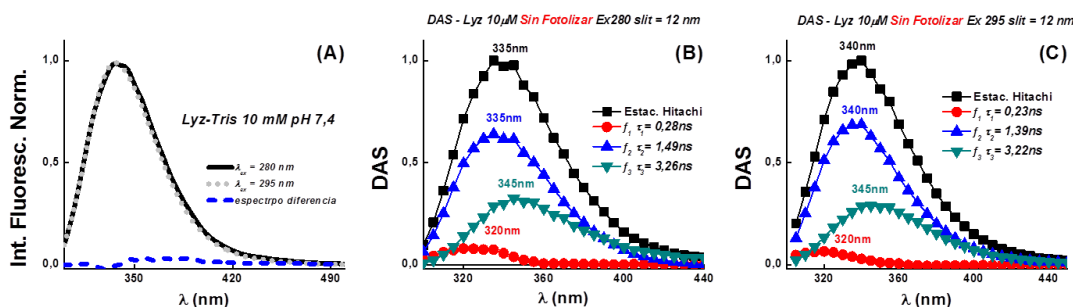


Figura 4.3 Espectro de fluorescencia normalizado de la solución de Lyz en buffer Tris 10 mM, con λ_{ex} = 280 nm (línea continua), 295 nm (línea punteada) y espectro diferencia (línea discontinua) (A). Espectros DAS de Lyz con λ_{ex} = 280 nm (B) y con λ_{ex} = 295 nm (C).

La comparación de los DAS de las soluciones de Cpx-Lyz en buffer Tris 10 mM (ambos 10 μ M) sin fotolizar y fotolizadas con λ_{ex} = 330 nm, donde solo absorbe el antibiótico, se representan en la **Figura 4.4**. Los tiempos de vida y la contribución fraccional de la mezcla Cpx-Lyz sin irradiar, son prácticamente iguales a los compuestos individuales de la Lyz sin

FQ. Cuando se fotoliza la solución se observa un ligero aumento en la contribución de la componente centrada ≈ 315 nm, que representa a los Trp situados en la matriz hidrofóbica; acompañado de una pequeña disminución de la componente atribuida al Trp 108 con $\lambda_{\max} \approx 335$ nm.

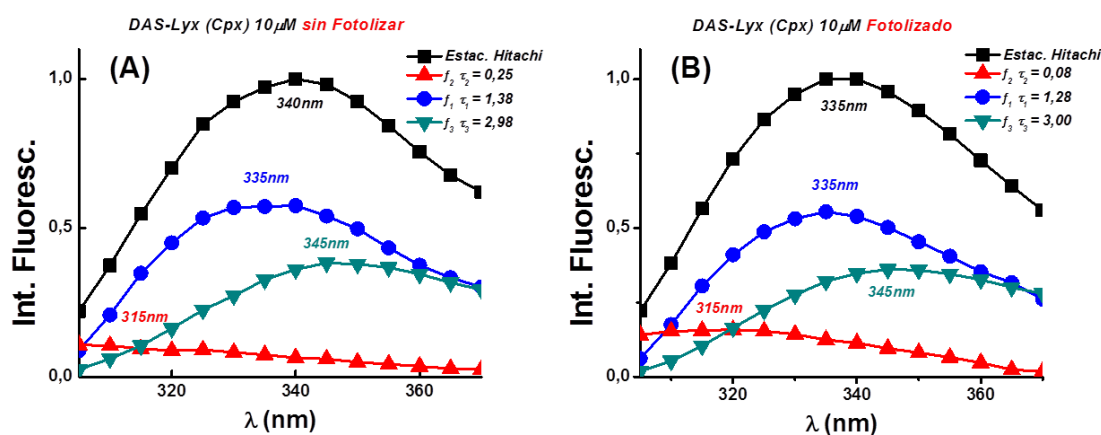


Figura 4.4 Espectros DAS con $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm de Lyz: con Cpx sin fotolizar (A) y con Cpx fotolizado con $\lambda_{\text{ex}} = 330$ nm (B).

A fin de poder observar con mayor detalle el efecto de Cpx fotolizada sobre los Trp de Lyz, se calculó las áreas relativas de las componentes obtenidas en el DAS de las dos soluciones mediante la **ecuación 4.1** y las mismas se detallan en la **Tabla 4.1**.

$$\text{Área}_{\text{relativa}} = \frac{\text{Área}_{\text{Total}}}{\text{Área}_f} \quad \text{Ec. 4.1}$$

Tabla 4.1 Áreas relativas de las componentes obtenidas en los DAS de las soluciones Cpx-Lyz y Cpx-Lyz fotolizada.

Compuesto	Áreas Relativas		
	$f_1 \lambda_{\max} 315 \text{ nm}$ (Trp28 y Trp111)	$f_2 \lambda_{\max} 335 \text{ nm}$ (Trp108)	$f_3 \lambda_{\max} 345 \text{ nm}$ (Trp62)
Cpx	$0,09 \pm 0,02$	$0,56 \pm 0,08$	$0,35 \pm 0,01$
Cpx-Lyz	$0,15 \pm 0,01$	$0,52 \pm 0,04$	$0,3 \pm 0,01$

La Tabla 4.1 resalta como la componente centrada en 315 nm (correspondiente a los Trp 28 y Trp 11) aumenta un 6% su contribución cuando Cpx es fotolizado con $\lambda_{\text{ex}} 330$ nm. Por otro lado, la componente atribuida al Trp 108 disminuye un 4% al igual que la componente del Trp 62 que lo hace en una menor proporción.

Por lo tanto, mediante espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo no se detectó efecto fotosensibilizador de Cpx a los Trp de Lyz, debido a que la fotólisis del antibiótico solo produce ligeros cambios en la contribución de la fluorescencia de los Trp de la proteína.

4.3 Estudio mediante ATR-FTIR

La estructura secundaria o nivel secundario de organización estructural de las proteínas ha sido definida como la conformación presente en regiones locales del polipéptido o proteína, que está estabilizada a través de enlaces de hidrógeno entre los átomos del enlace peptídico. En general, la estructura secundaria de proteínas se puede determinar por varios tipos de métodos instrumentales tales como Cristalografía de Rayos X, Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Dicroísmo Circular (DC) y Espectroscopias Vibracionales como Infrarroja (IR) y Ráman.

4.3.1 Estructuras secundarias

La estructura secundaria de las proteínas se caracteriza por estructuras periódicas tales como α -hélices, β -láminas, β -turn y estructura desordenada.

α -hélice: Es el nivel de organización proteica en el cual el esqueleto peptídico está enrollado, como una estructura en espiral, alrededor de un eje imaginario (organización helicoidal de la cadena peptídica). La **Figura 4.5** representa la estructura α -hélice de una proteína.

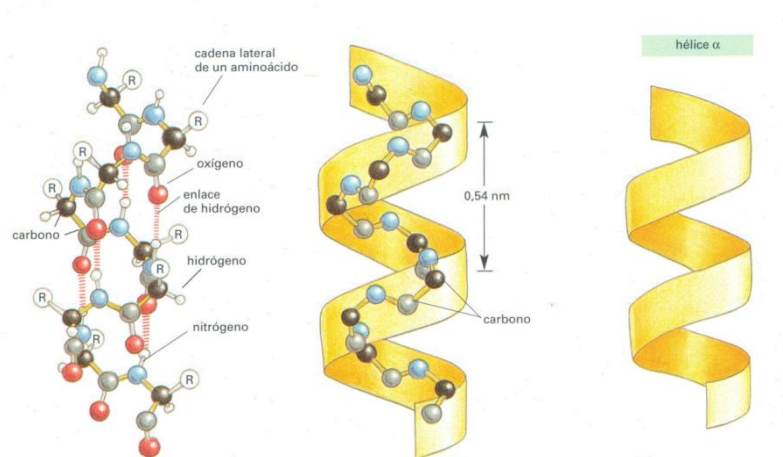


Figura 4.5 Representación de la estructura α -hélice de una proteína.

β -lámina (hoja plegada beta): Esta estructura secundaria se define como el nivel secundario de organización de las proteínas en el cual el esqueleto de la cadena peptídica (hebras betas) se extiende en un arreglo en zigzag similar a una serie de pliegues, con los enlaces peptídicos

organizados en planos de inclinación alterna (alternando planos descendentes y planos ascendentes). La hoja plegada beta puede formarse entre dos cadenas peptídicas o entre diferentes segmentos de una misma cadena peptídica, tal como se representa en la **Figura 4.6**.

Hay dos clases de estructura β -lámina: *Antiparalela*, se forma cuando las dos cadenas polipeptídicas corren en dirección opuesta (una corre del grupo amino al carboxilo y la otra del carboxilo al amino); y *Paralela*, si las cadenas polipeptídicas adyacentes corren en la misma dirección

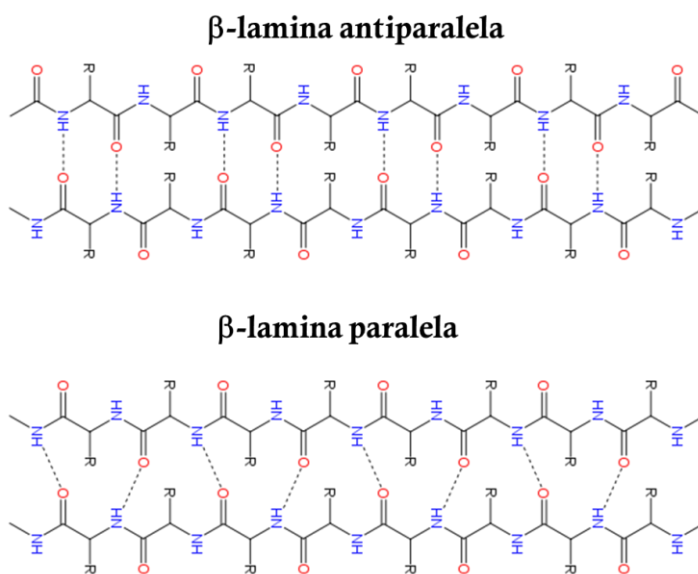


Figura 4.6 Estructura β -lamina antiparalela (en la parte superior) y paralela (en la parte inferior).

Usualmente los segmentos de polipéptidos que muestran conformación Beta se representan por una flecha que apunta en la dirección en la cual la hebra corre del grupo amino al grupo carboxilo. En las proteínas pueden encontrarse ambos tipos de β -lámina, pero la estructura antiparalela es la más estable.

β -turn (giro, rulo): Este es el nivel secundario de la organización proteica que permite el cambio de dirección de la cadena peptídica, necesario para que la proteína adopte una estructura más compacta, **Figura 4.7A**. Estas estructuras incluyen generalmente 5 residuos de aminoácidos o menos, y se asocian a la superficie proteica, ya que son estructuras hidrofílicas.

Debido a consideraciones termodinámicas, en el medio acuoso celular o sanguíneo los aminoácidos hidrofóbicos tienden a ubicarse en el interior de la proteína, exponiéndose en los pliegues los aminoácidos más hidrofílicos, los cuales interactúan con el ambiente acuoso. Como resultado, estos giros beta permiten la compactación de la proteína como se muestra en la **Figura 4.7B**.

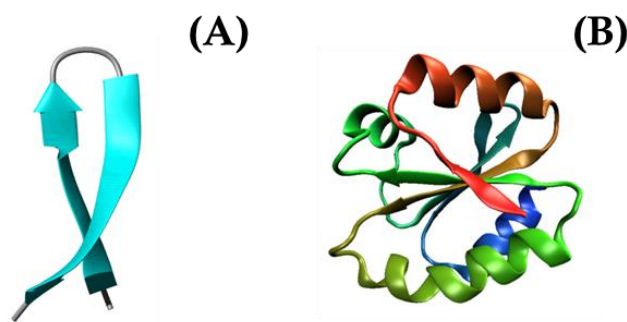


Figura 4.7 Estructura β -turn de una proteína (A), representación de la compactación de una proteína debido a β -turn (B).

Una cierta cantidad de los aminoácidos de las proteínas no se encuentran formando parte de ninguna de las estructuras anteriores, sino que se encuentran en estructuras menos organizadas que estas, que se han descrito como conformaciones enrolladas con cierto grado de organización y que han sido denominadas **random coil (estructuras desordenadas)**.

4.3.2 Análisis de Bandas mediante IR

La aplicación más común de la espectroscopia de infrarrojo en el estudio de proteínas es el análisis de la estructura secundaria. Este análisis es hecho prácticamente usando la banda Amida I, sin embargo las bandas Amida II y Amida III (**Figura 4.8**) también muestran información útil, siendo todas ellas sensibles a la conformación de la proteína

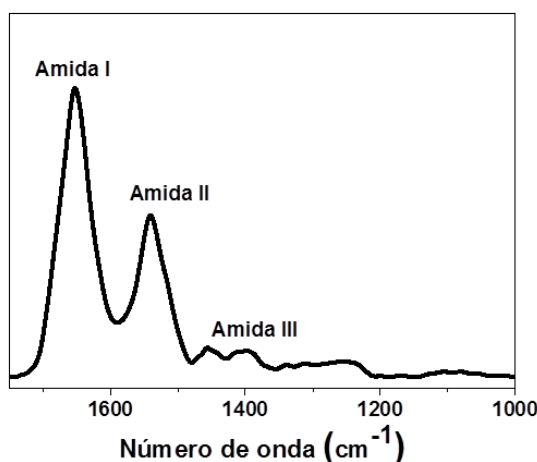


Figura 4.8 Espectro de infrarrojo clásico de proteínas para la región de las bandas Amida I, II y III.

En detalle, el espectro IR de proteínas hidratadas provee información estructural útil específicamente en la región de la banda amida I, (la banda más intensa y centrada entre 1600-

1700 cm^{-1}) la cual es debido principalmente al estiramiento del grupo C=O del enlace amida ^{115,116}. En particular, esta banda es sensible al enlace hidrogeno, a las interacciones dipolo-dipolo y a la geometría de la cadena polipeptídica. Esta banda consiste del solapamiento de bandas de elementos estructurales diferentes que pueden ser estudiados separadamente por medio de una deconvolucion de bandas ¹¹⁷. Otras bandas importantes son la Amida II que se extiende desde los 1480 a 1580 cm^{-1} (combinación de deformación en el plano del N-H y el estiramiento del enlace C-N) y la Amida III que se extiende desde los 1450 hasta los 1300 cm^{-1} , que consiste de modos vibracionales más complejos.

Generalmente, la máxima absorbancia de la banda **Amida I** de proteínas con un alto contenido de α -hélice ocurre cerca de 1656 cm^{-1} y un alto contenido de estructura **β -lámina** se observa centrada en 1632 cm^{-1} . La estructura extendida más común que se encuentra en proteínas es la **β -lámina** antiparalela, que en solución presenta dos contribuciones, una a bajas frecuencias alrededor de 1630 cm^{-1} y otra a altas frecuencias que aparece en 1690 cm^{-1} ¹¹⁸. La banda a menores números de onda ha sido asignada a péptidos en una configuración extendida, con un patrón de enlace hidrógeno formado por residuos peptídicos que no tienen parte en un enlace intramolecular β -lámina, sino más bien a un enlace hidrógeno hacia otras estructuras moleculares, por ejemplo formando enlace hidrógeno intermolecular en interacciones monómero-monómero. La estructura turn está caracterizada por la presencia de un enlace hidrogeno entre residuos de aminoácidos. No hay una clara asignación de este tipo de componente, pero se sabe que aparece entre 1660 y 1700 cm^{-1} y se estima como valor promedio 1678 cm^{-1} .

4.3.3 Estructura secundaria de Lisozima

La lisozima es una pequeña proteína de 14,4 kDa, y está constituida por 129 residuos de aminoácidos y en el estado nativo tiene una forma globular. La estructura nativa de esta enzima está compuesta de 2 dominios diferentes (α y β) entrecruzados por 4 enlaces disulfuros¹¹⁹. El dominio α está constituido por 3 α -hélices, mientras que el dominio β consiste principalmente de dos β -lámina antiparalela. Ambos dominios son funcionales para el sitio activo que se forma entre ellos. Tal como se mencionó en capítulos anteriores, Lyz es una proteína que contiene varios triptófanos, 4 residuos están situados en el dominio α (Trp 28, Trp 108, Trp 111 y Trp 123) y dos en el dominio β (Trp 62 y Trp 63), como puede verse en la **Figura 4.1**.

Los primeros reportes de estructura secundaria de Lisozima, por deconvolución de bandas mostraron una composición de 21 % de β -lámina y 41 % de α -hélice ¹²⁰, valores muy similares a los reportados por estudios de Rayos x. Tiempo después, Pérez and Griebenow ¹²¹,

cuantificaron la estructura secundaria de Lyz en solución acuosa, y basados en un ajuste de bandas para la banda Amida I, reportaron contenido de $34 \pm 1\%$ para la α -hélice y un $15 \pm 2\%$ de β -lámina como componentes mayoritarios. Estos valores fueron muy similares a los obtenidos por medidas de dicroísmo circular, que muestran valores de 30 % para α -hélice, 13% para β -lámina, 27% para la estructura β -turn y un 30% de estructura desordenada ¹²².

Por lo tanto, con el objetivo de determinar los cambios que pueden producir el antibiótico Cpx en la estructura secundaria de la proteína, se realizaron espectros infrarrojos de soluciones que contenían Cpx 8 μ M y Lyz 10 μ M en buffer Tris 10 mM pH 7,4 antes y después de la fotólisis con $\lambda_{\text{ex}} = 330$ nm. No fue necesario hacer una sustracción espectral del antibiótico solo, porque a la concentración de trabajo la contribución de su banda (≈ 1600 cm^{-1}) es muy débil. Además como control se utilizó una solución de Lyz en las mismas condiciones, con el fin de comparar el efecto de Cpx. Todas las soluciones fueron colocadas en un accesorio para ATR de cristal de ZnSe y se lo dejó secar hasta obtener un film. Basado en las derivadas segundas y en los espectros deconvolucionados, se realizó un ajuste de bandas a fin de determinar las bandas componentes de la banda amida I (1653 cm^{-1}) que es ampliamente utilizada para determinar estructura secundaria de proteínas.

La incorporación de Cpx en Lyz, produce un leve cambio conformacional en la proteína tal como se muestra en la **Figura 4.9**. Se observó una pequeña disminución en el contenido de α -hélice y un incremento para las estructuras desordenada y β -lámina. Estos resultados estarían en concordancia con lo postulado por otros autores, en donde observaron cambios en los espectros de dicroísmo circular en la región 200-230 nm, atribuidos a la modificación en la estructura secundaria de la enzima por el agregado de Cpx¹²³.

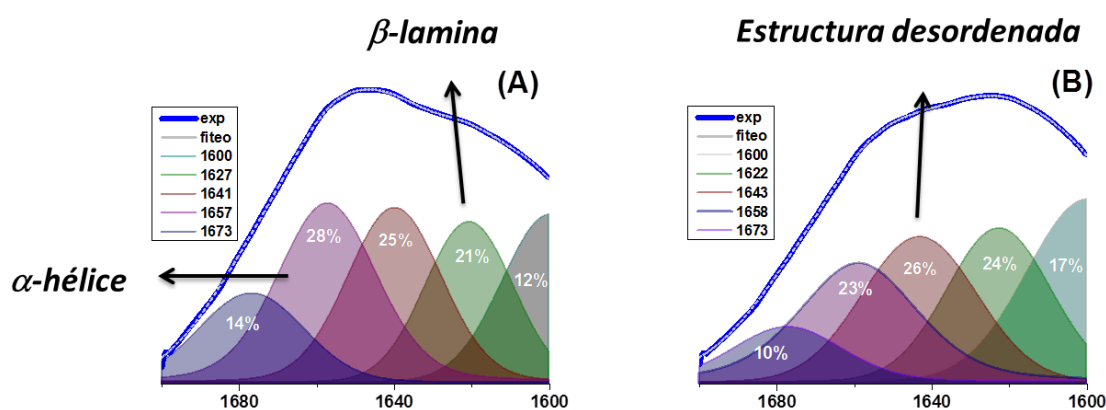


Figura 4.9 Componentes de bandas Amida I. A)- Lisozima 10 μ M, B)- Lisozima 10 μ M-Cpx 8 μ M. Ambos sistemas se encontraban en buffer Tris 10 mM pH 7,4.

Cuando la solución de Lyz-Cpx fue fotolizada con excitación a 330 nm (donde solo absorbe el antibiótico), no se observaron cambios significativos en las componentes de la banda amida I,

tal como se muestra en la **Figura 4.10**. Aunque es importante destacar el incremento del porcentaje de aminoácidos correspondientes a las interacciones de cadena laterales de la proteína (aproximadamente 1600 cm^{-1})¹²⁴, pero dicho aumento no contribuye en la estructura secundaria de la proteína.

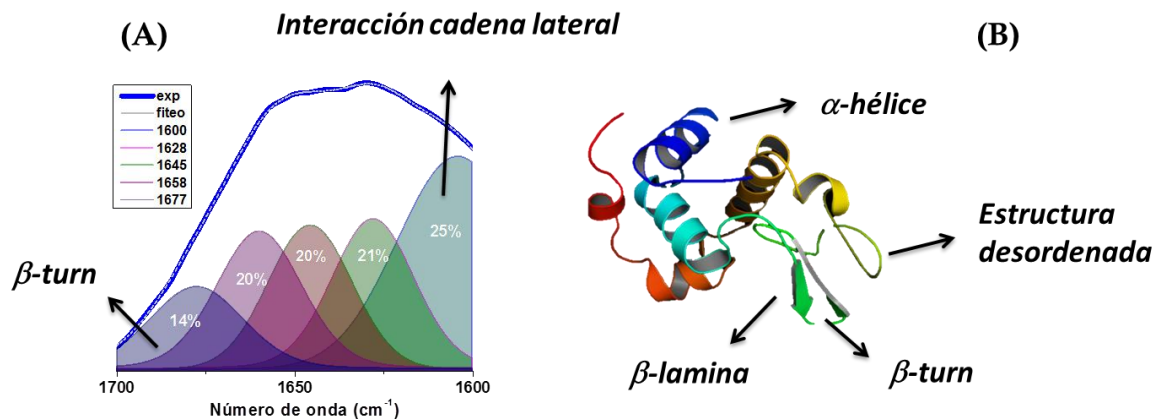


Figura 4.10 Componentes de bandas Amida I de Lyz-Cpx fotolizada con $\lambda_{\text{ex}} = 330\text{ nm}$, en buffer Tris 10 mM pH 7,4 (A). Estructura de Lyz, con flechas se indican las estructuras α -hélice, β -lámina, β -turn y estructura desordenada (B).

4.4 Conclusiones parciales

Los estudios indican que no hay transformación fotosensibilizada de la proteína Lisozima mediado por Ciprofloxacina. Los experimentos de fluorescencia resuelta en el tiempo revelan que no hay foto-oxidación de los Trp situados en la proteína. Asimismo, mediante FTIR se determinó que la estructura secundaria prácticamente no se ve afectada durante la fotolisis del antibiótico.

Resultados 4-Capítulo 5

**Efecto de la fotólisis en la
actividad antibacteriana de
Fluoroquinolonas y en la
actividad lítica de Lisozima**

5 Actividad antibacteriana de Fluoroquinolonas y Actividad lítica de Lisozima

Estudios de Actividad antibacteriana de Cpx

Mecanismos de acción

Las quinolonas son antibióticos cuyo blanco primario son la ADN girasa (topoisomerasa II) en organismos Gram negativos y la topoisomerasa IV en organismos Gram positivos¹²⁵⁻¹²⁷. La ADN girasa es un heterotetrámero A₂B₂ (**Figura 5.1**) con la subunidad A (Gyr A, 97 kDa) como responsable del enrollamiento del ADN, ruptura y reunión de ADN; y la subunidad B (Gyr B, 90 kDa) como la encargada de la hidrólisis de ATP y de la interacción con Gyr A y ATP. La ADN girasa introduce superenrollamientos negativos en el ADN y libera la tensión torsional acumulada por los procesos de replicación y transcripción; mientras que la topoisomerasa IV presenta una potente actividad decatenante (separar el DNA formado, del utilizado como plantilla para la replicación).

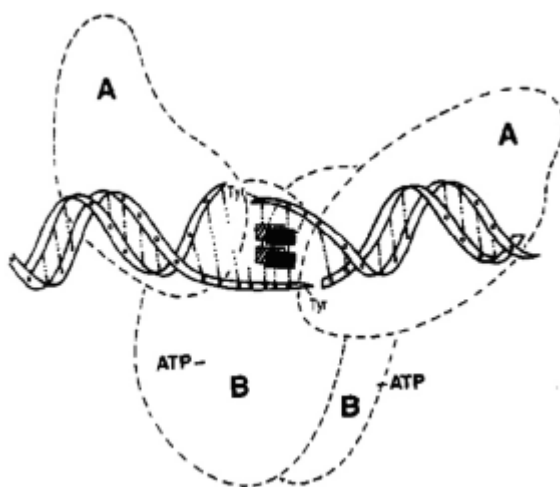


Figura 5.1 Modelo de unión cooperativa entre el ADN y la quinolona en la inhibición de la ADN-Girasa.

Ambas enzimas son esenciales para la replicación y transcripción del ADN donde la inhibición de estas funciones conduce a una muerte celular^{128,129}. La inhibición de la ADN girasa puede categorizarse dentro de los cinco tipos siguientes: Mecanismo específico basado en la inhibición de la Gyr A, mecanismo específico basado en la inhibición de la Gyr B, intercalación en el ADN, unión al hueco menor del ADN y quelación no específica.

Las quinolonas entran a los tejidos y a casi todas las células bacterianas a través de una combinación de absorción pasiva y canales de flujo (porinas)¹³⁰, **Figura 5.2**. Es decir, las

fluoroquinolonas deben de cruzar a través de las membranas citoplasmáticas para alcanzar su objetivo que es la topoisomerasa.

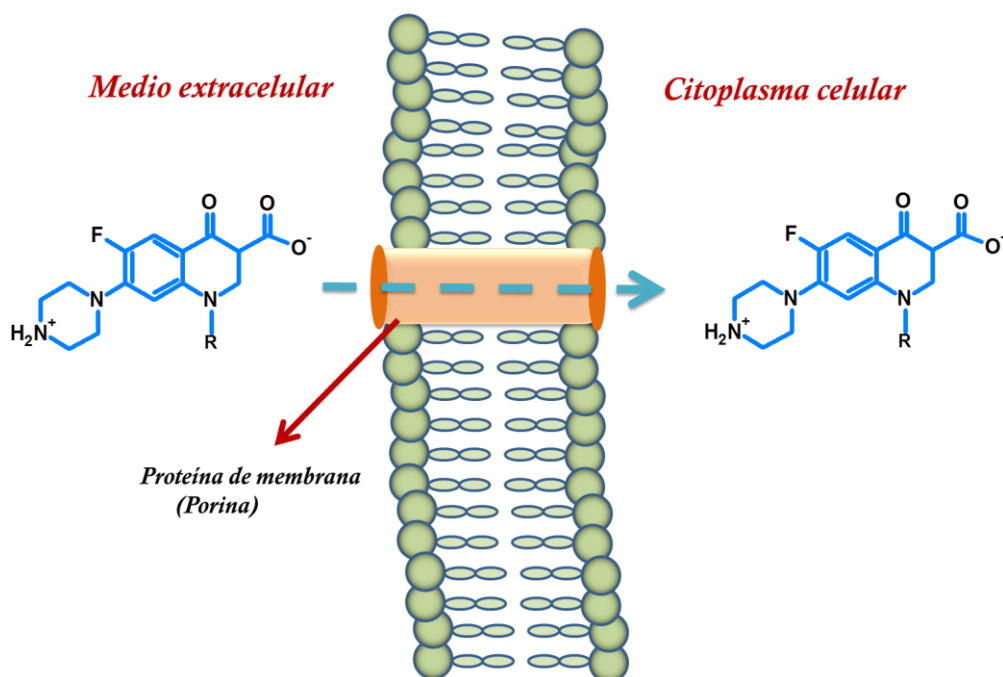


Figura 5.2 Esquematación del mecanismo de entrada de las fluoroquinolonas hacia el interior de las células.

Las FQs utilizadas en esta tesis se distinguen de su predecesora, el ácido nalidíxico, en agregar (en posición 6) átomo de flúor. Con ello aumenta la capacidad de penetración (a través del canal acuoso de las porinas) al interior de la célula bacteriana y la afinidad por la girasa. El sustituyente en el C-7 (anillo de piperazina) también influye en la actividad inhibitoria de la ADN girasa, potencia, solubilidad y otras propiedades fisicoquímicas. Dichos grupos sustituyentes en la molécula quinolona, no modifica el mecanismo de entrada hacia el interior celular, a pesar de encontrarse en su forma zwitteriónica en el pH fisiológico. Esto fue demostrado por Fresta y colaboradores cuando trabajaron con la fluoroquinolona Ofloxacin (con estructura similar a Levofloxacin), donde determinaron que la FQ tiene mayor capacidad de atravesar la membrana cuando se encuentra en su forma zwitteriónica¹³⁰. Por lo tanto, al igual que el ácido nalidíxico, las FQs cruzan la membrana externa de las bacterias mediante difusión pasiva a través de las porinas. En este sentido, Nikaido y Vaara demostraron que la membrana bacteriana estaba constituida por proteínas que permitían el ingreso de fármacos al interior celular¹³¹.

Por lo descripto anteriormente, se estudió el efecto de la luz sobre la actividad antibacteriana de las soluciones fotolizadas de Ciprofloxacina en ausencia y presencia de lisozima.

5.1 Aspectos experimentales

5.1.1 Materiales

Las soluciones de fluoroquinolonas en buffer Tris 10 mM fueron preparadas con agua ultra pura. En todos los casos la concentración final de FQs en la solución fue $\approx 10 \mu\text{M}$.

5.1.2 Métodos

Espectroscopia UV- Visible estacionaria

Los espectros de absorción se registraron en un espectrofotómetro UV-visible Hewlett Packard 8453.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Resultados y discusiones.

5.2 Ensayo cualitativo de la actividad antibacteriana de Cpx (método de difusión)

A fin de determinar el efecto de la luz en las soluciones de Cpx y Cpx-Lyz fotolizadas, sobre la actividad antimicrobiana del antibiótico, se realizó un antibiograma utilizando el método de difusión en agar (o método Kirby-Bauer). Esta es una prueba en la que se enfrenta la bacteria inoculada sobre la superficie de un medio de agar con una solución antibiótica. Para ello se utilizó cultivos puros de *Staphylococcus aureus*, Gram positivos y *Escherichia coli*, Gram negativos, en placas de Mueller Hinton (M H) agar.

Se colocaron sobre la placa sembrada 20 μL (Cpx 20 μM , Lyz 20 μM y 20 μM de cada una en la mezcla) de las muestras que se detallan en la **Tabla 5.1**. Se incubaron las placas en posición invertida a 37°C durante 24 horas y después de dicho tiempo, se midieron los diámetros de los halos de inhibición con una regla.

Tabla 5.1 Actividad antibacteriana de distintas soluciones fotolizadas y sin fotolizar de Cpx.

Muestra	Actividad antibacteriana			
	<i>Staphylococcus aureus</i> Gram (+)	Diámetro del halo (mm)	<i>Escherichia coli</i> Gram (-)	Diámetro del halo (mm)
1 – Lyz sin fotolizar	Sin actividad	-	Sin actividad	-
2 – Lyz fotolizada	Sin actividad	-	Sin actividad	-
3 – Cpx sin fotolizar	Act. moderada	13	Act. buena	29
4 – Cpx fotolizada	Sin actividad	-	Act. moderada	11
5 – Cpx-Lyz sin fotolizar	Act. moderada	11	Act. buena	27
6 – Cpx-Lyz fotolizada	Sin actividad	-	Act. moderada	13

Los diámetros de los halos de inhibición se traducen en las siguientes categorías: sin actividad menor a 7 mm, actividad moderada 10-15 mm y actividad buena mayor a 18 mm¹³².

En la **Imagen 1** se muestra una vista general de las placas con crecimiento bacteriano. La zona de color claro que ocupa la mayor parte de la placa es el crecimiento bacteriano en las zonas no inhibidas. Los círculos negros marcan las zonas en que las respectivas muestras han inhibido el crecimiento del microorganismo estudiado y se resalta con círculos rojos en la imagen.

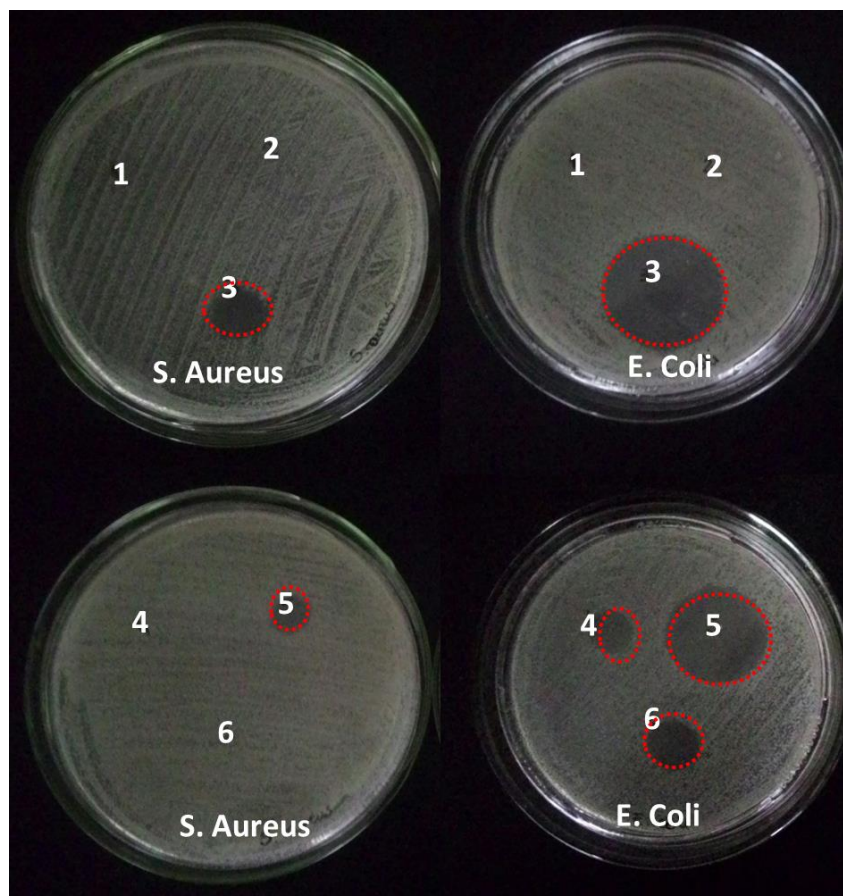


Imagen 1 Placas de *M H* agar con cultivos puros de bacterias, impregnados de antibiótico para realizar un antibiograma. Izquierda: *Staphylococcus aureus* y derecha: *Escherichia coli*. Con círculos rojos se resaltan los halos de inhibición producidos por *Cpx*.

