



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Industrial

Reactividad fotoquímica de capmatinib en disolución y en
proteínas transportadoras

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ingeniería Química

AUTOR/A: Tarín Moratalla, Christian

Tutor/a: Vayá Pérez, Ignacio

Cotutor/a: Andreu Ros, María Inmaculada

CURSO ACADÉMICO: 2024/2025

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutor Nacho Vayá por todo el esfuerzo que ha dedicado en la correcta realización de este trabajo. Desde el primer momento me brindó su ayuda y apoyo, me dio la oportunidad de realizar mi Trabajo de Fin de Grado con él, y de poder ampliar mis conocimientos más allá de lo aprendido en el Grado. Me ha enseñado lo que es ser un gran profesional, un gran investigador, y una grandísima persona. De nuevo, muchísimas gracias por todo. En cuanto a mi cotutora Inma Andreu, pese a no haber coincidido con ella tanto como con mi tutor, también estuvo siempre dispuesta a ayudarme en todo lo que fuese necesario.

No me pueden faltar todas las personas que he conocido en la carrera, sin las cuales probablemente yo no estaría aquí. A Paty, a Cruzadín, a Lolo, a Pepón, a Nuri, a Tuki, a Luis, a Sergi, a Sarita, a María, a Paula y a Joan. Juntos hemos formado un círculo precioso, que espero no se separe nunca.

También a mi padre, por aguantarme en épocas de exámenes, a Isabel, lo mismo; que no ha sido nada fácil lidiar conmigo. Muchas gracias por estar siempre ahí, y ser los pilares de mi vida. A mi hermanita, que es lo que más quiero en este mundo, mi más grande apoyo e impulso para sacar todo y no rendirme pese a las dificultades.

Por último, y lo más importante, quiero dedicarle a mi yaya unas palabras. Para ti, abuela, que siempre has confiado en tu nieto, y que has hecho de él la persona que es hoy en día. Ojalá te hubieses quedado una semana más con nosotros, y te habría podido por fin contar que ya he terminado lo que empecé gracias a ti y al yayo. Haré todo lo que esté en mi mano para que te sientas siempre orgullosa, aunque seguro que ya lo estás. Ahora te reunirás con tu marido, y sé que juntos me seguiréis guiando como habéis hecho siempre. Te quiero.

RESUMEN

En este Trabajo de Fin de Grado se ha estudiado la fotorreactividad del fármaco capmatinib (CAP), un inhibidor de la tirosina quinasa (TKIs) utilizado para tratar el cáncer de pulmón, en distintos medios. La motivación principal se debe a que las propiedades fotofísicas de los TKIs está relacionada con el daño fotobiológico que pueden generar tras absorber luz, por lo que conocer su reactividad fotoquímica y los procesos fotoinducidos que puedan ocurrir por la interacción con luz es importante desde un punto de vista médico, ya que pueden ayudar a minimizar los daños que estos puedan provocar a pacientes oncológicos tratados con TKIs.

Se han caracterizado las especies transitorias generadas tras irradiar CAP con luz ultravioleta mediante el uso de técnicas espectroscópicas tales como absorción transitoria y fluorescencia, tanto en estado estacionario como en resolución temporal. La fotorreactividad de este fármaco se ha estudiado en medio orgánico y biológico, principalmente en presencia de proteínas transportadoras (albúminas séricas y α -glicoproteínas). Se ha observado que CAP es fotoquímicamente estable cuando es irradiado a 350 nm tanto en medio orgánico como en presencia de proteínas. Además, se ha caracterizado el estado excitado singlete de CAP ($^1\text{CAP}^*$), y se ha detectado que sus propiedades fotofísicas varían en función del microambiente en el que se encuentra. En este sentido, se han observado diferencias significativas en la desactivación de $^1\text{CAP}^*$ en función de la proteína estudiada, siendo en HAG donde se ha detectado menor emisión, lo cual podría tener implicaciones a nivel biológico. No se ha detectado la formación del estado excitado triplete ($^3\text{CAP}^*$), por lo que las posibles consecuencias fotobiológicas que dicho fármaco pudiera generar derivarían de $^1\text{CAP}^*$. Finalmente, se ha estudiado la fuerza de unión con proteínas, siendo mayor en HSA.

Palabras Clave: capmatinib, fluorescencia, fotólisis de destello láser, fotosensibilización, proteínas transportadoras.

RESUM

En este Treball de Fi de Grau s'ha estudiat la fotorreactivitat del fàrmac capmatinib (CAP), un inhibidor de la tirosina cinasa (TKIs) utilitzat per a tractar el càncer de pulmó, en diferents mitjans. La motivació principal es deu al fet que les propietats fotofísiques dels TKIs està relacionada amb el mal fotobiològic que poden generar després d'absorbir llum, per el que conèixer la seua reactivitat fotoquímica i els processos fotoinduits que puguen ocórrer per la interacció amb llum és important des d'un punt de vista mèdic, ja poden ajudar a minimitzar els danys que estos puguen provocar a pacients oncològics tractats amb TKIs.

S'han caracteritzat les espècies transitòries generades després d'irradiar CAP amb llum ultraviolada mitjançant l'ús de tècniques espectroscòpiques com ara absorció transitòria i fluorescència, tant en estat estacionari com en resolució temporal. La fotorreactivitat d'este fàrmac s'ha estudiat al mig orgànic i biològic, principalment en presència de proteïnes transportadores (albúmines sèriques i α -glicoproteïnes). S'ha observat que CAP és fotoquímicament estable quan és irradiat a 350 nm tant al mig orgànic com en presència de proteïnes. A més, s'ha caracteritzat l'estat excitat singulet de CAP ($^1\text{CAP}^*$), i s'ha detectat que les seues propietats fotofísiques varien en funció del microambient en el qual es troba. En este sentit, s'han observat diferències significatives en la desactivació de $^1\text{CAP}^*$ en funció de la proteïna estudiada, sent en HAG on s'ha detectat menor emissió, la qual cosa podria tindre implicacions a nivell biològic. No s'ha detectat la formació de l'estat excitat triplet ($^3\text{CAP}^*$), per la qual cosa les possibles conseqüències fotobiològiques que este fàrmac poguera generar derivarien de $^1\text{CAP}^*$. Finalment, s'ha estudiat la força d'unió amb proteïnes, sent major en HSA.

Paraules clau: capmatinib, fotosensibilització, fluorescència, fotólisis de centelleig làser, proteïnes transportadores.

ABSTRACT

In this Final Degree Project the photoreactivity of the drug capmatinib (CAP), a tyrosine kinase inhibitor (TKIs) used to treat lung cancer, has been studied in different media. The main motivation is due to the fact that the photophysical properties of TKIs are related to the photobiological damage they can generate after absorbing light, so knowing their photochemical reactivity and the photoinduced processes that may arise due to interaction with light is important from a medical point of view, since they can help to minimize the damage they can generate to oncological patients treated with TKIs.

The transient species generated after irradiation of CAP with UV light have been characterized by means of spectroscopic techniques such as transient absorption and fluorescence, both in the steady-state and time-resolved modes. The photoreactivity of this drug has been studied in organic and biological media, mainly in the presence of transport proteins (serum albumins and α -glycoproteins). It has been observed that CAP is photochemically stable when it is irradiated at 350 nm both in organic medium and in the presence of proteins. In addition, the singlet excited state of CAP ($^1\text{CAP}^*$) has been characterized, and its photophysical properties have been found to vary as a function of the microenvironment. In this context, significant differences have been observed in the deactivation of $^1\text{CAP}^*$ depending on the investigated protein, the lower emission detected in HAG, which could have implications at the biological level. The formation of the triplet excited state ($^3\text{CAP}^*$) has not been detected, so the possible photobiological consequences that this drug could generate would arise from $^1\text{CAP}^*$. Finally, the strength of binding with proteins has been studied, being the highest in HSA.

Keywords: capmatinib, fluorescence, laser flash photolysis, photoinduced processes, transport proteins.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. EL CÁNCER.....	1
1.2. TRATAMIENTOS CONTRA EL CÁNCER	2
1.3. LA TERAPIA DIRIGIDA	2
1.4. TIPOS DE INHIBIDORES DE LA TIROSINA QUINASA	4
1.5. FOTOSENSIBILIZACIÓN DE FÁRMACOS FOTOACTIVOS	5
1.6. FUNDAMENTOS FOTOFÍSICOS Y FOTOQUÍMICOS	8
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS.....	11
CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	13
3.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS ESTADOS EXCITADOS DE CAPMATINIB EN DISOLUCIÓN ORGÁNICA.....	13
3.2. ESTUDIO DE LA FOTORREACTIVIDAD DE CAPMATINIB EN MEDIO ACUOSO Y EN PROTEÍNA.....	19
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES.....	33
CAPÍTULO 5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	35
5.1. Medidas espectroscópicas	355
5.2. ANÁLISIS JOB PLOT	39
5.3. CONSTANTES DE BINDING.....	39
5.4. ESTUDIO FOTOQUÍMICO	40
CAPÍTULO 6. PRESUPUESTO.....	41
6.1. RESUMEN DEL PRESUPUESTO.....	41
6.2. PRESUPUESTO DEL ESTUDIO DEL CAPMATINIB EN DISOLUCIÓN ORGÁNICA.....	41
6.3. PRESUPUESTO DEL ESTUDIO DEL CAPMATINIB EN MEDIOS ACUOSO Y BIOLÓGICO.	45
6.4. PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL, POR CONTRATA Y BASE DE LICITACIÓN	48
CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA.....	51
CAPÍTULO 8. ABREVIATURAS.....	53

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL CÁNCER

El cáncer es un conjunto de enfermedades relacionadas entre sí, en las cuales se produce un desarrollo anormal y descontrolado de la división de las células del cuerpo, produciendo una o varias neoplasias (salvo en la leucemia o cáncer de sangre) en algún tejido del cuerpo humano. La transformación de una célula normal en una célula cancerosa implica varias mutaciones en genes clave que controlan el crecimiento y la división celular. Hoy en día, el cáncer es una de las principales causas de muerte que existen en la actualidad, afectando aproximadamente al 44% de la población mundial.¹

Existen múltiples factores de riesgo que pueden favorecer la aparición de células cancerosas, entre los cuales se incluyen principalmente los factores genéticos y aquellos relacionados con los hábitos de vida. La genética en el cáncer se refiere a la herencia de mutaciones genéticas en cuanto a la probabilidad de contraer esta enfermedad. Estas mutaciones se encuentran principalmente en los genes que regulan funciones críticas, como lo pueden ser la reparación del ADN, la apoptosis (muerte celular programada) y el control del ciclo celular. Un ejemplo de ello pueden ser las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2, que están principalmente asociados al cáncer de mama.² Por otra parte, los hábitos de vida también están fuertemente relacionados con la probabilidad de padecer cáncer. Los principales hábitos que influyen en el riesgo de cáncer son el consumo de tabaco, que es una de las principales causas del cáncer de pulmón (el cual tiene una de las tasas de mortalidad más altas); el consumo excesivo de alcohol, ya que este puede dañar tanto al ADN como a las proteínas celulares; una fuerte exposición al sol y a radiación ultravioleta, lo cual es la principal causa del cáncer de piel; la práctica de una dieta no equilibrada y la poca actividad física. Se estima que el 40% de los cánceres puede prevenirse mediante la adopción de hábitos de vida saludables.³

Entre los tipos de cáncer más frecuentes, se encuentran, según un estudio realizado por GLOBOCAN en 2020:

- 1- Cáncer de mama: Con 2,26 millones de casos, este se ha convertido en el más común a nivel mundial, superando al cáncer de pulmón. En mujeres, este sigue siendo la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial.
- 2- Cáncer de pulmón: En el año 2020 se registró un total de 2,2 millones de casos, siendo en hombres ligeramente más común que en las mujeres. Este tipo de cáncer tiene la tasa de mortalidad más alta, debido principalmente a que se suele diagnosticar en etapas avanzadas.

- 3- Cáncer colorrectal: Con 1,79 millones de casos registrados, este cáncer resulta ser uno de los más tratables en caso de que se detecte temprano, aunque sigue siendo una causa significativa de muerte en países con menor acceso a programas de detección.

A esta larga lista le seguirían el cáncer de próstata, el cáncer de estómago, el cáncer de hígado y el cáncer de piel, entre otros.⁴

1.2. TRATAMIENTOS CONTRA EL CÁNCER

Históricamente, los posibles tratamientos capaces de combatir el cáncer han ido evolucionando progresivamente, a medida que avanzaba la investigación y los descubrimientos en este campo científico. Cronológicamente, el primer remedio que se encontró para el cáncer fue la cirugía (extirpación de las zonas afectadas), aunque en la antigüedad el cáncer era visto como una enfermedad incurable. A medida que fueron avanzando los conocimientos en cirugía (con el desarrollo en anestesia), esta se convirtió en un tratamiento cada vez más efectivo, aunque únicamente es posible durante las fases más tempranas del cáncer.

Durante el siglo XX se desarrollaron dos de los tratamientos más importantes para combatir el cáncer, como son la quimioterapia y la radioterapia. Con el descubrimiento de la radioactividad de Marie y Pierre Curie, se comenzó a utilizar la radiación como método para tratar tumores, lo cual condujo al desarrollo de la radioterapia.⁵ En 1901, se trató por primera vez a un paciente con radiación para intentar curar un cáncer de piel. Durante la segunda guerra mundial, se desarrollaron agentes quimioterapéuticos, como el gas mostaza nitrogenado o el metotrexato. Este tipo de tratamientos, aunque son efectivos, también son muy dañinos para el resto de las células sanas del paciente, debido a su alta agresividad. Los efectos que pueden producir son daño a tejidos sanos circundantes al área tratada (inflamación o daño funcional), fatiga, toxicidad a largo plazo (pudiendo llegar a generar problemas cardíacos o desarrollar nuevos tipos de cáncer) e inmunosupresión, entre otros.

En la época reciente, las numerosas investigaciones sobre la terapia contra el cáncer han dado lugar a nuevos sistemas para neutralizar las células cancerosas. Se han logrado obtener, como resultado, medicamentos con mayor eficacia, más precisos y menos invasivos que los mencionados anteriormente. Algunos ejemplos pueden ser la nanomedicina, que se centra en la utilización de nanopartículas para mejorar la entrega de fármacos; la inmunoterapia, cuyo fin es estimular el sistema inmunológico para atacar células cancerosas; la terapia génica, que consiste en la corrección de mutaciones que causan cáncer mediante la manipulación directa de genes; y las terapias dirigidas, que atacan mutaciones específicas en células tumorales.⁶

1.3. LA TERAPIA DIRIGIDA

La terapia dirigida es un tratamiento que se centra en atacar directamente los mecanismos moleculares específicos que intervienen en el crecimiento, división y proliferación de las células tumorales. Se utiliza un fármaco diseñado específicamente para inhibir una molécula que participa en el crecimiento, desarrollo y proliferación de las células cancerosas, impidiendo la progresión del tumor. Esto hace de la terapia dirigida una terapia precisa y con menos efectos secundarios sistémicos que las anteriormente mencionadas.

El desarrollo de las terapias dirigidas tiene como origen los avances científicos de las décadas de 1970 y 1980. Uno de los descubrimientos clave fue la identificación de oncogenes y genes supresores de tumores, que juegan un papel fundamental en el desarrollo y la progresión del cáncer. Los oncogenes son versiones mutadas o activadas de genes normales (protooncogenes) que, cuando se alteran, impulsan el crecimiento celular descontrolado. Por otro lado, los genes supresores de tumores normalmente inhiben el crecimiento celular, y cuando se inactivan, permiten que las células cancerosas se desarrollen sin restricción. Este conocimiento condujo a la idea de que, si se podía intervenir en estos procesos moleculares específicos, sería posible detener o ralentizar el crecimiento del cáncer de manera más selectiva.⁷

Las proteínas tirosinas quinasas funcionan como interruptores moleculares en las células, activando o desactivando otras proteínas a través de la fosforilación, un proceso en el que añaden un grupo fosfato a las proteínas. Esto inicia una cascada de señales dentro de la célula, que regula funciones clave como la división celular, la supervivencia y la migración. En condiciones normales, las tirosinas quinasas son controladas de manera estricta para que solo se activen cuando sea necesario. Sin embargo, en muchos tipos de cáncer, las tirosinas quinasas se activan de manera inadecuada o constante debido a mutaciones en los genes que las codifican. Esta activación continua puede llevar a un crecimiento celular incontrolado, una de las principales características del cáncer.

En este sentido, uno de los primeros hitos importantes en el desarrollo de las terapias dirigidas fue el descubrimiento del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR), que conforma una familia de cuatro receptores tirosina quinasa (HER-1, HER-2, HER-3 y HER-4), y el desarrollo de medicamentos que podían inhibir esta proteína en ciertos tipos de cáncer.⁸ Se observó que, en varios tipos de tumores, el EGFR se reproducía de manera descontrolada, principalmente en HER-1 y HER-2, debido a mutaciones y distorsiones del material genético, lo cual provocaba la desregulación de la señalización de la tirosina quinasa, y como consecuencia, el desarrollo del cáncer. Se sugirió que la inhibición del receptor EGFR podría ser una solución efectiva para detener la proliferación tumoral.

