

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Básicas e Ingeniería

Departamento de Química

“Estudio de la Interacción lisozima-sulfoftalocianinas”

Tesis de Maestría en Química

Que presenta

Q.F.B Jonathan Osiris Vicente Escobar

Matrícula 2141801258

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias (Química)

Asesores:

Dr. Salvador Ramón Tello Solís

Dr. Miguel Ángel García Sánchez

Jurado

Presidente: Dra. María Luisa Ojeda Martínez. Universidad de Guadalajara

Secretario: Dr. José Alfonso Arroyo Reyna. Departamento de Química UAM-I

Vocal: Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, IPN.

Iztapalapa, Ciudad de México, abril 2016

El presente trabajo fue realizado en el área de Química Inorgánica y Biofísicoquímica del Departamento de Química, División de Ciencias Básicas e Ingeniería, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, con la asesoría del Dr. Miguel Ángel García Sánchez y el Dr. Salvador Ramón Tello Solís

Para la realización de éste trabajo se contó con el apoyo económico de CONACyT a través de la Beca de Maestría con número de CVU: 588799

En estas instancias uno siempre llega a ser muy optimista, por el esfuerzo que uno imprime para realizar este proyecto y ver concretado el producto después de un par de años. Pero esta sensación, depende del valor que cada quien le asigne a cada evento, situación o cosa. Para mí ha sido muy enriquecedor, mi estancia aquí en la UAM, tanto a nivel académico como a nivel personal, creo firmemente que si no se tiene esa mejora concomitante en ambos aspectos; llega a ser un logro aparente. En ese sentido quisiera pensar que, en toda situación pertinente, el que yo dijera gracias era algo completamente sincero, difícilmente con la expresión más diáfana, o el ademán más preciso, lo cierto es que siempre hubo esa intención.

*En primera instancia quiero agradecer de manera especial a mis asesores el **Dr. Miguel Ángel y el Dr. Salvador Tello**, debo decir que estoy muy contento de esta decisión y espero que el sentimiento haya sido recíproco. Agradezco el tiempo y esa habilidad que tienen para decir el consejo preciso y esas palabras impregnadas de experiencia, que tanto sirven en los momentos complicados. Agradezco la libertad que tuve para realizar este proyecto, en verdad les agradezco mucho*

*Al comité del jurado la **Dra. María Luisa, la Dra. Claudia Benítez y el Dr. Alfonso Arrollo**, gracias por todos sus comentarios y su disposición para la revisión de la tesis.*

*A **Iris Serratos** fue una de las personas que siempre reitere mi agradecimiento, sin embargo, es ineludible no plasmar aquí un gracias; un gracias incommensurable, que esperaría dejase una impresión duradera. Tomo la confianza de decirte Iris sin el adjetivo de doctora, pues desde un inicio se omitió ese concepto de formalidad, y esta situación es algo que valoro mucho. Quisiera hacer notar esa humildad que te caracteriza y la capacidad que tienes de afrontar los retos y vicisitudes, puedo decirte que me quedo con la imagen de una mujer independiente y tenaz. Te agradezco la confianza y el apoyo en todo aspecto que siempre me hiciste saber.*

*A **Tania Tapía y Ana** agradezco el hecho de haber sido el recipiente donde verter y sentir la confianza de expresar ciertas situaciones y preocupaciones. A mis compañeros de laboratorio: **Eduardo Salas, Brenda, Iris Quiroz, Luis Alejo, Armin gordillo***

*Se agradece extensamente la beca otorgada por el **Conacyt** con el número de CVU: 588799*

*A **mi familia, mis padres**, les debo mucho y aunque de manera generalizada siempre nos ha sido complicado expresarnos y por inferencia entendernos, quiero agradecerles el mismo hecho de estar presentes. Quiero reconocer la determinación que tuvieron para vislumbrar un futuro, a pesar de la vida azarosa que les tocó. Finalmente creo entendí, que nos comunicamos mejor no con palabras si no mediante el trabajo.*

*Aunque haya habido un distanciamiento, no quisiera dejar de expresarle mi agradecimiento a la profesora **Martha Elba**. Gracias por haber cultivado esta forma de trabajo consistente, pero ciertamente agradezco en mayor medida el haber compartido todas esas ideas, que hasta hoy, muchas de ellas aún siguen vigentes. Siempre me pareció loable la sensibilidad con la que escribe algunas de sus experiencias. Gracias por que en su momento tuve esa sensación de dejarse "ser", expresar lo que realmente se piensa, sin la impresión de sentirse juzgado, sino comprendido. A ti esas gracias intemporal*

*A **Lizet la pelirroja** que me ha cautivado durante años y me inundo la vida; de palabras, de deseos e inquietudes. Creo pocas o no las suficientes veces le he proferido ese gracias por este gran lapso de vida, lo cierto es que es un pilar fortísimo, una motivación extraordinaria; cuando se interiorizo no hubo forma de sustraerla, ahora Lizet está más allá del amor y la indiferencia. Eres de las personas que nunca dejas de querer y que permanecen.*

Agradecimientos	3
Glosario	7
Resumen	9
Capítulo 1	10
a) Macrociclos tetrapirrólicos	10
Porfirinas	10
Ftalocianinas.....	10
b) Terapia fotodinámica (TFD)	13
c) Lisozima	14
d) Generalidades de la Interacción proteína-ligando.....	19
e) Generalidades y aplicación particular de la espectroscopía de fluorescencia	21
f) Acoplamiento molecular.....	27
Objetivos particulares	31
Capítulo 2	32
Metodología.....	32
Enfoque experimental.....	32
a) Síntesis de μ -hidroxi-tetrasulfoftalocianina de Hierro (III), μ -(OH)FeTSPc, y tetrasulfoftalocianina libre, H ₂ TSPc.....	32
b) Lisozima.....	33
c) Caracterización de μ -hidroxi-tetrasulfoftalocianina de Hierro (III), μ -(OH)FeTSPc, y tetrasulfoftalocianina libre, H ₂ TSPc.....	33
d) Estudio de la interacción lisozima-ftalocianinas por espectroscopía de fluorescencia	34
Enfoque computacional	34
e) Estudios de acoplamiento de la interacción lisozima- monómero- μ -(OH)FeTSPc.....	34
f) Cálculos de energía libre de unión computacional (Δ Guc) del complejo lisozima- μ -macrociclo	35
Capítulo 3	36
Resultados y discusión	36
a) Tetra-sulfoftalocianina de Hierro (III), μ -(OH)FeTSPc	36
b) Tetrasulfoftalocianina libre H ₂ TSPc.....	37

c) Formación del complejo lisozima-ftalocianina.....	40
d) Análisis de la interacción lisozima- μ -(OH)FeTSPc y lisozima-H ₂ TSPc por apagamiento de la fluorescencia	42
e) Análisis de la interacción molecular de los sistemas lisozima- μ -(OH)FeTSPc y lisozima-H ₂ TSPc, través de los cálculos de energía electrostática computacional.	54
Capítulo 4.....	67
Conclusiones	67
Perspectivas	68
Apéndice.....	69
Ecuación de Stern-Volmer.....	69
Determinación espectrofluorométrica de la constante de unión Proteína-ligando. Modelo de ajuste para un sitio de unión independiente	72
REFERENCIAS.....	75

GLOSARIO

H ₂ TSPc	Tetrasulfoftalocianina libre
μ -(OH)FeTSPc	μ -hidroxi-tetrasulfoftalocianina de Hierro III
H ₂ Pc	Ftalocianina libre
TFD	Terapia fotodinámica
Pcs	Ftalocianinas
MPc	Sulfoftalocianinas metaladas
EDTA	Ácido tetraetilendiaminotetraácetico
[L] _T	Concentración molar de ligando total
[L]	Concentración molar de ligando libre (sin unirse)
[P] _o	Concentración total de lisozima
A _o	Absorbancia de lisozima a 280 nm
A	Absorbancia de la lisozima en cada punto de la titulación
ΔA	Cambio de absorbancia (A -A _o)
FTIR	Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier
UV-Vis	Espectroscopía de absorción electrónica
FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
K _u	Constante de unión, lisozima-ligando
Φ	Rendimiento cuántico
pI	Punto isoeléctrico
[Q]	Concentración molar de desactivante: μ -(OH)FeTSPc o H ₂ TSPc
F _o	Emisión de Fluorescencia de lisozima inicial

F	Emisión de fluorescencia de lisozima en cada punto de la titulación
f_a	Fluoróforo accesible al desactivante
K_{SV}	Constante de Stern-Volmer para la asociación lisozima-ligando
K_q	Constante de apagamiento bimolecular
n	Número de sitios de unión en la lisozima
APBS	<i>Adaptative Poisson Boltzman Solver</i>
ASA	Área de superficie accesible al disolvente
ΔASA	Cambio del área de superficie accesible al disolvente
ΔH_u	Cambio de entalpia de unión, para lisozima-ligando
ΔS_u	Cambio de entropía de unión, para lisozima-ligando
ΔG_u	Cambio de energía libre de Gibbs de unión, para lisozima-ligando
ΔG_{uc}	Cambio de energía libre de Gibbs de unión computacional, para la asociación lisozima-ligando
ΔG_{coul}	Cambio de Energía libre de Gibbs electrostática de la unión lisozima-ligando
ΔG_{ele}	Cambio de Energía libre de Gibbs electrostática de la unión lisozima-ligando
ΔG_{apol}	Cambio Energía libre de Gibbs no polar de la unión lisozima-ligando
ΔG_{solv}	Cambio de Energía libre de Gibbs de solvatación de la unión lisozima-ligando
γ	Tensión superficial
VMD	<i>Visual Molecular Dynamic</i>

Las ftalocianinas son ligantes planos tetradentados, con un sistema aromático de 18 electrones π deslocalizados y se sabe que sus complejos metálicos, MPcs, son agentes fotosensibilizadores [1] que interaccionan con tejidos, como la piel, por irradiación con luz. Los fotosensibilizadores son moléculas que pueden transferir energía desde un estado excitado triplete a moléculas próximas, como el Oxígeno molecular, cuando son activados por luz de longitud de onda adecuada [2]. Esta transferencia conduce a la formación de Oxígeno singulete (${}^1O^2$) y otras especies reactivas de Oxígeno citotóxico que pueden degradar ó matar células cancerígenas vía apoptosis o necrosis [3]. Las ftalocianinas son fotosensibilizadores de segunda generación que absorben intensamente en la región roja del espectro visible [4]. Para la acción del fotosensibilizador es importante su transporte endógeno por proteínas plasmáticas al sitio diana, por ello las interacciones de proteínas con pequeñas moléculas son cruciales, tanto para el diseño de nuevas formulaciones farmacéuticas, como para diversos procesos biológicos [5].

La lisozima ha sido ampliamente estudiada y usada en tratamientos contra el cáncer, y se ha demostrado su capacidad de transporte de diversos fármacos [6], cuya efectividad depende de la afinidad de unión al fármaco, pero existen pocos reportes de su interacción con ftalocianinas. Por ello, en este trabajo, se sintetizaron las tetrasulftalocianina libre y su complejo de Hierro (III), H_2TSPc y $\mu-(OH)FeTSPc$ respectivamente, se estudió su interacción con lisozima vía espectroscopía de fluorescencia, suponiendo un solo sitio de unión independiente. Se observó que la $\mu-(OH)FeTSPc$ predomina en forma dimérica, mientras que la H_2TSPc lo hace como monómero en la misma solución reguladora de fosfatos 5 mM pH 7. Para la interacción lisozima-ftalociana se propone una estequiometria de unión 1:1. El apagamiento de fluorescencia (o inhibición o desactivación), se utilizó para analizar la interacción de ambos ligandos con lisozima, obteniendo información del mecanismo de interacción, la fracción de fluoróforo accesible al desactivante, el número de sitios de unión y modo de unión mediante los parámetros termodinámicos como ΔH_u , ΔS_u y ΔG_u , además de la determinación de las constantes de unión a diferentes temperaturas. Para entender el tipo de interacción entre lisozima-ftalocianina se realizaron estudios *in silico* de acoplamiento molecular, modelando los ligandos como monómero y dímero, para evaluar la energía libre de unión, a través de las contribuciones de tipo electrostático polar y no polar.

Porfirinas

Las porfirinas son compuestos macrocíclicos tetrapirrólicos derivados del anillo de porfina figura 1.1 a, las cuales son moléculas ligantes tetradentadas, que están constituidas por cuatro anillos de pirrol unidos mediante puentes *metino*, formando un macrociclo, en el cual 18 de los 22 electrones π intervienen en la deslocalización del anillo porfirico. De acuerdo a la regla de Hückel cumple las características para compuestos aromáticos (figura 1.1), lo que les confiere importantes propiedades fisicoquímicas [7]. Las porfirinas son también muy estables química y térmicamente, aunque en solución suelen ser inestables a la luz [8] La mayoría de las características sobresalientes del núcleo porfirico son debido a su carácter aromático, responsable de las notables propiedades espectroscópicas y la reactividad química de estas y sus derivados [9].

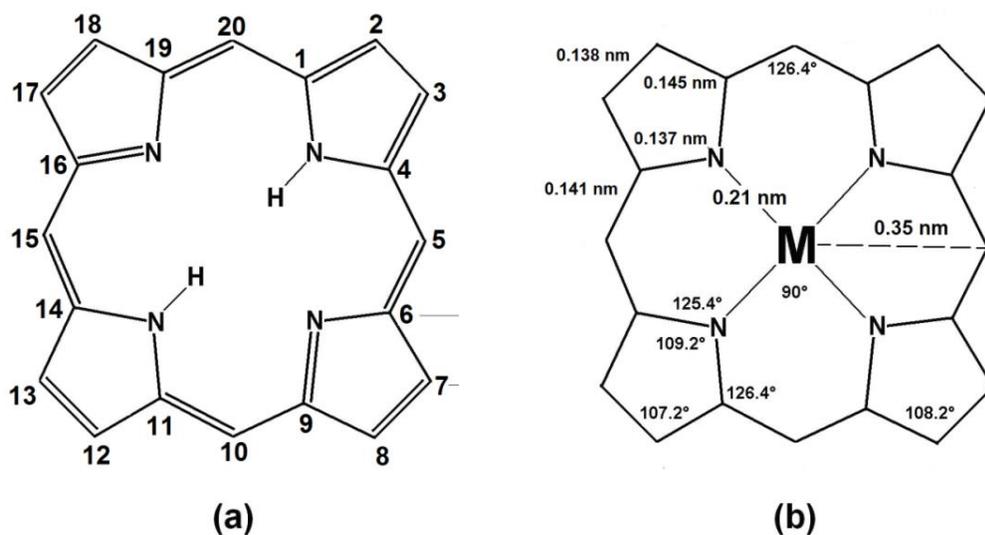


Figura 1.1 Estructura de: (a) macrociclos tetrapirrólicos de porfirina libre y (b) de porfirina metalada, incluyendo los parámetros de dimensión principal y la posición de los posibles sustituyentes [8]

Ftalocianinas

En 1907, Braun y Tcherniac [8] sintetizaron por accidente la primera ftalocianina. En 1927 Diesbach y Von der Weid [7], se toparon con un complejo de color azul que contenía cobre íntimamente ligado y que mostraba una estabilidad térmica notable. En 1928, un compuesto insoluble de color azul oscuro se encontró en los recipientes de Hierro que la Scottish Dyes Ltd.

de Escocia usaba para la síntesis de ftalamida [8]. En la década de los 30's, Linstead [10], inició el estudio específico de tales compuestos, descubriendo que cuatro unidades de isoindol, entraban en la formación de un sistema altamente conjugado. Linstead llamó al compuesto ftalocianina, según las raíces griegas *nafta* (aceite de roca) y *cian* (azul oscuro) [11].

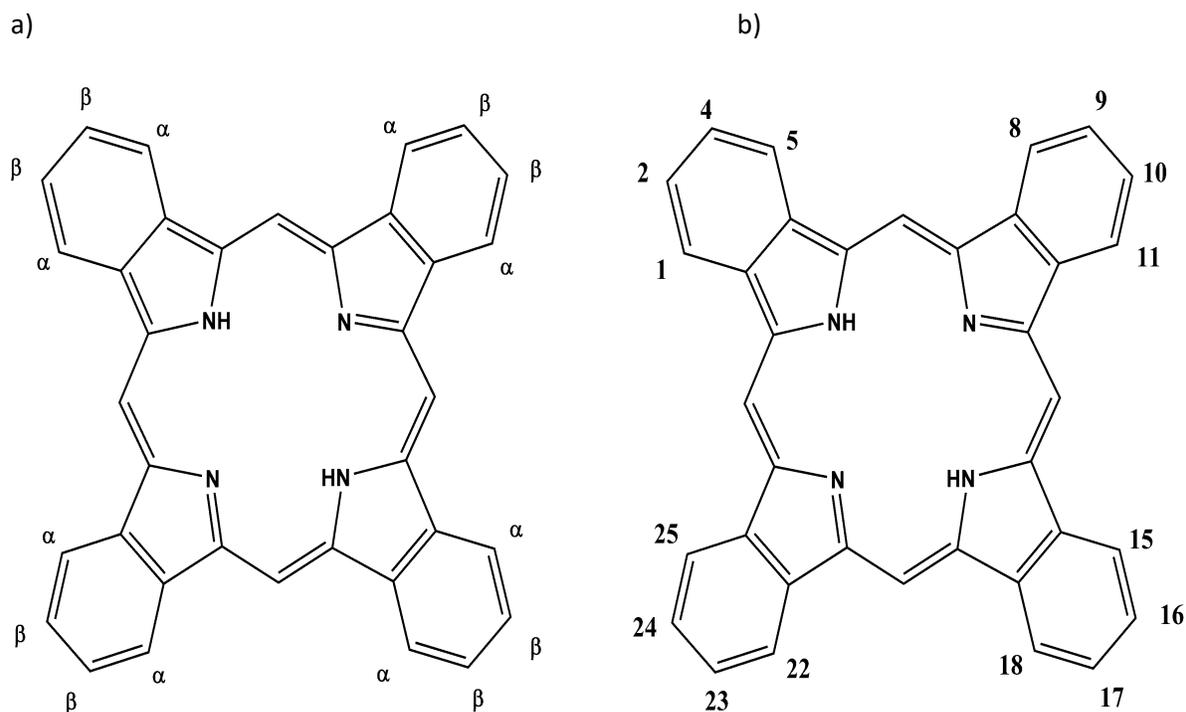


Figura. 1.2 Estructura de la ftalocianina libre, a) nomenclatura común, b) nomenclatura IUPAC

Las ftalocianinas (Pcs) son ligantes aromáticos tetradentados de estructura plana con 18 electrones π deslocalizados, en el que existen tres tipos de átomos de Nitrógeno; los Nitrógenos pirrólicos (N_1), Nitrógenos aza centrales (N_2) y los Nitrógenos *aza* puente (N_3) (figura 1.2), siendo los Nitrógenos centrales y los externos, energéticamente muy diferentes en la ftalocianina libre, pero muy similares en la metaloftalocianina [1]. Recientemente, se han propuesto como bloques de construcción molecular para su arreglo en materiales moleculares y aparatos nanotecnológicos. A la fecha, las PCs han sido exitosamente incorporadas como componentes activos en semiconductores y aparatos electrocrómicos, sistemas de almacenamiento de información y cristales líquidos, entre otros [12].

Las ftalocianinas metálicas son, en general compuestos térmica y químicamente muy estables que se descomponen por arriba de los 550°C y resisten el ataque de los ácidos de Bronsted. Como demostró B.D. Bezerinlg en 1962 [8], dicha estabilidad aumenta con el radio iónico y la carga del

cación que se coordina con los cuatro átomos de Nitrógeno centrales. Otra característica importante es su versatilidad; los dos átomos de Hidrógeno de la cavidad central pueden ser remplazados por más de 70 metales diferentes y una variedad de sustituyentes pueden ser incorporados, tanto en la periferia del macrociclo como en la posición axial. Debido a su versatilidad química las PCs se han incorporado en sistemas multicomponentes foto y electroactivos [12]. Las ftalocianinas metálicas presentan emisión de fluorescencia, caracterizada por una banda estrecha a longitudes de onda entre 670 y 710 nm, cuando son excitadas a una longitud de onda adecuada entre 600 y 650 nm. Esta emisión de fluorescencia surge de un estado excitado, el cual se origina en el anillo tetrapirrólico [13]. La estructura de las ftalocianinas es similar a las de las porfirinas y compuestos naturales de la misma familia, pero su absorción más fuerte en el visible ($\epsilon = 120,000$ a $180,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ocurre alrededor de los 680 nm, que es casi del doble de la longitud de onda a la que las porfirinas presentan su absorción principal en la región. Esta característica permite proponer a las PCs como modelos en sustitución de las porfirinas en la terapia fotodinámica (TFD). Aunque muchos complejos con ftalocianinas presentan absorción y fluorescencia más allá de los 1000 nm.

Las ftalocianinas metálicas MPCs, son conocidas como fotosensibilizadores de segunda generación, debido a la intensa absorción en la región roja del espectro visible, la localización selectiva en tumores y generación eficiente de Oxígeno singulete [14].

El fármaco llamado *Fotosens*, es una mezcla de ftalocianinas sulfonadas coordinadas con aluminio (III) y es usado en Rusia para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer. El rendimiento cuántico y largo tiempo de vida del estado triplete cuántico es esencial para una fotosensibilización efectiva, lo que puede lograrse incorporando elementos distintos a los metales de transición en el centro del anillo de la ftalocianina, por ejemplo; Si, P, Te, etc, [15], y por la modificación de los sustituyentes en la periferia. Así mismo, para aplicaciones en la TFD, la solubilidad en agua de las ftalocianinas es un requisito importante para considerarles fotosensibilizadores potenciales. Los grupos aniónicos o catiónicos intervienen en la solubilidad de MPCs en agua, sin embargo, los sustituyentes catiónicos ofrecen más ventajas debido a que estos mejoran la absorción celular y se localizan selectivamente en la mitocondria [14].

b) Terapia fotodinámica (TFD)

Desde mediados del siglo pasado se analizó la posibilidad de usar derivados del grupo *hemo* de la hemoglobina para el tratamiento de diversas afecciones humanas. Así mismo, en las últimas décadas del siglo XX e inicios del presente, ha surgido un gran interés en el uso de porfirinas y compuestos relacionados, tales como, ftalocianinas y clorinas, para su uso como agentes terapéuticos [16], esto debido a su fuerte absorción en el infrarrojo cercano, su baja o nula toxicidad, la localización selectiva en tumores, generación eficiente de Oxígeno singulete ($^1O^2$) y su alta eficiencia fotoquímica [17]. Los fotosensibilizadores son moléculas que pueden transferir su energía desde un estado excitado triplete a moléculas circunvecinas de Oxígeno molecular, cuando son activados por luz de una longitud de onda específica [2]. Esta transferencia de energía coadyuva a la formación de Oxígeno singulete ($^1O^2$) y otras especies reactivas de Oxígeno citotóxico que permiten la degradación de células cancerígenas mediante apoptosis o necrosis [3]

Las interacciones de porfirinas o ftalocianinas con proteínas pueden controlar la eficiencia y biodistribución en el citoplasma celular. Por lo tanto, la interacción de los fotosensibilizadores con proteínas, especialmente, aquellas que funcionan como transportadoras a través del torrente sanguíneo, son de suma importancia para formular fármacos seguros, y establecer dosis efectivas y seguras [16]. Las proteínas transportadoras son las responsables de la liberación del fotosensibilizador al tumor cancerígeno. El transporte *in vivo* de varios derivados de porfirinas con moderado y alto grado de hidrofobicidad son acarreadas por lipoproteínas [18]. La albúmina del suero, es la proteína más abundante en el plasma sanguíneo, la cual transporta tanto a los fotosensibilizadores amifílicos como hidrofílicos. El pH del ambiente local puede tener un efecto importante en la interacción entre una proteína y el fotosensibilizador [19]. El pH en los tumores es más ácido que en el tejido normal. El pH en los tumores malignos tiene un intervalo que varía entre 5.8 y 7.6, con un pH promedio de 7.0, el tejido normal tiene un pH de alrededor de 7.5 [20-21].

Lograr el incremento en la selectividad de las porfirinas para unirse a células tumorales es el principal problema en la detección y la TFD del tejido tumoral [22]. Esto se puede lograr empleando sistemas de liberación selectivos tales; como anticuerpos monoclonales, liposomas, emulsiones de aceite, lipoproteínas de baja densidad y albúminas las cuales pueden ser física y químicamente combinadas [23]. Existen diversos criterios para que una molécula sea considerada

un fotosensibilizador en TFD [24], entre estos se encuentran; la solubilidad en agua, el alto rendimiento cuántico (fluorescencia) y un alto coeficiente de absorción molar.

c) Lisoizima

Históricamente la lisoizima es una de las proteínas más estudiadas en bioquímica. La lisoizima se encuentra en diversos fluidos biológicos y tejidos, incluyendo huevos de ave, en secreciones como lágrimas, saliva, y secreciones cervicales. Esta se clasifica en seis tipos: lisoizima de pollo tipo C, la cual incluye la lisoizima de estómago y la lisoizima de unión a calcio, la lisoizima de ganso tipo G, lisoizima de plantas, lisoizima bacteriana, y lisoizima de invertebrados [25].

En 1963 Robert Canfield [26] determinó la estructura primaria de la lisoizima (figura 1.3). Un par de años después la estructura tridimensional de la enzima obtenida del huevo de gallina, fue elucidada por Blake *et al.*, [27], a partir de mapas de densidad electrónica creada por patrones de difracción de rayos X del cristal. Así mismo, se encontró que la estructura tridimensional de la lisoizima de humano y de huevo de gallina son muy similares.

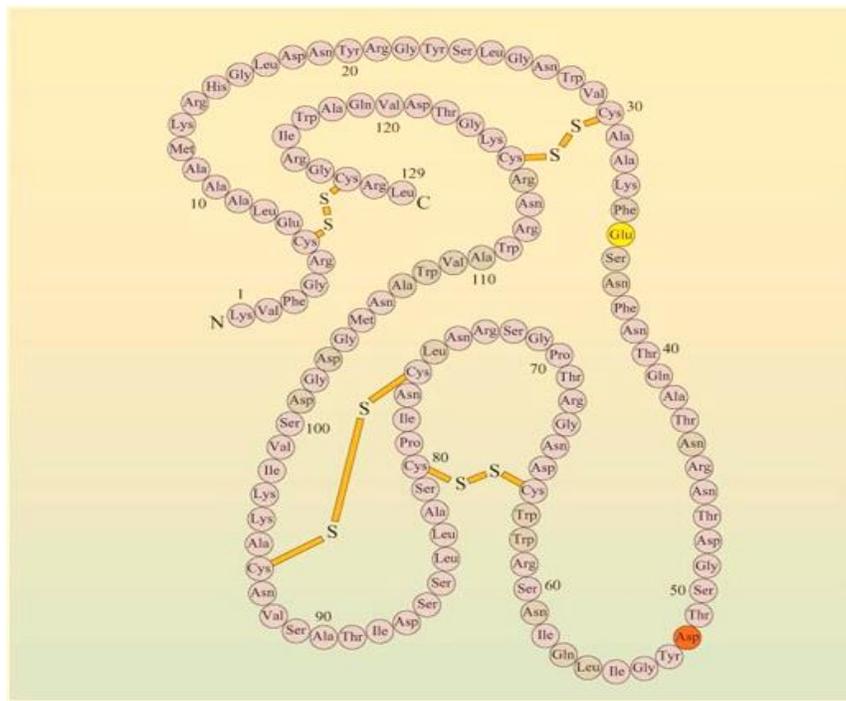


Figura. 1.3 Estructura primaria de la lisoizima, en la figura también se observan los 4 puentes disulfuro

La lisozima se conforma de una sola cadena de 129 aminoácidos, entrecruzada por cuatro puentes disulfuro [28] y formando dos dominios o lóbulos: el dominio α con los residuos (1- 40 y 90-129) y el dominio β (41-89) (figura 1.4), unidos por una larga α -hélice donde se encuentra el sitio activo (en este sitio se encuentran dos aminoácidos que son necesarios para que ocurra la catálisis que son (Glu 35 y Asp 52). La región alfa se compone de cinco segmentos helicoidales que son las hélices; A (4-15), hélice B (24-36), hélice C (88-99), hélice D (108-115) y hélice 3_{10} (120-125) [29]. La región beta laminar con tres cadenas: lámina- β (41- 60), hélice central 3_{10} (79-84) y un largo bucle (61-78). En la región alfa se encuentran dos puentes disulfuro (**Cys 6-Cys 127** y **Cys 30-Cys 115**), en el dominio beta posee otro (**Cys 64-Cys 80**) y el cuarto puente (**Cys 76-Cys 94**) se encuentra entre los dos dominios (figura 1.4) [30]. Estos cuatro puentes disulfuro confieren a la lisozima una elevada estabilidad térmica. Además, dos características interesantes en la estructura de la lisozima, son la ausencia de grupos sulfhidrilo y el alto contenido de arginina [31].