En la Imagen 1 y Tabla 5.1, se observa como el antibiótico fotolizado conserva su actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*, no así frente a *Staphylococcus aureus*. El mismo efecto ocurre cuando la proteína está presente en la solución. Esto puede estar dado porque la cantidad de *Cpx* que queda sin fotodegradarse (antibiótico remanente, como se vio en el capítulo 3), no alcanza a tener una concentración mínima inhibitoria (CMI) que sea capaz de inhibir el desarrollo de la cepa bacteriana¹³³. Por otro lado, como era de esperarse no se observa efecto de *Lyz* sobre los cultivos bacterianos, debido a que esta proteína no tiene actividad lítica frente a las cepas utilizadas¹³⁴⁻¹³⁶.

5.3 Actividad lítica de *Lyz*

Como se describió en capítulos anteriores, la lisozima es una enzima que rompe las paredes celulares de las bacterias, lo hace hidrolizando enlaces glucosídicos β (1 \rightarrow 4) de ácido N-acetilmuránico (NAM) y N-acetilglucosamina (NAG) en un polisacárido alternante de NAM-NAG, **Figura 5.3**, debilitando así la pared celular.

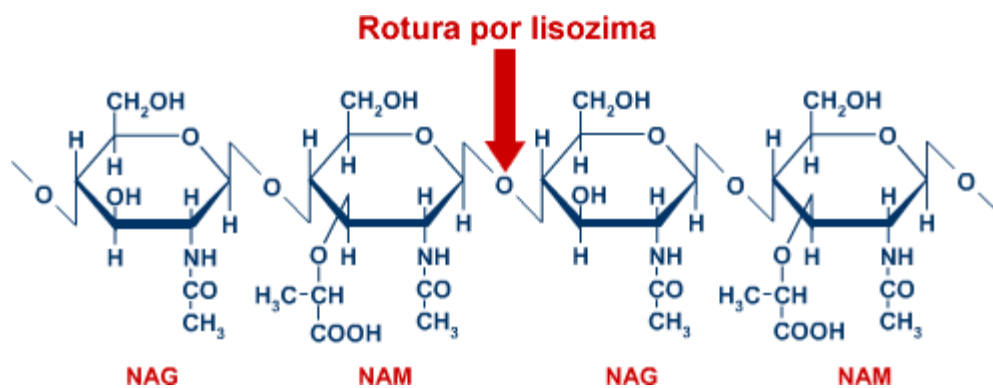


Figura 5.3 Estructuras repetitivas del péptidoglicano de la pared celular de bacterias. Se muestra el sitio de corte de lisozima.

El resultado es la penetración de agua en la célula que se hincha y acaba por estallar, un fenómeno denominado lisis, Figura 5.4.

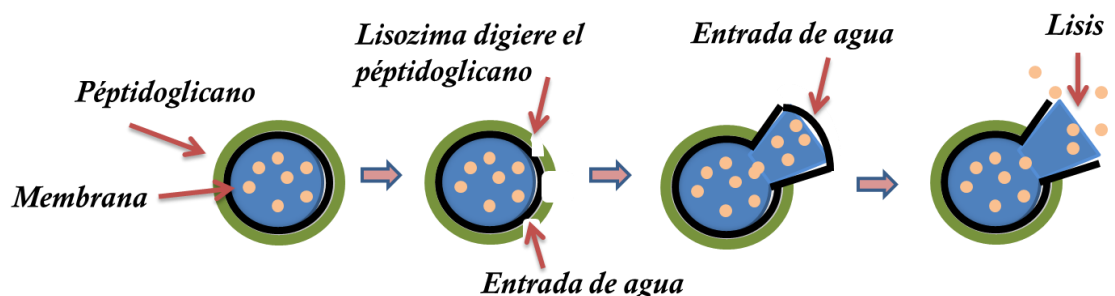


Figura 5.4 Formación de protoplastos: en una solución diluida, la rotura de la pared libera el protoplasto que inmediatamente se lisa al ser muy débil la membrana citoplasmática.

5.3.1 Ensayo de la actividad de lisozima

A fin de evaluar la actividad lítica de lisozima en las soluciones que contienen Cpx fotolizado y sin fotolizar, se utilizó una solución bacteriana de *Micrococos Luteus* (mo) como sustrato¹³⁷.

Para ello alícuotas de 0,1 ml de muestra se adicionó a 0,65 ml de la suspensión del sustrato, tal como se muestra en la **Tabla 5.2**. La actividad lítica se siguió por disminución de la turbidez (medidos a partir de valores de absorbancia a 540 nm) durante 12 min, **Figura 5.5**. Para cada ensayo de actividad se usó solución bacteriana fresca, control de temperatura a 25°C y agitación constante.

Tabla 5.2: Ensayo de la actividad lítica de lisozima.

Controles	<i>M. Lacteus</i> (mo)	Muestra
1	0,65 ml	0,1 ml de buffer Tris
2	0,65 ml	0,1 ml de Cpx en buffer Tris
3	0,65 ml	0,1 ml de Cpx en buffer Tris fotolizado
4	0,65 ml	0,1 ml de Lyz en buffer Tris
5	0,65 ml	0,1 ml de Lyz en buffer Tris fotolizada
6	0,65 ml	0,1 ml de Lyz-Cpx en buffer Tris
7	0,65 ml	0,1 ml de Lyz-Cpx en buffer Tris fotolizado

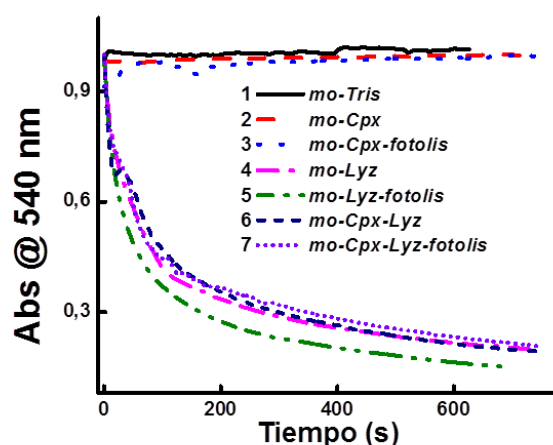


Figura 5.5 Cambios de absorbancia a 540 nm de una suspensión de *Micrococcus Luteus* con diferentes controles.

A partir de los datos representados en la **Figura 5.5**, se puede concluir que los controles 1, 2 y 3 no mostraron actividad lítica, evidenciados por ausencia de cambio en la absorbancia a 540 nm.

Con respecto a los otros controles, la actividad lítica de la proteína no fue afectada por la presencia del antibiótico, al igual que la solución de Cpx-Lyz fotolizada con $\lambda_{\text{ex}} = 330$ nm. Por lo tanto, este experimento nos permite concluir que Lyz mantiene su actividad aun cuando se une con el antibiótico. Asimismo, los fotoproductos producidos en la fotólisis del antibiótico (la desfluorinación y la ruptura del anillo piperazina) tampoco interfieren en la actividad de la enzima.

5.4 Conclusiones parciales

Los resultados indican que la exposición a luz constante ($\lambda_{ex} = 330 \text{ nm}$) de ciprofloxacina afecta su actividad antibiótica, siendo mayor el efecto en bacterias Gram positivas. Esto está relacionado con la baja concentración de antibiótico remanente luego de la fotólisis. Asimismo la presencia de lisozima no tiene ningún efecto, ya sea ni antagónico ni sinérgico, en la actividad del antibiótico. Del mismo modo, la Lyz no pierde su actividad lítica cuando se encuentra Cpx en la solución. Esto concuerda con lo estudiado en el capítulo 3, donde el antibiótico al unirse a Lyz no modificaba su estructura secundaria.

Resultados 5-Capítulo 6

Propiedades Fotofísicas de Fluoroquinolonas y Lisozima en Micelas Inversas de AOT

6 Propiedades fotofísicas de FQs y Lyz en Micelas Inversas de AOT

6.1 Micelas

Una forma de modelar o simular las propiedades de los sistemas naturales es mediante la utilización de **medios microheterogéneos**, en donde la organización molecular puede alcanzarse en forma controlada. El término microheterógeno proviene del hecho que estos sistemas en solución son termodinámicamente estables, isotrópicos, ópticamente transparentes y homogéneos en escala macroscópica pero heterogénea desde el punto de vista molecular. Las ventajas de la organización molecular son cada vez más reconocidas en el estudio de procesos fotoquímicos y fotofísicos. En estos sistemas es posible reunir reactivos, productos, sensibilizadores, etc. La heterogeneidad puede llevar a cambiar los potenciales redox, eficiencias cuánticas, rutas fotofísicas y fotoquímicas, reactividades y estereoquímica.

Estos medios microheterogéneos tales como micelas directas e inversas, son formados por la asociación espontánea de moléculas anfifílicas o **surfactantes**, **Figura 6.1**.

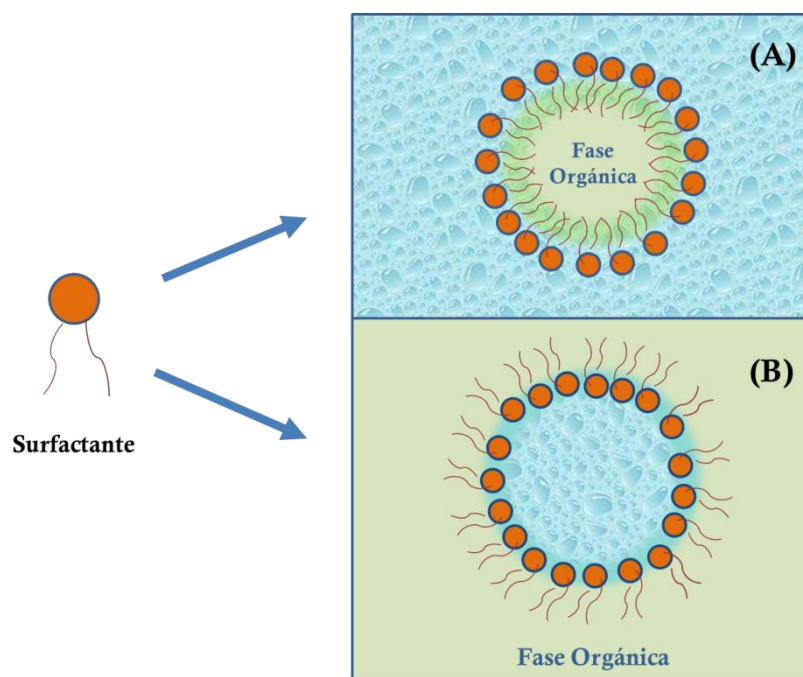


Figura 6.1 Representación esquemática de micelas directas (A) y micelas inversas (B), por agregación de moléculas de surfactante.

6.1.1 Micelas inversas

Las micelas inversas o microemulsiones agua en aceite (W/O) están caracterizadas por una microgota de agua rodeada por una monocapa de moléculas de surfactante, con sus colas hidrocarbonadas (apolares) orientadas hacia el solvente orgánico y los grupos iónicos o polares y sus contraiones orientados hacia el interior del agregado (Figura 6.1B), si el solvente es agua, se hace referencia a *laguna acuosa* (derivado del vocablo inglés “waterpool”) o microfase acuosa. Esta estructura permite la solubilización tanto de substratos solubles en agua en el interior acuosa y/o en la interfase micelar como de substratos no polares en la fase orgánica dispersa^{138,139}.

Una clase de surfactante con la capacidad de formar micelas inversas es el 1,4-bis (2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio (AOT), también denominado Aerosol OT (**Figura 6.2**). Este surfactante se ha utilizado extensamente debido a su capacidad de formar agregados en solventes polares y por su capacidad de solubilizar grandes cantidades relativas de agua¹⁴⁰. La cantidad de agua solubilizada en estos sistemas se define como W ($[H_2O]/[Surfactante]$), que es el cociente molar entre la concentración de agua y surfactante presente en la solución. El valor de W se calcula usando la **ecuación 6.1**, donde V_{H_2O} , es el volumen de agua agregada, 55,5 es la concentración molar del agua pura, V_{surf} y $[Surf]$, el volumen y concentración molar del surfactante, respectivamente.

$$W = \frac{n^{\circ} \text{ de moles de agua}}{n^{\circ} \text{ de moles de surfactante}} = \frac{V_{H_2O} \times 55,5}{V_{surf} [Surf]} \quad \text{Ec. 6.1}$$

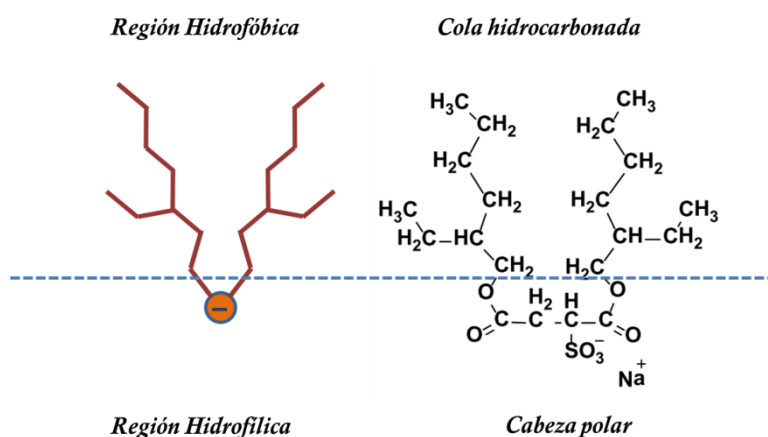


Figura 6.2 Estructura química de la molécula del surfactante AOT.

La estructura y propiedades de las micelas inversas han sido ampliamente investigado mediante el empleo de una variedad de técnicas, por ejemplo, Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Espectroscopia de

Fluorescencia, Dispersión Dinámica de Luz (DLS), técnicas Calorimétricas y de Conductividad¹⁴¹⁻¹⁴⁸.

Algunas propiedades generales de estos sistemas son:

- La forma geométrica que posean las moléculas de surfactante influenciará la forma y tipo de agregado que se forme en un solvente dado.
- Existe una relación aproximadamente lineal entre el tamaño de la laguna acuosa (nm), R_w , y el valor de W , dada por $R_w = 1.5 \times W$.
- El tamaño de las micelas sería independiente de la fase orgánica dispersante.
- El número de agregación N (= el número de moléculas de surfactante necesarios para formar una micela de determinado W), depende del solvente.
- La capacidad de solubilización de agua de estos surfactantes aumenta con el incremento del tamaño de la cadena carbonada.

Características de las moléculas de agua

Las características del agua incorporada en el interior de las micelas inversas dependen principalmente del valor de W y de la naturaleza de las cabezas polares del surfactante¹⁴⁹. Maitra y colaboradores¹⁵⁰, trabajando con micelas inversas de AOT en iso-octano, proponen la coexistencia de tres tipos diferentes de agua en el interior acuoso de una micela inversa. ❶ ***agua unida***: como las moléculas de agua unidas a las cabezas negativas del surfactante a través de los iones sodio que se encuentran en la vecindad de la interfase. Esto ocurre porque los iones sodio hidratados están unidos a las cabezas del surfactante por enlaces puente de hidrógeno. ❷ ***agua atrapada en la interfase***: aquellas moléculas cercanas a la interfase y que no están unidas a ningún otro tipo de moléculas y que se comportan como monómeros o dímeros y con capacidad de penetrar la interfase y que por lo tanto se comportan como moléculas de agua en una matriz. ❸ ***agua libre***: ubicada en el centro de la micela. La **Figura 6.3** representa la diferente ubicación de las moléculas del agua en una micela inversa de AOT.

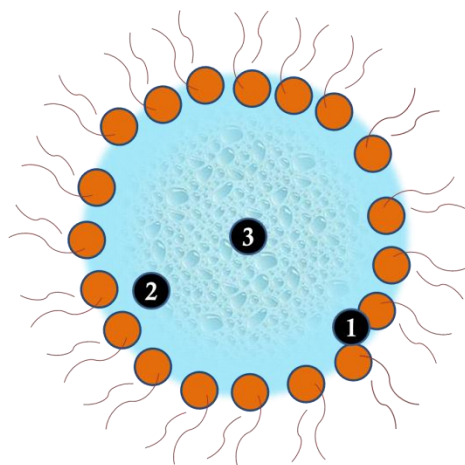


Figura 6.3 Representación de la ubicación de las moléculas de agua en el interior de una micela inversa de AOT.

En este capítulo de tesis se evalúa las propiedades fotofísicas de las FQs en micelas inversas de AOT disueltas en iso-octano, las cuales pueden simular ambientes biológicos. Además se realizara el estudio de las propiedades fotofísicas de la proteína Lisozima en estos sistemas microheterogéneos, para luego poder realizar una mejor interpretación en la interacción de estos antibióticos monofluorados con la proteína en soluciones micelares.

6.2 Aspectos experimentales

6.2.1 Materiales

Las soluciones de micelas inversas de 0,1 M de docusato de sodio (AOT) fueron preparadas por disolución del surfactante en iso-octano anhidro, tal como se indica en el capítulo 10 de Técnicas Experimentales. En todos los casos, la concentración final de FQs en la solución fue $\approx 4 \mu\text{M}$ y para Lyz $\approx 5 \mu\text{M}$.

6.2.2 Métodos

Espectroscopia UV- Visible estacionaria

Los espectros de absorción se registraron en un espectrofotómetro UV-visible Hewlett Packard 8453. Los espectros de emisión en un espectrofluorómetro Hitachi F-2500, en celdas de cuarzo de 1 cm, con rendijas de excitación y emisión de 5 nm y con $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$ para las soluciones de FQs y con $\lambda_{\text{ex}} = 280$ y 295 nm para las soluciones de Lyz.

Espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo por recuento de fotones individuales correlacionado temporalmente (TCSPC)

Estos experimentos fueron realizados en un aparato Tempro-01 de Joriba Jovin Yvon, utilizando una fuente de excitación pulsada ultra rápida de 340 (± 15) nm para las FQs y de 280 (± 12) nm y 295 (± 15) nm para Lyz, Nanoled®, 1Mhz. La longitud de onda de emisión fue seleccionada con un monocromador de 12 nm de ancho de banda de emisión. Todas las medidas fueron realizadas en solución saturada de aire y a temperatura ambiente.

Todas las medidas descriptas anteriormente se realizaron por triplicado.

Resultados y discusiones.

6.3 Propiedades fotofísicas de Fluoroquinolonas en Micelas Inversas

6.3.1 Espectros de absorción UV

Los espectros de absorción UV-Vis de Cpx ($\approx 4 \mu\text{M}$) encapsulados en soluciones de micelas inversas de AOT 0,1 M en iso-octano y en solución de buffer Tris 10 mM a pH 7,4, se muestran en la **Figura 6.4**. Es interesante destacar como el pico centrado ≈ 280 nm (correspondiente a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$) se corre hacia el rojo del espectro, cuando el antibiótico pasa de una solución homogénea a una micelar. El mismo efecto se observa para todas la FQs.

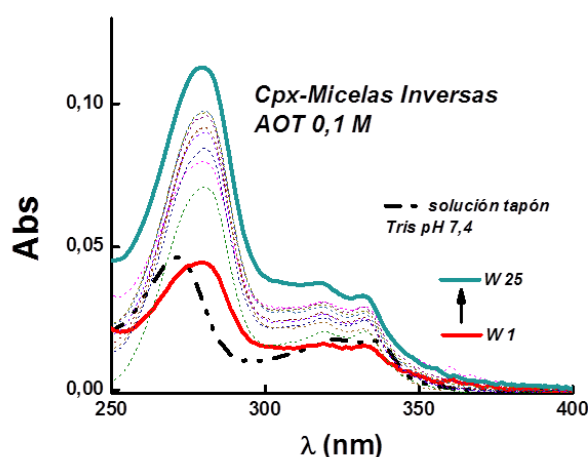


Figura 6.4 Espectros de absorción UV-Vis de Cpx ($\approx 4 \mu\text{M}$) en solución de buffer Tris 10 mM pH 7,4 (líneas y puntos negros) y en micelas inversas de AOT 0,1 M en iso-octano a diferentes W.

El aumento del contenido acuoso en el interior micelar de $W = 1$ hasta $W = 25$, produce un incremento en el espectro de absorción en todo el rango espectral donde absorben las FQs. Asimismo, también se observa un ligero desplazamiento batocrómico del pico centrado en longitudes de onda corta (260-310 nm aproximadamente). Este corrimiento espectral es característico cuando las FQs pasan de una solución neutra a una solución ácida, por lo tanto se podría suponer que el interior acuoso de una micela inversa de AOT tiene un pH más bajo que una solución homogénea. En este sentido, Niemeyer y colaboradores¹⁵¹ trabajando con el colorante Cl-NERF en micelas inversas de carboxilato de amonio perfluoropoliéter (PFPE) y AOT (surfactantes de estructuras similares), propusieron que el pH en el interior acuoso es ácido.

6.3.2 Espectros de emisión de fluorescencia

La **Figura 6.5** muestra los espectros de emisión de fluorescencia de Cpx ($\approx 4 \mu\text{M}$) en soluciones micelares de AOT 0,1 M en función de W y en solución buffer Tris 10 mM (pH = 7,4). Los espectros de emisión fueron corregidos por el valor de absorbancia a la longitud de onda de excitación ($\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{ nm}$). Como puede observarse, a medida que aumenta el W en las soluciones micelares se produce un incremento en las intensidades de fluorescencia. Este efecto se observó para todas las FQs estudiadas. Estos resultados coinciden con los reportados por Park y colaboradores⁵⁷, donde también observan un incremento y un corrimiento batocrómico en la intensidad de fluorescencia de Nor a medida que aumenta el contenido acuoso en la micela inversa de AOT; pero ellos atribuyen que el interior acuoso tiene un pH básico, lo cual no coincide con los cambios espectrales observados.

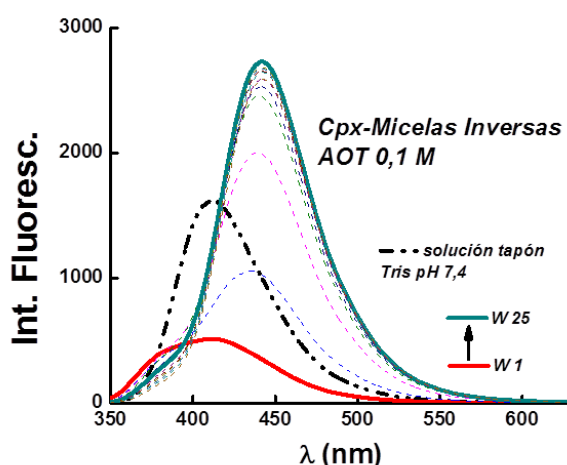


Figura 6.5 Espectros de Fluorescencia con $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$ de Cpx ($\approx 4 \mu\text{M}$) en micelas inversas de AOT 0,1 M en función del W y en solución de buffer Tris 10 mM pH 7,4 (líneas y puntos negros).

Del mismo modo que en los espectros de absorbancia, el incremento del contenido acuoso en la micela inversa produce un efecto batocrómico en el máximo de emisión de $W = 1$ a $W = 7$, manteniéndose prácticamente constante en $W > 7$. Nuevamente, esto es consistente con la acidez sensada por las FQs, ya que el espectro de fluorescencia es desplazado hacia el rojo del espectro al pasar de un medio neutro a uno ácido. Por otra parte, analizando el ancho total a la mitad del máximo (ATMM) se observa una fuerte disminución al variar el W de 1 a 5 y luego constante hasta $W = 25$. Estos resultados son representados en la **Figura 6.6**.

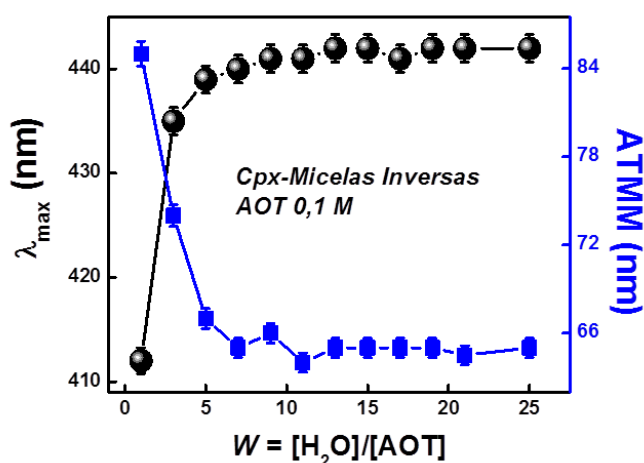


Figura 6.6 Variación de los parámetros de fluorescencia de Cpx en AOT-iso-octano 0,1M en función de W . Longitud de onda del máximo de emisión (λ_{max}) con círculos negros y ATMM con cuadrados azules.

En la **Figura 6.7** se observa un incremento en el corrimiento de Stokes ($\nu_A - \nu_F$) de Cpx con el aumento del contenido acuoso hasta $W \approx 10$, manteniéndose prácticamente constante a valores mayores de W y aproximándose a los obtenidos en solución ácida. Esta dependencia indica la estabilización progresiva del estado excitado emisor del antibiótico con la formación de la pseudofase acuosa en el interior micelar. Esto es debido a que la mayoría de los fluoróforos tienen momentos dipolares mayores en el estado excitado que en el estado fundamental. Por lo tanto las moléculas de disolvente pueden reorientar el dipolo de la molécula en estado excitado, lo cual disminuye su energía y la emisión se desplaza hacia longitudes de onda más largas.

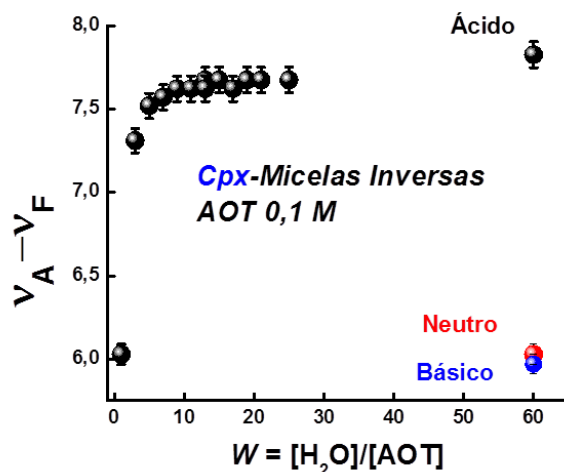


Figura 6.7 Corrimientos de Stokes ($v_A - v_F$) de soluciones de Cpx ($\approx 4 \mu\text{M}$) en AOT-iso-octano 0,1 M en función del W y en solución Tris 10 mM de pH ácido (círculo negro), pH neutro (círculo rojo) y pH básico (círculo azul).

Por otra parte, para determinar si el buffer Tris tiene algún efecto sobre las cabezas polares del surfactante (como contracción), se realizó el mismo experimento anterior pero en vez de agregar una solución de buffer Tris a pH = 7,4 para modificar el W ; se agregó agua ultrapura. Tal como se muestra en la **Figura 6.8** los cambios en la λ_{max} y en el ATMM de Cpx en micelas inversas de AOT, son independientes al cambiar el W con una solución de buffer Tris o con agua ultrapura.

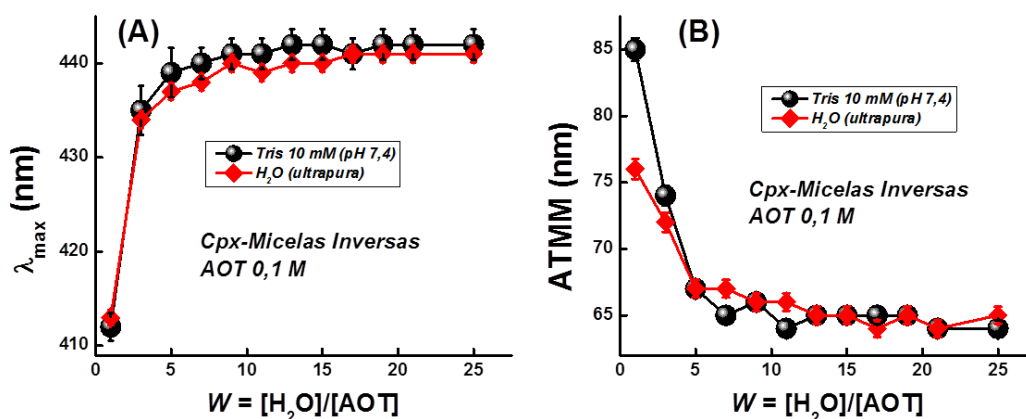


Figura 6.8 Variación de los parámetros de fluorescencia de Ciprofloxacina en AOT-iso-octano 0,1 M en función de W , utilizando buffer Tris 10 mM a pH 7,4 (círculos y líneas negras) y agua (diamantes y líneas rojas) para formar el interior acuoso. Longitud de onda del máximo de emisión (A) y ATMM (B).

Los cambios bruscos observados tanto en la λ_{max} como en el ATMM en soluciones micelares de $W < 5$ pueden explicarse debido a que la laguna acuosa no está completamente formada y las moléculas de agua pueden ser consideradas como “asociadas” a la interfase micelar,

solvatando la cabeza polar y el contraión sodio del surfactante. Bajo esta condición, el tamaño del interior acuoso es casi insignificante y se puede utilizar un modelo sencillo para describir dos pseudofase de la microemulsión: el agregado micelar y el disolvente que ocupa la mayor parte¹⁵².

Por otro lado, en $W > 5$, las cabezas polares del surfactante y sus contraiones están totalmente solvatados. En consecuencia, la proporción de moléculas de agua “libre” presentes en la laguna acuosa aumenta hasta que el entorno del agua se asemeja a la del agua en soluciones homogéneas¹⁵². Por tal motivo, prácticamente no se observan cambios en la λ_{\max} ni en el ATMM de los espectros de fluorescencia de las FQs. Además, esto pone de manifiesto que los antibióticos monofluorados se encontrarían en el interior de la laguna acuosa y no en la interfase micelar.

A fin de poder dilucidar el valor del pH en el interior acuoso de la micela inversa de AOT, se comparó los espectros de fluorescencia normalizados de Cpx en $W = 25$ y en soluciones homogéneas de pH ácidos.

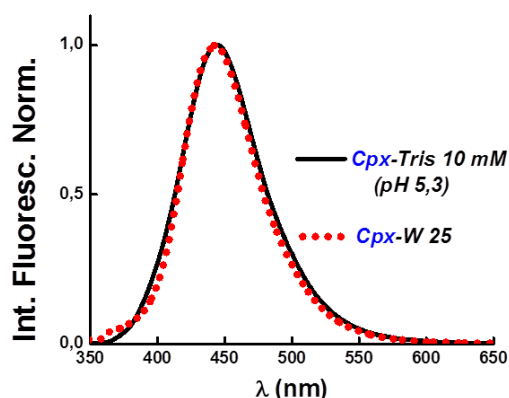


Figura 6.9 Comparación entre los Espectros de Fluorescencia Normalizados con $\lambda_{\text{ex}} = 330$ nm, de Cpx en solución micelar $W = 25$ (línea punteada) y en solución homogénea (línea continua) de pH = 5,3.

Interesantemente como puede observarse en la **Figura 6.9**, el espectro de emisión normalizado de Cpx dentro de las micelas inversas en $W = 25$ es coincidente con el espectro de emisión normalizado de Cpx en soluciones ácidas de pH $\approx 5,4$. Por lo que de esta forma se puede confirmar que el pH en el interior acuoso de las micelas inversa de AOT es ácido, y por este motivo se observa el corrimiento batocrómico de los espectros de los antibióticos cuando están encapsulados en las soluciones micelares.

6.3.3 Fluorescencia resuelta en el tiempo

El estudio de la fluorescencia dinámica de las FQs en soluciones micelares, resolvieron dos contribuciones en el decaimiento de la fluorescencia, tal como se muestra en la **Figura 6.10**.

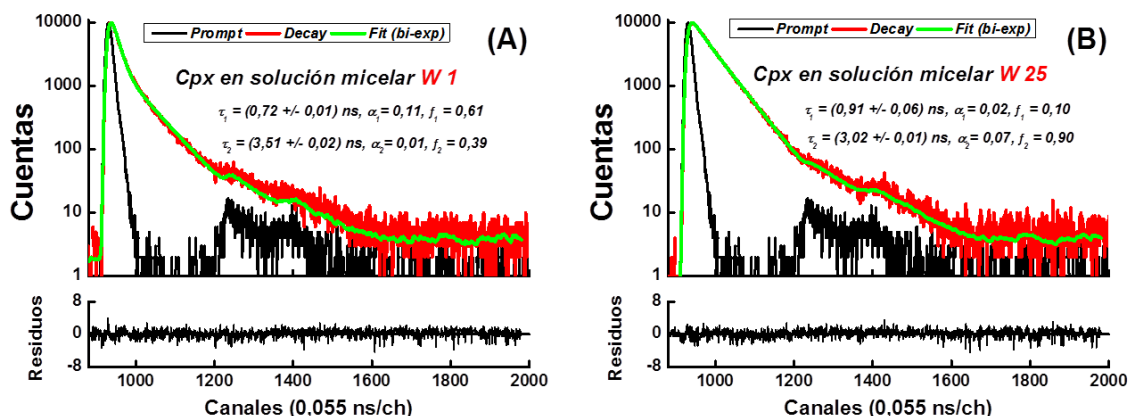


Figura 6.10 Decaimientos obtenidos por TCSPC de Cpx ($\approx 4 \mu\text{M}$) en micelas inversas de AOT utilizando un nanoled con $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$ y recolectando la señal en 440 nm : $W = 1$ (A) y $W = 20$ (B).

En soluciones micelares las FQs poseen dos tiempos de vidas, una componente corta τ_1 que se mantiene prácticamente constante al aumentar el contenido acuoso de la micela; y la segunda componente τ_2 la cual incrementa su valor al pasar de $W = 1$ hasta $W = 3$, luego disminuye hasta $W = 25$. Por otro lado, analizando las contribuciones fraccionales en función del contenido acuoso en las micelas inversas se observó como f_1 (correspondiente a τ_1) disminuye a expensas del aumento de f_2 (correspondiente a τ_2) en el rango de $W = 1$ a $W = 5$ y luego se mantienen constantes, **Figura 6.11**. Este fenómeno se observa para todas las FQs.

