



**FACULTADE DE CIENCIAS**

**GRAO EN BIOQUÍMICA**

**D.<sup>a</sup> Sofía Isabel Castro Castillo**

**DETECCIÓN E CUANTIFICACIÓN DE ADN  
MEDIANTE INTERCALADORES**

Traballo Fin de Grao

*Xuño 2024*

**DETECCIÓN E CUANTIFICACIÓN DE ADN  
MEDIANTE INTERCALADORES**

**DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN  
MEDIANTE INTERCALADORES**

**DNA DETECTION AND QUANTIFICATION USING  
INTERCALATORS**

# Índice

Resumen .....	3
Resumo .....	4
Abstract .....	5
1. Introducción .....	6
1.1. Amplificación y detección del ADN .....	6
1.2. Técnicas espectroscópicas.....	8
1.2.1. Absorción Vis-UV.....	8
1.2.2. Fluorescencia de estado estacionario.....	9
1.3. Proflavina .....	9
1.3.1. Formación del complejo PF:ADN.....	10
1.3.2. Efecto de los iones .....	11
2. Objetivos.....	14
3. Materiales y métodos.....	15
3.1. Reactivos .....	15
3.2. Preparación de muestras .....	15
3.3. Técnicas utilizadas .....	16
3.3.1. Absorción Vis-UV.....	16
3.3.2. Fluorescencia de estado estacionario.....	16
3.4. Análisis de datos .....	17
3.4.1. Análisis Global con Origin.....	17
3.4.2. Análisis de Componentes principales (PCA).....	17
3.4.3. Análisis Global (GA) .....	18
4. Resultados y discusión .....	19
4.1. Caracterización de la proflavina.....	19
4.1.1. Dependencia con la concentración: dimerización .....	19
4.1.2. Dependencia del pH: constante de acidez .....	22
4.1.3. Degradación .....	26
4.2. Intercalación.....	27
4.3. Cuantificación del ADN con PF.....	41
5. Conclusiones .....	43
6. Bibliografía.....	44
7. Anexo .....	47

# Índice de abreviaciones

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
bp	Pares de Bases
I	Fuerza Iónica
IF	Intensidad de Fluorescencia
GA	Análisis Global
q-PCR	PCR en tiempo real
LAMP	Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle
PCA	Análisis de Componentes Principales
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PF	Proflavina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano clorhidrato
Vis-UV	Visible-Ultravioleta

## Resumen

La proflavina (PF) es un colorante con una amplia variedad de usos; desde su papel como antiséptico o antitumoral hasta su papel como marcador de ácidos nucleicos, es una molécula capaz de intercalar la doble cadena de ADN, proceso en el cual una molécula plana se inserta entre los pares de bases del ADN. Muchos trabajos se basan en el estudio de la interacción de la PF y el ADN, ya que su mayor interés recae en su papel como fluorocromo económico que permita detectar y, en otros casos, cuantificar el ADN amplificado mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La formación de un complejo intercalado menos fluorescente se puede observar mediante el uso de técnicas espectroscópicas de absorción Vis-UV y de fluorescencia. En este trabajo se realizaron estudios de caracterización de la proflavina para determinar cómo la intercalación de la PF en el ADN se puede ver afectada por la fuerza iónica del medio y por la carga del catión presente en la sal. Para ello se determinaron las constantes de afinidad de la PF con ADN en presencia de diferentes concentraciones de sales de  $Mg^{2+}$  y de  $Na^+$ . Los resultados obtenidos demostraron que dicha constante disminuye al aumentar la fuerza iónica de la disolución y que el  $Mg^{2+}$  produce una mayor disminución en la constante de afinidad que el  $Na^+$ .

Finalmente, se cuantificó el ADN amplificado mediante LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*) utilizando proflavina como colorante, comparando estos valores con los obtenidos utilizando otro intercalador y un colorante comercial.

**Palabras clave:** *Proflavina, Intercalación, PCR, Absorción Vis-UV, Fluorescencia, Dimerización, Constante de asociación.*

## Resumo

A proflavina (PF) é un colorante cunha ampla variedade de usos; dende o seu papel como antiséptico ou antitumoral ata o seu papel como marcador de ácidos nucleicos, é unha molécula capaz de intercalar a dobre cadea do ADN, proceso no cal unha molécula plana se insire entre os pares de bases do ADN. Moitos traballos están baseados no estudo da interacción da PF e o ADN, xa que o maior interese recae no seu papel como fluorocromo económico que permita detectar e, noutros casos, cuantificar o ADN amplificado mediante a Reacción en Cadea da Polimerasa (PCR).

A formación dun complexo intercalado menos fluorescente pódese observar mediante o uso de técnicas espectroscópicas de absorción Vis-UV e de fluorescencia. Neste traballo realizáronse estudos de caracterización da PF para determinar como a intercalación da PF no ADN está afectada pola forza iónica do medio e pola carga do catión presente no sal. Para iso determináronse as constantes de afinidade da PF co ADN en presenza de diferentes concentracións de sales de  $Mg^{2+}$  e de  $Na^+$ . Os resultados obtidos demostraron que devandita constante diminúe ao aumentar a forza iónica da disolución e que o  $Mg^{2+}$  produce unha maior diminución na constante de afinidade co  $Na^+$ .

Finalmente, o ADN amplificado mediante LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*) cuantificouse utilizando proflavina como colorante, comparando estes valores cos obtidos empregando outro intercalador e un colorante comercial.

**Palabras chave:** *Proflavina, Intercalación, PCR, Absorción Vis-UV, Fluorescencia, Dimerización, Constante de asociación.*

## Abstract

Proflavine (PF) is a dye with countless uses; from its role as an antiseptic or antitumor to its role as a nucleic acid marker, this molecule can intercalate the double strand of DNA, a process where a flat molecule is inserted between the base pairs of DNA. Many works are based on the study of the interaction of PF and DNA, since the greatest interest lies in its role as a cheaper fluorochrome that allows detecting and, in other cases, quantifying DNA amplified by the Polymerase Chain Reaction (PCR).

The formation of a less fluorescent intercalated complex can be observed by using Vis-UV absorption and fluorescence spectroscopic techniques. In this work, we characterized PF to determine how its intercalation in DNA can be affected by the ionic strength of the medium and charge of the cation present in the salt. For this purpose, the affinity constants of PF with DNA were determined in the presence of different concentrations of  $Mg^{2+}$  and  $Na^+$  salts. Results demonstrated that this constant decreases as the ionic strength of the solution increases and that  $Mg^{2+}$  produces a bigger decrease in the affinity constant than  $Na^+$ .

Finally, the amplified DNA by LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) was quantified using proflavine as a dye, and these results were compared with others obtained using a different intercalator and a commercial dye.

**Keywords:** *Proflavine, Intercalation, PCR, Vis-UV absorption, Fluorescence, Dimerization, Affinity constant.*

# 1. Introducción

La interacción de pequeñas moléculas con el ADN es un objeto de estudio de gran interés debido a sus amplias aplicaciones en ciencias biomédicas y biológicas. Una de sus aplicaciones más comunes es en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).

La PCR es una técnica que permite amplificar secuencias específicas de ADN.<sup>1</sup> Sin embargo, como se trata de una molécula poco fluorescente, hay que recurrir al uso de fluorocromos, que son moléculas fluorescentes capaces de unirse al ADN de doble cadena. De esta manera, al combinar las técnicas espectroscópicas de fluorescencia con la PCR, es posible detectar el ADN y, en muchos otros casos, también cuantificarlo como en el caso de la PCR en tiempo real (q-PCR).<sup>2,3</sup>

A pesar de la gran relevancia que han adquirido las técnicas de PCR en el laboratorio, uno de sus mayores inconvenientes recae en el elevado coste de los reactivos, destacando el de los fluorocromos. En consecuencia, existe la necesidad de evaluar otras alternativas económicas a los marcadores comerciales, especialmente de aquellos colorantes cuya interacción con los ácidos nucleicos ya haya sido estudiada anteriormente.

En este trabajo se estudiará, utilizando medidas de absorción Vis-UV y de fluorescencia de estado estacionario, el papel de la proflavina como un colorante alternativo a los colorantes comerciales utilizados en los kits de detección mediante PCR.

## 1.1. Amplificación y detección del ADN

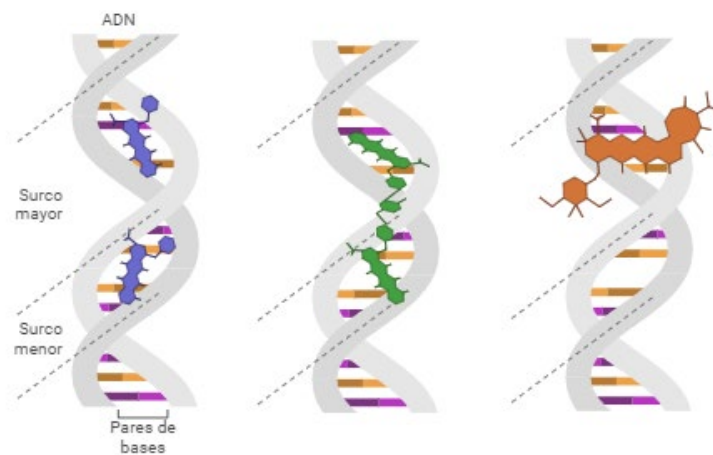
La PCR permite obtener muchas copias de un gen de interés de una manera rápida y fácil<sup>3</sup> y con el paso de los años ha sido capaz de adaptarse a una gran variedad de procedimientos, contribuyendo en campos de medicina y ciencias biológicas. Esta técnica contiene muchas variaciones que permiten que se pueda utilizar para analizar la expresión de genes, detectar mutaciones, patógenos, alérgenos o identificar especies.<sup>4</sup>

Se divide en tres fases esenciales, empleando variaciones cíclicas de temperatura: (i) desnaturalización del ADN, (ii) hibridación y (iii) extensión, que se van a repetir en varios ciclos hasta poder detectar la región de interés amplificada. Además, requiere de una serie de componentes para que tenga lugar la amplificación: (i) una ADN polimerasa termoestable, (ii) *primers* o cebadores y (iii) desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs).<sup>4</sup> El

producto amplificado se puede detectar utilizando la fluorescencia y fluorocromos, siendo estos últimos agentes intercalantes capaces de unirse al ADN de doble cadena<sup>3</sup> en los que la intensidad de fluorescencia del estado libre al estado complejado es diferente.

La intercalación es un proceso mediante el cual se inserta un cromóforo plano poliaromático entre los pares de bases del ADN de doble cadena,<sup>5</sup> y por ello son capaces de actuar como colorantes de ácidos nucleicos.<sup>6</sup> Este proceso también causa daños estructurales<sup>7</sup> y genera una modificación en la estructura de la cadena de ADN que puede alterar su función y afectar procesos biológicos como la transcripción, traducción o reparación. Por este motivo, los intercaladores han adquirido interés médico y científico debido a que también se pueden usar como antitumorales y antisépticos.<sup>6</sup>

Los intercaladores se pueden clasificar según sus características estructurales: (i) mono-intercaladores, que se unen al surco mayor o menor del ADN, (ii) bis-intercaladores, formados por la unión de dos mono-intercaladores e (iii) intercaladores de enhebrado, donde las cadenas laterales se encuentran a cada lado de la zona intercalada. Por otra parte, también se pueden clasificar según la orientación en la que intercalan al ADN: (i) intercaladores paralelos e (ii) intercaladores perpendiculares, esquematizados en la Figura 1.1.



*Figura 1.1. Representación de la intercalación de ADN por el monointercalador perpendicular Daunorrubicina (izquierda), el bisintercalador bis- Daunorrubicina (centro) y el intercalador de enhebrado nogamicina (derecha). Creado con Biorender.com*

El proceso de intercalación se puede estudiar de diversas formas; mediante viscosidad, coeficiente de sedimentación, cristalografía de rayos X, o mediante métodos espectroscópicos como la absorbancia o fluorescencia.<sup>7</sup>

## 1.2. Técnicas espectroscópicas

La espectroscopía es el estudio de la interacción de la radiación electromagnética con la materia. Muchos métodos espectroscópicos están basados en la absorción o emisión de la radiación en la región ultravioleta (UV), visible (Vis) o infrarroja (IR) y cada uno de ellos estudia diferentes aspectos moleculares.<sup>8</sup>

### 1.2.1. Absorción Vis-UV

La absorción de radiación es el proceso mediante el cual la energía de un fotón es absorbida por una especie química, generando un aumento de su energía interna proporcional a la cantidad de energía que llevaba ese fotón. Así, las especies pasan de estar en un estado de baja energía, que en el caso de la absorción Vis-UV suele ser el estado electrónico fundamental, a uno de mayor energía, que es un estado electrónico excitado.<sup>8</sup>

En los espectros de absorción se representa la absorbancia frente a la longitud de onda. La absorbancia,  $A$ , se puede definir como el logaritmo negativo de la transmitancia,  $T$ , la cual es, a su vez, la relación de la intensidad de luz que atraviesa la muestra,  $I$ , y la intensidad de luz incidente,  $I_0$ , como se indica en la Ecuación (1.1).

$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0} \quad (1.1)$$

La Ley de Lambert-Beer permite relacionar la absorbancia con la concentración de la especie,  $C$ , el camino óptico que tiene la cubeta,  $b$ , y el coeficiente de absorptividad molar,  $\epsilon$ , que es característico de cada sustancia en el medio en el que se encuentra, como se observa en la Ecuación (1.2).

$$A = \epsilon b C \quad (1.2)$$

No obstante, es importante mencionar que esta ecuación pierde su utilidad a altas concentraciones, puesto que hay una alteración de la absorbancia aparente y se pierde la linealidad.<sup>8</sup> Esto se puede explicar mediante el efecto de la luz difusa (*stray light*), radiación no deseada que llega al detector y provoca que la absorbancia medida sea menor que la real.<sup>9</sup>

### 1.2.2. Fluorescencia de estado estacionario

Otra técnica espectroscópica que implica transiciones electrónicas de las moléculas es la espectroscopia de fluorescencia de estado estacionario. La emisión de radiación tiene lugar cuando la energía de una molécula en un estado excitado es liberada para regresar a su estado fundamental. La radiación emitida por la molécula es de mayor longitud de onda y, por tanto, de menor energía que la radiación absorbida. Este proceso de emisión se le conoce como luminiscencia y se subdivide en dos tipos: fluorescencia y fosforescencia, dependiendo de la naturaleza del estado excitado en el que se encuentre la molécula.<sup>2</sup>

En la espectroscopia de fluorescencia de estado estacionario se registran los espectros de emisión de fluorescencia para una longitud de onda de excitación fija. Los espectros de emisión se obtienen representando la intensidad de fluorescencia,  $I_f$ , frente a la longitud de onda de la luz emitida. Cabe mencionar que en estos espectros se pueden visualizar bandas de dispersión no deseadas, que pueden ser debidas a dispersión elástica (Rayleigh) o inelástica (Raman). Estas bandas no corresponden con la fluorescencia de la molécula a estudiar, pero generalmente se pueden diferenciar con facilidad en la práctica.

### 1.3. Proflavina

La proflavina (PF) es un colorante derivado de la acridina que ha sido ampliamente utilizado como antibacteriano tópico y antiséptico urinario<sup>10,11</sup> debido a su capacidad de intercalarse en el ADN, interrumpiendo su síntesis y, por tanto, provocando altos niveles de mutación que evitan la reproducción bacteriana.<sup>5</sup> Por este motivo, además, se ha considerado como un candidato para tratar el VIH o para contribuir a la localización de drogas y realización de bioimágenes.<sup>5</sup>

Su estructura (Figura 1.2) consiste en un heterociclo tricíclico formado por dos anillos de anilina unidos por un anillo pirimidínico.