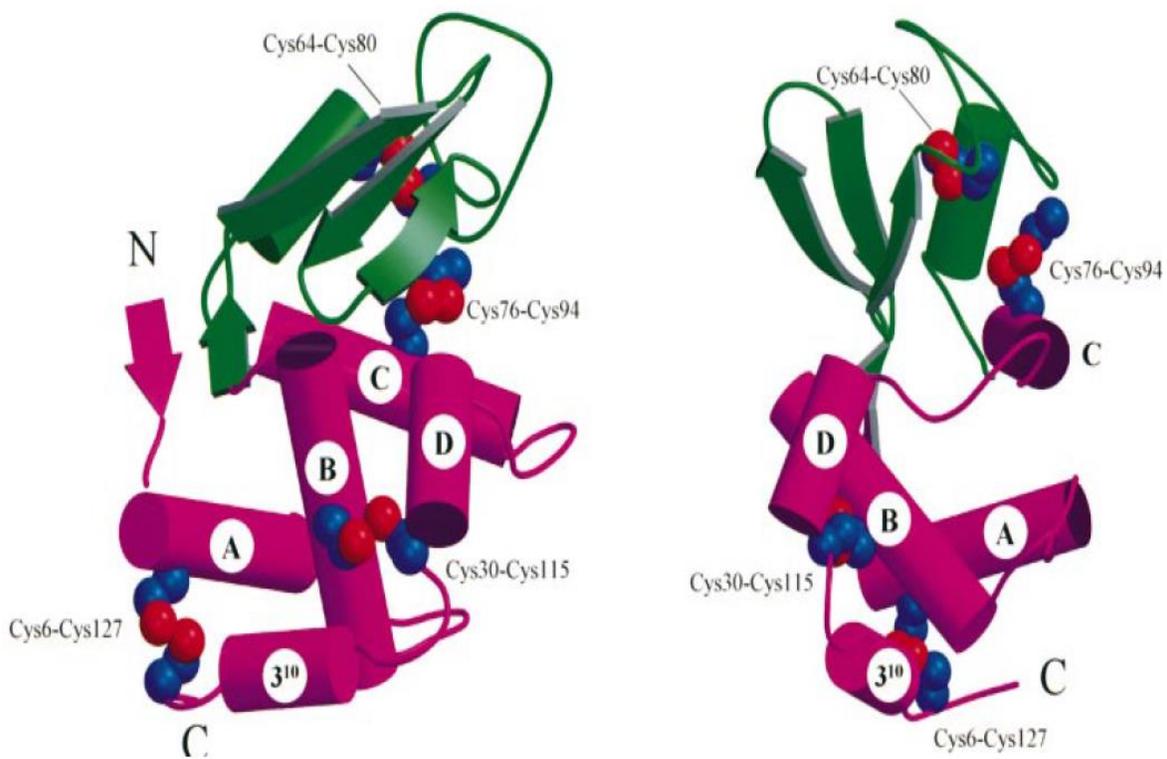


Figura 1.4. Modelo de barras y listones de la estructura tridimensional de la lisozima, en donde se observan los diferentes dominios α (purpura) y β (verde) y la posición de los cuatro puentes disulfuro presentes en la enzima, ver texto para detalles [14].

La lisozima cataliza la hidrólisis de enlaces β -(1,4) glicosídicos entre n-acetilglucosamina y ácido murámico (figura 1.5) de la capa de peptidoglicanos en la pared celular bacteriana [27]. La actividad de la lisozima es muy dependiente del pH y la fuerza iónica. La enzima es muy activa en un amplio intervalo de pH (6.0-9.0). Se sabe que a pH 6.2 y en un intervalo de fuerza iónica de (0.02–0.100 M), presenta máxima actividad [32]. Es bien conocida la actividad antibacteriana de la enzima y se han reportado gran cantidad de investigaciones sobre la susceptibilidad de los microorganismos a la acción de la enzima para lisar las paredes celulares. La actividad antimicrobiana de la lisozima se presenta especialmente en bacterias Gram positivas como; *Estafilococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Clostridium tyrobutyricum* [33] y con mucho menor eficacia en bacterias Gram negativas, en las que la característica de poseer membrana externa previene la difusión de la proteína hacia su sitio diana.

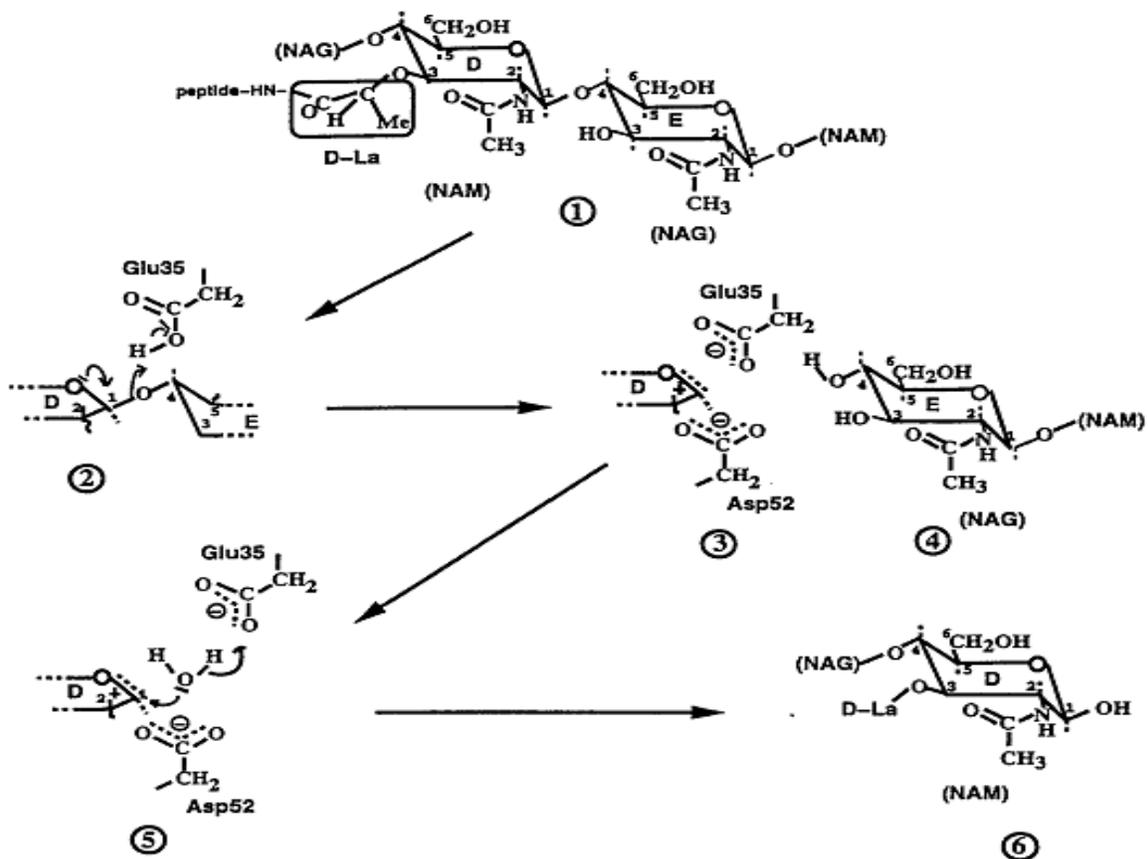


Figura 1.5. Mecanismo propuesto para la actividad enzimática de la lisozima. La unión del sustrato a lisozima (1), resulta en la distorsión del anillo D de NAM a una conformación menos estable de silla (2), debido a factores estéricos. El grupo carboxilo protonado de Glu 35, cede el electrón para la

glicosidar el átomo de Oxígeno, para formar el ión oxonio (3), el cual genera el anillo E (4), un buen grupo saliente. El carbocación formado C1 y el átomo de Oxígeno del anillo (3), es estabilizado por el ion carboxilato de Asp 52, el cual está localizado a una distancia de 3 Amstrops en un ambiente polar, hasta que adquiere un grupo hidroxilo (5), proveniente de una molécula de agua, para generar (6). El ion carboxilato adquiere un protón del medio. Abreviaturas: ácido N-acetilmuramico NAM; N-Acetilglucosamina NAG [27]

El espectro de la actividad antimicrobiana de la lisozima puede mejorarse al usar agentes quelantes que penetren la membrana celular de bacterias Gram negativas, por ejemplo, EDTA, también se ha observado este incremento de la actividad al reducir parcialmente sus puentes disulfuro. Se ha visto que la conjunción de lisozima con *dextran*, también incrementa su actividad contra bacterias Gram positivas. Debido a que la lisozima es una enzima pequeña y estable se ha usado como un modelo de investigación sobre la estructura y función de las proteínas. Entre los diversos estudios se encuentran un gran número de reportes que describen la unión de lisozima a lípidos [34], también se han reportado estudios sobre la acción antiviral contra ciertos virus, como un potencial antibiótico, en estudios de actividad antiinflamatoria y como antihistamínico, en activación directa de células inmunes y acción antitumoral, y como un modelo importante para el entendimiento en el replegamiento de proteínas. En la tabla 1, se presenta un resumen de características en la composición y propiedades fisicoquímicas de la lisozima.

Tabla 1. Composición y propiedades fisicoquímicas de la lisozima de huevo de gallina

Aminoácido	Número Residuos	Aminoácido	Número de Residuos
Alanina	12	Isoleucina	6
Ácido aspártico	7	Leucina	8
Ácido glutámico	2	Lisina	6
Arginina	11	Metionina	2
Asparagina	14	Prolina	2
Cisteína	8	Serina	10
Fenilalanina	3	Tirosina	3
Glicina	12	Triptófano	6
Glutamina	3	Valina	5
Histidina	1		
Masa molecular		14307 Da	

d) Generalidades de la Interacción proteína-ligando

Como se ha mencionado, las interacciones de proteínas con pequeñas moléculas son de importancia central tanto para el diseño de nuevos compuestos farmacéuticos como en una amplia variedad de procesos biológicos [5]. Por ejemplo, las enzimas las cuales se unen a un sustrato y moléculas efectoras; proteínas transportadoras, tales como, hemoglobina o proteínas de almacenamiento como mioglobina, ambas se unen al Oxígeno. Así mismo, muchas proteínas que actúan como reguladores lo hacen uniéndose a iones hidronio. De hecho, la mayoría de las funciones biológicas involucran la interacción de pequeñas moléculas, que fungen como metabolitos, reguladores y sitios de señalamiento para llevar a cabo una diversidad de procesos celulares. Uno de los aspectos clave de tales interacciones es la relación entre estructura molecular y la termodinámica de la unión [35-36].

La termodinámica química nos permite predecir la dirección espontánea de una reacción química, y determinar las fuerzas involucradas que gobiernan dicha interacción. Generalmente, las moléculas pequeñas se unen a macromoléculas a través de cuatro modos de unión: enlaces puente de Hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas [37].

La afinidad entre especies es cuantificada a través de la constante de unión K_u [38], la cual refleja los efectos de las interacciones no covalentes entre proteína-ligando y puede describirse mediante la siguiente ecuación $P + L \rightleftharpoons PL$

$$K_u = \frac{[PL]}{[P][L]} \quad [1.1]$$

Donde [P] es la concentración molar de proteína en el equilibrio, [L] la concentración molar de ligando equilibrio, [PL] es la concentración molar del complejo en el equilibrio y K_u la constante de unión a la temperatura T. La afinidad también puede ser cuantificada a través de la energía libre de unión, ΔG_u , la cual está relacionada con la constante de unión a través de la relación

$$\Delta G_u = -RT \ln K_u = \Delta H_u - T\Delta S_u \quad [1.2]$$

Donde ΔG_u es la energía libre de Gibbs de unión, R la constante universal de los gases, T es la temperatura absoluta, ΔH_u es el cambio de entalpía de unión y ΔS_u es el cambio de entropía de unión. Una energía libre de unión negativa indica una interacción favorable entre el ligando y la proteína, sin embargo, depende de dos condiciones ambientales tales como la temperatura y el

pH. ΔG es la suma de dos términos diferentes, uno entálpico ΔH_u y uno entrópico ΔS_u , los cuales dan información sobre la naturaleza de las interacciones involucradas, y por lo tanto, para lograr una alta afinidad es necesario que ambos términos contribuyan de manera favorable a la energética de unión [38-39]. La entalpia está relacionada a la naturaleza de las interacciones no covalentes; como Interacciones de van der Waals, interacciones de origen electrostático y puentes de Hidrógeno, la entropía de unión es dependiente en primera instancia del efecto hidrofóbico e inherente a interacciones segregativas, por ejemplo, cambios en la configuración y la solvatación de grupos hidrófilicos/lipófilicos hacia la formación de complejos [5]. Estas interacciones contribuyen de manera diferente al ΔH y ΔS es decir, poseen diferentes “firmas termodinámicas” [38-39].

Ross *et al.* [40] han resumido la naturaleza de las fuerzas en un proceso de interacción:

- 1.- $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$, corresponde a un efecto hidrofóbico;
- 2.- $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$, corresponde a contactos de van der Waals, formación de puentes de Hidrógeno
- 3.- $\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$, corresponde a interacciones iónicas/electrostáticas

Para confirmar cual es la naturaleza de las interacciones o fuerzas que actúan, se determinan los valores del cambio de entalpia ΔH y el cambio de entropía ΔS de reacción. El ΔH puede ser determinada de dos maneras; directamente usando calorimetría de titulación isotérmica o indirectamente midiendo la dependencia de la temperatura sobre la constante de unión [41] trabajando dentro de un intervalo de temperaturas en el que no se degraden las proteínas, mediante la ecuación de van't Hoff.

$$\ln K_u = -\frac{\Delta H_u}{RT} + \frac{\Delta S_u}{R} \quad [1.3]$$

En donde K_u es la constante de unión a la temperatura T , y R es la constante universal de los gases. Los valores de ΔH_u y ΔS_u se calculan a partir de la pendiente y la ordenada al origen de la representación gráfica del $\ln K_u$ frente a $1/T$, respectivamente, con lo que podemos obtener el ΔG_u , por medio de la ecuación. [1.2]

En cierto sentido la mayoría de las determinaciones experimentales de las constantes de unión son mediciones indirectas, en las cuales no podemos observar que macromolécula tiene un ligando unido a cierto sitio de unión. Lo que medimos es la fracción de todas las moléculas de ligando en el sistema que están unidas o la fracción de sitios de unión que están ocupados [42].

Las técnicas fisicoquímicas se emplean frecuentemente en estudios de interacción, que involucran la detección de un cambio físico, ya sea en el ligando, la macromolécula o el complejo formado. En la tabla 2 se mencionan algunos de los métodos más comunes, para determinar las constantes de unión.

Tabla 2. Sensibilidad y tipo de medición de los métodos más comunes para determinar constantes de unión

Método	Sensibilidad típica mol L⁻¹	Tipo
Osmometría	1x10 ⁻⁴ - 1x10 ⁻⁵	Directo
Equilibrio de diálisis	1x10 ⁻⁶ - 1x10 ⁻⁷	Semi-directo
FTIR	1x10 ⁻⁴ - 1x10 ⁻⁵	Usualmente indirecto
UV-Vis	1x10 ⁻⁷ - 1x10 ⁻⁸	Usualmente indirecto
Fluorescencia	1x10 ⁻⁸ - 1x10 ⁻⁹	Directo
FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia)	1x10 ⁻¹⁰ - 1x10 ⁻¹¹	Directo

e) Generalidades y aplicación particular de la espectroscopía de fluorescencia

La mayoría de sustancias que absorben radiación ultravioleta o visible pierden su exceso de energía en forma de calor mediante choques con otros átomos o moléculas (figura 1.6) [43]. Existen un número importante de sustancias que sólo pierden en forma de calor una parte de su exceso de energía y emiten el resto en forma de radiación electromagnética de longitud de onda (λ) más larga que la absorbida. Por lo regular, para un átomo o molécula la vida del estado excitado por la absorción de radiación es breve ya que hay muchos procesos posibles de relajación que permiten su regreso al estado fundamental, entre los que se encuentran la relajación no radiante y la relajación por fluorescencia y por fosforescencia [44].

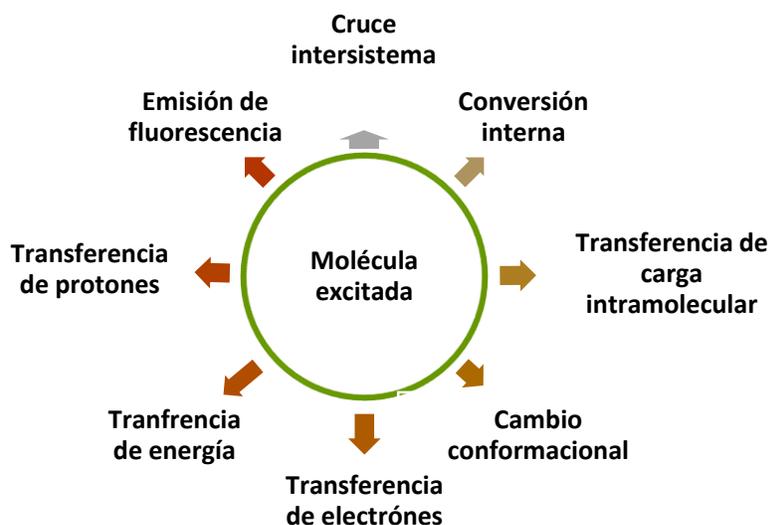


Figura 1.6. Posibles vías de pérdida del estado excitado de una molécula [43]

La fluorescencia y la fosforescencia son procesos de emisión importantes desde el punto de vista analítico. La emisión de radiación se presenta cuando la especie excitada con luz ultravioleta o visible, regresa a su estado fundamental. La fluorescencia ocurre con más rapidez que la fosforescencia y se completa después de 10^{-5} s a partir del tiempo de excitación [45].

La absorción y la emisión de luz es ilustrado por el diagrama de niveles de energía propuesto por A. Jablonski [46] (figura 1.7). En donde se tiene un estado basal, un segundo y tercer estado electrónico que se denotan como S_0 y S_1 y S_2 respectivamente, a cada uno de esos niveles de energía electrónicos, están asociados numerosos niveles de energía vibracionales que se muestran como 0, 1 y como 0, 1 y 2, siendo que las transiciones entre niveles de energía electrónica son verticales. Esta representación es usada para ilustrar la naturaleza instantánea de absorción de luz. La absorción de la radiación coloca a las moléculas en cualquiera de los diversos niveles vibracional asociados con los dos niveles electrónicos excitados. La vida de estos estados excitados vibracionales solo son del orden de 10^{-15} s, que es mucho menor que la vida de los estados electrónicos excitados (10^{-8} s) [46].

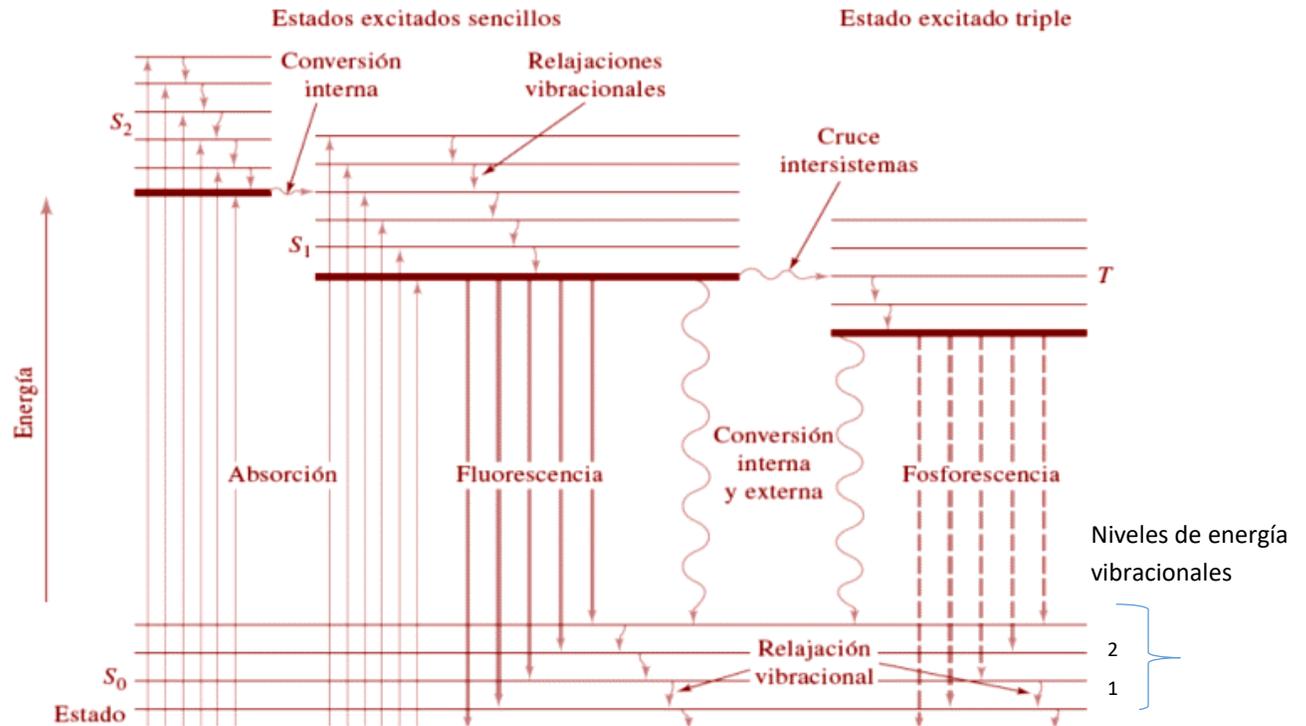


Figura 1.7. Diagrama de A. Jablonski [44]

Por tanto, la relajación vibracional se presenta en promedio antes que la relajación electrónica. Entonces, la energía de la radiación emitida es menor que la de la absorbida por una cantidad igual a la energía vibracional de excitación. Seguido a la absorción de luz varios procesos pueden ocurrir, una especie fluorescente es usualmente excitada a algún nivel vibracional tanto, de S_1 y S_2 . Con pocas excepciones, las moléculas en fase condensada rápidamente se relajan y pasan al nivel vibracional de más baja energía S_1 , proceso llamado conversión interna, que generalmente requiere 10^{-12} s y generalmente se completa *priori* a la emisión [44].

Para la absorción, la transición electrónica de un nivel de energía electrónica a uno más bajo también resulta en un estado vibracional excitado. Este estado también alcanza el equilibrio térmico en alrededor de 10^{-12} s. Una consecuencia interesante de esas consideraciones es que el espectro de absorción de la molécula refleja los niveles vibracionales del estado excitado electrónicamente, y el espectro de emisión refleja los niveles vibracionales del estado electrónico basal. Por lo general, la excitación electrónica no altera significativamente el espaciado de los niveles de energía vibracional y como resultado, la estructura vibracional en los espectros de absorción y emisión son similares [45].

En bioquímica, la técnica de fluorescencia puede proporcionar información cualitativa sobre la desnaturalización de proteínas, e información precisa y sensitiva sobre las interacciones proteína-ligando. En el último caso la unión de pequeñas moléculas a proteínas, pueden ser determinados tanto, por cambios en el rendimiento cuántico, como por la polarización de fluorescencia [47]. La fluorescencia intrínseca de las proteínas, se asocia principalmente a los aminoácidos aromáticos, triptófano (Trp), tirosina (Tyr) fenilalanina (Phe) [48]. Los grupos indol del triptófano son los grupos principales de la absorción y emisión en proteínas. La tirosina tiene un rendimiento cuántico similar al triptófano, pero su espectro de emisión es mucho más estrecho y se distribuye en un intervalo de longitudes de onda, esto da la impresión de un alto rendimiento cuántico de la tirosina. En proteínas nativas la emisión de tirosina casi siempre se ve apagada, lo cual se puede deber a su interacción con la cadena peptídica o la transferencia de energía al triptófano [48].

Las medidas de intensidad de fluorescencia también proporcionan información sobre el ambiente molecular en la vecindad de moléculas del cromóforo. Los cambios en el espectro de emisión del Trp, ocurre en respuesta a; transiciones conformacionales, asociación de subunidades, unión al sustrato y desnaturalización. La absorción de proteínas a 280 nm se debe tanto a residuos de tirosina [48], así como de triptófano, mientras que la absorción a longitudes más altas de 295 nm, se debe principalmente al triptófano. Así uno puede excitar selectivamente en el intervalo 295-305 nm, para observar solo la emisión del triptófano.

Una de las técnicas espectroscópicas más empleadas para el seguimiento de la interacción de proteínas con ligandos, es el apagamiento de la fluorescencia. El apagamiento de la fluorescencia se refiere a cualquier proceso que disminuye o anula la emisión fluorescencia de una sustancia. Una variedad de interacciones moleculares puede conducir al apagamiento; tales como reacciones en el estado excitado, rearrreglos moleculares, transferencia de energía, formación de complejos en el estado basal y apagamiento colisional [47]. El apagamiento de fluorescencia ha sido estudiado ampliamente tanto como un fenómeno natural, así como, una fuente de información para sistemas biológicos. Las aplicaciones en bioquímica se relacionan con las interacciones moleculares que resultan en el fenómeno de apagamiento.

El fenómeno de apagamiento puede dividirse en dos grupos: 1) apagamiento colisional o dinámico, que se presenta cuando la desactivación es resultado de los choques entre moléculas (molécula fluorescente y desactivante), y 2) apagamiento estático, cuando es el resultado de formación de complejos [49]. Tanto el apagamiento estático como el dinámico requieren que haya

contacto molecular entre el fluoróforo (residuos que confieren fluorescencia a la proteína dada) y el desactivante (en este caso el ligando). En el caso del apagamiento colisional, el fluoróforo debe interactuar con el desactivante, durante el tiempo de vida del estado excitado y con el contacto, el fluoróforo regresa al estado basal, sin la emisión de fotones. En general, el apagamiento se presenta sin un cambio permanente en la molécula, es decir, sin que ocurra una reacción fotoquímica. En el caso del apagamiento estático, es posible la formación de un complejo no fluorescente entre el fluoróforo y el desactivante [50].

El apagamiento usualmente se describe a través de la constante de apagamiento bimolecular, mediante la representación gráfica del modelo de Stern-Volmer [51],

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[L] \quad \text{con} \quad K_{SV} = K_q\tau_0 \quad [1.4]$$

Donde F_0 y F , son la emisión de fluorescencia de la proteína en ausencia y presencia del desactivante respectivamente y $[L]$ es la concentración del ligando libre (desactivante; se plantea desde un inicio que la concentración de ligando es mucho mayor que el de la proteína y se asume que en cada punto de la titulación la concentración de ligando total es igual a la concentración de ligando libre. De la pendiente de la gráfica de (F_0/F) en función de $[L]$, se obtiene la constante de Stern-Volmer, K_{SV} , que indica la sensibilidad de la fluorescencia o del fluoróforo a la presencia del desactivante. Si el fluoróforo se encuentra protegido en la molécula será parcial o totalmente inaccesible para el desactivante y como consecuencia, normalmente, el valor de K_{SV} será bajo. Por el contrario, los valores de esta constante son altos cuando el fluoróforo se encuentra libre en la disolución o si está situado en la superficie de la molécula [52]. Si se conoce el tiempo de vida τ_0 media del estado excitado del fluoróforo, es posible evaluar la constante de apagamiento bimolecular, K_q , la cual refleja la eficiencia del desactivante o la accesibilidad del fluoróforo al desactivante. Como se sabe el apagamiento controlado por difusión típicamente resulta en valores de K_q cercanas a $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, En el caso del apagamiento estático la dependencia de (F_0/F) vs $[L]$ también es lineal, la cual resulta similar a lo observado para el apagamiento dinámico, excepto que la constante de apagamiento K_{SV} , es ahora una constante de asociación K_s y equivalente a una constante de unión K_u .

La región lineal de la gráfica de Stern-Volmer generalmente indica solo una clase de fluoróforo ver figura 1.8a, es decir, que son igualmente accesibles para el desactivante. Si existen dos poblaciones de fluoróforos, y una clase no es accesible al desactivante, entonces la gráfica de

Stern-Volmer se desvía de la linealidad hacia el eje de las abscisas. Esta característica se encuentra frecuentemente en el apagamiento de fluorescencia del triptófano en proteínas por desactivantes polares o cargados. Estas moléculas no penetran fácilmente el interior de la proteína, y solo la fluorescencia de los residuos de triptófano sobre la superficie de la proteína son apagados [47].