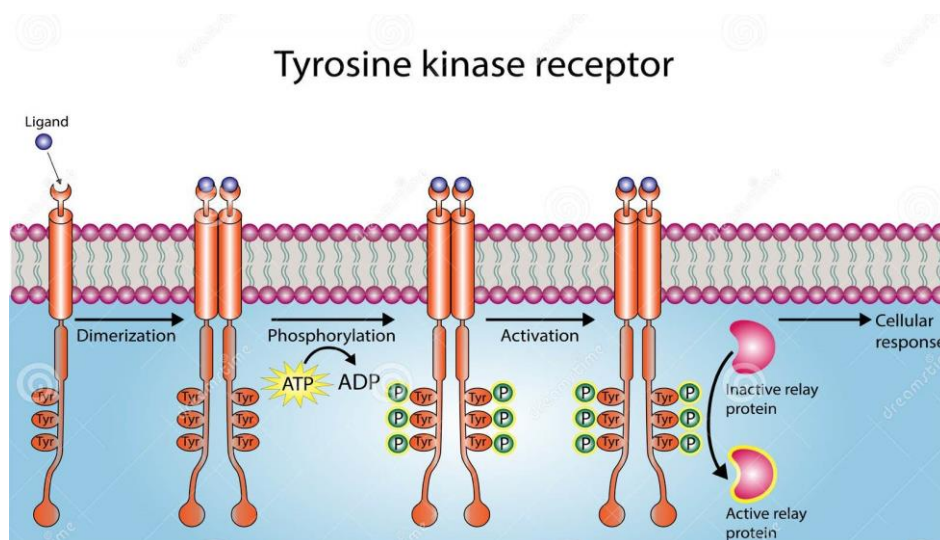


Figura 1. Esquema sobre el funcionamiento de la tirosina quinasa.²¹

Los inhibidores de tirosina quinasa (*Tyrosine Kinase Inhibitor*, TKI) son pequeñas moléculas que se unen al sitio activo del receptor (principalmente HER-1 y HER-2), bloqueando su capacidad de añadir grupos fosfato a otras proteínas. Al inhibir esta función, los TKI interrumpen las señales que permiten a las células cancerosas proliferar. Estos fármacos están diseñados para ser altamente específicos, lo que significa que se dirigen únicamente a receptores tirosina quinasa que poseen alguna alteración en las células tumorales, minimizando los efectos dañinos en las células sanas.⁹

Uno de los primeros y más importantes ejemplos de TKI es el imatinib (Gleevec), que fue desarrollado para tratar la leucemia mieloide crónica (LMC).¹⁰ En esta enfermedad, las células cancerosas tienen una fusión genética que da lugar a una proteína anormal llamada BCR-ABL, una tirosina quinasa que está constantemente activa y que impulsa el crecimiento de las células malignas. El modo de acción del imatinib es unirse al sitio activo de BCR-ABL, bloqueando su actividad y deteniendo la proliferación descontrolada de las células leucémicas. El éxito de imatinib no solo cambió el tratamiento de LMC, sino que también estableció el paradigma de las terapias dirigidas basadas en inhibidores de tirosina quinasa.

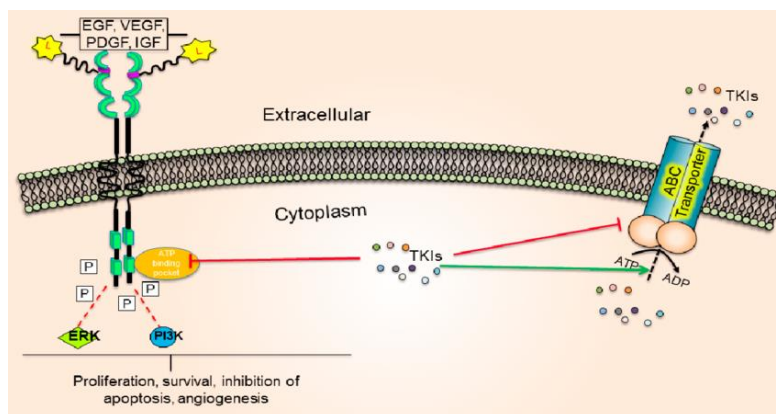


Figura 2. Funcionamiento de las terapias dirigidas basadas en inhibidores de la tirosina quinasa.²²

1.4. TIPOS DE INHIBIDORES DE LA TIROSINA QUINASA

Existen varios tipos de inhibidores de tirosina quinasa, los cuales se clasifican según su mecanismo de acción y por el tipo de tirosina quinasa específica que inhiben. Entre los más comunes se encuentran:

- **Inhibidores de quinasas receptoras:** Estas quinasas están asociadas a la superficie celular y transmiten señales desde el exterior al interior de la célula. Algunos ejemplos incluyen el EGFR, que está implicado en varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de pulmón no microcítico. Los inhibidores de EGFR, como lo son el erlotinib (ERL) y el gefitinib (GFT), bloquean este receptor, interrumpiendo las señales de crecimiento y ralentizando el avance del tumor.¹¹
- **Inhibidores de quinasas no receptoras:** Estas quinasas están ubicadas en el citoplasma y transmiten señales sin estar unidas a la membrana celular. Un ejemplo es el inhibidor

dasatinib, que se dirige a varias quinasas no receptoras, incluyendo SRC y ABL, y se usa en ciertos tipos de leucemia.¹²

- **Inhibidores multitarget:** Estos fármacos son capaces de inhibir varias tirosina quinasas a la vez, lo que les permite atacar múltiples vías de señalización involucradas en el crecimiento tumoral. Un ejemplo es el sunitinib, que inhibe tanto los receptores de VEGFR como los de PDGFR, y se utiliza en el tratamiento de tumores gastrointestinales y cáncer renal.¹³

Sin embargo, a pesar de que los TKI son más específicos que otros tratamientos, no están completamente libres de efectos secundarios. El uso continuado de este tipo de fármacos puede causar ciertos daños adversos, entre los que se incluyen problemas gastrointestinales, toxicidad hepática, hipertensión y problemas cutáneos, dependiendo del inhibidor y del tipo de cáncer. La creciente preocupación existente en torno a estos efectos secundarios ha dado lugar a diversos estudios con el objetivo de garantizar la máxima seguridad de los pacientes tratados. Se ha descubierto que más de 300 de estos medicamentos poseen un elevado potencial fotosensibilizante, la cual puede provocar alteraciones cutáneas.

1.5. FOTOSENSIBILIZACIÓN DE FÁRMACOS FOTOACTIVOS

Los fármacos fotoactivos son aquellos que pueden interactuar con la luz de una determinada energía ya que poseen cromóforos capaces de absorber dicha luz. Este proceso puede desencadenar una serie de reacciones químicas que deriven finalmente en la formación de reacciones de fotosensibilización, lo que principalmente resulta en la aparición de lesiones cutáneas como eccemas o quemaduras, fotodermatitis, hiperpigmentación o incluso cáncer de piel.¹⁴ Este tipo de fármacos capaces de absorber luz de una determinada longitud de onda se excitan y pasan a un estado de alta energía; ese exceso de energía se puede disipar de diferentes formas, bien dando reacciones fotoquímicas, por lo que se generan nuevos productos químicos (fotoproductos) y/o procesos de fotosensibilización, o bien mediante procesos fotofísicos (fluorescencia, fosforescencia, desactivación no radiante) donde además se puede transferir esa energía a otras moléculas cercanas (procesos de transferencia de energía o electrónica, etc.)

La radiación solar puede dividirse en radiación ultravioleta C (UV-C, de 200 a 290 nm), radiación ultravioleta B (UV-B, de 290 a 315 nm), radiación ultravioleta A (UV-A, de 315 a 400 nm), la radiación visible (de 400 a 700 nm) y la radiación infrarroja (más de 700 nm). De todas ellas, la más perjudicial a nivel biológico es la radiación ultravioleta, siendo la UV-A la que llega mayoritariamente a la superficie terrestre y la más relacionada con los procesos de fotosensibilización. Este tipo de procesos, pese a estar cada vez más relacionados con las enfermedades cutáneas mencionadas anteriormente, cuentan con pocos trabajos de investigación con relación a la fotosensibilización derivada de fármacos TKI. Por tanto, se trata de un campo de estudio abierto que irá adquiriendo más relevancia, centrándose en entender los mecanismos y las respuestas celulares que se desencadenan por la interacción entre los fármacos TKI y la radiación solar.¹⁵

Las reacciones de fotosensibilización dan comienzo con la absorción de un fotón por parte del fármaco anticancerígeno, pasando este a un estado excitado de mayor energía. En este estado,

el agente fotosensibilizante puede generar distintas especies (singlete, triplete, radicales, etc.), que podrían provocar daño a biomoléculas tales como proteínas, ADN o lípidos mediante procesos de transferencia de energía, transferencia electrónica o transferencia de protón. Además, esta reacción también puede dar lugar a un compuesto químico diferente, dando lugar a un fotoproducto que podría ser fotosensibilizante, aunque el agente inicial no lo fuera. Cualquiera de estos procesos puede llegar a causar daño biológico fotoinducido, y producir lesiones en el organismo. Este daño puede ser de dos tipos:

- 1- **Fotoalergia:** Reacciones de fotosensibilidad producidas por respuestas del propio sistema inmunitario. Estas respuestas son producidas por la formación de alérgenos que se generan tras la absorción de luz por parte del fármaco (al producirse la unión a proteínas de membrana). El daño producido no es inmediato, se manifiesta con la presencia de erupciones en la piel, enrojecimientos y edema. Al ser una respuesta del sistema inmunológico, estas lesiones pueden extenderse a zonas que no hayan sido afectadas por la radiación.
- 2- **Fototoxicidad:** Se produce cuando el fármaco que ha absorbido luz solar interacciona desde su estado excitado con biomoléculas o con oxígeno, desencadenando una serie de reacciones que pueden generar daños en el ADN, proteínas o lípidos. Estos daños dependen directamente de la cantidad de agente fotosensibilizante que haya sido expuesto a la radiación, y suele manifestarse en forma de quemaduras.

Este tipo de reacciones se debe a la presencia de algún cromóforo en la estructura molecular de los TKIs. Un cromóforo es una parte de una molécula capaz de absorber luz de una cierta energía. Existen antecedentes donde se demuestra la capacidad de ciertos TKI de interactuar con luz y generar un daño biológico; en estos estudios, realizados en el grupo de investigación donde se ha desarrollado este TFG, se relaciona la reactividad fotofísica y fotoquímica de los TKI con su potencial fotosensibilizante. Por ejemplo, en el caso del lapatinib (LAP, fármaco diagnosticado contra el cáncer de mama), este contiene en su estructura el cromóforo quinazolina, del cual se concluye que el daño fotobiológico generado por LAP deriva de la interacción de dicho cromóforo con luz UV. Aunque no siempre es tan sencillo identificar cuáles son las especies que producen los efectos fotofísicos que dan lugar a estas reacciones, y requieren de un estudio exhaustivo para llegar a alguna conclusión. Esto ocurrió, por ejemplo, en el caso del imatinib (fármaco utilizado para varios casos de leucemia), donde fue necesario dividir la molécula para identificar la subestructura responsable del daño causado a las biomoléculas.¹⁶

Generalmente, las reacciones de fototoxicidad son las más comunes, y por tanto se profundizará algo más en ellas. Los TKIs pueden producir reacciones adversas con carácter fototóxico, y aunque hoy en día no existen muchos estudios en los que se hayan investigado a nivel molecular los mecanismos capaces de producir dichas reacciones, sí se puede contar con algunas investigaciones realizadas para los fármacos lapatinib (LAP), gefitinib (GFT) y erlotinib (ERL), habiendo sido los dos últimos estudiados en nuestro laboratorio de investigación.

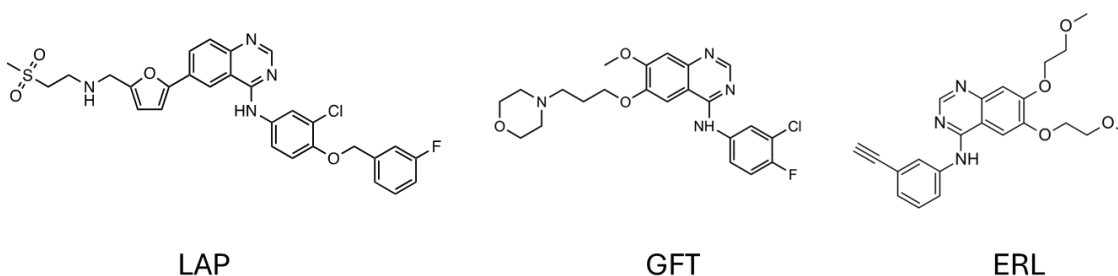


Figura 3. Estructura química de los TKI lapatinib, gefitinib y erlotinib.

De esta forma, el lapatinib, un medicamento utilizado principalmente para contrarrestar el cáncer de mama y el cáncer de pulmón, contiene en su estructura el cromóforo quinazolina, del cual, según estudios previos, ya se conoce que puede absorber luz solar y provocar daño fotoinducido de tipo fototóxico. Según dichos estudios, existe una relación entre las propiedades fotofísicas del LAP con el daño fotobiológico que este provoca, identificándose las especies transitorias que se generan al irradiar LAP a 330 nm. El mecanismo por el cual se provoca dicho daño implica procesos de transferencia electrónica desde el estado excitado singlete de LAP.¹⁷

Un estudio reciente determinó la fototoxicidad que puede provocar el GFT y sus principales metabolitos fotoactivos, mediante un estudio completo sobre la fotorreactividad de éstos en disolución orgánica y en medio proteico. En dicho estudio, se identificaron y caracterizaron las principales especies transitorias y se estudiaron los procesos fotoinducidos que dan lugar tras la irradiación de rayos UV-A en GFT, GFT-M1 y GFT-M2. Se pudo correlacionar el comportamiento fotofísico de los tres compuestos y sus potenciales fototóxicos. Finalmente se llegó a la conclusión de que el daño generado por el fármaco y sus metabolitos sigue un mecanismo fototóxico de tipo I, ya que se observaron procesos de transferencia electrónica y/o de protón.³³

Con respecto al estudio realizado sobre el fármaco erlotinib, el cual es un fármaco utilizado en tratamientos contra el cáncer de pulmón y de páncreas, se determinaron los estados excitados y los procesos fotoinducidos que ocurren tras la excitación del fármaco y sus metabolitos con luz UV-A. Se comprobó que, el comportamiento de este fármaco al ser irradiado es bastante diferente dependiendo del medio en el que se encuentre. Se llegó finalmente a la conclusión de que la fotosensibilidad observada en medios orgánicos y en interacciones biológicas pueden contribuir a las reacciones de fotosensibilidad observadas clínicamente.¹⁸

Los resultados de las investigaciones comentadas anteriormente indican que existe una estrecha relación entre la fototoxicidad que pueden provocar los TKIs con sus propiedades fotofísicas, así como los efectos fotoinducidos en las biomoléculas tras interactuar con luz ultravioleta. En este sentido, las especies responsables de este daño son estados excitados de naturaleza singlete o triplete que pueden inducir la formación de radicales (generados por un proceso de transferencia electrónica entre el fármaco en su estado excitado y la biomolécula), o especies reactivas de oxígeno, el cual se forma tras un proceso de transferencia de energía triplete-triplete entre el fármaco y el oxígeno molecular. De esta forma, se puede clasificar la fototoxicidad en función de las especies responsables de que esta sea generada, siguiendo un mecanismo de tipo I cuando la generan especies radicalarias, y de tipo II cuando se generan a partir de especies reactivas de oxígeno.

1.6. FUNDAMENTOS FOTOFÍSICOS Y FOTOQUÍMICOS

La fotoquímica es la ciencia que estudia las interacciones entre átomos y/o moléculas pequeñas con la luz, así como los cambios que esta pueda llegar a producir en la materia como consecuencia de dicha interacción. Este tipo de procesos fotoinducidos se dan cuando el cromóforo de las moléculas orgánicas absorbe luz de una determinada energía. En ese momento, un electrón del orbital molecular ocupado de mayor energía puede desplazarse al orbital desocupado de menor energía, de manera que la molécula pasa de su estado fundamental (S_0) a un estado excitado singlete (S_n) de mayor energía. Desde este nivel S_n (que depende de la longitud de onda a la que la molécula es irradiada), se disipará el exceso de energía de los electrones y se relajarán rápidamente, alcanzando el estado excitado singlete de menor energía (S_1), desde donde se podrán iniciar varios procesos fotoquímicos y fotofísicos hasta que la molécula alcance de nuevo su estado fundamental.¹⁹

Los procesos fotofísicos suceden durante la transición de una molécula al pasar del estado excitado al estado fundamental, cuando esta no sufre cambios en su estructura química. Estos procesos pueden ser de naturaleza radiante, si emiten la energía absorbida en forma de luz, como es el caso de la fluorescencia y fosforescencia; o no radiante, si no emiten energía en forma de luz sino en forma de calor.

El diagrama de Jablonski (ver Figura 4) es una representación esquemática de los distintos niveles de energía y procesos fotofísicos que pueden ocurrir tras la absorción de energía por parte del cromóforo de una molécula tras ser irradiada. Estos procesos son competitivos entre sí, siendo más o menos favorables dependiendo de la molécula.