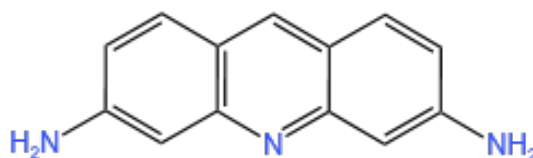


Figura 1.2. Estructura química de la proflavina.

A pH neutro, la molécula se encuentra protonada ( $PF^+$ ) y solo en este estado es capaz de dimerizar, mientras que a pH alcalinos está en su forma neutra y no forma dímeros.<sup>15,12</sup>

En la bibliografía hay datos muy dispares sobre la concentración a la que se empiezan a formar dímeros.<sup>10,13,14</sup> No obstante, se sabe que una proporción alta de dímeros se comienza a observar a partir de concentraciones mayores a  $5 \times 10^{-5}$  M y los agregados de mayor tamaño se forman a partir de concentraciones por encima de los  $10 \times 10^{-3}$  M.<sup>15</sup> También se sabe que la constante de dimerización,  $K_D$ , tiene un valor aproximado de  $500 \text{ M}^{-1}$ .<sup>12,13</sup>

La formación de dímeros deriva en un fenómeno denominado *self-quenching*, es decir, disminución de la intensidad de fluorescencia del fluoróforo debido a que se forman dímeros carentes de fluorescencia. Este aspecto es importante, ya que los cambios que generen los dímeros sobre el espectro de absorción o de emisión pueden alterar los resultados del sistema a estudiar.<sup>2,13</sup>

Hay dos tipos de dímeros principales: el tipo H y el tipo J. El tipo H se forma cuando una proflavina se une paralelamente a otra, mientras que el tipo J se forma cuando los monómeros de proflavina se posicionan uno al lado del otro,<sup>15</sup> como se muestra en la Figura 1.3.



Figura 1.3. Representación esquemática de los tipos de dímeros posibles para la proflavina: tipo H (izquierda) y tipo J (derecha).

### 1.3.1. Formación del complejo PF:ADN

La proflavina es un mono-intercalador paralelo de ADN, de manera que se posiciona entre los pares de bases del ADN por el surco mayor o menor<sup>7</sup> como se observa en la Figura 1.4.

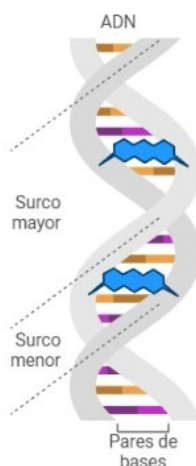


Figura 1.4. Representación del complejo intercalado entre el ADN y la proflavina.  
Creado con Biorender.com

La intercalación tiene lugar en dos fases: (i) una fase inicial limitada por difusión rápida donde la proflavina se une al exterior de la estructura del ADN y (ii) una segunda fase lenta de intercalación para formar un complejo estable.<sup>19,16</sup>

La formación del complejo proflavina-ADN depende de la concentración de ADN y de colorante. Cuando la concentración de proflavina es mayor a la de ADN se formarán dímeros, mientras que cuando la concentración de proflavina es menor, se formará el compuesto intercalado,<sup>14</sup> que es el objeto de investigación de este trabajo. La formación del complejo trae consigo un aumento del tamaño de los surcos mayor y menor,<sup>11</sup> dando lugar a variaciones notables en los espectros de absorción<sup>17</sup> y de emisión, destacando el *quenching* producido.<sup>18</sup>

Por este motivo, es de gran importancia poder diferenciar si el *quenching* observado se debe a la formación de dímeros o si se debe a la complejación de la proflavina con el ADN.

### 1.3.2. Efecto de los iones

Dado que el ADN es una molécula cargada negativamente, requiere de un entorno que le permita estabilizar su carga,<sup>19</sup> ya que es una molécula involucrada en diversos procesos biológicos y, por tanto, depende altamente del ambiente en el que se encuentre. En este trabajo, se estudiará la intercalación de la proflavina en el ADN en presencia de iones como el sodio ( $\text{Na}^+$ ) o el magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ).<sup>14,20</sup> El interés de estas dos sales en particular recae en el hecho de que el  $\text{NaCl}$  forma parte de muchos sistemas biológicos y el  $\text{MgCl}_2$ , por su parte, suele ser utilizado en una pequeña concentración para los *buffers* de las PCR.<sup>4</sup>

La unión entre el ADN y la proflavina se produce mediante interacciones electrostáticas entre el anillo aromático del colorante y las bases nucleotídicas del ADN.<sup>21</sup> Cuando un ligando se une al ADN, los contraiones que estaban unidos anteriormente se liberan para mantener un equilibrio en la densidad de las cargas del medio. Por tanto, cuando la proflavina se une, la liberación de contraiones contribuye fuertemente a las constantes de unión.<sup>19</sup>

Para poder analizar el efecto de las sales (formadas por un catión y un anión, de la forma  $M_p^+X_p^-$ ) sobre la unión de la proflavina con el ADN se puede utilizar la Ecuación (1.3), la cual relaciona la constante de asociación observada en presencia de sal,  $K_{obs}$ , con la constante de equilibrio termodinámica en ausencia de sal,  $K_T^0$ , con  $\Delta n_{MX}$ , que indica cómo afecta la sal a la formación del complejo, y con la actividad de la sal,  $a_{MX}$ .<sup>22</sup>

$$\log K_{obs} = \log K_T^0 - \Delta n_{MX} \times \log a_{MX} \quad (1.3)$$

A su vez, la actividad de la sal se puede calcular de la siguiente manera (Ecuación (1.4)):

$$a_{MX} = [MX] \gamma_{\pm} \quad (1.4)$$

donde  $[MX]$  es la concentración de la sal y  $\gamma_{\pm}$  el coeficiente de actividad medio los iones que la forman. Dado que la actividad y el coeficiente de actividad de los iones individuales no se puede calcular experimentalmente, se trata a la actividad como una propiedad del electrolito entero.

La ecuación de Debye-Hückel permite relacionar la fuerza iónica,  $I$ , con el coeficiente de actividad medio, a concentraciones bajas de sal. Como en este trabajo también se utilizarán concentraciones altas de sal, es necesario emplear la ecuación de Debye-Hückel extendida (Ecuación (1.5)):

$$\log \gamma_{\pm} = \frac{-A |z_M z_X| \sqrt{I}}{1 + B r_M \sqrt{I}} \quad (1.5)$$

donde  $z_M$  y  $z_X$  son las cargas del catión y anión y  $r_M$  es el radio iónico del catión.  $A$  y  $B$  son constantes cuyos valores a 25°C son  $A = 0,510 \text{ mol}^{-1/2} \text{ dm}^{3/2}$  y para  $B = 3,288 \text{ nm}^{-1} \text{ mol}^{-1/2} \text{ dm}^{3/2}$ . Se pueden obtener como se muestra en las Ecuaciones (1.6) y (1.7):

$$B = \sqrt{\frac{e^2 B}{\epsilon_0 \epsilon_r k T}} = \sqrt{\frac{2e^2 N}{\epsilon_0 k}} \frac{1}{\sqrt{\epsilon_r T}} = 3,288 \text{ nm}^{-1} \text{ mol}^{-1/2} \text{ dm}^{3/2} \quad (1.6)$$

$$A = \frac{e^2 B}{2.303 \times 8\pi \epsilon_0 \epsilon_r k T} = \frac{\sqrt{2} e^3 N^{1/2}}{2.303 \times 8\pi (\epsilon_0 k)^{3/2} (\epsilon_r T)^{3/2}} = 0,510 \text{ mol}^{-1/2} \text{ dm}^{3/2} \quad (1.7)$$

Para calcular la fuerza iónica, se utiliza la Ecuación (1.8), que indica que la  $I$  será mayor cuanto mayores sean las cargas de los iones de los electrolitos:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 \quad (1.8)$$

donde  $c_i$  corresponde con la concentración de cada tipo de iones en la muestra y  $z_i$  con la carga de cada ion.

No obstante, debido a que tanto la carga del anión como la del tampón Tris usado tienen un valor de -1, se obtiene una versión simplificada (Ecuación (1.9)) para calcular la fuerza iónica:<sup>23</sup>

$$I = \frac{[M]z_M^2}{2} + [X] + 2[Tris] \quad (1.9)$$

La cinética de las reacciones biomoleculares se puede ver afectada por la adición de sales al medio,<sup>24</sup> pero también depende de la actividad de un complejo activado (teoría cinética del complejo activado), según la relación Bronsted-Bjerrum:

$$k = k^0 \frac{\gamma_A \gamma_B}{\gamma_X} \quad (1.10)$$

Donde  $k^0$  es la constante cinética a dilución infinita y  $\gamma_A$ ,  $\gamma_B$ , y  $\gamma_X$  son los coeficientes de actividad de los reactivos y del complejo activado, respectivamente.

Combinando esta ecuación con la teoría de Debye-Hückel, se llega a una ecuación simplificada, conocida como ecuación de Debye-Bronsted:<sup>25</sup>

$$\log k_r = \log k_r^0 + 2 z_A z_B I^{1/2} \quad (1.11)$$

Donde  $k_r^0$  es la constante de velocidad en ausencia de sal y  $z_A$  y  $z_B$  son las cargas de cada especie química. Esta ecuación representa el efecto salino cinético, es decir, la variación de la constante cinética con la fuerza iónica de la disolución para reactivos con carga neta. De este modo, la velocidad de reacción disminuirá si aumenta la fuerza iónica cuando las especies químicas reaccionantes tienen signos contrarios, mientras que el efecto será opuesto con especies cargadas del mismo signo.<sup>26</sup>

Con estas ecuaciones es posible analizar la influencia del NaCl y MgCl<sub>2</sub> sobre la constante de afinidad.

## 2. Objetivos

El siguiente Trabajo Fin de Grado se va a enfocar en dos principales objetivos:

1. Estudiar la asociación de la proflavina como un intercalador fluorescente con el ADN de doble cadena, utilizando técnicas de espectroscopía de absorción Vis-UV y fluorescencia de estado estacionario. Se estudiará la influencia de las concentraciones de sales como NaCl y MgCl<sub>2</sub> sobre la constante de afinidad.
2. Validar la detección y cuantificación del ADN resultante de un proceso de amplificación mediante PCR con proflavina. Estos resultados se compararán con los obtenidos utilizando otros fluorocromos en el marco del proyecto NANOFLUIDETEC (Detección rápida y automatizable para SARS-Cov-2 basada en PCR, nanotecnología y microfluídica) financiado por la Axencia Galega de Innovación (GAIN).

## 3. Materiales y métodos

### 3.1. Reactivos

A continuación, se recogen en la Tabla 3.1 los reactivos utilizados en este trabajo.

Tabla 3.1. Compuestos comerciales utilizados.

Compuesto	Especificación comercial	CAS	Pureza
<b>Buffer</b>			
Tris-HCl (Trizma hydrochloride) (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ·HCl) (TRIS HCl)	SIGMA-ALDRICH 93287-50G	1185-53-1	≥ 99%
Cloruro sódico (Sodio Cloruro) (NaCl)	Panreac 141659	7647-14-5	≥ 99%
Cloruro de magnesio hexahidratado (Magnesium chloride hexa-hydrate) (MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich M2670	7791-18-6	≥ 99%
<b>ADN</b>			
Calf Thymus DNA solution 5x1mL 10mg/mL	Invitrogen 15633-019	-	-
<b>Colorante</b>			
Proflavina (3,6-Diaminoacridine hydrochloride) (C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> ·HCl)	Sigma-Aldrich 131105 - 5G	952-23-8	-

### 3.2. Preparación de muestras

Para comenzar con el trabajo, se prepararon disoluciones madre de proflavina, NaCl y MgCl<sub>2</sub>, todas disueltas en Tris (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>·HCl) 10 mM y pH ≈ 7,4. En algunos casos se necesitó preparar otras disoluciones madre más diluidas a partir de las iniciales para aumentar el volumen a pipetear y mejorar la precisión entre todas las muestras.

Todas las disoluciones madre se almacenaron en refrigeración cuando no se utilizaban y, aun así, las disoluciones madre de proflavina se tuvieron que preparar nuevamente. Esto se debe a que se observó una degradación de la proflavina, pues cambió de color y finalmente se formaron agregados.

Se utilizó una disolución madre de ADN de timo de ternera, con una concentración inicial de 10 mg/ml, y se rehibridó a 95 °C durante 15 minutos antes de cada uso.

Todas las muestras preparadas fueron muestras independientes, es decir, se prepararon por dilución directa a partir de las disoluciones madre. Aquellas muestras de volúmenes muy pequeños se prepararon por pesada para aumentar la precisión y conocer la concentración real. Además, se mantuvieron a 25 °C y en agitación utilizando un agitador termostatzado.

Se utilizaron cubetas de cuarzo, con 10,00 mm o 3,00 mm de camino óptico y entre cada medición se limpiaron adecuadamente para evitar contaminaciones.

### 3.3. Técnicas utilizadas

#### 3.3.1. Absorción Vis-UV

Para realizar las medidas de absorción, se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis Varian Cary 100 Bio y un termostato para mantener la temperatura de las muestras a 25°C. Se trata de un espectrofotómetro de doble haz, en el que se mide la muestra frente a una referencia que contiene el disolvente. Al inicio de cada serie de medidas se realizó una corrección por la línea base, midiendo el disolvente utilizado (Tris, NaCl o MgCl<sub>2</sub>, dependiendo del experimento) con el 100% de transmitancia (corrección de diferencias entre los dos canales de medida) y luego con el 0% (corrección del efecto de la luz difusa). No obstante, las pequeñas variaciones de la línea base observadas a lo largo de la serie se corrigieron calculando el valor medio de absorbancia en una zona del espectro donde no haya absorción y restando ese valor al espectro completo.

El intervalo para las mediciones abarcó desde los 200 nm hasta los 550 nm. Entre otros parámetros instrumentales, cabe mencionar que el tiempo de integración tuvo un valor de 0,2 segundos, la resolución espectral fue de 2,0 nm y la resolución digital de 1 nm.

#### 3.3.2. Fluorescencia de estado estacionario

Las mediciones de fluorescencia de estado estacionario se realizaron en un espectrofluorímetro Edinburgh Instruments FS5. Los espectros de emisión se obtienen al fijar una longitud de onda de excitación fija, en este caso 440 nm. El intervalo de medida fue desde 450 nm hasta 600 nm o 650 nm, con parámetros instrumentales donde el tiempo de integración tuvo un valor de 0,5 segundos y una resolución digital de 1 nm. Las rendijas, que determinan la resolución espectral, se ajustaron en base a la intensidad de la muestra, con valores típicos de 1,5 nm y 2 nm tanto para excitación como para emisión.

### 3.4. Análisis de datos

Se realizaron análisis comunes a todos los espectros experimentales obtenidos, explicados a continuación.

#### 3.4.1. Análisis Global con Origin

OriginPro se trata de un programa que permite realizar representaciones gráficas de los espectros obtenidos, así como ajustes tanto lineales como no lineales con facilidad.

Se empleó el análisis no lineal global para el tratamiento de los espectros de absorción y de emisión de fluorescencia, ya que permite analizar datos a más de una longitud de onda y compartir parámetros de ajuste entre todas las series.

A pesar de que OriginPro permite analizar una serie de datos, por ejemplo, valores de intensidad de fluorescencia a unas pocas longitudes de onda, no está capacitado para analizar un espectro completo, por lo que se utilizó un programa elaborado en el propio grupo de investigación (Sección 3.4.3).

#### 3.4.2. Análisis de Componentes principales (PCA)

El análisis de componentes principales (PCA) es un tipo de análisis estadístico que posee una gran variedad de usos. Su objetivo principal es encontrar aquellos componentes de un sistema que puedan explicar las variaciones de este. En un aspecto más específico, el PCA aplicado al análisis de datos espectroscópicos permite obtener el número mínimo de especies químicas o componentes presentes en el sistema objeto de estudio.