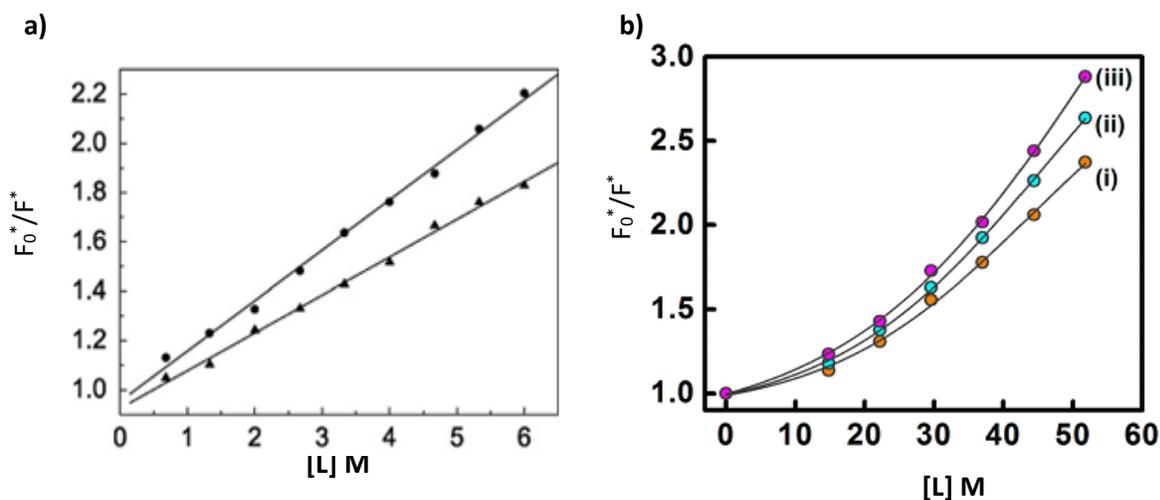


Figura 1.8. Gráfico de Stern-Volmer. a) Existencia de solo tipo de mecanismo de apagamiento, b) combinación de apagamiento estático y dinámico

En muchos casos el fluoróforo puede ser desactivado tanto por apagamiento dinámico como apagamiento estático, lo que resulta en la desviación del gráfico de Stern-Volmer hacia el eje de las ordenadas, ver figura 1.8b. El apagamiento estático y dinámico se puede distinguir por la diferente dependencia respecto a la temperatura, viscosidad o especialmente analizando los tiempos de vida media que presentan [47]. Las altas temperaturas resultan en una rápida difusión, y, por lo tanto, una mayor ocurrencia del apagamiento dinámico, así mismo, altas temperaturas también resultan en la disociación de complejos débilmente unidos. El decremento en el tiempo de vida ocurre debido a que el apagamiento está en un proceso de velocidad adicional que disminuye la población del estado excitado y, por lo tanto, la ocurrencia del apagamiento estático es pequeña. A menos que no haya información adicional sobre los datos de apagamiento de fluorescencia, algunas veces la magnitud de K_s puede ser usado para demostrar que el apagamiento dinámico no es responsable de la disminución de la intensidad [53].

Las mediciones de apagamiento de fluorescencia pueden revelar también, la accesibilidad del fluoróforo (grupos fluorescentes en la proteína) al desactivante (ligando), también si la proteína o membrana es impermeable al desactivante o si el fluoróforo está localizado en el interior de la

proteína. Las proteínas usualmente poseen varios residuos de triptófano que se encuentran en distintos ambientes en la proteína y cada residuo puede presentar distinta accesibilidad al desactivador. Por lo tanto, uno puede esperar gráficos complejos de Stern-Volmer, e incluso cambios especiales debido al apagamiento selectivo de los triptófanos expuestos en la superficie y los residuos en el interior de la proteína. La determinación de la fracción accesible al fluoróforo se obtiene a partir de la siguiente ecuación [1.5]

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a K_q} \frac{1}{[L]} + \frac{1}{f_a}$$

Donde F_0 y F , son la emisión de fluorescencia de la proteína en ausencia y presencia del desactivante respectivamente, $\Delta F = F_0 - F$ es la diferencia en la intensidad de fluorescencia debido a la concentración del desactivante, f_a , es la fracción del fluoróforo que es accesible al desactivante y K_q es la constante de apagamiento efectivo para el fluoróforo accesible. La dependencia de $\frac{F_0}{\Delta F}$ en función de $1/[L]$ (concentración ligando) es lineal, obteniéndose $1/f_a$ a partir de la ordenada al origen y $\frac{1}{f_a K_q}$ a partir de la pendiente.

El valor de la constante de unión K_u y el número de sitios de unión n , se pueden determinar en caso de que el apagamiento sea de tipo estático, a partir de la ecuación modificada de Stern-Volmer [54]

$$\log \left[\frac{F_0 - F}{F} \right] = \log K_u + n \log [L] \quad [1.6]$$

Donde F_0 y F , son la emisión de fluorescencia de la proteína en ausencia y presencia del desactivante respectivamente. La gráfica de $\log \left[\frac{F_0 - F}{F} \right]$ en función de $\log [L]$, permite determinar los valores de n a partir de la pendiente y de K_u de la ordenada al origen ecuación 1.6.

f) Acoplamiento molecular

El reconocimiento molecular entre receptores, por ejemplo, proteínas, y ligandos a través de asociaciones no covalentes tiene un papel fundamental virtualmente en todos los procesos biológicos [55]. Desde hace dos décadas, varios estudios han abordado el problema de relacionar los parámetros termodinámicos de unión con las características moleculares involucradas en la formación del complejo y con la naturaleza del complejo mismo [56-57]. El uso de la simulación biomolecular se ha incrementado y ha ganado relevancia como un método muy importante para entender la estructura, dinámica y funciones moleculares [57].

El acoplamiento molecular, es un procedimiento computacional, que intenta predecir las interacciones no covalentes, de macromoléculas o más frecuentemente de proteínas (receptores) y pequeñas moléculas (ligandos), partiendo de sus estructuras libres. El objetivo es predecir la conformación y afinidad de dicha unión [58]. El acoplamiento molecular ha ganado terreno en los últimos años, como una herramienta importante en el desarrollo y diseño de nuevos fármacos. En este rubro el acoplamiento molecular se emplea en tres principales escenarios: en la predicción del modo de unión proteína-ligando, búsqueda *in silico* (escaneo virtual) y evaluación de la afinidad de unión [59-61]. Así pues, esta técnica puede facilitar e incluso evitar, las etapas tempranas en el desarrollo de fármacos a través de una búsqueda sistemática de los ligandos, para encontrar la forma y compatibilidad energética con un receptor (proteína), previo a la evaluación experimental [62].

Los programas que realizan el acoplamiento generalmente usan funciones de simulación o tanteo, la cuales pueden ser vistas como un intento para aproximar los potenciales químicos estándar del sistema [59]. Estas funciones están basadas en métodos de mecánica molecular que, a diferencia de los métodos cuánticos, se basa en un modelo mecano clásico de la estructura molecular. En este modelo, las moléculas son tratadas como un conjunto de átomos en el espacio, unidos entre sí mediante enlaces, gobernadas por un conjunto de potenciales mecano-clásicos. Como consecuencia directa del modelo anterior, la energía total de una molécula se obtiene como la suma de una serie de contribuciones o términos perfectamente definidos que dependen de las coordenadas espaciales de los núcleos. Los términos que componen la función energía pueden ser agrupados en [63-64]:

- Términos de valencia: asociados a movimientos de tensión, flexión, torsión y flexión fuera del plano; son términos que dependen de los enlaces covalentes
- Términos de no valencia: que reflejan las interacciones a larga distancia entre átomos no enlazados. Engloban las interacciones de van der Waals y las interacciones electrostáticas.
- Términos cruzados: que aparecen al considerar que los enlaces, ángulos de enlace y diedros en una molécula, no están aislados, sino que pueden estar influenciados por los átomos y grupos químicos vecinos.

Existen tres importantes aplicaciones de las funciones de simulación en base al acoplamiento molecular. La primera de estas es la determinación del modo y sitio de unión del ligando en una

proteína, de acuerdo a la estructura de la proteína, el acoplamiento molecular genera cientos o miles de posibles conformeros, con distinta orientación/conformación alrededor del posible sitio de unión de la proteína. La segunda aplicación, la cual se relaciona a la primera, es predecir la afinidad absoluta entre la proteína y el ligando, la cual es particularmente importante para llevar a cabo la optimización [64-65]. La optimización se refiere al proceso de mejorar la afinidad de unión mejorando la afinidad computacional a través de modificaciones en la estructura de compuestos (ligandos) que ya han sido identificados. Durante este proceso una función de simulación precisa, puede incrementar de manera importante la eficiencia de la optimización y ahorrar costos, prediciendo *in silico* la afinidad de unión, entre la proteína y el ligando modificado antes de realizar estudios mucho más caros en la síntesis del ligando y las siguientes pruebas experimentales. La tercera aplicación, quizá la más importante, es el diseño de fármacos basados en la estructura, lo cual significa identificar fármacos potenciales o dirigidos para una proteína blanco [61].

Entre los distintos tipos de interacciones moleculares, las fuerzas electrostáticas son de importancia central debido a su largo alcance (figura 1.9) y la relevancia que posee la carga de los aminoácidos, además del papel importante que juegan dichas interacciones en la estructura, propiedades y funcionalidad de las macromoléculas [66]. El comportamiento exacto de las interacciones electrostáticas en una simulación está determinado por cuatro factores: la distribución de carga molecular, el radio atómico del soluto, las especies iónicas móviles y el disolvente [67]. La mayoría de los modelos electrostáticos aplicados en las simulaciones bimoleculares adopta una representación completa de los átomos de la macromolécula en cuestión. Estos modelos pueden dividirse en dos categorías: la primera incluye a todos los modelos que tratan al disolvente como explícito y realizan una modificación a la ley de Coulomb para calcular la energía electrostática, la segunda categoría trata al disolvente como implícito, reduciendo las interacciones con el soluto [68-69].

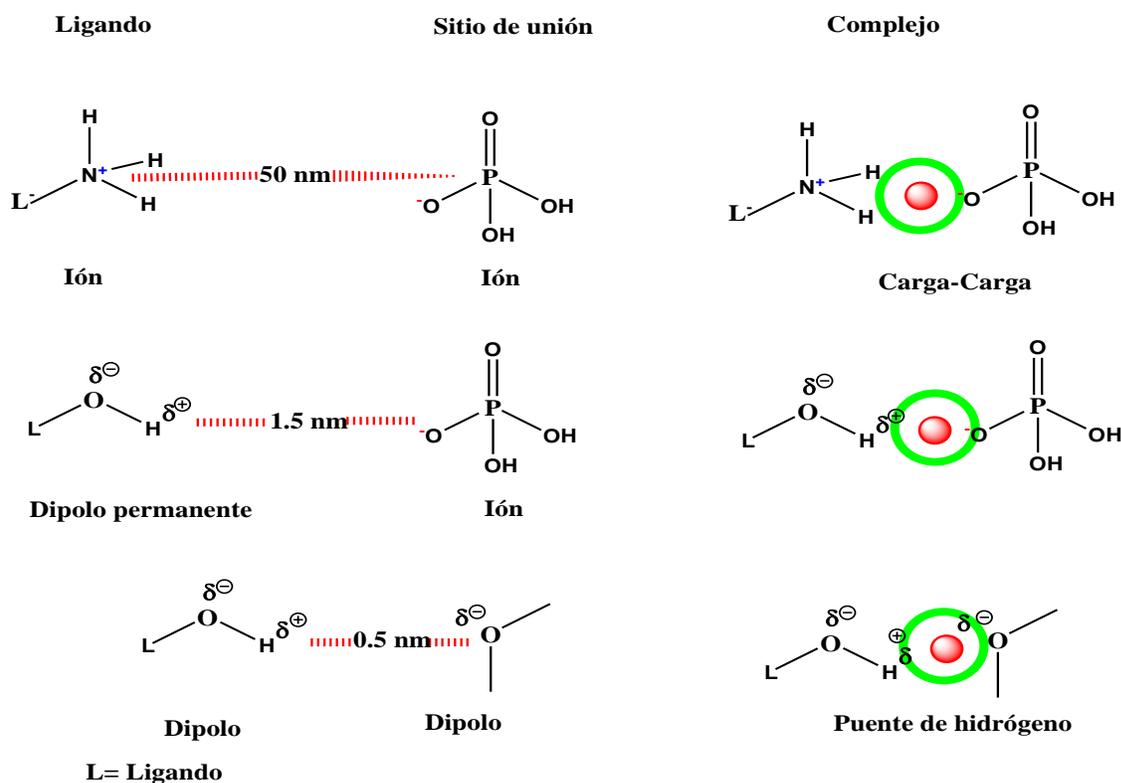


Figura 1.9. Distancias en nm de las diferentes interacciones intermoleculares que se presentan en la asociación proteína-ligando

Puesto que la mayoría de los procesos biológicos son regulados por proteínas, la caracterización termodinámica de la unión de proteínas y ligandos, es muy importante para el desarrollo de metodologías que nos permitan mejorar la afinidad de un ligando modificando su estructura química hacia una proteína blanco. Además de que este proceso es un paso relevante en las primeras etapas del desarrollo de nuevos compuestos farmacéuticos.

Por todo lo anterior, suponemos que debe ocurrir la interacción entre la lisozima, una enzima de estructura bien conocida, y la ftalocianina, un macrociclo tetrapirrólico de notables características fisicoquímicas y espectroscópicas. Para conocer la naturaleza de dicha interacción se realizarán estudios experimentales e *in silico*, obteniendo la factibilidad, sitio y naturaleza del acoplamiento. Todo ello con el fin de contribuir con una metodología de identificación de sistemas proteína-ligando, que permitan el desarrollo de nuevas estrategias que faciliten el transporte de fotosensibilizadores a bacterias o tumores para servir como medios de contraste o en terapia fotodinámica.

Objetivo general

- Estudio de la interacción lisozima- ftalocianina

Objetivos particulares

- ❑ Síntesis de la especie tetrasulfoftalocianina libre, H_2TSPc
- ❑ Síntesis de la especie tetrasulfoftalocianina de Hierro (III), $\mu-(OH)FeTSPc$
- ❑ Caracterización espectroscópica de las ftalocianinas libre y metálica, por ultravioleta-visible, infrarrojo y fluorescencia
- ❑ Determinación de los parámetros termodinámicos de unión: K_u , ΔH_u , ΔS_u , ΔG_u para el complejo lisozima-ftalocianinas, por espectroscopía de fluorescencia.
- ❑ Determinación del posible sitio de unión entre lisozima - $\mu-(OH) FeTSPc$ y lisozima- H_2TSPc , por medio del cálculo de ΔG_{uc}

a) Síntesis de μ -hidroxi-tetrasulfoftalocianina de Hierro (III), μ -(OH)FeTSPc, y tetrasulfoftalocianina libre, H₂TSPc

La síntesis tanto de μ -(OH)FeTSPc, como de H₂TSPc, se llevó a cabo por el método reportado por García Sánchez [8]. Para obtener la μ -hidroxi-tetrasulfoftalocianina de Hierro (III), μ -(OH)FeTSPc, se mezclaron 21.6 g ácido sulfoftálico, 4.7 g de NH₄Cl, 48 g de urea, 0.68 g de MoO₄, 5.8 g de FeCl₃ y 40 mL de nitrobenceno. Se puso a reflujo por 12 h a una temperatura de 120°C. Posteriormente se extrae con metanol y se filtra, el proceso de extracción se repitió hasta que el olor de nitrobenceno no fuese perceptible. El sólido resultante se disuelve en una solución 1 M de HCl, se calienta a una temperatura menor a 80°C por tres horas, se deja precipitar toda la noche y se filtra. Se obtuvo un sólido de color verde oscuro el cual contiene una gran cantidad de nitrato de amonio y cristales de urea, para eliminarlos, el sólido se re-disuelve en solución 0.2 M de NaOH y se calienta a una temperatura menor de 80°C, por menos de una hora (a mayor temperatura el NaOH degrada a las ftalocianinas), se deja que la ftalocianina precipite y se filtra. Después se procedió a lavar en *Soxhlet* con metanol y finalmente se sublima en dedo frío para eliminar la urea restante. Se realizó una última purificación en cromatografía en columna, usando metanol como eluyente. El esquema de reacción de la ftalocianina sintetizada se muestra en la figura 2.1. La síntesis y purificación de la especie libre H₂TSPc, se llevó a cabo utilizando el mismo procedimiento, a excepción de la adición de la sal de Hierro FeCl₃ para la formación de la especie libre.

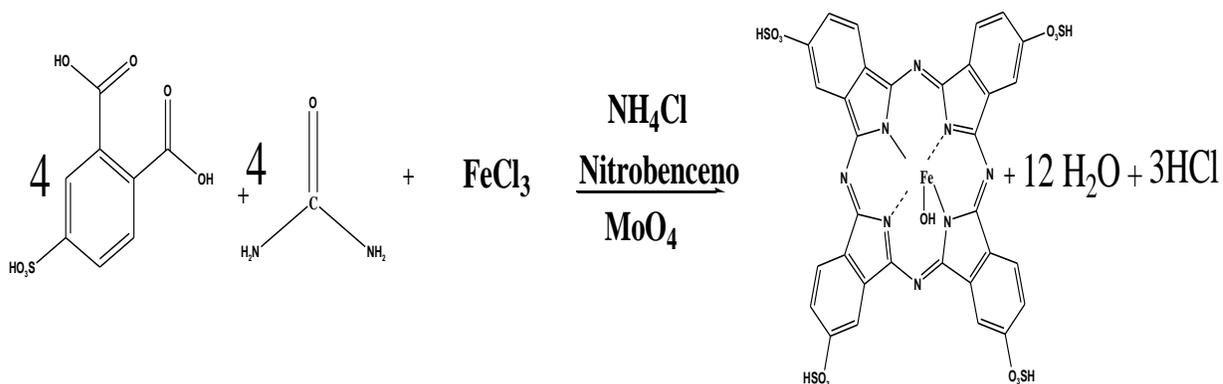
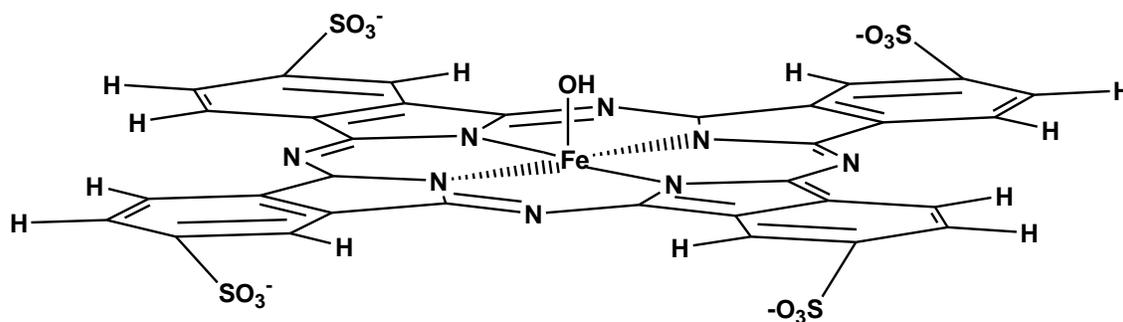


Figura 2.1. Esquema de reacción para la síntesis de μ -(OH)FeTSPc

En la figura 2.2 se muestran las estructuras de las especies sintetizadas

A)



B)

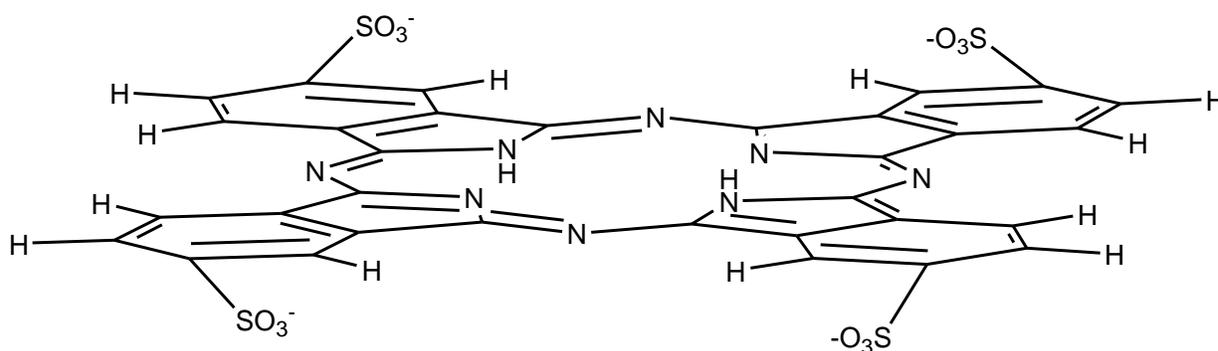


Figura 2.2. Estructura de las especies sintetizadas. A) $\mu\text{-(OH)FeTSPc}$ y B) H_2TSPc

b) *Lisozima*

La lisozima de huevo de gallina se obtuvo de sigma aldrich, no se realizó ningún tratamiento antes de cada estudio. Todas las soluciones de lisozima se prepararon en amortiguador (Previamente filtrado) de fosfatos (fosfato monobásico de Potasio y fosfato dibásico de Potasio) 5mM, pH7. Antes de cada uso, las soluciones de lisozima se pusieron en un vortex durante 10 segundos y posteriormente se filtraron.

c) *Caracterización de $\mu\text{-hidroxi-tetrasulfoftalocianina de Hierro (III)$, $\mu\text{-(OH)FeTSPc}$, y tetrasulfoftalocianina libre, H_2TSPc .*

La caracterización de las especies sintetizadas se llevó a cabo por espectroscopía UV-Vis en un espectrofotómetro Cary Varian modelo 500E en un intervalo de los 200 a 800 nm, los espectros de

fluorescencia se realizaron en un espectrofluorómetro K2 de ISS equipado con un baño para el control de temperatura, en ambos casos se utilizó una celda de recorrido óptico de 1 cm, los análisis de IR se llevaron a cabo en un espectrofotómetro IR perkin Elmer con transformada de Fourier.

d) Estudio de la interacción lisozima-ftalocianinas por espectroscopía de fluorescencia

Para conocer en que intervalo de longitudes de onda se podría monitorear la asociación de lisozima- μ -(OH)FeTSPc, se obtuvieron los espectros de emisión de fluorescencia tanto de la lisozima como de μ -(OH)FeTSPc libres, a diferentes longitudes de onda de excitación; 280, 320 y 370 nm. La determinación de la constante de unión se llevó a cabo titulando 3 mL de una solución de lisozima de concentración 5.983×10^{-6} M, disuelta en fosfatos 5 mM pH 7. Las ftalocianinas fueron disueltas en fosfatos 5 mM pH 7. Para evitar efectos de dilución, la titulación se realizó empleando volúmenes de 5 a 145 μ L para μ -(OH)-FeTSPc y de 5 a 175 μ L para H₂TSPc, a partir de una solución madre de concentración 1.7747×10^{-4} M. En cada adición se obtuvo el espectro de emisión de fluorescencia en el intervalo de los 290 a 650 nm. La longitud de onda de excitación fue de 280 nm. Todos los experimentos se llevaron a 4 diferentes temperaturas; 17.2, 25, 35 y 42. 5°C.

Se ha encontrado que la formación del complejo porfirinas metaladas (un análogo estructural de μ -(OH)FeTSPc) y lisozima se establece con estequiometría 1:1 [70] Para determinar la constante de unión lisozima- μ -(OH)FeTSPc se utilizó el modelo de apagamiento de fluorescencia, mediante la representación gráfica del modelo de Stern-Volmer $\log \left[\frac{F_0-F}{F} \right] = \log K_u + n \log [L]$, ecuación [1.6] la cual nos permite obtener la constante de unión a partir de la ordenada al origen y el número de sitios de unión, a partir de la pendiente.

Enfoque computacional

e) Estudios de acoplamiento de la interacción lisozima- monómero- μ -(OH)FeTSPc

La estructura cristalográfica de la lisozima con código ID PDB 2LYZ.pdb se obtuvo del *Protein Data Bank* y la estructura de μ -(OH)FeTSPc y de H₂TSPc se construyeron, a partir de una plantilla optimizada en *GaussView* 5.0, incorporando los grupos *sulfo* cargados negativamente. La estructura de μ -(OH)FeTSPc se construyó como monómero y como dímero cofaxial, mientras la

especie libre solo en forma monómerica debido a que es la especie predominante en la disolución de fosfatos 5 mM, pH 7. En una primera etapa se realizó el acoplamiento molecular con el programa *Autodock Vina* [58]. Para los estudios de refinamiento; a los mejores complejos se les realizó minimizaciones de energía con 100 pasos de *steepest descent* con el programa *CHARMM c35b2* [71] y con el campo de fuerza *charmm36* parametrizado para proteínas.

f) Cálculos de energía libre de unión computacional (ΔG_{uc}) del complejo lisozima- μ - macrociclo

Para todos los mejores conformeros obtenidos de los estudios de acoplamiento se utilizó el programa *PDB2PQR* [72], el cual prepara los archivos de datos cristalográficos para cálculos electrostáticos en un medio continuo, de acuerdo a la metodología de Nathan Baker [69]. Los archivos de salida tienen un formato similar al *PDB*, e incorporan los datos de carga y radio atómicos, utilizando como campo de fuerza *CHARMM*.

Para evaluar la energía libre de unión para el complejo lisozima-monómero- μ -(OH)FeTSPc, se determinaron separadamente las contribuciones de tipo electrostático polar y no polar, como se muestra a continuación:

$$\Delta G_{uc} = \Delta G_{uelec} + \Delta G_{uapol} \quad [2.1]$$

y a su vez

$$\Delta G_{uelec} = \Delta G_{usol} + \Delta G_{ucoul} \quad [2.2]$$

donde el ΔG_{uc} es la energía de unión y está en función de la energía electrostática, ΔG_{uelec} , y de la energía no electrostática o no polar, ΔG_{uapol} . A su vez el ΔG_{uelec} está en función de la energía de solvatación ΔG_{usol} (que es la energía necesaria para retirar el solvente del sitio activo para que se una el ligando a la proteína) y de la energía Coulómbica, ΔG_{ucoul} (la energía de interacción entre las cargas de la proteína y las cargas del ligando).

La componente electrostática se determinó resolviendo la ecuación no lineal de Poisson-Boltzman a través del programa *Adaptative Poisson-Boltzmann Solver* (APBS), descrito por Nathan Baker [68]. La contribución al ΔG_{uc} por parte de las interacciones no polares (ΔG_{unopol}) se evaluó como la energía liberada al ocultar el área de la interfase al disolvente cuando se forma el complejo: dicha energía es proporcional al cambio en el área accesible al solvente y un parámetro semejante a la tensión superficial (γ), con un valor de $0.021 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ para el agua: $\Delta G_{unopol} = \gamma \Delta A_{interfase}$. Para calcular el área de la interfase que queda oculta del solvente en el complejo se empleó el

programa *Visual Molecular Dynamics* (VMD) [73], a partir de los archivos *PDB* del complejo y de las moléculas individuales. Integrando las contribuciones electrostáticas y no electrostáticas se determinó el ΔG_{uc} de acuerdo a la ecuación [2.1].

CAPÍTULO 3

Resultados y discusión

a) Tetra-sulfoftalocianina de Hierro (III), μ -(OH)FeTSPc

La caracterización de la μ -(OH)FeTSPc se llevó a cabo por espectroscopía UV-Vis, fluorescencia e Infrarrojo con transformada de Fourier. El rendimiento de la reacción fue menor al 36 %. En la figura 3.1 se muestra el espectro UV-Vis de la especie μ -(OH)FeTSPc, en disolución reguladora de fosfatos 5mM pH 7 y 25 °C, el espectro indica que se presenta una fuerte tendencia a dimerizarse, esto es, se observa un desplazamiento y ensanchamiento de la banda Q a 635 nm, además de un desplazamiento de la banda de Soret en el intervalo de los 255-260 nm para cada nivel de concentración [8]. En general, los procesos de agregación, reducen la absorptividad del monómero libre, lo cual puede causar una desviación a la ley de Lambert-Beer, este decremento en la banda de absorción del monómero, puede ocurrir simultáneamente con otros cambios, tales como un alargamiento y un cambio en el máximo de absorción o la formación de bandas adicionales relacionadas a la agregación de μ -(OH)FeTSPc. De esta forma se establece que la posible inter

acció

n

con

lisozi

ma

se

da

con

la

form

a

dímé

rica de μ -(OH)FeTSPc.