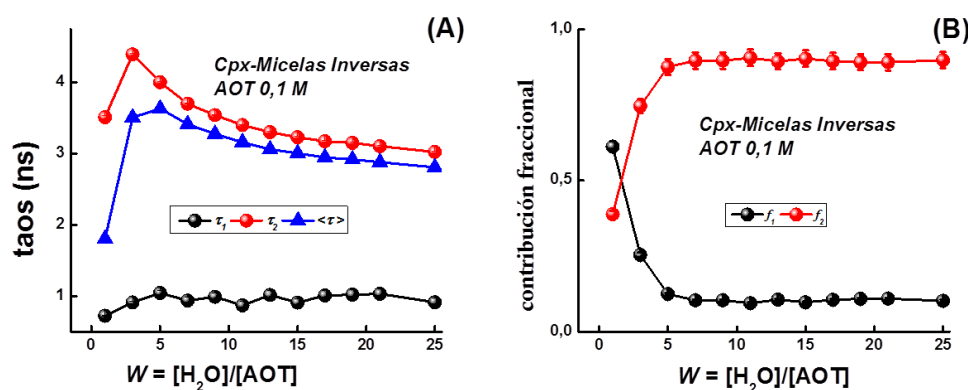


Figura 6.11 Tiempos de vida (A) y contribuciones fraccionales (B) de Cpx ($\approx 4 \mu\text{M}$) en micelas inversas de AOT 0,1 M en función del W .

Espectros Asociados a los Decaimientos (DAS) de FQs en Micelas Inversas de AOT

Para una mejor interpretación de los resultados obtenidos de la emisión resuelta en el tiempo, se realizó las medidas de decaimientos de fluorescencia en todo el rango del espectro de emisión de FQs en soluciones micelares y se analizaron mediante el ajuste multi-exponencial (ecuación 2.3 del capítulo 2).

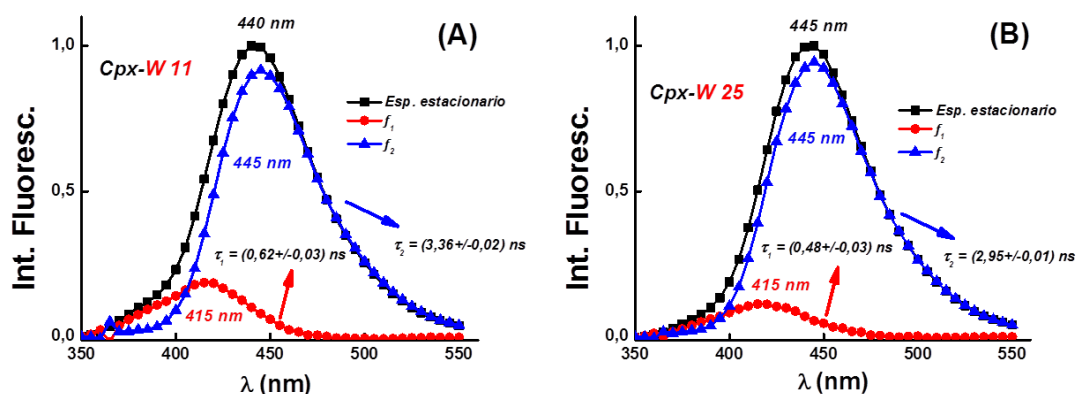


Figura 6.12 Espectro asociado al decaimiento (DAS) de cada componente emisor de Cpx ($\approx 4 \mu\text{M}$) en micelas inversas de AOT 0,1 M: $W=11$ (A) y $W=25$ (B).

En la **Figura 6.12** se puede ver como a medida que aumenta el contenido acuoso en la micela inversa, la contribución fraccional f_2 (correspondiente al tiempo de vida más largo) corresponde a $\approx 95\%$ del espectro de fluorescencia de Cpx. El mismo efecto se observó para el resto de los antibióticos. Estos resultados explican la disminución del ATMM y el corrimiento batocrómico de λ_{max} de las FQs a medida que aumenta el W , observados en las figuras 6.3 y 6.4.

Por otro lado, se calcularon las áreas relativas de las componentes obtenidas en el DAS de Cpx en la micela inversa de $W=25$ y se comparó con la distribución de especies del antibiótico en solución homogénea en función del pH (figura 2.12 del capítulo 2) y se encontró que coinciden con la distribución de especies de Cpx en solución de pH = 5,3. Por lo tanto, de esta forma se confirma una vez más el carácter ácido del interior acuoso en la micela inversa y se infiere el valor de pH = 5,3. Esto se detalla en la **Tabla 6.1**.

Tabla 6.1 Comparación entre las áreas relativas de Cpx en Micela W 25 y la especie catiónica y zwitteriónica de Cpx en solución homogénea de pH 5,3.

<i>Especie</i>	<i>Cpx</i>	
	<i>Micela $W = 25$</i>	<i>Solución pH 5,3</i>
f_1/Cpx^\pm	$0,09 \pm 0,05$	$0,12 \pm 0,03$
f_2/Cpx^+	$0,91 \pm 0,03$	$0,88 \pm 0,02$

6.4 Propiedades fotofísicas de Lisozima en Micelas Inversas

Como se mencionó en capítulos anteriores, la proteína Lisozima de clara de huevo se caracterizada por poseer 6 residuos de Triptófano (Trp), los cuales son representados en la figura 3.1 del capítulo 3, y sirven como sondas fluorescentes para realizar estudios espectroscópicos. Por ello, antes de estudiar la interacción de los antibióticos FQs con Lyz, primero se estudió el efecto de las micelas inversas de AOT en las propiedades fotofísicas de la enzima.

6.4.1 Espectros de absorbancia UV

Como se puede observar en la **Figura 6.13**, los espectros de absorción de Lyz ($\approx 5 \mu\text{M}$) incorporada en soluciones de micelas inversas de AOT, prácticamente no cambian con la cantidad de agua dentro de la micela (W). Por otro lado, se determinó que la proteína no se disuelve ni en iso-octano (solvente utilizado para disolver AOT) ni en solución de AOT en ausencia de agua. Lo que pone de manifiesto que Lyz se encuentra ubicada en el interior acuoso de la micela.

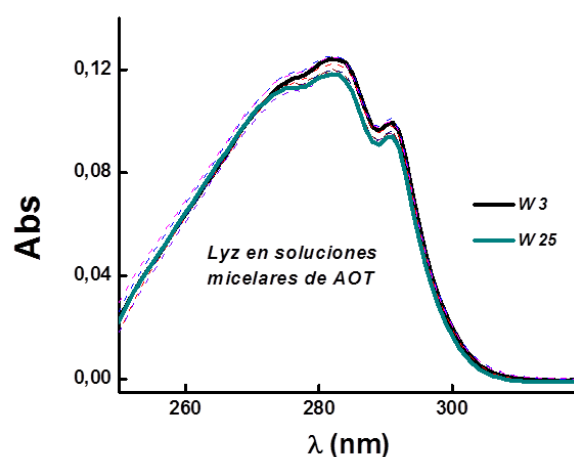


Figura 6.13 Espectros de absorción de la proteína lisozima ($\approx 5 \mu\text{M}$) en micelas inversa de AOT 0,1 M en función del interior acuoso.

6.4.2 Espectros de emisión de fluorescencia

Contrariamente a lo observado por espectroscopia de absorción, la emisión de fluorescencia de Lyz es más sensible a la cantidad de agua solubilizada en la micela inversa de AOT (**Figura 6.14A**). En micelas inversas con bajo contenido acuoso ($W = 3$), se observa un incremento en la intensidad de fluorescencia y un desplazamiento al azul del espectro ($\approx 10 \text{ nm}$) en comparación con el de solución homogénea. A medida que aumenta el W , la fluorescencia disminuye y el espectro es desplazado hacia longitudes de onda mayores, aproximándose al espectro en solución homogénea. El mismo efecto fue observado por Ferreira y colaboradores.¹⁵³

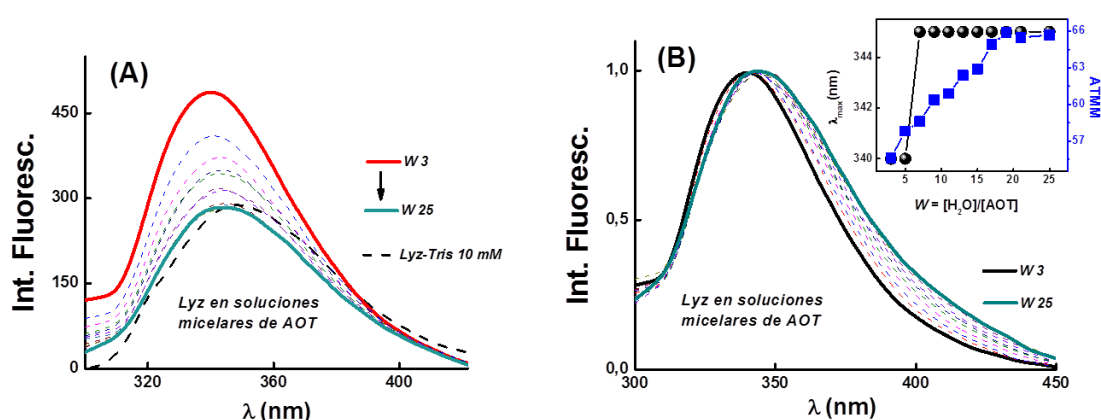


Figura 6.14 Espectros de Fluorescencia de Lyz ($\approx 5 \mu\text{M}$) en función del W con $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ (A); Espectros de Fluorescencia Normalizado de Lyz en función del W , inserto longitud de onda del máximo de emisión (λ_{max}) con círculos negros y ATMM con cuadrados azules.

En los espectros de fluorescencia normalizados en el máximo de emisión (**Figura 6.14B**), se observa como λ_{max} aumenta hasta $W = 5$ y luego permanece constante. De igual modo, el ATMM aumenta hasta $W = 16$ y a partir de ese valor ya no se modifica (insertos en la Figura 6.14B). Como se mencionó anteriormente, en micelas inversas con $W > 5$ las moléculas de agua comienzan a tener más libertad y por lo tanto el interior acuoso comienza a ser menos rígido permitiendo a la proteína tener mayor movilidad y sensor una región más polar, lo cual explicaría los cambios observados.

El aumento del ATMM hasta $W = 16$ indica que, la distribución de las poblaciones (tres poblaciones de Trp, ver capítulo 3) en el espectro de fluorescencia, estarían siendo modificadas hasta llegar a ese equilibrio. Para poder ver con mayor detalle el efecto micelar en las poblaciones de Trp en Lyz, se realizó medidas resueltas en el tiempo.

6.4.3 Fluorescencia resuelta en el tiempo

Los experimentos de fluorescencia resueltos en el tiempo se exploraron variando el W de 3 a 25. Al igual que en solución homogénea (ver capítulo 3), un buen ajuste de los datos experimentales de Lyz en micelas inversas se obtiene mediante el uso de un decaimiento tri-exponencial. Tal como puede observarse en la **Figura 6.15**, existe una componente corta con $\tau_1 \approx 0,60$ ns, otra componente con $\tau_2 \approx 2,20$ ns y una larga con $\tau_3 \approx 7,20$ ns. Estos tiempos de vida no se ven afectados por el incremento del contenido acuoso en la micela y son muy similares a los datos de bibliografía¹⁵⁴.

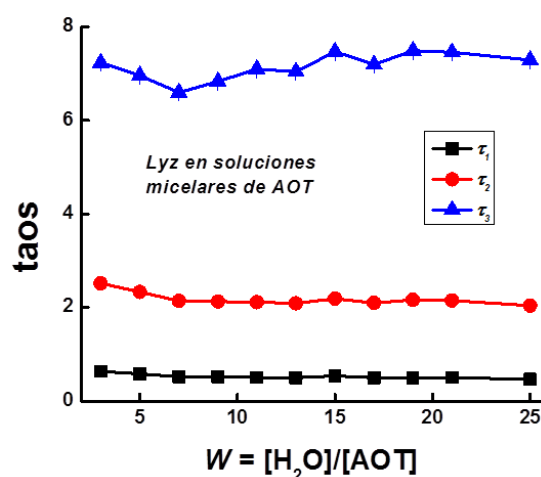


Figura 6.15 Tiempos de vida de Lisozima en soluciones micelares de AOT 0,1 M a diferente W , utilizando un nanoleed con $\lambda_{ex} = 295$ nm y recolectando la señal en 345 nm.

Espectros Asociados a los Decaimientos (DAS) de Lyz en Micelas Inversas de AOT

Para dilucidar el efecto observado en la Figura 6.14B, donde el ATMM del espectro de emisión de Lyz aumenta con el incremento del W , se midieron los decaimientos de la intensidad de fluorescencia de soluciones micelares, con el objeto de construir los DAS.

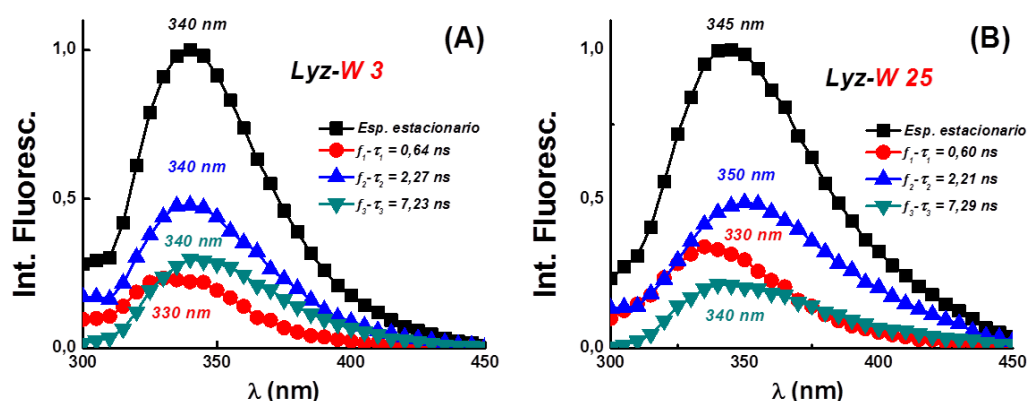


Figura 6.16 Espectro asociado al decaimiento (DAS) de cada componente emisor de Lyz en solución de AOT 0.1 M : $W = 3$ (A) y $W = 25$ (B), con $\lambda_{ex} = 295$ nm.

En la **Figura 6.16A** se puede observar que las contribuciones fraccionales del espectro de fluorescencia de Lyz en micelas inversas de $W = 3$, son muy parecidas a las observadas en solución homogénea (figura 4.2, del capítulo 4). La componente corta ($\tau_1 \approx 0,60$ ns) centrada en 330 nm puede ser atribuida a los Trp 28 y Trp 111 ubicados en la matriz hidrofóbica. La componente de 2,27 ns, centrada en 340 nm, atribuida al Trp 108 en el interior de la Lyz y la última componente de 7,23 ns con máximo en 340 nm, asignada al Trp 62 que se encuentra totalmente expuesto al solvente¹¹³.

Se puede observar que dos de los tres tiempos de vida de Lyz (τ_1 y τ_2) en micelas inversas son cercanos a los tiempos de vida en solución acuosa. A priori, se puede concluir que la fluorescencia de Trp 108 y los Trp 28 y Trp 111 no cambia cuando la proteína se incorpora en las micelas de W bajos. En cambio, el tiempo de vida largo (τ_3) atribuido al Trp 62 es más grande que el de solución acuosa y podría deberse a la contribución de los Trp 63 y Trp 123, debido a alteraciones conformacionales que sufre la enzima en la solución micelar¹⁵⁴. Debido a las limitaciones del sistema micelar, no fue posible caracterizar la estructura secundaria de Lyz mediante FTIR-ATR.

Por otro lado, cuando el W es grande la contribución f_3 disminuye y se produce un ensanchamiento de la componente f_2 y un incremento de la componente f_1 . Como se sabe, en solución homogénea el rendimiento cuántico de fluorescencia de Tyr en Lyz es menor al 1%¹¹⁴

pero debido a que la proteína modifica su conformación al incorporarse en la micela inversa, no sería desatinado pensar que puede haber contribuciones de Tyr (Tyr 20, Tyr 23 y Tyr 53) en la región espectral donde contribuye la componente f_1 . Por lo tanto, para dilucidar esa hipótesis se midieron los espectros de fluorescencia estacionarios y resueltos en el tiempo (DAS) de Lyz en solución micelares con excitación a 280 nm.

Como se puede observar en la **Figura 6.17**, prácticamente no existen diferencias en los espectros de fluorescencia estacionarios de Lyz en $W = 3$ y $W = 25$ cuando se cambia la longitud de onda de excitación de 280 nm a 295 nm.

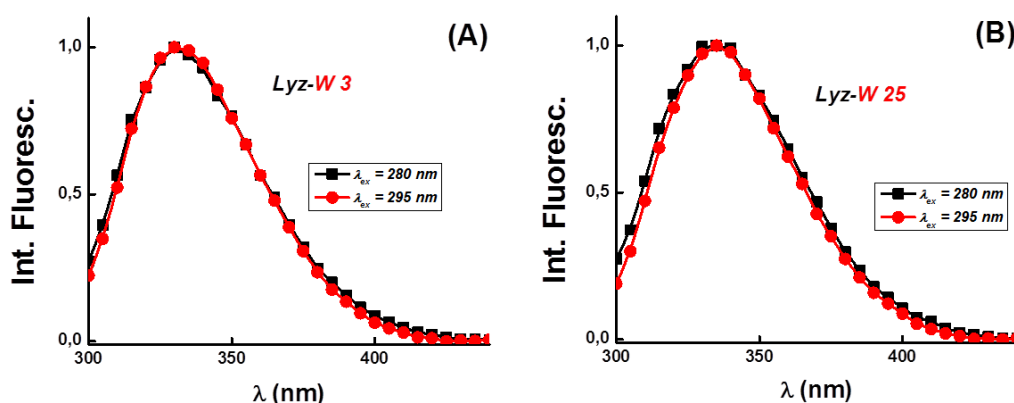


Figura 6.17 Espectro de fluorescencia de Lyz excitando a 280 nm (cuadrados y línea negra) y a 295 nm (círculos y línea roja) en: micelas inversas de $W = 3$ (A) y micelas inversas de $W = 25$ (B)

Sin embargo, comparando las contribuciones fraccionales de los DAS obtenidos a las dos longitudes de onda de excitación (280 nm y 295 nm), se puede observar que la componente f_1 difiere cuando cambia λ_{ex} en las soluciones micelares ($W = 3$ y $W = 25$) produciéndose un ensanchamiento del espectro cuando se excita con 280 nm, este efecto no ocurre con las otras componentes, **Figura 6.18**. A esta longitud de onda también absorben las Tyr presentes en la proteína y emiten en ≈ 310 nm. Por lo tanto, se puede concluir que en soluciones micelares las Tyr tienen mayor contribución al espectro de fluorescencia de Lyz que en solución homogénea, y puede estar debido a la modificación estructural que sufre la enzima al ser incorporada en la micela inversa.

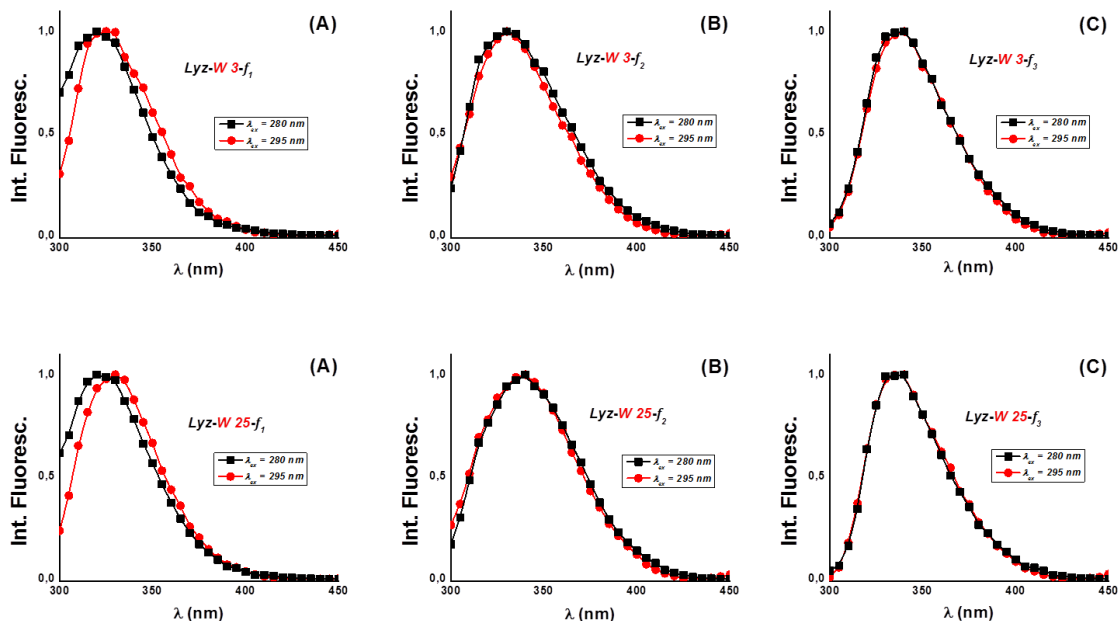


Figura 6.18 Contribución fraccional al espectro de fluorescencia con $\lambda_{ex} = 280$ nm (cuadrados y línea negra) y $\lambda_{ex} = 295$ nm (círculos y línea roja) de Lyz en micelas inversas de $W = 3$ (arriba) y $W = 25$ (abajo): componente f_1 (A), componente f_2 (B) y componente f_3 (C).

6.5 Conclusiones parciales

En este capítulo se observó que las propiedades fotofísicas de las FQs son modificadas cuando se encuentran en un sistema microheterógeno como las micelas inversas de AOT. El corrimiento batocrómico en los espectros que sufren los antibióticos es atribuido a la acidez del interior acuoso ($pH \approx 5,4$). Por otro lado, se observó como las Tyr presentes en Lyz aumentan su contribución en el espectro de fluorescencia cuando se encuentran en soluciones micelares.

Resultados 6-Capítulo 7

**Efecto de Lisozima en las
Propiedades Fotofísicas y
Fotoquímicas de
Fluoroquinolonas en Micelas
Inversas de AOT**

7 Estudio fotofísico y fotoquímico de la interacción entre FQs y Lyz en micelas inversas de AOT

7.1 Aspectos experimentales

7.1.1 Materiales

Las soluciones de micelas inversas de 0,1 M de docusato de sodio (AOT) fueron preparadas por disolución del surfactante en iso-octano anhidro. En todos los casos, la concentración final de FQs en la solución fue $\approx 10 \mu\text{M}$. Debido a la baja solubilidad de la proteína en micelas inversas en presencia de los antibióticos, se trabajó en relaciones molares Agua/Surfactante de $W = 16$ y $W = 25$.

7.1.2 Métodos

Espectroscopia UV- Visible estacionaria

Los espectros de absorción se registraron en un espectrofotómetro UV-visible Hewlett Packard 8453. Los espectros de emisión, en un espectrofluorómetro Hitachi F-2500, en celdas de cuarzo de 1 cm, con rendijas de excitación y emisión de 5 nm y con $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$.

Espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo por recuento de fotones individuales correlacionado temporalmente (TCSPC)

Los experimentos fueron realizados en un aparato Tempro-01 de Joriba Jovin Yvon, utilizando una fuente de excitación pulsada ultra rápida de 340 (± 15) nm, Nanoled®, 1Mhz. La longitud de onda de emisión fue seleccionada con un monocromador de 12 nm de ancho de banda de emisión. Todas las medidas fueron realizadas en solución saturada de aire y a temperatura ambiente.

Todas las medidas descriptas anteriormente se realizaron por triplicado.

Resultados y discusiones.

7.2 Estudio de la interacción entre FQs y Lyz en micelas inversas de W 16 mediante espectroscopía de absorción y fluorescencia

7.2.1 Espectros de absorbancia

En los espectros de absorbancia de las FQs en micelas inversas de $W = 16$, se observan ligeros cambios con el aumento creciente de la concentración de Lyz en la región de 315-360 nm, tal como se muestra en los espectros diferencia mostrados en los insertos de la **Figura 7.1**. Sin embargo no fue posible ajustar la variación de la absorbancia con ningún modelo de unión o asociación.

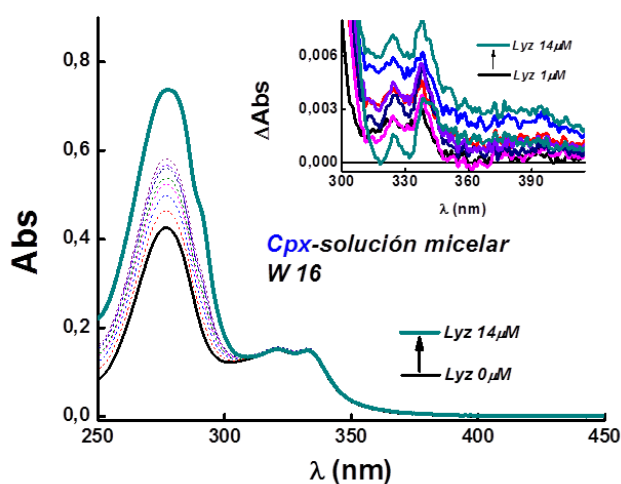


Figura 7.1 Espectro de absorción de Cpx 10 μM en función de la concentración de Lyz en micelas inversas de AOT. Inserto espectros diferencia.

7.2.2 Espectros de fluorescencia

La espectroscopia de fluorescencia es una técnica más sensible y registra pequeños cambios en el espectro de las FQs cuando se adiciona Lyz a la solución. La **Figura 7.19** representa los espectros de emisión del antibiótico Cpx excitando a 330 nm (donde solo absorben las FQs) y registrando la emisión entre 350-650 nm.

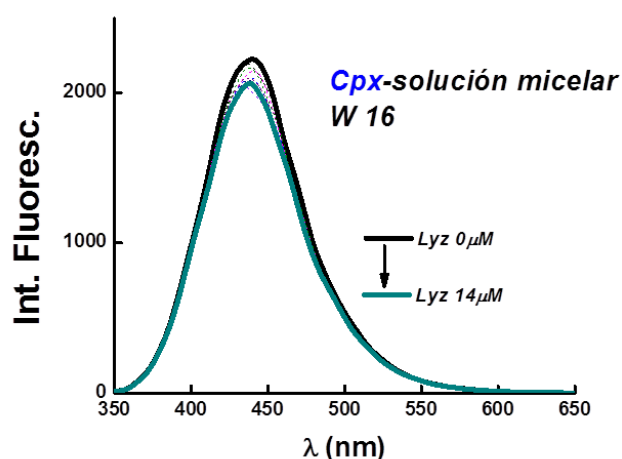


Figura 7.19 Espectro de fluorescencia de Cpx 10 μM en función de la concentración de Lyz en micelas inversas de AOT de W 16. Con excitación $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$.

Se observó una leve disminución en la fluorescencia tanto para Cpx como Nor con el aumento de la concentración de Lyz, en cambio para Lev se observó un pequeño incremento de la emisión. En la Figura 7.3 se representa los cambios en la intensidad de fluorescencia de los FQs en función de la concentración de Lyz, los mismos son menos del 3%. En el capítulo 6 se determinó que las FQs en soluciones micelares tienen dos componentes que contribuyen en el espectro de emisión. Por lo tanto estos pequeños cambios observados en los espectros de fluorescencia estacionaria de las FQs, podrían estar relacionados a la interacción entre Lyz con alguna de las especies fluorescentes de los antibióticos (catiónica y zwitteriónica).

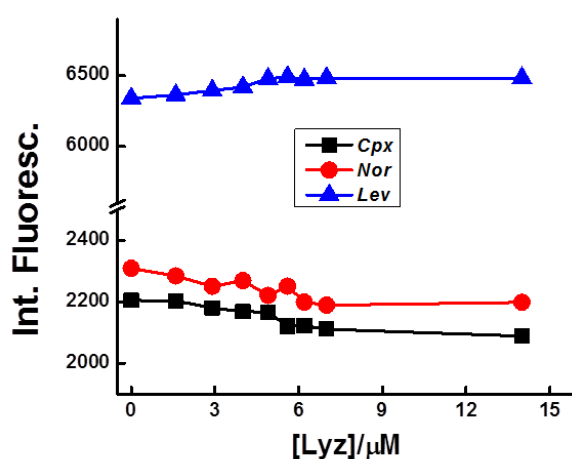


Figura 7.3 Cambios en la intensidad de fluorescencia máxima de las FQs en micelas inversas de AOT, producidos por la concentración creciente de Lyz.

7.2.3 Interacción entre FQs y Lyz, fluorescencia resuelta en el tiempo

Se midieron los tiempos de vida en estado excitado singulete de las FQs en función de la concentración de Lyz. En la **Tabla 7.1** se resumen los valores obtenidos y se observa que la proteína no interacciona con ninguno de los estados excitados de los antibióticos, ni con la especie catiónica (tiempo de vida largo) ni zwiterionica (tiempo de vida corto).

Tabla 7.1 Tiempos de vida del estado singulete de FQs en micelas inversas W 16, en función de la concentración de Lyz.

[Lyz] μM	τ / ns					
	Cpx		Nor		Lev	
	τ_1	τ_2	τ_1	τ_2	τ_1	τ_2
0	$1,28 \pm 0,02$	$3,55 \pm 0,01$	$1,11 \pm 0,03$	$3,33 \pm 0,01$	$1,55 \pm 0,04$	$9,24 \pm 0,02$
2,9	$1,26 \pm 0,02$	$3,43 \pm 0,01$	$1,16 \pm 0,04$	$3,34 \pm 0,01$	$1,56 \pm 0,04$	$9,22 \pm 0,02$
5	$1,29 \pm 0,03$	$3,52 \pm 0,01$	$1,12 \pm 0,03$	$3,32 \pm 0,01$	$1,50 \pm 0,04$	$9,27 \pm 0,02$
7	$1,31 \pm 0,03$	$3,49 \pm 0,02$	$1,21 \pm 0,03$	$3,33 \pm 0,01$	$1,55 \pm 0,04$	$9,26 \pm 0,02$
14	$1,28 \pm 0,02$	$3,55 \pm 0,01$	$1,15 \pm 0,04$	$3,32 \pm 0,01$	$1,53 \pm 0,05$	$9,23 \pm 0,01$

Para asegurar que no haya interacción con los estados excitados de las FQs, se registraron los decaimientos a diferente longitud de onda y se construyeron los espectros DAS, los cuales son representados en la **Figura 7.4** para el caso de Nor en micela de W 16.

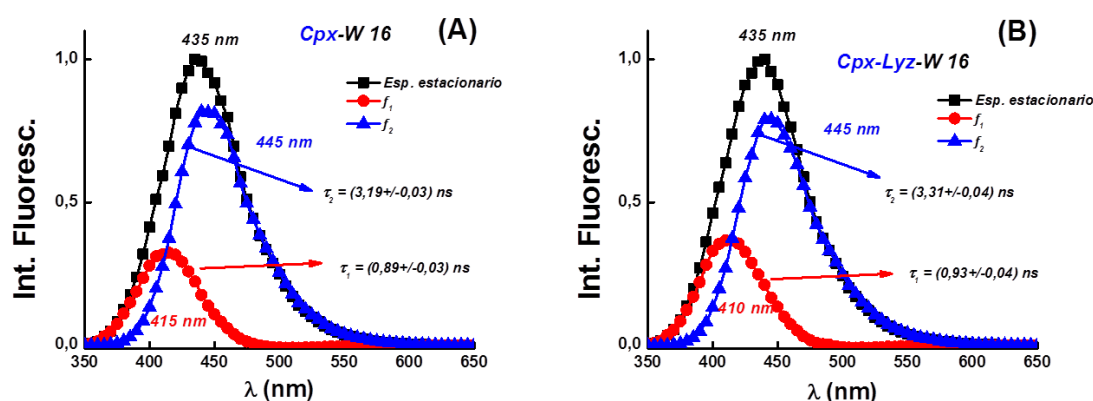


Figura 7.4 Espectro asociado al decaimiento (DAS) de cada componente emisor de Cpx en micelas inversas de W =16: (A) sin Lyz y (B) con Lyz 14 μM .

Para analizar adecuadamente si hay algún efecto de la proteína sobre las contribuciones de cada componente de FQs, se calculó el área relativa de los espectros individuales con respecto al área total del antibiótico. Dichos valores, se detallan en la **Tabla 7.2**, y en ella se puede

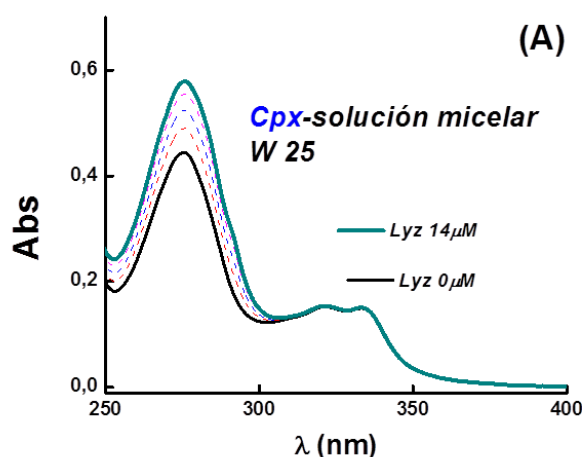
observar que las contribuciones f_1 y f_2 de las FQs no se ven afectadas por la presencia de Lyz. Por lo tanto se puede inferir que en micelas inversas de $W = 16$ no hay interacción entre los antibióticos y la enzima.

Tabla 7.2 Áreas relativas f_1 y f_2 de las contribuciones de FQs en presencia de Lyz en Micelas inversas $W 16$.

	<i>Cpx</i>	<i>Cpx-Lyz</i>	<i>Nor</i>	<i>Nor-Lyz</i>	<i>Lev</i>	<i>Lev-Lyz</i>
Área Relativa f_1	$0,23 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,07$	$0,14 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$
Área Relativa f_2	$0,77 \pm 0,04$	$0,73 \pm 0,02$	$0,86 \pm 0,04$	$0,90 \pm 0,05$	$0,86 \pm 0,06$	$0,88 \pm 0,02$

7.3 Estudio fotofísico de la interacción entre FQs y Lyz en micelas inversas de $W 25$

Al igual que en soluciones micelares $W 16$, en micelas inversas de $W 25$ no se encontró interacción entre las FQs y la proteína mediante espectroscopia de absorción, fluorescencia estacionaria y resuelta en el tiempo. La **Figura 7.5** muestra los espectros de absorción, fluorescencia y tiempos de vida en estado excitado singulete para Cpx a diferentes concentraciones de Lyz.