Los datos experimentales forman una matriz tridimensional,  $Y$ , cuyas filas corresponden con cada espectro y las columnas con las longitudes de onda dadas. El espectro experimental,  $Y$ , es la combinación lineal de un número de espectros puros, correspondientes a las especies químicas presentes en el sistema, multiplicados por la contribución (concentración) de cada especie en la muestra. Las variables externas, como el pH o la concentración, solo afectan a las contribuciones de cada una de las especies químicas y no a los espectros puros.

Con este análisis se tratan series de espectros de absorción o de fluorescencia medidos en función de un parámetro externo. Del análisis de las representaciones gráficas que se obtienen con los resultados del PCA se puede determinar el número real de componentes que explican los cambios sistemáticos de los espectros experimentales. Esto se puede realizar mediante el análisis del diagrama de autovectores, el perfil de los

autovectores, diagrama de los errores medios residuales, gráfica de los valores del test Durbin Watson o mediante el análisis de los residuos.

Los autovectores son representaciones de la absorbancia o intensidad de fluorescencia frente a las longitudes de onda. Los primeros autovectores son los que explican la mayor parte de la variación y el número de vectores viene dado por el número de componentes que presenten variaciones sistemáticas.

El problema del análisis de autovectores recae en que se pueden observar componentes que corresponden únicamente a ruido experimental o distorsiones instrumentales, por lo que suele ser bastante subjetivo. Por ese motivo, el análisis visual de los residuos obtenidos en función del número de componentes es, quizás, el más fácil para poder diferenciar el ruido de los componentes reales. Esto se debe a que los artefactos más comunes suelen aparecer como una variación sistemática en una representación espectral, pero se observan como variables aleatorias cuando se representan frente a una variable externa, pues no dependen de ella.

También cabe mencionar que detectar un número de componentes no necesariamente indica el número real de especies químicas, ya que algunas de estas especies pueden no ser fluorescentes, pueden tratarse de especies que tengan la misma dependencia respecto a la variable externa o que sean especies con características espectrales muy similares.

### 3.4.3. Análisis Global (GA)

En este paso, la información procedente del PCA se utiliza en un análisis global para confirmar el número de componentes propuestos y para encontrar estimaciones de los parámetros del modelo, que corresponde al número de componentes determinado. Aquí la función matemática del modelo se ajusta a todos los espectros a todas las longitudes de onda dadas, permitiendo obtener los espectros puros y mejores estimaciones de las constantes fisicoquímicas implicadas.

El análisis de componentes principales y el análisis global de la serie de espectros experimentales se realiza con un programa elaborado en el grupo de investigación utilizando el *software* de Wolfram Mathematica. Este programa permite el uso de diferentes modelos fisicoquímicos para el análisis global y da como resultado numerosas gráficas que permiten la determinación del número de componentes y el análisis de la calidad del ajuste.<sup>27</sup>

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Caracterización de la proflavina.

Para comenzar con los objetivos de este trabajo, el primer paso es encontrar las condiciones ideales de medición, como puede ser la concentración de fluorocromo (PF) o el pH del medio. Para ello se realizó un estudio previo de la proflavina, analizando la potencial influencia de la concentración, el pH y el tiempo sobre su espectro de absorción.

#### 4.1.1. Dependencia con la concentración: dimerización

Tal como se indicó en la introducción, la PF forma dímeros a concentraciones relativamente bajas que afectan al espectro de absorción. La formación de dímeros de PF no es deseable para este trabajo, ya que se pretende estudiar la interacción de la PF como un mono-intercalador de ADN. Por tanto, para elegir concentraciones donde su influencia sea menor, es necesario realizar estudios para determinar las concentraciones adecuadas donde se minimice este efecto (Figura 4.1). Además, en vista de que se estudiará la complejación en presencia de sal, también se puede estudiar la influencia que estas tendrán sobre el espectro de la proflavina (Figura 4.2).

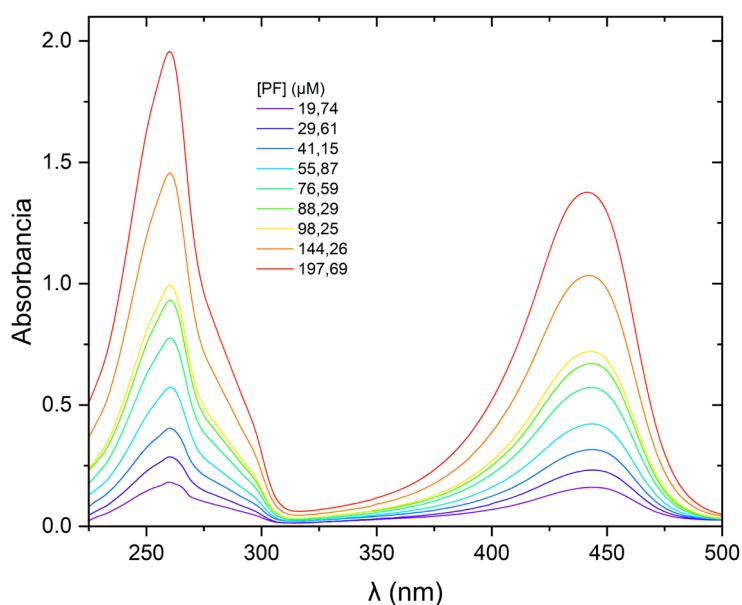


Figura 4.1. Espectro de absorción de la proflavina a diferentes concentraciones en una disolución de Tris 10 mM (sin NaCl).  $[PF] = 1 - 100 \mu M$ .

El aumento de la absorbancia, como se puede observar en la Figura 4.1, es proporcional al aumento de la concentración de proflavina. A concentraciones elevadas, la luz difusa altera significativamente los espectros y, por tanto, para realizar las mediciones de la

proflavina en presencia de NaCl (Figura 4.2), se utilizó una cubeta de camino óptico de 3,00 mm. Según la ley de Lambert-Beer (Ecuación(1.2)), el cambio de cubeta da lugar a una menor absorbancia, por lo que se puede llegar a concentraciones más elevadas.

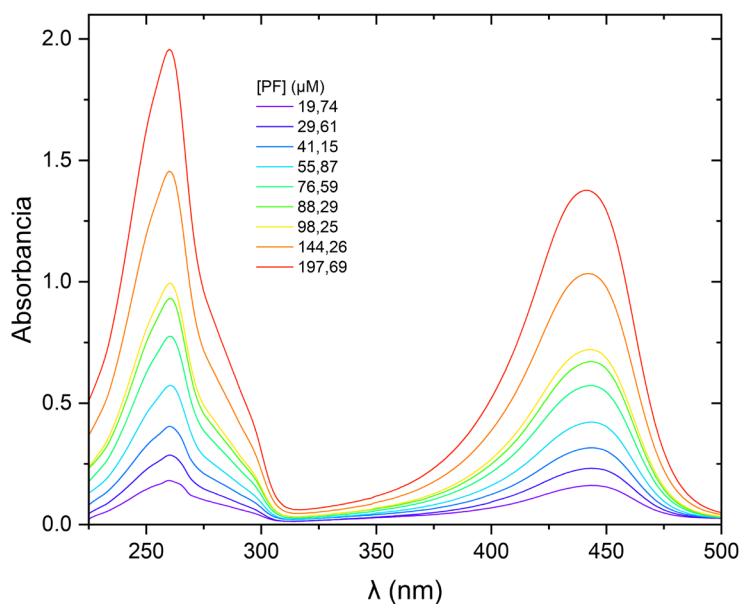


Figura 4.2. Espectro de absorción de la proflavina en una disolución de Tris 10 mM en presencia de NaCl 150 mM.  $[PF] = 20 - 200 \mu M$ .

En ambos casos se puede observar que el espectro de la proflavina posee dos picos máximos de absorbancia a 260 nm y 444 nm.

La absorbancia se puede representar frente a la concentración de proflavina a una longitud de onda determinada para analizar la posible desviación de la linealidad por la formación de dímeros. La ecuación de la recta será de la forma  $y = mx + b$ , donde  $y$  corresponde con la absorbancia,  $x$  con la concentración de proflavina,  $b$  con la ordenada en el origen y la pendiente,  $m$ , con el coeficiente de absortividad molar. Este análisis se realizó tanto en ausencia (Figura 4.3) como en presencia de sal (Figura 4.4) para comprobar si  $\epsilon$  se ve influenciado por la presencia de sal.

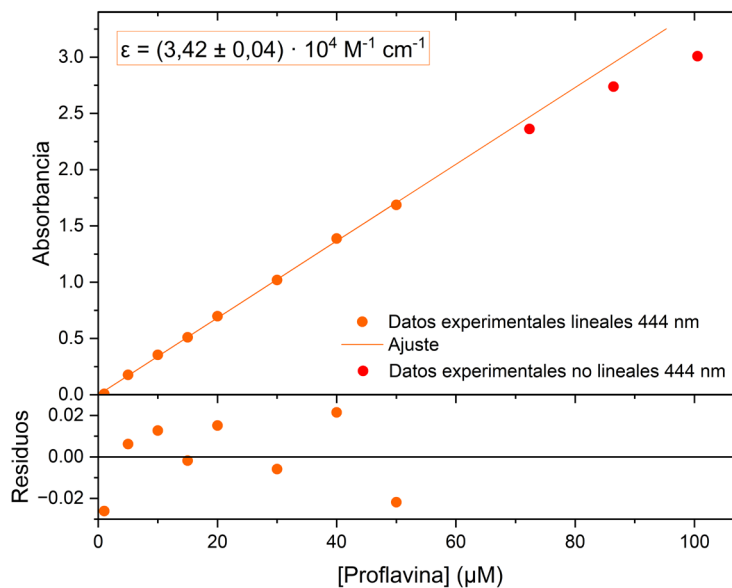


Figura 4.3. Ajuste lineal de la absorbancia a 444 nm frente a la concentración de proflavina en ausencia de NaCl.

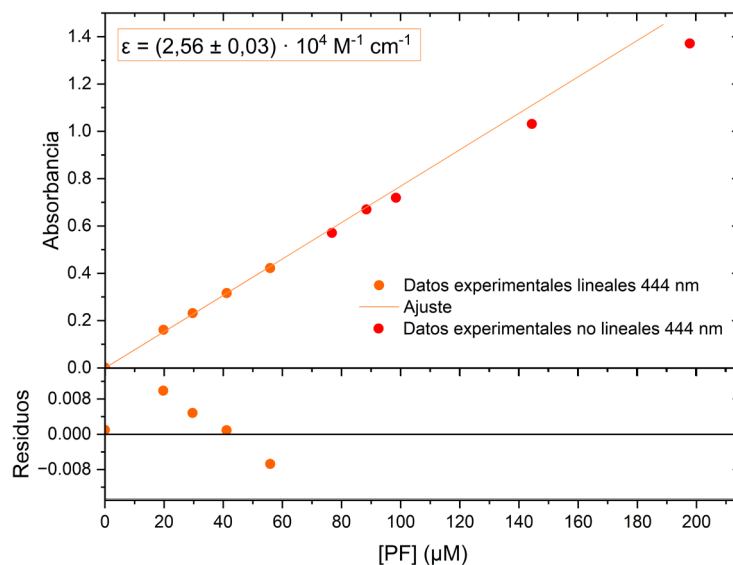


Figura 4.4. Ajuste lineal de la absorbancia a 444 nm frente a la concentración de proflavina en presencia de NaCl 150 mM.

Como se puede observar, la linealidad solo se mantiene en concentraciones bajas y el coeficiente de absorción molar no se ve afectado por la presencia de sal. Esto indica la formación dímeros de PF a concentraciones altas que provocan cambios en las bandas de absorción. Por tanto, para observar mejor esta variación, se divide la absorbancia entre la concentración y el camino óptico de la cubeta para obtener los espectros en unidades de  $\epsilon$  en presencia de sal (Ecuación (1.2)), como se observa a continuación (Figura 4.5):

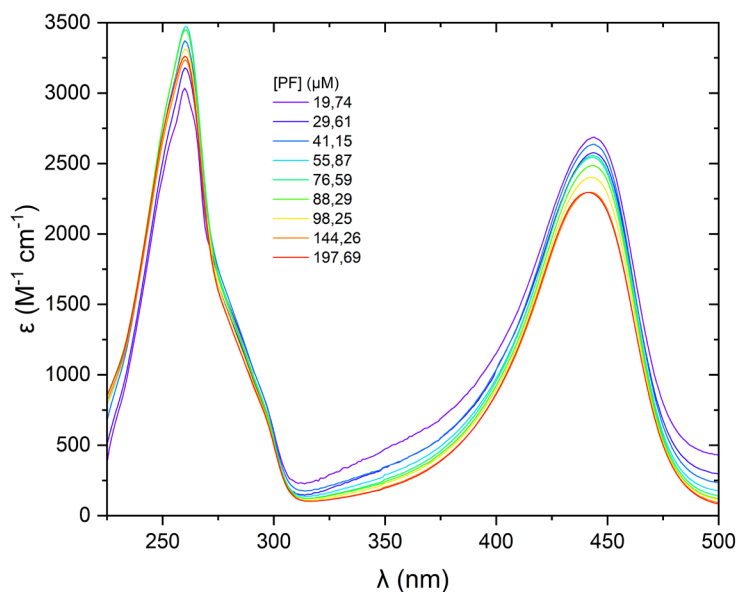


Figura 4.5. Espectro del coeficiente de absorción molar de la proflavina en presencia de NaCl 150 mM.  $[PF] = 20 - 200 \mu\text{M}$ .

Si se tratara del mismo compuesto, los espectros serían iguales. Sin embargo, mientras aumenta la concentración, disminuye el coeficiente de absorción molar indicando que aparece una nueva especie química que se puede atribuir al dímero.

Estos estudios permitieron elegir las concentraciones adecuadas de proflavina para cada técnica espectroscópica. Así, para la absorción se utilizó una concentración de  $30 \mu\text{M}$ , mientras que para la fluorescencia la concentración fue de  $2 \mu\text{M}$ .

#### 4.1.2. Dependencia del pH: constante de acidez

La constante de disociación ácida,  $K_a$ , define el equilibrio de disociación de un ácido en un equilibrio ácido-base.<sup>28</sup> En vista de que la información bibliográfica indica que el  $pK_a$ , es decir, el logaritmo negativo de la  $K_a$ , tiene un valor aproximado de 9,6,<sup>18,29</sup> se analizó la dependencia de los espectros de absorción y de emisión de fluorescencia de la PF con el pH añadiendo distintas cantidades de NaOH en muestras de PF preparadas en tampón Tris de  $\text{pH} \approx 7,4$ .

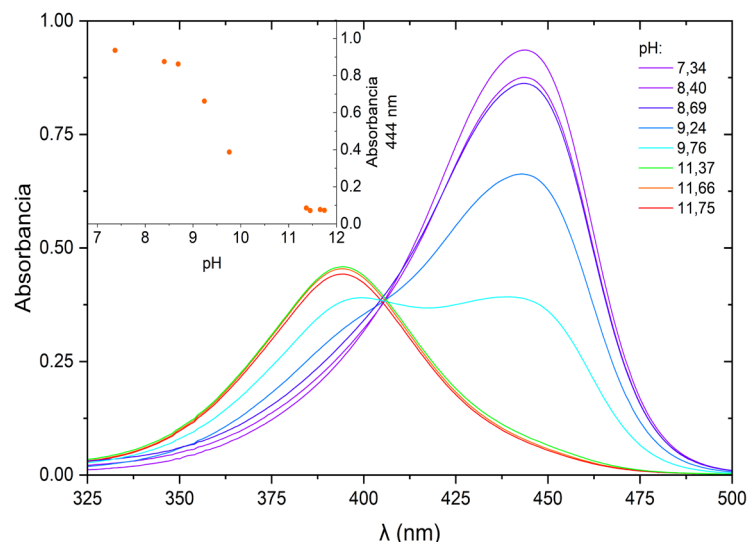


Figura 4.6. Espectro de absorción de la proflavina a diferentes valores de pH. En el gráfico insertado se muestran los valores de absorbancia a 444 nm en función del pH de 7 a 12.  $[PF] = 30 \mu M$ .