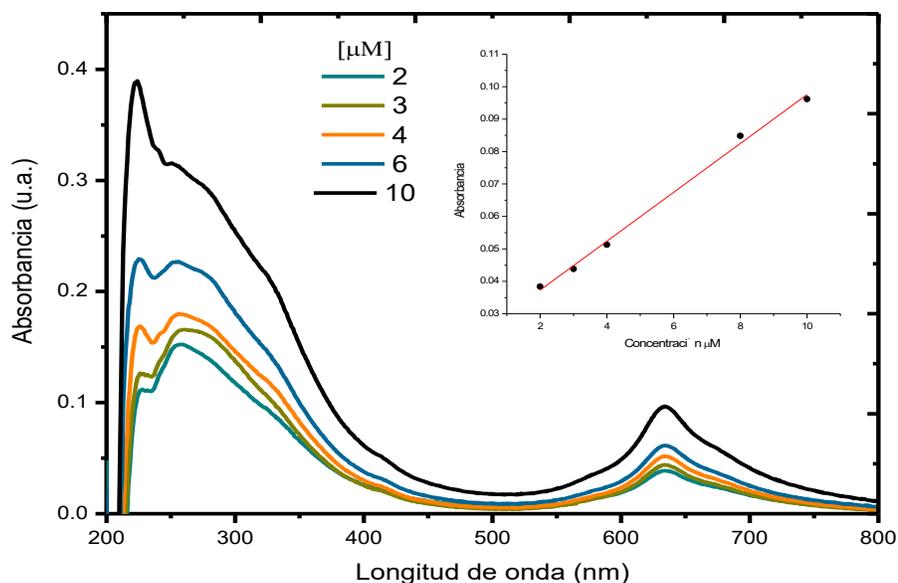


Figura 3.1 Espectro UV- Vis de la especie $\mu\text{-(OH)FeTSPc}$ en disolución reguladora de fosfatos 5mM pH 7 y 25 °C, en el recuadro se observa la relación lineal entre la absorbancia y el aumento de concentración a 635 nm

En la figura 3.2 se presenta el espectro FTIR de $\mu\text{-(OH)-FeTSPc}$ se compone de gran parte de las bandas asociadas a las vibraciones de los enlaces C=C del macrociclo aromático. Así mismo, se observa una gran banda asimétrica entre los 3700 y 2000 cm^{-1} que puede asociarse a las vibraciones del grupo hidroxilo (OH) axial al complejo de Hierro y aquellos de los grupos *sulfo* (HOSO_2^{-1}) de la sulfotetrapirrol.

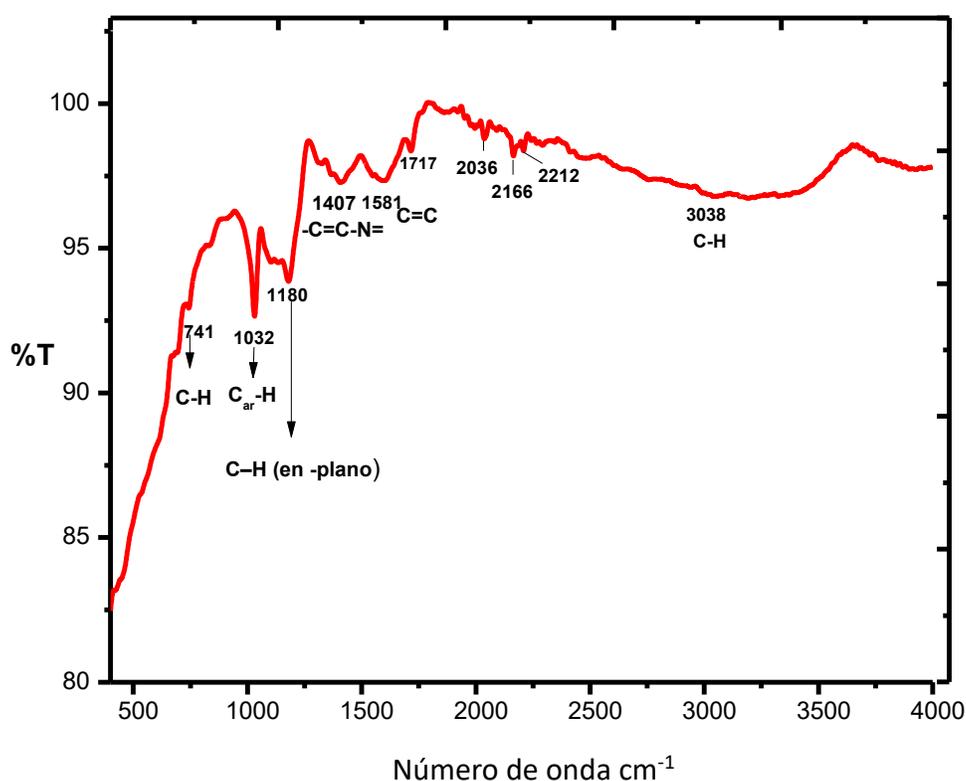


Figura 3.2. Espectro FTIR de la especie $\mu\text{-(OH)FeTSPc}$

b) Tetrasulfotetrapirrolina libre H_2TSPc

Como se sabe en la base libre de la ftalocianina, H_2TSPc , la degeneración de los estados Q se pierde; y se observan dos bandas intensas en el espectro UV-Vis una a 655 nm y otra a 693 nm de mayores intensidades asociadas al monómero del macrociclo. En la figura 3.3, se observan 3 espectros UV-Vis que están asociados a la agregación o dimerización de H_2TSPc en medio acuoso. La línea naranja representa una mayor concentración del monómero, el cual presenta 3

principales bandas de absorción; las bandas Q_{III} y Q_{II} que se observan a 639 y 693 nm respectivamente y la banda de Soret a los 343 nm. La línea negra se asocia a un equilibrio entre el monómero y dímero,

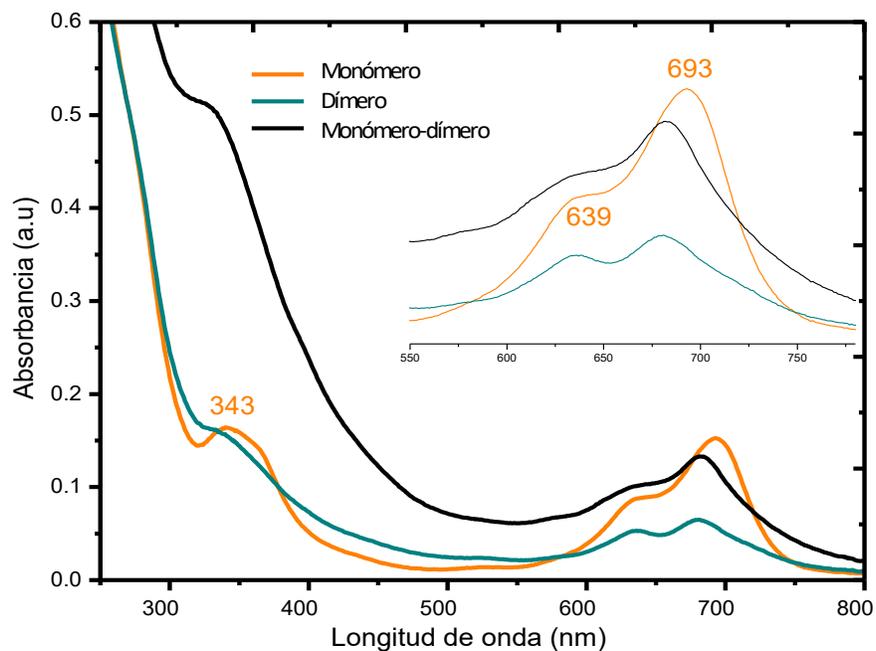


Figura 3.3. Espectro UV-Vis de tetrasulfoftalocianina libre en solución reguladora de fosfatos 5 mM, pH 7 y 25 °C. Cada espectro corresponde a diferente solución

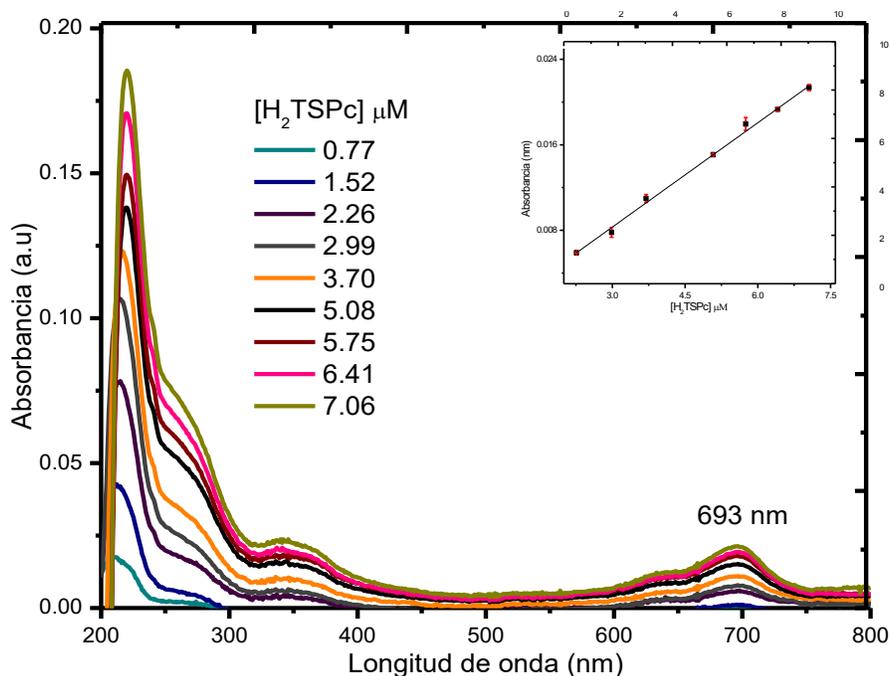


Figura 3.4 Espectros UV- Vis de la especie H_2TSPc , a diferentes concentraciones, en disolución reguladora de fosfatos 5 mM, pH 7 y 25 °C, en el recuadro se observa la relación lineal entre la absorbancia y el aumento de concentración a 693 nm.

con un desplazamiento a 682 nm y una disminución de la intensidad de la banda Q_{II} . El espectro en verde sugiere la existencia de una mayor concentración de dímeros, la intensidad tanto de la banda Q_{III} y Q_{II} se ve disminuida por dicho efecto.

En la figura 3.4 se observa la relación lineal entre la absorbancia en función de la concentración de la sulfoftalocianina libre, a diferencia de la especie metalada; la banda de Soret no se desplaza por el aumento de concentración, esto podría indicar que existe mayoritariamente la especie monomérica en el equilibrio y no se ve afectada por el aumento de concentraciones en el intervalo empleado.

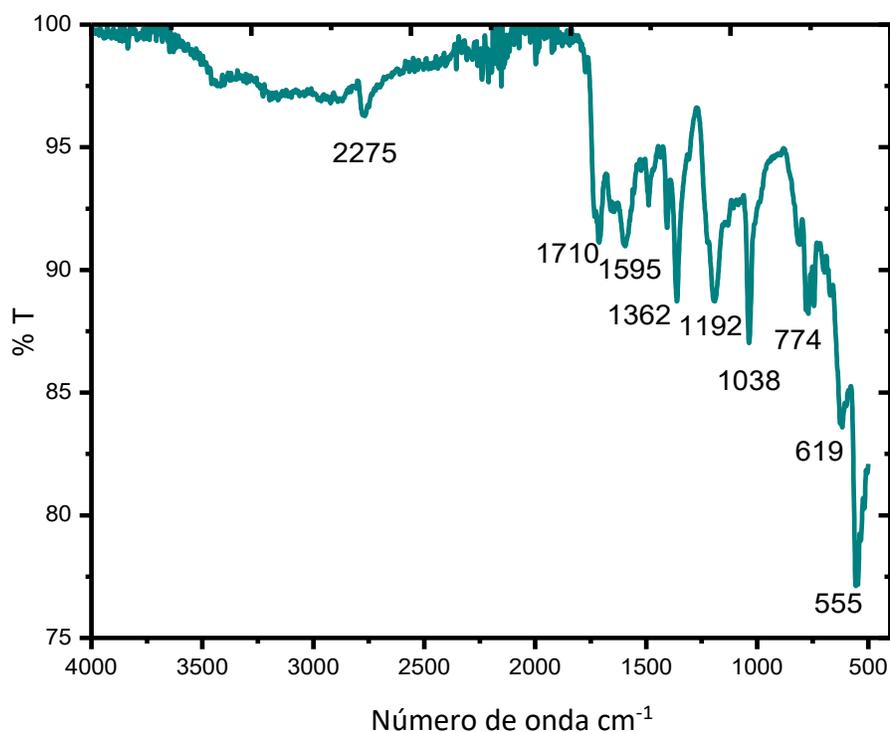


Figura 3.5 Espectro FTIR de la especie H_2TSPc

Una diferencia evidente en el espectro FTIR de la sulfoftalocianina libre, con respecto a la especie metalada, es la aparición de bandas asociadas a las vibraciones del grupo NH; las cuales pueden ser debido al estiramiento del enlace N-H, flexión del enlace N-H en el plano, y flexión del enlace N-H fuera del plano. Las vibraciones de estiramiento del enlace N-H se observan regularmente a

los 3273cm^{-1} , la banda en 1595cm^{-1} se puede asociar a la flexión del enlace N-H en el plano y la banda vista en 774cm^{-1} puede vincularse a la flexión del enlace N-H fuera del plano. Al igual que en la especie metalada se observa una fuerte absorción en el intervalo de 3700 y 2000cm^{-1} que puede asociarse a las vibraciones del grupo hidroxilo (OH) de los grupos *sulfo* (HOSO_2^{-1}) de la sulfoftalocianina libre (ver figura 3.5).

c) Formación del complejo lisozima-ftalocianina

La máxima absorción de la lisozima en la región ultravioleta se presentó a los 280nm (figura 3.6). Se estableció que el aumento de absorbancia en la zona $240\text{-}340\text{nm}$, tras la adición de cantidades crecientes de $\mu\text{-(OH)FeTSPc}$ o de H_2TSPc ambas a una concentración de $7.687 \times 10^{-7}\text{M}$ a $7.0584 \times 10^{-6}\text{M}$, se debía a la formación de un complejo entre la lisozima y las sulfoftalocianinas [74] (figura 3.7 y figura 3.8). Un cambio en el ambiente circundante de los residuos aromáticos de la lisozima puede modificar ligeramente su espectro de absorción, por lo que probablemente la interacción lisozima-macro ciclo tetrapirrólico se efectuó con algún residuo; de triptófano o tirosina. Estos resultados se discutirán más adelante.

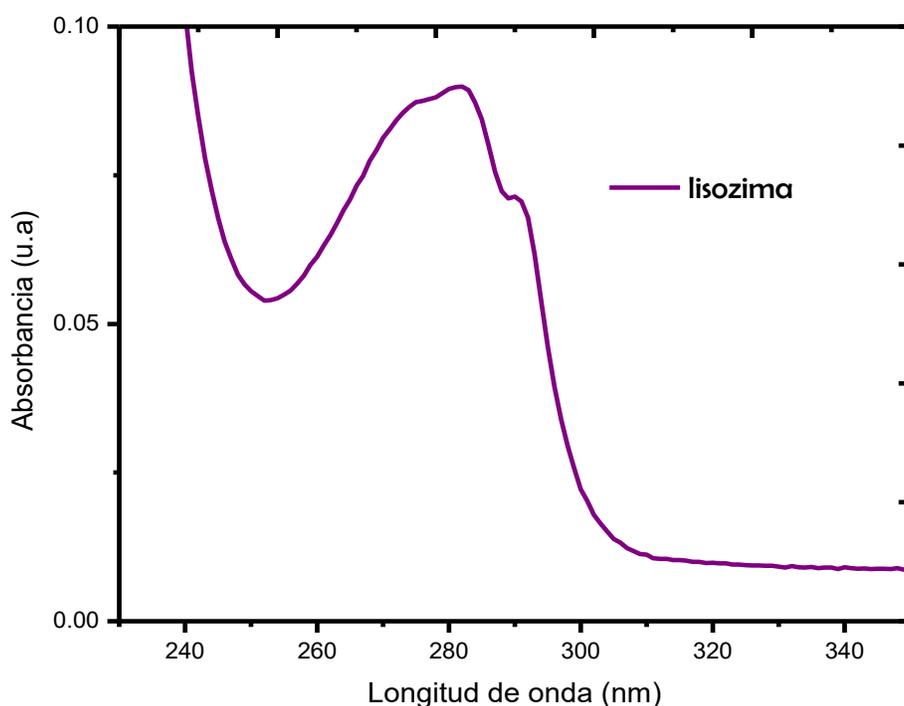


Figura 3.6 Espectro UV-vis de lisozima en solución reguladora de fosfatos pH 7 5mM.

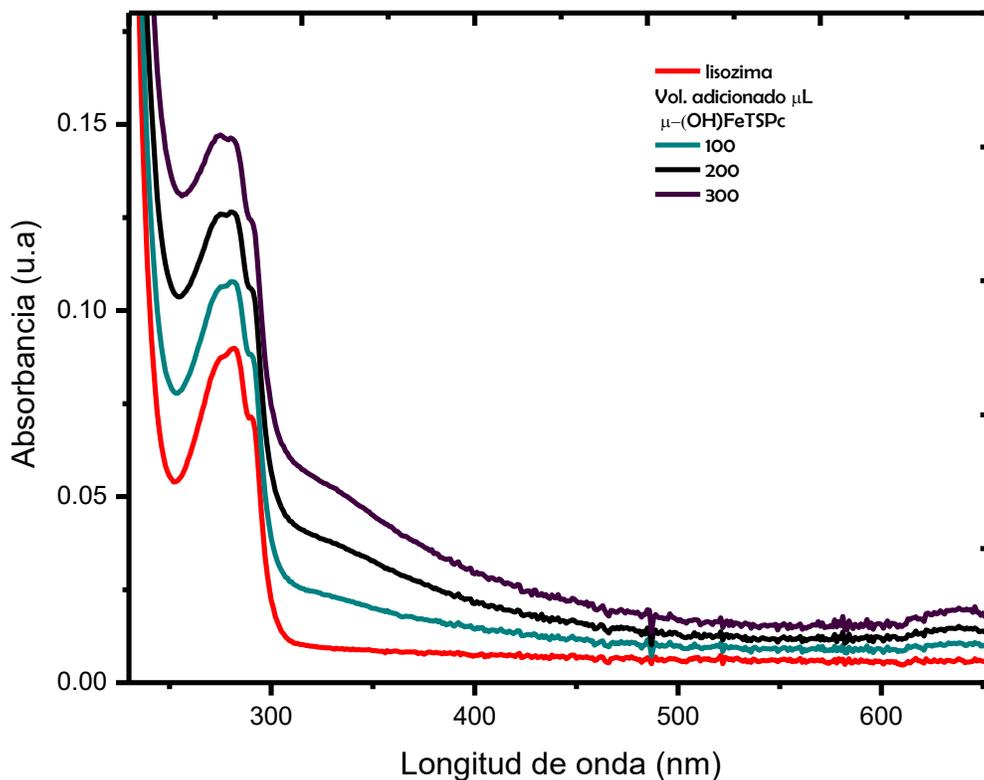


Figura 3.7 Espectro UV-vis de la titulación de lisozima con μ -(OH)FeTSPc

Como se observa en el espectro UV- Vis de la figura 3.8, la forma monómerica de H_2TSPc es la especie que predomina en la titulación con lisozima, debido a que se observa el mismo comportamiento que en la figura 3.1, es decir, están presentes las bandas Q_{III} y Q_{II} que se observan a 639 y 697 nm respectivamente y la banda de Soret a los 349 nm, asociadas a una mayor concentración de monómero en disolución. Por lo que, se establece que su interacción con esta proteína, posiblemente se establezca con la especie monómerica.

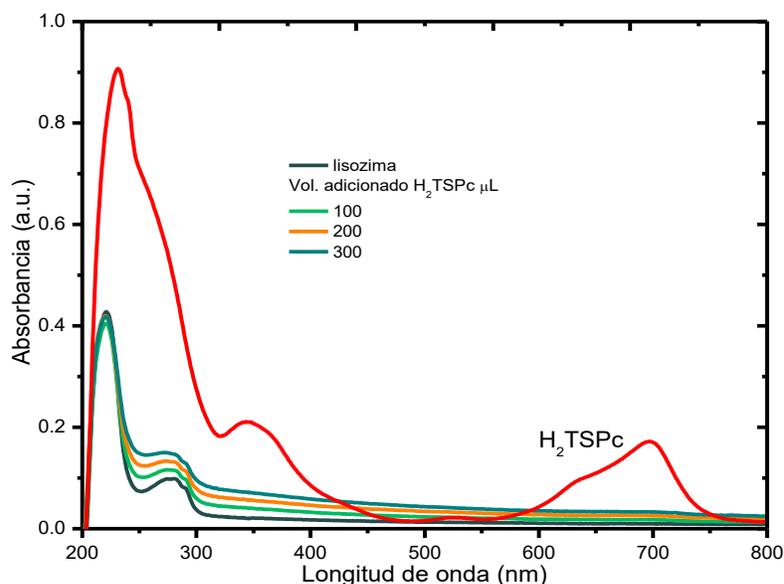


Figura 3.8 Espectro UV-vis de la titulación de lisozima con H_2TSPc , la línea roja indica el espectro de la sulfofalconina

d) Análisis de la interacción lisozima- $\mu-(OH)FeTSPc$ y lisozima- H_2TSPc por apagamiento de la fluorescencia

La técnica de apagamiento de fluorescencia, se utilizó para investigar el mecanismo de unión tanto de $\mu-(OH)FeTSP$, como de H_2TSPc a lisozima, determinando el modo de unión a través de los parámetros termodinámicos ΔH_u , ΔS_u y ΔG_u , y las constantes de unión. Los cambios de emisión del triptófano son comunes en respuesta a transiciones conformacionales, la unión al sustrato o cuando ocurre la desnaturalización de la proteína. La longitud de onda de excitación de 295 nm, permite observar solo la emisión de los residuos de triptófano, mientras a una longitud de onda de 280 nm se observa la excitación del triptófano, así como, de la tirosina presente en las proteínas [53].

En base a los espectros de emisión de fluorescencia de disoluciones en fosfatos 5 mM, pH 7, tanto de lisozima, como de $\mu-(OH)FeTSPc$ y de H_2TSPc , excitadas a diferentes longitudes de onda (figuras 3.9 y 3.10) y dado que para esta proteína la interferencia de la emisión de fluorescencia por parte de la tirosina y/o la transferencia de energía de la tirosina al triptófano es mínima [48], el seguimiento del apagamiento debido a la interacción lisozima-macrocielo tetrapirrólico, se llevó a cabo a una longitud de onda de excitación de 280 nm. En tales espectros se observó que la lisozima libre presentó un máximo de emisión a los 327 nm, que se debe principalmente a la emisión de los residuos de triptófano 62 y 108, además se observó otro máximo a 550 nm.

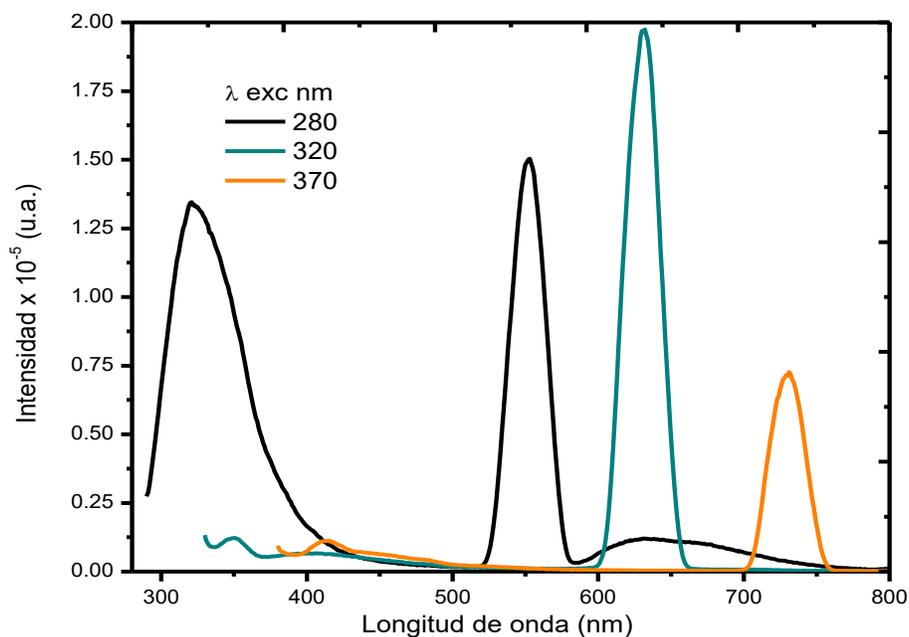


Figura 3.9 Espectro de fluorescencia de lisozima libre en disolución de fosfatos 5 mM, pH 7 y 25 °C, a diferentes longitudes de onda de excitación

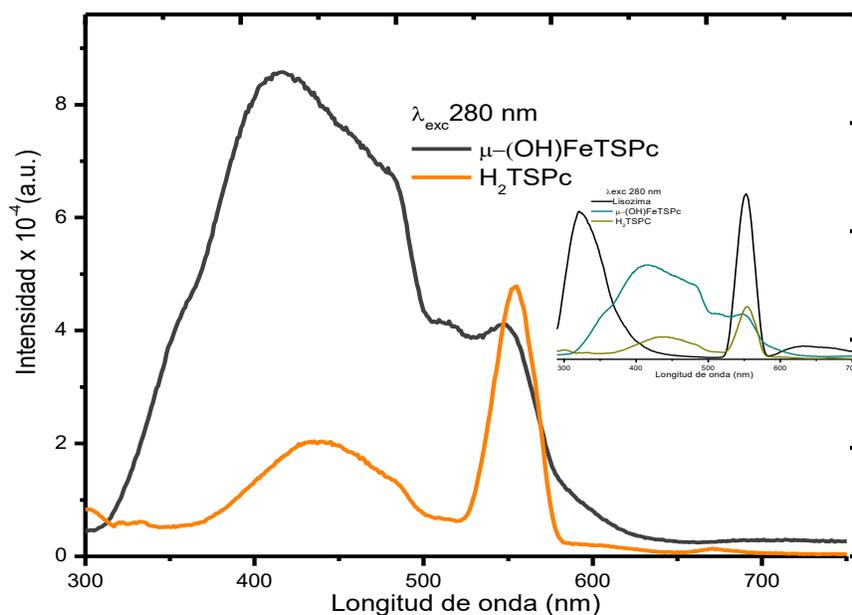


Figura 3.10. Espectro de fluorescencia de las especies $\mu-(OH)FeTSPc$ y H_2TSPc , en disolución de fosfatos 5 mM pH 7 y 25 °C. $\lambda_{exc} = 280$ nm. En el recuadro se observa el espectro de las sulfoftalocianinas además de la de la lisozima

Se observa que los macrociclos de ftalocianina libre o el complejo de Hierro presentan bandas de emisión en la región de los 435 y 555 nm, con máximos alrededor de 415 a 440 nm para las

especies H_2TSPc y $\mu-(OH)FeTSPc$, respectivamente, atribuidas principalmente al macrociclo de ftalocianina y los grupos *sulfo* periféricos (figura 3.10). Como se observa en los espectros de las titulaciones respectivas, las emisiones de los macrociclos respectivos no interfieren con la observación de la banda a 327 nm atribuida a la lisozima.

En la figura 3.11, se presentan los espectros de fluorescencia, a una $\lambda_{exc} = 280$ nm y a 25 °C, para la titulación de una disolución de lisozima con volúmenes crecientes de la disolución de $\mu-(OH)FeTSPc$. Las principales características espectrales son un máximo a 327 nm y otro a 553 nm, con un punto isobéptico a 405 nm. Vía el seguimiento de la intensidad de la banda a los 327 nm, se comprobó que existe una disminución o apagamiento intrínseco de fluorescencia de la lisozima, al titularla con cantidades crecientes de $\mu-(OH)FeTSPc$, lo cual se debe a la interacción entre la proteína y la ftalocianina de Hierro.

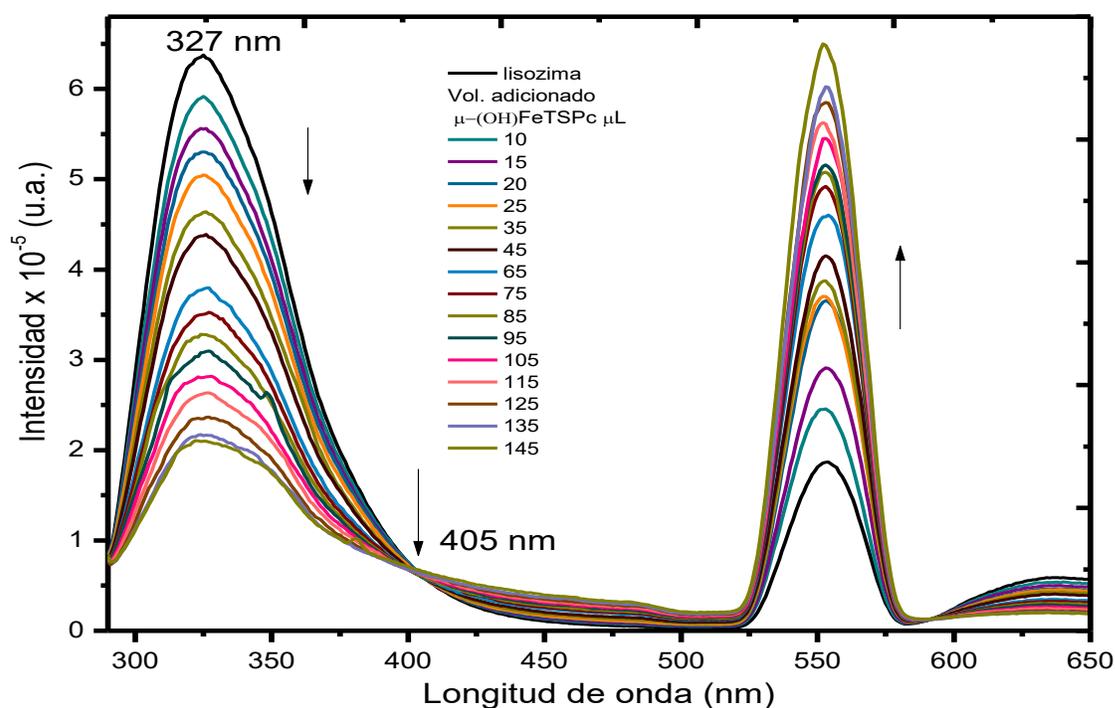


Figura 3.11 Espectros de fluorescencia ($\lambda_{exc} 280$ nm) a 25°C, del sistema lisozima- $\mu-(OH)FeTSPc$. La concentración de lisozima fue de 5.983×10^{-6} M y la de ftalocianina 5.9×10^{-7} a 8.72×10^{-6}

En la figura 3.12, se presentan los espectros de fluorescencia, con $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$ y $25 \text{ }^\circ\text{C}$, para la titulación de la disolución de lisozima con volúmenes crecientes de la disolución de H_2TSPc . Las principales características espectrales son un máximo a 327 nm y otro a 553 nm , con un punto isobéptico a 435 nm . Por el seguimiento de la intensidad de fluorescencia de la banda a los 327 nm , se comprobó que existe una disminución o apagamiento intrínseco de fluorescencia de la lisozima, al titularla con cantidades crecientes de H_2TSPc , lo cual se debe a la interacción entre la proteína y la ftalocianina libre.