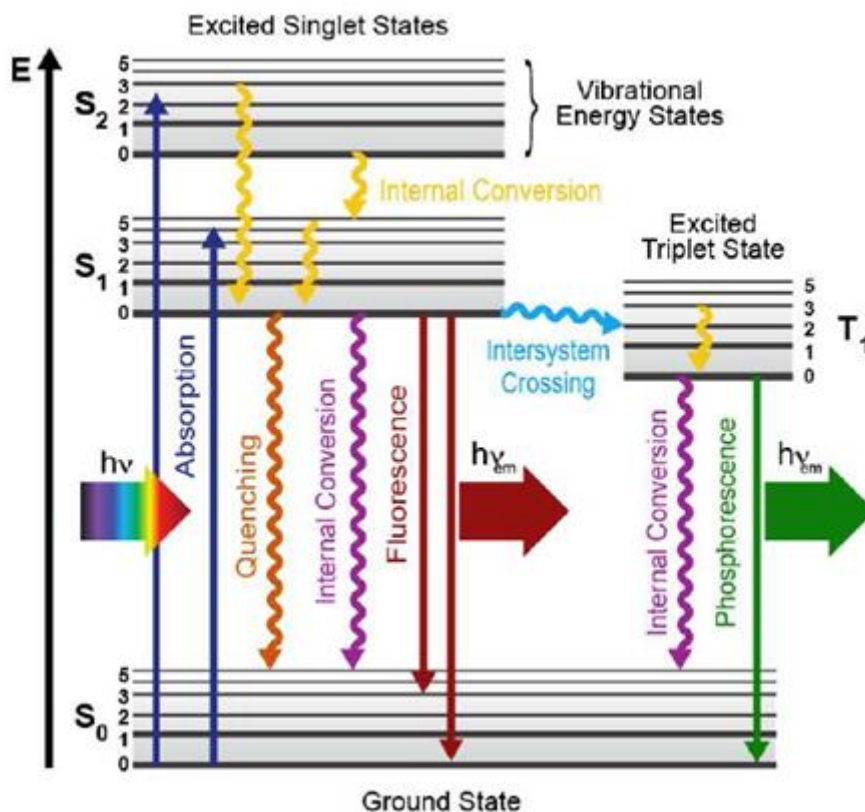


Figura 4. Diagrama de Jablonski.²⁰

En este diagrama, se pueden observar varios de los procesos mencionados anteriormente, que se describirán a continuación:

- Fluorescencia: emisión de energía en forma de luz que va desde el estado excitado S_1 hasta el estado fundamental S_0 . Este proceso se suele dar en intervalos muy cortos de tiempo, del orden de nanosegundos.
- Fosforescencia: emisión de energía en forma de luz que va dado desde el estado excitado triplete (T_1) hasta el estado fundamental S_0 . Durante este proceso, a diferencia de la fluorescencia, sí cambia el espín del electrón, lo cual hace que sea una transición prohibida, y por tanto ocurre en escalas de tiempo mayores, del orden de microsegundos.
- Conversión interna: proceso fotofísico no radiante mediante el cual se pasa de un estado electrónico a otro isoenergético, manteniendo la misma multiplicidad de espín.
- Reconversión o cruce intersistema: proceso no radiante por el cual una molécula cambia de un estado electrónico a otro (formando estados excitados del tipo triplete), manteniendo la misma energía, pero de distinta multiplicidad. También se trata de una transición prohibida, y por lo tanto es más lento que aquellos procesos que sí mantienen la misma multiplicidad de espín.
- Relajación vibracional: proceso fotofísico no radiante por el que una molécula pasa muy rápidamente de un estado vibracional de mayor energía a otro de menor energía, debido a colisiones con el entorno.

De los procesos mencionados anteriormente, los únicos que se pueden medir con mayor facilidad son la absorción y la emisión luminiscente, pudiendo determinar los espectros de absorción y emisión, intensidades y cinéticas de desactivación.

La transferencia de energía es un fenómeno mediante el cual una molécula que se encuentra en su estado excitado singlete o triplete (dador) pasa de su mismo estado excitado a otra molécula que se encuentre en su estado fundamental (aceptor).

Por otra parte, los procesos de transferencia electrónica implican que una molécula ceda sus electrones a otra, dando como resultado la formación de compuestos aniónicos, catiónicos o especies radicalarias. Para ello, una de las dos moléculas debe encontrarse en su estado excitado.

Por último, las reacciones químicas son procesos en los que se generan nuevos compuestos a partir de intermedios de reacción.

Para que cualquiera de estos procesos de desactivación pueda llevarse a cabo, el dador deberá tener siempre una energía superior en el estado excitado que la energía en el estado excitado del aceptor. Además, las condiciones en las cuales tienen lugar afectan sobremanera a estos procesos, dependiendo del microambiente en el que se encuentren las especies orgánicas que actúen como dador y aceptor. Por ello, resulta crucial estudiar el comportamiento de las moléculas en diferentes condiciones, para que esta sea caracterizada correctamente.

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

En vista de los antecedentes explicados en el apartado anterior, es evidente la estrecha relación existente entre la fotorreactividad de los fármacos y las propiedades fotofísicas que presentan en distintos medios con el daño fotoinducido que se puede generar en biomoléculas, que finalmente derivaría en un daño biológico (fototoxicidad, fotoalergia, fotomutagenicidad, etc.). Por este motivo, se ha decidido realizar un estudio completo sobre la fotorreactividad del fármaco capmatinib (CAP) en distintos medios: disolución orgánica, disolución acuosa y medio biológico.

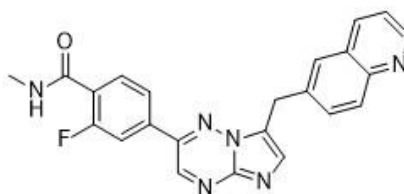


Figura 5. Estructura química del fármaco capmatinib.

Las propiedades fotofísicas de CAP no se han estudiado con anterioridad. Este fármaco se usa actualmente para tratar el cáncer de pulmón de células caracterizadas como ‘no pequeñas’ en adultos en los que dicho cáncer se ha expandido por el organismo. Este medicamento, como algunos comentados en la introducción, pertenece al grupo de fármacos inhibidores de la tirosina quinasa, y como muchos de los medicamentos pertenecientes a este grupo, puede presentar efectos secundarios relacionados con la interacción del fármaco con la luz.

Se desconoce la fotorreactividad y las causas específicas por las cuales se producen algunos de estos efectos secundarios durante el consumo de este medicamento, estando relacionados, eso sí, con la exposición a la radiación. De esta forma, el objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado es estudiar en detalle la fotorreactividad de CAP, tanto en disolución orgánica como en disolución acuosa y en medio proteico. Se realizará una caracterización completa de las especies transitorias generadas tras irradiar el fármaco con luz ultravioleta, y se describirán sus principales propiedades fotofísicas, así como los procesos fotoinducidos que tienen lugar tras interaccionar CAP con luz UV mediante el uso de técnicas espectroscópicas tales como la fluorescencia (en estado estacionario y resuelta en el tiempo) y la absorción transitoria a escala de microsegundos (técnica de fotólisis de destello láser, FDL).

Para el estudio en medio orgánico, se utilizarán diferentes disolventes orgánicos para investigar la influencia de la polaridad del medio sobre las propiedades fotofísicas del fármaco. Por otra parte, para el estudio realizado en medio biológico se utilizarán proteínas de distinta naturaleza: albúminas séricas y alfa-glicoproteínas ácidas, de origen humano y bovino. Estas

son de las proteínas transportadoras más abundantes, las cuales se encargan principalmente de transportar tanto sustancias endógenas como exógenas por el torrente sanguíneo.

CAPÍTULO 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este capítulo, se expondrán los resultados obtenidos en este proyecto de investigación. En primer lugar, se ha realizado un estudio fotofísico y fotoquímico del fármaco en medio orgánico; una vez se han caracterizado los estados excitados y los procesos fotoinducidos que tienen lugar en este medio, se ha procedido a estudiar el comportamiento de CAP tanto en disolución acuosa (PBS) como en medio biológico, principalmente en presencia de las proteínas transportadoras descritas en el apartado anterior (albúminas séricas y α -glicoproteínas ácidas).

3.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS ESTADOS EXCITADOS DE CAPMATINIB EN DISOLUCIÓN ORGÁNICA.

El motivo de estudiar el comportamiento fotofísico y fotoquímico del CAP en disolventes orgánicos es, principalmente, que se disuelve con mucha facilidad y es además el medio más “sencillo” en el que el fármaco puede encontrarse, sin las restricciones de movimiento que le puede proporcionar las cavidades de unión de la proteína, lo cual se discutirá más adelante. En este caso, los disolventes elegidos para realizar estos experimentos fueron el tolueno (Tol), el acetonitrilo (MeCN) y el etanol (EtOH), clasificados de menos polar a más polar. Las principales características de cada uno de estos disolventes, detalladas para justificar la elección de estos para la realización de los estudios fotoquímicos, son las siguientes:

- Tolueno: Es un disolvente apolar capaz de disolver fácilmente compuestos orgánicos apolares, y además presenta una alta estabilidad química, lo cual resulta muy útil a la hora de su uso en investigación.²³
- Acetonitrilo: Es un disolvente polar con una constante dieléctrica alta, además de presentar también una alta estabilidad química.²⁴
- Etanol: Es un disolvente polar y práctico muy versátil, pues puede disolver gran cantidad de compuestos orgánicos de diferente polaridad. Además, es menos tóxico que otros solventes y se utiliza muy habitualmente en investigaciones biológicas y farmacéuticas.²⁵

En primer lugar, se realizó un registro de los espectros de absorción ultravioleta-visible (UV-vis) de CAP en acetonitrilo, etanol y tolueno.

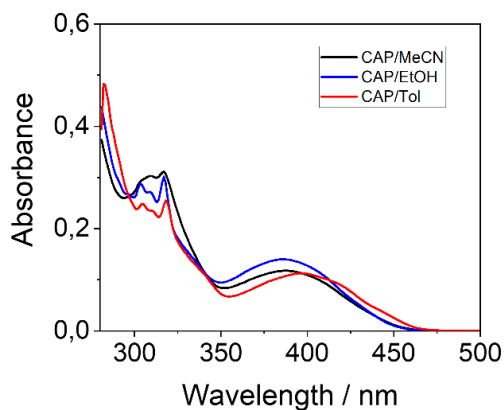


Figura 6. Espectros de absorción de CAP en MeCN (negro), etanol (azul) y tolueno (rojo) a concentración 2 μ M.

Como se puede observar, los espectros de absorción UV-vis no varían demasiado en función de la polaridad del disolvente; para etanol y tolueno, los espectros muestran un perfil más definido, y en el caso de tolueno, el máximo de absorción se desplaza ligeramente a longitudes de onda mayores.

Estos resultados indican que las propiedades físicas del fármaco en el estado fundamental apenas varían en función de la polaridad del disolvente orgánico.

Un aspecto importante a resaltar es que CAP es capaz de absorber luz desde en la región ultravioleta A e incluso visible, ya que su espectro de absorción se extiende hasta casi los 470 nm; de hecho, como se puede apreciar en la Figura 7, el fármaco tiene color amarillento. Este hecho se traduce en que el fármaco, al poder absorber luz de las regiones ultravioleta A y visible, podría generar un daño fotoinducido no deseado a biomoléculas tales como proteínas, lípidos, ADN, etc., llegando incluso a ocasionar daño permanente a aquellos pacientes oncológicos tratados con CAP.

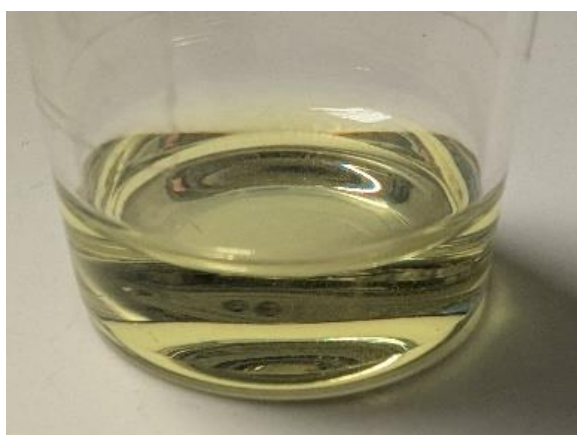


Figura 7. CAP disuelto en DMSO a concentración 2 mM.

En vista del análisis realizado sobre el espectro de absorción del fármaco, y ya que se ha observado que éste es capaz de absorber luz UV-A, se va a realizar un análisis fotoquímico del mismo para ver si al ser irradiado a 350 nm es capaz de generar algún fotoproducto (FP). La

reactividad fotoquímica de CAP se seguirá a partir de los espectros de emisión del fármaco en disolución de acetonitrilo tras ser irradiado en un fotorreactor multilámpara a 350 nm durante distintos tiempos. El motivo por el que se ha seleccionado la fluorescencia para seguir la reactividad fotoquímica de CAP se debe a que es una técnica espectroscópica altamente sensible a pequeñas modificaciones que pueda sufrir el fármaco; así pues, si este reacciona generando algún FP (o bien se degrada) se detectará por cambios en el espectro de emisión de CAP.

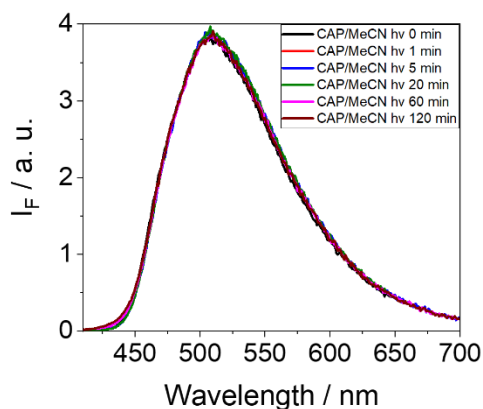


Figura 8. Espectros de fluorescencia de CAP en acetonitrilo tras ser irradiado a distintos tiempos (1, 5, 20, 60 y 120 minutos) en un fotorreactor multilámpara a 350 nm.

Como se puede observar en la Figura 8, no se observa ningún cambio significativo en el espectro de emisión del fármaco tras ser irradiado a 350 nm, lo cual confirma que CAP es bastante estable fotoquímicamente. Adicionalmente, también se comprueba que los resultados que se han obtenido a partir de los experimentos fotofísicos que se van a mostrar a continuación van a derivar por la excitación del fármaco y no por la formación de ningún fotoproducto ni por la degradación de CAP.

Una vez observada la alta estabilidad fotoquímica de CAP, se procede al estudio de sus propiedades fotofísicas.

En la Figura 9 se muestran los espectros de emisión del fármaco en los disolventes orgánicos de distinta polaridad empleados con anterioridad tras excitar a una longitud de onda de 340 nm. Se puede observar que el máximo de emisión está centrado a unos 510 nm, desplazándose ligeramente a longitudes de onda menores para el caso del tolueno; esto puede deberse a la diferencia de polaridad entre el tolueno (bastante apolar) y acetonitrilo y etanol, que son disolvente mucho más polares. Sin embargo, el rendimiento cuántico de fluorescencia sí varía en función de la polaridad, siendo mayor para tolueno ($\phi_F \sim 0.21$) y mucho menor en etanol ($\phi_F \sim 0.10$). Estos pequeños cambios en los valores de los rendimientos cuánticos podrían producirse debido a que los procesos no radiantes tomen más importancia según la polaridad del medio en el que se encuentre el fármaco, siendo estos más eficientes en disolventes polares, y por ello, al emitir una menor cantidad de luz, presenta un rendimiento cuántico de fluorescencia menor. Este efecto se ha observado con anterioridad con fármacos como el flurbiprofeno.³⁴

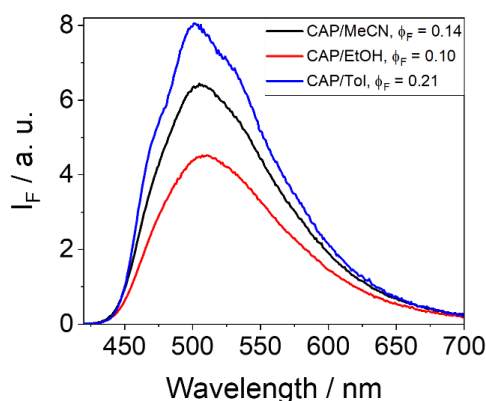


Figura 9. Espectros de fluorescencia de CAP en MeCN (negro), etanol (rojo) y tolueno (azul) a $\lambda_{exc} = 340$ nm.

En concordancia con los resultados observados de los espectros de fluorescencia, los perfiles cinéticos muestran que el tiempo de vida media de fluorescencia (τ_F) del fármaco son algo más cortos en disolventes polares que en medio apolar (Figura 10), aunque estos tiempos de vida media son, en general, muy cortos para todos los disolventes, siendo del orden de nanosegundos. Esta ligera variación en los tiempos de vida podría deberse a una mayor relajación de CAP en su estado excitado por movimientos conformacionales que sea más eficiente en disolventes polares que en apolares. De nuevo, este efecto se ha observado anteriormente con fármacos como el flurbiprofeno.³⁴

Los valores de τ_F se determinaron ajustando las cinéticas de desaparición de la fluorescencia mediante un ajuste y deconvolución no lineal utilizando una función monoexponencial (este proceso se ha detallado en el apartado 5, PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL).

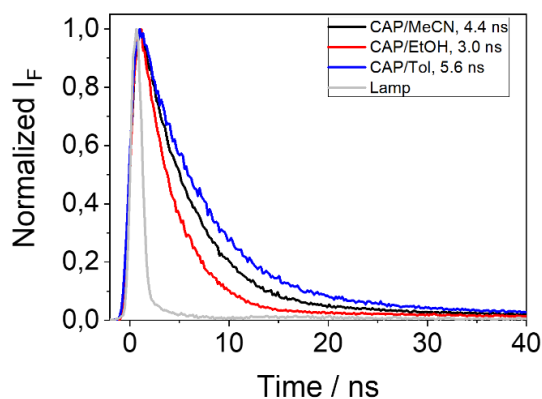


Figura 10. Cinéticas de fluorescencia de CAP en MeCN (negro), etanol (rojo) y tolueno (azul) a $\lambda_{exc} = 340$ nm. La respuesta del equipo (lamp) se muestra en gris claro.

Una vez estudiados los espectros y las cinéticas de emisión de CAP en los distintos disolventes, se va a proceder a determinar la energía del primer estado excitado singlete (E_S) del fármaco.

Esta energía se determinó a partir de la longitud de onda correspondiente a la intersección entre el espectro de emisión normalizado (registrado a $\lambda_{exc} = 340$ nm) y el espectro de excitación normalizado (registrado a $\lambda_{em} = 510$ nm). En la siguiente figura se muestran dichos espectros.