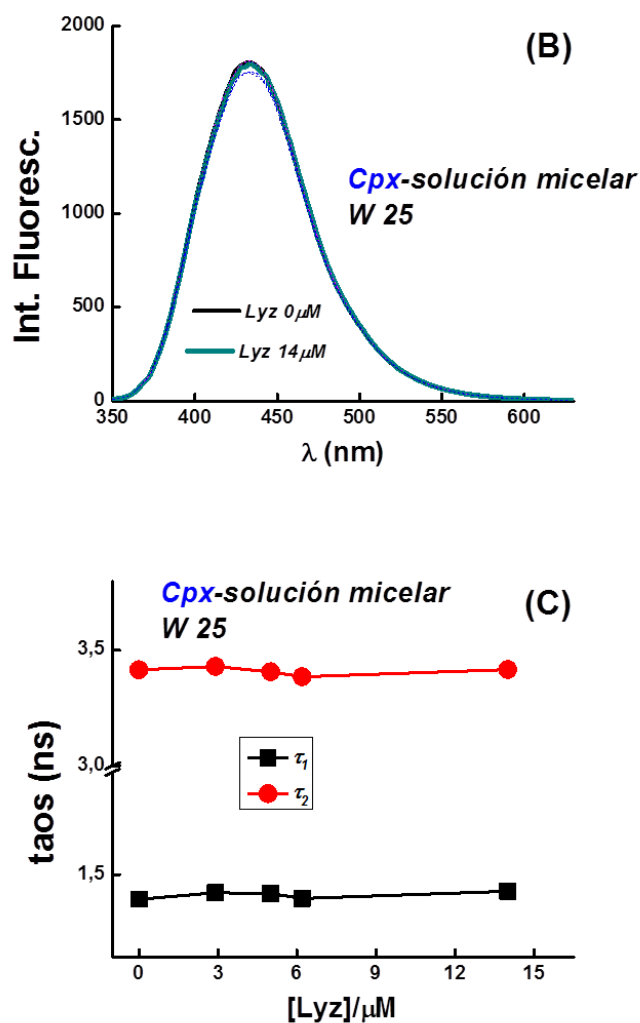


Figura 7.5 Espectros de absorción, de fluorescencia y tiempos de vida en estado excitado singulete de Cpx 10 μ M en función de la concentración de Lyz, en micelas inversas de AOT 0,1 M de W 25.

7.4 Estudio de la fotoestabilidad de FQs en presencia de Lyz en micelas inversas de W 16

7.4.1 Fotodegradación de Fluoroquinolonas. Espectroscopía de Absorción

Se estudió la fotoestabilidad de las FQs en micelas inversas de $W = 16$, mediante exposición de luz con $\lambda_{\text{ex}} = 330$ nm. Para ello se utilizó la metodología descrita en el capítulo 3, página 49.

Los antibióticos Cpx y Nor fueron fotodegradados durante la fotólisis, destacándose la disminución del pico de absorción en 280 nm y en la región comprendida entre 300-340 nm, así como la aparición de una nueva banda en 360 nm aproximadamente. El mismo efecto se observó para estas FQs cuando fueron fotolizadas en solución homogénea (Figura 3.1,

capítulo 3). En el caso de Lev no se registró cambios en el espectro de absorción. El comportamiento descrito anteriormente se muestra en la **Figura 7.6**.

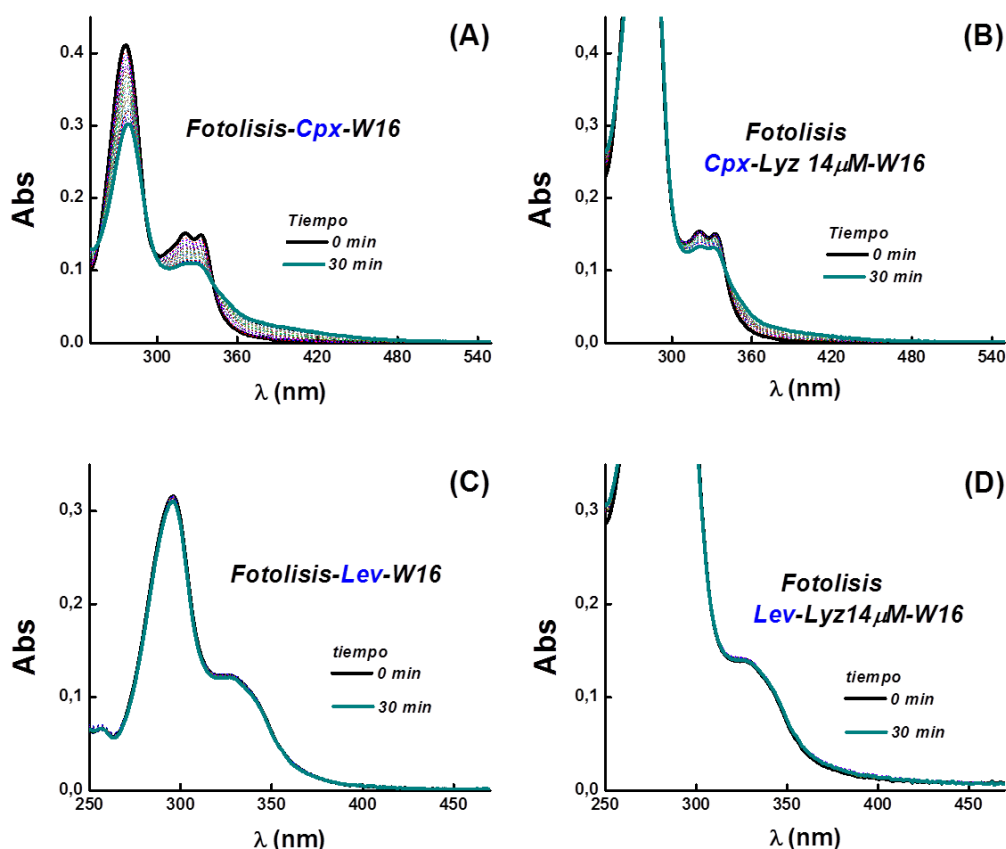


Figura 7.6 Espectros de absorción de Cpx 10 μM y Lev 10 μM en micelas inversas de W 16, irradiados durante 30 minutos con $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$: (A) y (C) FQs en ausencia de Lyz, (B) y (D) en presencia de Lyz.

La presencia de Lyz durante la fotolisis de Cpx disminuye el fotoconsumo del antibiótico (Figura 7.6C) y en mucho menor medida para Nor. Nuevamente no se registró cambios en la fotolisis de Lev cuando se encuentra la proteína en la solución (Figura 7.6D). Estos cambios registrados en los espectros de absorción, permiten calcular los rendimientos cuánticos de fotoconsumo de las FQs y el efecto que tiene la presencia de Lyz.

7.4.2 Cinética de fotoconsumo

Con los datos de absorbancia en la longitud de onda de 330 nm de las soluciones de FQs en micelas inversas fotolizadas, se pudo comparar el efecto de Lyz en las velocidades iniciales (**Figura 7.7**) y calcular los rendimientos cuánticos de fotoconsumo de las FQs (Φ_{FC}), mediante la metodología descrita en el capítulo 3, página 52-53. Los valores obtenidos se detallan en la **Tabla 7.3**

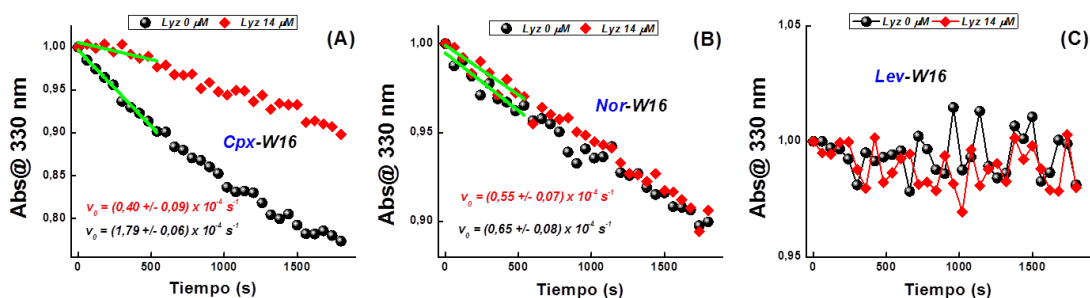


Figura 7.7 Variación en la absorbancia en 330 nm de las FQs 10 μM en micelas inversas W 16 durante la fotólisis. (A) Cpx, (B) Nor y (C) Lev.

Tabla 7.3 Rendimientos cuánticos de fotoconsumo para Cpx, Nor y Lev en función de Lyz.

[Lyz] μM	$\Phi_{\text{FC}} (\times 10^3)$		
	Cpx	Nor	Lev
0	$7,06 \pm 0,02$	$2,52 \pm 0,11$	-
14	$1,62 \pm 0,10$	$2,19 \pm 0,08$	-

Como se puede observar en la Tabla 7.3, durante la fotólisis, para el antibiótico Cpx el valor de Φ_{FC} disminuye casi un 80% cuando está presente Lyz, indicando que la proteína cumple un rol protector, retardando su fotodegradación. En el caso de Nor se observa una pequeña disminución del rendimiento cuántico pero se encuentra dentro del error experimental, sugiriendo que Lyz no influye sobre la cinética de fotodegradación. Para Lev no se pudo calcular Φ_{FC} debido a que no se fotodegrada en las condiciones experimentales.

La aparición de nuevas bandas de absorción en la región entre 340-470 nm después de la fotoexcitación se debe al o los productos generados por la fotólisis. En el Esquema 3 del capítulo 3 se muestra los sitios moleculares fotoquímicamente lábiles que pueden sufrir modificaciones, donde en esta tesis demostramos que Cpx en solución homogénea neutra se fotodegrada mediante la vía *Desfluorinación y Degradación del anillo piperazina*.

7.4.3 Fotodegradación de Fluoroquinolonas en función de la concentración de oxígeno

Como se mencionó en el capítulo 3, la fotoquímica de las fluoroquinolonas en solución homogénea proviene mediante el estado excitado triplete. Por lo tanto, para determinar si en solución micelar ocurre el mismo mecanismo se realizó la fotólisis de Cpx y Nor en función de la concentración de oxígeno disuelto (quencher eficiente del estado triplete de las FQs). No se estudió el efecto del oxígeno para Lev, debido a que no se observó fotoconsumo en la micela inversa *W* 16 cuando se irradia de forma continua la solución con $\lambda_{\text{ex}} = 330$ nm.

Como se observa en los espectros de absorción de la **Figura 7.8**, a medida que aumenta la concentración de oxígeno durante la fotólisis de Cpx en solución micelar, disminuye el consumo en la banda de 280 nm y en la región 300-340 nm; así como la formación de la banda en 360 nm. El mismo efecto se observó para Nor.

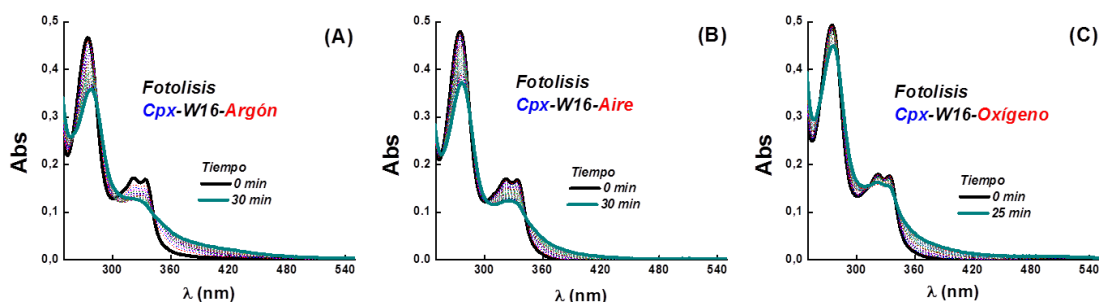


Figura 7.8 Espectros de absorción de Cpx (12 μM) en micelas inversas *W* 16 durante la fotólisis, irradiados durante 30 minutos con $\lambda_{\text{ex}} = 330$ nm: (A) en Argón, (B) en Aire y (C) en Oxígeno.

Con el fin de poder realizar un análisis detallado, se calculó las velocidades iniciales de fotoconsumo y el rendimiento cuántico de fotoconsumo de los dos antibióticos en función de la concentración de oxígeno. Dichos valores de rendimiento cuántico se resumen en la **Tabla 7.4**.

Tabla 7.4 Rendimientos cuánticos de fotoconsumo para Cpx y Nor en función de O_2 .

$[\text{O}_2]$ <i>mM</i>	$\Phi_{\text{FC}} (\times 10^3)$	
	<i>Cpx</i>	<i>Nor</i>
0	$26,70 \pm 0,20$	$4,80 \pm 0,11$
0,27	$7,06 \pm 0,02$	$2,52 \pm 0,08$
1,27	$3,10 \pm 0,07$	$0,80 \pm 0,06$

En la **Figura 7.9A** se observa como las cinéticas de fotoconsumo de Cpx en micela inversa *W* 16 disminuye con el incremento de la concentración de oxígeno disuelto. Un efecto similar se observó para el antibiótico Nor. Por otro lado, mediante la ecuación de Stern-Volmer (ecuación 2.2 del capítulo 2) y utilizando los valores de Φ_{FC} , se obtuvo constantes de desactivación bimolecular (**Figura 7.9B**) similares a los valores determinados en solución homogénea (figura 2.23 del capítulo 2). Por lo tanto de esta manera se confirma que la fotoquímica de las FQs en solución micelar proviene del estado excitado triplete.

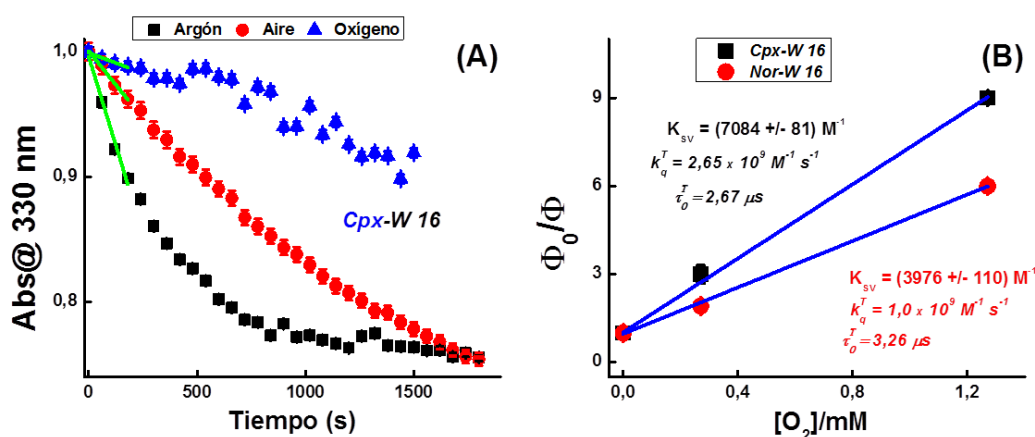


Figura 7.9 Cinética de absorbancia en 330 nm de Cpx en *W* 16 en función del oxígeno disuelto (A) y grafica de Stern-Volmer en función del oxígeno (B).

7.4.4 Fotodegradación de Fluoroquinolonas. Espectroscopía de Fluorescencia

Además de los espectros de absorción, también se registraron los espectros de fluorescencia de las FQs (10 μM) en solución micelar de *W* 16 durante la fotólisis. La evolución de los cambios se representa en la **Figura 7.10**.

En la Figura 7.10A, se observa como los espectros de emisión del antibiótico Cpx disminuyen bajo la exposición a luz constante de 330 nm, y aumenta su ATMM. Este aumento del ancho medio espectral es un indicio de que la población fluorescente de esta FQ ha cambiado durante la fotólisis. El mismo efecto se observó para Nor. En el caso de Lev (Figura 7.10B), al igual que los espectros de absorción, la emisión no es modificada durante la irradiación con luz.

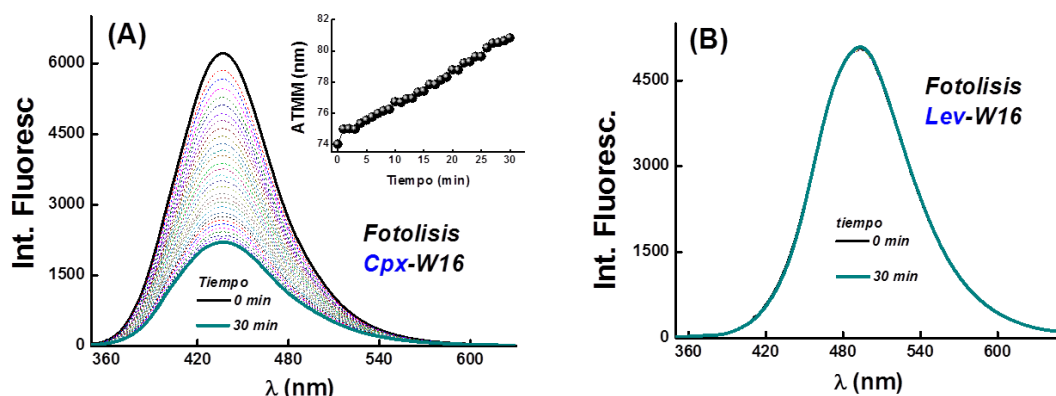


Figura 7.10 Espectros de fluorescencia con $\lambda_{ex} = 330$ nm de FQs durante la fotólisis en solución de micelas inversas de AOT, (A) Cpx y (B) Lev. Insertos en (A) el ATMM.

7.4.5 Fotodegradación de Fluoroquinolonas. Fluorescencia resuelta en el tiempo

Con el propósito de caracterizar los productos fluorescentes generados durante la fotodegradación de las FQs fotolizadas en micelas inversas, se obtuvieron los decaimientos en el máximo de emisión de cada antibiótico. La **Figura 7.11** muestra que las soluciones de Cpx sin fotolizar tienen un decaimiento bi-exponencial, no así las fotolizadas que tienen un buen ajuste tri-exponencial. Evidenciando la formación de un nuevo fluoróforo que contribuye a la fluorescencia total de estas FQs. El mismo comportamiento registra el antibiótico Nor.

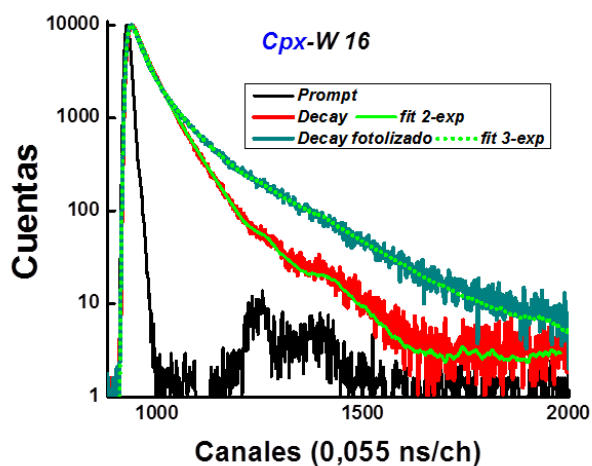


Figura 7.11 Ajuste de las señales de decaimiento de FQs fotolizadas con $\lambda_{ex} = 330$ nm y sin fotolizar en solución de micelas inversas W 16. (A) Cpx 10 μ M y (B) Nor 10 μ M.

Del ajuste tri-exponencial de las soluciones fotolizadas, se obtuvieron dos tiempos de vida similares al de las FQs en micelas sin fotolizar ($\tau_1 \approx 1$ ns y $\tau_2 \approx 3$ ns) y un tercer tiempo de vida

$\tau_3 \approx 8$ ns atribuido al fotoproducto formado durante la irradiación. Utilizando estos valores de tiempos de vida y registrando los decaimientos en el rango espectral de emisión de las FQs se construyeron los espectros DAS.

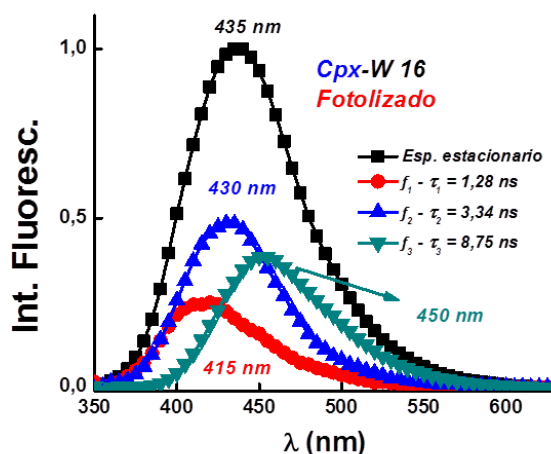


Figura 7.12 Espectro asociado a los decaimientos de Cpx 10 μ M en micelas inversas de AOT 0,1 M de W 16 fotolizadas con $\lambda = 330$ nm.

La **Figura 7.12** representa el DAS de las FQs en micelas inversas después de la fotólisis. En ella se observa la contribución de tres componentes en el espectro de emisión, donde la componente f_1 y f_2 corresponden a la especie zwitteriónica y catiónica respectivamente; y la componente f_3 es atribuida al fotoproducto generado durante la irradiación. Mediante un gráfico comparativo entre la componente f_3 de Cpx y Nor (**Figura 7.13**), se observa que son prácticamente iguales indicando que el producto formado durante la fotólisis de estos dos antibióticos sería el mismo. Lo cual no es descabellado esta conclusión debida a sus similitudes estructurales (ver Figura 2.1 del capítulo 2).

Asimismo, comparando en la misma figura la componente f_3 de la fotólisis de Cpx en solución homogénea neutra con las componentes f_3 de las FQs en micelas, coinciden casi en su totalidad en el rango espectral. De esta forma se identificó que el fotoproducto generado de los antibióticos en la micela inversa es la *Hidroquinona*, la cual se forma mediante la *Desfluorinación* de las FQs (ver esquema 4 del capítulo 3).

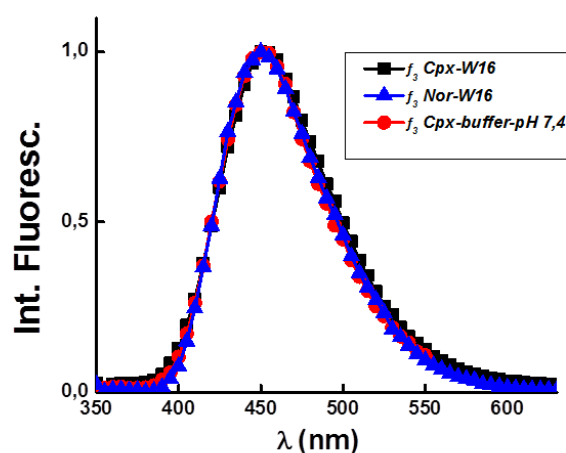
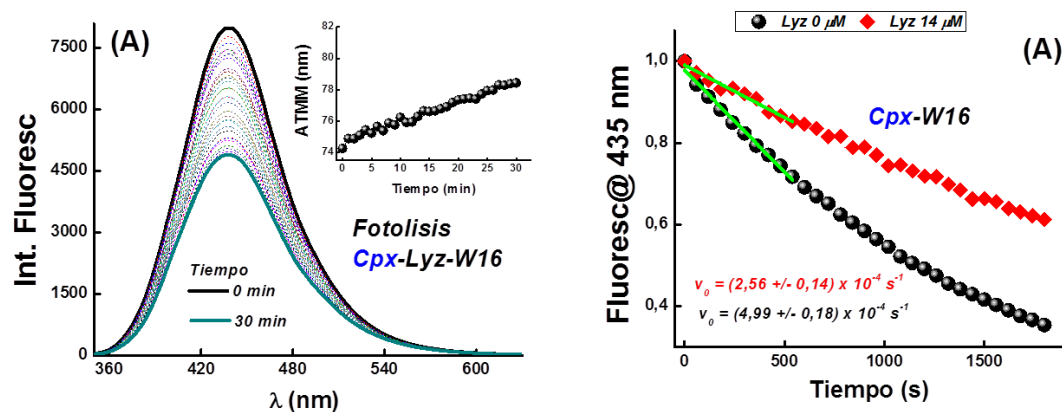


Figura 7.13 Espectros de fluorescencia normalizados de la contribución fraccional f_3 de Cpx en micela inversa W 16 (cuadrados negros), de Nor en micela inversa W 16 (triángulos azules) y de Cpx en solución buffer pH 7,4 (círculos rojos).

7.4.6 Fotodegradación de Fluoroquinolonas con Lyz

Del mismo modo que lo observado mediante espectroscopia de absorción, la presencia de Lyz disminuye el fotoconsumo del espectro de fluorescencia de Cpx, no así para Nor para el cual no se observa una influencia marcada de la proteína sobre el consumo del antibiótico; en el caso de Lev no se observa consumo. Este comportamiento se muestra en las cinéticas de la Figura 7.14.



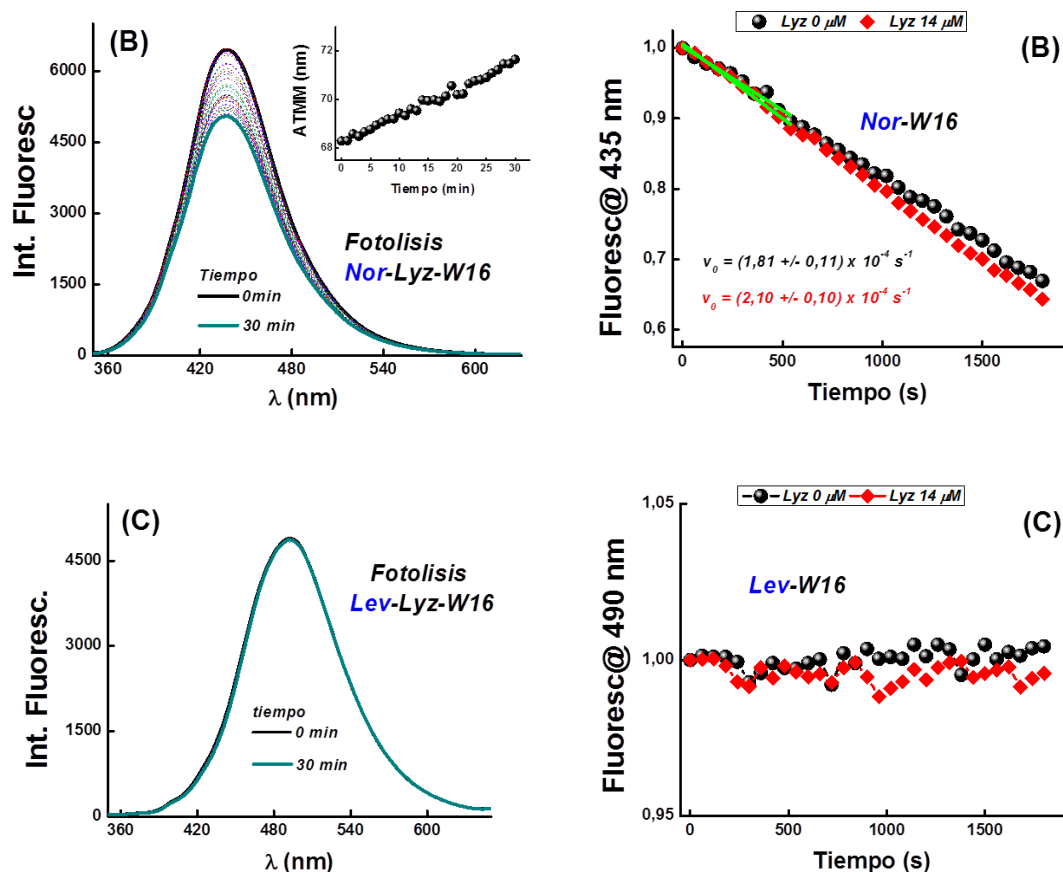


Figura 7.14 En la parte izquierda, espectros de fluorescencia de FQs (10 μM) durante la fotólisis, insertos en (A) y (B) el ATMM. En la parte derecha, variación en el máximo de emisión en función del tiempo de las FQs. (A) Cpx, (B) Nor y (C) Lev.

Para realizar un análisis más detallado, se construyeron los espectros DAS de las soluciones de Cpx y Nor fotolizados en presencia de Lyz y se calculó las áreas relativas de los componentes f_1 , f_2 y f_3 . Estos valores se representan en la **Tabla 7.5**.

Tabla 7.5 Áreas relativas f_1 , f_2 y f_3 de las FQs fotolizadas en presencia de Lyz en Micelas inversas W 16.

	Cpx-W16	Cpx-W16 fotolizado	Cpx-Lyz- W16 fotolizado	Nor-W16	Nor-W16 fotolizado	Nor-Lyz- W16 fotolizado
Área relativa f_1	$0,23 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,01$
Área relativa f_2	$0,77 \pm 0,03$	$0,42 \pm 0,01$	$0,51 \pm 0,02$	$0,86 \pm 0,04$	$0,70 \pm 0,02$	$0,69 \pm 0,04$
Área relativa f_3		$0,36 \pm 0,03$	$0,26 \pm 0,02$		$0,18 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,02$

Analizando la Tabla 7.5, se observa como el área relativa de la componente f_2 de Cpx (especie catiónica) es la que disminuya cuando se irradia el antibiótico y f_1 (zwitteriónica) se mantiene constante, por lo tanto la componente f_3 se forma a expensa de f_2 . Por otro lado, cuando está presente la proteína, el área relativa de f_1 se mantiene constante, f_2 aumenta y f_3 disminuye, indicando que Lyz retarda el fotoconsumo de la especie catiónica de Cpx cuando es irradiada en solución micelar. En el caso de Nor, también se observa que f_1 prácticamente no cambia, la disminución de f_2 y la formación de f_3 ; pero en este caso se pone de manifiesto como la proteína no interfiere en la fotólisis de Nor.

7.4.7 Fotodegradación de FQs en Argón en función de la concentración de Lyz

Como se explicó en las secciones anteriores, no existe interacción de las FQs tanto en su estado fundamental ni en el estado excitado singulete con Lyz en micela inversa *W* 16. Pero se observa un efecto protector de la proteína sobre el fotoconsumo de Cpx, dicho fenómeno puede deberse a una interacción de Cpx en estado excitado triplete con Lyz ya que la fotoquímica del antibiótico proviene de esta vía.

Por lo tanto, con el objeto de poder dilucidar el efecto de Lyz sobre el fotoconsumo de Cpx se realizó la fotólisis del antibiótico en presencia de la proteína en solución micelar saturada con argón. Como puede observarse en la **Figura 7.15A**, la presencia de Lyz disminuye la cinética de fotoconsumo de Cpx en $\approx 70\%$ del mismo modo que lo hace en los Φ_{FC} mostrados en la Tabla 7.3. Por otro lado también se estudió el efecto sobre Nor, pero la presencia de la proteína prácticamente no modifica el consumo de este antibiótico (**Figura 7.15B**). De este modo se comprueba que el efecto protector de Lyz sobre Cpx se debe a la desactivación del estado excitado triplete del antibiótico y debido a eso se observa la disminución del Φ_{FC} , lo que no ocurre con Nor donde la proteína no interacciona con su estado excitado triplete y por lo tanto no afecta su Φ_{FC} .

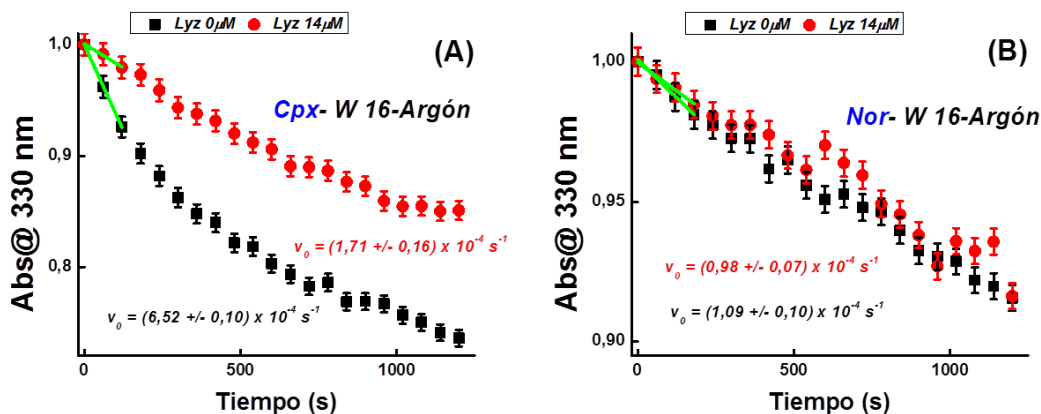


Figura 7.15 Cinetica de absorbancia en 330 nm de FQs en W 16 saturadas en argón en ausencia (cuadrados negros) y presencia (círculos rojos) de Lyz: (A) Cpx 10 μM y (B) Nor 10 μM.

7.5 Estudio fotoquímico de la interacción entre FQs y Lyz en micelas inversas de W 25

También se estudió la fotoquímica de las FQs en micelas inversas de W 25. En ella se observó, al igual que en solución micelar de W 16 pero en menor medida, como en los espectros de absorción de Cpx y Nor disminuye el pico de 280 nm y la región 330 nm aproximadamente; así como la aparición de la banda en 360 nm. Por otro lado, en este tamaño micelar el antibiótico Lev presenta pequeños cambios en su espectro tanto en 250, 280, 330 y en 360 nm, contrariamente a lo que ocurría en W 16. Todos estos cambios son mostrados en la **Figura 7.16**.

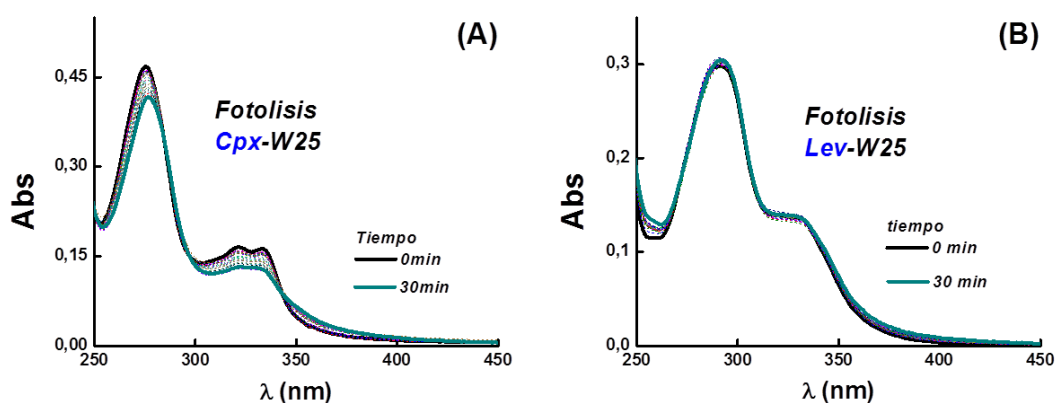


Figura 7.16 Espectros de absorción de FQs en micelas inversas de AOT de W 25 durante la fotólisis con $\lambda_{ex} = 330 \text{ nm}$. (A) Cpx y (B) Lev.