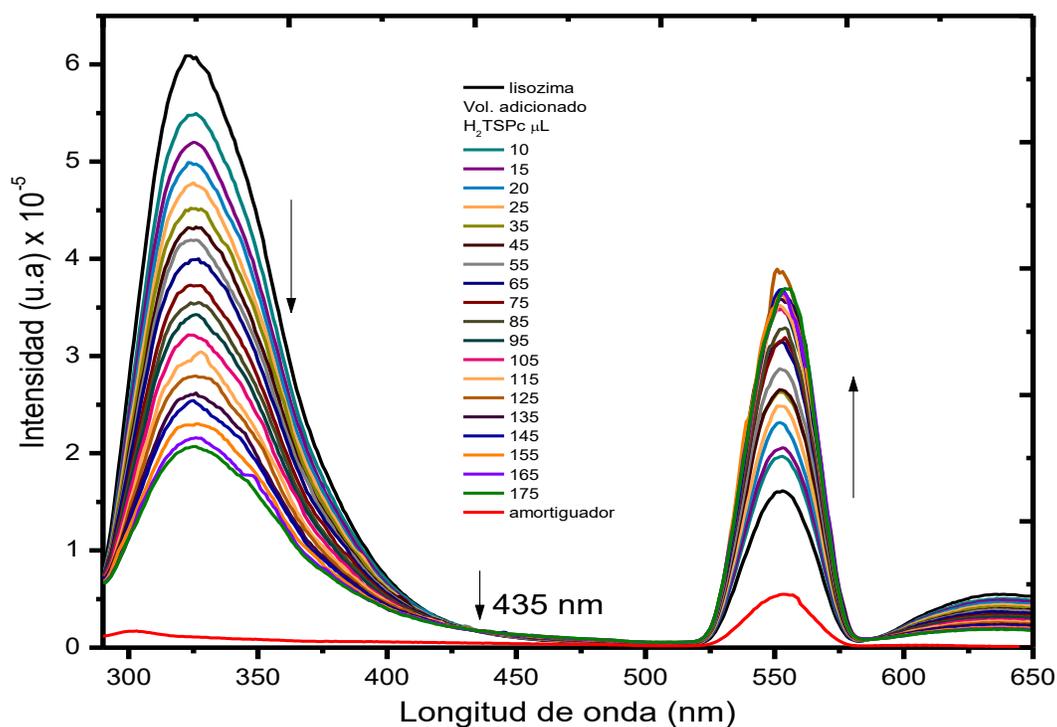


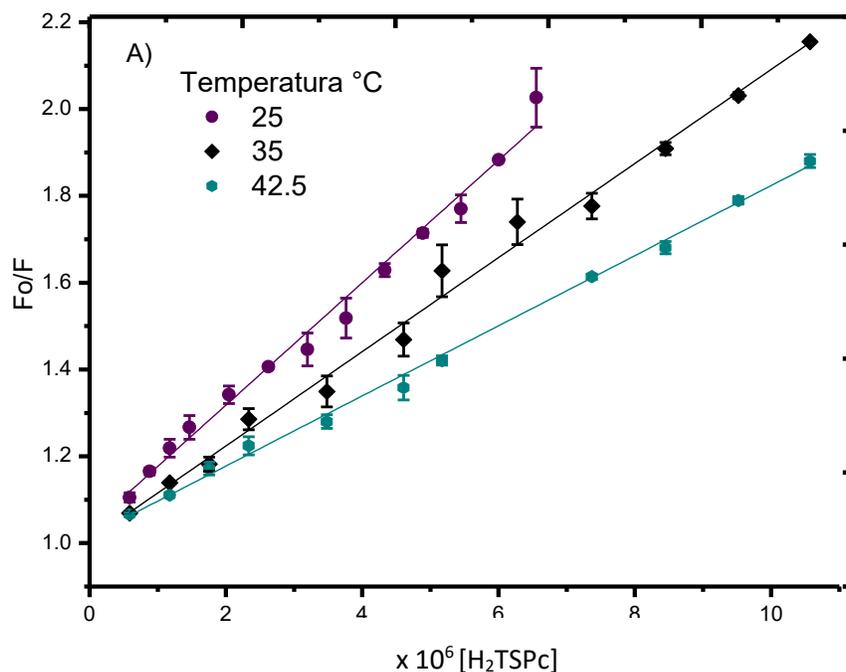
Figura 3.12 Cambios en el espectro de fluorescencia ($\lambda_{exc} 280 \text{ nm}$) de lisozima a 25°C , al adicionar cantidades crecientes de H_2TSPc . La concentración de lisozima fue de $5.983 \times 10^{-6} \text{ M}$

Los cambios de fluorescencia de la disolución de lisozima al titular con la disolución de $\mu\text{-}(\text{OH})\text{FeTSPc}$ o la disolución de H_2TSPc fueron similares, la disminución de fluorescencia a los 327 nm se ve acompañado de un aumento en la emisión a los 553 nm cuando la concentración de ambos ligandos aumenta. Esta disminución y aumento de la emisión a los 327 nm y 553 nm , respectivamente se considera como un punto isoemisiivo y puede ser visto como la fluorescencia de $\mu\text{-}(\text{OH})\text{FeTSPc}$ o H_2TSPc unidos a la lisozima[75].

El apagamiento de fluorescencia corresponde a un decremento en el rendimiento cuántico (intensidad de fluorescencia) del fluoróforo (lisozima) y como se mencionó, puede ser inducido

por medio de una variedad de interacciones moleculares con el desactivante (ftalocianina). Para distinguir el fenómeno de apagamiento con ambos ligandos, se realizaron los experimentos de titulación fluorométrica a diferentes temperaturas: 25, 35 y 42.5°C, y 17.2 °C para la sulfoftalocianina de Hierro (III). En la representación del gráfico de Stern-Volmer: (F_0/F) en función de $[L]$ (ecuación [1.4]), de lisozima en presencia y ausencia de $\mu\text{-(OH)FeTSPc}$ o H_2TSPc , se observó una tendencia lineal, lo cual nos indica que solo está presente un único tipo de mecanismo de apagamiento (figura 3.13).

La dependencia del apagamiento dinámico a altas temperaturas, resulta en una difusión más rápida, por tanto, la constante de Stern-Volmer aumenta con la temperatura. En contraste con el apagamiento estático, las altas temperaturas afectan la estabilidad del complejo (no fluorescente) formado y por lo tanto K_{SV} disminuye [41].



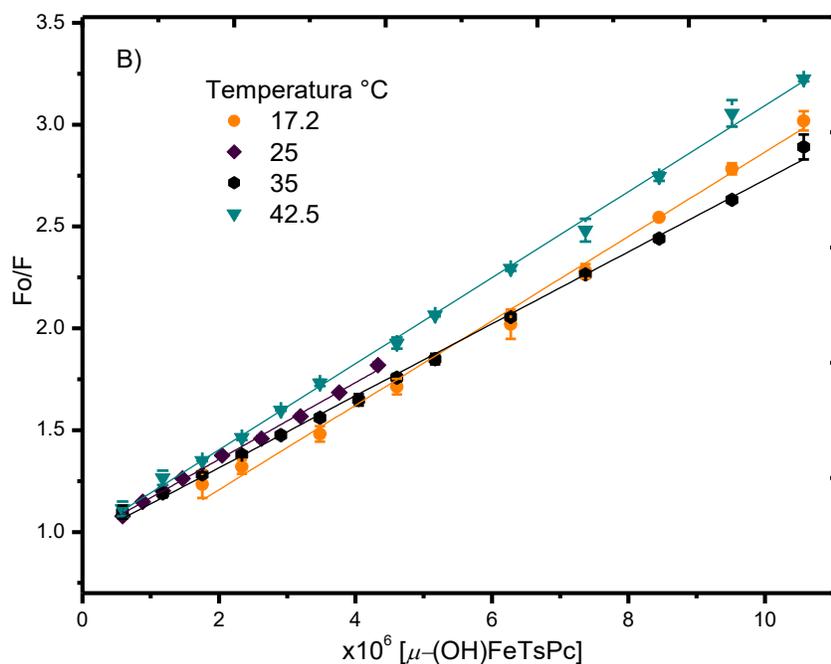


Figura 3.13. Gráfico de Stern-Volmer de las titulaciones de lisozima a diferentes temperaturas, con las especies A) H_2TSPc y B) $\mu-(OH)FeTsPc$, todas las muestras se disolvieron en amortiguador de fosfatos 5 mM, y pH 7.

En la tabla 3.1 se presentan los valores de K_{SV} , obtenidos a partir de la pendiente de los gráficos de Stern-Volmer, para la interacción de lisozima con ambos ligandos. Debido a que el apagamiento disminuye con el aumento de la temperatura la interacción, tanto de lisozima- $\mu-(OH)FeTsPc$, como de lisozima- H_2TSPc , ocurre de acuerdo a un modelo de tipo estático. Los valores de K_{SV} , muestran la misma tendencia con ambos macrociclos.

Un dato interesante e importante deducido de estas valoraciones son los altos valores de K_{SV} encontrados para ambos complejos, siendo mayores a cada nivel de temperatura para la especie $\mu-(OH)FeTsPc$, que para la especie H_2TSPc . Lo anterior indica que el apagamiento es más efectivo en presencia de la especie metalada que en la libre.

Tabla 3.1 Valores de K_{SV} del sistema lisozima-macrocielo a diferentes temperaturas

	T °C	$K_{SV} \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	R^2
Lisozima- H₂TSPc	25 ± 0.09	1.414 ± 0.455	0.9877
	35 ± 0.25	1.082 ± 0.298	0.9917
	42.5 ± 0.32	0.839 ± 0.014	0.9967
Lisozima-μ-(OH)FeTSPc	17.2 ± 0.06	2.047 ± 0.057	0.9939
	25 ± 0.07	1.893 ± 0.042	0.9965
	35 ± 0.08	1.767 ± 0.023	0.9978
	42.5 ± 0.23	1.6706 ± 0.027	0.9954

Ya que el gráfico de Stern-Volmer (figura 3.13) no se desvió hacia el eje de las abscisas, en ambos casos, se propone que existe un solo tipo de fluoróforo, en la lisozima, que es accesible para ambos ligandos. En otro estudio [76], se ha observado dicha desviación hacia el eje de las abscisas en la interacción de lisozima con diferentes ligandos, pero el mecanismo de apagamiento es prominentemente dinámico, además de que se ha realizado con ligandos sin carga.

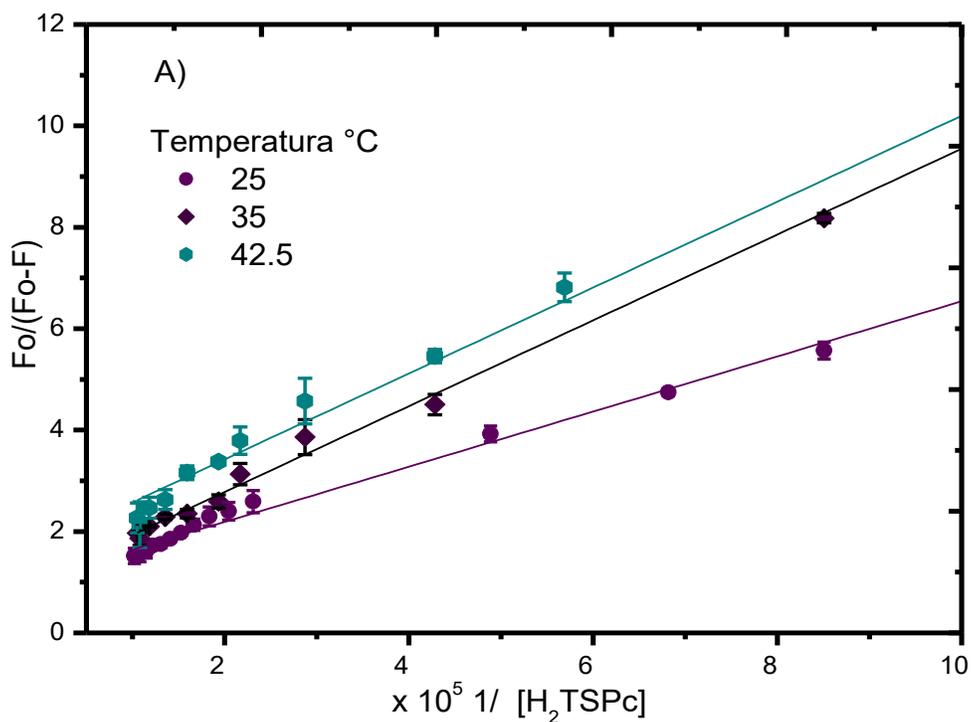
Por otro lado, el apagamiento estático también puede ser observado mediante los espectros de UV-Vis del sistema proteína-ligando. El apagamiento colisional solo se afecta el estado excitado del fluoróforo, y por lo tanto no se esperan cambios en el espectro de absorción. En contraste, la formación de un complejo en el estado basal frecuentemente resulta en una perturbación en el espectro de absorción del fluoróforo [32]. Como se observa en la figura 3.7 y 3.8 de los espectros de absorción de la disolución de lisozima, en presencia de μ -(OH)FeTSPc y H₂TSPc, estos se ven afectados por la adición de los macrocíclicos, reflejándose en el aumento de la absorción a 280 nm, lo cual nos indica que se presenta preferencialmente el fenómeno de apagamiento estático, por la formación del complejo lisozima- μ -(OH)FeTSPc o lisozima-H₂TSPC.

Determinación de la fracción de fluoróforo accesible

Es bien sabido que la lisozima posee 6 residuos de triptófano; 28, 62, 63, 108, 111 y 123 [37]. Dos de estos (28 y 111) están rodeados por puentes difulfuro, y, por tanto, no contribuyen a la fluorescencia de la proteína. Tres de ellos están localizados en el sitio activo; 62, 63 y 108, mientras el último (123) está separado de los demás. La emisión de fluorescencia se debe principalmente a los residuos Trp-62 and Trp-108 [77-78]. La fracción de fluoróforo accesible se

puede determinar mediante la ecuación modificada de Stern-Volmer $\frac{F_0}{\Delta F} = \frac{1}{f_a K_q} \frac{1}{[L]} + \frac{1}{f_a}$ (ecuación 1.5). Cuando la fracción de fluoróforo accesible f_a es igual a 1, indica que todos los residuos de triptófano son accesibles al desactivante. Consecuentemente, un cambio en el valor de f_a indica que la fracción de fluoróforo accesible al desactivante se ha alterado. Aplicando la ecuación [1.5] a los datos obtenidos para la interacción de lisozima con ambos macrociclos, se obtuvo una tendencia lineal para cada nivel de temperatura (figura 3.14), los valores de f_a se muestran en la tabla 3.2.

Los valores de f_a para las temperaturas de 17.2, 25, 35 y 42.5 °C, oscilan en torno al valor de uno, indicando que ambos triptófanos que confieren fluorescencia a la lisozima son igualmente accesibles, tanto a la sulfoftalocianina metalada como a la libre.



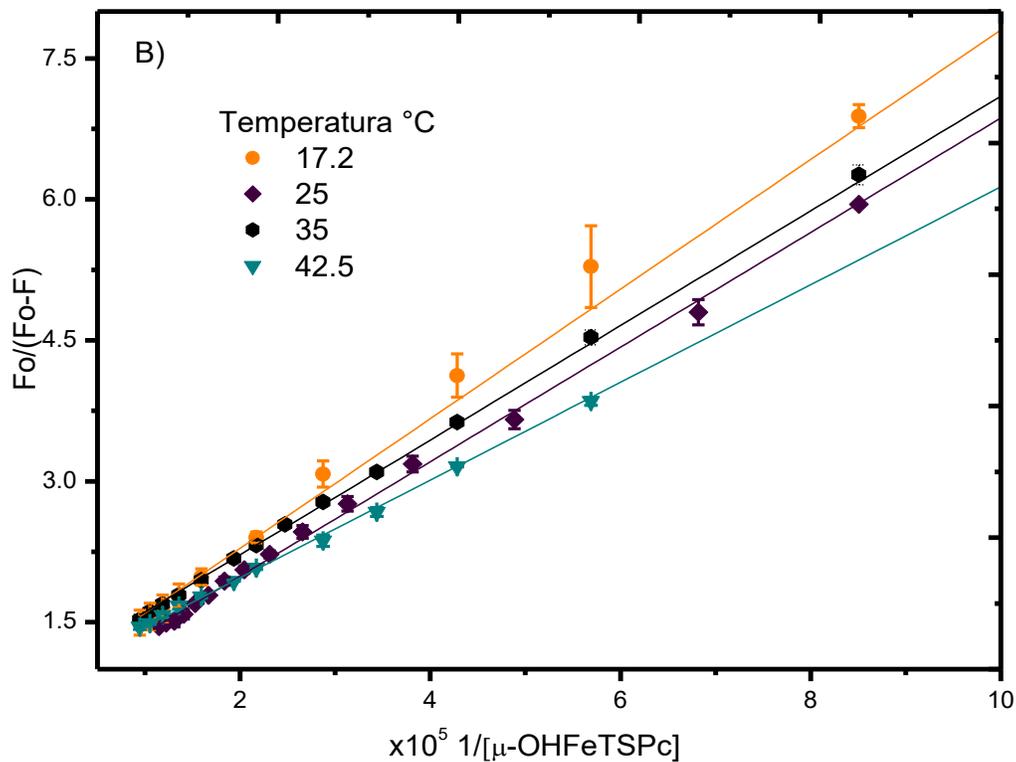


Figura 3.14 Grafico modificado de Stern-Volmer, para la obtención de la fracción de fluoróforo accesible al desactivante A) H_2TSPc y B) $\mu-(OH)FeTSPc$. Las líneas rectas representan el ajuste por mínimos cuadrados.

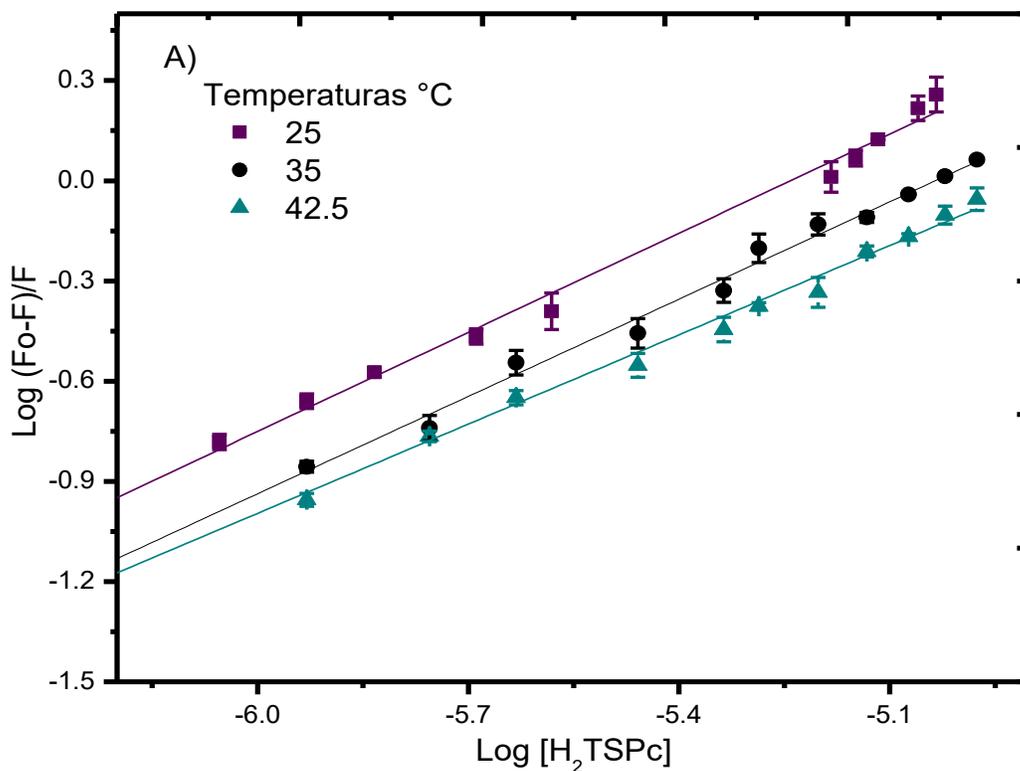
Tabla 3.2. Fluoróforo accesible para la asociación lisozima-ligando a diferentes temperaturas

	T °C	f_a	R^2
Lis- H_2TSPc	25 ± 0.09	0.90 ± 0.05	0.9962
	35 ± 0.25	0.90 ± 0.06	0.9984
	42.5 ± 0.32	0.60 ± 0.11	0.9950
Lis- $\mu-(OH)FeTSPc$	17.2 ± 0.06	1.01 ± 0.09	0.9957
	25 ± 0.07	1.29 ± 0.02	0.9990
	35 ± 0.08	0.98 ± 0.02	0.9995
	42.5 ± 0.23	1.06 ± 0.09	0.9924

Determinación de la constante de unión y estequiometría de la unión

Para interacciones de apagamiento estático y asumiendo que todos los sitios de unión son iguales e independientes en la lisozima, los datos de intensidad de fluorescencia pueden ser usados para obtener el número de sitios y la constante de unión entre lisozima-macro ciclo, utilizando la ecuación [1.6], para ello se graficó el logaritmo de $(F_0-F)/F$, en función del logaritmo de la concentración para cada macrociclo y a diferentes temperaturas, obteniéndose en cada caso relaciones lineales (figura 3.15).

Los valores obtenidos de n y K_u , calculados a partir de la pendiente y la ordenada al origen, respectivamente, se muestran en la tabla 3.3, de ellos se deduce que en todos los casos el número de sitios de unión fluctuó alrededor de 1, sugiriendo una estequiometria de unión 1:1, lisozima-ftalocianina, en los dos casos. Los altos valores de K_u indican que el complejo formado es termodinámicamente muy estable, siendo más afin el complejo formado con la especie $\mu-(OH)FeTSPc$. Como se menciona anteriormente, la forma predominante de $\mu-(OH)FeTSPc$ en disolución acuosa es como un dímero figura 3.1, seguramente de tipo cofaxiales debido a la existencia del grupo hidroxilo axial sobre el núcleo de Hierro al centro del macrociclo



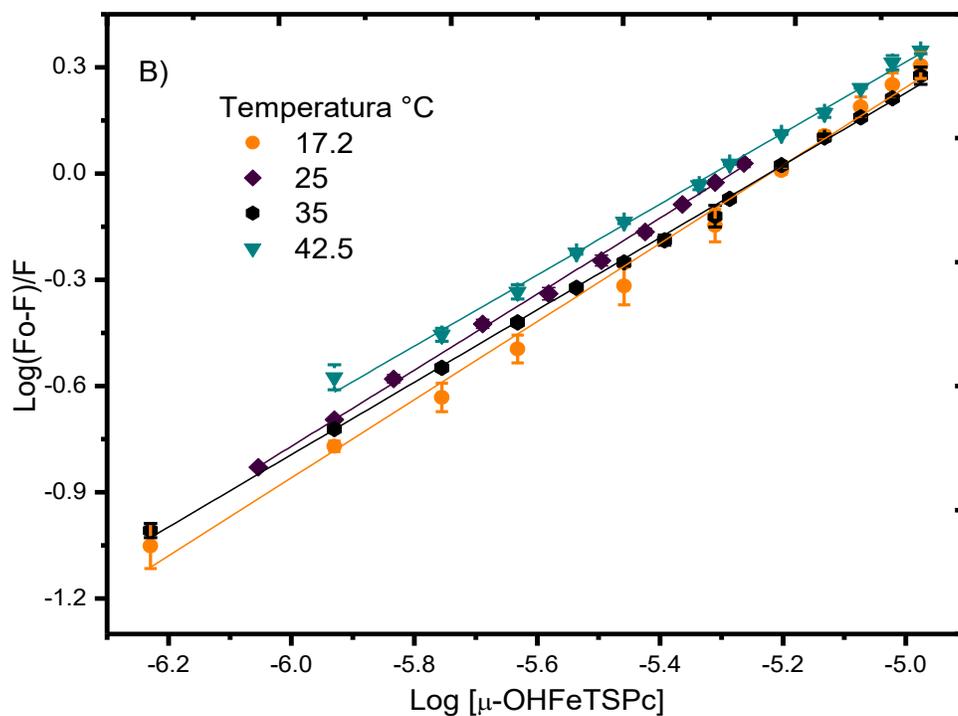


Figura 3.15 Gráfico de $\log (F_o-F)/F$ en función logaritmo [macrociclo] para la determinación de la estequiometría y la constante de unión con las especies H_2TSPc (A) ó $\mu-(OH)FeTSPc$ (B). Las líneas rectas fueron ajustadas por mínimos cuadrados

Tabla 3.3. Parámetros de unión para el sistema lisozima-sulfoftalocianina a diferentes temperaturas

*El valor de ΔG_u , se obtuvo de la ecuación $\Delta G = -RT \ln K$

	T °C	n	$K_u \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	R ²	* ΔG_u kJ/mol
Lis- H_2TSPc	25 ± 0.09	1.00 ± 0.02	1.823	0.9931	-30.02
	35 ± 0.25	0.97 ± 0.02	0.815	0.9936	-28.90
	42.5 ± 0.32	0.89 ± 0.02	0.212	0.9929	-26.14
Lisozima-$\mu-(OH)FeTSPc$	17.2 ± 0.06	1.10 ± 0.33	5.780	0.9915	-32.03
	25 ± 0.07	1.07 ± 0.01	4.384	0.9983	-32.20
	35 ± 0.08	1.03 ± 0.01	2.454	0.9993	-31.80
	42.5 ± 0.23	0.99 ± 0.01	1.778	0.9969	-31.72

Parámetros termodinámicos de unión ΔH_u , ΔS_u

Los parámetros termodinámicos ΔH y ΔS de unión se obtuvieron a partir de la pendiente y ordenada al origen, respectivamente de los gráficos de van't Hoff (ecuación [1.3]), asumiendo que ΔH y ΔS son independientes de la temperatura en el intervalo estudiado (figura 3.16). Estos datos termodinámicos (tabla 3.4), son una evidencia importante para confirmar las fuerzas involucradas en la unión, lo que permite sugerir el tipo de interacción presente en el sistema.