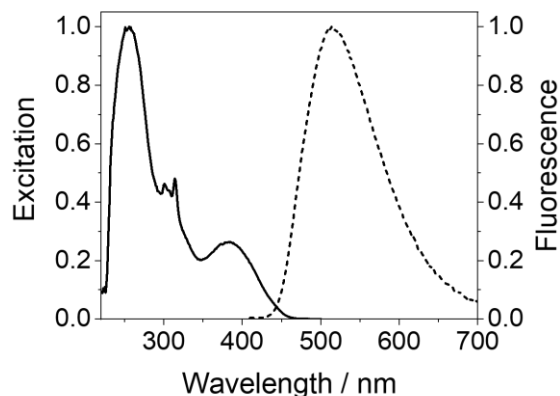


Figura 11. Espectros normalizados de excitación (línea sólida) a $\lambda_{em} = 510$ nm y de emisión (línea punteada) a $\lambda_{exc} = 340$ nm de CAP en MeCN.

Como se puede observar en la FIGURA 11, la longitud de onda correspondiente al cruce entre ambos espectros es de 446 nm, lo que equivale a una energía del estado excitado singlete de 65 kcal/mol.

Con el fin de continuar con el proceso de caracterización fotofísica de CAP en medio orgánico, se va a realizar un estudio de las diferentes especies que se puedan obtener por absorción transitoria, utilizando la técnica de fotólisis de destello láser (FDL). Esta técnica permite detectar especies de naturaleza triplete, así como especies radicalarias, etc. Este experimento se realizó excitando el fármaco a 355 nm (longitud a la que permite el láser, y en la cual se ha determinado anteriormente que el fármaco absorbe luz) en acetonitrilo y atmósfera inerte (purga con N_2). Conviene destacar que las medidas se han realizado en ausencia de oxígeno ya que éste es capaz de desactivar estados excitados triplete.

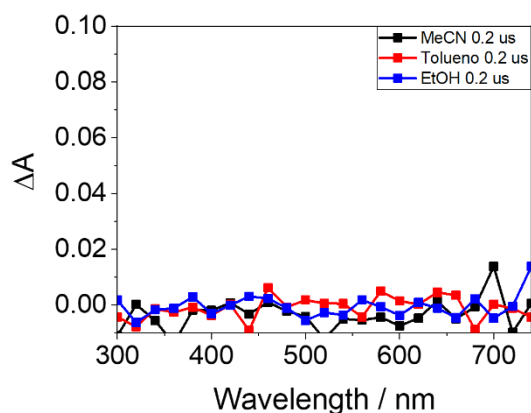


Figura 12. Espectros de FDL registrados a 0.2 μs tras el pulso del láser tras excitar CAP a 355 nm en MeCN/ N_2 .

Como se puede observar en la figura anterior, no se aprecia ninguna especie de absorción transitoria. Se ha de tener en cuenta que la escala de tiempo a la que el láser permite medir es relativamente baja (μs), lo que permitiría detectar estados excitados triplete-triplete o procesos de transferencia de electrones (formando especies radicalarias). En este caso, la ausencia de señal puede deberse a dos motivos: En primer lugar, que las especies de absorción transitoria, principalmente estados excitados triplete, tengan un tiempo de vida inferior a los microsegundos, por lo que no pueden ser detectados con el sistema de FDL empleado, sino que sólo podrían detectarse por espectroscopía de absorción transitoria ultrarrápida a escala de fs-ps; o bien que el proceso de cruce intersistemas (ISC) no esté favorecido para formar el estado excitado triplete del fármaco ($^3\text{CAP}^*$).

Adicionalmente, se han realizado medidas de fosforescencia en matriz sólida de etanol, con el fin de medir las emisiones de los estados excitados triplete-triplete del fármaco. Este experimento queda detallado en el APARTADO 5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

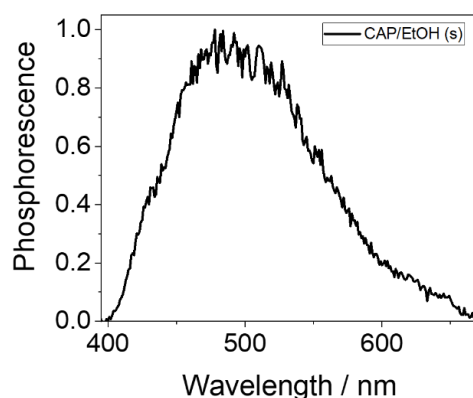


Figura 13. Espectros de fosforescencia de CAP en matriz sólida de etanol tras excitar a 355 nm.

Con los resultados del espectro de fosforescencia que se puede observar en la figura anterior, se determina la energía del estado excitado triplete (E_T) a partir la longitud de onda correspondiente al 10% de la subida del espectro (que en este caso corresponde a 410 nm). De esta manera, se obtiene una energía del estado excitado triplete de CAP de 70 kcal/mol.

En vista de que sí se ha detectado emisión de CAP desde el estado excitado triplete, se concluye que el proceso de ISC sí se puede dar, al menos en matriz sólida de etanol. Sin embargo, conviene destacar que E_T de CAP es 5 kcal/mol superior a la energía de su estado excitado singlete (E_S), determinada anteriormente, con un valor de unos 65 kcal/mol. Este resultado explica por qué no se generan los estados excitados triplete: no se puede producir el cruce intersistemas ya que es termodinámicamente desfavorable, por ser $E_T > E_S$.

Con el fin de intentar formar $^3\text{CAP}^*$, se realizó un experimento de fotosensibilización utilizando un compuesto con una E_T superior a la de CAP. En este caso, se utilizó 2-metoxiacetofenona (MAP), cuya energía de triplete es de 75 kcal/mol. Así pues, se prepararon mezclas conteniendo CAP y MAP en condiciones donde la absorción de CAP a 355 nm fuera mínima, para que toda la luz la absorbiera MAP. De esta forma, la irradiación selectiva de MAP podría inducir la formación de $^3\text{CAP}^*$ por un proceso de transferencia de energía triplete-triplete, siendo MAP el dador y CAP el aceptor. Los resultados indican que no se observa ninguna

especie transitoria tras irradiar selectivamente a MAP en la mezcla MAP:CAP, por lo que no existen un proceso de transferencia de energía MAP→CAP para generar ³CAP*, por lo que dicha especie no se forma en disolución orgánica.

3.2. ESTUDIO DE LA FOTORREACTIVIDAD DE CAPMATINIB EN MEDIO ACUOSO Y EN PROTEÍNA.

Una vez estudiada la fotorreactividad de capmatinib en medio orgánico, y sabiendo que esta puede verse afectada por el microambiente que rodea al fármaco, se procedió a estudiar las propiedades fotofísicas de CAP en presencia de proteínas transportadoras, concretamente albúminas séricas y α -glicoproteínas ácidas. El motivo de realizar estos estudios se debe, principalmente, a que estas proteínas transportadoras son de las biomoléculas (junto al ADN) más críticas y susceptibles de sufrir daño fotoinducido por aquellos fármacos que puedan absorber luz UVA-vis, que es el caso de CAP. Así, las interacciones fármaco-proteína son muy importantes a causa de su intervención en procesos clave como la absorción, transporte, metabolismo y eliminación de los medicamentos, así como los mismos efectos farmacológicos de estos.²⁵

De este modo, para la realización de estos ensayos se han utilizado cuatro tipos diferentes de proteínas:

- Albúmina sérica humana (*human serum albumin*, HSA): Es una proteína de transporte en la sangre, encargada de transportar moléculas como hormonas, ácidos grasos y fármacos, además de mantener la presión osmótica. Posee tres dominios principales de unión de moléculas orgánicas (I, II y III), cada uno compuesto por dos subdominios (A y B). Este tipo de estructura resulta crucial para su capacidad de unión de diferentes ligandos. Está formada por una cadena polipeptídica compuesta por 585 aminoácidos, con un peso molecular medio de aproximadamente 66,5 kDa. Además, contiene 17 puentes disulfuro que estabilizan su estructura terciaria, y una cisteína con un grupo sulfhidrilo libre. Presenta principalmente tres sitios de unión: el sitio I, preferido por ligandos como la warfarina y algunos fármacos; el sitio II, que une benzodiazepinas y otros compuestos; y el sitio III, que se descubrió recientemente, pero se ha observado que puede unir lípidos y pequeños compuestos ligandos, incluyendo fármacos TKIs.²⁶

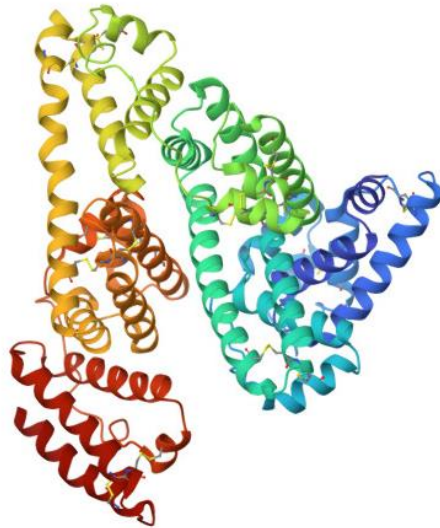


Figura 14. Estructura terciaria de la proteína HSA.²⁷

- Albúmina sérica bovina (*bovine serum albumin, BSA*): Es una proteína de transporte en la sangre, y es muy utilizada en investigaciones debido a sus propiedades de unión y estabilidad. Esta proteína tiene una estructura similar a HSA, con tres dominios principales (I, II y III), cada uno subdividido en subdominios A y B. Está compuesta por una sola cadena polipeptídica de 583 aminoácidos, con un peso molecular medio de 69 kDa. Su estructura terciaria está estabilizada por 17 puentes disulfuro y una cisteína libre.²⁸

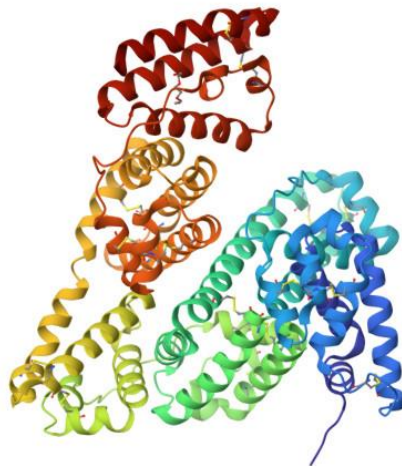


Figura 15. Estructura terciaria de la proteína BSA.²⁹

Aunque comparten un alto grado de similitud (aproximadamente el 76% de identidad en secuencia) con HSA, estas diferencias afectan a cómo interactúan con ciertos compuestos. Una de las principales diferencias que existe entre BSA y HSA es que, pese a tener ambas tres sitios de unión posibles donde pueden interactuar moléculas

orgánicas, como fármacos, las diferencias en la secuencia de aminoácidos y la configuración afectan la especificidad y afinidad hacia algunos ligandos. Por ejemplo, la proteína HSA presenta un solo triptófano en el sitio de unión I, mientras que BSA presenta dos triptófanos en su estructura.

- α_1 -glicoproteína ácida humana (*human α_1 -acid glycoprotein*, HAG): Es una proteína plasmática que actúa principalmente como transportadora de fármacos y otras moléculas lipofílicas en la sangre. Está formada por una cadena polipeptídica de aproximadamente 183-201 aminoácidos, dependiendo de la variante genética (ORM1 o ORM2) que codifique la proteína. El peso molecular oscila entre 41 y 43 kDa, donde la mayor parte de su masa corresponde a cadenas de carbohidratos. Su estructura primaria incluye varios residuos de cisteína que forman puentes disulfuro, estabilizando su estructura. La estructura tridimensional de la HAG genera cavidades específicas que permiten su interacción con moléculas pequeñas, y aunque únicamente presenta un sitio de unión (haciendo que esta tenga una especificidad más restringida), su capacidad de unirse a fármacos básicos es superior a otras proteínas como la HSA.³⁰

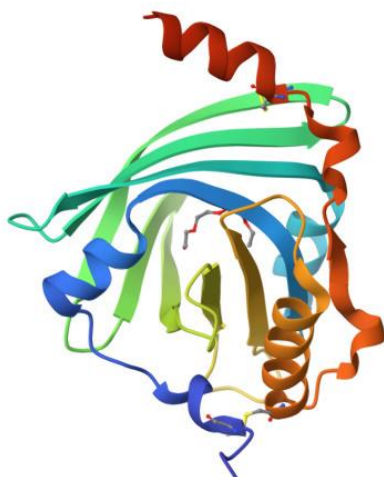


Figura 16. Estructura terciaria de la proteína HAG.³¹

- α_1 -glicoproteína ácida bovina (*bovine α_1 -acid glycoprotein*, BAG): Tiene la misma función que la HAG, pero en bovinos. Está compuesta por una cadena polipeptídica de aproximadamente 183-201 aminoácidos (dependiendo de la variante específica), y tiene un peso molecular de 40-50 kDa, dependiendo del grado de glicosilación. Presenta un único sitio de unión, con características hidrofóbicas que favorecen la interacción con moléculas lipofílicas. Presenta características muy similares a las de la HAG, aunque las diferencias en los aminoácidos presentes en la cavidad de unión pueden afectar a la afinidad y selectividad de algunos ligandos específicos.³²

Dado que se desconoce el comportamiento fotoquímico y fotofísico de CAP en medio biológico, se ha realizado un estudio completo de éste en presencia de las cuatro proteínas anteriormente descritas: HSA, BSA, HAG y BAG.

En primer lugar, se realizó un estudio para caracterizar el grado de unión del fármaco a cada una de las proteínas, con el fin de determinar la relación molar del complejo fármaco/proteína. Para ello, se realizó un análisis de Job Plot para estudiar la estequiometría de los complejos CAP : proteína, como se detalla en el apartado 5. ANÁLISIS DE RESULTADOS. Tras el estudio, se verificó que el complejo formado para cada una de las proteínas sigue una relación molar 1 : 1; es decir, una molécula de fármaco se une a una molécula de proteína.

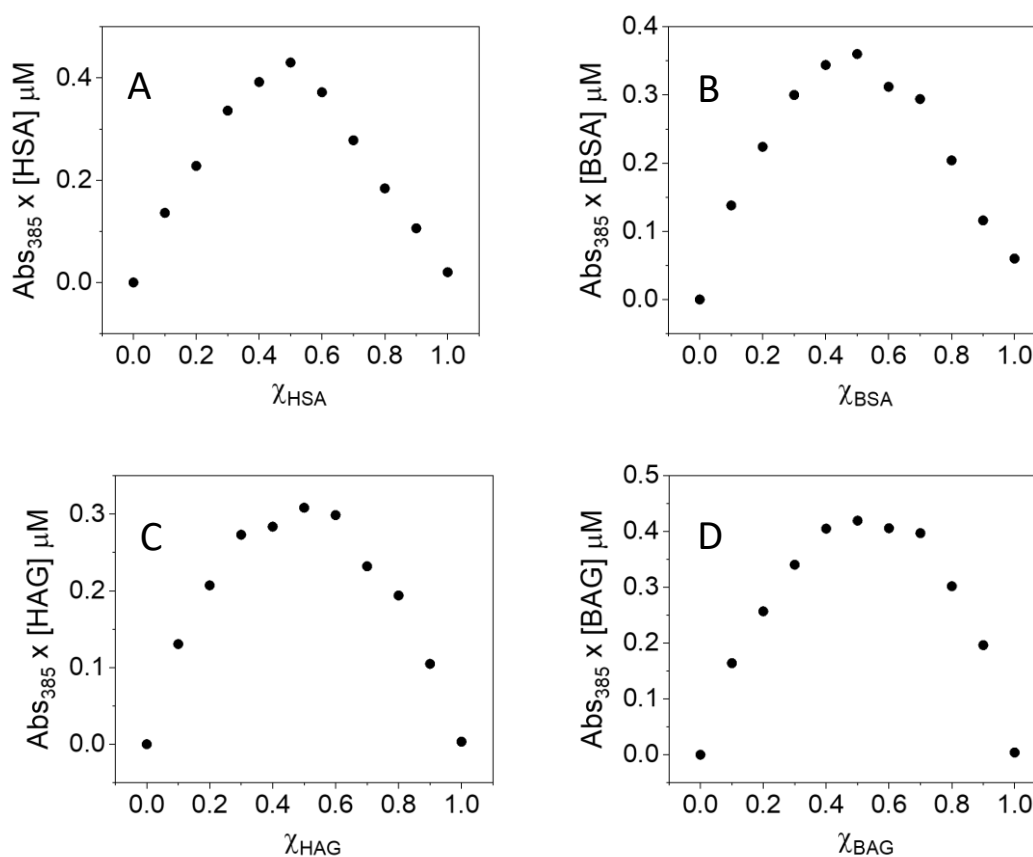


Figura 17. Análisis de Job Plot para la unión de CAP con HSA (A), BSA (B), HAG (C) y BAG (D).

Antes de empezar con los estudios fotofísicos de CAP en medio acuoso y biológico, se procederá, al igual que se ha realizado para el medio orgánico, a realizar un estudio sobre la reactividad/estabilidad fotoquímica del fármaco en estos medios, con el fin de observar si CAP sufre alguna degradación que deba tenerse en cuenta de cara al estudio de sus propiedades fotofísicas. Para ello, se ha irradiado CAP en un fotorreactor multilámpara a 350 nm en disolución acuosa de PBS y en presencia de HSA a una relación CAP/HSA de 1:1; el progreso de degradación/reacción del fármaco se ha seguido por espectroscopía de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 340$ nm), tal y como se ha detallado anteriormente en medio orgánico.