En la Figura 4.6 se observa una disminución de la absorbancia en el máximo de 444 nm con el aumento de iones hidroxilo ( $OH^-$ ) en la muestra. Por otro lado, hay un desplazamiento del máximo de absorción hacia el azul, estabilizándose a 396 nm en medio fuertemente básico. Los espectros pasan por un punto isobéptico sobre los 406 nm, el cual tiene lugar cuando la absorbancia una longitud de onda determinada no cambia con el pH.<sup>30</sup>

En cuanto a los espectros de emisión (Figura 4.7) se puede observar que la intensidad de fluorescencia disminuye a medida que aumenta el pH. El desplazamiento del máximo también es significativo, pero de menor magnitud que en el espectro de absorción.

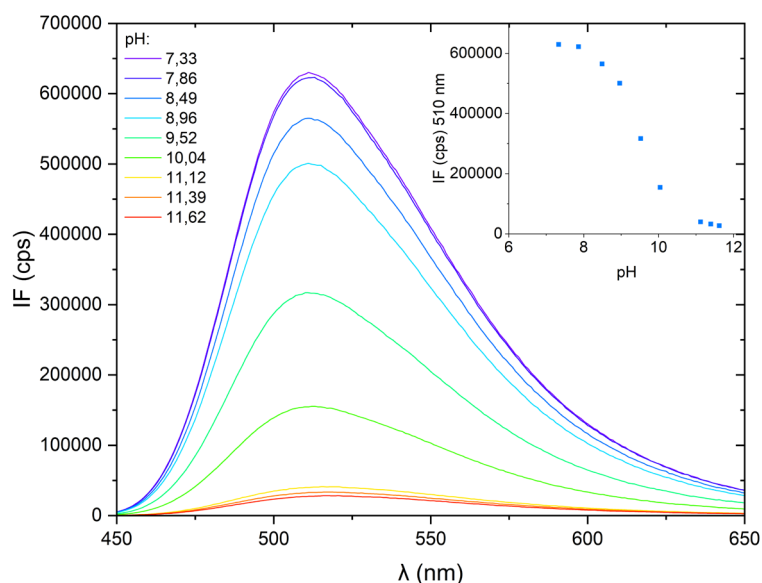


Figura 4.7. Espectro de emisión de la proflavina a diferentes pH. En el gráfico insertado se muestran los valores de intensidad de fluorescencia a 510 nm en función del pH de 7 a 12.  $[PF] = 2 \mu M$ .  $\lambda_{exc} = 440 nm$ .

Las variaciones de la absorbancia y de la intensidad de fluorescencia con el pH presentan una curva sigmoideal que indica la presencia de un  $pK_a$  ubicado en su punto de inflexión, aproximadamente entre 9 y 10. Para poder determinarlo, se considera el siguiente equilibrio ácido-base:



donde  $HA$  es la especie química protonada,  $B$  es la especie química sin protonar y  $H^+$  el protón que se libera en la reacción. La constante de acidez  $K_a$  relaciona las concentraciones de las tres especies, como se muestra en la Ecuación (4.2):

$$K_a = \frac{[B][H^+]}{[HA]} \quad (4.2)$$

La proflavina en su forma protonada tiene un protón unido al nitrógeno del anillo pirimidínico, mientras que en su forma desprotonada carece de él (Figura 4.8), provocando que cada especie tenga propiedades espectroscópicas diferentes.

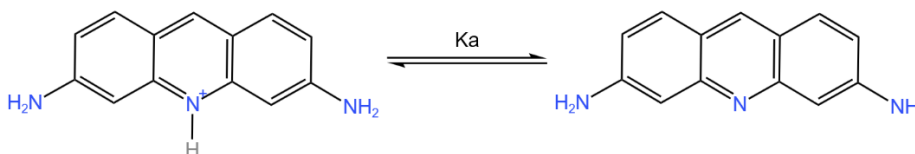


Figura 4.8. Estructura química de la proflavina protonada (izquierda) y desprotonada (derecha).

Para llegar a la ecuación de ajuste, es necesario considerar que la concentración inicial corresponde a la suma de las dos especies presentes (Ecuación (4.3)) y que la absorbancia total es igual a la suma de las absorbancias de cada especie (Ecuación (4.4)):

$$C_0 = [HA] + [B] \quad (4.3)$$

$$A = \varepsilon_{HA}b[HA] + \varepsilon_Bb[B] \quad (4.4)$$

Combinando ambas ecuaciones, se llega a la Ecuación (4.5) que permitirá determinar el valor de la  $K_a$  mediante un ajuste no lineal y es válida para datos experimentales de absorción y de emisión:

$$A = \frac{A_{HA}[H^+] + A_B}{[H^+] + K_a} \quad (4.5)$$

donde  $A_{HA}$  y  $A_B$  son las absorbancias de la especie protonada y desprotonada, respectivamente.

A continuación, se presentan los ajustes globales y su representación para ciertos valores de la absorbancia (Figura 4.9) y de la intensidad de fluorescencia (Figura 4.10).

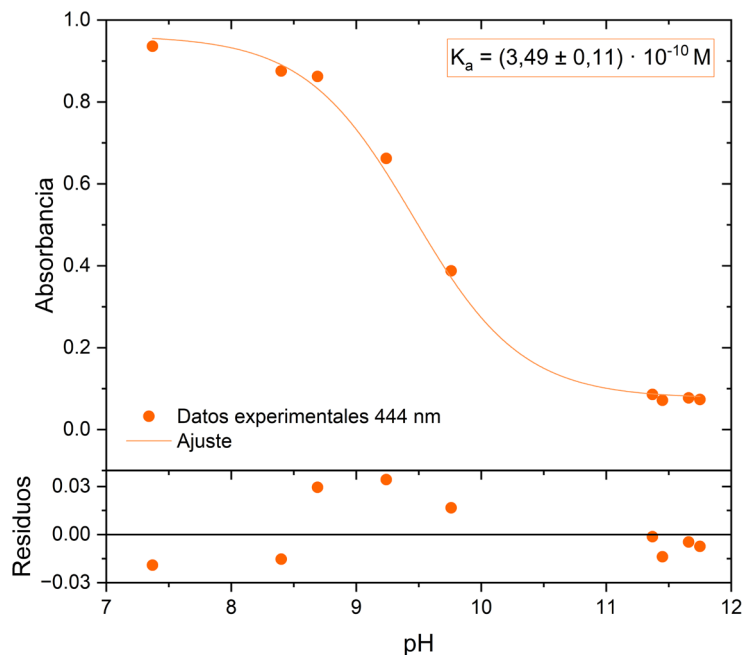


Figura 4.9. Ajuste no lineal de la absorbancia de la proflavina a 444 nm en función del pH.

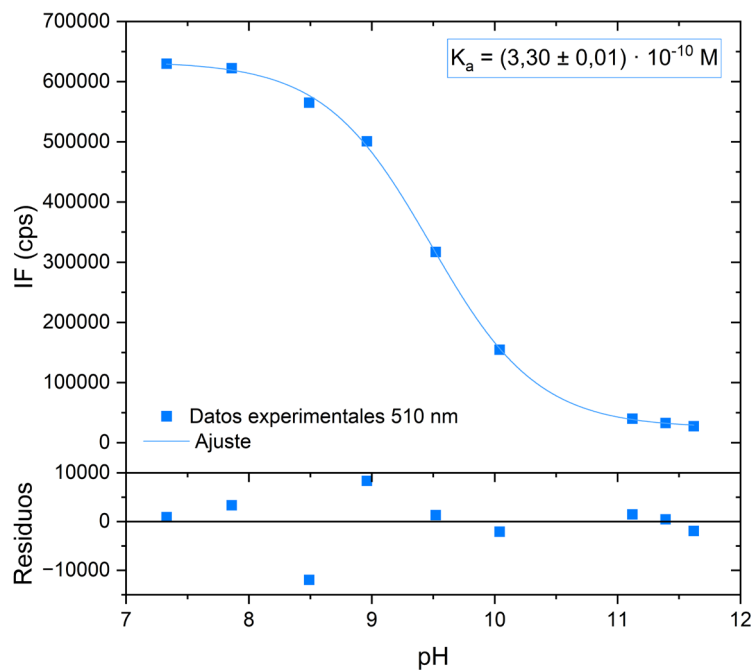


Figura 4.10. Ajuste no lineal de la intensidad de fluorescencia de la proflavina a 510 nm en función del pH.

Los valores obtenidos en ambos ensayos son bastante parecidos, coincidiendo además con los de la bibliografía.<sup>18,29</sup> Los resultados obtenidos en los análisis globales de los espectros completos aparecen recogidos en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Valores de  $K_a$  y  $pK_a$  obtenidos experimentalmente.

Técnica espectroscópica	$K_a$ (M)	$pK_a$
Absorción	$(3,49 \pm 0,11) \cdot 10^{-10}$	$9,46 \pm 0,01$
Emisión	$(3,30 \pm 0,01) \cdot 10^{-10}$	$9,48 \pm 0,01$

#### 4.1.3. Degradación

Como cualquier sustancia química, la proflavina es susceptible a procesos químicos que llevan a su degradación. Aunque la información sobre su estabilidad química es poca, contrasta con lo observado durante el desarrollo del trabajo.

Según la bibliografía,<sup>31</sup> la proflavina almacenada bajo refrigeración es estable químicamente por al menos 12 meses. No obstante, en un plazo de 30 días, la proflavina experimentó un proceso de degradación que derivó en formación de agregados o productos de degradación que precipitaban.

En la Figura 4.11 se puede observar cómo la proflavina pierde intensidad con el tiempo. Sobre la base de estos datos, se comprobó siempre que la disolución madre estuviera en buenas condiciones.

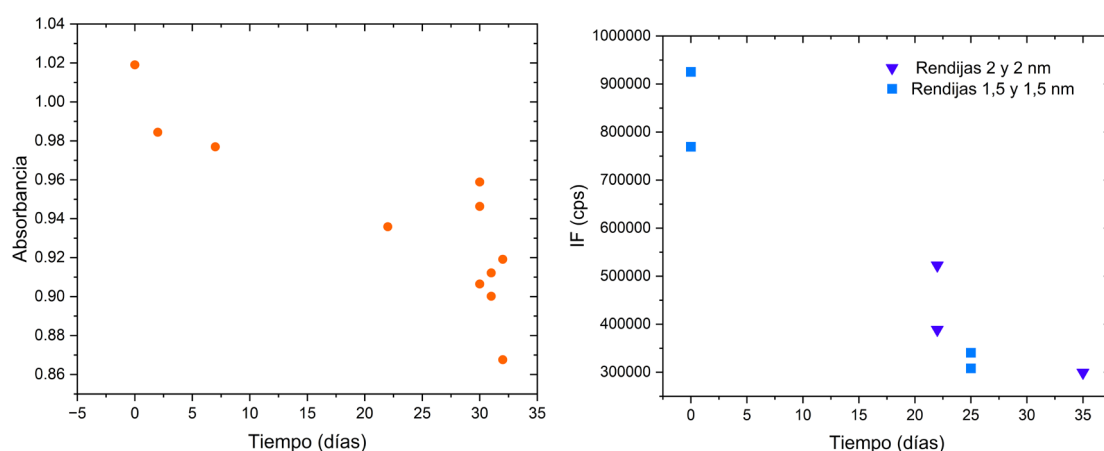


Figura 4.11. Izquierda: representación de la disminución de absorbancia a 444 nm de la proflavina con el tiempo. Derecha: representación de la disminución de la intensidad de fluorescencia a 510 nm de la proflavina con el tiempo. Se muestra como ejemplo los valores obtenidos con dos configuraciones de rendijas.

## 4.2. Intercalación

Expresar la concentración de ADN en términos de molaridad no proporciona información sobre la extensión de las cadenas, ya que un mol de una cadena larga de ADN tiene más sitios de unión que un mol de una cadena corta. Por este motivo, se suele expresar la concentración en concentración molar de pares de bases de ADN, ya que facilita la comparación entre diferentes tipos de ADN. De esta manera, sabiendo que un par de base del ADN de doble cadena tiene una masa molar media de 660 mg/mol,<sup>32</sup> se puede determinar su concentración en  $\mu\text{M bp}$ .

Se realizaron series de diferentes concentraciones de sales para estudiar el efecto de los iones sobre la complejación del ADN y la proflavina. A continuación, se presentan los datos obtenidos para concentraciones de NaCl 150 mM y  $\text{MgCl}_2$  2,0 mM. El resto de los resultados obtenidos (para concentraciones de NaCl 50 mM, 100 mM, 200 mM y 300 mM y concentraciones de  $\text{MgCl}_2$  de 10 mM y 50 mM) se muestran en el anexo.

La complejación se puede observar con claridad en los espectros de absorción. Por un lado, la región del ultravioleta presenta un aumento de la absorbancia con el aumento de la concentración de ADN, mientras que este efecto es contrario en la zona del espectro visible (Figura 4.12). Las primeras dos bandas corresponden principalmente a la absorción del ADN, mientras que en la tercera banda se observa la absorción de la proflavina y su variación con la formación del complejo intercalado.<sup>17</sup>

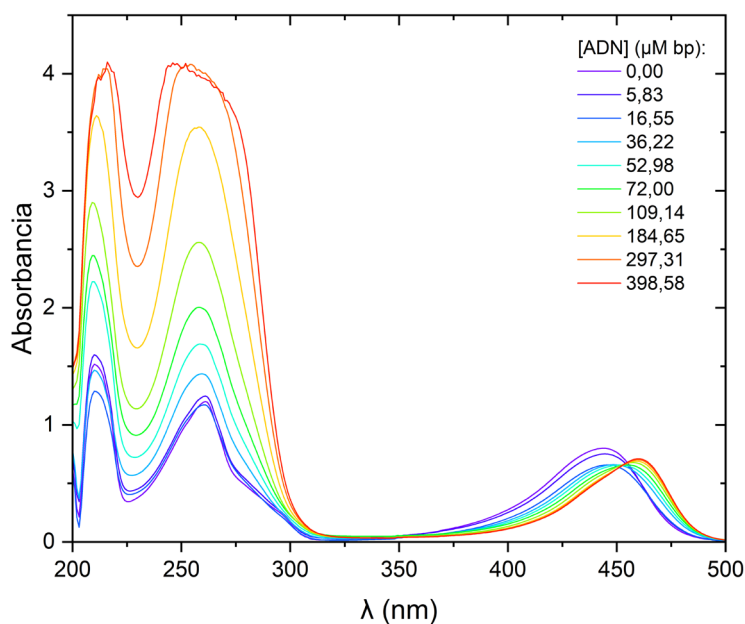


Figura 4.12. Espectro de absorción de la proflavina en presencia de ADN y NaCl.  $[\text{ADN}] = 0 - 400 \mu\text{M bp}$ .  $[\text{PF}] = 30 \mu\text{M}$ .  $[\text{NaCl}] = 150 \text{ mM}$ .

La luz difusa afecta en gran medida a las muestras con mayor concentración de ADN en la zona del ultravioleta. No obstante, la zona de mayor interés se encuentra entre 350 nm y 500 nm, cuya absorbancia es lo suficientemente baja como para no estar influenciada por la luz difusa. Así, en este intervalo se puede observar una disminución de la absorbancia en el máximo a 444 nm con el aumento de la concentración de ADN, con un claro desplazamiento hacia mayores longitudes de onda. Se observa también una curva típica de los procesos de complejación al representar los valores de absorbancia frente a la concentración de ADN (Figura 4.13). Se observa la presencia de más de un punto isobéptico, lo que podría indicar la presencia de más de dos especies químicas en el equilibrio.