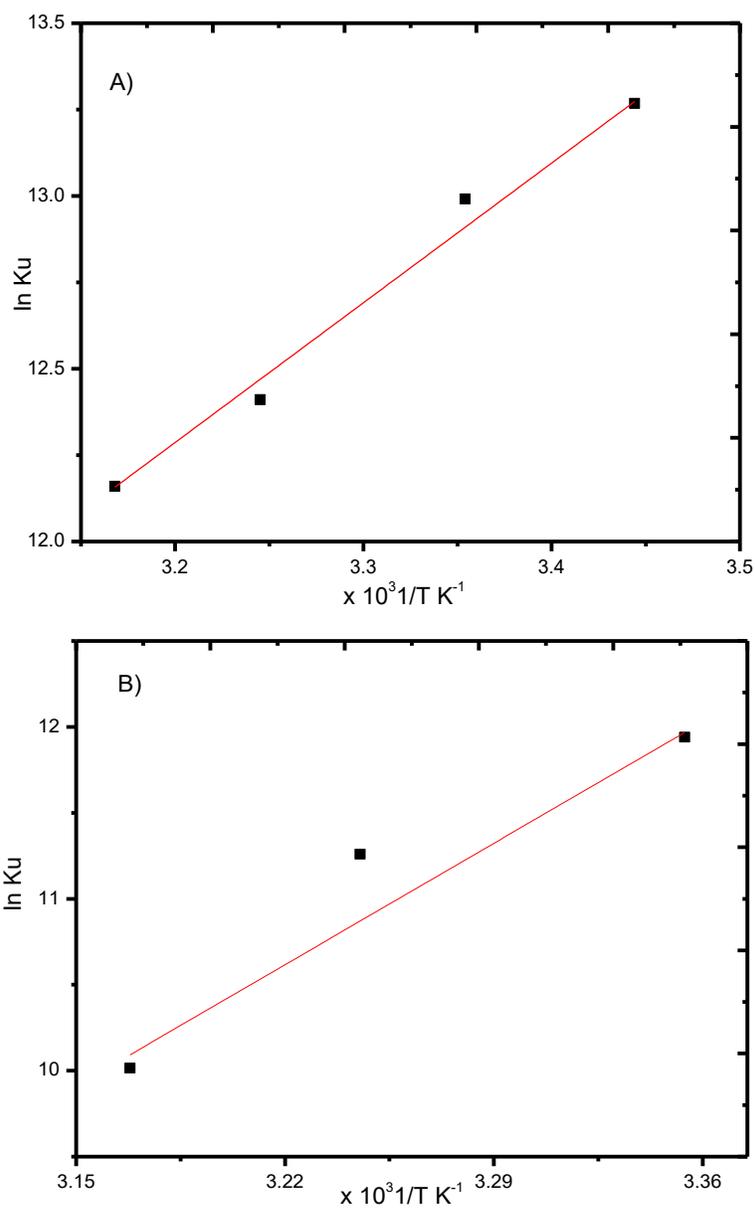


Figura 3.16 Gráfico de van't Hoff para el sistema lisozima-sulfoftalocianina. A) $\mu\text{-(OH)FeTSPc}$, B) H_2TSPc

Siendo el agua el disolvente más frecuente en las reacciones y procesos bioquímicos más comunes, un valor positivo de ΔH y ΔS , es tomado frecuentemente como evidencia de interacciones de tipo hidrofóbico. En cambio, valores negativos, tanto ΔS como de ΔH , son indicativo de que la interacción está gobernada por fuerzas de van der Waals o puentes de Hidrógeno. De acuerdo a los datos obtenidos de ΔH_u y ΔS_u , para el complejo lisozima- $\mu\text{-(OH)FeTSPc}$ y lisozima- H_2TSPc , se puede sugerir que las principales fuerzas de unión en dicho sistema son de tipo electrostático, principalmente por la formación de puentes de Hidrógeno. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el análisis *in silico* del acoplamiento molecular (siguiente sección); aunque también es evidente que pueden ocurrir interacciones de tipo hidrofóbico entre el sitio de unión y las regiones no polares del macrociclo tetrapirrólico o bien interacciones débiles de esta especie con regiones menos polares de la proteína. Sin embargo, parece que estas no contribuyen significativamente a la estabilización final del complejo formado.

Tabla 3.4 Parámetros termodinámicos de unión para el sistema lisozima ligando

Ligando	ΔH_u kJ/mol	ΔS_u J/mol K
Lisozima- H_2TSPc	-83.90	-181.10
Lisozima- $\mu\text{-(OH)FeTSPc}$	-34.82	-10.43

e) Análisis de la interacción molecular de los sistemas lisozima- $\mu\text{-(OH)FeTSPc}$ y lisozima- H_2TSPc , través de los cálculos de energía electrostática computacional.

Dado que a pH 7, la especie $\mu\text{-(OH)FeTSPc}$ tiende a dimerizarse, lo que es revelado por su espectro UV-Vis (figura 3.1), sin embargo, se realizaron simulaciones considerando tanto el monómero como el dímero interaccionando con lisozima. En el caso de la sulfoftalocianina libre, se modeló su estructura, en forma monomérica; esto en base a los espectros de absorción, que establecen que es la especie predominante en la disolución a pH 7 (ver figura 3.4), aunque también se decidió modelar el dímero, para efectos comparativos.

Como una primera aproximación se modeló la sulfoftalocianina de Hierro (III) en forma de monómero. En la Tabla 3.5 se puede observar que las interacciones electrostáticas gobiernan la unión proteína-ftalocianina metálica (monómero); principalmente las interacciones coulómbicas y

ligeramente las interacciones no polares. En la figura 3.17 se muestran los posibles sitios de unión en el complejo lisozima- μ -(OH)FeTSPc, de los tres mejores conformeros o modelos obtenidos en base a las simulaciones realizadas. De ellos el modelo 1, figura 3.17a, es el más favorable con un $\Delta G_u = -1283$ kJ/mol, al parecer debido a que se establecen puentes de Hidrógeno con los aminoácidos Val 120 y Glut 121. Los puentes de Hidrógeno con los residuos Asn 107 y Tyr 23 no se consideran puesto que la distancia de interacción es mayor a 5 Å. Además, en el modelo 1 un átomo del Oxígeno del grupo sulfo del macrociclo (SO_3^{-1}) interactúa con la carga positiva del átomo de N de la Lys 116, lo que establece un ambiente electrostático favorable y que se refleja en el valor del ΔG_{uc} determinado. En el modelo 2, figura 3.17b, se establece una interacción carga-carga de un átomo de Oxígeno del grupo SO_3^{-1} con Arg 112, mientras en el modelo 3, no existen interacciones tipo carga-carga (ver figura 3.17c)

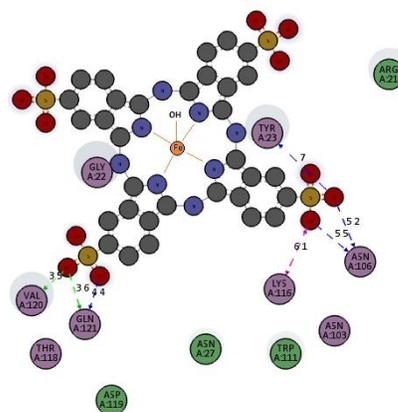
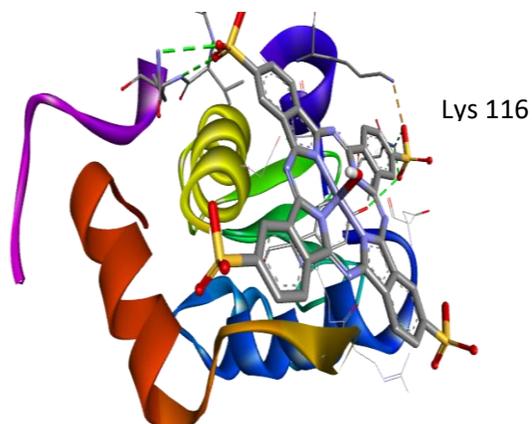
Tabla 3.5 Energías de unión (ΔG_{uc}) para el sistema lisozima-monómero μ -(OH)FeTSPc determinado por APBS y VMD.

Sistema	ΔG_{solv} (kJ/mol)	ΔG_{coul} (kJ/mol)	ΔG_{np} (kJ/mol)	ΔG_{uc}^* (kJ/mol)	Puentes de Hidrógeno a 5 Å
Modelo 1	63	-1332	-14	-1283	2
Modelo 2	236	-1211	-15	-991	0
Modelo 3	246	-1140	-16	-910	0

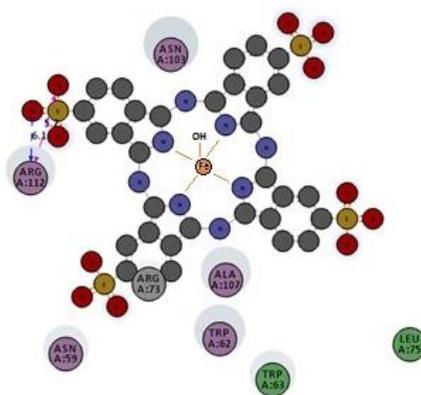
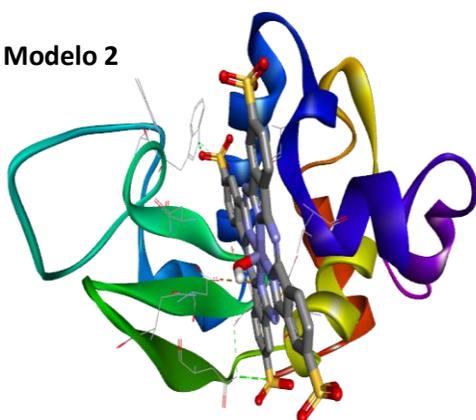
* $\Delta G_{uc} = \Delta G_{solv} + \Delta G_{coul} + \Delta G_{np}$

En la figura 3.17 se muestran los posibles sitios de unión en el complejo lisozima- μ -(OH)FeTSPc de los tres mejores conformeros, obtenidos mediante la evaluación de ΔG_{uc}

A) |Modelo 1



B) Modelo 2



C) Modelo 3

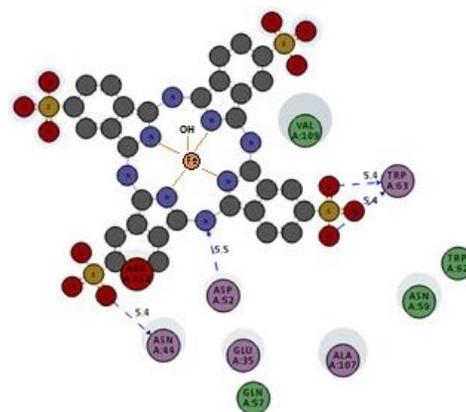
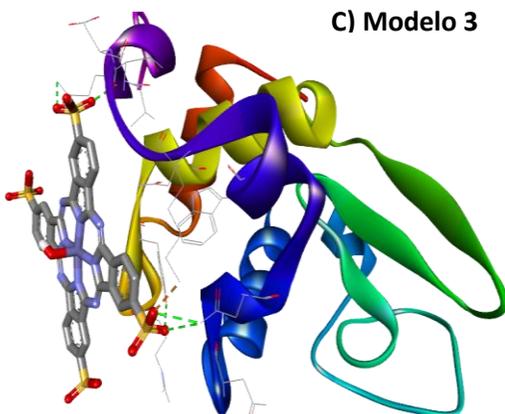


Figura 3.17 Estudios de acoplamiento del monómero μ -(OH)FeTSPc con la lisozima (ID PDB 2LYZ), donde se muestran los mejores conformeros. A) Modelo 1, B) Modelo 2 y C) Modelo 3. Los estudios de acoplamiento se realizaron con el programa Autodock Vina [4] y las estructuras fueron visualizadas con el programa Discovery studio [79]. Gris = Carbón, blanco = Hidrógeno, azul = Nitrógeno, rojo = Oxígeno, amarillo= Azufre, anaranjado = Hierro.

En los anteriores modelos se observa el gran acercamiento y acoplamiento del macrociclo en la superficie de la lisozima por efecto de las interacciones débiles con las regiones no polares del

macrociclo, pero sobre todo por interacciones puente de Hidrógeno entre los grupos *sulfo* ($-\text{SO}_3^{-1}$) periférico ó con el grupo *hidroxilo* ($-\text{OH}$) axial, del complejo macrocíclico de Hierro (III), con la superficie de la proteína. Para establecer una mejor aproximación, sobre el sitio de unión energéticamente más favorable, se realizaron nuevamente los cálculos de acoplamiento molecular de los 3 conformeros de menor energía con el programa *CHARMM c35b2*. Puesto que en el sitio de unión más favorable no se presenta una interacción con los residuos de triptófano, responsables de la emisión de fluorescencia de la lisozima, y pareciera no existir una correlación entre el apagamiento de la fluorescencia observado de la lisozima en presencia de la especie $\mu\text{-}(\text{OH})\text{FeTSPc}$. También se realizó el estudio computacional con la sulfoftalocianina libre; como monómero y dímero.

En la figura 3.18 se observa que a pH de 7 la lisozima presenta una distribución de carga positiva

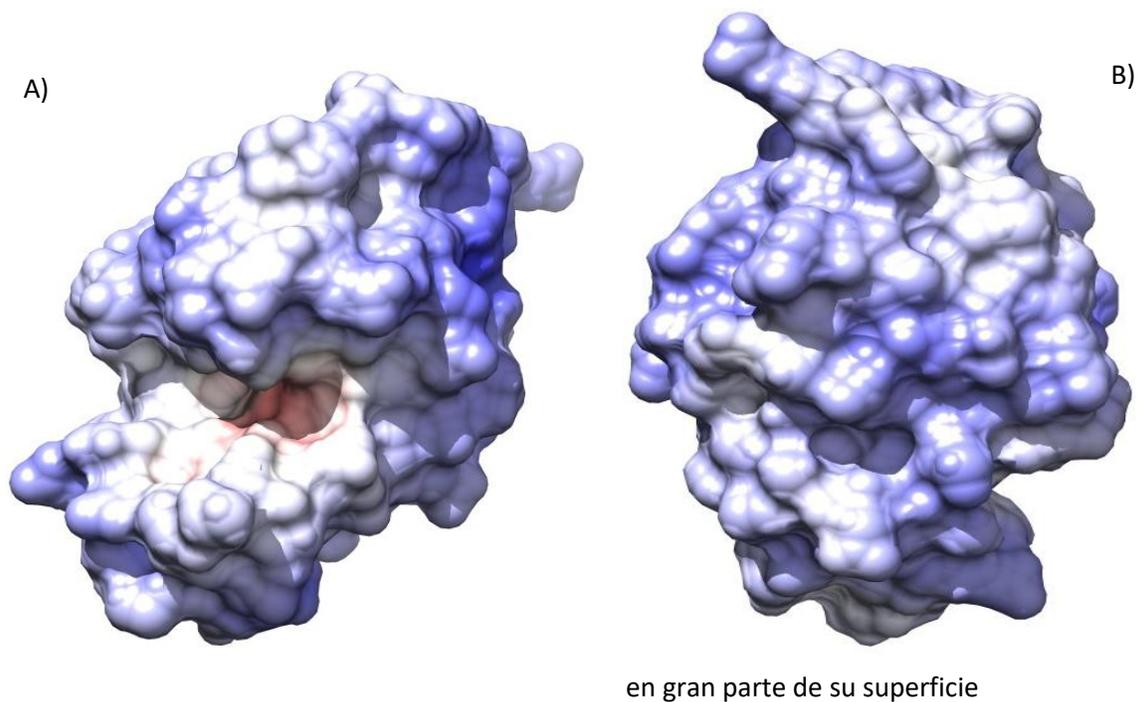


Figura 3.18 Superficie de potencial electrostático APBS (adaptive Poisson-Boltzmann solver) de lisozima a pH 7, A) vista frontal, B) vista con giro 180°. Las áreas azules y rojas representan cargas positivas y negativas respectivamente. Las estructuras fueron visualizadas en UCFS Chimera [80].

Los resultados de la minimización de energía con el programa *CHARM c35b2* para los mejores complejos, demostraron que el sitio de unión es el mismo, tanto en el monómero de la sulfoftalocianina de Hierro (III), como en el monómero de la especie libre (figura 3.19), es decir que interactúan formando puentes de Hidrógeno con los mismos residuos; Trp 62,63, Asn 49 y establecen una interacción carga- carga con Arg 61, con los átomos de Oxígeno del grupo sulfo de las sulfoftalocianinas figura 3.20 y 3.22, sin embargo, con las sulfoftalocianinas en forma dimérica de Hierro (III) o libre, la interacción cambia ligeramente, seguramente por la presencia de un mayor número de grupos interactuantes que se aproximan a aquellos de la lisozima, también por efecto estérico y quizá en menor grado por interacciones débiles de las regiones menos polares del macrocíclico en forma de dímero con la superficie de la proteína; seguramente entre las nubes de electrones π y las regiones menos polares de la proteína (por ejemplo, con los residuos Thr 47, Asp 48, Asp 52, Gln 57 ó Val 109) figuras 3.21 y 3.23

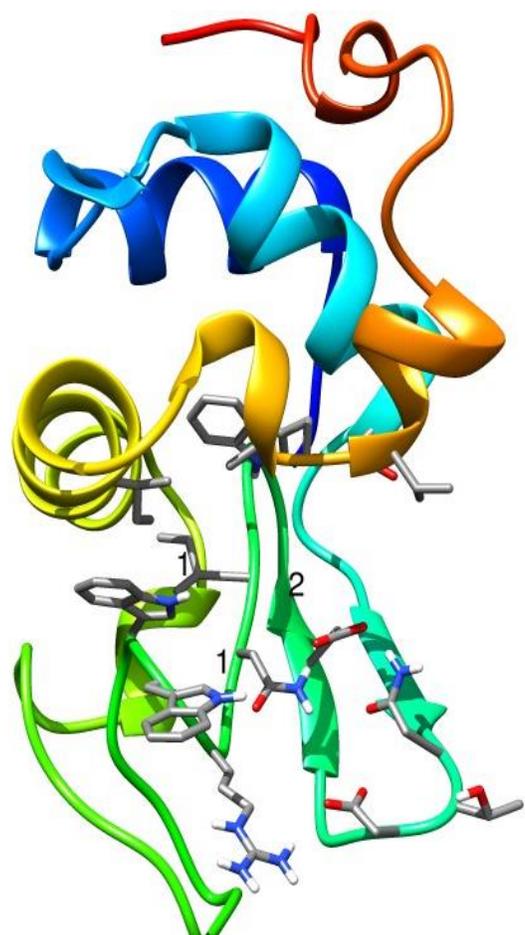
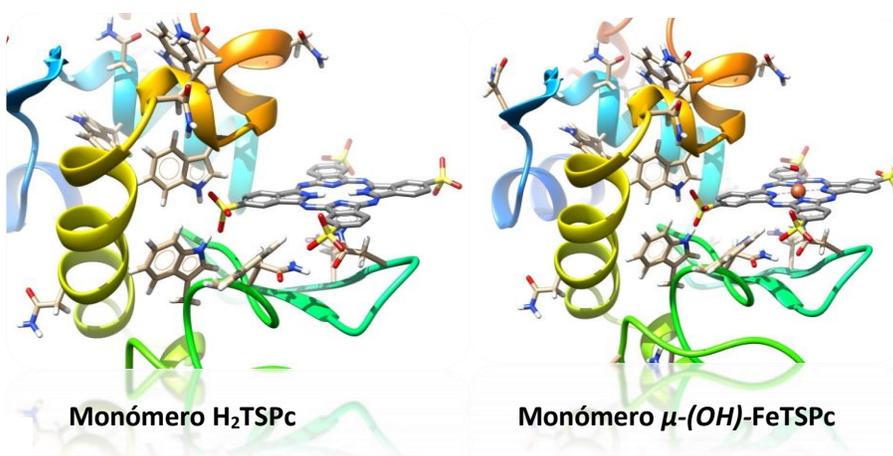
En el acoplamiento de los dímeros tanto de la sulfoftalocianina metalada como la libre con lisozima, es muy probable que además intervengan interacciones tipo puentes de Hidrógeno y que la lisozima adquiera una conformación en la que permita mayor tipo de interacciones de tipo hidrofóbico (electrón π), además de las de tipo electrostático. El análisis computacional, nos permite dar una explicación a la diferencia de los valores experimentales de K_u vistos en la tabla 4.3, entre $\mu\text{-(OH)FeTSPc}$ y H_2TSPc . Como se vio anteriormente, los valores más altos de K_u se observaron para la asociación lisozima- $\mu\text{-(OH)FeTSPc}$, debido probablemente a que en el ambiente de interacción es más favorable por existir un mayor número de residuos de la lisozima interactuando en el complejo formado, además de que el hierro genere una mayor estabilidad (figura 3.22). Aunque los valores más altos de ΔG_{uc} se observaron para las especies diméricas, en los diagramas de las figuras 3.21 y 3.23 se observa que hay un menor número de residuos de la lisozima que interaccionan favorablemente.

En la tabla 3.6 se observa que las interacciones de tipo electrostático gobiernan la unión proteína-ftalocianinas; principalmente las interacciones coulombicas y ligeramente las interacciones no polares.

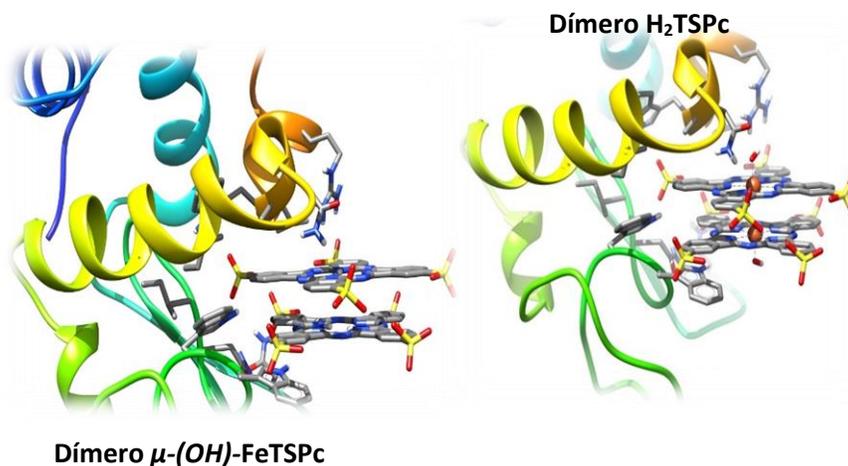
Tabla 3.6 Energías de unión (ΔG_{uc}) para el sistema lisozima- monómero μ -(OH)FeTSPc,, lisozima- dímero μ -(OH)FeTSPc y monómero- H₂TSPc determinado por APBS y VMD

Sistema	ΔG_{solv} (kJ/mol)	ΔG_{coul} (kJ/mol)	ΔG_{np} (kJ/mol)	ΔG_{uc}^* (kJ/mol)	Puentes de Hidrógeno a 5Å
Monómero libre	179.47	-472.49	-21.011	-314.45	4
Dímero libre	276.24	-1401.26	-20.93	-1145.96	1
Monómero Fe	225.24	-713.92	-19.29	-507.97	4
Dímero Fe	276.24	-1401.27	-20.93	-1145.96	1

Figura 3.19 Resultados de la determinación del ΔG_{uc} , mostrando los sitios de unión más favorables en lisozima, con las distintas sulfoftalocianinas.



El Dímero se une al sitio uno y el monómero al sitio dos. Las estructuras fueron visualizadas en UCFS Chimera. Gris=Carbón, blanco= Hidrógeno, azul= Nitrógeno, rojo= Oxígeno, amarillo= Azufre, anaranjado= Hierro



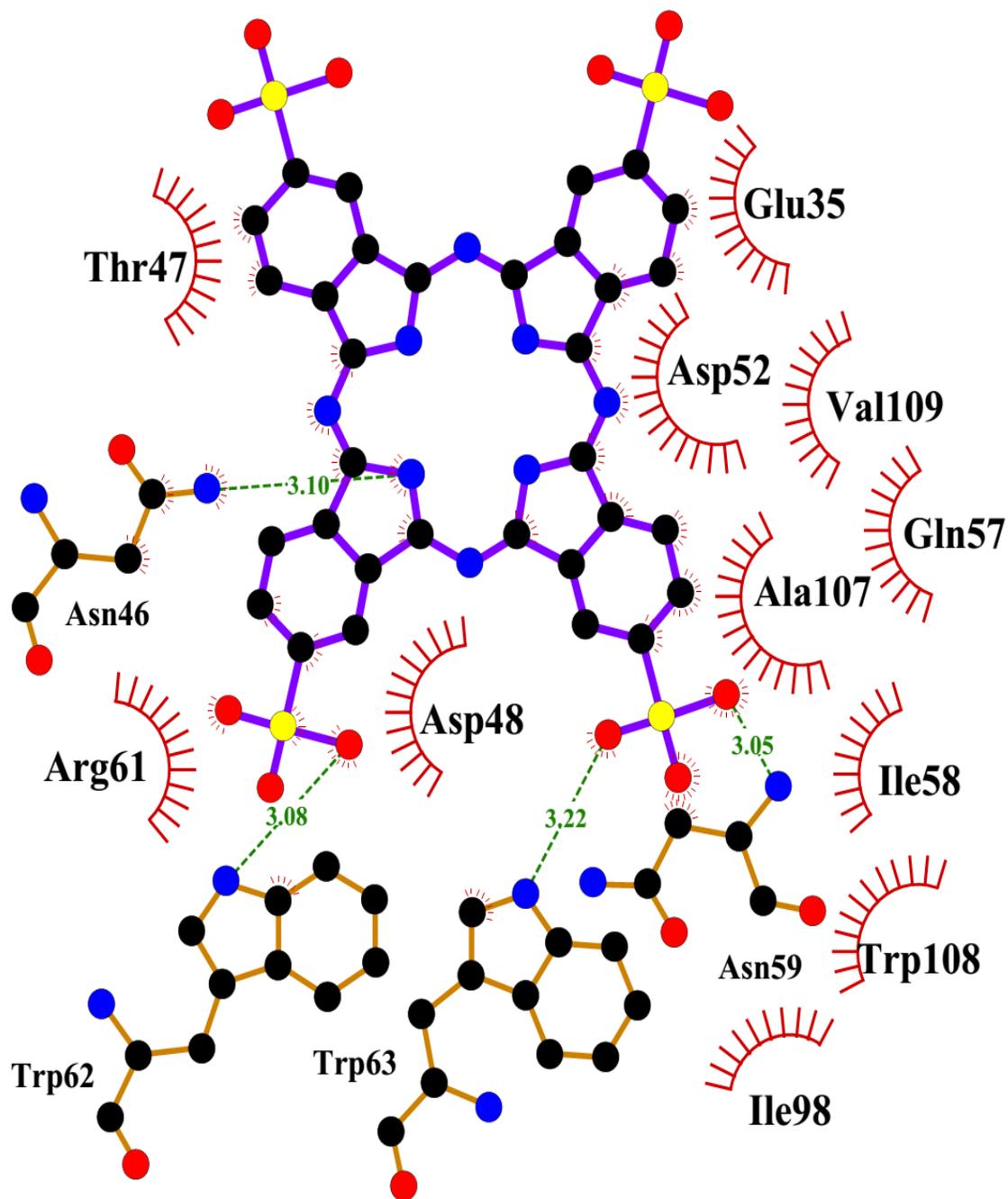


Figura 3.20 Residuos y los cuatro puentes de Hidrógeno formados entre el monómero de H₂TSPc y lisozioma en el sitio de unión más favorable. Las distancias y tipo de interacciones se determinaron con el programa LIGPLOT+.39 [81]. Gris = Carbón, blanco = Hidrógeno, azul = Nitrógeno, rojo = Oxígeno, amarillo = Azufre. Los puentes de Hidrógeno formados se observan como líneas verdes.