Nuevamente, con los datos de absorbancia en 330 nm de FQs fotolizadas, se calculó los rendimientos cuánticos de fotoconsumo y los valores se resumen en la **Tabla 7.6**. Analizando los valores de Φ_{FC} , se observa como en este tamaño micelar la presencia de Lyz no afecta la fotoestabilidad de las FQs, ya que no se encuentran diferencias significativas de Φ_{FC} .

Tabla 7.6 Rendimientos cuánticos de fotoconsumo para Cpx, Nor y Lev en función de Lyz en micelas inversas W 25.

$[Lyz]$ μM	$\Phi_{FC} (x10^3)$		
	Cpx	Nor	Lev
0	$4,46 \pm 0,70$	$2,79 \pm 0,03$	$1,08 \pm 0,08$
14	$5,79 \pm 0,52$	$2,75 \pm 0,06$	$1,14 \pm 0,11$

Por otro lado, los espectros de fluorescencia durante la fotólisis revelan nuevamente el fotoconsumo de Cpx, Nor y además de Lev, donde esta última no presentaba cambios en micelas inversas con menor contenido acuoso ($W = 16$). En la **Figura 7.17** se muestra los cambios espectrales durante la irradiación continua de 330 nm para Cpx y Lev.

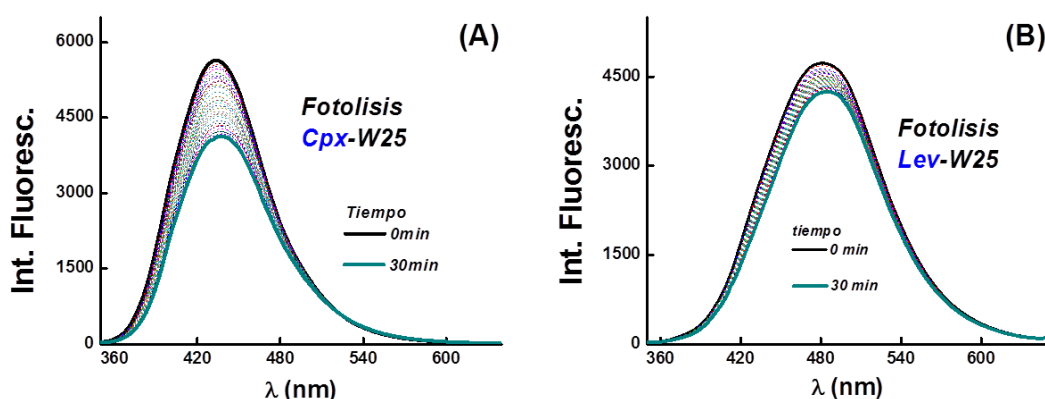


Figura 7.17 Espectros de fluorescencia con $\lambda_{ex} = 330$ nm, de FQs durante la fotólisis en micelas inversas de AOT 0,1 M de W 25, (A) Cpx y (B) Lev.

Con respecto a los decaimientos de fluorescencia de los antibióticos en las soluciones micelares fotolizadas, se ajustaron con una ecuación tri-exponencial, a excepción de Lev que presenta un buen ajuste con una ecuación bi-exponencial, Figura 7.18. De este análisis puede deducirse que el producto formado durante la fotodegradación de Lev no es una especie fluorescente.

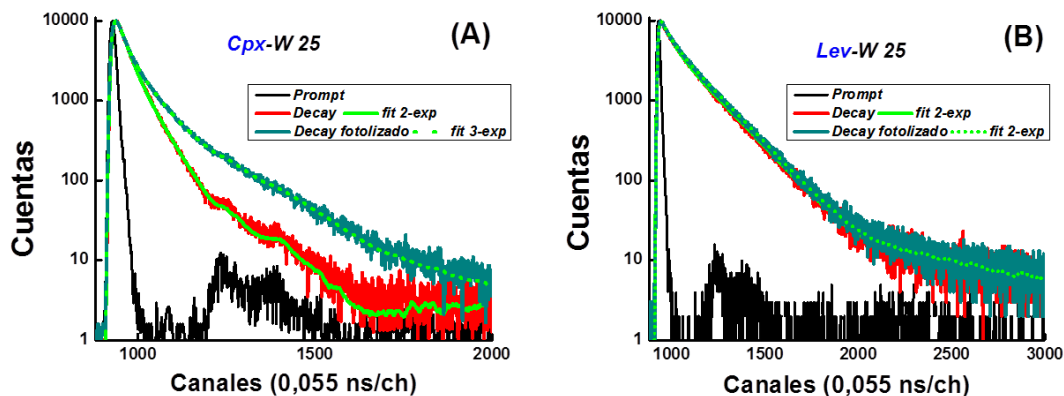


Figura 7.18 Ajuste de las señales de decaimiento de FQs fotolizadas con $\lambda_{ex} = 330 \text{ nm}$ y sin fotolizar en solución de micelas inversas W 25. (A) Cpx y (B) Lev.

Finalmente, se construyeron los espectros DAS y se calcularon las áreas relativas para interpretar el camino de fotodegradación de las FQs. En la **Tabla 7.7** se reportan las áreas relativas de las componentes f_1 , f_2 y f_3 de las FQs fotolizadas y antes de la fotólisis. Se puede ver una vez más que la componente atribuida a la especie catiónica (f_2), disminuye generando el fotoproducto (f_3) y como la especie zwitteriónica se mantiene constante en el caso de Cpx y Nor. La tabla también muestra como f_1 y f_2 de Lev no se modifican a pesar de la disminución observada por espectroscopia de fluorescencia estacionaria. Por otro lado, la presencia de Lyz no afecta el área relativa f_2 de los antibióticos Nor y Cpx. Este comportamiento puede estar relacionado con los cambios conformacionales que tiene la proteína al aumentar el contenido acuoso de la micela.

Tabla 7.7 Áreas relativas f_1 , f_2 y f_3 de las FQs fotolizadas en presencia de Lyz en Micelas inversas W 25.

	Cpx-W25	Cpx-W25 fotolizado	Cpx-Lyz- W25 fotolizado	Nor-W25	Nor-W25 fotolizado	Nor-Lyz- W25 fotolizado	Lev-W25	Lev-W25 fotolizado	Lev-Lyz- W25 fotolizado
Área relativa f_1	$0,22 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,03$	$0,23 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$
Área relativa f_2	$0,78 \pm 0,04$	$0,48 \pm 0,01$	$0,49 \pm 0,03$	$0,79 \pm 0,01$	$0,40 \pm 0,02$	$0,41 \pm 0,02$	$0,86 \pm 0,04$	$0,85 \pm 0,05$	$0,86 \pm 0,02$
Área relativa f_3		$0,29 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,02$		$0,37 \pm 0,02$	$0,38 \pm 0,03$			

7.6 Conclusiones parciales

A partir de los resultados obtenidos en este capítulo, se puede concluir que no existe interacción entre los estados fundamental y excitado singulete de las FQs con Lyz en micelas inversas, pero si con el estado excitado triplete de los antibióticos. Por otro lado, se determinó que la fotoquímica de las FQs involucra su estado triplete, y que la especie catiónica de Cpx y Nor se degrada bajo irradiación a 330 nm mediante la vía de la Desfluorinación, y no así la especie zwitteriónica. En el caso de Lev solo se observó fotoconsumo en micelas inversas de W 25, pero no genera un producto fluorescente. Asimismo se determinó como Lyz disminuye el Φ_{FC} de Cpx en micelas de W 16 y no con Nor, pero cuando el contenido acuso aumenta (W 25), no modifica el Φ_{FC} de ninguna FQs, esto puede estar relacionado con cambios conformacionales en la proteína al aumentar el tamaño micelar.

Resultados 7-Capítulo 8

Propiedades Fotofísicas y Fotoquímicas de Fluoroquinolonas con Ácidos Húmicos

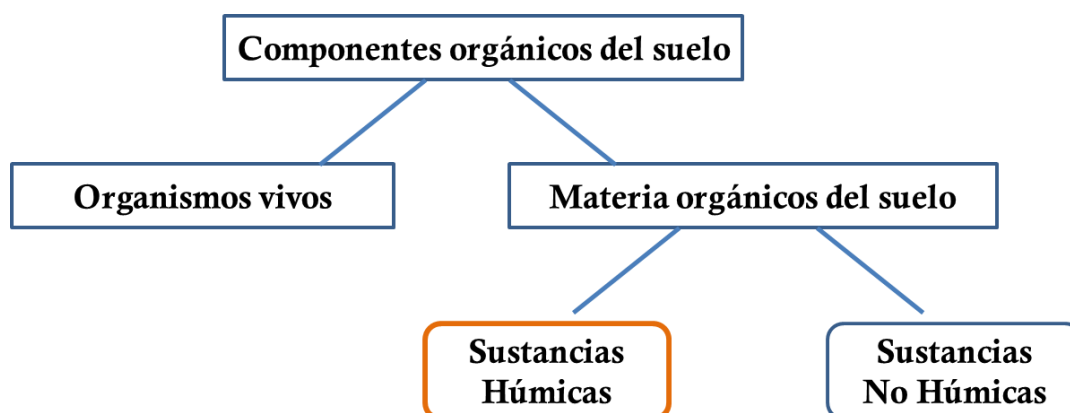
8 Interacción de Fluoroquinolonas con Ácidos Húmicos

Debido a que más del 75% de las fluoroquinolonas administradas se excreta sin cambios, las fracciones no metabolizadas, siguen siendo bioactivas y pueden llegar finalmente a ríos y lagos¹⁵⁵. Al igual que los contaminantes convencionales, la distribución, el destino, el transporte y la biodisponibilidad de FQs dependen en gran medida de la interacción con solutos orgánicos naturales como las sustancias húmicas (SH). A diferencia de los métodos analíticos bien establecidos para la detección de trazas de FQs en diversas matrices ambientales, el conocimiento de las interacciones de FQs con SH es limitado¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Por ello, en esta etapa se estudió la interacción de FQs con Ácidos Húmicos (AH), que forman parte de las SH, mediante técnicas de absorción y emisión tanto en régimen estacionario como dinámico.

8.1 Materia orgánica del suelo, Sustancias Húmicas y Ácidos Húmicos

El suelo es un sistema complejo de muchos componentes (organismos vivos, material orgánico e inorgánico) que interactúan entre sí, y sus propiedades son el resultado de dicha interacción. La materia orgánica del suelo (MOS) es una mezcla heterogénea que incluye tejidos de origen animal y vegetal, sus productos de descomposición parcial resultantes de las transformaciones microbiológicas y químicas del proceso de humificación, material orgánico de alto peso molecular (como por ejemplo polisacáridos y proteínas) y sustancias simples (como aminoácidos, lípidos y monosacáridos).

Suele clasificarse a la materia orgánica del suelo en sustancias húmicas y sustancias no-húmicas. Estas últimas incluyen a carbohidratos, lípidos, péptidos y aminoácidos, por lo general estos compuestos son atacados de forma relativamente fácil por los microorganismos, y su estabilidad en suelos y aguas es bastante baja. La distribución de la materia orgánica del suelo se muestra en el siguiente esquema:



Esquema 7 Clasificación de los componentes orgánicos del suelo.

Las SH son un conjunto de sustancias coloreadas de alto peso molecular formadas por procesos bioquímicos a partir de residuos de origen animal o vegetal, bastante resistentes a la degradación microbiológica o química (por lo que también se denominan materia orgánica refractaria). Son probablemente los productos naturales más ampliamente distribuidos en la superficie terrestre; estas se encuentran en suelos, lagos, ríos y mares. Si bien estos compuestos son de composición muy heterogénea dependiendo del origen del suelo y las condiciones climáticas y geológicas locales, puede considerarse a las SH como *polielectrolitos macromoleculares* amorfos presentes en la materia orgánica de los suelos y aguas.

El término SH suele utilizarse como nombre genérico para describir al material coloreado del suelo o a las fracciones que se obtienen en base a sus características de solubilidad: *Ácidos Húmicos (AH)*, *Ácidos Fúlvicos (AF)* y *Huminas (H)*. Las SH están compuestas por aproximadamente 50% de C, entre un 35-45% de O, 5% de H, 3% de N y S^{159,160}. Los principales grupos funcionales presentes incluyen grupos ácidos carboxílicos y OH fenólicos.

8.1.1 Estructura y propiedades de las sustancias húmicas

La complejidad intrínseca de estos materiales debida a la variabilidad de factores que intervienen en su formación (material original, microorganismos del suelo, condiciones ambientales, etc.), hace que la caracterización de las estructuras químicas que las conforman sea realmente complicada; aunque actualmente se han propuesto algunas estructuras aproximadas como muestra la **Figura 8.1**¹⁶¹. Aunque para tener un aceptable conocimiento de la importante función de las sustancias húmicas, no es necesario conocer de manera precisa la estructura de las mismas.

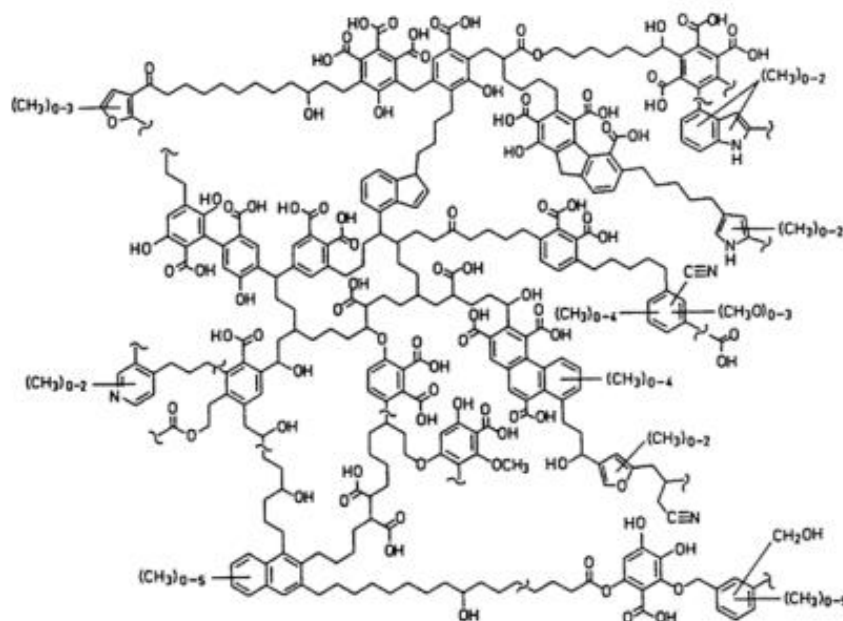


Figura 8.1 Estructura propuesta para un ácido húmico (AH) proveniente de un suelo europeo¹⁶¹.

Por consiguiente, la dificultad de definir las SH en términos químicos específicos, obliga a usar definiciones aproximadas en base únicamente a las características observadas en los procesos de su fraccionamiento (clasificación operacional). En este sentido es posible realizar un fraccionamiento de dichas sustancias en distintos componentes que presentan propiedades físicas y químicas diversas (**Figura 8.2**). La técnica más común y aceptada es la basada en las diferentes solubilidades en agua a distintos pH:

Ácidos Húmicos (AH): fracción de las SH que no es soluble en soluciones acuosas ácidas ($\text{pH} < 2$) pero sí es soluble a valores mayores de pH. Puede extraérselas del suelo con diferentes reactivos. Son la mayor fracción extraíble de las SH del suelo. Presentan una coloración entre marrón oscuro y negro.

Ácidos Fúlvicos (AF): fracción de las SH que es soluble en soluciones acuosas a cualquier valor de pH. Se las separa de los AH por acidificación, y los AF permanecen en solución. Son de color amarillo-amarronado.

Huminas (H): fracción de SH insoluble en agua a cualquier valor de pH. Son de color negro.

Sustancias Húmicas
(polímeros pigmentados)

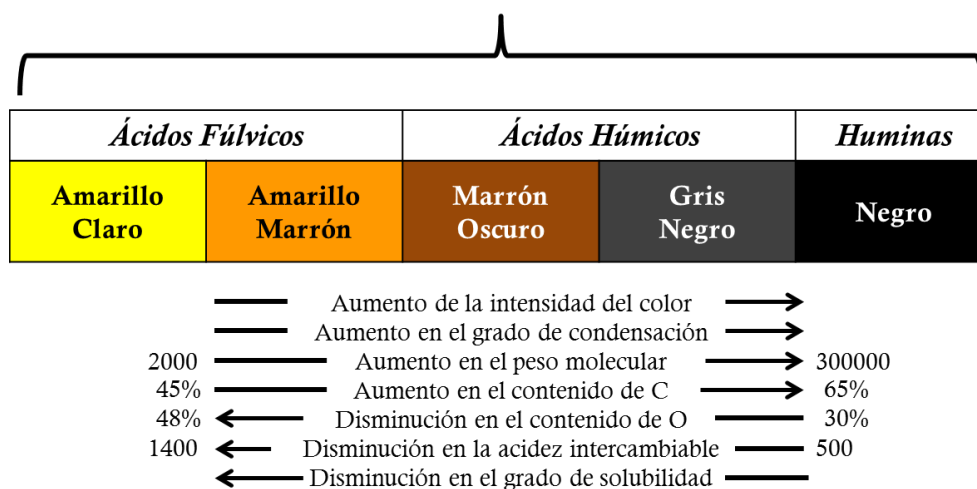


Figura 8.2 Propiedades fisicoquímicas de las SH.

Fotoquímica en Aguas superficiales

Los procesos fotoquímicos que ocurren en aguas superficiales inducidos por la luz solar afectan la química redox de estas aguas, y la de los contaminantes que se encuentran disueltos en ellas. Las SH constituyen casi la mitad de la materia orgánica disuelta (MOD) en aguas superficiales y son las sustancias que más absorben la luz solar, siendo los Ácidos Húmicos una fracción importante en la MOD. A partir del proceso de absorción de luz UV-visible se generan tripletes de las SH^{162,163}, los que interaccionan con especies presentes en el agua formando intermediarios reactivos como por ejemplo:

- Oxígeno singulete ($O_2 (^1\Delta g)$)^{162,164}
- Radicales alquilperoxido ($RO_2\bullet$)^{165,166}
- Radicales hidroxilo ($\bullet OH$)¹⁶⁵⁻¹⁶⁷
- Radicales anión superoxido ($O_2\bullet^-$)^{168,169}

En aguas superficiales, en presencia de iones $Fe(III)$, Cl^- , Br^- y HCO_3^- , se forman también otras especies reactivas como por ejemplo los radicales $HCO_3\bullet^-$, $Cl_2\bullet^-$, y $Br_2\bullet^-$. Además, datos experimentales indican que las SH fotoionizan y liberan los electrones que posteriormente se hidratan^{170,171}. Los procesos que generan estas especies reactivas se esquematizan en la **Figura 8.3**. Estos intermediarios reactivos son los responsables de la oxidación de contaminantes orgánicos y de la MOD.

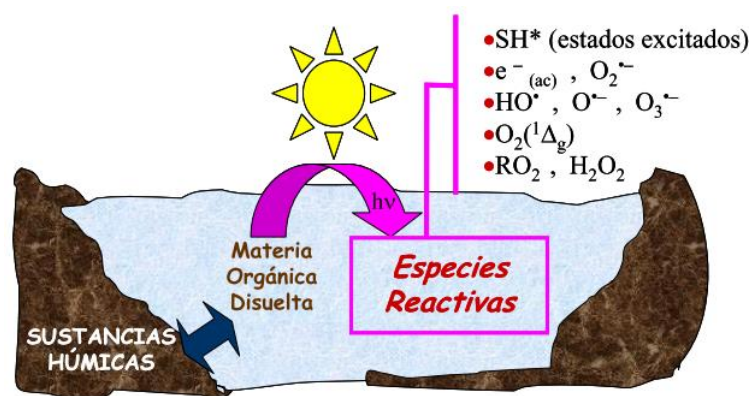


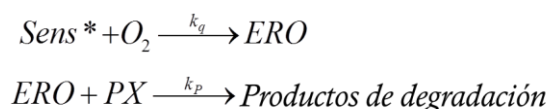
Figura 8.3 Esquema del proceso de fotosensibilización en aguas naturales.

8.1.2 Transformación de xenobióticos (Fluoroquinolonas) en aguas superficiales

La persistencia de un xenobiótico en aguas naturales puede variar entre algunos pocos días a varios meses o aún años¹⁷², dependiendo de su estructura y reactividad química, composición de la MOD, pH, temperatura, y condiciones climáticas. Por lo tanto es de esperarse que la velocidad de degradación dependa del grado de asociación entre el xenobiótico y la MOD. En ese sentido las interacciones de aminas alifáticas y aromáticas con ácidos húmicos aislados fueron estudiadas por medio de marcadores de espín y espectroscopia de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR)¹⁷³, demostrando que las aminas aromáticas instantáneamente se asocian con los AH mediante un mecanismo de unión oxidativa, en cambio las aminas alifáticas no se unen a los ácidos húmicos. También se ha reportado recientemente la influencia de los agregados húmicos en solución acuosa sobre la estabilidad química del plaguicida *Iprodiona*¹⁷⁴.

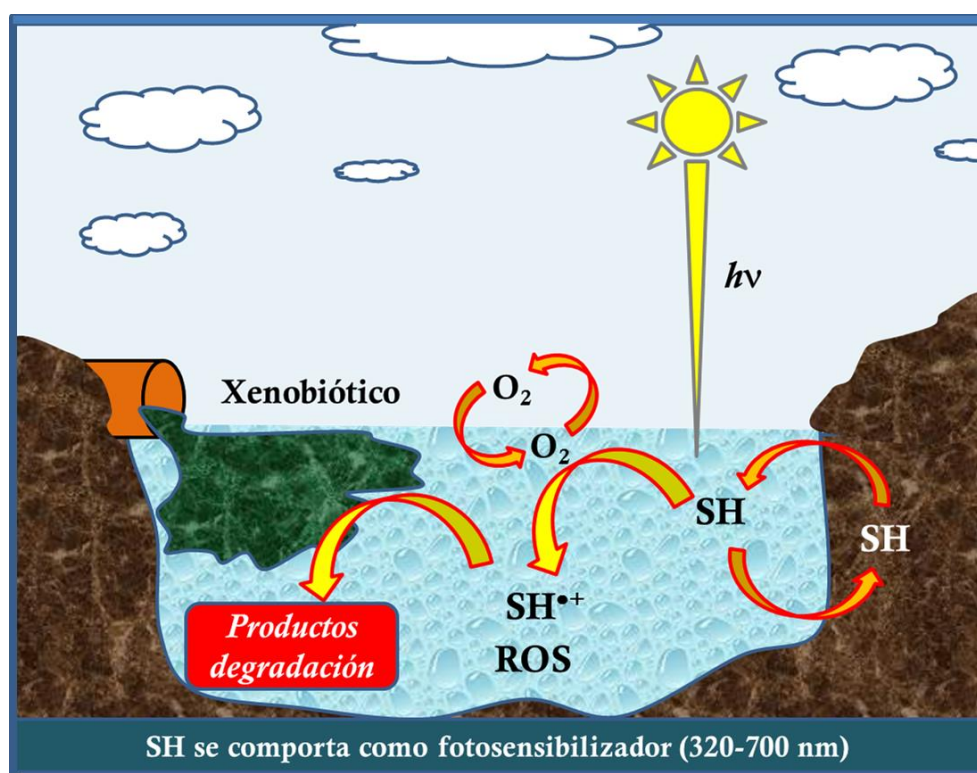
Una vez incorporado el xenobiótico a la matriz orgánica además de la degradación microbiana, los procesos de degradación química y fotoquímica juegan un papel importante. En aguas superficiales, los sistemas supramoleculares (contaminantes, compuestos orgánicos e inorgánicos, etc.) se encuentran expuestos a la radiación solar y por tanto la transformación fotoquímica juega un papel importante, sobre todo en regiones de alta luminosidad media anual, tal el caso de nuestra región de influencia del NOA. La degradación fotoquímica puede producirse sobre la superficie foliar de los vegetales, en el suelo, en el aire y en aguas superficiales. En ese sentido, existen estudios realizados sobre la foto-oxidación de la materia orgánica a CO_2 y la foto-oxidación de compuestos que permanecen en la MOD en aguas superficiales del Ártico después de la exposición al sol¹⁷⁵.

Por otra parte en medios naturales aeróbicos la concentración de oxígeno disuelto ($\approx 8,26\text{-}6,58 \text{ mg/L}$ ¹⁷⁶) es suficiente como para interaccionar con especies excitadas y generar especies reactivas de oxígeno (ERO) las cuales pueden degradar al xenobiótico, PX.



Donde ERO representa especies tales como oxígeno singlete $^1\text{O}_2$, anión superóxido $\text{O}_2^{\cdot-}$, y otras especies radicalarias como HO^{\cdot} y ROO^{\cdot} ¹⁷⁷. Además de las sustancias sintéticas, muchos pigmentos naturales absorben luz visible y actúan como sensibilizadores para la producción de especies reactivas de oxígeno, potenciando el efecto de degradación de las ERO sobre los xenobióticos^{178,179}.

Como se mencionó anteriormente, las SH también pueden servir de vehículo de xenobióticos por asociación con los mismos, por lo tanto el comportamiento de un sistema natural compuesto por SH y un xenobiótico expuesto a radiación solar puede resumirse mediante en el siguiente **Esquema 8**.



Esquema 8 Representación esquemática de procesos fotoquímicos que involucran a la sustancias húmicas y xenobióticos disueltos en aguas superficiales.

Por todo lo expuesto anteriormente es que se considera el estudio de la materia orgánica disuelta como sensibilizador de xenobióticos, para comprender los diversos procesos fisicoquímicos que ocurren en las aguas. Por ello, en este capítulo se estudió la interacción entre el Ácido Húmico Aldrich (AHA), el cual es utilizado como modelo de la materia

orgánica disuelta en aguas naturales, con las Fluoroquinolonas Cpx, Nor y Lev. Además se estudió el efecto fotosensibilizador del AHA sobre los antibióticos mencionados.

8.2 Aspectos experimentales

8.2.1 Materiales

Las soluciones de ácidos húmicos fueron preparadas con agua ultra pura y en todos los casos la concentración final de AHA en la solución fue $\approx 3.3 \mu\text{M}$.

8.2.2 Métodos

Espectroscopia UV- Visible estacionaria

Los espectros de absorción se registraron en un espectrofotómetro UV-visible Hewlett Packard 8453. Los espectros de emisión, en un espectrofluorómetro Hitachi F-2500, en celdas de cuarzo de 1 cm, con rendijas de excitación y emisión de 5 nm y con $\lambda_{\text{ex}} = 460 \text{ nm}$. Las matrices de excitación-emisión (EEM), se obtuvieron registrando los espectros de emisión entre 300 y 600 nm, y excitando las muestras entre 250 y 500 nm, cada 5 nm a una velocidad de 120 nm min^{-1} . Las matrices se construyen y grafican con el software Microcal Origin™.

Espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo por recuento de fotones individuales correlacionado temporalmente (TCSPC)

Los experimentos fueron realizados en un aparato Tempro-01 de Joriba Jovin Yvon, utilizando una fuente de excitación pulsada ultra rápida de $460 (\pm 15) \text{ nm}$, Nanoled®, 1Mhz. La longitud de onda de emisión fue seleccionada con un monocromador de 12 nm de ancho de banda de emisión. Todas las medidas fueron realizadas en solución saturada de aire y a temperatura ambiente.

Todas las medidas descriptas anteriormente se realizaron por triplicado.

Resultados y discusiones.

8.3 Propiedades Fotofísicas de Ácidos Húmicos

8.3.1 Espectros de absorción UV

El espectro de absorción UV-Vis del Ácido Húmico Aldrich (AHA) no presenta estructura y como se observa normalmente para este tipo de materiales, muestra una disminución continua y monótona de la absorbancia con el aumento de la longitud de onda debido a la hiperconjugación de electrones π de los diferentes cromóforos constituyentes en las sustancias húmicas¹⁸⁰⁻¹⁸³. Tal como se muestra en la **Figura 8.4A**.

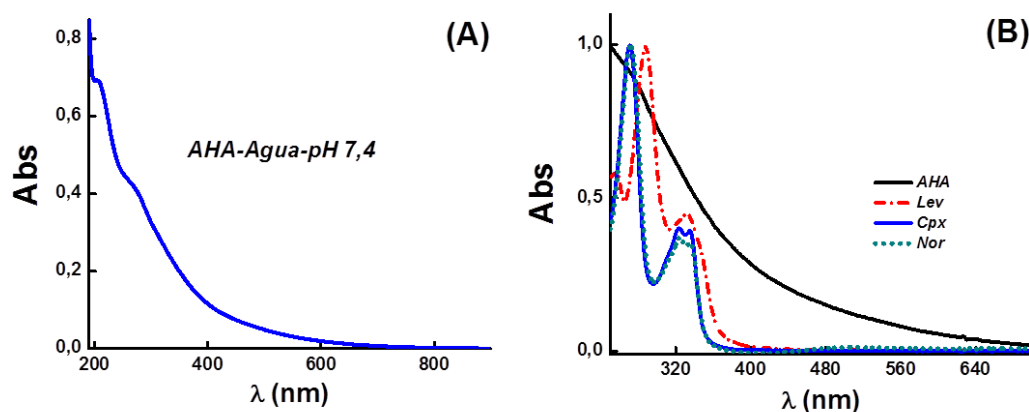


Figura 8.4 Espectro de absorción UV-Vis de AHA (A) y espectro de absorción comparativo entre AHA y FQs en solución acuosa pH 7.4 (B).

En los Ácidos Húmicos, la mayoría de los cromóforos que absorben radiación electromagnética en la región UV (< 400 nm) son moléculas aromáticas con diferente grado y tipos de sustitución, entre las cuales se encuentran fenoles y ácidos aromáticos mono y poli sustituidos.

Claramente se observa en la **Figura 8.4B** que el espectro de absorción del AHA abarca todo el espectro de las FQs, ya que el rango de absorción de los antibióticos comprende desde ≈ 220 -400 nm y el del AHA se extiende hasta 750 nm aproximadamente. Por tal motivo, en esta etapa se estudió el efecto de las FQs sobre las propiedades fotofísicas del AHA, excitando en una región donde no absorbe los antibióticos ($\lambda_{\text{ex}} = 460$ nm).

8.3.2 Espectros de fluorescencia

Normalmente, el rendimiento cuántico de fluorescencia de los AH es bajo ($10^{-4} < \Phi_F < 10^{-3}$)¹⁸⁴. Sin embargo, la alta sensibilidad y selectividad de la fluorescencia, permite obtener

información molecular muy útil para clasificar y diferenciar el origen y la naturaleza de los AHA, debido a su naturaleza multifluorofórica¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. Además la fluorescencia intrínseca, los AHA contiene información relacionada con interacciones intra e intermoleculares^{186,187}. Debido a la heterogeneidad de grupos fluoróforos presentes en los AHA, sus espectros de fluorescencia son dependientes de la longitud de onda de excitación como puede observarse en la **Figura 8.5**.

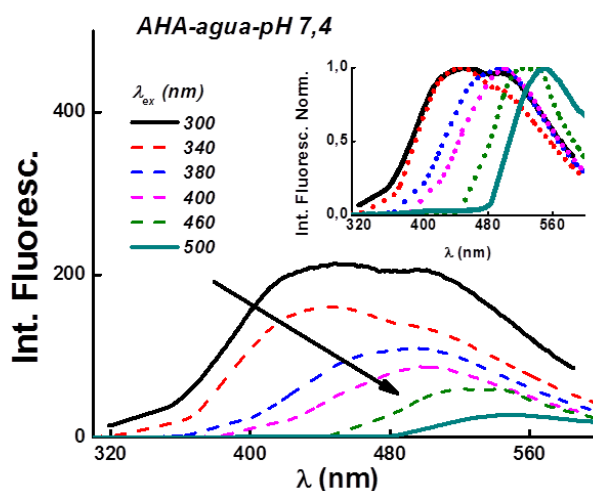


Figura 8.5 Espectros de fluorescencia de AHA de suelo a diferentes λ_{Ex} . Inserto espectros normalizados de AHA.

Por tal motivo, es necesario el análisis de los espectros de fluorescencia totales o de curvas de niveles obtenidos a partir de una matriz de excitación-emisión (MEE)¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Dicha matriz se obtiene midiendo la emisión en un amplio rango de longitudes de onda de excitación¹⁹⁰, **ecuación 8.1**.

$$MEE = \sum_{f=1}^n a_f \times b_f(\lambda_{ex}) \times c_f(\lambda_{em}) \quad \text{Ec. 8.1}$$

Donde MEE representa la matriz de excitación-emisión, a_f el factor de concentración del fluoróforo f , b_f el espectro de excitación del fluoróforo f y c_f el espectro de emisión del fluoróforo f . Las superficies MEE permiten identificar los pares de longitudes de onda excitación-emisión a los cuales aparecen máximos de fluorescencia, constituyendo una verdadera “huella digital o *finger-print*” de la SH, debido a que ninguna posee un espectro MEE idéntico a otra. La **Figura 8.6** representa la MEE de una solución de AHA en pH neutro, a la cual se le substrajo las dispersiones de luz de primer y segundo orden mediante la rutina eemscat en el programa Matlab de acuerdo al algoritmo desarrollado por Bagthoth y colaboradores¹⁹¹.

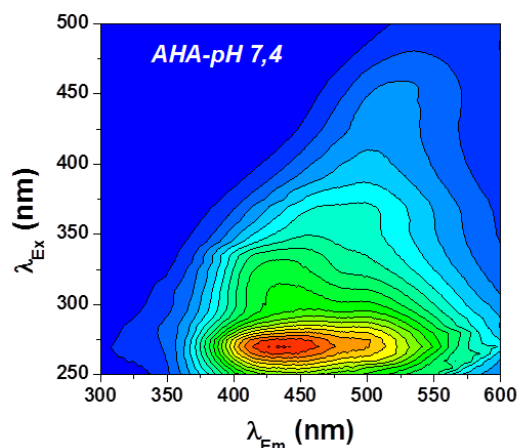


Figura 8.6 Matriz de excitación-emisión (MEE) para AHA 10 mg/L a pH = 7,4. El número de líneas de contorno en la MEE se generó realizando 20 cortes entre el máximo y mínimo para obtener 20 curvas de nivel.