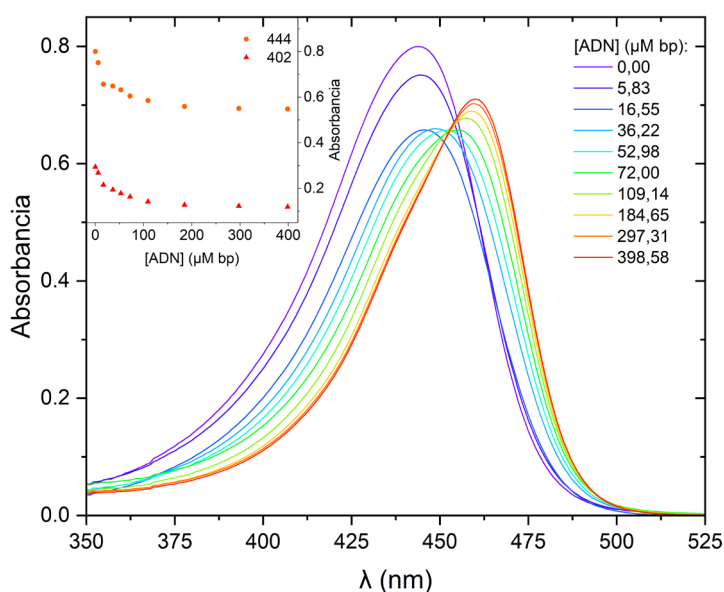


Figura 4.13. Espectro de absorción de la proflavina en presencia de ADN y NaCl. En el gráfico insertado se muestran los valores de absorbancia a dos longitudes de onda (444 nm y 402 nm) en función de la concentración de ADN ( $\mu\text{M bp}$ ).  $[\text{ADN}] = 0 - 400 \mu\text{M bp}$ .  $[\text{PF}] = 30 \mu\text{M}$ .  $[\text{NaCl}] = 150 \text{ mM}$ .

El intervalo de concentraciones de ADN era relativamente amplio (0 – 400  $\mu\text{M bp}$ ) y a concentraciones muy elevadas, la curva se estabiliza, volviéndose independiente de la concentración. Por este motivo, el intervalo de concentraciones se redujo para obtener suficientes datos de la zona de la curva que depende altamente de la concentración de ADN (Figura 4.14).

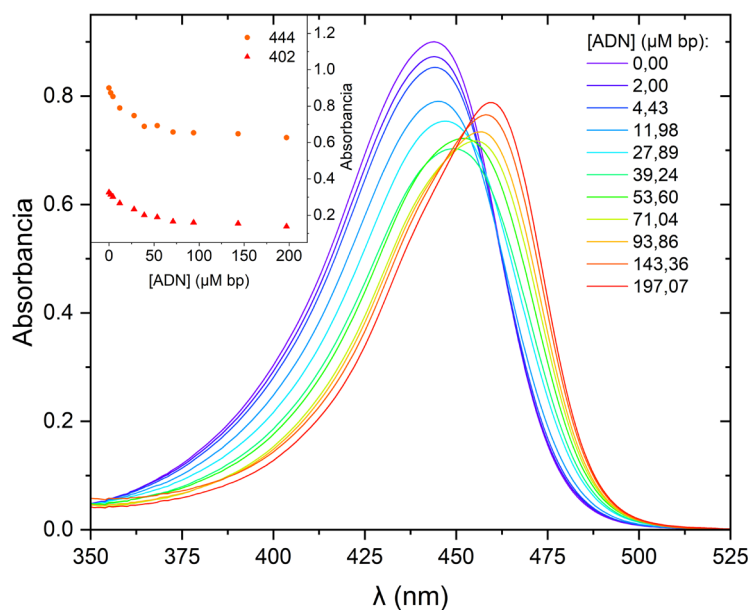


Figura 4.14. Espectro de absorción de la proflavina en presencia de ADN y  $MgCl_2$ . En el gráfico insertado se muestran los valores de absorbancia a dos longitudes de onda (444 nm y 402 nm) en función de la concentración de ADN ( $\mu M$  bp).  $[ADN] = 0 - 200 \mu M$  bp.  $[PF] = 30 \mu M$ .  $[MgCl_2] = 2 mM$ .

Estos efectos también se pueden observar en los espectros de emisión (Figura 4.15 y Figura 4.16), observándose un *quenching* de la fluorescencia y un desplazamiento del máximo, originalmente ubicado a 510 nm, hacia longitudes de onda menores.

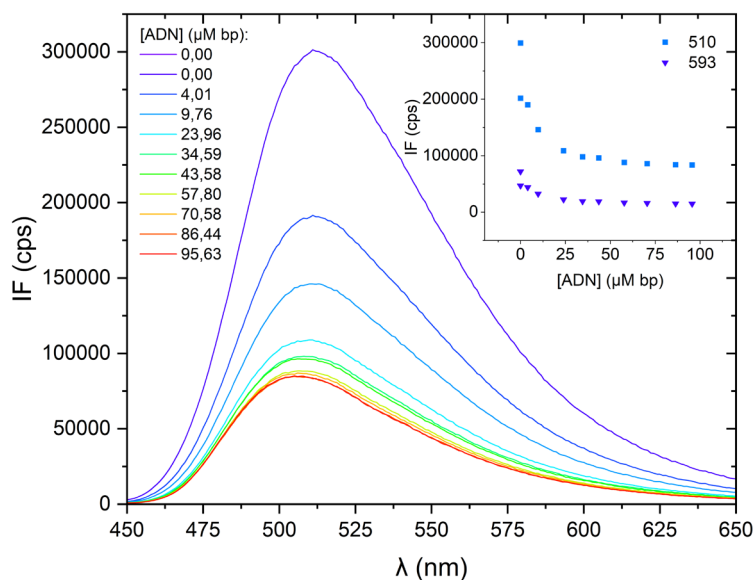


Figura 4.15. Espectro de emisión de la proflavina en presencia de ADN y  $NaCl$ . En el gráfico insertado se muestran los valores de absorbancia a dos longitudes de onda (510 nm y 593 nm) en función de la concentración de ADN ( $\mu M$  bp).  $[ADN] = 0 - 100 \mu M$  bp.  $[PF] = 2 \mu M$ .  $[NaCl] = 150 mM$ .  $\lambda_{exc} = 440 nm$ .

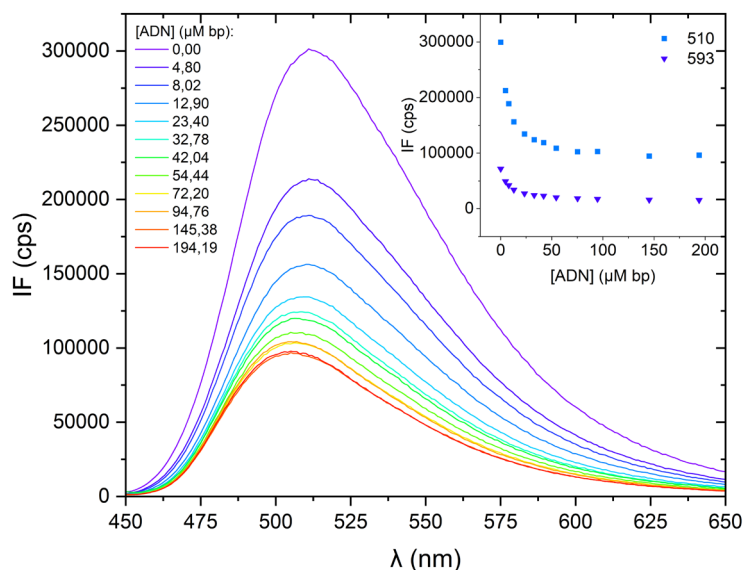


Figura 4.16. Espectro de emisión de la proflavina en presencia de ADN y  $MgCl_2$ . En el gráfico insertado se muestran los valores de absorbancia a dos longitudes de onda (510 nm y 593 nm) en función de la concentración de ADN ( $\mu M$  bp).  $[ADN] = 0 - 200 \mu M$  bp.  $[PF] = 2 \mu M$ .  $[MgCl_2] = 2 mM$ .  $\lambda_{exc} = 440 nm$ .

Por tanto, los cambios observados, tanto en los espectros de absorción como en los de emisión, indican la complejación entre la proflavina y el ADN. Para poder establecer el modelo de complejación adecuado, es necesario determinar en primer lugar el número de componentes (especies químicas) presentes en el medio.

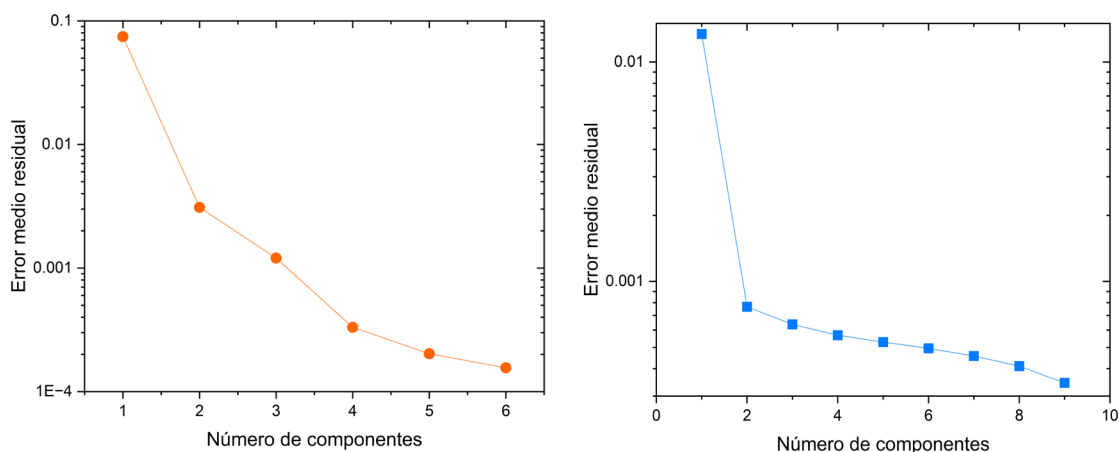


Figura 4.17. Error medio residual de los espectros de absorción (izquierda) y emisión (derecha) con el ajuste del modelo de complejación 1:1.  $[NaCl] = 150 mM$ .

Como se mencionó anteriormente, una de las formas más fáciles para conocer el número de componentes es el análisis visual del error medio residual (Figura 4.17). Este tipo de gráfico muestra cómo se reduce el error medio residual de la serie espectral cuando se introducen sucesivos componentes. Así, cuando se introducen dos componentes, la serie de espectros de emisión presenta un error medio residual mucho menor que con un componente y no disminuye significativamente con la introducción de

más componentes (Figura 4.17, derecha). Esto significa que la serie de espectros de emisión se puede explicar satisfactoriamente con dos componentes.

En el caso de la emisión, es fácil reconocer que el número de componentes es dos, es decir, hay dos especies químicas presentes: la proflavina libre (PF) y el complejo de la proflavina con el ADN (PF:ADN). En cambio, el mismo gráfico para la serie de espectros de absorción (Figura 4.17, izquierda) muestra que, al menos, son necesarios tres componentes para reducir el error medio a valores residuales. En este caso será necesario un modelo de complejación más amplio que incluya la presencia de otras especies química adicionales, como pueden ser los dímeros.

Para obtener modelos para ajustar los valores obtenidos, es necesario considerar tanto a la absorbancia como a la intensidad de fluorescencia de estado estacionario como combinaciones lineales de las concentraciones de las especies presentes en la muestra.

Se comienza por el modelo de ajuste de los datos de emisión de fluorescencia, donde se han identificado únicamente dos especies químicas en equilibrio. De esta manera, la constante de equilibrio  $K$  define la reacción estequiométrica 1:1 donde la proflavina (huésped) se une al ADN (hospedador):



La constante de equilibrio vendrá dada por la Ecuación (4.7).

$$K = \frac{[PF:ADN]}{[PF][ADN]} \quad (4.7)$$

Considerando los balances de materia, suponiendo que el ADN siempre está en exceso:

$$\begin{aligned} [ADN]_0 &= [ADN] + [PF:ADN] \approx [ADN] \\ [PF]_0 &= [PF] + [PF:ADN] \end{aligned} \quad (4.8)$$

Combinando las Ecuaciones (4.7) y (4.8) se llega la Ecuación (4.9).

$$\begin{aligned} [PF] &= \frac{[PF:ADN]}{K[ADN]} = [PF]_0 - [PF:ADN] = [PF]_0 - K[PF][ADN] \\ [PF]_0 &= [PF](1 + K[ADN]) = [PF](1 + K[ADN]_0) \\ [PF] &= \frac{[PF]_0}{1 + K[ADN]_0} \end{aligned} \quad (4.9)$$

Así se puede sacar la concentración del complejo:

$$[PF:ADN] = K[PF][ADN] = K[PF][ADN]_0 = \frac{K[PF]_0[ADN]_0}{1 + K[ADN]_0} \quad (4.10)$$

Usando el software de OriginPro o el programa de PCGA, se puede ajustar este modelo a los datos experimentales para determinar el valor de  $K$  y los espectros puros de las especies químicas implicadas.

En el caso de la emisión, y como se observó en el análisis de PCA, no hay presencia de dímeros, debido a las bajas concentraciones con las que se trabajó. Así, con estas series, se realizó un análisis de complejación 1:1. A continuación se muestran los resultados de estos análisis: los espectros puros de cada especie (Figura 4.18), la concentración de cada especie en función de la concentración de ADN (Figura 4.19) y ejemplos de los ajustes de las intensidades de fluorescencia a ciertas longitudes de onda (Figura 4.20 y Figura 4.21).

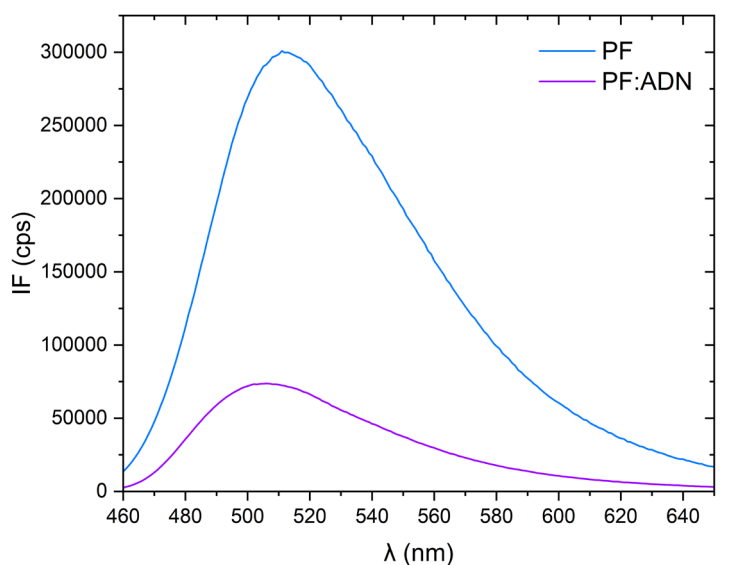


Figura 4.18. Espectros puros de las especies presentes en emisión.  $[NaCl] = 150 \text{ mM}$ .

El complejo intercalado es menos fluorescente que la proflavina sin complejar, con un desplazamiento del pico hacia longitudes de onda menores como se había observado anteriormente.