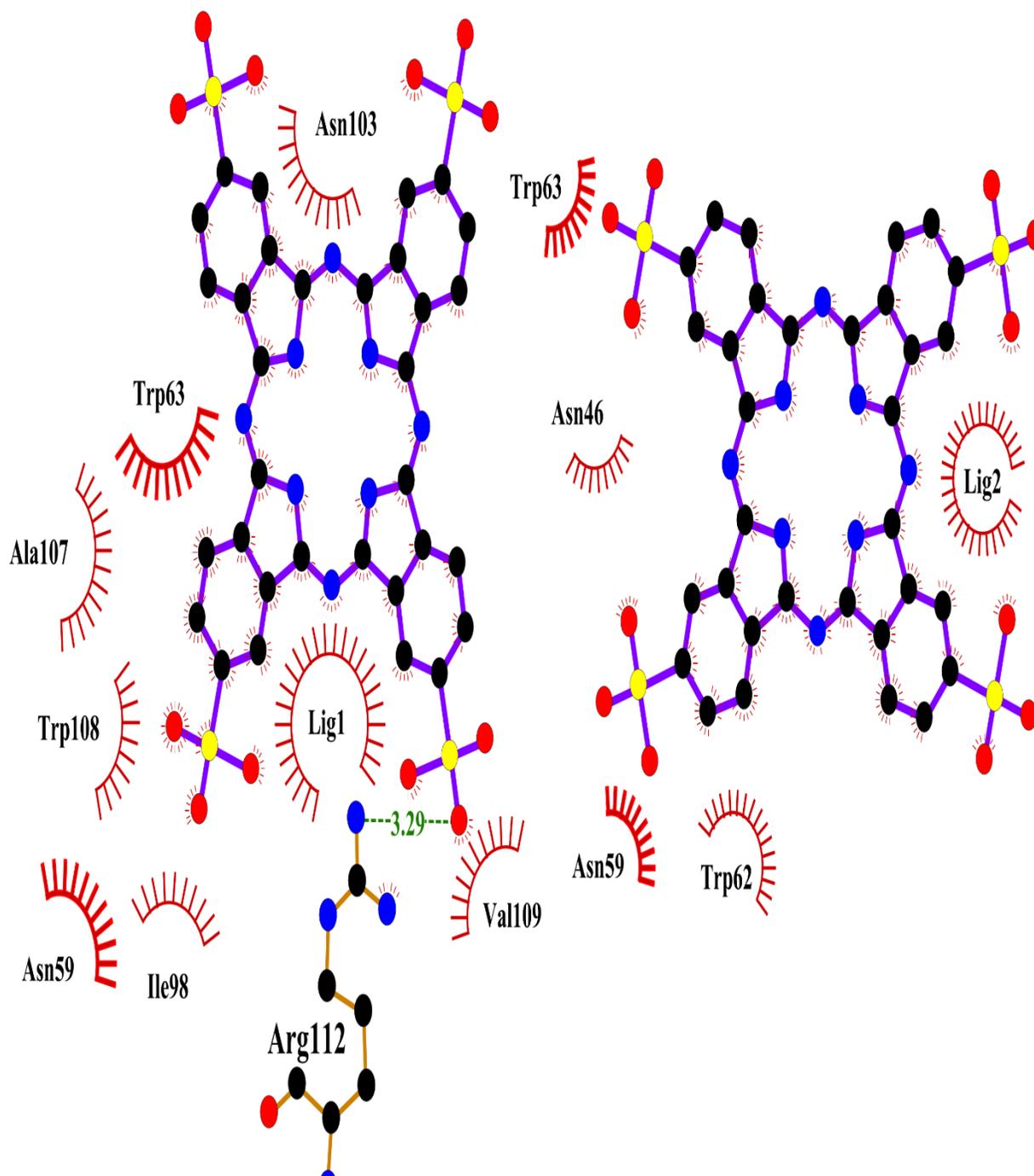


Figura 3.21 Residuos y el puente de Hidrógeno formado entre el dímero de H₂TSPc y lisozima en el sitio de unión más favorable. Las distancias y tipo de interacciones se determinaron con el programa LIGPLOT+.39. Gris = Carbón, blanco = Hidrógeno, azul = Nitrógeno, rojo = Oxígeno, amarillo = Azufre. Los puentes de Hidrógeno formados se observan como líneas verdes

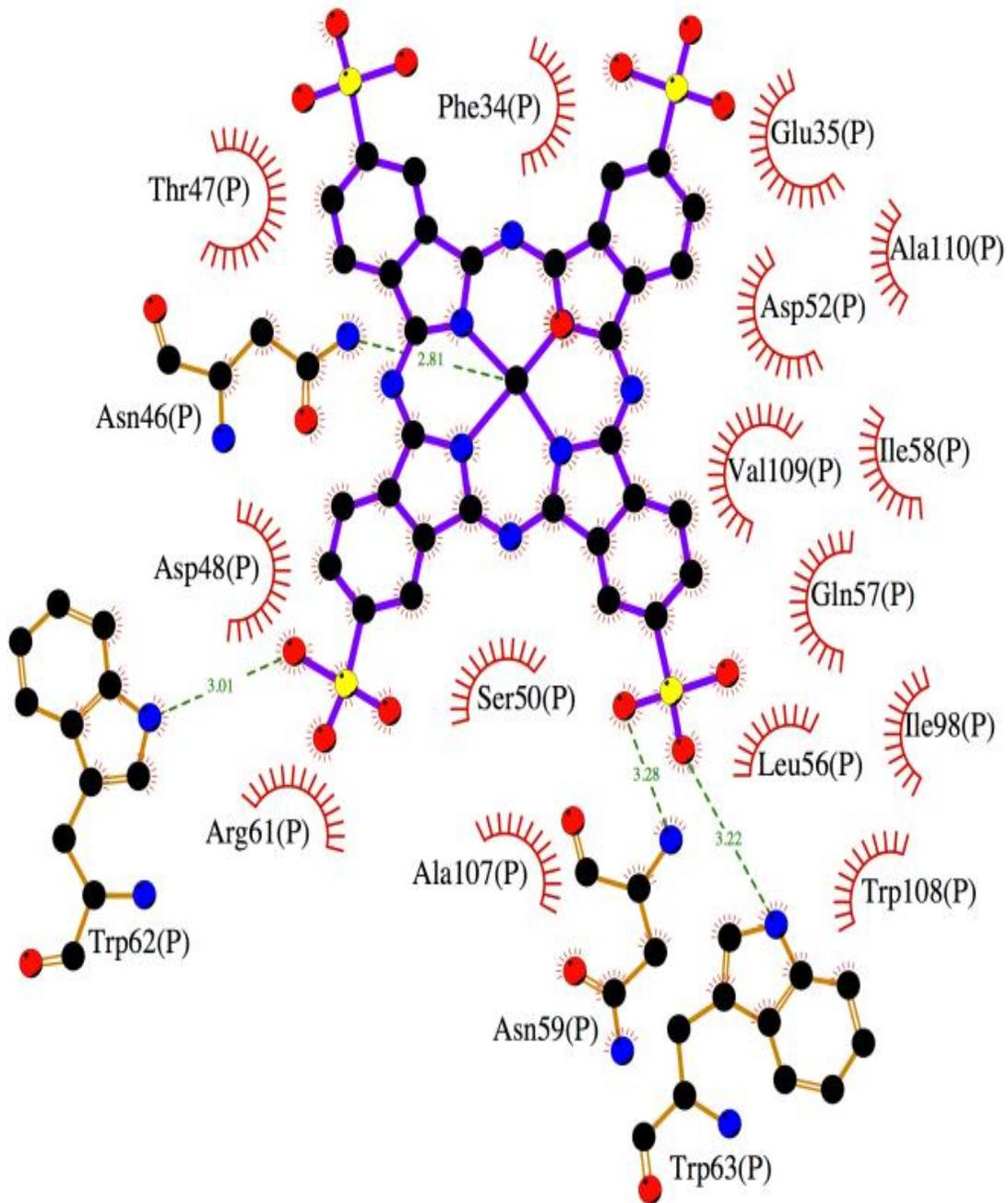


Figura 3.22 Residuos y los cuatro puentes de Hidrógeno formados entre el monómero de μ -(OH)FeTSPc and lisozima en el sitio de unión más favorable. Las distancias y tipo de interacciones se determinaron con el programa LIGPLOT+.39. Gris=Carbón, blanco = Hidrógeno, azul = Nitrógeno, rojo = Oxígeno, amarillo = Azufre, anaranjado = Hierro. Los puentes de Hidrógeno formados se observan como líneas verdes

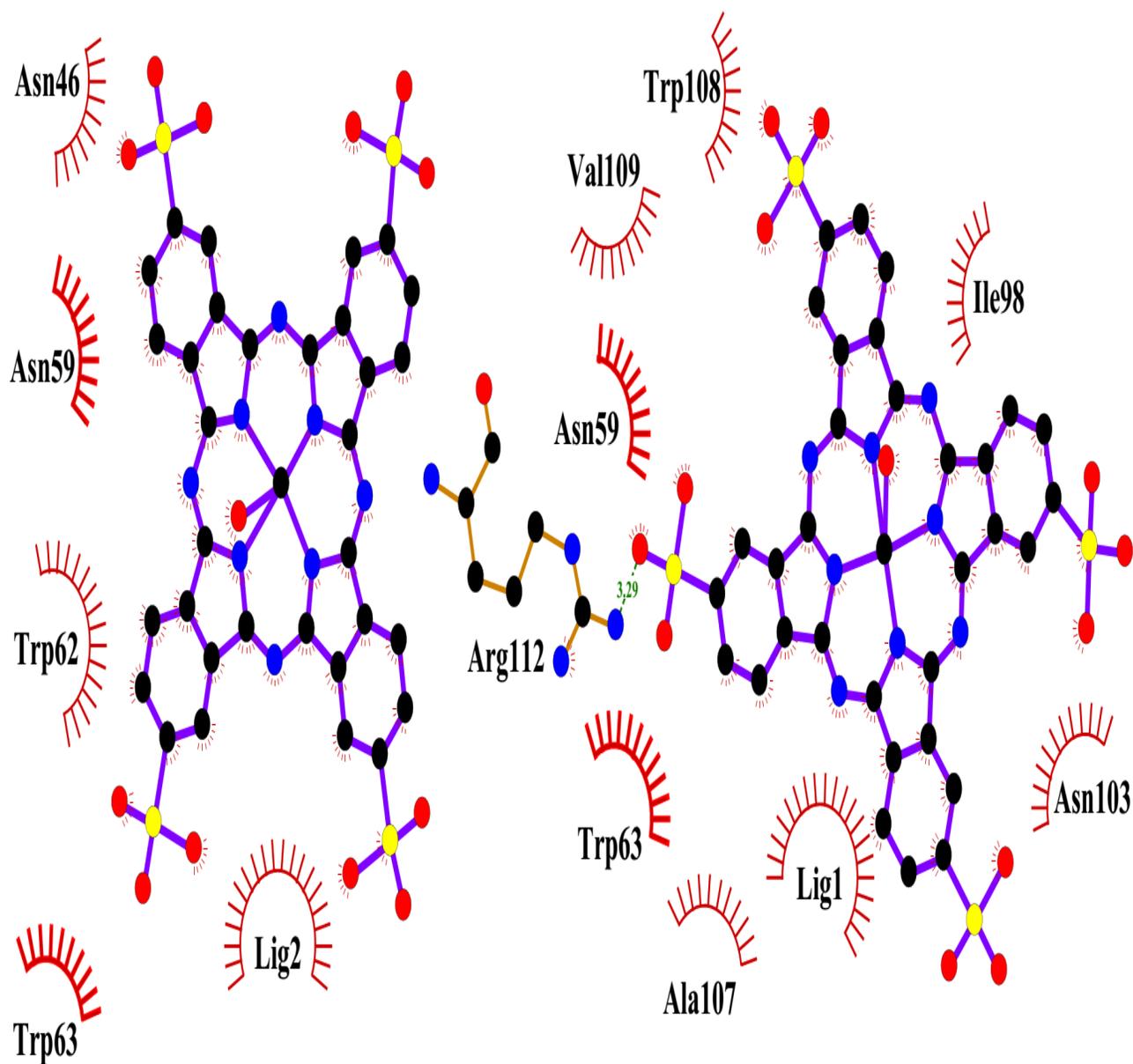


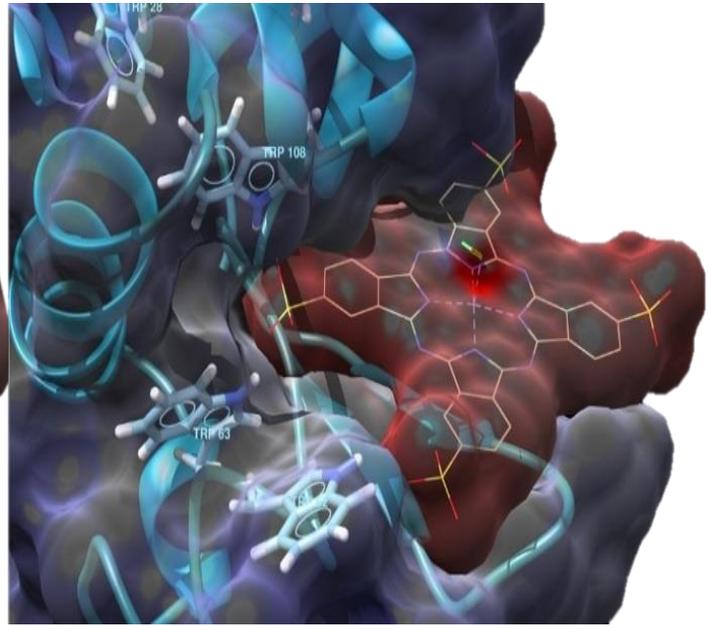
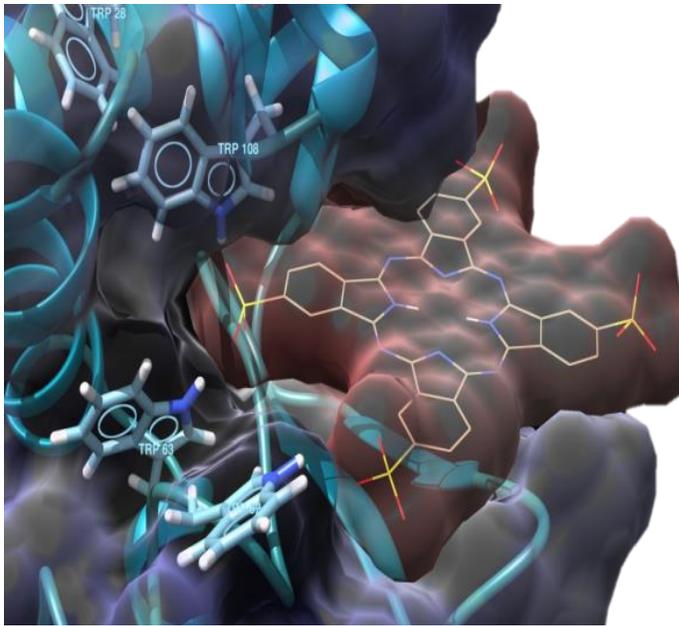
Figura 3.23 Residuos y el puente de Hidrógeno formado entre el dímero de μ -(OH)FeTSPc y lisozima en el sitio de unión más favorable. Las distancias y tipo de interacciones se determinaron con el programa LIGPLOT+.39. Gris=Carbón, blanco = Hidrógeno, azul = Nitrógeno, rojo = Oxígeno, amarillo = Azufre, anaranjado = Hierro. Los puentes de Hidrógeno formados se observan como líneas verdes

Cabe resaltar que los estudios de acoplamiento molecular se realizaron con el isómero (confórmero) más simétrico de $\mu\text{-(OH)FeTSPc}$ o H_2TSPc , es decir con la sustitución de los grupos sulfo en las posiciones 2,10, 16, 24 del núcleo macrocíclico figura 1.2 . Por lo que, sería importante realizar los estudios de acoplamiento molecular utilizando cada uno de los isómeros de las sulfoftalocianinas e identificar el isómero energéticamente más favorable en la asociación con lisozima.

En el sitio de unión más favorable para la forma monomérica de ambos macrociclos de estudio, se encuentran 2 residuos de Triptófano; Trp-62 y Trp-63, que forman puentes de Hidrógeno con los átomos de Oxígeno del grupo sulfo ($-\text{SO}_3^{-1}$) de la sulfoftalocianina (figura 3.20 y figura 3.22). La interacción de estos residuos con ambos ligandos, nos permite explicar el fenómeno de apagamiento observado en los estudios de fluorescencia, considerando que el complejo formado no es fluorescente. Con respecto a la forma dimérica de ambos macrociclos, estos no forman puentes de Hidrógeno con los residuos de Trp-62 y Trp-63, sin embargo, se encuentran dentro del ambiente de interacción favorable figura (3.21 y 3.23). Se conoce muy bien que el Trp-62, contribuye de manera más significativa a la fluorescencia de la lisozima, sin embargo, se ha sugerido que el Trp-63 también puede contribuir a dicha característica [80]. El Trp-62 está completamente expuesto al disolvente, y el Trp-63 está rodeado de puentes disulfuro y es susceptible a un fuerte intercambio de electrones con los puentes disulfuro Cys 76 y Cys 94 [79].

Tanto el Trp-62, como el Trp-63 forman parte del ambiente hidrófilico de la lisozima. Así mismo, ligandos como $\mu\text{-(OH)FeTSPc}$ o H_2TSPc , que presentan regiones cargadas negativamente que propician una situación electrostática favorable a la interacción con proteínas como lisozima que a su vez presenta una distribución de carga positiva en gran parte de su superficie (figura 3.24).

Los estudios de acoplamiento sugieren que el residuo de Arg 61 es importante en la afinidad de unión para ambos ligandos, ya que este residuo posee carga positiva y puede establecer una interacción carga-carga con el Oxígeno del grupo SO_3^{-1} , cargado negativamente. También es importante considerar que existen interacciones de tipo hidrofóbico, debido a la aromaticidad del macrociclo tetrapírrrolico (débiles o entre nubes de electrones π) siendo, probablemente, la interacción con el residuo de Val 109 el que puede proveer una mayor estabilidad al complejo. Con respecto al dímero de ambos macrociclos, estos establecen interacciones de tipo hidrofóbico con el residuo de Trp-62 y posiblemente formen un puente de Hidrógeno con Arg 112.



Lisozima- Monómero H₂TSPc

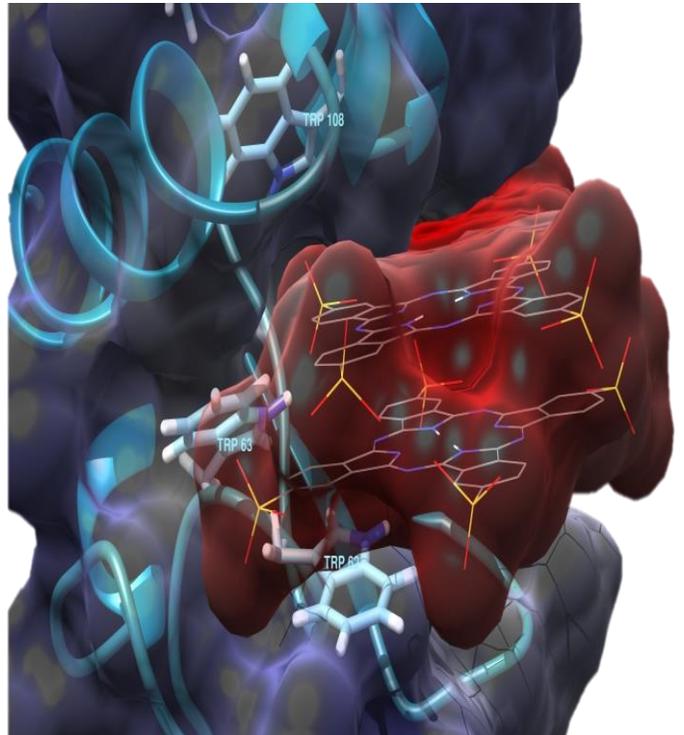
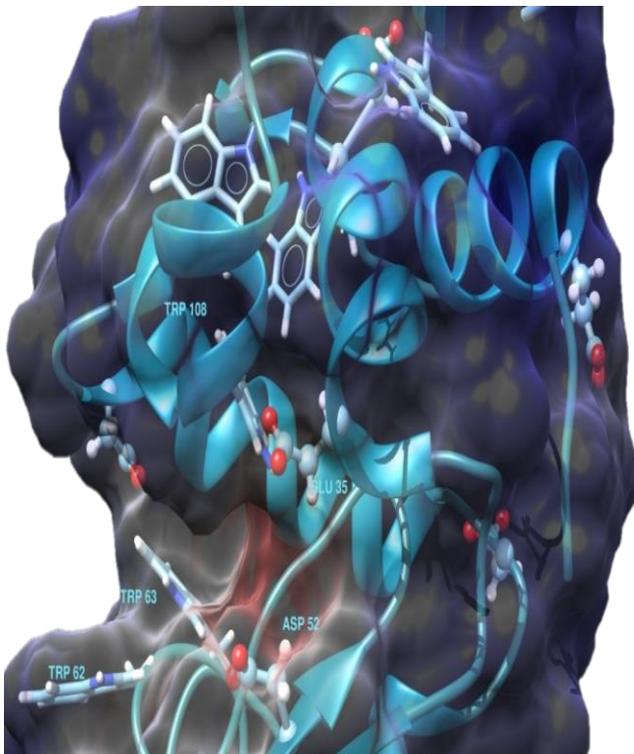


Figura 3.24 Superficie de potencial electrostático de lisozima y la interacción con μ -(OH)FeTSPc y H₂TSPc.

Aunque en apariencia, no se presenta una interacción electrostática con los residuos de Asp 52 y Glu 35, estos si forman parte del medio ambiente próximo al sitio de interacción principal de la lisozima con las ftalocianinas y probablemente contribuyen, aunque débilmente al acercamiento, orientación y acoplamiento final entre ambas especies. Nuevamente es importante considerar realizar estudios de actividad enzimática para determinar si estos macrociclos pueden fungir como inhibidores de la lisozima, puesto que los residuos de la proteína mencionados, forman parte del sitio catalítico y son responsables en gran medida de tal capacidad. Los átomos involucrados en la interacción se resumen en la tabla 3.7.

Tabla 3.7. Átomos involucrados en la unión de los complejos de lisozima-ligando, distancias y tipos de interacción

Ligando	Residuo (átomo)	Átomo ligando	Distancia Å	Tipo de Interacción
Monómero libre	Arg 61	O (sulfo)	3.01	Electrostático
	Trp 62 (N)	O (sulfo)	3.08	Puente de H
	Trp 63 (N)}	O (sulfo)	3.22	Puente de H
	Asn 46 (N)	O (sulfo)	3.10	Puente de H
	Asn 59 (N)	O (sulfo)	3.05	Puente de H
	Val 109	Anillo bencénico	4.97	Pi-alkil
Monómero Fe	Arg 61 (N)	O (sulfo)	3.01	Electrostático
	Trp 62 (N)	O (sulfo)	3.01	Puente de H
	Trp 63 (N)	O (sulfo)	3.22	Puente de H
	Asn 46 (N)	O (hidróxi axial)	2.81	Puente de H
	Asn 59 (N)	O (sulfo)	3.28	Puente de H
	Val 109	Anillo bencénico	4.97	Pi-alkil
Dímero Fe	Asn 49 (N)	O	2.48	Puente de H
	Arg 112 (N)	O (hidróxi axial)	2.33	Puente de H
	Asn 103 (N)	O (sulfo)	4.00	Pi-alkil
	Trp 62 anillo bencénico	Anillo bencénico	3.63	
	Ala 107 anillo bencénico	Anillo bencénico	2.96	Pi-alkil

- En esta tesis, se sintetizó y caracterizó espectroscópicamente las especies: sulfoftalocianina de Hierro (III), $\mu\text{-(OH)FeTSPc}$, y sulfoftalocianina libre, H_2TSPc . Se determinó que la forma dimérica de la sulfoftalocianina de Hierro (III), es la que predomina en disolución de fosfatos 5 mM, pH7, mientras que, en la especie libre predomina la forma monómerica en la misma disolución reguladora. Se determinó que existe una asociación lisozima-sulfoftalocianinas mediante el análisis por espectroscopia UV-Vis, en base a la formación de un complejo que absorbe a 280 nm.
- Se comprobó que existe un apagamiento de fluorescencia intrínseco de la lisozima al interactuar con las sulfoftalocianinas. La estequiometría de la interacción para ambos macrociclos cumple con un modelo de unión en una relación molar 1:1 y se estableció que dicha unión es más fuerte con la especie metalada, esto es a que el Hierro (III) provea una mayor estabilidad al complejo. De acuerdo a los valores de ΔH_u y ΔS_u , la asociación es principalmente, conducida por fuerza de tipo puentes de hidrógeno.
- Por medio del análisis computacional se confirmó que la interacción lisozima- $\mu\text{-(OH)FeTSPc}$ y lisozima- H_2TSPc es favorable, siendo conducida principalmente por interacciones coulombicas, un término importante en el componente electrostático, esto es interaccionando por medio de puentes de Hidrógeno con los residuos Trp-62 y Trp-63, lo cual permitió correlacionarlo con el apagamiento de fluorescencia observado. Además, es conducido en menor medida por las interacciones no polares. Para la especie monómerica tanto de $\mu\text{-(OH)FeTSPc}$, como de H_2TSPc se conserva el mismo sitio de unión, pero la interacción es relativamente mayor para la especie metalada, lo cual se compruebo en los valores obtenidos de K_u experimentalmente y computacionalmente.

Para establecer una caracterización más completa sobre el sitio de unión en lisozima, sería importante hacer estudios de actividad enzimática, puesto que se encontró que ambos macrociclos podrían estar uniéndose al sitio activo de la enzima. Sería muy conveniente generar modelos con todos los posibles isómeros tanto de la sulfoftalocianina de Hierro (III), así como de la especie libre y determinar cuál de estos isómeros tendría la mayor afinidad a lisozima.

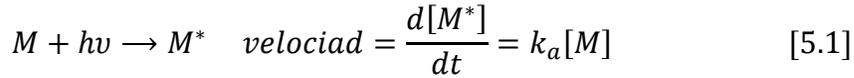
Realizar estudios de dicroísmo circular, para determinar si en la asociación de las sulfoftalocianinas con lisozima existen cambios conformacionales.

Establecer el efecto del pH sobre la asociación lisozima-sulfoftalocianinas, en un intervalo de pH en que los macrociclos presenten carga neutra. Para determinar tanto experimentalmente, como computacionalmente, si la interacción es principalmente de carácter electrostático.

Ecuación de Stern-Volmer

Supongamos que una molécula M absorbe luz, pasando a un estado excitado M*

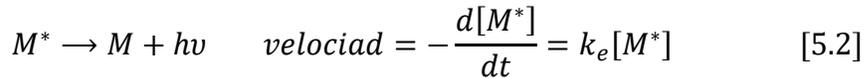
Absorción



Donde h es la constante de Planck y ν es la frecuencia. La velocidad a la que se forma M*, $d[M^*]/dt$, es proporcional a la concentración de M. La constante de velocidad k_a , depende de la intensidad de iluminación y la absortividad de M.

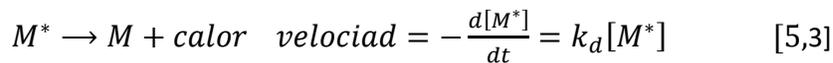
Después de la absorción M*, puede emitir un fotón y volver al estado fundamental

Emisión



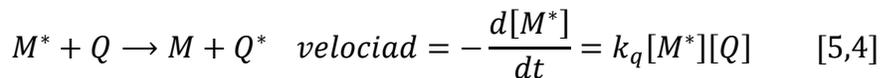
La velocidad a la que desaparece M* es proporcional a la concentración de M*. La molécula excitada también puede perder energía en forma de calor

Desactivación



Otra posibilidad es que la molécula excitada transfiera energía a otra molécula, llamada desactivador (quencher Q), que pasa así a un estado excitado Q*

Apagamiento



El desactivante puede perder su exceso de energía en procesos muy variados. En condiciones de iluminación constante, el sistema pronto alcanza un estado estacionario, en la cual la

concentración de M y M* permanecen constantes. En el estado estacionario la velocidad de formación de M* es igual a la velocidad de desaparición de M*. La primera es

Velocidad de formación de M*

$$M^* = \frac{d[M^*]}{dt} = k_a[M] \quad [5.5]$$

La velocidad de desaparición de M* es la suma de las velocidades de emisión, desactivación y apagamiento.

Velocidad de desaparición de M*

$$M^* = k_e[M^*] + k_d[M^*] + k_q[M^*][Q] \quad [5.6]$$

Igualando velocidad de aparición y desaparición en el estado estacionario

$$k_a[M] = k_e[M^*] + k_d[M^*] + k_q[M^*][Q] \quad [5.7]$$

Definimos el rendimiento cuántico de emisión de M* como el cociente de la velocidad (intensidad) de emisión entre la velocidad de absorción. En ausencia de desactivante, este rendimiento cuántico se presenta por

$$\Phi_0 = \frac{\text{fotones emitidos por segundo}}{\text{fotones absorbidos por segundo}} = \frac{\text{velocidad de emisión}}{\text{velocidad de absorción}} = \frac{k_e[M^*]}{k_a[M]} \quad [5,8]$$

Sustituyendo valor de $k_a[M]$ de 3.77 y haciendo Q igual a cero, se obtiene una expresión del rendimiento cuántico en el estado estacionario

$$\Phi_0 = \frac{k_e[M^*]}{k_e[M^*] + k_d[M^*] + k_q[M^*][0]} = \frac{k_e}{k_e + k_d} \quad [5,9]$$

Si Q es diferente de cero el rendimiento cuántico es

$$\Phi = \frac{k_e[M^*]}{k_e[M^*] + k_d[M^*] + k_q[M^*][Q]} = \frac{k_e}{k_e + k_d + k_q [Q]} \quad [5,10]$$

En los experimentos de apagamiento de fluorescencia, la emisión se mide tanto en ausencia como en presencia de desactivante.