8.4 Efecto de las FQs en la propiedades fotofísicas AHA

8.4.1 Interacción entre AHA y FQs, espectros de absorbancia

La **Figura 8.7A** muestra los espectros de absorción UV-Vis de soluciones acuosas de AHA $\sim 3.3 \mu\text{M}$ ($\sim 10 \text{ mg/L}$, $\sim \text{P.M. } 3600 \text{ gr/mol}^{184}$), en ausencia y presencia de Cpx. Dentro del error experimental de la medición de absorbancia (± 0.005), la adición de FQs produce el solapamiento aditivo de los espectros de absorción UV-Vis del AHA en todo el rango espectral donde absorbe el antibiótico, tal como lo confirma el espectro diferencia (**Figura 8.7B**). Los datos de espectroscopia UV-Vis no indican la existencia de formación de complejos entre AHA y FQs, ya que no se observa la formación de una nueva banda de absorción. Sin embargo, teniendo en cuenta que los AH son macromoléculas poliamorfas con sitios ionizables, neutros, e hidrofóbicos no debe descartarse la posibilidad de algún tipo de asociación con FQs mediante algún tipo de interacción (hidrofóbica, electrostática, etc.).

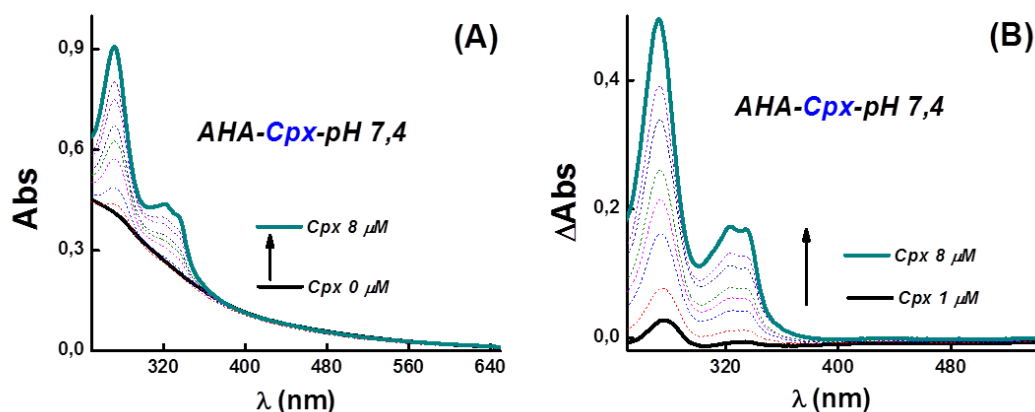


Figura 8.7 Espectros de absorción de AHA (~ 10 mg/L) con la adición creciente de concentración de Cpx (A). Espectros diferencia de AHA y Cpx (B).

8.4.2 Interacción entre AHA y FQs, espectros de fluorescencia

La adición de FQs a una solución acuosa neutra (pH 7,4) de AHA induce un aumento en su fluorescencia, tal como muestra la **Figura 8.8**, cuando AHA es excitado a 460 nm.

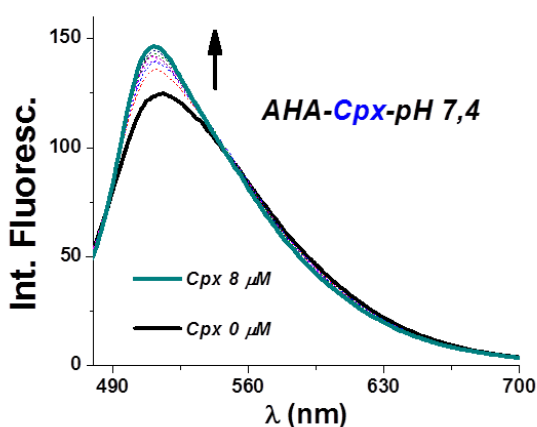


Figura 8.8 Espectros de fluorescencias con $\lambda_{ex} = 460$ nm de AHA (~ 10 mg/L) en función de la concentración de Cpx).

El aumento de fluorescencia de AHA por FQs fue analizado utilizando la ecuación de Hill, **ecuación 8.2** (**Figura 8.9**). El ajuste no lineal de los datos usando esta ecuación permite el cálculo de constantes de asociación entre moléculas pequeñas y macromoléculas^{192–194} para la asociación cooperativa y en el caso de asociación cooperativa infinita (“todos ó ninguno”).

$$F - F_0 = \frac{a \times (F_\infty - F_0) \times (K \times [FQs])^n}{1 + (K \times [FQs])^n} \quad \text{Ec. 8.2}$$

Donde F_0 es la fluorescencia inicial, a es una constante de proporcionalidad, el término $F_\infty - F_0$ se puede aproximar a la cantidad de sitios vacantes del AHA para ser ocupados por las FQs, F_∞ es la fluorescencia observada cuando todas las moléculas de FQs están completamente unidas al AHA y K es la constante de asociación. Los valores de K se detallan en la **Tabla 8.1**.

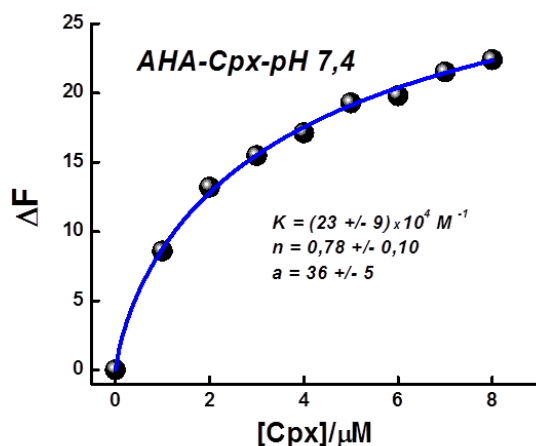


Figura 8.9 Efecto del agregado de FQs sobre la fluorescencia de AHA 10 mg/L (3.3 μM). La línea en color azul representa el ajuste de los datos con la Ec. 2.

Tabla 8.1 Valores de la constante de asociación entre AHA y FQs.

	<i>Cpx</i>	<i>Nor</i>	<i>Lev</i>
$K \times 10^{-4} M^{-1}$	23 +/- 9	31 +/- 3	35 +/- 2

Por otro lado, analizando en detalle el espectro de fluorescencia de AHA en presencia de Cpx se observa un comportamiento particular. La **Figura 8.10A** muestra cómo, los espectros de fluorescencia normalizados del AHA y AHA-Cpx, difieren tanto en la posición del máximo de emisión ($\lambda_{\text{máx}}$) como en el ancho total a mitad del máximo (ATMM). Este efecto no ocurre con las otras FQs.

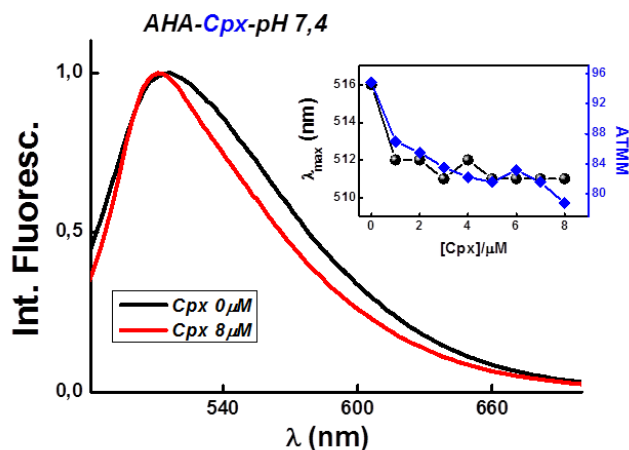


Figura 8.10 Espectros de fluorescencia normalizado de AHA con (línea roja) y sin Cpx (línea negra). Insertos efecto en la $\lambda_{m\acute{a}x}$ y ATMM del AHA por la adición de FQ.

Estos cambios observados sugieren que Cpx interacciona de manera diferente con los fluoróforos del AHA, donde la disminución del ATMM por la presencia de Cpx podría estar indicando una inhibición del fluoróforo responsable de la emisión en longitudes de ondas mayores. Como puede observarse en la **Figura 8.11**, hay un apagamiento de la fluorescencia del AHA alrededor de los 600 nm, como consecuencia del agregado de Cpx (*quenching*). Este quenching explica la disminución en el ATMM y el corrimiento de $\lambda_{m\acute{a}x}$.

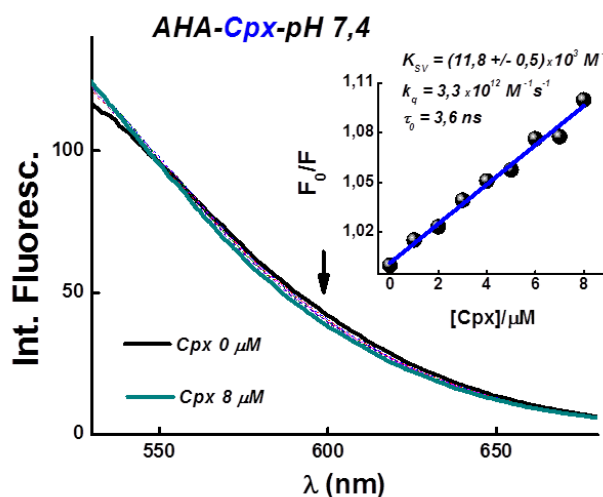


Figura 8.11 Cambios en el espectro de fluorescencia de AHA por Cpx. Inserto representación de la ec. de Stern-Volmer en $\lambda_{em} = 600$ nm.

Estos datos de *Quenching* de fluorescencia fueron analizados utilizando la ecuación Stern-Volmer, obteniéndose un valor de $K_{SV} = 1,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (inserto en **Figura 8.11**). Por otro lado, si se considera el tiempo de vida promedio de los fluoróforos mayoritarios de AHA como 3,6

ns¹⁸⁴, puede calcularse una constante bimolecular de quenching ($k_q = K_{SV} / \tau_0 \approx 5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), la cual excede por dos órdenes de magnitud el valor difusional aun considerando la contribución por atracción electrostática. Esto indica que el mecanismo de quenching es netamente estático.

8.4.3 Matrices Excitación-Emisión de AHA en presencia de FQs

Con el objeto de poder visualizar mejor los cambios espectrales del AHA por la adición de las FQs, se realizó las MEE tal como se muestra en la **Figura 8.12**. En ella se observa como la presencia de las FQ enmascaran toda la matriz de fluorescencia, siendo imposible determinar el efecto de los antibióticos en los fluoróforos del AHA. El mismo efecto se observa con la presencia de Nor y Lev en la solución de AHA.

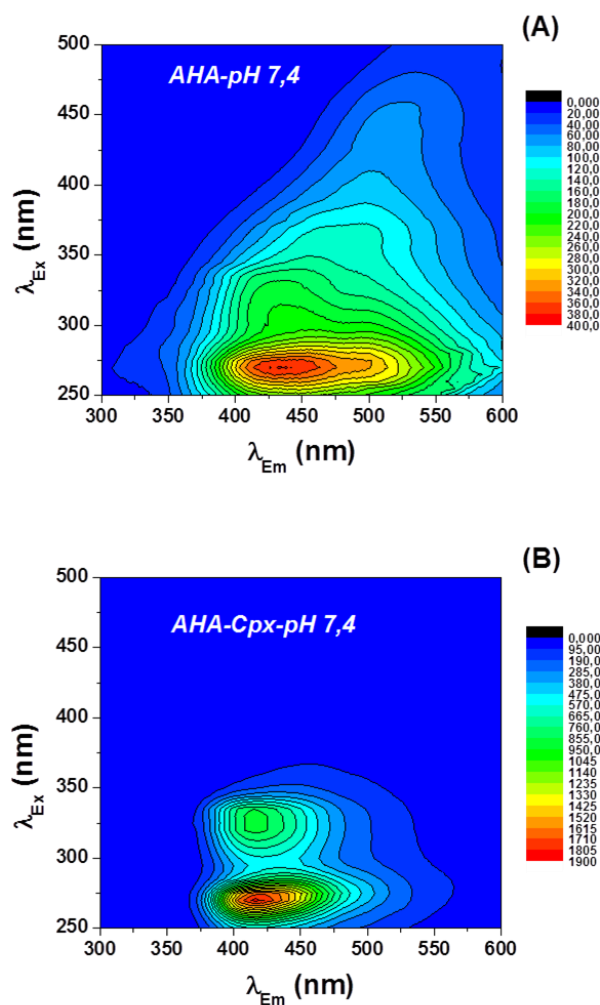


Figura 8.12 Matrices de excitación-emisión (EMM) a pH 7,4. A) AHA; B) AHA-Cpx.

8.4.4 Interacción entre AHA y FQs, fluorescencia resuelta en el tiempo

Con el objeto de corroborar que la interacción entre ellos no involucra un proceso dinámico, se midieron los tiempos de vida del AHA en presencia de FQs. Dichos valores se representan en la siguiente **Figura 8.13**.

En la Figura 8.13 se observa claramente como la presencia del antibiótico Cpx en una solución neutra de AHA, no afecta los tiempos de vida del estado excitado singulete. El mismo efecto se registró con el resto de las FQs. Por lo tanto, mediante estos experimentos se confirma la hipótesis propuesta anteriormente, donde la desactivación estacionaria de la fluorescencia del AHA no involucra un mecanismo de *quenching* dinámico.

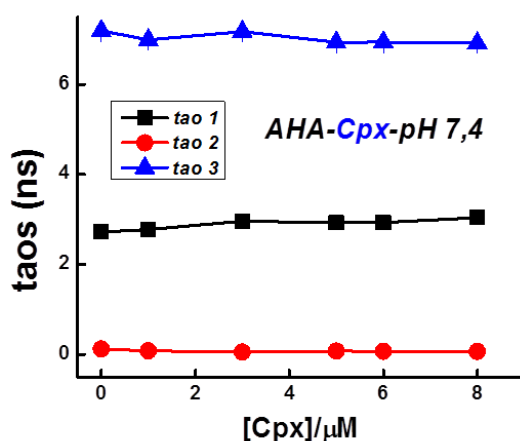


Figura 8.13 Tiempos de vida del AHA en presencia de FQs: A) AHA-Cpx; B) AHA-Nor y C) AHA-Lev. Para ello se utilizó un nanoled con $\lambda_{ex} = 460$ nm y se registró la señal en 510 nm.

Espectros Asociados a los Decaimientos (DAS) de AHA

Para dilucidar el efecto observado en fluorescencia estacionaria, donde las FQs interaccionan de diferente manera con los fluoróforos de AHA, modificando el ATMM; se midieron los decaimientos de la intensidad de fluorescencia de soluciones de AHA en ausencia y presencia de FQs, con el objeto de construir los *DAS* de dichas soluciones, **Figura 8.14**. Los datos obtenidos se analizaron con la ecuación 3.4 y 3.5 del capítulo 3.

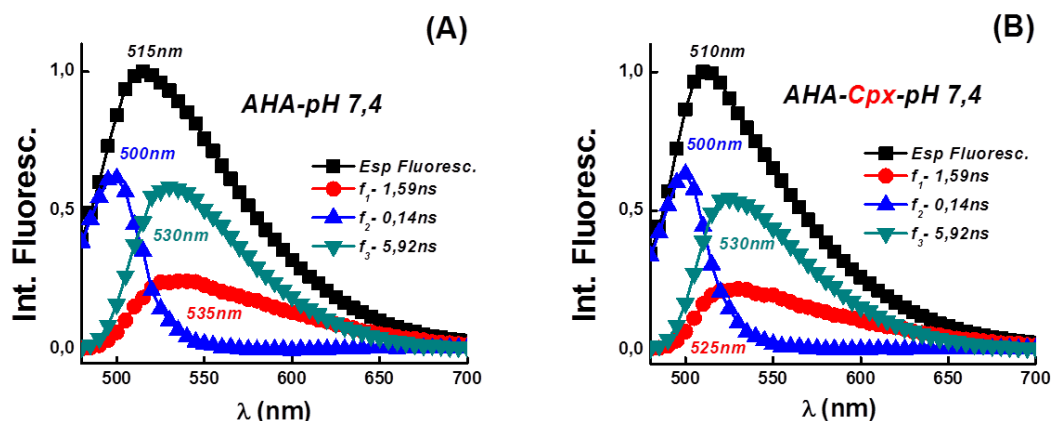


Figura 8.14 Espectro asociado al decaimiento (DAS) de cada componente emisor de AHA: en ausencia de FQs (A), y en presencia de Cpx (B). Para ello se utilizó un nanoled con $\lambda_{ex} = 460$ nm.

La **Figura 8.14A** representa el DAS del AHA, el cual revela tres contribuciones al espectro de fluorescencia. Una componente corta de 0,14 ns con un máximo de emisión a 500 nm. Otra componente con $\lambda_{max} = 530$ nm con un $\tau = 5,92$ ns y la última componente de 1, 59 ns con máximo de emisión en 535 nm. Por otro lado, no se observan cambios significativos en los componentes del AHA cuando están presentes las FQs, tal como se representa en la **Figura 8.14B**. Para cuantificar adecuadamente las contribuciones de cada componente al espectro de emisión total, se calculó el área relativa de los espectros individuales con respecto al área total del AHA. Dichos valores, se detallan en la **Tabla 8.2**.

Tabla 8.2 Áreas relativas f_1 , f_2 y f_3 de las contribuciones de AHA en presencia de FQs.

Compuesto	AHA	AHA-Cpx	AHA-Lev
Área relativa f_1	$0,269 \pm 0,01$	$0,254 \pm 0,02$	$0,159 \pm 0,02$
Área relativa f_2	$0,234 \pm 0,01$	$0,251 \pm 0,01$	$0,233 \pm 0,01$
Área relativa f_3	$0,497 \pm 0,03$	$0,495 \pm 0,02$	$0,608 \pm 0,03$

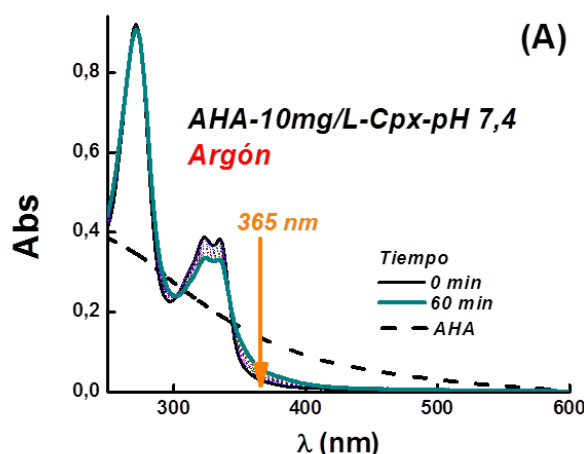
Analizando la Tabla 8.2, se observa que el área relativa f_1 disminuye con la presencia de las FQs. Lo que sugiere que hay una disminución en la contribución de los fluoróforos en la región entre 500-700 nm, tal como se observa cuando Cpx está presente en una solución de AHA (Figura 8.11 muestra el quenching en ≈ 600 nm). En cambio, el área relativa f_2 aumenta con Cpx y prácticamente es constante con Lev. Contrariamente con f_3 , donde la presencia de Lev produce un aumento pero no cambia con Cpx. Este comportamiento se relaciona con los

cambios observados para $\lambda_{\text{máx}}$ y ATMM de AHA en presencia de Cpx. Ya que, la disminución del área relativa f_1 es consistente con el *quenching* observado a longitudes de ondas mayores ($\lambda \sim 600$ nm) en experimentos de fluorescencia estacionaria; y el aumento del área relativa f_2 pone en evidencia el aumento de la fluorescencia y el corrimiento hacia el azul del espectro. En cambio la presencia de Lev no modifica la $\lambda_{\text{máx}}$ y ATMM del AHA, debido a que solo afecta las áreas relativas f_1 y f_3 donde una disminuye a expensa del aumento del otro, teniendo un efecto de compensación, ya que estas contribuyen en la misma región espectral (580-700 nm).

8.5 Propiedades fotosensibilizadoras del Ácido Húmico sobre las FQs

8.5.1 Fotólisis estacionaria

Para estudiar la capacidad fotosensibilizadora del AHA sobre las fluoroquinolonas, se realizó experimentos de fotólisis estacionaria con $\lambda_{\text{ex}} = 365$ nm, utilizando como blanco la solución de AHA (10 mg/L) con el proposito de poder seguir los cambios en la absorbancia de los antibióticos. La **Figura 8.15** representa los cambios en el espectro de absorción de Cpx sensibilizado por el AHA, en función del tiempo de excitación.



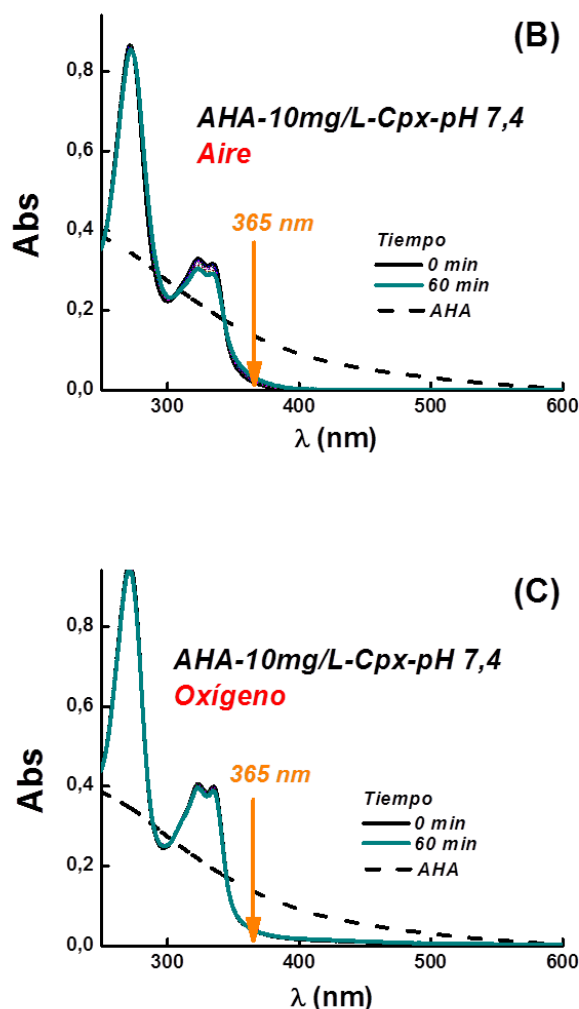


Figura 8.15 Efecto fotosensibilizador de AHA sobre Cpx en diferentes concentraciones de oxígeno. Las líneas continuas representan los cambios en el espectro de absorbancia de Cpx ($\sim 22 \mu M$) y las líneas discontinuas el espectro de AHA. Para ello se irradia la solución durante 60 minutos con $\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$

Los experimentos revelaron que existe un efecto fotosensibilizador del AHA sobre las FQs estudiadas, ya que a la longitud de onda de excitación absorbe principalmente el AHA (fracción absorbida por AHA $> 90\%$). El efecto es mayor para Cpx y Nor, y en menor proporción para Lev. Esto último puede explicarse debido a la presencia del anillo oxacino en la posición 8 que presenta Lev, el cual le atribuye mayor estabilidad fotoquímica.

Analizando los cambios espectrales obtenidos en la fotólisis, en la región de 330 nm, permite calcular las velocidades iniciales de fotoconsumo de las FQs. En la **Tabla 8.3** se detallan los valores calculados y como control se realizó la fotólisis directa de Cpx con $\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$ en aire y no se observó fotoconsumo. Indicando que la degradación del antibiótico esta mediado por la fotosensibilización del AHA.

Tabla 8.3 Velocidades iniciales de fotoconsumo de FQs en $\lambda = 330$ nm.

<i>Atmosfera</i>	<i>Velocidades iniciales $v_0 \times 10^5 s^{-1}$</i>		
	<i>Cpx</i>	<i>Nor</i>	<i>Lev</i>
<i>Argón</i>	3,98 +/- 0,10	5,80 +/- 0,22	0,08 +/- 0,06
<i>Aire</i>	2,13 +/- 0,05	1,26 +/- 0,06	No hay cambios
<i>Oxígeno</i>	0,03 +/- 0,01	No hay cambios	No hay cambios

Por otro lado, a medida que aumenta la concentración de oxígeno en los experimentos se observa que el fotoconsumo del antibiótico disminuye, esto puede observarse en las cinéticas a 330 nm en la **Figura 8.16**. Por lo tanto, el hecho de que el oxígeno disuelto disminuye la velocidad de fotodegradación de FQs, sugiere que un estado excitado con tiempo de vida de microsegundos está implicado en la reacción.

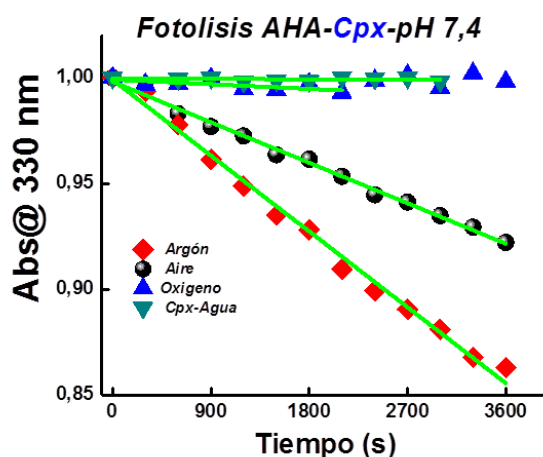


Figura 8.16 Cinéticas de fotoconsumo de Cpx mediante: fotólisis inversa con $\lambda_{ex} = 365$ nm (donde solo absorbe el AHA) y directa (triángulo invertido de color magenta) con $\lambda_{ex} = 365$ nm en ausencia de AHA.

8.5.2 Efecto de la concentración de O_2

Utilizando los valores de velocidades iniciales de fotoconsumo de Cpx en función de la concentración de oxígeno, fue posible calcular la constante de *Quenching bimolecular* de los estados tripletes del AHA por O_2 . Obteniéndose un valor de $k_q \sim 10^9 M^{-1} s^{-1}$ (**Figura 8.17**); para ello se utilizó el $\tau_0^T = 2 \mu s^{163}$. Dicho valor concuerda con la desactivación de estados tripletes de moléculas orgánicas por O_2 y confirma la hipótesis de la participación de los estados tripletes de AHA en el mecanismo de fotodegradación¹⁹⁵.

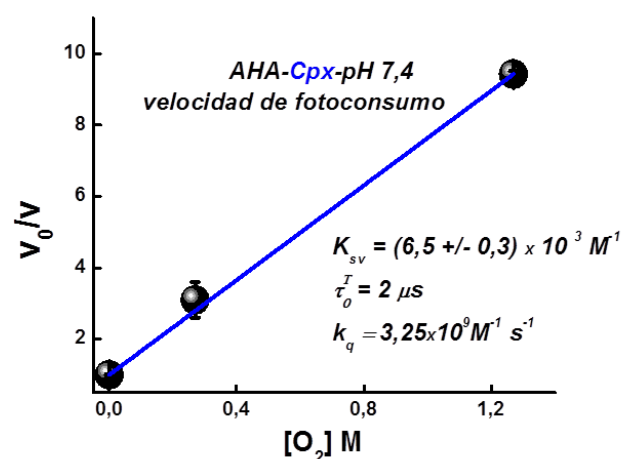


Figura 8.17 Velocidades relativas de fotoconsumo de Cpx en función de la concentración de O_2 disuelto en la solución.

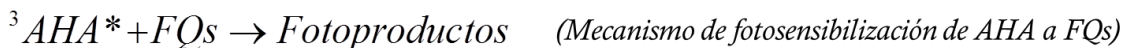
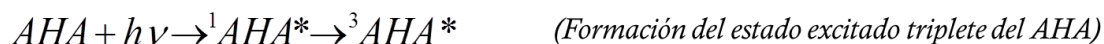
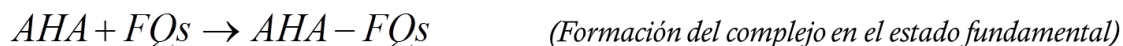
8.5.3 Efecto de la concentración de Ácido Húmico

Para determinar el efecto sensibilizador del AHA sobre las FQs, se realizó la fotólisis en función de la concentración de AHA. En la **Tabla 8.4** se muestra como la velocidad de fotoconsumo de Cpx aumenta hasta llegar a una concentración de 10 mg/L de AHA y luego disminuye. Este efecto puede estar dado por la aniquilación eficiente de tripletes de AHA mediante la interacción triplete-triplete y/o singulete-triplete.

Tabla 8.4 Velocidades iniciales de fotoconsumo de FQs en $\lambda = 330 \text{ nm}$ en función de la concentración de AHA.

	<i>[AHA]/ mg/L</i>			
	5	10	20	40
$V_0 \times 10^5 s^{-1}$	0,79 +/- 0,20	2,70 +/- 0,31	1,73 +/- 0,16	0,20 +/- 0,05

8.5.4 Mecanismo de fotointeracción entre AHA y FQs



Esquema 9 Mecanismo de interacción entre el AHA y las FQs.

8.6 Conclusiones parciales

A partir de estos resultados, se espera que las FQs puedan ser transportadas en las corrientes acuosas por su fuerte asociación con ácidos húmicos, generando su dispersión en el ambiente en zonas lejanas al punto de uso. Además se demostró que el AHA posee actividad sensibilizadora e induce la fototransformación de las FQs hasta una concentración de 10 mg/L. A concentraciones mayores, la velocidad de fotodegradación de la FQ disminuye, debido a una posible aniquilación triplete-triplete y/o singulete-triplete del AHA. Un efecto similar se observa cuando el oxígeno está presente en la solución, ya que desactiva el estado triplete del AHA. Estos resultados indican claramente que el proceso de sensibilización del fotoconsumo de las FQs, involucra el estado excitado triplete del AHA.

Capítulo 9

Conclusiones Generales

9 Conclusiones

En la primera parte de esta tesis se abordó el estudio fotofísico y fotoquímico de las Fluoroquinolonas con la proteína Lisozima en solución homogénea. En este sistema se determinó que las FQs interaccionan con Lyz, y que la fuerza y naturaleza de la interacción depende del pH del medio. Forman un complejo en el estado fundamental, sin involucrar los estados excitados tanto singulete como triplete de los antibióticos.

Se determinó que las FQs se fotodegradan mediante dos vías: Desfluorinación y Degradación del anillo piperazina. El complejo formado, FQs-Lyz, disminuye el rendimiento cuántico de fotodegradación de los antibióticos (Φ_{FC}). Esto se debe a que Lyz se encuentra unida a la FQs mediante el anillo piperazina, lo retarda la vía de la degradación del anillo. Dicho efecto protector no produce foto-oxidación de los Trp situados en la proteína, y no afecta la estructura secundaria ni la actividad lítica de la enzima.

Además, se estudió que el efecto de la irradiación constante con $\lambda_{ex} = 330$ nm sobre ciprofloxacina produce una disminución en su actividad antibiótica, siendo mayor el efecto en bacterias Gram positivas. Esto está relacionado con la baja concentración de antibiótico remanente luego de la fotólisis. La presencia de Lyz no tiene ningún efecto, ya sea antagónico ni sinérgico sobre la actividad de Cpx.

En la segunda parte de esta tesis se enfocó el estudio fotofísico y fotoquímico de las FQs con Lyz en Micelas Inversas, con el propósito mimetizar un sistema confinado. Se demostró que las FQs son estabilizadas y ubicadas en el interior acuoso de la micela, donde sensan un medio ácido ($pH \approx 5,4$). Además se observó como las Tyr presentes en Lyz contribuyen en el espectro de fluorescencia, indicando que la proteína sufre cambios conformacionales cuando se incorpora en micelas inversas.

Por otro lado, se determinó que no existe interacción entre las FQs y Lyz cuando se encuentran incorporadas en las micelas inversas. Se demostró además, que la fotoquímica de las FQs en soluciones micelares proviene del estado excitado triplete de los antibióticos y que la proteína interacciona con el triplete de Cpx, disminuyendo su fotoconsumo en W 16.

Por último, se determinó que las FQs forman complejos con el Ácido Húmico en el estado fundamental, lo cual puede promover su dispersión en el ambiente a través de las corrientes acuíferas. Se demostró también que el estado triplete del AHA tiene un efecto fotosensibilizador sobre la degradación de Cpx cuando son irradiados a 360 nm.

En esta tesis se demostró que las interacciones entre FQs con macromoléculas como la Lyz pueden modificar la velocidad de degradación fotoquímica y persistencia de los mismos. Además la degradación fotoquímica de las FQs afecta su actividad antibacteriana.

Por otro lado se demostró que los AH pueden jugar dos roles importantes: a) en la dispersión ambiental de las FQs por su moderada asociación y b) pueden ser fotosensibilizadores efectivos en la región UVA para degradar a las FQs.

Capítulo 10

Materiales y Métodos

10 Detalles experimentales

10.1 Materiales

10.1.1 Reactivos de uso general

El Trizma ácido y el Trizma básico, fueron marca Sigma. El Hidróxido de Sodio y Ácido Clorhídrico fueron marca Ciccarelli, grado p.a. El solvente iso-octano fue marca Fluka, grado HPLC.

Las soluciones acuosas se prepararon con agua ultrapura obtenida mediante un equipo de potabilización de agua, modelo OSMOION 10-2 (conductividad = $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$). Este equipo que cuenta con una membrana de osmosis inversa, un sistema de filtros de carbono para reducir materia orgánica, un filtro de poliuretano para reducir entrada de partículas grandes, y un par de resinas de intercambio iónico, para reducir la conductividad.

10.1.2 Reactivos específicos

Las Fluoroquinolonas Ciprofloxacina (Cpx) y Norfloxacina (Nor) fueron marca Fluka, mientras que Levofloxacina (Lev) fue marca Sigma. Dichos antibióticos fueron utilizados sin previa purificación.

Se utilizó un ácido húmico (AH) comercial, marca Aldrich (Aldrich Humic acid, sodium salt), que es un AH que proviene de turbas. La muestra fue purificada y cedida por el Dr. Mignone¹⁸⁴ y se rotuló como AHA (Aldrich purificado).