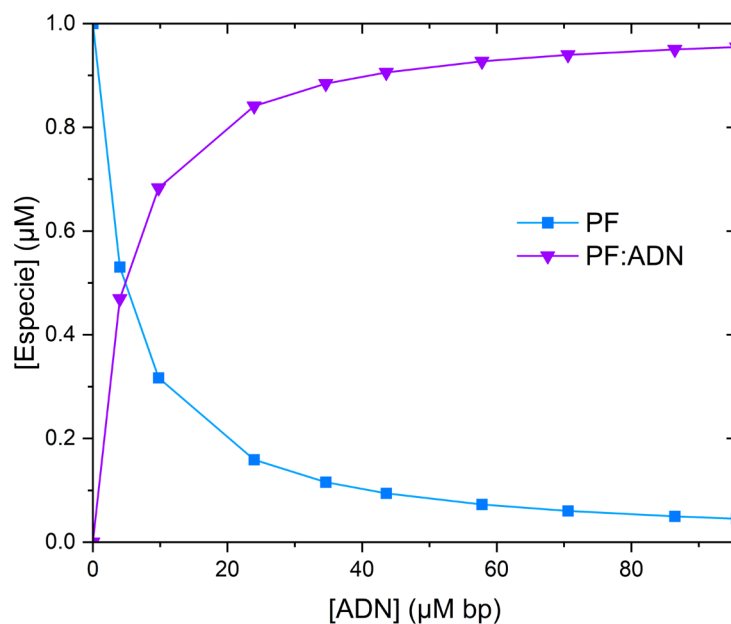


Figura 4.19. Contribución de cada especie química en la emisión en función de la concentración de ADN.  $[NaCl] = 150 \text{ mM}$ .

Cuando la concentración de ADN es cero, en la muestra está presente únicamente la proflavina en su forma libre, y su concentración va disminuyendo con el aumento de la concentración de ADN para formar el complejo PF:ADN.

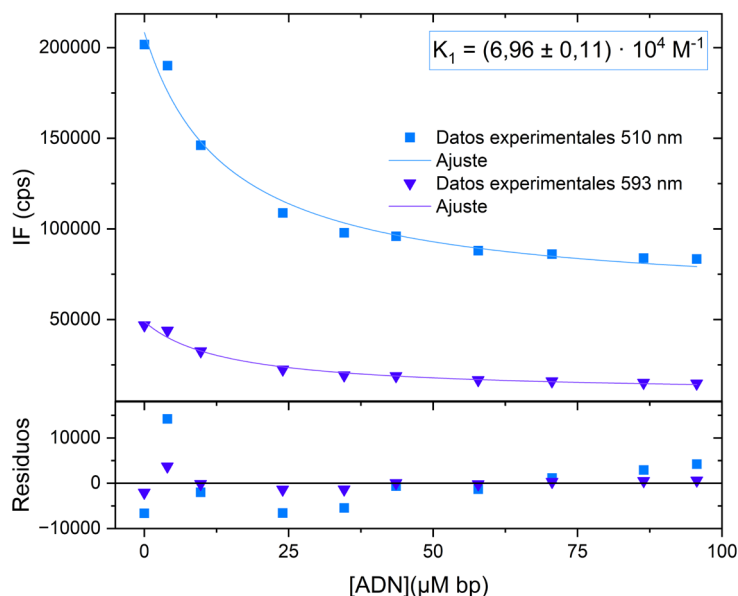


Figura 4.20. Ajuste no lineal de la complejación 1:1 a los datos de emisión de la proflavina en presencia de ADN y NaCl. En la gráfica se representa el ajuste de las intensidades de fluorescencia a dos longitudes de onda (510 nm y 593 nm).  $[ADN] = 0 - 100 \text{ μM bp}$ .  $[PF] = 2 \text{ μM}$ .  $[NaCl] = 150 \text{ mM}$ .  $\lambda_{exc} = 440 \text{ nm}$ .

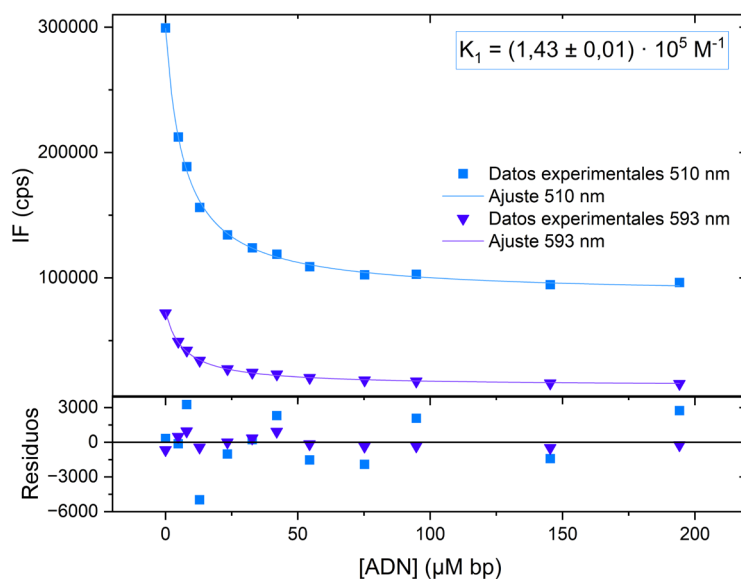


Figura 4.21. Ajuste no lineal de la complejación 1:1 a los datos de emisión de la proflavina en presencia de ADN y  $\text{MgCl}_2$ . En la gráfica se representa el ajuste de las intensidades de fluorescencia a dos longitudes de onda (510 nm y 593 nm).  $[\text{ADN}] = 0 - 200 \mu\text{M bp}$ .  $[\text{PF}] = 2 \mu\text{M}$ .  $[\text{MgCl}_2] = 2 \text{ mM}$ .  $\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$ .

En la Tabla 4.2 se recogen los valores de  $K_1$  a todas las concentraciones de sales estudiadas, así como su valor inverso,  $K_{d1}$ , que corresponde con la constante de disociación. En el anexo se muestran los datos experimentales y los ajustes para las series de espectros de emisión medidas a las diferentes concentraciones de  $\text{NaCl}$  y  $\text{MgCl}_2$ .

Tabla 4.2. Valores de  $K_1$  y  $K_{d1}$  obtenidos experimentalmente del ajuste global de las series de espectros de emisión para diferentes concentraciones de sales.

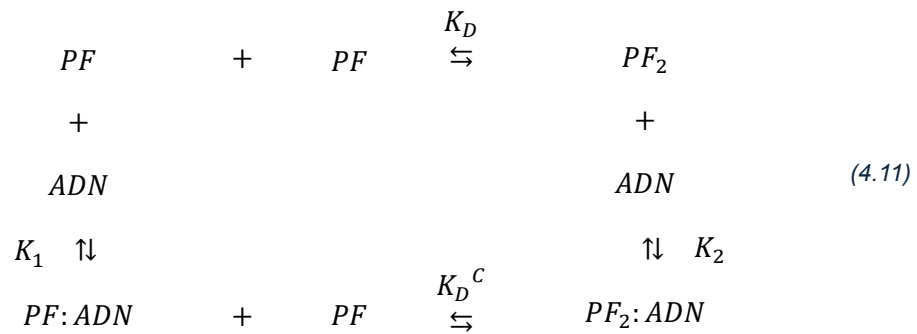
Sal	Concentración (mM)	$K_1 (\text{M}^{-1})$	$K_{d1} (\text{M})$
NaCl	50	$(1,10 \pm 0,01) \cdot 10^5$	$(9,09 \pm 0,08) \cdot 10^{-6}$
	100	$(1,09 \pm 0,01) \cdot 10^5$	$(9,17 \pm 0,08) \cdot 10^{-6}$
	150	$(6,96 \pm 0,11) \cdot 10^4$	$(1,44 \pm 0,02) \cdot 10^{-5}$
	200	$(4,95 \pm 0,08) \cdot 10^4$	$(2,02 \pm 0,03) \cdot 10^{-5}$
	300	$(5,83 \pm 0,11) \cdot 10^4$	$(1,72 \pm 0,03) \cdot 10^{-5}$
$\text{MgCl}_2$	2	$(1,43 \pm 0,01) \cdot 10^5$	$(6,99 \pm 0,05) \cdot 10^{-6}$
	10	$(1,01 \pm 0,02) \cdot 10^5$	$(9,90 \pm 0,20) \cdot 10^{-6}$
	50	$(6,17 \pm 0,08) \cdot 10^4$	$(1,62 \pm 0,02) \cdot 10^{-5}$

El examen de los resultados obtenidos para la constante de complejación 1:1 indica una elevada afinidad entre la proflavina y el ADN, así como un efecto significativo de la concentración de sal, que es mucho más acusado en el caso del catión divalente. Los

valores de la constante de disociación son bajos, lo que indica la formación de un complejo PF:ADN estable.

En cuanto a los datos de absorción, el PCA indicaba un número de especies químicas mayor que en los datos de emisión, al menos tres. Es importante recordar que las concentraciones de proflavina utilizadas en las disoluciones de absorción son diferentes de las usadas en emisión, siendo 15 veces mayores en el caso de la absorción. Por tanto, es necesario plantear un modelo de complejación más amplio, que tenga en cuenta la posible formación de dímeros, que estaría favorecida en presencia del ADN.

Así, para las concentraciones relativamente elevadas usadas en las medidas de absorción, la proflavina puede unirse a otra molécula de proflavina o al ADN, formando el dímero  $PF_2$  o el complejo  $PF:ADN$ , y cada una de estas reacciones está definida por una constante de equilibrio,  $K_D$  o  $K_1$ , respectivamente. Además de estas reacciones, el complejo intercalado puede interactuar con otra proflavina para formar el dímero intercalado  $PF_2:ADN$ , que también se puede formar a partir de la unión de un dímero con el ADN. Este sistema de reacciones se muestra en el esquema siguiente:



Las constantes de equilibrio en este caso son:

$$\begin{aligned}
 K_D &= \frac{[PF_2]}{[PF][PF]} & K_1 &= \frac{[PF:ADN]}{[PF][ADN]} \\
 K_D^C &= \frac{[PF_2:ADN]}{[PF][PF:ADN]} & K_2 &= \frac{[PF_2:ADN]}{[PF_2][ADN]}
 \end{aligned} \quad (4.12)$$

El balance de materia:

$$\begin{aligned}
 [ADN]_0 &= [ADN] + [PF:ADN] + [PF_2:ADN] \\
 [PF]_0 &= [PF] + 2[PF_2] + [PF:ADN] + 2[PF_2:ADN]
 \end{aligned} \quad (4.13)$$

Suponiendo que  $[ADN] \approx [ADN]_0$  y que  $[ADN]_0 \gg [PF]_0$  se llega a las siguientes expresiones para las concentraciones de cada una de las especies presentes:

$$\begin{aligned}
[PF] &= \frac{-(1 + K_1[ADN]_0) + \sqrt{(1 + K_1[ADN]_0)^2 + 8K_D(1 + K_2[ADN]_0)[PF]_0}}{4K_D(1 + K_2[ADN]_0)} \\
[PF_2] &= K_D[PF]^2 \\
[PF:ADN] &= K_1[ADN]_0[PF] \\
[PF_2] &= K_D[PF]^2 \\
[PF:ADN] &= K_1[ADN]_0[PF] \\
[PF_2:ADN] &= K_DK_2[ADN]_0[PF]^2
\end{aligned} \tag{4.14}$$

Dado que, a las concentraciones de proflavina utilizadas, no se detectó la presencia de dímeros  $PF_2$ , se considerará que las especies presentes en el sistema son la proflavina libre PF, el complejo 1:1  $PF:ADN$  y el complejo 2:1  $PF_2:ADN$  y que las tres contribuyen a la absorbancia observada. Estas especies químicas están ligadas a través de las constantes de equilibrio  $K_1$  y  $K_2$ , siendo  $K_D$  y  $K_D^C$  constantes directamente relacionadas.

De esta manera se llega a la ecuación de ajuste:

$$A^\lambda = A_{PF}^\lambda [PF] + A_{PF:ADN}^\lambda [PF:ADN] + A_{PF_2:ADN}^\lambda [PF_2:ADN] \tag{4.15}$$

Este modelo de complejación 2:1 + 1:1 se utilizó para ajustar los datos experimentales de absorción y determinar la constante de equilibrio  $K_2$ , usando para la constante  $K_1$  los valores obtenidos del análisis de los espectros de emisión. También se obtuvieron los espectros puros de cada especie (Figura 4.22), la concentración de cada especie en función de la concentración de ADN (Figura 4.23) y ejemplos de los ajustes de las intensidades de fluorescencia a ciertas longitudes de onda (Figura 4.24 y Figura 4.25).

El espectro puro del complejo intercalado presenta menor absorbancia que la proflavina sin complejar, con un desplazamiento del máximo hacia longitudes de onda mayores, como se había observado anteriormente. En el caso del dímero intercalado, la absorbancia también es menor, pero el desplazamiento del máximo es menos pronunciado (Figura 4.22). Además de las especies presentes en emisión (PF y  $PF:ADN$ ), el dímero está presente en mayor proporción cuando la concentración de ADN es muy pequeña y disminuye lentamente con el aumento de la concentración de ADN. Esto es lógico ya que, a concentraciones bajas de ADN, hay una alta relación proflavina/ADN que favorece la dimerización (Figura 4.23).

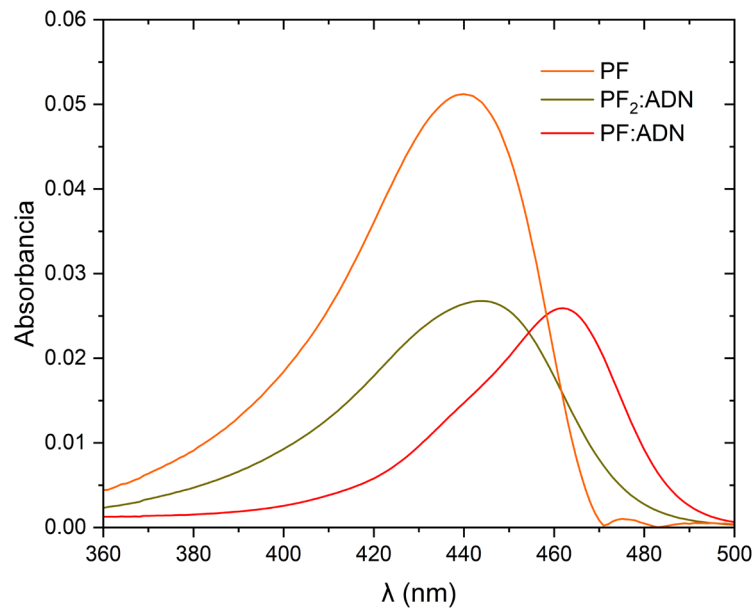


Figura 4.22. Espectros puros de las especies que contribuyen a la absorción.  $[NaCl] = 150 \text{ mM}$ .

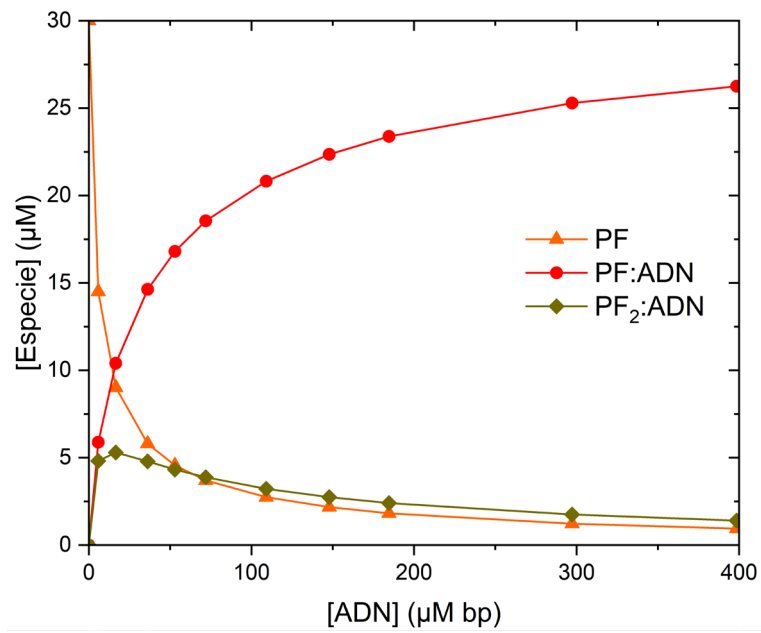


Figura 4.23. Contribución de cada especie química a la absorción en función de la concentración de ADN.  $[NaCl] = 150 \text{ mM}$ .