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{k_e + k_d + k_q [Q]}{k_e + k_d} = 1 + \left(\frac{k_q}{k_e + k_d} \right) [Q] \quad [5.11]$$

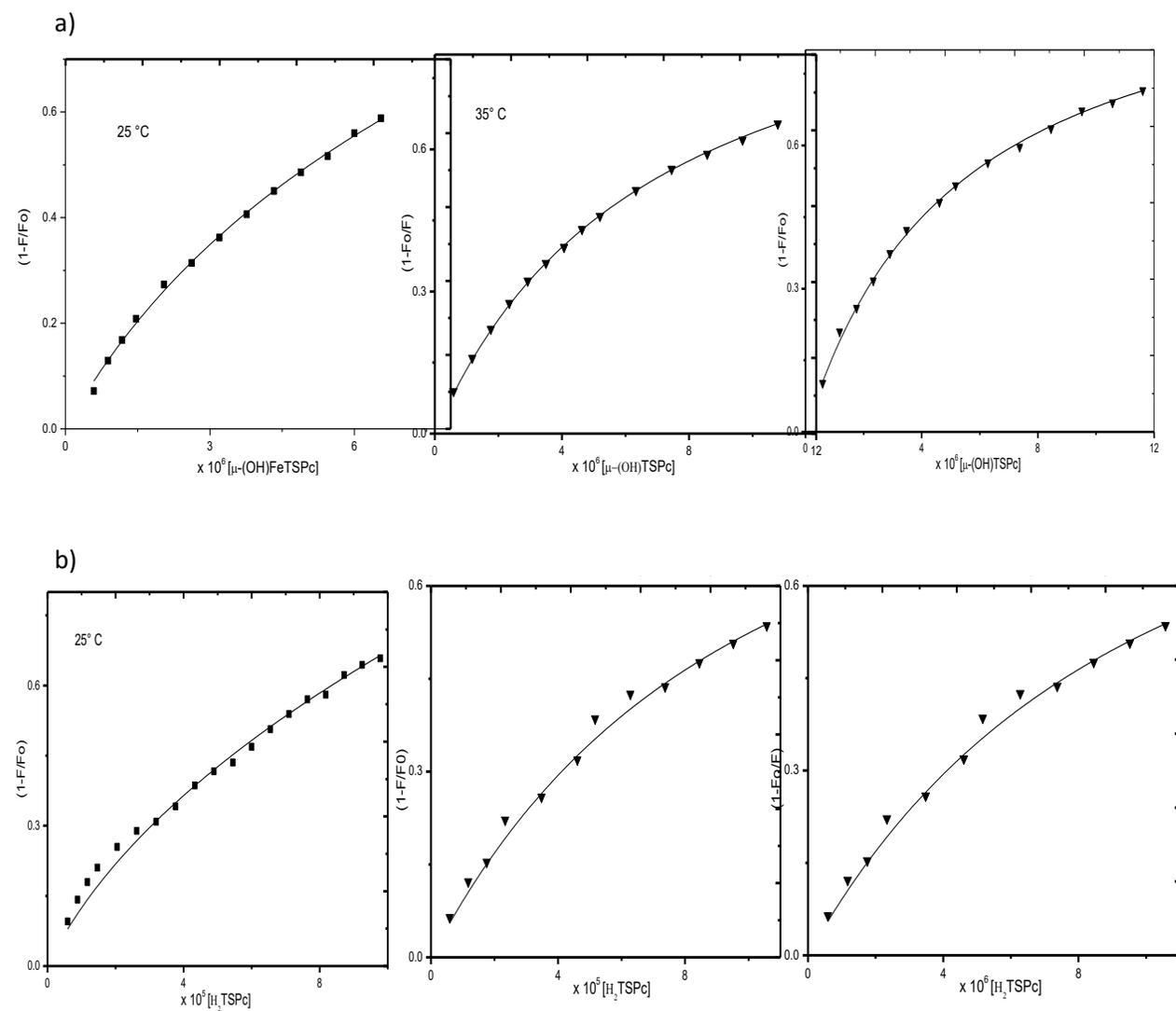
Finalmente se llega a la ecuación de Stern-Volmer

Determinación espectrofluorométrica de la constante de unión Proteína-ligando. Modelo de ajuste para un sitio de unión independiente

Para efectos comparativos se realizó el ajuste de los datos obtenidos por fluorescencia con un modelo para un sitio de unión independiente [56], en el cual se utiliza la siguiente ecuación, para obtener la constante de unión a las diferentes temperaturas empleadas

$$y = \left(\frac{a}{2c}\right) [c + x + b) - \sqrt{(c + x + b)^2 - 4cx}$$

Donde $y = 1 - (F / F_0)$, a es la fracción de saturación, b la constante de disociación del sistema lisozima-sulfoftalocianinas, c la concentración total de sitios de unión y x la concentración de ligando total en cada punto de la titulación. A continuación, se muestran las gráficas obtenidas con



dicho modelo.

Fig. 1 Titulación fluorométrica para el sistema a) lisozima- μ -(OH)TSPC y b) lisozima-H₂TSPc . La concentración de los macrociclos están en moles L⁻¹

Se encontró que los datos se ajustaron consistentemente a dicho modelo, con altos valores de R² ver la siguiente tabla, reiterando que la unión en el sistema de estudio es del tipo P+L = PL.

	T °C	n	K _u x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	R ²	*ΔG _u kJ/mol	K _u x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ [56]	R ²
Lis- H₂TSPc	25 ± 0.09	1.00 ± 0.02	1.823	0.9931	-30.02	2.57	0.9987
	35 ± 0.25	0.97 ± 0.02	0.815	0.9936	-28.90	1.75	0.9927
	42.5 ± 0.32	0.89 ± 0.02	0.212	0.9929	-26.14	1.17	0.9997
	17.2 ± 0.06	1.10 ± 0.33	5.780	0.9915	-32.03	1.27	0.9987
Lisozima-μ-(OH)FeTSPc	25 ± 0.07	1.07 ± 0.01	4.384	0.9983	-32.20	8.06	0.9997
	35 ± 0.08	1.03 ± 0.01	2.454	0.9993	-31.80	1.46	0.9999
	42.5 ± 0.23	0.99 ± 0.01	1.778	0.9969	-31.72	1.93	0.9986

Se observa que las constantes de unión determinadas por este método son más grandes para el caso de la sulfoftalocianina libre, sin embargo, se mantiene la misma tendencia obtenida con el modelo de Stern-Volmer, es decir la constante de unión disminuye conforme aumenta la temperatura. Para el caso de la sulfoftalocianina de hierro se observa una disminución importante de la constante de unión para las temperaturas de 17.2 y 35 °C, para el caso de la temperatura de 25 °C, esta aumenta cerca del doble con dicho modelo. Se distingue un cambio sustancial en el sentido que no se mantiene ninguna tendencia con respecto al modelo de Stern-volmer. Por lo que sería importante analizar la interacción del sistema de estudio bajo las condiciones experimentales, para el correcto uso de este modelo matemático.

REFERENCIAS

- 1.- Woodward J. Monteath Robertson And Ida (1940) *An X-Ray Study Of The Phthalocyanines. Part Iv. Direct Quantitative Analysis Of The Platinum Compound* . - Págs. 36-48.
- 2.- Zvi Malikt Judith Hanania And Yeshayau Nitzan (1990) *Newtrends In Photobiology Bactericidal Effects Of Photoactivated Porphyrins - An Alternative Approach To Antimicrobial Drugs. Journal Of Photochemistry And Photobiology. Vol. 5.* - Págs. 293-281.
- 3.- Shigenobu Yano Shiho Hirohara, Makoto Obata, Yuichiro Hagiya, Shun-ichiro Ogurad, Atsushi Ikeda, Hiromi Kataoka, Mamoru Tanaka, Takashi Joh (2011) *Current States And Future Views In Photodynamic Therapy. Journal Of Photochemistry And Photobiology* . - Vol. 12. - Pp. 46-67
- 4.- Tebello Nyokong (2007). *Effects of substituents on the photochemical and photophysical properties of main group metal phthalocyanines. Coord. Chem. Rev. Vol. 251 Pp 1707-1722*
- 5.- Tjelvar S. G. Olsson, Mark A. Williams, William R. Pitt (2008) *The Thermodynamics of Protein–Ligand Interaction and Solvation: Insights for Ligand Design.*, *J. Mol. Biol*, Vol. 384, págs. 1002–1017.
- 6.- Mahdieh Mansouri, Malihe Pirouzi , Mohammad Reza Saberi , Maryam Ghaderabad and Jamshidkhan Chamani. 2013. *Investigation on the Interaction between Cyclophosphamide and Lysozyme in the Presence of Three Different Kind of Cyclodextrins: Determination of the Binding Mechanism by Spectroscopic and Molecular Modeling Techniques.*, *Molecules*, Vol. 18, pág. 789-813
- 7.-K. M. Smith (1978), “*Porphyrins And Metalloporphyrins*”, Academic Press, N. Y.
- 8.-García Sánchez M.A (1993). *Síntesis Y Caracterización De Complejos Macrocíclicos Mixtos Lantanoides, Tesis De Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa*
- 9.- Latos-Grazyński M. Stepień And L. Aromaticity And Tautomerism In Porphyrins And Porphyrinoids/ *Top Heterocycl Chem, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.*
- 10.- Linstead R.P (1934) *Phthalocyanines. Part I. A New Type Of Synthetic Colouring Matters [Publicación Periódica] Journal Of Chemical Society.* - . - Vols. 1016-1017.
- 11.- C. E. Dent R. P. Linstead And A. R. Lowe (1934) *Phthalocyanines. Part Vi. The Structure Of The Phthalocyanines Journal Of Chemical Society.* - - Vols. 1033-1039 .
- 12.- Gema De La Torre, Giovanni Bottari, Uwe Hahn, And Tomas Torres (2010) *Functional Phthalocyanines: Synthesis, Nanostructuration, And Electro-Optical Applications. Functional Phthalocyanine Molecular Materials Book. Vol. 135*
- 13.- D. Chahraoui E Valat And J. Kossanyi (1992) *Fluorescence Of Phthalocyanines: Emission From An Upper Excited State Research On Chemical Intermediates.* - - Vol. 17. - Págs. 219-232.
- 14.- Mopelola A. Idowu Yasin Arslanoğlu(2014) *Spectral Properties And Photophysical Behaviour Of Water Soluble Cationic Mg(II) And Al(III) Phthalocyanines Central European Journal Of Chemistry.* - - Vol. 12. - Págs. 403-415.
- 16.- Costa Suzana M Andrade And Sílvia M (2002) *Spectroscopic Studies On The Interaction Of A Water Soluble Porphyrin And Two Drug Carrier Proteins /Biophysical Journal* . - - Vol. 82. - Págs. 1607–1619.
- 17.- Brovko Lubov *Photodynamic Treatment: A New Efficient Alternative For Surface Sanitationadvances In Food And Nutrition Research Volume 61* .
- 18.- Sjarhei Sasnouskia B, Vladimir Zorinb, Ivan Khludeyevb, D Hallewin, Francois Guillemín (2005) *Investigation Of Foscan® Interactions With Plasma Proteins Biochimica Et Biophysica Acta.* - - Vol. 1725. - Págs. 394 – 402.
- 19.- Qiang Li Stefan, Seeger Deep (2009) *Uv Sensing Of The Interaction Of Porphyrin With Bovine Serum Albumin Protein Sensors And Actuators B: Chemical.* - - Vol. 139. - Págs. 118–124.
- 19.- Rotin Ian F. Tannock And Daniela Acid Ph In *Tumors And Its Potential For Therapeutic Exploitation Cancer Research.* - 1989. - Vol. 49. - Págs. 173-4384.
- 20.- Seetharaman Leo E. Gerweck And Kala Cellular (1996) *pH Gradient In Tumor Versus Normal Tissue:*

Potential Exploitation For The Treatment Of Cancer
Cancer Research. - Vol. 56. - Págs. 1194-1198.

21.- Cecil L. Jones Tereje Dickson, Ronald Hayes, Lana Thomas (2012) Effects Of Ph And Ionic Strength On The Thermodynamics Of Human Serum Albumin-Photosensitizer Binding *Thermochimica Acta* . - Vol. 545. - Págs. 112– 115.

22.- Ping Zhaoa Jin-Wang Huangb, Liang-Nian (2012)Cationic Pyridinium Porphyrins Appending Different Peripheral Substituents: Spectroscopic Studies On Their Interactions With Bovine Serum Albumin *Spectrochimica Acta Part A*. Vol. 88. - Págs. 130– 136.

23.- Arnaut Luis G. Design Of Porphyrin-Based (2011) Photosensitizers For Photodynamic Therapy *Inorganic Photochemistry*. - Vol. 63. - Págs. 188-229.

24.- K. E van Holde Van (2006) Principles of physical biochemical, , segunda edición, capítulo 14

25.- Canfield, Robert E. (1963). The Amino Acid Sequence Of Egg White Lysozyme., *J. Biol. Chem*, Vol. 238.

26.- Swan S and F Blake (1971) X Ray Analysis Of Structure Human Lysozyme At 6 A Resolution ., *Nature*, Vol. 232, Págs. 12-15.

27.- Molecular Divergence Of Lysozymes And A-Lactalbumin. Kumar, Pradman K. Qasba And Soma. 1997, *Critical Reviews In Biochemistry And Molecular Biology*, Vol. 32, Págs. 255-306.

28.- Bent Van Der Berg, Evonne W Chong, Carol V Robinson, Pedro L Mateo And Christopher Dobson. (1999) Oxidative Refolding Of Hen Lysozyme And Its Catalysis By Protein Disulfide Isomerase., *Journal Of European Molecular Biology Organization*, Vol. 18, Págs. 4794-4803.

29.- Carrillo, Wilman.(2013) Lysozyme: Antibacterial Activity And Allergenicity., *Actualización En Nutrición*, Vol. 14, Págs. 314-326.

30.- Gaston E. Matthyssensg, Onda Giebens, And Louis Kanarek. (1974) Structure And Antigenicity Of Hen Egg-White Lysozyme Fragments Study Of Region 57-107., *Eur. J. Biochem.*, Vol. 43, Págs. 353-362 .

31.- R. C. Davies, A. Neuberger And G. M. Wilson. (1969) The Dependence Of Lysozyme Activity On Ph

And Ionic Strength., *Biochimica Et Biophysica Acta*, Vol. 178, Págs. 294-503.

32.- Salton, M. R. J. The Properties Of Lysozyme And Its Action On Microorganisms. Department Of Bacteriology, University Of Manchester, England.

33. Yoshinori Mine, Fupeng Ma, And Sophie Lauriau. (2004) Antimicrobial Peptides Released By Enzymatic Hydrolysis Of Hen Egg White Lysozyme., *J. Agric. Food Chem*, Vol. 52, Págs. 1088-1094.

34.- Gorbenko, Valeriya M. Ioffe, And Paavo K. J. Kinnunen. (2007) Binding Of Lysozyme To

35.- S. W. Homans, (2007) Dynamics and Thermodynamics of Ligand-Protein Interactions, *Top Curr Chem*) 272, pag 51–82

36.- Guang-De Yanga, Cong Lia, Ai-Guo Zenga, Yuan Zhaob, Rong Yanga (2013) Fluorescence spectroscopy of osthole binding to Albumin human serum., *Journal of Pharmaceutical Analysis* , Vol. 3, págs. 200–204.

37.- Murphy, Kenneth P.(1999) Predicting Binding Energetics from Structure: Looking Beyond DGS. , John Wiley & Sons, Inc., págs. 333-339.

38. Freire, Ernesto (2008).Do Enthalpy and Entropy Distinguish First in Class From Best in Class?, *Drug Discov Today*, Vol. 13, págs. 869–874.

39. . James R. Horn, John F. Brandts, and Kenneth P. Murphy (2002) van't Hoff and Calorimetric Enthalpies II: Effects of Linked Equilibria., *Biochemistry* , Vol. 41, págs. 7501-7507.

40.- Subramanian, Philip D. Ross and S. (1981) Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability, *Biochemistry*, Vol. 20, págs. 3096-3102.

41.- Fayeze Samari, Bahram Hemmateenejad, Mojtaba Shamsipur, Mehdi Rashidi and Hamidreza Samouei (2012) Affinity of Two Novel Five-Coordinated Anticancer Pt(II) Complexes to Human and Bovine Serum Albumins: A Spectroscopic Approach., *inorganic chemistry*, Vol. 51, pag. 3454–3464.

42.- Sompong Thammasirirak, Yuwatida Pukcothanung , Sutthidech Preecharram , Sakda Daduang , Rina Patramanon, Tamo Fukamizo, Tomohiro Araki (2010). *Antimicrobial Peptides*

- Derived From Goose Egg White Lysozyme., *Comparative Biochemistry And Physiology*, Págs. 84-91.
- Phospholipid Bilayers: Evidence For Protein Aggregation Upon Membrane Association*. Galyna P., *Biophysical Journal*, Vol. 93, Págs. 140–153.
- 43.- Valeur Bernard, 2001. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag.
- 44.- Skoog, Holler And Nieman. *Principios De Análisis Instrumental*, Quinta Edición Mc Graw Hill
- 45.-Solbes María Del Mar Santamaria (2010). *Calibración De Un Espectrofluorímetro Multi-Funcional Para La Medida Y Evaluación (Visual) De Colores Fluorescentes Tesis De Maestría –*
- 46.- Maria Teresa Montero, Jordi Hernández and Joan Estelrich (1990). *Fluorescence quenching of albumin. A spectrofluorimetric experiment*. *Biochemical Education*, Vol. 18, págs. 99-101.
- 47.- Joseph R. Lakowick 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, tercera Edición Springer Science.
- 48.- Etsuko Nisshimoto, Shoji Yamasita 1999 .*Resolution And Characterization Of Tryphtophyl Of Fluorescence Of Hen Egg-With Lysozyme By Quenching-And Time Resolved Spectroscopy*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* Vol. 2, Págs 329-336
- 49.- Robert M. Watt and Edward W. Voss, Jr. (1979). *Solvent Perturbation of the Fluorescence of Fluorescein Bound to Specific Antibody.*, *The journal of biological chemistry*, Vol. 254, pág. 16841690.
- 50.- DorothyB. Calhoun, Jane M. Vanderkooi, Gary R.Holtorn, and S. Walter Englander'. (1986). *Protein Fluorescence Quenchingby Small Molecules: Protein Penetration Versus Solvent Exposure.*, *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, Vol. 1, págs. 109-115 .
- 51.-Daniel C Harris.- *Análisis químico cuantitativo.- Editorial reverté tercera edición 2003*
- 52.- Zu-De Qi, Bo Zhou , Qi Xiao , Chuan Shi , Yi Liu , Jie Dai. (2008). *Interaction of rofecoxib with human serum albumin: Determination of inding constants and the binding site by spectroscopic methods*. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* , Vol. 193, págs. 81–88.
- 53.- Hamideh Sanei, Ahmad Asoodeh, Shirin Hamedakbari-Tusi, Jamshidkhan Chamani. 2011. *Multi-spectroscopic investigations of aspirin and colchicine interactions with human hemoglobin: binary and ternary systems.*, *Journal of Solution Chemistry*, Vol. 40, págs. 1905-1931
- 54.- Weert, Marco. 2010. *Fluorescence Quenching to Study Protein-ligand Binding: Common Errors.*, *J Fluorescence*, Vol. 20, pp. 625–629.
- 55.- Lill Mengang Xu y Markus A (2011) *Significant Enhancement of Docking Sensitivity Using Implicit Ligand Sampling*. *J. Chem. Inf. Model* Vol 51 pp. 693-706.
- 56.- Serratos-Álvarez, I.N. (2011). *Evaluación De Las Interacciones Electroestáticas En Complejos Enzima-Inhibidor: La Triosafosfato Isomerasa Con Inhibidores Fosforilados*, *Tesis De Doctorado*, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México.
- 57.- Baker, Nathan A. "Biomolecular Applications Of Poisson-Boltzmann Methods."
- 58.- Oleg Trott And Arthur J. Olson (2010) *Autodock Vina: Improving The Speed And Accuracy Of Docking With A New Simulación Function, Efficient Optimization, And Multithreading*. *J Comput Chem*, 3: 455–461
- 59.- Sergio Filipe Sousa, Pedro Alexandrino Fernandes, And Maria Joao Ramos. "Protein–Ligand Docking: Current Status And Future Challenges." *Proteins: Structure, Function, And Bioinformatics* 65 (2006): 15–26.
- 60.- Simon, Orr Ravitz, Zsolt Zsoldos, Aniko (2011). "Improving Molecular Docking Through Ehits' Tunable Simulación Function." *J Comput Aided Mol Des* Vol. 25 Pp. 1033–1051.
- 61.- William J. Allen, Trent E. Balias, Sudipto Mukherjee, Scott R. Brozell, Demetri T. Moustakas, P. Therese Lang, David A. Case, Irwin D. Kuntz, And Robert C. Rizzo. (2015) "Dock 6: Impact Of New Features And Current Docking Performance." *Journal Of Computational Chemistry* Vol. 36 Pp. 1132–1156.
- 62.- Niu Huang, Chakrapani Kalyanaraman, Katarzyna Bernacki And Matthew P. Jacobson (2006). "Molecular Mechanics Methods For Predicting Protein–Ligand Binding." *Physical Chemistry Chemical Physics* Vol 8 Pp. 5166–5177.

- 63.- Juan Andrés Y Juan Beltrán *Química Teórica Y Computacional*
- 64.- Moitessier, Pablo Englebienne And Nicolas (2010). "Docking Ligands Into Flexible And Solvated Macromolecules. 4. Are Popular Simulación Functions." *J. Chem. Inf. Model* 49 (2009): 1568–1580.
- 65.- Sheng-You Huang, Sam Z. Grinter And Xiaoqin Zou. "Simulación Functions And Their Evaluation Methods For Protein–Ligand Docking: Recent Advances And." *Phys. Chem. Chem. Phys* 12 12899–12908.
- 66.- Vallejo, Diego (2005). "Interacciones Eléctricas En Macromoléculas De Interés Biológico." *Esis Docoral Universidad Nacional De La Plata,*.
- 67.- Koehl, Patrice (2006). "Electrostatics Calculations: Latest Methodological Advances." *Current Opinion In Structural Biology* Vol. 16 Pp. 142–151.
- 68.-- Baker, Nathan A (2005). "Improving Implicit Solvent Simulations: A Poisson-Centric View." *Current Opinion In Structural Biology* Vol. 15 Pp. 137-143.
- 69- Baker, N.A. (2004). *Poisson-Boltzmann Methods For Biomolecular Electrostatics. Methods Enzymol*, 383: 94-118.
- 70.- Bishuyun, Wangyu, Wang Tianjiao1 ,Pangb (2014). *Mechanism Of Meso-Tetra (4 Hydroxyphenyl) Porphyrin And Lysozyme Zhao Tingting, Journal Of Jilin Interaction, University Vol 52*
- 71.- B.R., Brooks, Et Al. (2009). *Charmm: The Biomolecular Simulation Program. J Comput Chem* Vol. 30 Pp.1545–1614
- 72.- Dolinsky, J. Li, H., Jensen, J.H., Baker, N.A., Czodrowski, J., Nielsen, P., Klebe, G. (2004). *Pdb2pqr: An Automated Pipeline For The Setup Of Poisson-Boltzmann Electrostatics Calculations. Nucleic Acids Res*, 32: 665- 667.
- 73.- William Humphrey, Andrew Dalke, Klaus Schulten (1996). "Vmd: Visual Molecular Dynamics." *Journal Of Molecular Graphics* Vol. 14 Pp 33-38.
- 74.-Franz-Xaver Schmid (2001). *Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry.*
- 75.- Haixin Bai, Cheng Yang, Xiurong Yang. 2008, *Interaction Between Bovine Serum Albumin And Indo-1 Using Fluorescence Spectroscopic Method. Front. Chem. China*, Vol. 3, Págs. 105–111.
76. Lehrer, S.S. (1971). *Fluorescence Quenching Of Tryptophan By Trifluoroacetamide. Biochemistry* , Vol. 10, Pp. 3254-3263.
77. Forster, Carl Formoso And Leslie S. 1975, *Tryptophan Fluorescence Lifetimes In Lysozyme. The Journal Of Biological Chemistry*, Vol. 250, Pág. 3738 3745.
78. T. Imoto, Leslie S. Forstert, J. A. Rupley, And Fumio Tanaka. 1971, *Fluorescence Of Lysozyme: Emissions From Tryptophan Residues 62 And 108 And Energy Migration. Proc. Nat. Acad. Sci*, Vol. 69, Págs. 1151-1155.
- 79.- Dassault Systèmes Biovia, *Discovery Studio Modeling Environment, Release 4.5, San Diego: Dassault Systèmes, 2015.*
80. - Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE 2004. UCSF Chimera--A Visualization System For Exploratory Research And Analysis.. *J Comput Chem. Vol 25 Págs 1605-1612.*
- 81.- Wallace A C, Laskowski R A, Thornton J M 1996. *LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. Protein Eng.*, 8, 127-134.
- 82.- Kirstin Wenck, Sebastian Koch, Christian Renner, Wei Sun, and Thomas Schrader 2007. *A Noncovalent Switch for Lysozyme. J Am Chem Soc. Vol 129 pags 16015-9*

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Básicas e Ingeniería

Departamento de Química

Estudio de la Interacción lisozima-sulfoftalocianinas

Tesis de Maestría en Química

Que presenta

Q.F.B Jonathan Osiris Vicente Escobar

Para obtener el grado de maestro en ciencias (química)

Asesores:

Dr. Salvador Ramón Tello Solís

Dr. Miguel Ángel García Sánchez

Jurado

Presidente: Dr. Alfonso Arroyo Reyna. Departamento de Química UAM-I

Secretario: Dra. María Luisa Ojeda Martínez. Universidad de Guadalajara

Vocal: Dr. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía,

IPN.

Abril 2016



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00061

Matrícula: 2141801258

ESTUDIO DE LA INTERACCION
LISOZIMA-SULFOFTALOCIANINAS

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 6 del mes de mayo del año 2016 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MARIA LUISA OJEDA MARTINEZ
DRA. CLAUDIA GUADALUPE BENITEZ CARDOZA
DR. JOSE ALFONSO ARROYO REYNA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS (QUIMICA)

DE: JONATHAN OSIRIS VICENTE ESCOBAR

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



Jonathan Osiris Vicente Escobar

JONATHAN OSIRIS VICENTE ESCOBAR
ALUMNO

REVISÓ



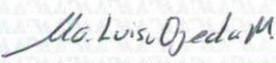
LIC. JULIO CESAR DE LANA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBI



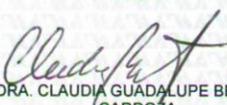
DR. JOSE GILBERTO CORDOBA HERRERA

PRESIDENTA



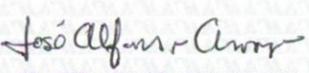
DRA. MARIA LUISA OJEDA MARTINEZ

VOCAL



DRA. CLAUDIA GUADALUPE BENITEZ
CARDOZA

SECRETARIO



DR. JOSE ALFONSO ARROYO REYNA



Casa abierta al tiempo

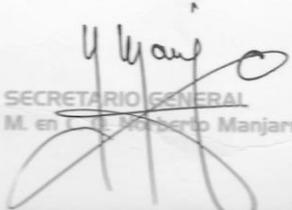
LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

EXPIDE EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

A
JONATHAN OSIRIS VICENTE ESCOBAR

EN VIRTUD DE HABER REALIZADO
LOS ESTUDIOS CORRESPONDIENTES
EN LA UNIDAD XOCHIMILCO
CONFORME A LOS PLANES
Y PROGRAMAS APROBADOS
POR EL COLEGIO ACADÉMICO


RECTOR GENERAL
Dr. Salvador Vega y León


SECRETARIO GENERAL
M. en C. Roberto Manjarrez Álvarez

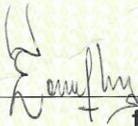

RECTORA DE LA UNIDAD
Dra. Patricia Emilia Alfaro Moctezuma



En mi carácter de titular de la Dirección de Sistemas Escolares de la Universidad Autónoma Metropolitana y con base en el Acuerdo 9/2002 del Rector General, por el cual me autoriza y responsabiliza para administrar los sistemas de ingreso, registro escolar y egreso de los alumnos, para verificar y resguardar el historial académico y expediente de cada uno de ellos, a efecto de garantizar su integridad y confiabilidad, así como para verificar el cumplimiento de los requisitos que deben ser satisfechos para tramitar y expedir los títulos profesionales, hago constar lo siguiente:

JONATHAN OSIRIS VICENTE ESCOBAR, con matrícula 207357400, de nacionalidad mexicana, CURP VIEJ870325HDFCSN06, cumplió con los requisitos establecidos en el Reglamento de Estudios Superiores y en el Reglamento de Servicio Social a Nivel de Licenciatura, ambos de la UAM, en la Ley Reglamentaria del Artículo 5º Constitucional, Relativo al Ejercicio de las Profesiones en el Distrito Federal y en el Reglamento de la Ley Reglamentaria del Artículo 5º Constitucional, y con los que se exigen en el correspondiente plan y programas de estudio de la carrera en QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA, cursada en el periodo 2008-2012. Por no exigirse como requisito, se exhibe la constancia de no presentación de examen profesional de fecha 23-SEP-13. Asimismo, se hace constar que de acuerdo con los documentos que, debidamente verificados, obran en nuestros archivos, cursó y acreditó los estudios de nivel medio superior en COLEGIO DE BACHILLERES de la Entidad Federativa de MEXICO, D.F., en el periodo de 2006.

México, D. F. a 2 DE DICIEMBRE DE 2013.


firma.


Lic. Julio César de Lara Isassi

título número:
054670
115349

Registrado en la Dirección de Sistemas Escolares a 161 fojas del libro UX-122 CBS el día 6 de DICIEMBRE del 2013.

ESTE DOCUMENTO QUEDÓ REGISTRADO EN LA DIRECCIÓN GENERAL DE PROFESIONES SEP - DGP

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA DIRECCIÓN DE SISTEMAS ESCOLARES

 Casa abierta al tiempo

SEP SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

Cédula Número:  8529668

Libro: A852 Foja: 538 Fecha: 29/04/2014

Número: 3 Jaime Hugo Talanco Escobedo