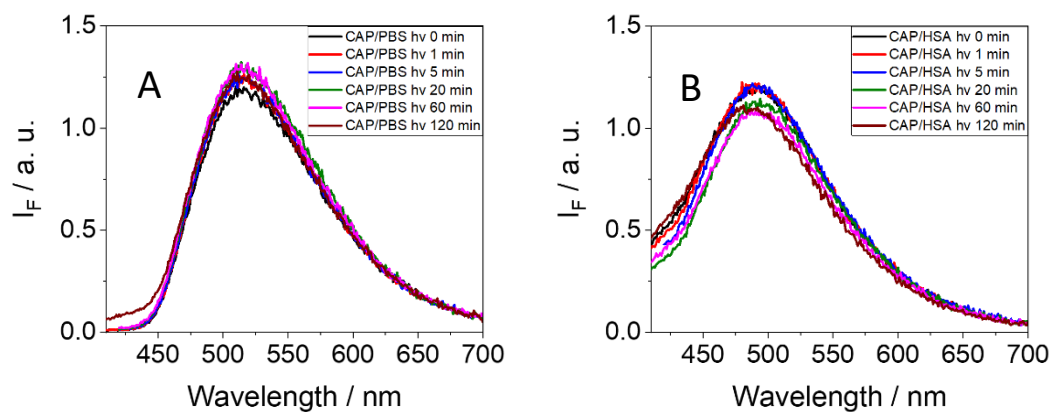


Figura 18. Espectros de fluorescencia de CAP en PBS (A) y CAP/HSA 1:1 (B) tras ser irradiado a distintos tiempos (1, 5, 20, 60 y 120 minutos) en un fotorreactor multilámpara a 350 nm.

Como se puede observar de la Figura 18, y al igual que se ha visto en medio orgánico, no se observan diferencias significativas en los espectros de fluorescencia de CAP tras ser irradiado libre en disolución de PBS o en el interior de HSA, por lo que se puede concluir que el fármaco también es estable fotoquímicamente en medio acuoso y en medio proteico. Aunque se puede observar alguna mínima diferencia en los espectros de emisión tras ser irradiado (sobre todo en presencia de la proteína HSA), esta no es suficiente para concluir que se produzca alguna degradación del fármaco en su estructura química. Conviene resaltar que convendría extender dicho estudio a las otras proteínas BSA, HAG y BAG (en este caso no se ha podido hacer por falta de tiempo).

Una vez realizados los análisis previos, y concluyendo que los resultados que se obtendrán a continuación no se verán afectados por la fotodegradación de CAP, se realizará un estudio completo sobre sus propiedades fotofísicas libre en disolución PBS y en presencia de HSA, BSA, HAG y BAG.

La Figura 19 muestra los espectros de absorción de CAP y de proteína libres en disolución de PBS, así como los espectros de los complejos CAP/proteína. Además, también se muestran los espectros de absorción teóricos que deberían obtenerse en ausencia de interacciones CAP-proteína en el estado fundamental. Estos espectros se han obtenido por la suma matemática de los espectros de CAP y proteína libres en disolución PBS.

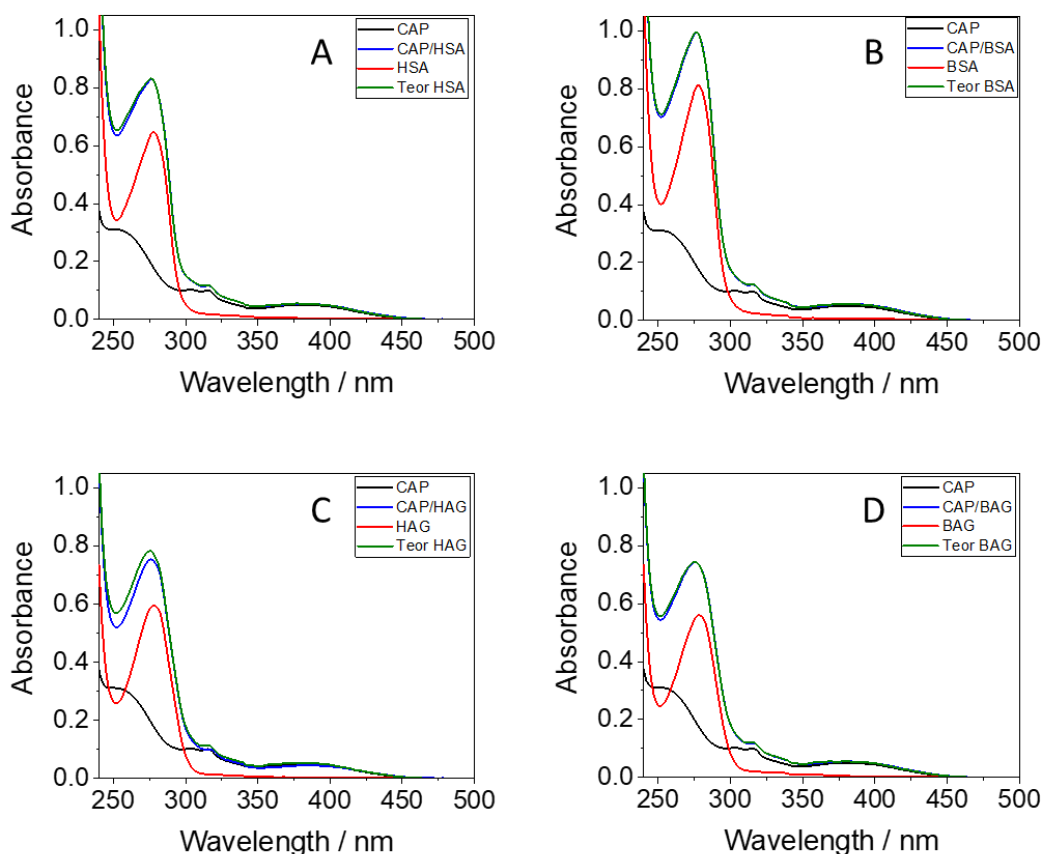


Figura 19. Espectros de absorción UV-vis de CAP (negro), proteína (rojo), y del complejo CAP/proteína (azul) para HSA (A), BSA (B), HAG (C) y BAG (D). Además, se muestra el espectro de absorción teórico (verde) que debería obtenerse en ausencia de interacciones CAP-proteína en el estado fundamental, el cual se ha obtenido por suma matemática del espectro de absorción de CAP (negro) con el espectro de absorción de la proteína (rojo).

Como se puede apreciar, en los casos de la disolución del fármaco con HSA, BSA y BAG, la forma del espectro experimental coincide en gran parte con el obtenido teóricamente, mientras que en el caso de CAP con HAG se observan pequeñas diferencias, quedando el espectro de absorción teórico algo por encima del experimental. Esta diferencia puede deberse muy probablemente a la formación de un complejo en el estado fundamental entre CAP y HAG. Este tipo de complejos podría derivar de la interacción particular entre el fármaco con alguno de los aminoácidos presentes en la cavidad de unión de la proteína HAG. Para confirmar estos resultados, se repitió el experimento varias veces con diferentes disoluciones y usando muestras de distintos lotes, obteniéndose en todo momento resultados muy similares, por lo que la diferencia observada en los espectros de absorción no deriva de ningún error experimental ni de ninguna impureza, sino que es un resultado reproducible y por tanto válido. Este tipo de complejos puede venir determinado por la orientación de CAP en el sitio de unión de HAG, teniendo una conformación distinta a la que debe tener con las demás proteínas (HSA, BSA, y BAG). Estos resultados convendría que se corroborasen mediante estudios teóricos de dinámica molecular (lo cual está fuera del objetivo inicial de este TFG).

Con el fin de intentar entender mejor la formación de dicho complejo fármaco/proteína en el estado fundamental, la figura 20 muestra el espectro que corresponde de la diferencia entre el

espectro de absorción teórico y experimental de la mezcla CAP/HAG. Como se puede observar, se define claramente un espectro de absorción con un máximo sobre 260 nm y una banda desestructurada en el rango de 300 a 420 nm asociada a dicho complejo en el estado fundamental.

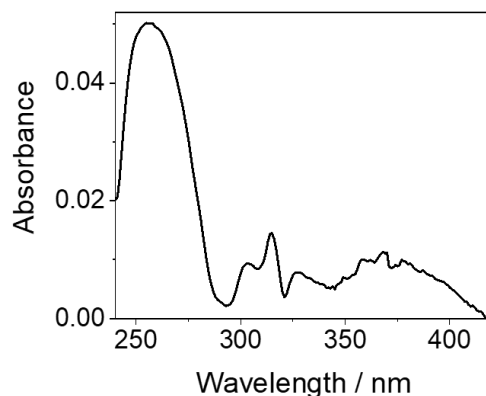


Figura 20. Espectro de absorción UV-vis obtenido de la resta matemática del espectro CAP/HAG teórico (traza verde de la figura X6) con el de CAP/HAG experimental (traza azul de la figura X6).

Con el fin de profundizar en el estudio de las propiedades fotofísicas de CAP en medio proteico, se procedió a estudiar la fluorescencia de CAP en PBS y en presencia de proteína tras excitar selectivamente al fármaco a 340 nm (a esta longitud de onda la proteína no absorbe luz, por lo que los resultados obtenidos derivan de CAP en su estado excitado).

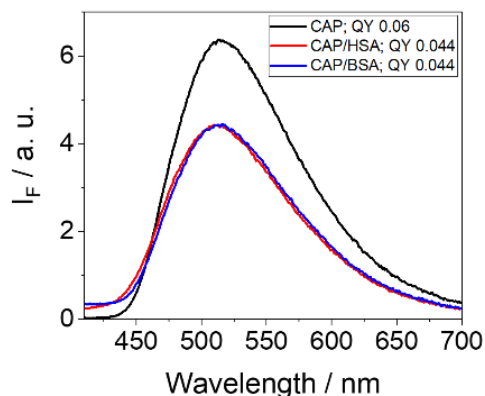


Figura 21. Espectros de fluorescencia de CAP en PBS (negro), CAP/HSA (rojo) y CAP/BSA (azul) tras excitar selectivamente al fármaco a 340 nm.

Como se puede observar en la figura 21, los máximos de emisión de CAP en presencia de proteína se desplazan ligeramente a longitudes de onda menores, lo cual puede deberse a la distinta polaridad de CAP libre en disolución PBS a la del sitio de unión de la proteína. Además, se puede observar que el rendimiento cuántico de fluorescencia del fármaco libre en disolución de PBS es ligeramente superior al obtenido cuando se encuentra unido a HSA o a BSA. Esto puede deberse a la existencia de un proceso de desactivación de la fluorescencia del estado excitado singlete de CAP ($^1\text{CAP}^*$) cuando éste interacciona con la proteína.

Adicionalmente, también se midieron los espectros de emisión del fármaco en PBS y unido a las proteínas HAG y BAG, donde los resultados, como se muestra en la siguiente figura, fueron algo diferentes.

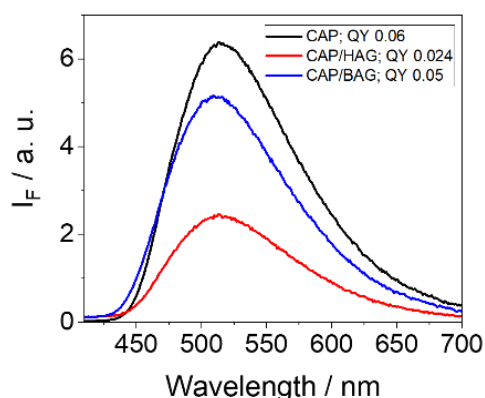


Figura 22. Espectros de fluorescencia de CAP en PBS (negro), CAP/HAG (rojo) y CAP/BAG (azul) tras excitar selectivamente al fármaco a 340 nm.

Como se puede observar, existe una cierta desactivación de la fluorescencia del fármaco unido a BAG con respecto a la emisión obtenida en PBS (como también se puede observar en los rendimientos cuánticos de emisión), siendo esta diferencia muy similar a la observada en las proteínas HSA y BSA. Sin embargo, esta desactivación es mucho mayor cuando el fármaco está unido a la proteína HAG. Esto puede deberse a las diferencias observadas con anterioridad en el espectro de absorción ultravioleta visible, que como se ha explicado en el anterior apartado, indica que se puede estar generando un complejo CAP/HAG desde el estado fundamental, y que ésta sea la causa de la menor emisión del fármaco unido HAG. Este resultado lógicamente se refleja en los valores de rendimientos cuánticos, siendo notoriamente menor para CAP en HAG que en cualquiera de las demás proteínas.

A continuación, con el fin de estudiar con mayor profundidad el proceso de desactivación de la fluorescencia del fármaco en presencia de proteína, se realizaron medidas cinéticas tanto en disolución acuosa como en medio proteico, excitando a la misma longitud de onda a la que se ha realizado el ensayo anterior (340 nm).

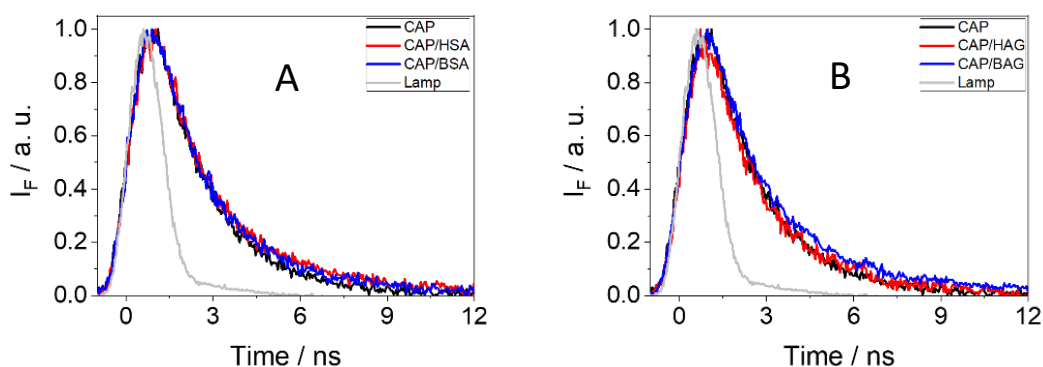


Figura 23. A) Cinéticas de fluorescencia de CAP en PBS (negro), CAP/HSA (rojo) y CAP/BSA (azul). B) Cinéticas de fluorescencia de CAP en PBS (negro), CAP/HAG (rojo) y CAP/BAG (azul).

Analizando estos perfiles cinéticos, se puede observar que los tiempos de vida medio del fármaco libre en disolución PBS y unido a cualquiera de las proteínas son muy similares entre sí. Esto nos indica que los procesos de desactivación de la fluorescencia de CAP no son de naturaleza dinámica, por lo que la desactivación de $^1\text{CAP}^*$ unido a la proteína no viene por un proceso de transferencia de energía ni electrónica. En vista de que dicha desactivación se observa únicamente en los espectros de emisión y no en sus cinéticas, se concluye que se debe principalmente a un proceso estático, por lo que debe derivar de la formación de complejos CAP/proteína desde el estado fundamental, siendo dichos complejos mucho más importantes en HAG, como se deduce de la mayor desactivación de $^1\text{CAP}^*$ en esta proteína, así como de la detección de la absorción de dicho complejo por espectroscopía UV.

Analizando los resultados obtenidos en los apartados anteriores, se confirma que el fármaco en medio biológico es capaz de formar un complejo en el estado fundamental que favorezca la desactivación de la fluorescencia del fármaco. Este complejo se podría formar en cualquiera de las cuatro proteínas, ya que a pesar de que los mayores cambios se han detectado en presencia de HAG (lo cual es consecuencia de que en presencia de esta proteína se forme en mayor proporción), en las demás proteínas también se han detectado ligeros cambios, sobre todo en el ensayo de emisión de fluorescencia (disminuyendo su rendimiento cuántico en comparación con el CAP en disolución acuosa).

Por otro lado, en muchas investigaciones a nivel químico y biológico se estudian procesos de transferencia de energía entre un fármaco y una proteína. Por este motivo, y para estudiar si existen procesos de transferencia energética entre el CAP y las proteínas estudiadas, se ha llevado a cabo un ensayo a una longitud de onda de excitación donde la proteína también absorbe parte de luz (y no solamente el fármaco, como en los ensayos realizados con anterioridad). La longitud de onda elegida para este estudio ha sido 295 nm.

Al igual que se ha explicado con anterioridad para los espectros de absorción, es posible calcular de manera teórica el espectro de emisión de CAP unido a proteína en ausencia de interacciones entre ambas unidades teniendo en cuenta la cantidad de luz que absorbe el fármaco en disolución acuosa y la cantidad de luz que absorbe la proteína. Así pues, la Figura 24 muestra los espectros de emisión de CAP y HSA libres en disolución de PBS, así como el espectro de emisión del fármaco unido a la proteína, comparándose con el que se obtendría teóricamente en ausencia de interacción CAP/Proteína.

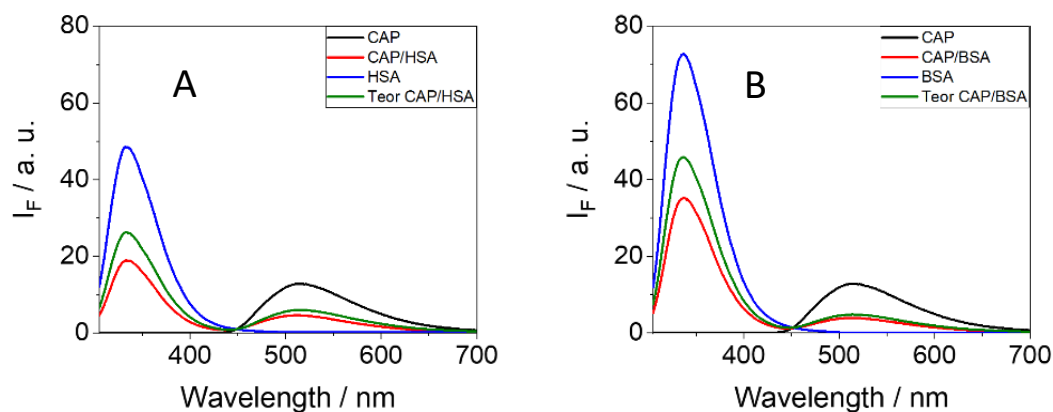


Figura 24. Espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 295$ nm) de CAP (negro), proteína (azul), y del complejo CAP/proteína (rojo) para HSA (A) y BSA (B). Además, se muestra el espectro de emisión teórico (verde) que debería obtenerse en ausencia de interacciones CAP-proteína teniendo en cuenta la emisión de fármaco y proteína libres en disolución junto con la cantidad de luz que absorbe CAP y proteína de forma individual.