La sal de Docusato de Sodio (AOT), para la preparación de las micelas inversas, fue de marca Sigma-Aldrich.

10.2 Métodos e instrumentos

10.2.1 Preparación de soluciones

En el caso de soluciones acuosas, estas fueron preparadas en el día. Para soluciones micelares, fueron preparadas en el día de la experiencia y luego mantenidas a -18°C para una segunda determinación, cuando fuera necesario. Luego de llevarlas nuevamente a temperatura ambiente, el sistema se sometió a agitación para lograr nuevamente la formación de las micelas inversas.

Fluoroquinolonas (FQs) en solución buffer- stock

Las soluciones se prepararon agregando una pequeña cantidad de las fluoroquinolonas en un frasco color caramelo y disolviéndolos con buffer Tris 10 mM de pH 7,4.

Soluciones de Ácido Húmico.

El AHA se disolvió en agua al que se le adicionó NaOH hasta pH = 10 y se almacenó a 4°C durante 24 hs para asegurar su completa disolución. Durante este tiempo dicha solución se sometió periódicamente a agitación por ultrasonido y luego fue filtrada a través de filtros Millipore de 0,45 µm para reducir la suspensión de partículas no disueltas. El pH final de las disoluciones se ajustó al deseado por la adición de pequeñas cantidades de solución de NaOH ó HCl concentrado.

Micelas Inversas

Se prepararon soluciones de AOT 0,1 M en iso-octano anhidro. Posteriormente se inyectó una determinada cantidad de solución stock de FQs en buffer Tris 10 mM a un volumen bien definido de solución de AOT. Cantidades adicionales de agua fueron agregadas para obtener las relaciones molares entre agua y surfactante ($W = [H_2O]/[AOT]$) de 3 a 25. Las mezclas fueron agitadas para obtener soluciones ópticamente transparentes.

10.2.2 Espectroscopia UV-Visible

Es una técnica analítica basada en la medida directa de la absorción de radiación electromagnética por parte de una muestra. La absorbancia se define como la relación (logarítmica) entre la intensidad de la luz que incide sobre una muestra y la intensidad de esa misma luz que es transmitida a través de esa muestra (Figura 10.1). Esta absorción de la radiación varía con la longitud de onda de la radiación dependiendo de la composición química de la muestra y es directamente proporcional a su concentración. Un espectro de absorción UV-visible no proporciona una clara identificación de un compuesto, pero es muy útil para observar cambios en los grupos funcionales de una molécula, debido a que es muy sensible a ellos. Por ejemplo, las distintas formas ácido-base de una misma sustancia pueden claramente ser distinguidas por las diferencias en sus espectros de absorción.

Los espectros de absorbancia UV-Visible fueron obtenidos con un espectrofotómetro de arreglo de diodos Hewlett- Packard HP 8453, con resolución de ± 1 nm entre 190 y 1100 nm, provisto con portacelda termostatizado.

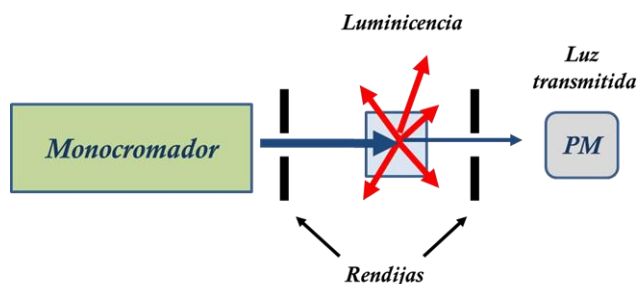


Figura 10.1 Esquema del diseño instrumental de un espectrofotómetro y fotografía del espectrofotómetro Hewlett-Packard HP 8453.

10.2.3 Espectroscopia de fluorescencia estacionaria

La fluorescencia es un proceso de fotoluminiscencia en el cual los átomos o las moléculas son excitados mediante la absorción de radiación electromagnética y luego pierde el exceso de energía en forma radiativa¹⁹⁶ (diagrama de Jablonski, Capítulo 2). Un espectro de emisión es un registro de la intensidad de la emisión como función de la longitud de onda y depende de la estructura química de la molécula y del solvente⁶⁴.

Los espectros de emisión y excitación se obtuvieron con un espectrofluorómetro Hitachi F-2500 equipado con un fotomultiplicador de detección Hamamatsu R928 extendido al rojo (200-900 nm). El ancho de la rendija de excitación fue de 5 nm, al igual que el de emisión. El potencial de trabajo del fotomultiplicador se fijó a 700 V.

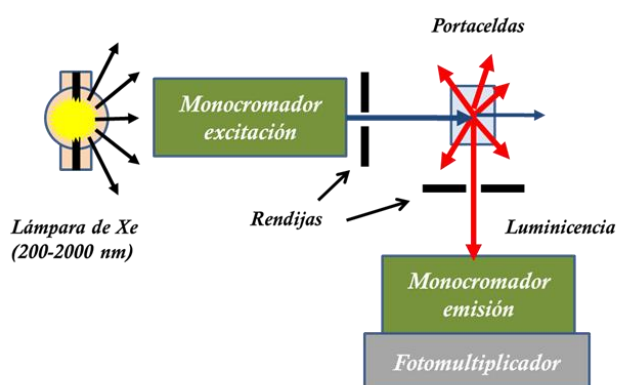


Figura 10.2 Esquema del diseño de un espectrofluorómetro y fotografía del equipo utilizado durante las determinaciones.

Las matrices de excitación-emisión (MEE) del AHA se obtuvieron excitando las muestras desde 250 a 500 nm cada 5 nm, registrando la intensidad de emisión entre 360 y 700 nm cada 1 nm. Las matrices se construyeron y graficaron con el programa de análisis Microcal OriginTM.

10.2.4 Espectroscopia de fluorescencia resuelta en el tiempo

En las técnicas resueltas en el tiempo se genera una cierta población de moléculas en estados electrónicamente excitados mediante un pulso de radiación electromagnética. Luego de dicho pulso se estudia alguna propiedad del sistema como una función del tiempo. Tal propiedad puede ser la emisión de un compuesto. De esta manera se pueden estudiar el *Decaimiento de la fluorescencia*, obteniendo τ_F que es el tiempo de vida de dicho estado. Para medir este parámetro se debe excitar la muestra con un pulso de luz muy corto de λ apropiada y registrar el decaimiento de la fluorescencia en función del tiempo.

Las medidas de fluorescencia dinámica se realizaron por *Recuento de Fotones Individuales Correlacionado Temporalmente (TCSPC)* donde se utiliza una fuente de luz pulsada y un detector, el cual mediante un circuito permite detectar eventos de un solo fotón. Los fotones emitidos son atenuados mediante un filtro de densidad neutra de forma tal de asegurar que el fotomultiplicador detecte un único fotón por pulso de excitación. En una serie repetitiva de muchas señales star-stop provenientes del circuito electrónico, el recuento de cada uno de los fotones, permite la generación progresiva de un histograma, **Figura 10.3**.

El equipo utilizado fue Tempro-01 de Horiba Jovin Yvon (Edimburg, Reino Unido), utilizando como fuentes de excitación pulsada Nanoled[®] de 340 (± 15) nm y 460 (± 27) nm que operan a 1 MHz de frecuencia. La longitud de onda de emisión fue seleccionada con un monocromador cuyo ancho de banda de emisión que se seleccionó entre 12 y 32 nm, dependiendo de las condiciones de la muestra analizada.

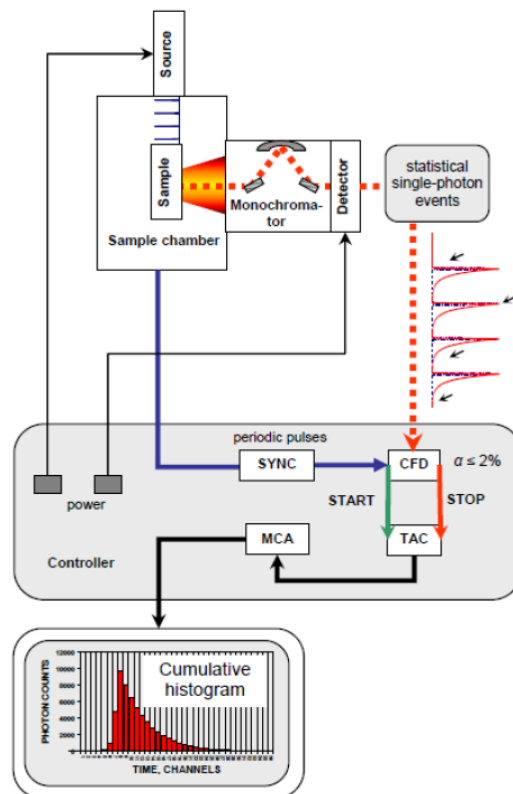


Figura 10.3 Esquema del diseño instrumental de un equipo para medida de TCSPC. Una fuente de luz pulsada excita la muestra de forma repetitiva. La emisión de la muestra es observada en un detector, mientras que el flash de excitación es detectado por un módulo de sincronización (SYNC). A través del diseño electrónico, se genera un histograma de fotones contabilizados en cada uno de los canales de tiempo.

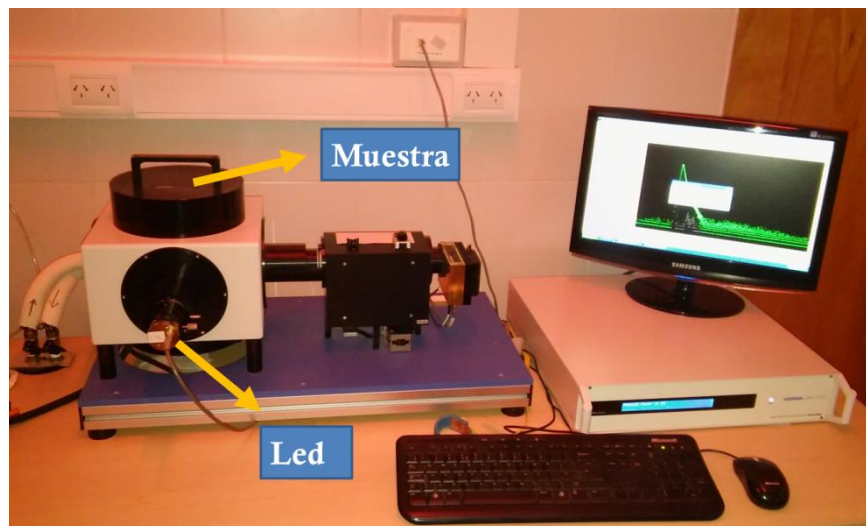


Figura 10.4 Fotografía del equipo TCSPC.

10.2.5 Experimentos de Láser Flash Fotólisis

LFP es una técnica con resolución temporal para el estudio espectroscópico y cinético de transitorios en la cual se emplea luz pulsada para generar especies transitorias. Habitualmente, se utiliza un pulso intenso de corta duración para producir una especie transitoria con la concentración adecuada para su observación espectroscópica⁸⁷. El método de LFP fue desarrollado por Norrish y Porter en 1948, utilizado para la iniciación y el estudio de procesos fotoquímicos. En esta técnica se crea una situación de no equilibrio en la mezcla de reacción en un intervalo de tiempo corto, generando intermediarios inestables en concentraciones detectables.

La detección de especies transitorias intermediarias se realizó con un sistema de laser-flash-photolysis LFP (mLFP-112, Luzchem), que permite la detección por absorción UV-Vis (200-750 nm) de especies con tiempos de vida entre 20 ns y 100 ms. Esta técnica se basa en la medición del cambio de absorbancia por parte de especies transitorias (estados tripletes, radicales, etc.) generados luego del pulso de excitación. Como fuente de excitación se utilizó un láser de estado sólido de Nd:YAG (Continuum Minilite II, USA) emitiendo radiación de 10 ns de ancho de pulso a 355 nm.

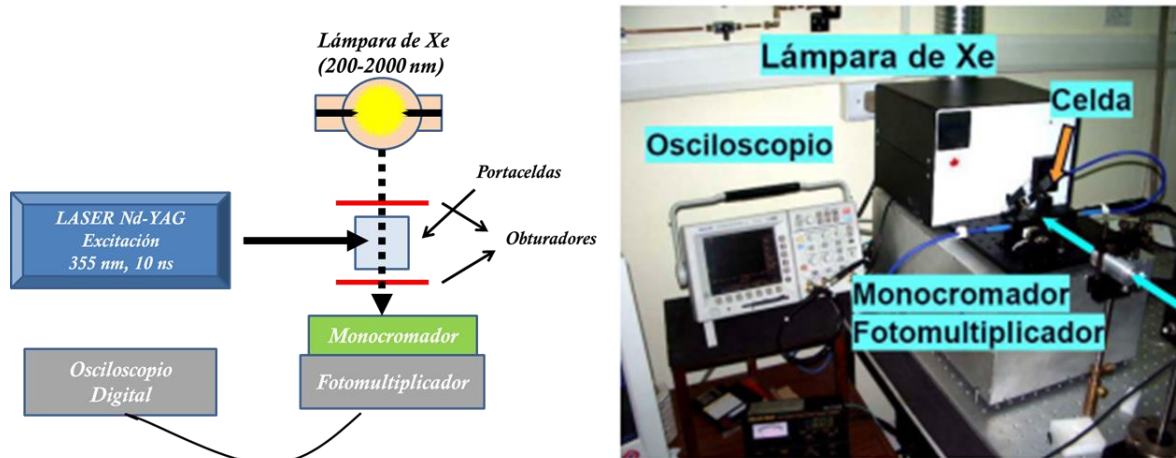


Figura 10.5 Esquema del diseño experimental del equipo de LFP y fotografía del arreglo instrumental utilizado en el CITSE, con un sistema de detección mLFP-112, Luzchem.

En la **Figura 10.6** se muestran las transiciones triplete-triplete habitualmente detectadas con la técnica de LFP y la traza cinética típica que resulta de la modificación de la señal de corriente o voltaje por cambio de absorbancia en la muestra.

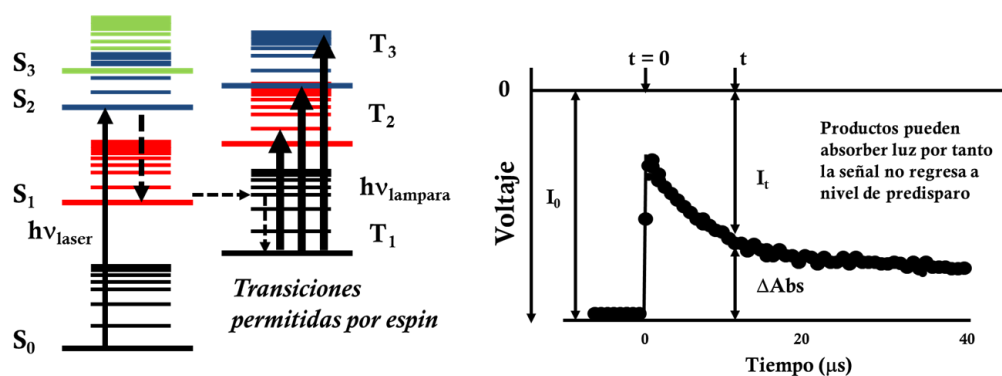


Figura 10.6 Esquema del proceso de absorción del transitorio (A) y, modificación de la señal de corriente por cambio de absorbancia en la muestra (B).

Las señales son enviadas a un osciloscopio digital Tektronix TDS3032B de 300 MHz de ancho de banda. Alrededor de 20 disparos fueron promediados para obtener una buena relación señal/ruido y no se observó fotodegradación de las muestras. Para convertir a cambios de absorbancia (ΔAbs) los valores de cambio de intensidad de corriente (I) registrados, se utiliza la ley de Lambert-Beer y se obtiene

$$\Delta Abs = -\log\left(\frac{I_0}{I_t}\right) = \varepsilon_{\lambda} l C_t \quad \text{Ec. 10.1}$$

Donde ε_{λ} es el coeficiente de absorción molar de la especie transitoria a la longitud de onda, λ , C_t es su concentración molar al tiempo t y l la longitud de la celda en centímetros. El análisis cinético de las señales de decaimiento y crecimiento de las diferentes especies transitorias observadas se realizó con el programa Microcal Origin™.

10.2.6 Espectros infrarrojos con transformada de Fourier

La espectroscopia infrarroja, constituye una técnica espectroscópica de amplio uso, que se basa en la excitación de los modos normales de vibración de las moléculas por la absorción de la radiación infrarroja.

Los registros de los espectros de infrarrojo fueron llevados a cabo con un espectrofotómetro FT-IR Thermo Nicolet 6700 del Laboratorio de Biointerfases y Sistemas Biomiméticos y un equipo JASCO FT/IR-4600 de nuestro laboratorio, ambos pertenecientes al Centro de Investigación y Transferencia (CITSE-UNSE-CONICET) de la Universidad Nacional de Santiago del Estero.

Un equipo de FTIR, está diseñando según el principio del interferómetro de Michelson, donde todas las frecuencias son medidas simultáneamente. El mismo presenta una fuente de radiación policromática, un divisor de haz (beam splitter), un par de espejos (uno fijo y otro móvil) y un detector.

Todos los espectros, independientemente de las características de las muestras, fueron registrados entre 4000 y 600 cm^{-1} sobre un accesorio de Reflectancia Total Atenuada.

El equipo Thermo Nicolet (**Figura 10.7**) está provisto de un accesorio ATR inteligente de múltiple rebote (Multiple bounce ATR) con cristal de ZnSe, el cual proporciona un rendimiento óptico más alto y una flexibilidad de muestreo. Los espectros para las muestras de *Proteína* fueron registrados en este equipo provisto por una purga de aire continua, usando una resolución de 4 cm^{-1} y 64 scans de barrido.

El equipo FT/IR-4600 (**Figura 10.8**) está provisto de un accesorio ATR de una sola reflexión con un cristal de ZnSe de nuevo diseño para proporcionar alto rendimiento óptico. Las muestras de fotólisis de *Ciprofloxacina* fueron medidas usando este equipo a una resolución de 4 cm^{-1} y 32 scans de barrido.

Los dos equipos utilizados están provistos de un detector de sulfato de triglicina deuterado dopado con L-alanina (DLATGS), y un divisor de haz de KBr.

Los espectros de las muestras en solución acuosa se realizaron colocando una gota del mismo sobre el cristal de ATR y dejando secar en condiciones adecuadas hasta la formación de un film hidratado, mientras para las muestras sólidas, cantidades adecuadas fueron coladas sobre la superficie del cristal.



Figura 10.7 Fotografía del espectrofotómetro FTIR THERMO NICOLET 6700

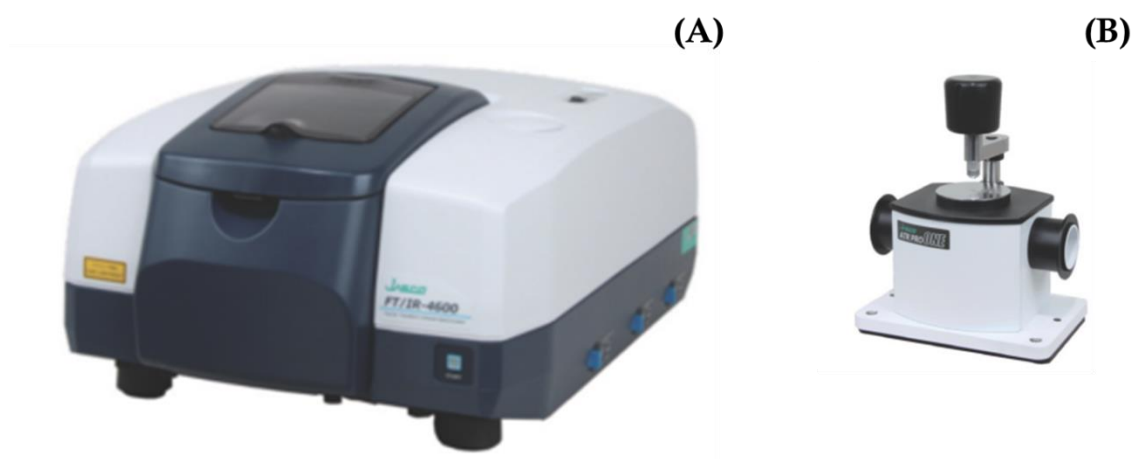


Figura 10.8 Fotografía del espectrofotómetro FT/IR JASCO 4600 (A), accesorio ATR PRO ONE de una sola reflexión (B).

Todos los espectros fueron registrados usando el software OMNIC 9.0, mientras que el procesamiento de los espectros (resta de blanco, corrección de línea de base, derivada segunda y deconvolución) fue realizado usando el software OPUS 7.0.

10.3 Cálculos teóricos

10.3.1 Docking molecular¹⁹⁷

Esta aproximación se inicia con una base de datos de moléculas conocidas e intenta colocar cada una de ellas en la cavidad de unión de la proteína y, si tiene éxito, estima la afinidad de la unión utilizando una función scoring. Al final, se obtiene una lista de las moléculas de mayor unión para la proteína.

El problema de docking proteína-ligando es el siguiente:

.....”A partir de una descripción geométrica y química de una proteína y una pequeña molécula orgánica (ligando) se desea determinar computacionalmente si la molécula pequeña se unirá a la proteína, y si es así, se desea estimar la geometría del complejo unido así como la afinidad de la unión”.....

Muchos algoritmos incluyen dos componentes:

- Una técnica de búsqueda para encontrar la ubicación óptima de ligando en la cavidad de enlace de la proteína.
- Una función de scoring (punto a punto) para evaluar cada uno de los mejores sitios de unión, así como para clasificar ligandos candidatos uno contra otro.

Para determinar la primera componente se usa por lo general una técnica de optimización estándar, tal como un algoritmo genérico (Autodock).

Para la segunda, se utilizan campos de fuerzas AMBER (Autodock), el cual provee una buena aproximación de la energía libre de enlace.

Los cálculos docking realizados en este trabajo de tesis, fueron desarrollados usando el programa AutoDock 4.2¹⁹⁸

10.3.2 AutoDock

AutoDock es un procedimiento automatizado que permite la predicción de la interacción de ligandos con biomacromoléculas. La actual versión de AutoDock, usa el algoritmo genético de Lamarckian y función scoring para la energía libre empírica y típicamente provee resultados de docking reproducibles para ligandos que presentan hasta 10 enlaces flexibles. Este software permite un método de búsqueda rápido, y provee resultados reproducibles para sistemas grandes de hasta 20 enlaces flexibles.

Los cálculos AutoDock se llevan a cabo en varios pasos:

1)- Preparación de los archivos de coordenadas usando AutoDockTools.

AutoDock4.2 está parametrizado para utilizar un modelo de la proteína y el ligando que incluye átomos de hidrógeno polares, pero no los átomos de hidrógeno unidos a átomos de carbono. Se genera un archivo que incluye cargas atómicas parciales y tipos de átomos, también incluye información sobre los grados de libertad de la torsión que considera.

2)- Precálculo de las afinidades atómicas usando AutoGrid.

Se realiza una evaluación rápida de la energía mediante un precálculo de los potenciales de afinidades atómicas para cada tipo de átomo en una molécula ligando. Se genera una grilla tridimensional y se considera un átomo en cada punto de la grilla. La energía de la interacción de este único átomo con la proteína se asigna a la red punto. AutoGrid se calcula para cada tipo de átomo en el ligando, típicamente de carbono, oxígeno, nitrógeno e hidrógeno, así como las redes de potenciales electrostáticos y desolvatación.

3) Cálculo docking del ligando usando AutoDock.

El docking se lleva a cabo usando uno de varios métodos de búsqueda. El método más eficiente es el algoritmo genético de Lamarckian (LGA). El cálculo se ejecuta varias veces para dar varias conformaciones, y el análisis de la energía y la predicha consistencia de los resultados se combinaron para identificar la mejor solución.

4) Análisis de los resultados usando AutoDockTools.

AutoDockTools incluye varios métodos para análisis de los resultados de simulaciones docking, incluyendo herramientas por resultados de cluster por similitudes conformacionales, visualización de ligandos y proteínas.

10.3.3 Archivos de entrada para cálculos docking

Para generar la entrada del archivo docking se requieren dos estructuras.

- 1- Estructura de la proteína. Obtenida a partir de la base de datos de proteínas, donde se encuentra un archivo .pdb con la estructura de la macromolécula.
- 2- Estructura del ligando. La estructura optimizada es generada con otro programa de cálculo tal como el programa Gaussian 09 usando un determinado nivel de teoría y un conjunto de funciones base.

10.3.4 Optimización de la estructura del ligando usando Gaussian 09

Para optimizar una estructura de una molécula, se necesita de un modelo teórico o método, que es una forma de modelar un sistema que utiliza un conjunto específico de aproximaciones. Estas aproximaciones se combinan con un algoritmo de cálculo y se aplican a los orbitales atómicos, definido por el conjunto de base, con el fin de calcular los orbitales moleculares y energía.

En este trabajo de tesis se usaron métodos basados en la Teoría de los Funcionales de la Densidad (DFT)¹⁹⁹⁻²⁰², los cuales se están volviendo más debido a que los resultados obtenidos son comparables a los obtenidos utilizando métodos ab initio, sin embargo el tiempo de CPU es reducido drásticamente. DFT difiere de los métodos basados en cálculos Hartree-Fock (HF) en el camino, que es la densidad de electrones, que se utiliza para calcular la energía en lugar de una función de onda.

Las estructuras geométricas de todas las especies e intermediarios fueron optimizadas. Luego de cada optimización se realizó un análisis vibracional para confirmar que las estructuras calculadas posean realmente un mínimo de energía y para evaluar las correcciones de la energía vibracional del punto cero (zero-point energy, ZPE) y correcciones térmicas a la energía libre de Gibbs, las que se incluyen en todas las energías calculadas.

Los efectos de solvente fueron calculados con el modelo del campo de reacción autoconsistente continuo polarizado (self-consistent reaction field polarized continuum model, SCRF-PCM)²⁰³ como lo implementa el programa de cálculo Gaussian09. El programa utiliza

el conjunto de radios de hidratación UAO para formar cavidades según la geometría molecular previamente optimizada, la hibridización y la carga de la especie. En este método, el solvente es modelado como un continuo de constante dieléctrica ϵ , y el soluto es colocado en la cavidad formada según los parámetros mencionados dentro del solvente. El modelo no considera interacciones específicas entre el soluto y el solvente.

Capítulo 11

Publicaciones

11 Publicaciones

11.1 Trabajos en preparación

Photophysical and photochemical behavior of Ciprofloxacin bound to Lysozyme. **Hugo A. Pérez**, Faustino E. Morán Vieyra & Claudio D. Borsarelli.

11.2 Trabajos Presentados a Congresos

- 1- *Impact on photophysical and photochemical properties of fluoroquinolones by interaction with lysozyme in aqueous solutions.* 16th International Congress on Photobiology (16vo Congreso Internacional de Fotobiología). Hugo A. Pérez, Faustino E. Morán Vieyra y Claudio D. Borsarelli. Cordoba, Argentina. Septiembre de 2014. Póster.
- 2- *Unexpected effect of Tris buffer on photophysical properties of Fluoroquinolone Antibiotics.* XLIV Reunión Anual Sociedad Argentina de Biofísica (SAB). Hugo A. Pérez y Faustino E. Morán Vieyra. Santiago del Estero, Argentina. Noviembre de 2015. Póster.
- 3- *Binding of Fluoroquinolone by humic substances.* XLIV Reunión Anual Sociedad Argentina de Biofísica (SAB). Hugo A. Pérez y Faustino E. Morán Vieyra. Santiago del Estero, Argentina. Noviembre de 2015. Póster.

Capítulo 12

Referencias

12 Referencias

1. Greenfield RA. Symposium on antimicrobial therapy. VII. The fluoroquinolones. *J Okla State Med Assoc.* 1993;86(4):166-174.
2. Organization WH, others. Contengamos la resistencia microbiana. 2000.
3. Levy SB. Antibiotic use for growth promotion in animals: ecologic and public health consequences. *J Food Prot.* 1987;50(7):616-620.
4. Dölz H. Consideraciones sobre el empleo de la quimioterapia antibacteriana en salmonicultura. *Actual Farm.* 1992;49(2):7-9.
5. Levy SB, O'Brien TF, Davey PG, et al. Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups. 2001.
6. Vidaver AK. Uses of antimicrobials in plant agriculture. *Clin Infect Dis.* 2002;34(Supplement 3):S107--S110.
7. Hayes JD, Wolf CR. Molecular mechanisms of drug resistance. *Biochem J.* 1990;272(2):281.
8. Pratt WB, tr Nuñez MJ, tr Paolini H, colab Orlandini RK, ed Ceitlin J. *Quimioterapia de La Infección.*; 1981.
9. Dölz H. La resistencia de las bacterias patógenas a los antimicrobianos, un fenómeno en avance que requiere urgente atención. *Pharmakon.* 1999;1:14-21.
10. Read RC, Morrissey I, Ambler JE. *Clinicians Manual on Respiratory Tract Infections and Fluoroquinolones.* Science Press; 2002.
11. Ball P. Quinolone generations: natural history or natural selection? *J Antimicrob Chemother.* 2000;46(suppl 3):17-24.
12. Martinez M, McDermott P, Walker R. Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. *Vet J.* 2006;172(1):10-28.
13. Zufiaurre MNG. Relación entre estructura, actividad y efectos adversos de las quinolonas. *Rev Española Quimioter.* 2004;17(3):232-243.
14. Wright DH, Brown GH, Peterson ML, Rotschafer JC. Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. *J Antimicrob Chemother.* 2000;46(5):669-683.
15. Andersson MI, MacGowan AP. Development of the quinolones. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51 Suppl 1(suppl_1):1-11. doi:10.1093/jac/dkg212.
16. Gutiérrez Zufiaurre. Revisión Relación entre estructura , actividad. 2004;17(Nº3):232-

17. Chu DT, Fernandes PB. Structure-activity relationships of the fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33(2):131.
18. Peterson LR. Quinolone molecular structure-activity relationships: what we have learned about improving antimicrobial activity. *Clin Infect Dis.* 2001;33(Supplement 3):S180--S186.
19. Domagala JM. Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials. *J Antimicrob Chemother.* 1994;33(4):685-706.
20. Stein GE. The 4-Quinolone Antibiotics: Past, Present, and Future. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther.* 1988;8(6):301-314.
21. Higgins PG, Fluit AC, Schmitz FJ. Fluoroquinolones: structure and target sites. *Curr Drug Targets.* 2003;4(2):181-190.
22. Appelbaum PC, Hunter PA. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int J Antimicrob Agents.* 2000;16(1):5-15.
23. Yoshida T, YAMAMOTO Y, ORITA H, et al. Studies on Quinolone Antibacterials. V. Synthesis and Antibacterial Activity of Chiral 5-Amino-7-(4-substituted-3-amino-1-pyrrolidinyl)-6-fluoro-1, 4-dihydro-8-methyl-4-oxoquinoline-3-carboxylic Acids and Derivatives. *Chem Pharm Bull.* 1996;44(7):1376-1386.
24. Drakopoulos AI, Ioannou PC. Spectrofluorimetric study of the acid–base equilibria and complexation behavior of the fluoroquinolone antibiotics ofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin and pefloxacin in aqueous solution. *Anal Chim Acta.* 1997;354(1-3):197-204. doi:10.1016/S0003-2670(97)00465-0.
25. Sortino S, De Guidi G, Giuffrida S, Monti S, Velardita a. pH effects on the spectroscopic and photochemical behavior of enoxacin: a steady-state and time-resolved study. *Photochem Photobiol.* 1998;67(2):167-173.
26. Bilski P, Martinez LJ, Koker EB, Chignell CF. Photosensitization by norfloxacin is a function of pH. *Photochem Photobiol.* 1996;64(3):496-500.
27. Honeyman J. Efectos de las radiaciones ultravioleta en la piel. *Rev Peru dermatolog{'\i}a.* 2002;12(2).
28. Sturini M, Speltini A, Maraschi F, et al. Photodegradation of fluoroquinolones in surface water and antimicrobial activity of the photoproducts. *Water Res.* 2012;46(17):5575-5582. doi:10.1016/j.watres.2012.07.043.

29. Albini A, Monti S. Photophysics and photochemistry of fluoroquinolones. *Chem Soc Rev.* 2003;32(4):238-250. doi:10.1039/b209220b.
30. De Guidi G, Bracchitta G, Catalfo A. Photosensitization reactions of fluoroquinolones and their biological consequences. *Photochem Photobiol.* 2011;87(6):1214-1229. doi:10.1111/j.1751-1097.2011.00978.x.
31. Domagala JM, Heifetz CL, Hutt MP, et al. 1-Substituted 7-[3-[(ethylamino) methyl]-1-pyrrolidinyl]-6, 8-difluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acids. New quantitative structure activity relationships at N1 for the quinolone antibacterials. *J Med Chem.* 1988;31(5):991-1001.
32. Cecchetti V, Fravolini A, Sabatini S, Tabarrini O, Xin T. Dibenzo [1, 6] naphthyridindiones as modified quinolone antibacterials. *Eur J Med Chem.* 1998;33(11):899-903.
33. Leyva S, Leyva E. Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. *Soc Química México.* 2008;2(1):13. [http://www.bsqm.org.mx/PDFS/V2/N1/1.SocorroLeyva\[1\]REV.pdf](http://www.bsqm.org.mx/PDFS/V2/N1/1.SocorroLeyva[1]REV.pdf).
34. Morandé SC, de Rada Lorente PD, Clemente JD, Muñoz LMR, Quetglas EG. Rotura bilateral del tendón Aquiles secundario a levofloxacin. *Rev Española Cirugía Ortopédica y Traumatol.* 2010;54(4):238-240.
35. Tokura Y. Quinolone photoallergy: photosensitivity dermatitis induced by systemic administration of photohaptenic drugs. *J Dermatol Sci.* 1998;18(1):1-10.
36. Soldevila S, Cuquerella MC, Bosca F. Understanding of the Photoallergic Properties of Fluoroquinolones: Photoreactivity of Lomefloxacin with Amino Acids and Albumin. 2014.
37. Salas M, Barrionuevo E, Fernandez TD, et al. Hypersensitivity Reactions to Fluoroquinolones. *Curr Treat Options Allergy.* 2016;3(2):129-146.
38. Monteiro AF, Rato M, Martins C. Drug-induced photosensitivity: Photoallergic and phototoxic reactions. *Clin Dermatol.* 2016;34(5):571-581.
39. Bosca F. A Photochemical Approach to Fluoroquinolones Toxicity. *Adv Mol Toxicol.* 2015;9:259.
40. Reisch J, Zappel J. Photostabilitätsuntersuchungen an Natrium-Warfarin in kristallinem Zustand. *Sci Pharm.* 1993;61:283-286.
41. Kümmerer K. *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks.* Springer

Science & Business Media; 2008.