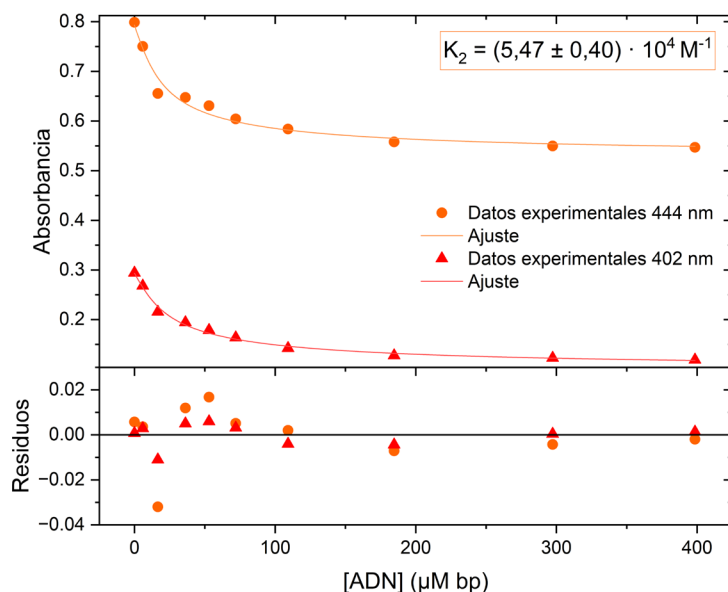


Figura 4.24. Ajuste no lineal de complejación 2:1 + 1:1 a los datos de absorción de la proflavina en presencia ADN y NaCl. En la gráfica se representa el ajuste de las absorbancias a dos longitudes de onda (402 nm y 444 nm).  $[\text{ADN}] = 0 - 400 \mu\text{M bp}$ .  $[\text{PF}] = 30 \mu\text{M}$ .  $[\text{NaCl}] = 150 \text{ mM}$ .

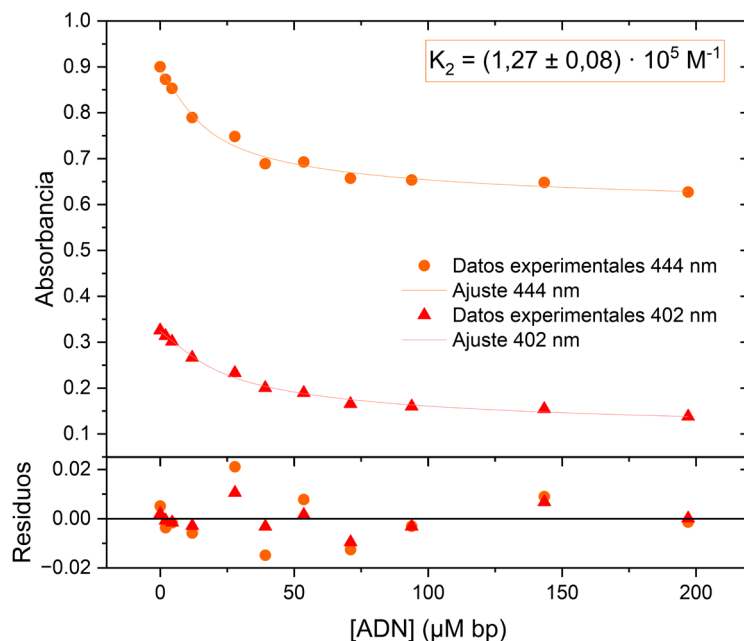


Figura 4.25. Ajuste no lineal de complejación 2:1 + 1:1 a los datos de absorción de la proflavina en presencia de ADN y  $\text{MgCl}_2$ . En la gráfica se representa el ajuste de las absorbancias a dos longitudes de onda (402 nm y 444 nm).  $[\text{ADN}] = 0 - 200 \mu\text{M bp}$ .  $[\text{PF}] = 30 \mu\text{M}$ .  $[\text{MgCl}_2] = 2 \text{ mM}$ .

En la Tabla 4.3 se recogen los valores de  $K_2$  a todas las concentraciones de sales estudiadas, al igual que los valores de  $K_{d2}$ . Estos resultados presentan un error mucho más elevado que los obtenidos en las series de emisión, por lo que no se puede observar un efecto claro de los cationes sobre la constante de afinidad de complejación 2:1 o la constante de disociación.

Tabla 4.3. Valores de  $K_2$  y  $K_{d2}$  obtenidos experimentalmente del ajuste global de las series de espectros de absorción para diferentes concentraciones de sales.

Sal	Concentración (mM)	$K_2$ ( $M^{-1}$ )	$K_{d2}$ (M)
NaCl	50	$(8,78 \pm 0,71) \cdot 10^4$	$(1,14 \pm 0,09) \cdot 10^{-5}$
	100	$(8,28 \pm 0,62) \cdot 10^4$	$(1,21 \pm 0,09) \cdot 10^{-5}$
	150	$(5,65 \pm 0,40) \cdot 10^4$	$(1,77 \pm 0,13) \cdot 10^{-5}$
	200	$(4,63 \pm 0,41) \cdot 10^4$	$(2,16 \pm 0,19) \cdot 10^{-5}$
	300	$(8,84 \pm 0,75) \cdot 10^4$	$(1,13 \pm 0,10) \cdot 10^{-5}$
MgCl <sub>2</sub>	2	$(1,23 \pm 0,08) \cdot 10^5$	$(8,13 \pm 0,53) \cdot 10^{-6}$
	10	$(1,05 \pm 0,08) \cdot 10^5$	$(9,52 \pm 0,73) \cdot 10^{-6}$
	50	$(2,30 \pm 0,43) \cdot 10^5$	$(4,35 \pm 0,81) \cdot 10^{-6}$

Finalmente se analizó cuantitativamente el efecto de la concentración de sal y de la carga del catión sobre la constante de complejación 1:1 entre la proflavina y el ADN.

La influencia de los iones sobre la constante de afinidad se puede analizar mediante el estudio de la fuerza iónica. En la Tabla 4.4 se recogen los valores obtenidos a partir de la fuerza iónica  $I$  (calculada con la Ecuación (1.9)) para el coeficiente de actividad medio de los iones que forman la sal  $\gamma_{\pm}$  (Ecuación (1.5)) y la actividad de la sal  $a_{MX}$  (Ecuación (1.4)), así como el logaritmo decimal de  $K_1$ .

Tabla 4.4. Valores calculados de  $I$ ,  $\gamma_{\pm}$ ,  $a_{MX}$ , y  $\log(K_1)$  para todas las concentraciones de sales utilizadas en este estudio.

[NaCl] (mM)	[MgCl <sub>2</sub> ] (mM)	$I$	$\gamma_{\pm}$	$a_{MX}$	Log( $K_1$ )
50		0,06	0,78	0,04	5,04
100		0,11	0,71	0,07	5,04
150		0,16	0,66	0,1	5,13
150		0,16	0,66	0,1	4,84
200		0,21	0,63	0,13	4,77
300		0,31	0,59	0,17	4,84
	2	0,016	0,76	0,002	5,16
	10	0,04	0,65	0,01	5,02
	50	0,16	0,44	0,07	4,80

La fuerza iónica y la actividad aumentan mientras mayor sea la concentración de sal. Por otro lado, el coeficiente de actividad medio y la constante de afinidad disminuyen con mayores concentraciones de sal.

Con estos datos se puede representar el logaritmo de la constante de afinidad frente a la raíz cuadrada de  $I$ . En la Figura 4.26 se representan los valores obtenidos en el TFG y los obtenidos anteriormente en el grupo de investigación para mejorar el análisis.

El ajuste lineal de los datos dará una ecuación de la recta donde la pendiente,  $m$ , corresponde con  $z_A z_B$ , según la Ecuación (1.11).

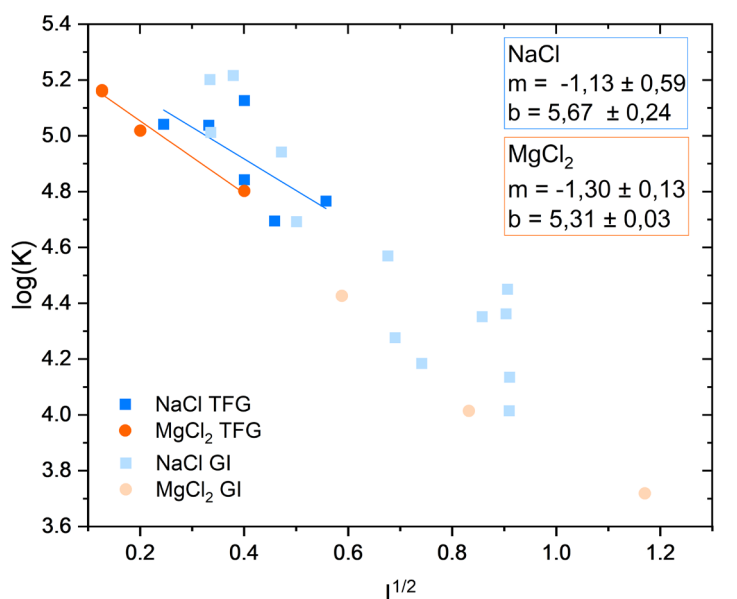


Figura 4.26. Representación del logaritmo de la constante de afinidad frente a la raíz cuadrada de la fuerza iónica. Se muestran los datos obtenidos durante el TFG junto con otros obtenidos anteriormente en el grupo de investigación (GI).

Como se puede observar, la constante de asociación disminuye con el aumento de la fuerza iónica, debido a la estabilización de la carga del ADN, lo que a su vez afecta la interacción de la proflavina con el ADN.

La pendiente es negativa, lo que indica que estas dos moléculas poseen cargas de signo contrario. Si la pendiente tuviese un valor de -1, indicaría que la proflavina tiene una carga de +1 y el ADN de -1. No obstante, la relación es mayor a -1, es decir, la carga neta promedio del ADN en estas condiciones es más negativa.

### 4.3. Cuantificación del ADN con PF

Finalmente, para la cuantificación del ADN se utilizaron dos muestras positivas en SARS-CoV-2 amplificadas mediante el método LAMP y sin colorante, resultantes del proyecto de investigación anteriormente mencionado.

Es importante mencionar que estas muestras ya habían sido sometidas anteriormente a varios procesos de congelación y descongelación para estudiar otro intercalador como colorante en otro trabajo.<sup>33</sup>

Cada muestra y control se preparó individualmente en un volumen total de 200  $\mu\text{l}$ , con  $[\text{PF}] = 2,0 \mu\text{M}$  y  $[\text{MgCl}_2] = 2,0 \text{ mM}$  disueltos en Tris 10 mM. Los controles, por un lado, se prepararon añadiendo una concentración de ADN conocida (100  $\mu\text{M}$  bp), mientras que las muestras se diluyeron con un factor de dilución 1:100.

Para conocer la concentración real de cada control, se midió su absorbancia a 260 nm y sabiendo que  $\epsilon = 0,020 \text{ ml}/\mu\text{g cm}^{-1}$ ,<sup>34</sup> se utilizó la Ecuación (1.2). Estos controles van a permitir ajustar la curva de calibrado de  $[\text{MgCl}_2] = 2,0 \text{ mM}$  a las condiciones experimentales, utilizando la Ecuación (4.16).

$$F_C = \frac{A' + B' K_1 [\text{ADN}]_C}{1 + K_1 [\text{ADN}]_C} \quad (4.16)$$

donde  $F_C$  es la intensidad de fluorescencia de la muestra control,  $K_1$  es la constante de asociación del ajuste de complejación 1:1 para  $[\text{MgCl}_2] = 2,0 \text{ mM}$  y  $[\text{ADN}]_C$  corresponde con la concentración de ADN de la muestra control. Los valores de  $A'$  y  $B'$  se pueden determinar a partir de los dos controles realizados, ya que se disponen de dos ecuaciones con dos incógnitas.

Posteriormente, se puede determinar la concentración de ADN que tenía cada muestra con la expresión siguiente:

$$[\text{ADN}]_m = \frac{F_m - A'}{K_1 (B' - F_m)} \quad (4.17)$$

donde  $F_m$  es la intensidad de fluorescencia de la muestra.

En la Tabla 4.5 se muestran los valores obtenidos para  $F_m$ ,  $A'$ ,  $B'$ , y la concentración de ADN amplificado en la muestra original para cada repetición de las muestras 62 y 63.

Tabla 4.5. Valores de  $F_m$ ,  $A'$ ,  $B'$  y  $[ADN]$  sin diluir.

Muestra	$F_m \cdot 10^5$	$A'$	$B'$	$[ADN] (\mu M bp) \cdot 10^3$
62 <sub>(1)</sub>	5,421	$5,386 \cdot 10^6$	$4,606 \cdot 10^4$	6,852
62 <sub>(2)</sub>	5,197			7,209
62 <sub>(3)</sub>	6,386			5,622
63 <sub>(1)</sub>	5,910			6,174
63 <sub>(2)</sub>	5,956			6,117
63 <sub>(3)</sub>	4,946			7,652

El orden de magnitud de la concentración de ADN cuantificado coincide entre todas las mediciones, pero hay cierta dispersión de datos. Esto puede deberse a la falta de homogeneidad de las muestras utilizadas.

El valor medio de estos datos se puede comparar con los obtenidos en otro trabajo, donde se utilizó el Thiazole Orange (TO) y un colorante comercial, NEB.<sup>33</sup> Estos datos se muestran a continuación en la Tabla 4.6:

Tabla 4.6. Comparación de las concentraciones de ADN amplificado obtenidas para la proflavina (PF), el thiazole orange (TO) y un colorante comercial (NEB).

Muestra	$[ADN] (\mu M bp) \cdot 10^3$		
	PF	TO	NEB
62	$6,56 \pm 0,83$	$2,88 \pm 0,01$	$3,12 \pm 0,08$
63	$6,64 \pm 0,87$	$8,760 \pm 0,004$	$2,51 \pm 0,01$

Como se puede observar, la magnitud de las concentraciones de ADN coincide entre todos los colorantes, pero en el caso de la proflavina los valores son significativamente más altos. Para perfeccionar estos resultados sería necesario mejorar la curva de calibración y realizar la determinación de una mayor cantidad de muestras más recientes.

## 5. Conclusiones

Con los estudios de la proflavina, utilizando absorción Vis-UV y fluorescencia de estado estacionario, se llegaron a las siguientes conclusiones:

El estudio de la dimerización demostró que la PF dimerizada absorbe de manera diferente que su forma monomérica, haciendo necesario evitar la formación de dímeros en las medidas realizadas posteriormente.

La PF en medio fisiológico se encuentra protonada. La pérdida de este protón tiene lugar a pH alcalinos, con un pKa aproximado de 9,5.

Los estudios sobre la estabilidad química de la PF contrastan con lo observado durante el desarrollo del trabajo, por lo que necesita mayor investigación en este campo.

La constante de asociación de la PF con el ADN se ve disminuida con el aumento de la fuerza iónica. Este efecto es mayor en presencia del ion  $Mg^{2+}$  que en el caso del ion  $Na^+$ .