Como se puede observar de la figura anterior, la emisión asociada a la proteína, con máximo sobre 340 nm, para el sistema CAP/proteína es menor que la observada teóricamente. Esto indica que puede existir un proceso de transferencia de energía proteína \rightarrow CAP. Este resultado se observa tanto para HSA como para BSA. Conviene mencionar que la emisión observada a 510 nm, asociada a $^1\text{CAP}^*$, es muy similar a la detectada previamente tras excitar selectivamente al fármaco a 340 nm, lo que confirma la robustez de los resultados obtenidos.

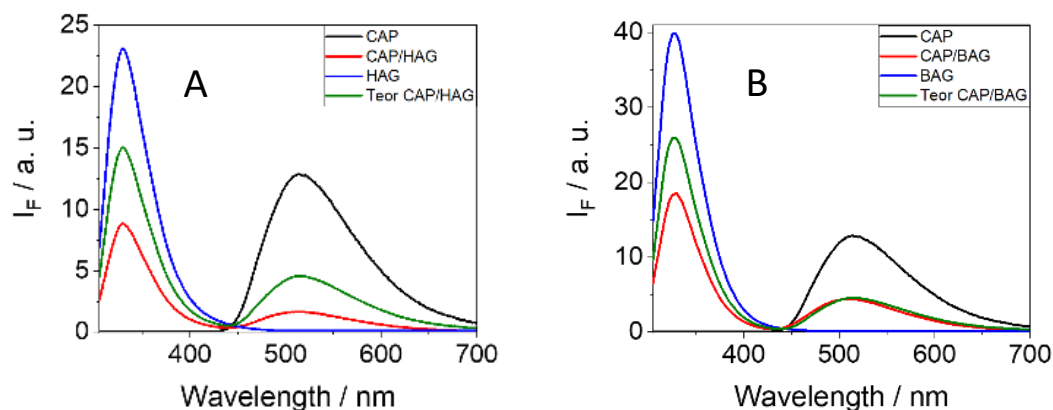


Figura 25. Espectros de emisión ($\lambda_{exc} = 295$ nm) de CAP (negro), proteína (azul), y del complejo CAP/proteína (rojo) para HAG (A) y BAG (B). Además, se muestra el espectro de emisión teórico (verde) que debería obtenerse en ausencia de interacciones CAP-proteína teniendo en cuenta la emisión de fármaco y proteína libres en disolución junto con la cantidad de luz que absorbe CAP y proteína de forma individual.

Para el caso de las proteínas HAG y BAG, como se puede observar en estas figuras, sucede algo muy parecido a lo detectado para HSA y BSA: así pues, se observa una menor emisión

correspondiente a la proteína cuando CAP está unido a HAG y/o BAG, lo cual se asocia a un proceso de transferencia de energía de HAG (o BAG) a CAP. Por otro lado, la emisión detectada a 510 nm coincide con la observada tras excitar selectivamente a 340 nm, confirmando de nuevo la solidez de los resultados obtenidos.

Una vez caracterizada la fluorescencia de CAP en las cuatro proteínas, se va a realizar un estudio haciendo uso de la técnica de fotólisis de destello láser, como se ha hecho anteriormente en medio orgánico. Este ensayo se ha realizado a una longitud de onda de excitación de 355 nm. A continuación, se muestran las figuras con los resultados obtenidos:

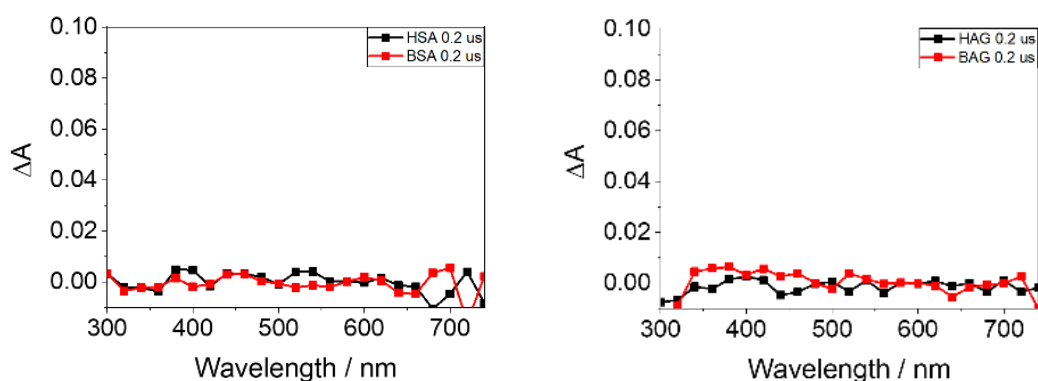


Figura 26. Espectros de FDL registrados a 0.2 μ s tras el pulso del láser tras excitar CAP a 355 nm en MeCN/N₂ junto con HSA (negro) y BSA (rojo) en la figura A y junto con HAG (negro) y BAG (rojo) en la figura B.

Como se puede observar en las gráficas anteriores, en medio proteico tampoco se detecta ninguna especie de absorción transitoria a escala de microsegundos. Esto quiere decir que no se observa la formación de ³CAP* en medio proteico. Como se ha explicado anteriormente, si se dispusiera del equipo de absorción transitoria a escala de femtosegundo se podrían estudiar otros procesos fotoinducidos y detectar la formación de especies de tiempo de vida muy corto (fs-ps).

Finalmente, y con el fin de profundizar en el estudio de las interacciones CAP/proteína, se han realizado distintos experimentos fotofísicos para determinar la fuerza de unión o constantes de unión (K_b , *binding constants*) entre CAP y cada una de las proteínas. Estos experimentos se han realizado haciendo uso de técnica de absorción UV-vis, y de los resultados obtenidos se han podido calcular las constantes de unión empleando un análisis de Scatchard modificado, el cual se explica detalladamente en el APARTADO 5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

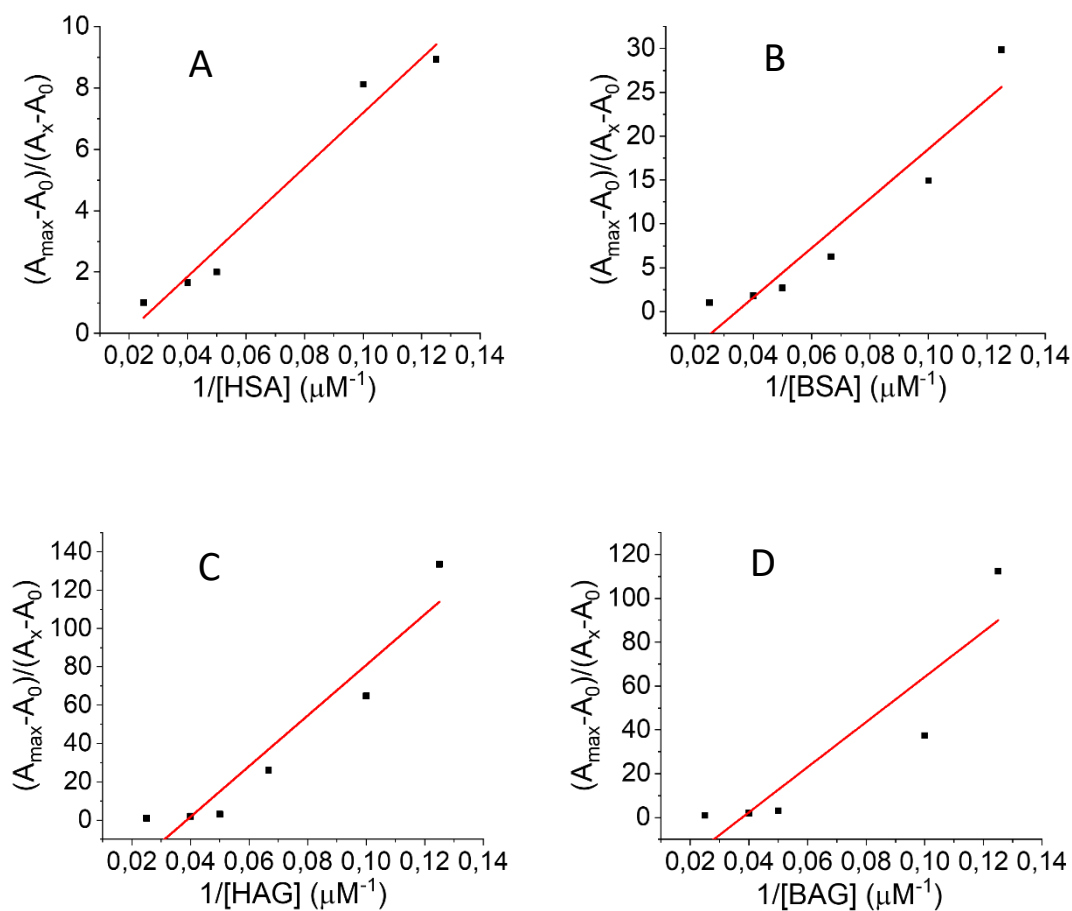


Figura 27. Ajuste lineal del análisis gráfico de Scatchard modificado para determinar las constantes de unión para CAP en HSA (A); BSA (B); HAG (C) y BAG (D) en PBS (medidas de absorción UV-vis).

A partir del análisis de regresión lineal explicado en el APARTADO 5, y haciendo uso de la ecuación V, se pudieron determinar los distintos valores de K_B de CAP con HSA, BSA, HAG y BAG (Tabla 1).

	K_B (M^{-1})
HSA	$1,1 \times 10^4$
BSA	$3,5 \times 10^3$
HAG	$7,5 \times 10^2$
BAG	$1,0 \times 10^3$

Tabla 1. Valores de K_B de CAP con las distintas proteínas.

Como se puede observar, la fuerza de interacción de CAP difiere considerablemente en función de la proteína, siendo mayor para HSA que para el resto de proteínas. Estos valores se han obtenido de unos ajustes de regresión con bastante error, como se puede observar de la figura

27, por lo que son resultados que no pueden considerarse definitivos sino que deberían repetirse e incluso medirse usando la técnica de fluorescencia, con el fin de comparar los resultados con ambas técnicas.

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES

A lo largo de este trabajo de investigación, se ha llevado a cabo un completo estudio fotofísico y fotoquímico del fármaco capmatinib, utilizado para combatir el cáncer de pulmón. Las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de este fármaco eran desconocidas, y aunque se sabe que fármacos de la familia TKIs, como CAP, pueden inducir daño fotobiológico al absorber luz solar, los procesos causantes de dicho daño no se habían investigado. Por ello, se ha seleccionado CAP en este Trabajo de Fin de Grado, con el fin de estudiar los procesos fotoinducidos que tienen lugar tras la absorción de luz UV-vis, así como sus propiedades fotofísicas en medio orgánico, acuoso y en presencia de proteínas transportadoras.

Se ha observado que CAP es fotoquímicamente estable cuando es irradiado en medio orgánico, ya que no se degrada ni genera FP. Se ha caracterizado el estado excitado singlete de CAP ($^1\text{CAP}^*$), con una energía de 65 kcal/mol, mostrando un máximo de emisión sobre 510 nm y con un tiempo de vida del orden de 3 - 5,6 nanosegundos, dependiendo del disolvente orgánico. Se puede observar una ligera diferencia entre el comportamiento del fármaco en función de la polaridad de los disolventes, teniendo un rendimiento cuántico mayor en tolueno (disolvente apolar) que en el resto de los disolventes, que son mucho más polares. Esto puede deberse a que los procesos no radiantes sean más eficientes en disolventes polares.

No se ha detectado ninguna especie de absorción transitoria debido a que el proceso de ISC está impedido ya que la energía de triplete de CAP ($^3\text{CAP}^*$) es mayor que la energía de $^1\text{CAP}^*$ (70 vs. 65 kcal/mol, respectivamente). Además, $^3\text{CAP}^*$ tampoco se pudo formar por fotosensibilización con MAP, por lo que el estado excitado triplete de CAP no se pudo detectar de ninguna de las maneras. Sería necesario realizar experimentos de absorción transitoria a escala de fs para poder estudiar los procesos fotoinducidos ultrarrápidos.

Adicionalmente, se ha estudiado la fotorreactividad de CAP en proteínas transportadoras. Se ha observado que la relación molar fármaco:proteína es 1:1; lo cual significa que cada molécula de fármaco se une a una sola molécula de proteína. A continuación, tras comprobar la estabilidad fotoquímica del CAP en medio acuoso y en medio proteico (lo cual asegura que los resultados obtenidos no se producirán por la fotodegradación del fármaco), se procedió a realizar un estudio completo sobre la fotorreactividad de este, caracterizando los procesos fotofísicos que tienen lugar en el mismo. Se ha observado un proceso de desactivación de $^1\text{CAP}^*$ que se asocia a la formación de un complejo en el estado fundamental; este proceso es mucho más eficiente en HAG que en el resto de proteínas, ya que en este caso se ha observado la formación de dicho complejo por absorción UV, y además se ha detectado una mayor desactivación de $^1\text{CAP}^*$. Asimismo, se han detectado procesos de transferencia de energía proteína \rightarrow CAP cuando se irradia a 295 nm. Finalmente, se han determinado (aunque con cierto error, por lo que hay que repetir estos experimentos) las constantes de unión

CAP/proteína, observándose mayor fuerza de interacción del fármaco con HSA. Además, como ya se detectó en medio orgánico, no se observó la formación de ³CAP* en medio proteico.

Para finalizar este estudio y terminar de caracterizar el tipo de daño fotoinducido que puede provocar el CAP en medio biológico, el siguiente paso sería la realización de ensayos de fototoxicidad, de fotocarcinogenicidad y de fotooxidaciones inducidas por CAP en medio biológico, que no se han podido llevar a cabo en la realización de este Trabajo de Fin de Grado por falta de tiempo. Este tipo de ensayos, algo más avanzados, mostrarían si se genera algún daño al ADN molecular, al ADN celular, así como a la membrana plasmática de células FSK.

CAPÍTULO 5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.1. MEDIDAS ESPECTROSCÓPICAS

➤ **5.1.1. Espectrofotometría de absorción UV.**

Para la obtención de los espectros de absorción UV-visible se utilizó un espectrofotómetro Cary 60 (Agilent) a concentraciones del fármaco 2 μ M, las cuales se prepararon a partir de una disolución madre de CAP en DMSO 2 mM. Para la preparación de los complejos fármaco/proteína, se usaron mezclas de relación molar 1 : 1 en PBS.

Para medir cada una de las muestras, estas se introdujeron en cubetas de cuarzo con un paso óptico de 1 cm y una capacidad de 4 mL. Previamente a cada medición, se registró la transmitancia del disolvente correspondiente para tomarlo de referencia.

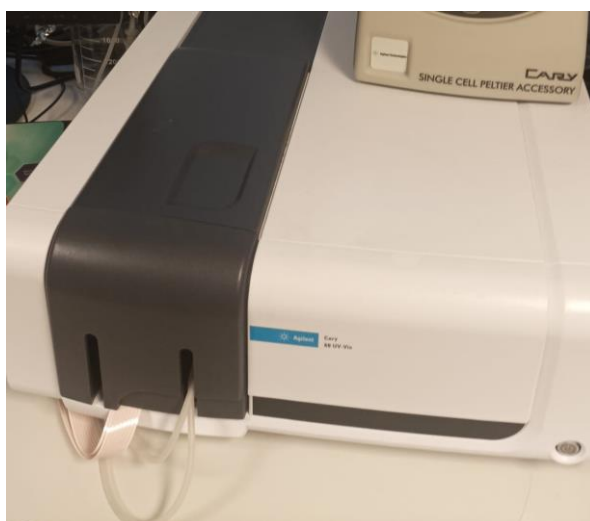


Figura 28. Espectrofotómetro de absorción ultravioleta-visible Cary 60 (Agilent).

➤ **5.1.2. Espectroscopía de fluorescencia.**

La espectroscopía de fluorescencia es un tipo de espectroscopía basada en la emisión fluorescente de una muestra. Se utiliza un haz de luz ultravioleta que excita los electrones en ciertas moléculas. Con este experimento se puede extraer información acerca de los excitados, generalmente de moléculas orgánicas. Durante la realización de este trabajo se han realizado dichas mediciones en estado estacionario.

Para realizar las mediciones en estado estacionario, se ha empleado un espectrofotómetro Edinburgh F55 provisto de un monocromador en el intervalo de longitudes de onda 400-700 nm, con una longitud de onda de excitación de 340 nm a 25 °C. Dicha emisión se registra en ángulo recto con respecto a la excitación para evitar interferencias, y se detecta mediante un fotomultiplicador que muestra la señal en la pantalla del ordenador.



Figura 29. Fluorímetro Edinburgh F55.

Con los datos obtenidos mediante este experimento, se pudieron obtener los rendimientos cuánticos de fluorescencia (ϕ_F) a través de la **ecuación I**, utilizando como referencia una disolución de antraceno en etanol.

$$\phi_F = \phi_{F_{ref}} \cdot \frac{A}{A_{ref}} \cdot \frac{Abs_{ref}}{Abs} \cdot \left(\frac{n}{n_{ref}} \right)^2 \quad (I)$$

En esta ecuación, A y A_{ref} son las áreas de los espectros de emisión de la muestra correspondiente al estudio y de la muestra de referencia, respectivamente; Abs y Abs_{ref} son la absorbancia de la muestra y de la referencia, respectivamente; y por último n y n_{ref} son el índice de refracción del disolvente utilizado en la disolución de la muestra y de la referencia, respectivamente.