42. Borsarelli CD, Montejano HA, Cosa JJ, Previtali CM. Medium effects on the photochemical reaction between pyrene and indole. A laser flash photolysis study. *J Photochem Photobiol A Chem.* 1995;91(1):13-19.
43. Borsarelli CD, Cosa JJ, Previtali CM. Photoinduced Charge Separation in Reverse Micelles Prepared with Benzylhexadecyldimethylammonium Chloride (BHDC). The Electron-Transfer Reaction between Pyrene and N, N-Dimethylaniline. *Photochem Photobiol.* 1998;68(4):438-446.
44. Borsarelli CD, Durantini EN, Garcia NA. Singlet molecular oxygen-mediated photooxidation of nitrophenolic compounds in water-in-oil microemulsions. A kinetic study. *J Chem Soc Perkin Trans 2.* 1996;(9):2009-2013.
45. Lam MW, Tantuco K, Mabury SA. PhotoFate: a new approach in accounting for the contribution of indirect photolysis of pesticides and pharmaceuticals in surface waters. *Environ Sci Technol.* 2003;37(5):899-907.
46. Halladja S, Amine-Khodja A, Ter Halle A, Boulkamh A, Richard C. Photolysis of fluometuron in the presence of natural water constituents. *Chemosphere.* 2007;69(10):1647-1654.
47. Chen Y, Hu C, Qu J, Yang M. Photodegradation of tetracycline and formation of reactive oxygen species in aqueous tetracycline solution under simulated sunlight irradiation. *J Photochem Photobiol A Chem.* 2008;197(1):81-87.
48. Diaz M, Luiz M, Bertolotti S, Miskoski S, Garcia NA. Scavenging of photogenerated singlet molecular oxygen and superoxide radical anion by sulpha drugs-Kinetics and mechanism. *Can J Chem.* 2004;82(12):1752-1759.
49. Knapp CW, Cardoza L a, Hawes JN, Wellington EMH, Larive CK, Graham DW. Fate and effects of enrofloxacin in aquatic systems under different light conditions. *Environ Sci Technol.* 2005;39(23):9140-9146.
50. Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment-a review-part I. *Chemosphere.* 2009;75(4):417-434.
51. Thiele-Brun S, Peters D. Photodegradation of pharmaceutical antibiotics on slurry and soil surfaces. *Landbauforsch Volkenrode.* 2007;57(1):13.
52. Belden JB, Maul JD, Lydy MJ. Partitioning and photodegradation of ciprofloxacin in aqueous systems in the presence of organic matter. *Chemosphere.* 2007;66(8):1390-1395.
53. Kainthla R, Zewail-Foote M. Oxidative DNA damage following photoexcitation of

- daunomycin: direct role of oxygen. *J Photochem Photobiol A Chem.* 2008;198(2):200-204.
54. Oehler R, Polacek N, Steiner G, Barta A. Interaction of tetracycline with RNA: photoincorporation into ribosomal RNA of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(6):1219-1224.
 55. Tonnesen HH. *Photostability of Drugs and Drug Formulations*. CRC Press; 2004.
 56. Bosca F. Seeking to shed some light on the binding of fluoroquinolones to albumins. *J Phys Chem B.* 2012;116(11):3504-3511.
 57. Park H-R, Lee H-C, Kim TH, Jin-Ki L, Yang K, Bark K-M. Spectroscopic Properties of Fluoroquinolone Antibiotics and Nanosecond Solvation Dynamics in Aerosol-OT Reverse Micelles. *Photochem Photobiol.* 2000;71(3):281. doi:10.1562/0031-8655(2000)071<0281:SPOFAA>2.0.CO;2.
 58. Gould RG, Jacobs WA. The Synthesis of Certain Substituted Quinolines and 5,6-Benzoquinolines. *J Am Chem Soc.* 1939;61(10):2890-2895. doi:10.1021/ja01265a088.
 59. Price CC, Roberts RM. The Synthesis of 4-Hydroxyquinolines. 1 I. Through Ethoxymethylenemalonic Ester. *J Am Chem Soc.* 1946;68(7):1204-1208. doi:10.1021/ja01211a020.
 60. Leyva E, Monreal E, Hernández A. Synthesis of fluoro-4-hydroxyquinoline-3-carboxylic acids by the Gould–Jacobs reaction. *J Fluor Chem.* 1999;94(1):7-10. doi:10.1016/S0022-1139(98)00310-8.
 61. Fasani E, Mella M, Monti S, Albini A. Unexpected Photoreactions of Some 7-Amino-6-fluoroquinolones in Phosphate Buffer. *European J Org Chem.* 2001;2001(2):391-397. doi:10.1002/1099-0690(200101)2001:2<391::AID-EJOC391>3.0.CO;2-R.
 62. Cuquerella MC, Miranda MA, Bosca F. Role of excited state intramolecular charge transfer in the photophysical properties of norfloxacin and its derivatives. *J Phys Chem A.* 2006;110(8):2607-2612. doi:10.1021/jp0559837.
 63. Lorenzo F, Navaratnam S, Edge R, Allen NS. Primary photoprocesses in a fluoroquinolone antibiotic sarafloxacin. *Photochem Photobiol.* 2009;85(4):886-894. doi:10.1111/j.1751-1097.2009.00553.x.
 64. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3 rd ed. Springer; 2006.
 65. Monti S, Sortino S, Fasani E, Albini a. Multifaceted photoreactivity of 6-fluoro-7-aminoquinolones from the lowest excited states in aqueous media: a study by nanosecond and picosecond spectroscopic techniques. *Chemistry.* 2001;7(10):2185-2196.

66. Jollès P, Jollès J. What's new in lysozyme research? *Mol Cell Biochem.* 1984;63:165-189. doi:10.1007/BF00285225.
67. Gu Z, Zhu X, Ni S, Su Z, Zhou HM. Conformational changes of lysozyme refolding intermediates and implications for aggregation and renaturation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(5):795-805. doi:10.1016/j.biocel.2003.08.015.
68. Yamashita S, Nishimoto E, Yamasaki N. The Steady State and Time-resolved Fluorescence Studies on the Lysozyme-Ligand Interaction. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1995;59(7):1255-1261. doi:10.1271/bbb.59.1255.
69. Cowgill RW. Fluorescence and Protein Structure XI. Fluorescence Quenching by Disulfide and Sulfhydryl Groups. *Biochim Biophys Acta.* 1967;140:37-44. doi:10.1016/0005-2795(67)90379-0.
70. Imoto T, Forster LS, Rupley J a, Tanaka F. Fluorescence of lysozyme: emissions from tryptophan residues 62 and 108 and energy migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972;69(5):1151-1155. doi:10.1073/pnas.69.5.1151.
71. Ruso JM, Attwood D, Garc'ia M, Taboada P, Varela LM, Mosquera V. A study of the interaction of the amphiphilic penicillins cloxacillin and dicloxacillin with human serum albumin in aqueous solution. *Langmuir.* 2001;17(17):5189-5195.
72. Yuan H, Pawliszyn J. Application of solid-phase microextraction in the determination of diazepam binding to human serum albumin. *Anal Chem.* 2001;73(18):4410-4416.
73. Xiao X, Min J-L, Lin W-Z, Liu Z, Cheng X, Chou K-C. iDrug-Target: predicting the interactions between drug compounds and target proteins in cellular networking via benchmark dataset optimization approach. *J Biomol Struct Dyn.* 2015;33(10):2221-2233.
74. Tran TT, Panesso D, Mishra NN, et al. Daptomycin-resistant *Enterococcus faecalis* diverts the antibiotic molecule from the division septum and remodels cell membrane phospholipids. *MBio.* 2013;4(4):e00281--13.
75. Bi S, Pang B, Wang T, Zhao T, Yu W. Investigation on the interactions of clenbuterol to bovine serum albumin and lysozyme by molecular fluorescence technique. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2014;120:456-461.
76. ROSS D, RILEY C. Aqueous solubilities of some variously substituted quinolone antimicrobials. *Int J Pharm.* 1990;63(3):237-250. doi:10.1016/0378-5173(90)90130-V.
77. Sortinol S, Marconil G, Giuff S, et al. Photophysical Properties of Rufloxacin in Neutral Aqueous Solution. 1999;70(5):731-736.
78. Rawel HM, Frey SK, Meidtner K, Kroll J, Schweigert FJ. Determining the binding

- affinities of phenolic compounds to proteins by quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence. *Mol Nutr Food Res*. 2006;50(8):705-713. doi:10.1002/mnfr.200600013.
79. Rawel HM, Meidtner K, Kroll J. Binding of selected phenolic compounds to proteins. *J Agric Food Chem*. 2005;53(10):4228-4235. doi:10.1021/jf0480290.
 80. Ross PD, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*. 1981;20:3096-3102. doi:10.1021/bi00514a017.
 81. Kopka ML, Yoon C, Goodsell D, Pjura P, Dickerson RE. The molecular origin of DNA-drug specificity in netropsin and distamycin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(5):1376-1380. doi:10.1073/pnas.82.5.1376.
 82. Liu X, Shang Y, Ren X, Li H. Molecular Modeling and Spectroscopic Studies on the Interaction of Transresveratrol with Bovine Serum Albumin. 2013;2013. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotochem.2006.02.004.
 83. Mella M, Fasani E, Albini A. Photochemistry of 1-Cyclopropyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-7- (piperazin-1-yl) quinoline-3-carboxylic Acid (^ Ciprofloxacin) in Aqueous Solutions. 2001;84:2508-2519.
 84. Wilkinson F, McGarvey DJ, Olea a. F. Excited Triplet State Interactions with Molecular Oxygen: Influence of Charge Transfer on the Bimolecular Quenching Rate Constants and the Yields of Singlet Oxygen (O₂¹Ag) for Substituted Naphthalenes in Various Solvents. *J Phys Chem*. 1994;98:3762-3769.
 85. Umezawa N, Arakane K, Ryu A, Mashiko S, Hirobe M, Nagano T. Participation of reactive oxygen species in phototoxicity induced by quinolone antibacterial agents. *Arch Biochem Biophys*. 1997;342(2):275-281. doi:10.1006/abbi.1997.0124.
 86. Martínez LJ, Sik RH, Chignell CF. Fluoroquinolone antimicrobials: singlet oxygen, superoxide and phototoxicity. *Photochem Photobiol*. 1998;67(4):399-403. doi:10.1111/j.1751-1097.1998.tb05217.x.
 87. Bourdelande JL, Nonell S, Verhoeven JW. *Glosario de Términos Usados En Fotoquímica Used in Photochemistry*.; 1999.
 88. FOOT CS. Definition of Type I and Type II. 1991;54(5):865-191. doi:10.1111/j.1751-1097.1991.tb02071.x.
 89. Blelski BHJ. Nitro Blue Tetrazolium by. 1980:830-833. doi:10.1021/j100445a006.
 90. Moore DE, Wang J. Electron-transfer mechanisms in photosensitization by the anti-inflammatory drug benzydamine. 2006;4.

91. Lu CY, Wang WF, Lin WZ, Han ZH, Yao S De, Lin NY. Generation and photosensitization properties of the oxidized radical of riboflavin: A laser flash photolysis study. *J Photochem Photobiol B Biol.* 1999;52(1-3):111-116. doi:10.1016/S1011-1344(99)00111-6.
92. Yamasaki H, Uefuji H, Sakihama Y. Bleaching of the red anthocyanin induced by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys.* 1996;332(1):183-186. doi:10.1006/abbi.1996.0331.
93. Krishna CM, Uppuluri S, Riesz P, Zigler JS, Balasubramanian D. A study of the photodynamic efficiencies of some eye lens constituents. *Photochem Photobiol.* 1991;54(1):51-58. doi:10.1111/j.1751-1097.1991.tb01984.x.
94. Martinez LJ, Li G, Chignell CF. Photogeneration of Fluoride by the Fluoroquinolone Antimicrobial Agents Lomefloxacin and Fleroxacin. *Photochem Photobiol.* 1997;65(3):599-602. doi:10.1111/j.1751-1097.1997.tb08612.x.
95. Niki E. Action of ascorbic acid as a scavenger and stable oxygen radicals. *Am J Clin Nutr.* 1991;54:1119S-1124S.
96. Fasani E, Profumo a, Albini a. Structure and medium-dependent photodecomposition of fluoroquinolone antibiotics. *Photochem Photobiol.* 1998;68(5):666-674.
97. Fasani E, Negra FFB, Mella M, Monti S, Albini A. Photoinduced C - F Bond Cleavage in Some Fluorinated 7-Amino-4-quinolone-3-carboxylic Acids. 1999;(12):5388-5395.
98. Valeur B, Berberan-Santos MN. *Molecular Fluorescence*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2012. doi:10.1002/9783527650002.
99. Neugebauer U, Szeghalmi A, Schmitt M, Kiefer W, Popp J, Holzgrabe U. Vibrational spectroscopic characterization of fluoroquinolones. 2005;61:1505-1517. doi:10.1016/j.saa.2004.11.014.
100. Sahoo S, Chakraborti C, Behera P, Mishra S. FTIR and Raman Spectroscopic Investigations of a Norfloxacin/Carbopol934 Polymeric Suspension. *J Young Pharm.* 2012;4(3):138-145. doi:10.4103/0975-1483.100017.
101. Yang Y, Gao H. Theoretical structure and vibrational spectra of ciprofloxacin: Density functional theory study. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2013;102:134-141. doi:10.1016/j.saa.2012.10.029.
102. Gunasekaran S, Anita B. Spectral investigation and normal coordinate analysis of piperazine. 2008.
103. Martin S, Shchukarev A, Hanna K, Boily JF. Kinetics and Mechanisms of

- Ciprofloxacin Oxidation on Hematite Surfaces. *Environ Sci Technol*. 2015;49(20):12197-12205. doi:10.1021/acs.est.5b02851.
104. Zhang X, Li R, Jia M, Wang S, Huang Y, Chen C. Degradation of ciprofloxacin in aqueous bismuth oxybromide (BiOBr) suspensions under visible light irradiation: A direct hole oxidation pathway. *Chem Eng J*. 2015;274:290-297. doi:10.1016/j.cej.2015.03.077.
 105. Wiberley SE, Colthup NB, Daly LH. Introduction to infrared and Raman Spectroscopy. ed NB Colthup LH Daly, Acad Press Inc, San Diego. 1990.
 106. An T, Yang H, Li G, Song W, Cooper WJ, Nie X. Kinetics and mechanism of advanced oxidation processes (AOPs) in degradation of ciprofloxacin in water. *Appl Catal B Environ*. 2010;94(3-4):288-294. doi:10.1016/j.apcatb.2009.12.002.
 107. De Gruijl FR. Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2002;15(5):316-320. doi:10.1159/000064535.
 108. Kielbassa C. Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis*. 1997;18(4):811-816. doi:10.1093/carcin/18.4.811.
 109. Cadet J, Sage E, Douki T. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*. 2005;571(1-2 SPEC. ISS.):3-17. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.09.012.
 110. Mäkinen M, Forbes PD, Stenbäck F. Quinolone antibacterials: A new class of photochemical carcinogens. *J Photochem Photobiol B Biol*. 1997;37(3):182-187. doi:10.1016/S1011-1344(96)07425-8.
 111. Klecak G, Urbach F, Urwyler H. Fluoroquinolone antibacterials enhance UVA-induced skin tumors. *J Photochem Photobiol B Biol*. 1997;37(3):174-181. doi:10.1016/S1011-1344(96)07424-6.
 112. Lhiaubet-Vallet V, Bosca F, Miranda MA. Photosensitized DNA damage: The case of fluoroquinolones. *Photochem Photobiol*. 2009;85(4):861-868. doi:10.1111/j.1751-1097.2009.00548.x.
 113. Beechem JM, Brand L. Time-Resolved Fluorescence of Proteins. *Annu Rev Biochem*. 1985;54(1):43-71. doi:10.1146/annurev.bi.54.070185.000355.
 114. Kronman MJ, Holmes LG. the Fluorescence of Native, Denatured and Reduced-Denatured Proteins. *Photochem Photobiol*. 1971;14(2):113-134. doi:10.1111/j.1751-1097.1971.tb06157.x.
 115. Barth A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1767(9):1073-

1101. doi:10.1016/j.bbabbio.2007.06.004.

116. KONG J, YU S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2007;39(8):549-559. doi:10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x.
117. Mallamace D, Corsaro C, Vasi C, Vasi S, Dugo G, Mallamace F. The protein irreversible denaturation studied by means of the bending vibrational mode. *Phys A Stat Mech its Appl*. 2014;412:39-44. doi:10.1016/j.physa.2014.06.007.
118. Arrondo J, Goñi F. Structure and dynamics of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy. *Prog Biophys Mol Biol*. 1999;72:367-405. http://rojo.ibmc.umh.es/docencia/doctorado_IR/review.infrared_1.pdf <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079610799000073>.
119. Vaney MC, Maignan S, Riès-Kautt M, Ducruix A. High-Resolution Structure (1.33 Å) of a HEW Lysozyme Tetragonal Crystal Grown in the APCF Apparatus. Data and Structural Comparison with a Crystal Grown under Microgravity from SpaceHab-01 Mission. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 1996;52(3):505-517. doi:10.1107/S090744499501674X.
120. Byler DM, Susi H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers*. 1986;25(3):469-487. doi:10.1002/bip.360250307.
121. Pérez C, Griebenow K. Fourier-transform infrared spectroscopic investigation of the thermal denaturation of hen egg-white lysozyme dissolved in aqueous buffer and glycerol. *Biotechnol Lett*. 2000;22(23):1899-1905. doi:10.1023/A:1005645810247.
122. Knubovets T, Osterhout JJ, Connolly PJ, Klibanov a M. Structure, thermostability, and conformational flexibility of hen egg-white lysozyme dissolved in glycerol. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(4):1262-1267. doi:10.1073/pnas.96.4.1262.
123. Qin P, Su B, Liu R. Probing the binding of two fluoroquinolones to lysozyme: a combined spectroscopic and docking study. *Mol Biosyst*. 2012;8(4):1222. doi:10.1039/c2mb05423j.
124. Silva B, Einarsdóttir Ó, Fink A, Uversky V. Biophysical Characterization of α -Synuclein and Rotenone Interaction. *Biomolecules*. 2013;3(3):703-732. doi:10.3390/biom3030703.
125. Hooper DC. Mechanisms of Action of Antimicrobials: Focus on Fluoroquinolones. *Clin Infect Dis*. 2001;32(Supplement 1):S9-S15. doi:10.1086/319370.
126. Hooper DC. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist Updat*.

- 1999;2(1):38-55. doi:10.1054/drup.1998.0068.
127. Levine C, Hiasa H, Marians KJ. DNA gyrase and topoisomerase IV: Biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr.* 1998;1400(1-3):29-43. doi:10.1016/S0167-4781(98)00126-2.
 128. Drlica K. Mechanism of fluoroquinolone action. *Curr Opin Microbiol.* 1999;2(5):504-508. doi:10.1016/S1369-5274(99)00008-9.
 129. Khodursky AB, Cozzarelli NR. The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *J Biol Chem.* 1998;273(42):27668-27677. doi:10.1074/jbc.273.42.27668.
 130. Fresta M, Guccione S, Beccari AR, Furneri PM, Puglisi G. Combining molecular modeling with experimental methodologies: Mechanism of membrane permeation and accumulation of ofloxacin. *Bioorganic Med Chem.* 2002;10(12):3871-3889. doi:10.1016/S0968-0896(02)00350-4.
 131. Nikaido H, Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev.* 1985;49(1):1.
 132. Guillem P. *Microbiología Clínica.* 2005:1-363.
 133. Andrews JM, Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48 Suppl 1:5-16. doi:10.1093/jac/48.suppl_1.5.
 134. Bera A, Herbert S, Jakob A, Vollmer W, Götz F. Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol.* 2005;55(3):778-787. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04446.x.
 135. Bera A, Biswas R, Herbert S, et al. Influence of wall teichoic acid on lysozyme resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2007;189(1):280-283. doi:10.1128/JB.01221-06.
 136. Schnaitman CA. Effect of Ethylenediaminetetraacetic Acid, Triton X-100, and Lysozyme on Morphology and Chemical Composition of Isolated Cell Walls of *Escherichia-Coli*. *J Bacteriol.* 1971;108(1):553-.
 137. Salman H, Ibrahimi S, Ibrahimi I. Lysozyme Turnover during the Development of Chicken Oocyte. *Jordan J Biol Sci.* 2012;5(1):55-64.
 138. Sepulveda L, Lissi E, Quina F. Interactions of neutral molecules with ionic micelles. *Adv Colloid Interface Sci.* 1986;25:1-57.

139. Kitahara A. Solubilization and catalysis in reversed micelles. *Adv Colloid Interface Sci.* 1980;12(2):109-140.
140. De TK, Maitra A. Solution behaviour of Aerosol OT in non-polar solvents. *Adv Colloid Interface Sci.* 1995;59:95-193.
141. Onori G, Santucci A. IR investigations of water structure in Aerosol OT reverse micellar aggregates. *J Phys Chem.* 1993;97(20):5430-5434.
142. Zhou N, Li Q, Wu J, Chen J, Weng S, Xu G. Spectroscopic characterization of solubilized water in reversed micelles and microemulsions: sodium bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate and sodium bis (2-ethylhexyl) phosphate in n-heptane. *Langmuir.* 2001;17(15):4505-4509.
143. Hauser H, Haering G, Pande A, Luisi PL. Interaction of water with sodium bis (2-ethyl-1-hexyl) sulfosuccinate in reversed micelles. *J Phys Chem.* 1989;93(23):7869-7876.
144. Biswas S, Bhattacharya SC, Bhowmik BB, Moulik SP. Absorption and emission characteristics of 7-hydroxycoumarin and 1-hydroxypyrene-3, 6, 8-trisulfonate in water/oil microemulsion with reference to the determination of the interfacial and bulk pH of the water pool. *J Colloid Interface Sci.* 2001;244(1):145-153.
145. Bumajdad A, Eastoe J, Griffiths P, et al. Interfacial compositions and phase structures in mixed surfactant microemulsions. *Langmuir.* 1999;15(16):5271-5278.
146. Pitarresi G, Sbriziolo C, Liveri MLT, Liveri VT. Calorimetric study of the solubilization of ethylenediamine, N, N-dimethylaminoethylamine and N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine by reversed AOT micelles. *J Solution Chem.* 1993;22(3):279-287.
147. Hait SK, Sanyal A, Moulik SP. Physicochemical studies on microemulsions. 8. The effects of aromatic methoxy hydrotropes on droplet clustering and understanding of the dynamics of conductance percolation in water/oil microemulsion systems. *J Phys Chem B.* 2002;106(48):12642-12650.
148. Testard F, Zemb T. Solute effect on connectivity of water-in-oil microemulsions. *Langmuir.* 2000;16(2):332-339.
149. Li Q, Weng S, Wu J, Zhou N. Comparative study on structure of solubilized water in reversed micelles. 1. FT-IR spectroscopic evidence of water/AOT/n-heptane and water/NaDEHP/n-heptane systems. *J Phys Chem B.* 1998;102(17):3168-3174.
150. Jain TK, Varshney M, Maitra A. Structural studies of aerosol OT reverse micellar aggregates by FT-IR spectroscopy. *J Phys Chem.* 1989;93(21):7409-7416.

151. Niemeyer ED, Bright F V. The pH within PFPE Reverse Micelles Formed in Supercritical CO₂. *J Phys Chem B*. 1998;102(8):1474-1478. doi:10.1021/jp973157v.
152. Borsarelli CD, Bertolotti SG, Previtali CM. Exciplex-type Behavior and Partition of 3-Substituted Indole Derivatives in Reverse Micelles Made with Benzylhexadecyldimethylammonium Chloride, Water and Benzene. *Photochem Photobiol*. 2007;73(2):97-104. doi:10.1562/0031-8655(2001)0730097ETBAPO2.0.CO2.
153. Ferreira S, Gratton E. Hydration and protein substates: Fluorescence of proteins in reverse micelles. *J Mol Liq*. 1990;45(3-4):253-272. doi:10.1016/0167-7322(90)80034-H.
154. Marzola P, Gratton E. Hydration and protein dynamics: frequency domain fluorescence spectroscopy of proteins in reverse micelles. *J Phys Chem*. 1991;95(23):9488-9495. doi:10.1021/j100176a083.
155. Golet EM, Alder AC, Hartmann A, Ternes TA, Giger W. Trace Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Urban Wastewater by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Anal Chem*. 2001;73(15):3632-3638. doi:10.1021/ac0015265.
156. Schmitt-Kopplin P, Burhenne J, Freitag D, Spiteller M, Kettrup A. Development of capillary electrophoresis methods for the analysis of fluoroquinolones and application to the study of the influence of humic substances on their photodegradation in aqueous phase. *J Chromatogr A*. 1999;837(1-2):253-265. doi:10.1016/S0021-9673(99)00079-5.
157. Renew JE, Huang C-H. Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2004;1042(1-2):113-121. doi:10.1016/j.chroma.2004.05.056.
158. Holten Lützhøft H-C, Vaes WHJ, Freidig AP, Halling-Sørensen B, Hermens JLM. Influence of pH and Other Modifying Factors on the Distribution Behavior of 4-Quinolones to Solid Phases and Humic Acids Studied by “Negligible-Depletion” SPME–HPLC. *Environ Sci Technol*. 2000;34(23):4989-4994. doi:10.1021/es000917y.
159. MacCarthy P. The principles of humic substances: An introduction to the first principle. *Spec Publ Soc Chem*. 2001;273:19-30.
160. Thurman EM. *Organic Geochemistry of Natural Waters*. Vol 2. Springer Science & Business Media; 2012.
161. Senesi N, Loffredo E. The chemistry of soil organic matter. *Soil Phys Chem*. 1999;2:239-370.

162. Zepp RG, Baughman GL, Schlotzhauer PF. Comparison of photochemical behavior of various humic substances in water: I. Sunlight induced reactions of aquatic pollutants photosensitized by humic substances. *Chemosphere*. 1981;10(1):109-117. doi:10.1016/0045-6535(81)90174-0.
163. Zepp RG, Schlotzhauer PF, Sink RM. Photosensitized transformations involving electronic energy transfer in natural waters: role of humic substances. *Environ Sci Technol*. 1985;19(1):74-81. doi:10.1021/es00131a008.
164. Wolff CJM, Halmans MTH, van der Heijde HB. The formation of singlet oxygen in surface waters. *Chemosphere*. 1981;10(1):59-62. doi:10.1016/0045-6535(81)90159-4.
165. MILL T, HENDRY DG, RICHARDSON H. Free-Radical Oxidants in Natural Waters. *Science (80-)*. 1980;207(4433):886-887. doi:10.1126/science.207.4433.886.
166. Draper WM, Crosby DG. Solar photooxidation of pesticides in dilute hydrogen peroxide. *J Agric Food Chem*. 1984;32(2):231-237. doi:10.1021/jf00122a014.
167. Haag WR, Hoigné J. Photo-sensitized oxidation in natural water via .OH radicals. *Chemosphere*. 1985;14(11-12):1659-1671. doi:10.1016/0045-6535(85)90107-9.
168. COOPER WJ, ZIKA RG. Photochemical Formation of Hydrogen Peroxide in Surface and Ground Waters Exposed to Sunlight. *Science (80-)*. 1983;220(4598):711-712. doi:10.1126/science.220.4598.711.
169. Draper WM, Crosby DG. The photochemical generation of hydrogen peroxide in natural waters. *Arch Environ Contam Toxicol*. 1983;12(1):121-126. doi:10.1007/BF01055010.
170. Fischer AM, Kliger DS, Winterle JS, Mill T. Direct observation of phototransients in natural waters. *Chemosphere*. 1985;14(9):1299-1306. doi:10.1016/0045-6535(85)90150-X.
171. Zepp RG, Braun AM, Hoigne J, Leenheer JA. Photoproduction of hydrated electrons from natural organic solutes in aquatic environments. *Environ Sci Technol*. 1987;21(5):485-490. doi:10.1021/es00159a010.
172. Kerle EA, Jenkins JJ, Vogue PA. Understanding pesticide persistence and mobility for groundwater and surface water protection. Report EM 8561, Oregon State University Extension Service. 1996.
173. Aleksandrova ON, Kholodov VA, Perminova I V. Using spin labels to study molecular processes in soils: Covalent binding of aromatic amines to humic acids of soils. *Russ J Phys Chem A*. 2015;89(8):1407-1413.

174. Morales J, Manso JA, Cid A, Mejuto JC. Stability study of Iprodione in alkaline media in the presence of humic acids. *Chemosphere*. 2013;92(11):1536-1541. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.04.020.
175. Ward C. Relating the Chemical Composition of Dissolved Organic Matter Draining Permafrost Soils to its Photochemical Degradation in Arctic Surface Waters. In: *2015 AGU Fall Meeting*. ; 2015.
176. Kemker C. Dissolved Oxygen. Fundamentals of Environmental Measurements. <http://www.fondriest.com/environmental-measurements/parameters/water-quality/dissolved-oxygen/>. Accessed May 4, 2016.
177. Zepp RG. Photochemical fate of agrochemicals in natural waters. 1991.
178. Hirahara Y, Ueno H, Nakamuro K. Aqueous photodegradation of fenthion by ultraviolet B irradiation: contribution of singlet oxygen in photodegradation and photochemical hydrolysis. *Water Res*. 2003;37(2):468-476.
179. Paciolla MD, Kolla S, Jansen SA. The reduction of dissolved iron species by humic acid and subsequent production of reactive oxygen species. *Adv Environ Res*. 2002;7(1):169-178.
180. Domeizel M, Khalil A, Prudent P. UV spectroscopy: a tool for monitoring humification and for proposing an index of the maturity of compost. *Bioresour Technol*. 2004;94(2):177-184. doi:10.1016/j.biortech.2003.11.026.
181. Korshin G V, Li C, Benjamin MM. Monitoring the properties of natural organic matter through UV spectroscopy: A consistent theory. *Water Res*. 1997;31(7):1787-1795. doi:10.1016/S0043-1354(97)00006-7.
182. Morán Vieyra FE, Palazzi VI, Sanchez de Pinto MI, Borsarelli CD. Combined UV–Vis absorbance and fluorescence properties of extracted humic substances-like for characterization of composting evolution of domestic solid wastes. *Geoderma*. 2009;151(3-4):61-67. doi:10.1016/j.geoderma.2009.03.006.
183. Senesi N, Miano TM, Provenzano MR, Brunetti G. Spectroscopic and compositional comparative characterization of I.H.S.S. reference and standard fulvic and humic acids of various origin. *Sci Total Environ*. 1989;81-82(1):143-156. doi:10.1016/0048-9697(89)90120-4.
184. Mignone RA, Martin M V., Morán Vieyra FE, et al. Modulation of Optical Properties of Dissolved Humic Substances by their Molecular Complexity†. *Photochem Photobiol*. 2012;88(4):792-800. doi:10.1111/j.1751-1097.2012.01135.x.

185. Senesi N, Miano TM, Provenzano MR, BRUNETTI G. Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Sci.* 1991;152(4):259-271.
186. Chen J, LeBoeuf EJ, Dai S, Gu B. Fluorescence spectroscopic studies of natural organic matter fractions. *Chemosphere.* 2003;50(5):639-647. doi:10.1016/S0045-6535(02)00616-1.
187. Mobed JJ, Hemmingsen SL, Autry JL, McGown LB. Fluorescence Characterization of IHSS Humic Substances: Total Luminescence Spectra with Absorbance Correction. *Environ Sci Technol.* 1996;30(10):3061-3065. doi:10.1021/es960132l.
188. Antunes MCG, Esteves da Silva JCG. Multivariate curve resolution analysis excitation-emission matrices of fluorescence of humic substances. *Anal Chim Acta.* 2005;546(1):52-59. doi:10.1016/j.aca.2005.05.003.
189. Antunes MCG, Pereira CCC, Esteves da Silva JCG. MCR of the quenching of the EEM of fluorescence of dissolved organic matter by metal ions. *Anal Chim Acta.* 2007;595(1-2):9-18. doi:10.1016/j.aca.2006.12.017.
190. Hunt JF, Ohno T. Characterization of Fresh and Decomposed Dissolved Organic Matter Using Excitation–Emission Matrix Fluorescence Spectroscopy and Multiway Analysis. *J Agric Food Chem.* 2007;55(6):2121-2128. doi:10.1021/jf063336m.
191. Baghoth SA, Dignum M, Grefte A, Kroesbergen J, Amy GL. Characterization of NOM in a drinking water treatment process train with no disinfectant residual. *Water Sci Technol Water Supply.* 2009;9(4):379-386.
192. Grossweiner LI. A note on the analysis of ligand binding by the “double-logarithmic” plot. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2000;58(2-3):175-177. doi:10.1016/S1011-1344(00)00113-5.
193. Kinniburgh DG, van Riemsdijk WH, Koopal LK, Borkovec M, Benedetti MF, Avena MJ. Ion binding to natural organic matter: competition, heterogeneity, stoichiometry and thermodynamic consistency. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 1999;151(1-2):147-166. doi:10.1016/S0927-7757(98)00637-2.
194. Goutelle S, Maurin M, Rougier F, et al. The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fundam Clin Pharmacol.* 2008;22(6):633-648. doi:10.1111/j.1472-8206.2008.00633.x.
195. Murov SL, Carmichael I, Hug GL. *Handbook of Photochemistry.* CRC Press; 1993.
196. Douglas A. Skoog, Donald M. West FJ, Crouch H y SR. *Fundamentos de Química*

Analitica. Novena edi. Cengage Learning; 2014.

197. Kaviraki LE. Protein-ligand docking, including flexible receptor-flexible ligand docking. *Connexions Web site*. 2007.
198. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*. 2009;30(16):2785-2791.
199. Hohenberg P, Kohn W. Inhomogeneous electron gas. *Phys Rev*. 1964;136(3B):B864.
200. Kohn W, Sham LJ. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. *Phys Rev*. 1965;140(4A):A1133.
201. Parr RG. *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*. Springer; 1980.
202. Salahub DR, Zerner MC, others. Challenge of d and f electrons. In: *Chemical Congress of North America 1988: Toronto, Ont.*; 1989.
203. Tomasi J, Mennucci B, Cammi R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem Rev*. 2005;105(8):2999-3094.