También se han determinado las energías del estado excitado singlete a partir de los espectros de emisión obtenidos tras excitar a 340 nm, y los espectros de excitación registrados a la longitud de onda máxima registrada durante el ensayo del espectro de emisión. De esta forma, con el valor de longitud de onda correspondiente a la intersección entre ambos espectros normalizados, y utilizando la ecuación de Planck (**ecuación II**).

$$E \left(\frac{kcal}{mol} \right) = \frac{N_A}{4184} \cdot h \cdot \frac{c}{\lambda_{int}} \quad (II)$$

En la ecuación anterior, el término N_A es el número de Avogadro ($6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), h es la constante de Planck, que tiene un valor de $6,63 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$; y c es la velocidad de la luz en el vacío ($3 \times 10^8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$).

En lo referente a las medidas de cinéticas de fluorescencia, se realizaron utilizando un sistema EasyLife X que contenía un compartimento de muestra compuesto por un soporte de cubeta peltier capaz de controlar la temperatura de registro, una fuente de excitación LED y un detector de tiempo de vida ubicado de forma perpendicular a la fuente de excitación. Dichas mediciones se realizaron a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ aplicando una fuente de excitación LED de 340 nm , con un filtro de emisión de WG370 para eliminar señales por debajo de 370 nm y poder evitar interferencias del haz de excitación en la señal registrada.



Figura 30. Espectrofluorímetro de resolución temporal EasyLife X.

Los datos extraídos de cada experimento se trataron mediante el uso de un sistema de deconvolución no lineal ajustado a una ecuación exponencial (**ecuación III**).

$$F(t) = \sum a_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad \text{(III)}$$

En ella, el símbolo F representa la fluorescencia con respecto al tiempo t ; a_i representa el coeficiente preexponencial correspondiente a cada término i del ajuste; y τ_i el tiempo de vida media, también con respecto a cada término i .

En los casos donde el perfil cinético no se ajusta al utilizar un ajuste monoexponencial, es necesario realizar un ajuste multiexponencial de orden 2 o superior, obteniéndose tiempos de vida diferentes. En los casos donde ha sido necesario este ajuste, se ha obtenido el tiempo de vida media según la **ecuación IV**.

$$\langle \tau_F \rangle = a_1 \cdot \tau_1 + a_2 \cdot \tau_2 \quad (\text{IV})$$

En esta ecuación, se obtiene el tiempo de vida media $\langle \tau_F \rangle$ mediante los tiempos de vida media calculados para cada una de las especies (τ_1 y τ_2); y los valores preexponenciales para cada término (a_1 y a_2).

➤ **5.1.3. Espectroscopía de fosforescencia.**

Las medidas de fosforescencia se realizaron en un espectrofotómetro de Photon Technology International (PTI, TimeMaster TM-2/2003) equipado con una lámpara Xe pulsada, la cual funcionaba en un modo resuelto en el tiempo con un retardo de 0.2 ms. Previo al muestreo, las muestras se disolvieron en etanol y se introdujeron en un tubo de cuarzo de 5 mm de diámetro y se enfriaron con nitrógeno líquido a 77 K. Una vez cristalizado, se realizaron las medidas con una longitud de onda de excitación de 300 nm.

➤ **5.1.4. Espectroscopía de absorción transitoria.**

Las medidas de fotólisis flash láser (LFP) se llevaron a cabo mediante el uso de un Nd:YAG pulsado L52137 V LOTIS TII a una longitud de onda de excitación de 355 nm. Los pulsos simples fueron de 10 ns de duración, y la energía de cada pulso fue de 12 mJ. El sistema de fotólisis láser comprendía un láser pulsado, un monocromador 77250 Oriel, y un osciloscopio DP04054 Tektronix.

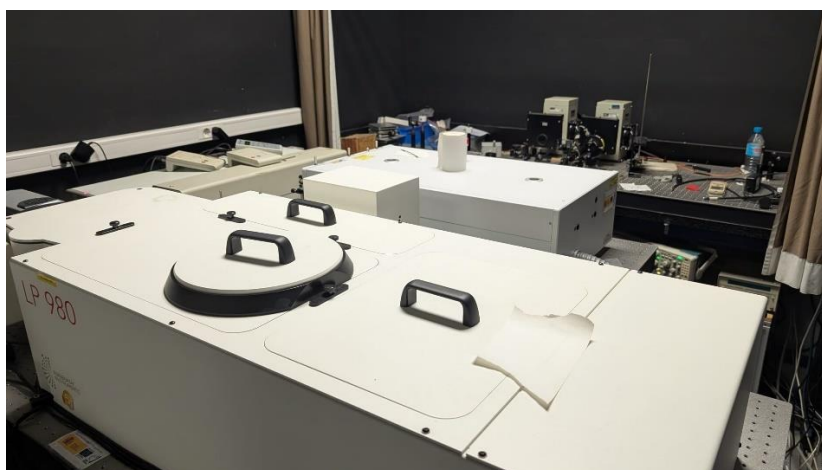


Figura 31. Equipo de fotólisis de destello láser.

Las muestras se prepararon en cubetas de cuarzo de 1 cm × 1 cm de paso de luz, y de 4 mL de capacidad, a temperatura ambiente. Cada una de las muestras se realizaron, además, en una atmósfera inerte de nitrógeno (N_2). Para ello, se burbujearon todas las disoluciones con N_2

durante 10 minutos. Se verificó en todos los casos que la degradación de las muestras tras la irradiación era inferior al 5%.

5.2. ANÁLISIS JOB PLOT

El análisis de Job Plot trata de estudiar la estequiometría de unión de un ligando con su respectiva proteína. Esto se puede determinar variando de forma continuada la relación molar entre el ligando y la proteína, pero manteniendo la concentración molar total constante. De esta forma, se midieron los espectros de absorción ultravioleta de disoluciones de fármaco junto a las proteínas, variando la relación molar ligando : proteína. Se realizaron un total de 10 medidas con cada proteína, de relaciones 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100. Tras ello, se representaron los valores de máximos de absorbancia de cada valor con la fracción molar de proteína utilizada en cada experimento, y con ello, como se ha explicado anteriormente, se ha obtenido que la estequiometría idónea para la formación de los complejos estudiados es de 1:1.

5.3. CONSTANTES DE BINDING

Para obtener el resultado de las constantes de *Binding*, también llamadas constantes de unión, es posible utilizar la espectroscopía de fluorescencia, la cual resulta muy útil dada su alta selectividad y sensibilidad. De esta forma, los valores de K_B han sido calculados aplicando un análisis de Scatchard modificado, a partir de medidas espectroscópicas de fluorescencia. Para ello, se utiliza un ligando a concentración constante, y a este se le van añadiendo cantidades de proteína cada vez mayores, asumiendo que no hay moléculas de ligando libres en disolución.

De esta forma, se realizaron medidas espectroscópicas de absorción para las disoluciones de CAP en DMSO a concentración constante de 6 μM , añadiéndose, como se ha indicado anteriormente, de manera progresiva pequeñas alícuotas de proteína en PBS, de concentración 2×10^{-3} M. Se obtuvieron unas concentraciones finales de 6, 8, 10, 15, 20, 25 y 40 μM para cada una de las proteínas (HSA, BSA, HAG y BAG). Tras la obtención de los espectros de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 340 nm; se aplicó el análisis de Scatchard modificado, utilizando la **ecuación V**.

$$\frac{A_{m\acute{a}x} - A_0}{A_x - A_0} = 1 + \frac{1}{K_B} \cdot [P]^{-1} \quad (\text{V})$$

En esta ecuación, $A_{m\acute{a}x}$ es el valor máximo de absorción correspondiente al máximo ligando unido posible, A_0 es el valor del máximo de absorción del ligando libre en disolución, y A_x es el valor del máximo de absorción a una concentración de proteína determinada $[P]$. Con estos valores, se obtiene el valor de K_B realizando un ajuste lineal a la ecuación anterior.

5.4. ESTUDIO FOTOQUÍMICO.

El estudio fotoquímico realizado nos ayuda a saber si el fármaco es estable fotoquímicamente, es decir, si sufre cambios en su estructura química al ser irradiado con luz ultravioleta A por un período de tiempo determinado. Para este experimento, concretamente, se utilizó una concentración 20 μM de CAP, disuelto en acetonitrilo, en PBS y en HSA. Se realizaron medidas de los espectros de fluorescencia de dicha disolución; primero sin ser irradiado, y después irradiándolo a 350 nm en un fotorreactor multilámpara durante 1 minuto, 5 minutos, 20 minutos, 1 hora y 2 horas, obteniendo un total de 18 medidas.

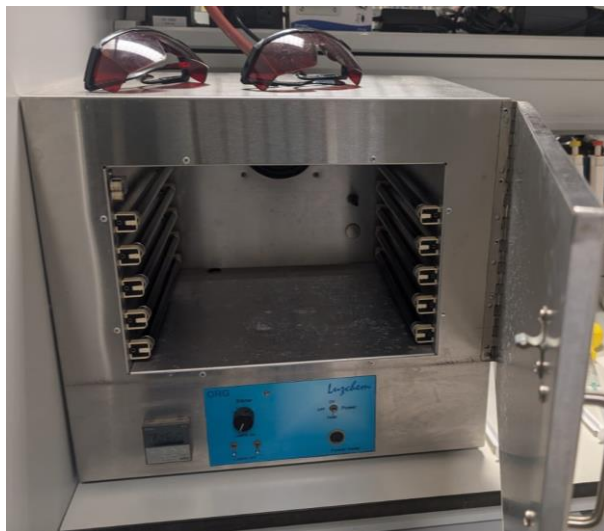


Figura 32. Fotorreactor multilámpara Luzchem.

CAPÍTULO 6. PRESUPUESTO

6.1. RESUMEN DEL PRESUPUESTO.

A continuación, se procede a exponer el presupuesto necesario para la realización de este Trabajo de Fin de Grado, para comprobar su viabilidad económica. El presupuesto de este proyecto incluye los principales gastos necesarios para su desarrollo, abarcando recursos humanos, reactivos, material y equipos empleados. Se ha considerado la inversión en personal para actividades específicas del proyecto, asegurando la correcta ejecución de cada etapa. Además, se han calculado los costes asociados a los reactivos requeridos para los procedimientos experimentales, así como los materiales consumibles utilizados. Por último, se han incluido los costes de mantenimiento de los equipos empleados, fundamentales para garantizar la calidad y precisión de los resultados. Este presupuesto está diseñado para optimizar los recursos disponibles y asegurar la viabilidad técnica y económica del trabajo.

6.2. PRESUPUESTO DEL ESTUDIO DEL CAPMATINIB EN DISOLUCIÓN ORGÁNICA.

En primer lugar, se detallará todo lo relacionado al estudio realizado sobre las propiedades fotofísicas y fotoquímicas del CAP en medio orgánico, utilizando los disolventes tolueno, acetonitrilo y etanol. Para la realización de este presupuesto, se dividirá en cuatro partes, que corresponden al personal, reactivos, materiales y equipos utilizados.

➤ **6.2.1. Personal**

El presupuesto del personal de la UPV que ha formado parte de la investigación llevada a cabo por este proyecto ha sido calculado de la siguiente forma:

$$\text{Importe (€)} = \text{Dedicación (h)} \cdot \text{Coste horario (€)}$$

El coste horario tanto del tutor como de mi cotutora ha sido fijado teniendo en cuenta las categorías laborales de ambos, el coste del autor del trabajo (estudiante del Grado de Ingeniería Química) se ha fijado en función del salario de ayuda económica propuesto para los estudiantes.

UNIDAD	DESCRIPCIÓN	MEDICIÓN	PRECIO	IMPORTE
U1	PERSONAL			3.784,00 €
h	Christian Tarín Moratalla (Estudiante de Ingeniería Química)	120	6,00 €	720,00 €
h	Ignacio Vayá Pérez (Profesor Titular de Universidad y tutor TFG)	40	38,30 €	1.532,00 €
h	Inmaculada Andreu Ros (Profesora Titular de Universidad y cotutora TFG)	40	38,30 €	1.532,00 €

Tabla 2. Presupuesto de personal para la realización de los ensayos en disolución orgánica.

➤ **6.2.2. Reactivos y disolventes.**

En este apartado se tendrá en cuenta la cantidad de reactivos y disolventes utilizados para la realización de los experimentos en disolución orgánica. Para ello, se ha tenido en cuenta la cantidad total que se ha utilizado en cada uno de los experimentos realizados, así como su precio unitario, consultado en las páginas web de los principales proveedores. De esta forma, se ha obtenido como resultado el siguiente coste:

UNIDAD	DESCRIPCIÓN	MEDICIÓN	PRECIO	IMPORTE
U2	REACTIVOS			652,00 €
g	Capmatinib	5	110,00 €	550,00 €
mL	DMSO	20	3,85 €	77,00 €
mL	MeCN	10	0,30 €	3,00 €
mL	EtOH	10	0,25 €	2,50 €
mL	Tol	10	1,23 €	12,30 €
mL	MAP	4	1,80 €	7,20 €

Tabla 3. Presupuesto de reactivos para la realización de los ensayos en disolución orgánica.

➤ **6.2.3. Material de laboratorio**

Se ha tenido en cuenta la cantidad de material de laboratorio que se ha utilizado, tanto el material de un solo uso como el material reutilizable, calculando el coste total que supone la realización de los ensayos realizados. El coste unitario de cada uno de los equipos se ha buscado en la página web de los principales comerciantes de estos productos, que en este caso han sido Daselab y VWR.

UNIDAD	DESCRIPCIÓN	MEDICIÓN	PRECIO	IMPORTE
U3	MATERIAL DE LABORATORIO			1.004,13 €
ud	Pipetas Pasteur - Daselab	10	0,06 €	0,60 €
ud	Gradilla para tubos de ensayo - Daselab	1	34,98 €	34,98 €
ud	Tubos de ensayo - Daselab	6	0,08 €	0,48 €
ud	Cubetas de cuarzo 4 MI - Daselab	6	123,42 €	740,52 €
ud	Puntas de micropipeta - Daselab	40	0,02 €	0,80 €
ud	Cuchara/espátula - Daselab	1	2,41 €	2,41 €
ud	Guantes de nitrilo - VWR	30	0,26 €	7,80 €
ud	Matraz esférico 50 mL - Daselab	1	3,03 €	3,03 €
ud	Soporte de corcho para matraz esférico - Daselab	1	3,99 €	3,99 €
ud	Micropipeta 100-1000 µL - Daselab	1	158,66 €	158,66 €
ud	Probeta graduada 10 mL - Daselab	1	3,45 €	3,45 €
ud	Probeta graduada 250 mL - Daselab	1	4,84 €	4,84 €
ud	Pinza de sujeción - Daselab	1	3,27 €	3,27 €
ud	Vial con tapón 5 MI - VWR	20	1,59 €	31,80 €
ud	Vaso de precipitados 100 mL - VWR	3	2,50 €	7,50 €

Tabla 4. Presupuesto del material de laboratorio utilizado para los ensayos en disolución orgánica.

➤ 6.2.4. Equipos

Para el cálculo de este apartado, se ha tenido en cuenta el coste total de la adquisición e instalación de cada uno de los equipos, y se ha calculado la amortización de cada uno de ellos, teniendo en cuenta su período de amortización y el tiempo de uso durante la realización de los ensayos. La amortización se ha calculado de la siguiente forma:

$$\text{Amortización} \left(\frac{\text{€}}{\text{h}} \right) = \text{Coste adquisición e instalación} \cdot \frac{1}{\text{Período amortización (horas)}}$$

Para ello, se ha considerado como período de amortización aquel establecido por la clasificación económica de gasto en la adquisición de equipos didácticos y de investigación, lo cual resultan ser diez años, teniendo en cuenta que en cada año hay 245 días laborables y su uso es de 8 horas al día. Por tanto, el período de amortización en horas resulta:

$$10 \text{ años} \cdot \frac{245 \text{ días}}{1 \text{ año}} \cdot \frac{8 \text{ horas}}{1 \text{ día}} = 19600 \text{ horas}$$

A partir de este resultado, se ha calculado la amortización de cada uno de los equipos utilizados, obteniendo los siguientes resultados:

UNIDAD	DESCRIPCIÓN	PERÍODO AMORTIZACIÓN (años)	COSTE	AMORTIZACIÓN (€/H)
h	Balanza analítica	10	994,90 €	0,05 €
h	Baño ultrasonidos digital	10	1.600,83 €	0,08 €
h	Espectrofotómetro JASCO V-360	10	10.000,00 €	0,51 €
h	Espectrofluorímetro Easy Life X	10	20.000,00 €	1,02 €
h	Fotólisis de destello láser (FDL)	10	200.200,00 €	10,21 €
h	Espectrofotómetro de fluorescencia JASCO FP-8500	10	28.000,00 €	1,43 €
h	Espectrofotómetro Photon Technology International	10	9.157,48 €	0,47 €

Tabla 5. Amortizaciones de los equipos utilizados en los ensayos en disolución orgánica.

Con el valor de la amortización de cada uno de estos equipos, se ha calculado, teniendo en cuenta las horas de uso que se le han dado, el importe total que ha supuesto la realización de los ensayos:

UNIDAD	DESCRIPCIÓN	MEDICIÓN	AMORTIZACIÓN (€/H)	IMPORTE
U4	EQUIPOS			69,62 €
h	Balanza analítica	4	0,05 €	0,20 €
h	Baño ultrasonidos digital	2	0,08 €	0,16 €
h	Espectrofotómetro JASCO V-360	8	0,51 €	4,08 €
h	Espectrofluorímetro Easy Life X	8	1,02 €	8,16 €
h	Fotólisis de destello láser (FDL)	4	10,21 €	40,86 €
h	Espectrofotómetro de fluorescencia JASCO FP-8500	10	1,43 €	14,29 €
h	Espectrofotómetro Photon Technology International	4	0,47 €	1,87 €

Tabla 6. Coste total del uso de equipos durante la realización de los ensayos en disolución orgánica.

➤ **6.2.5. Resumen costes experimentos en disolución orgánica**

A continuación, se mostrará una tabla resumen con los costes totales que han supuesto los ensayos realizados en disolución orgánica, teniendo un coste final total de 5509,75 €.

UNIDAD	DESCRIPCIÓN	IMPORTE
U1	PERSONAL	3.784,00 €
U2	REACTIVOS	652,00 €
U3	MATERIAL DE LABORATORIO	1.004,13 €
U4	EQUIPOS	69,62 €

Total	5.509,75 €
--------------	-------------------

Tabla 7. Resumen de costes de los ensayos realizados en disolución orgánica.

6.3. PRESUPUESTO DEL ESTUDIO DEL CAPMATINIB EN MEDIO ACUOSO Y BIOLÓGICO.

A continuación, para finalizar el presupuesto, se detallarán aquellos gastos asociados al estudio fotofísico y fotoquímico que se ha realizado sobre el CAP en medio acuoso y en medio biológico, disuelto en las proteínas HSA, BSA, HAG y BAG. Al ser muy parecido al visto en el apartado anterior, no se repetirán muchas de las explicaciones que ya han sido mencionadas con anterioridad. Así pues, el siguiente presupuesto también constará de cuatro apartados: el personal, los reactivos, el material de laboratorio y los equipos utilizados.

➤ **6.3.1. Personal**

El total de gasto del personal ha sido el siguiente:

UNIDAD	DESCRIPCIÓN	MEDICIÓN	PRECIO	IMPORTE
U1	PERSONAL			5.676,00 €
h	Christian Tarín Moratalla (Estudiante de Ingeniería Química)	180	6,00 €	1.080,00 €
h	Ignacio Vayá Pérez (Profesor Titular de Universidad y tutor TFG)	60	38,30 €	2.298,00 €
h	Inmaculada Andreu Ros (Profesora Titular de Universidad y cotutora TFG)	60	38,30 €	2.298,00 €

Tabla 8. Presupuesto de personal para la realización de los ensayos en medio acuoso y biológico.

➤ **6.3.2. Reactivos y disolventes**

El importe total de los reactivos que se han gastado durante los ensayos se desglosa así:

UNIDAD	DESCRIPCIÓN	MEDICIÓN	PRECIO	IMPORTE
U2	REACTIVOS			2.199,00 €
g	Capmatinib	5	110,00 €	550,00 €
mL	DMSO	20	3,85 €	77,00 €
g	HSA	2	443,00 €	886,00 €
g	BSA	2	1,35 €	2,70 €
g	HAG	2	41,40 €	82,80 €
g	BAG	2	300,00 €	600,00 €
mL	PBS	10	0,05 €	0,50 €

Tabla 9. Coste de los reactivos utilizados durante los ensayos en medio acuoso y biológico.

➤ **6.3.3. Material de laboratorio**

El coste total en material de laboratorio se muestra en la siguiente tabla:

UNIDAD	DESCRIPCIÓN	MEDICIÓN	PRECIO	IMPORTE
U3	MATERIAL DE LABORATORIO			550,78 €
ud	Pipetas Pasteur - Daselab	10	0,06 €	0,60 €
ud	Cubetas de cuarzo 4 MI - Daselab	4	123,42 €	493,68 €
ud	Puntas de micropipeta - Daselab	50	0,02 €	1,00 €
ud	Guantes de nitrilo - VWR	30	0,26 €	7,80 €
ud	Vial con tapón 5 MI - VWR	30	1,59 €	47,70 €

Tabla 10. Gastos en material de laboratorio durante la realización de los ensayos en medio acuoso y biológico.

➤ **6.3.4. Equipos**

En primer lugar, como se ha hecho en el anterior apartado, se calculará la amortización de cada uno de los equipos, para después calcular el coste final que ha supuesto su uso.

Título del Trabajo Fin de Grado

UNIDAD	DESCRIPCIÓN	PERÍODO AMORTIZACIÓN (años)	COSTE	AMORTIZACIÓN (€/H)
h	Balanza analítica	10	994,90 €	0,05 €
h	Baño ultrasonidos digital	10	1.600,83 €	0,08 €
h	Espectrofotómetro JASCO V-360	10	10.000,00 €	0,51 €
h	Espectrofluorímetro Easy Life X	10	20.000,00 €	1,02 €
h	Fotólisis de destello láser (FDL)	10	200.200,00 €	10,21 €
h	Espectrofotómetro de fluorescencia JASCO FP-8500	10	28.000,00 €	1,43 €
h	Espectrofotómetro Photon Technology International	10	9.157,48 €	0,47 €

Tabla 11. Amortización de los equipos utilizados para los ensayos en medio acuoso y biológico.

Tras calcular la amortización de cada uno de los equipos, se procederá al cálculo del importe total que se ha gastado utilizándolos:

UNIDAD	DESCRIPCIÓN	MEDICIÓN	AMORTIZACIÓN (€/H)	IMPORTE
U4	EQUIPOS			107,58 €
h	Balanza analítica	6	0,05 €	0,30 €
h	Baño ultrasonidos digital	3	0,08 €	0,25 €
h	Espectrofotómetro JASCO V-360	10	0,51 €	5,10 €
h	Espectrofluorímetro Easy Life X	10	1,02 €	10,20 €
h	Fotólisis de destello láser (FDL)	6	10,21 €	61,29 €
h	Espectrofotómetro de fluorescencia JASCO FP-8500	20	1,43 €	28,57 €
h	Espectrofotómetro Photon Technology International	4	0,47 €	1,87 €

Tabla 12. Importe total de uso de los equipos utilizados durante los ensayos en medio acuoso y biológico.

➤ **6.3.5. Resumen costes experimentos en medio acuoso y medio biológico**

A continuación, se mostrará una tabla resumen con los costes totales que han supuesto los ensayos realizados en medio acuoso y medio biológico, teniendo un coste final total de 8533,36 €.

UNIDAD	DESCRIPCIÓN	IMPORTE
U1	PERSONAL	5.676,00 €
U2	REACTIVOS	2.199,00 €
U3	MATERIAL DE LABORATORIO	550,78 €
U4	EQUIPOS	107,58 €

Total	8.533,36 €
--------------	-------------------

Tabla 13. Resumen del coste total de la realización de los ensayos en medio acuoso y biológico.

6.4. PRESUPUESTO DE EJECUCIÓN MATERIAL, POR CONTRATA Y BASE DE LICITACIÓN

El Presupuesto de Ejecución Material (PEM) engloba el coste total calculado en cada uno de los apartados anteriores, además de los costes indirectos, que son aquellos que no se tienen en cuenta porque no influyen de manera directa en la investigación (véase limpiezas del laboratorio, mantenimiento de este, consumos de agua y electricidad...). Por recomendación del Servicio de Gestión de I+D+I de la UPV, se ha aplicado un 25% de costes indirectos.

UNIDAD	DESCRIPCIÓN	IMPORTE
P1	ENSAYOS EN DISOLUCIÓN ORGÁNICA	5.509,75 €
P2	ENSAYOS EN MEDIO ACUOSO Y MEDIO BIOLÓGICO	8.533,36 €
CI	COSTES INDIRECTOS	3.510,78 €

PEM	17.553,89 €
------------	--------------------

Tabla 14. Resumen obtención del PEM.

El Presupuesto de Ejecución por Contrata (PEC) se calcula por la suma del PEM previamente calculado y un porcentaje de gastos generales, ya que, en el caso de esta investigación, el beneficio industrial ha sido del 0%. Dicho porcentaje no está fijado por ninguna normativa, de modo que se ha empleado un porcentaje que se utiliza habitualmente en este tipo de proyectos, el cual es un 13%.

UNIDAD	DESCRIPCIÓN	IMPORTE
PEM	Presupuesto de Ejecución Material	17.553,89 €
GG	Gastos Generales	2.282,01 €

PEC	19.835,90 €
------------	--------------------

Tabla 15. Resumen de obtención del PEC.

Por último, el Presupuesto Base de Licitación (PBL) se obtiene una vez se aplica el coste del Impuesto de Valor Añadido (IVA) de 21% al coste del PEC.

UNIDAD	DESCRIPCIÓN	IMPORTE
PEC	Presupuesto de Ejecución por Contrata	19.835,90 €
IVA	Impuesto de Valor Añadido	4.165,54 €

PBL	24.001,44 €
-----	-------------

Tabla 16. Resumen de obtención del PBL.

En resumen:

- El Presupuesto de Ejecución Material asciende a la expresada cantidad de **DIECISIETE MIL QUINIENTOS CINCUENTA Y TRES EUROS CON OCHENTA Y NUEVE CÉNTIMOS.**
- El Presupuesto de Ejecución por Contrata asciende a la expresada cantidad de **DIECINUEVE MIL OCHOCIENTOS TREINTA Y CINCO EUROS CON NOVENTA CÉNTIMOS.**
- El Presupuesto Base de Licitación asciende a la expresada cantidad de **VEINTICUATRO MIL UN EUROS CON CUARENTA Y CUATRO CÉNTIMOS.**

CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ International Agency for Research on Cancer. The Global Cancer Observatory – Cancer Today. <https://gco.iarc.who.int/today/en>
- ² Syngal S, Brand RE, Church JM, Giardiello FM, Hampel HL, Burt RW; American College of Gastroenterology. *ACG clinical guideline: Genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes.*
- ³ Richa Shah, Nicolò Matteo Luca Battisti, Etienne Brain, Freddy H R Gnanon, Ravindran Kanesvaran, Supriya Mohile, Vanita Noronha, Martine Puts, Enrique Soto-Perez-de-Celis, Sophie Pilleron. *Updated cancer burden in oldest old: A population-based study using 2022 Globocan estimates.*
- ⁴ International Agency for Research on Cancer. World Health Organization (WHO). *Cancer Today: Data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2020.*
- ⁵ Falzone, L.; Salomone, S.; Libra, M. *Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium.*
- ⁶ Benedí, J.; Gómez del Río, M. Á. *Fármacos Antineoplásicos (I).*
- ⁷ Uribe, M. L.; Marrocco, I.; Yarden, Y. *EGFR in Cancer: Signaling Mechanisms, Drugs, and Acquired Resistance.*
- ⁸ Mendelsohn, J.; Baselga, J. *The EGF Receptor Family as Targets for Cancer Therapy.*
- ⁹ Huang, L.; Jiang, S.; Shi, Y. *Tyrosine Kinase Inhibitors for Solid Tumors in the Past 20 Years (2001–2020).* *J. Hematol.*
- ¹⁰ Yamaoka, T.; Kusumoto, S.; Ando, K.; Ohba, M.; Ohmori, T. *Receptor Tyrosine Kinase-Targeted Cancer Therapy.*
- ¹¹ Charles Pottier, Margaux Fresnais, Marie Gilon, Guy Jérusalem, Rémi Longuespée, Nor Eddine Sounni. *Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer: Breakthrough and Challenges of Targeted Therapy.*
- ¹² Alice Main, William Fuller, George S. Baillie. *Post-translational regulation of cardiac myosin binding protein-C: A graphical review.*
- ¹³ Masako Yumura, Tatsuya Nagano, Yoshihiro Nishimura. *Novel Multitarget Therapies for Lung Cancer and Respiratory Disease.*
- ¹⁴ Stein, K. R.; Scheinfeld, N. S. *Drug-Induced Photoallergic and Phototoxic Reactions.*
- ¹⁵ Di Bartolomeo, L.; Irrera, N.; Campo, G. M.; Borgia, F.; Motolese, A.; Vaccaro, F.; Squadrito, F.; Altavilla, D.; Condorelli, A. G.; Motolese, A.; Vaccaro, M. *Drug-Induced Photosensitivity: Clinical Types of Phototoxicity and Photoallergy and Pathogenetic Mechanisms.*

- ¹⁶ Nardi, G.; Lhiaubet-Vallet, V.; Miranda, M. A. *Photosensitization by Imatinib. A Photochemical and Photobiological Study of the Drug and Its Substructures.*
- ¹⁷ Selvam, T. P.; Kumar, P. V. *Quinazoline Marketed Drugs-A Review.*
- ¹⁸ Álvarez, L; Vayá, I; Andreu, I; Fernández, I. *Evaluación fotofísica, fotoquímica y fotobiológica del inhibidor de la tirosina quinasa erlotinib.*
- ¹⁹ Scaiano, J. C. (Tito). *Photochemistry Essentials*; American Chemical.
- ²⁰ <https://www.simtrum.com/WebShop/SolutionInfo.aspx?id=1669>
- ²¹ *Tyrosine kinase receptor. Dimerization, phosphorylation, activation and cellular response. Cell membrane receptors for ligands as growth factors and cytokines binding. Insulin receptor. vector design.*
- ²² Nagaraju Anreddy, Pranav Gupta, Rishil J. Kathawala, Atish Patel †, John N. D. Wurpel and Zhe-Sheng Chen. *Tyrosine Kinase Inhibitors as Reversal Agents for ABC Transporter Mediated Drug Resistance.*
- ²³ Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). *Toxicological Profile for Toluene.*
- ²⁴ National Center for Biotechnology Information (NCBI). *Acetonitrile Toxicity Overview.*
- ²⁵ Taguchi, K.; Nishi, K.; Giam Chuang, V. T.; Maruyama, T.; Otagiri, M. *Molecular Aspects of Human Alpha-1 Acid Glycoprotein — Structure and Function.*
- ²⁶ Alessandra di Masi. *Human Serum Albumin: From Molecular Aspects to Biotechnological Applications.*
- ²⁷ Kawai, A., Chuang, V.T.G., Kouno, Y., Yamasaki, K., Miyamoto, S., Anraku, M., Otagiri, M. *Crystallographic analysis of the ternary complex of octanoate and N-acetyl-L-methionine with human serum albumin reveals the mode of their stabilizing interactions.*
- ²⁸ Fei Han, Qian Shen, Wei Zheng, Jingnan Zuo, Xinyu Zhu, Jingwen Li, Chao Peng, Bin Li, Yijie Chen. *The Conformational Changes of Bovine Serum Albumin at the Air/Water Interface: HDX-MS and Interfacial Rheology Analysis.*
- ²⁹ Bujacz, A. *Structures of bovine, equine and leporine serum albumin.*
- ³⁰ Luciana Dente, Gennaro Ciliberto, Riccardo Cortese. *Structure of the human α 1acid glycoprotein gene: sequence homology with other human acute phase protein genes.*
- ³¹ Nishi, K., Ono, T., Nakamura, T., Fukunaga, N., Izumi, M., Watanabe, H., Suenaga, A., Maruyama, T., Yamagata, Y., Curry, S., Otagiri, M. *Structural insights into differences in drug-binding selectivity between two forms of human alpha1-acid glycoprotein genetic variants, the A and F1*S forms.*
- ³² <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q3SZR3/entry>.
- ³³ Tamarit, L; Vayá, I; Andreu, I. *Fotorreactividad de gefitinib y sus metabolites fenólicos en disolución y en proteínas transportadoras.*
- ³⁴ Jiménez, M. C.; Miranda, M. A.; Tormos, R.; Vayá, I. *Characterisation of the lowest singlet and triplet excited states of S-flurbiprofen.*

CAPÍTULO 8. ABREVIATURAS

A	Área de espectros de emisión
Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BAG	α_1 -glicoproteína ácida de origen bovino
BRCA1	Gen 1 relacionado al cáncer de mama
BRCA2	Gen 2 relacionado al cáncer de mama
BSA	Albúmina sérica bovina
c	Velocidad de la luz
CAP	Capmatinib
DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Energía
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ERL	Erlotinib
E_S	Energía de singlete
E_T	Energía de triplete
EtOH	Etanol
F	Fluorescencia
FDL	Fotólisis de Destello Láser
FS	Fotosensibilizador
GFT	Gefitinib
H	Constante de Planck
HAG	α_1 -glicoproteína ácida de origen humano
HER-1	Receptor 1 del factor de crecimiento epidérmico
HER-2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico
HER-3	Receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico
HER-4	Receptor 4 del factor de crecimiento epidérmico
HSA	Albúmina sérica humana

IC	Conversión interna
I_F	Intensidad de fluorescencia
ISC	Cruce intersistema
K_B	Constante de unión
kDa	kiloDalton
LAP	Lapatinib
LED	Diodo emisor de luz
LFP	Fotólisis de destello láser
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
MAP	2-metoxiacetofenona
MeCN	Acetonitrilo
MET	Metionina
n	Índice de refracción
N_2	Nitrógeno molecular
N_A	Número de Avogadro
PBS	Disolución tampón fosfato
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
ϕ_F	Rendimiento cuántico de fluorescencia
Ph	Fosforescencia
QY	Rendimiento cuántico de fluorescencia
S_0	Estado de energía fundamental
S_n	Estado de energía excitado
t	Tiempo
T_1	Estado de energía triplete-triplete
TKI	Inhibidor de la tirosina quinasa
Tol	Tolueno
u.a.	Unidades arbitrarias
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular
VR	Relajación vibracional

Xe	Xenón
ΔA	Incremento de Absorbancia
λ	Longitud de onda
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{exc}	Longitud de onda de excitación
τ	Tiempo de vida media
τ_F	Tiempo de vida media de fluorescencia
χ	Fracción molar