La PF puede funcionar como un colorante para detectar y cuantificar el ADN, ya que su comportamiento es similar al de otros colorantes como el Thiazole Orange o el NEB.

## 6. Bibliografía

1. Artika IM, Dewi YP, Nainggolan IM, Siregar JE, Antonjaya U. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. Vol. 13, Genes. MDPI; 2022.
2. Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd ed. Boston, MA: Springer US; 2006. 24–35 p.
3. Benito Jiménez C, Espino Nuño FJ. Genética / Conceptos esenciales. Editorial Médica Panamericana; 2013. 377–395 p.
4. Green MR, Sambrook J. Polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Protoc. 2019 Jun 1;2019(6):436–56.
5. Denny WA. Acridine Derivatives as Chemotherapeutic Agents. Curr Med Chem. 2002;9(18):1655–65.
6. Li S, Cooper VR, Thonhauser T, Lundqvist BI, Langreth DC. Stacking Interactions and DNA Intercalation. J Phys Chem B. 2009 Aug 13;113(32):11166–72.
7. Mukherjee A, Sasikala WD. Drug-DNA intercalation: From discovery to the molecular mechanism. In: Advances in Protein Chemistry and Structural Biology. Academic Press Inc.; 2013. p. 1–62.
8. Penner MH. Basic Principles of Spectroscopy. In: Food Analysis. 2010. p. 377–85.
9. Cook RB, Jankow R. Effects of stray light in spectroscopy. J Chem Educ. 1972 Jun 1;49(6):405.
10. Nedu ME, Tertis M, Cristea C, Georgescu AV. Comparative study regarding the properties of methylene blue and proflavine and their optimal concentrations for in vitro and in vivo applications. Diagnostics. 2020 Apr 1;10(4).
11. Gatasheh MK, Kannan S, Hemalatha K, Imrana N. Proflavine an acridine DNA intercalating agent and strong antimicrobial possessing potential properties of carcinogen. Karbala Int J Mod Sci. 2017 Dec 1;3(4):272–8.
12. Kostjukova LO, Leontieva S V., Kostjukov V V. The vibronic absorption spectra and electronic states of proflavine in aqueous solution. Comput Theor Chem. 2021 Mar 1;1197.

13. Haugen GR, Melhuish WH. Association and self-quenching of proflavine in water. *Trans Faraday Soc.* 1964;60:386.
14. Sasikala WD, Mukherjee A. Structure and dynamics of proflavine association around DNA. *Phys Chem Chem Phys.* 2016 Apr 21;18(15):10383–91.
15. Savenko ES, Kostjukov V V. Theoretical study of the excitation of proflavine H-dimers in an aqueous solution: the effect of functionals and dispersion corrections. *Phys Chem Chem Phys.* 2023 Apr 6;25(17):12259–76.
16. Sasikala WD, Mukherjee A. Molecular Mechanism of Direct Proflavine–DNA Intercalation: Evidence for Drug-Induced Minimum Base-Stacking Penalty Pathway. *J Phys Chem B.* 2012 Oct 11;116(40):12208–12.
17. Zhou J, Wang X, Jia M, He X, Pan H, Chen J. Ultrafast spectroscopy study of DNA photophysics after proflavine intercalation. *J Chem Phys.* 2024 Mar 28;160(12).
18. MoradpourHafshejani S, Hedley JH, Haigh AO, Pike AR, Tuite EM. Synthesis and binding of proflavine diazides as functional intercalators for directed assembly on DNA. *RSC Adv.* 2013 Oct 21;3(39):18164.
19. Riemer SC, Bloomfield VA. Effect of Mg<sup>++</sup> and Polyamines on Proflavine Binding to T2 DNA. *Biopolymers.* 1979;18:1695–708.
20. Zhou J, Jia Y, Wang X, Jia M, Pan H, Sun Z, et al. Excited-State Dynamics of Proflavine after Intercalation into DNA Duplex. *Molecules.* 2022 Nov 23;27(23):8157.
21. B.L. Gittelson, I.O. Walker. The interaction of proflavine with deoxyribonucleic acid and deoxyribonucleohistone. *Biochim Biophys Acta.* 1967;138(3):619–21.
22. Record MT, Anderson CF, Lohman TM. Thermodynamic analysis of ion effects on the binding and conformational equilibria of proteins and nucleic acids: the roles of ion association or release, screening, and ion effects on water activity. *Q Rev Biophys.* 1978 May 17;11(2):103–78.
23. Robson Wright M. *An Introduction to Aqueous Electrolyte Solutions.* Wiley; 2007. 409–424 p.
24. Bronsted JN, Teeter CE. On Kinetic Salt Effect. *J Phys Chem.* 1924 Jun 1;28(6):579–87.

25. Knipping EM, Dabdub D. Modeling Cl<sub>2</sub> formation from aqueous NaCl particles: Evidence for interfacial reactions and importance of Cl<sub>2</sub> decomposition in alkaline solution. *J Geophys Res: Atmospheres*. 2002 Sep 27;107(D18):8–30.
26. Atkins P, De Paula J, Keeler J. *Atkins' Physical Chemistry*. 12th ed. Oxford University Press; 2022. 880–885 p.
27. Al-Soufi W, Novo M, Mosquera M, Rodríguez-Prieto F. Principal Component Global Analysis of Series of Fluorescence Spectra. In 2011. p. 23–45.
28. Wright MR. *An Introduction to Aqueous Electrolyte Solutions*. ChemPhysChem. Wiley; 2007. 409–424 p.
29. Liu C, Betteridge T, Hou YM. Fluorophore Labeling to Monitor tRNA Dynamics. In: *Methods in enzymology*. 2009. p. 69–93.
30. isosbestic point. In: *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology [Internet]*. 3.0.1. Research Triangle Park, NC: International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC); 2014. Available from: <https://goldbook.iupac.org/terms/view/I03310>
31. Kawedia JD, Zhang YP, Myers AL, Richards-Kortum RR, Kramer MA, Gillenwater AM, et al. Physical and chemical stability of proflavine contrast agent solutions for early detection of oral cancer. *J Oncol Pharm Pract*. 2016 Feb 10;22(1):21–5.
32. Kallansrud G, Ward B. A Comparison of Measured and Calculated Single-and Double-Stranded Oligodeoxynucleotide Extinction Coefficients. *Anal Biochem*. 1996;236:134–8.
33. Hernández Faria de Moraes S. *Uso do laranxa de tiazol para a detección e cuantificación do ADN de dobre febra [Trabaja Fin de Máster]*. [Lugo]: Universidade de Santiago de Compostela; 2023.
34. Murphy JH, Trapane TL. Concentration and Extinction Coefficient Determination for Oligonucleotides and Analogs Using a General Phosphate Analysis. *Anal Biochem*. 1996;240:273–82.

## 7. Anexo

Se presentan los espectros de absorción y emisión para concentraciones de NaCl (50 mM, 100 mM, 200 mM y 300 mM) y MgCl<sub>2</sub> (10 mM y 50 mM).

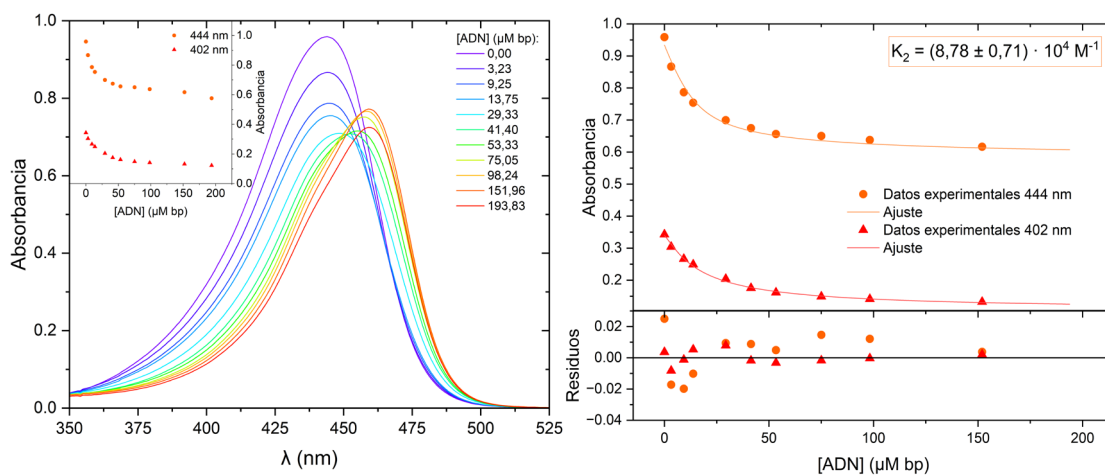


Figura 7.1. Izquierda: espectro de absorción de la proflavina en presencia de ADN y NaCl. En el gráfico insertado se muestran los valores de absorbancia a dos longitudes de onda (444 nm y 402 nm) en función de la concentración de ADN ( $\mu\text{M bp}$ ).  $[\text{ADN}] = 0 - 200 \mu\text{M bp}$ .  $[\text{PF}] = 30 \mu\text{M}$ .  $[\text{NaCl}] = 50 \text{ mM}$ . Derecha: Ajuste de estos datos con el modelo de complejación 2:1 + 1:1.

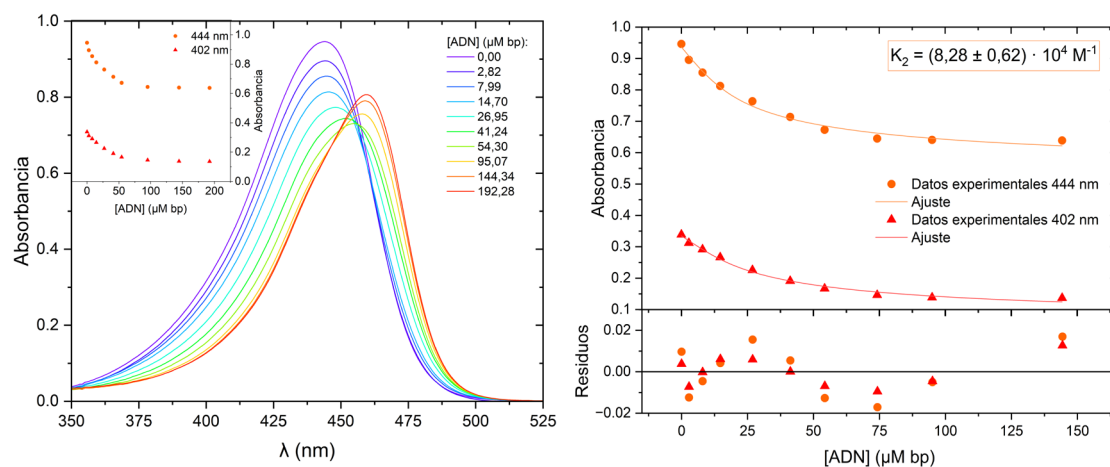


Figura 7.2. Izquierda: espectro de absorción de la proflavina en presencia de ADN y NaCl. En el gráfico insertado se muestran los valores de absorbancia a dos longitudes de onda (444 nm y 402 nm) en función de la concentración de ADN ( $\mu\text{M bp}$ ).  $[\text{ADN}] = 0 - 200 \mu\text{M bp}$ .  $[\text{PF}] = 30 \mu\text{M}$ .  $[\text{NaCl}] = 100 \text{ mM}$ . Derecha: Ajuste de estos datos con el modelo de complejación 2:1 + 1:1.

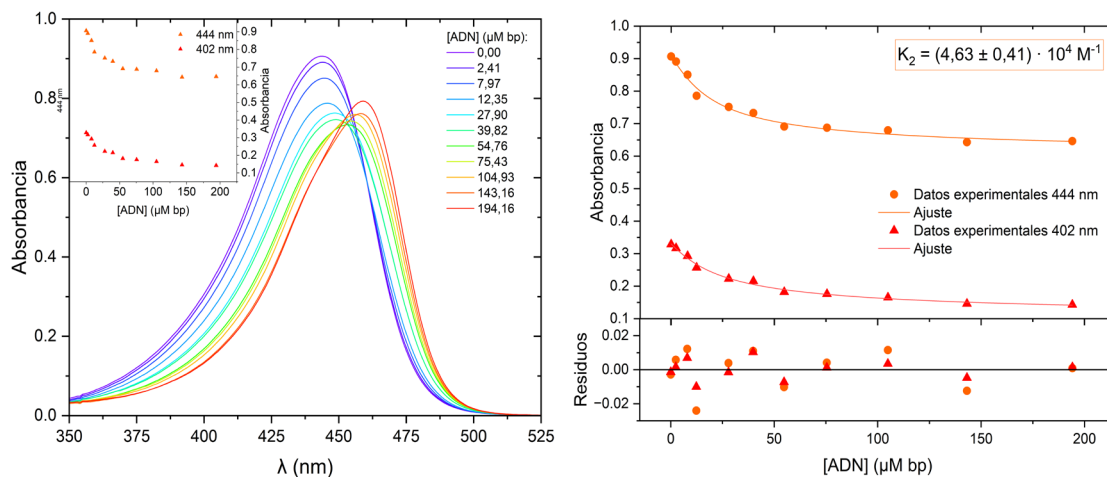


Figura 7.3. Izquierda: espectro de absorción de la proflavina en presencia de ADN y NaCl. En el gráfico insertado se muestran los valores de absorbancia a dos longitudes de onda (444 nm y 402 nm) en función de la concentración de ADN ( $\mu\text{M bp}$ ).  $[\text{ADN}] = 0 - 200 \mu\text{M bp}$ .  $[\text{PF}] = 30 \mu\text{M}$ .  $[\text{NaCl}] = 200 \text{ mM}$ . Derecha: Ajuste de estos datos con el modelo de complejación 2:1 + 1:1.

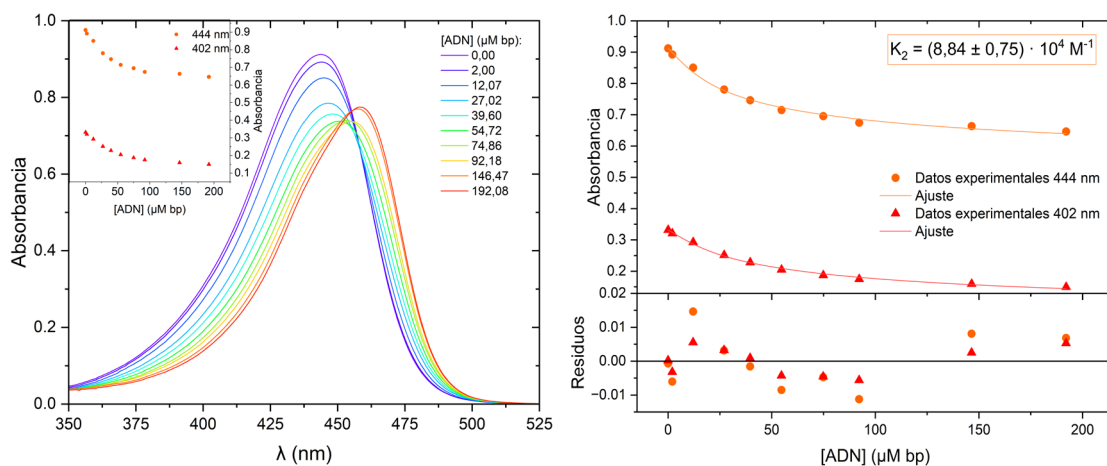


Figura 7.4. Izquierda: espectro de absorción de la proflavina en presencia de ADN y NaCl. En el gráfico insertado se muestran los valores de absorbancia a dos longitudes de onda (444 nm y 402 nm) en función de la concentración de ADN ( $\mu\text{M bp}$ ).  $[\text{ADN}] = 0 - 200 \mu\text{M bp}$ .  $[\text{PF}] = 30 \mu\text{M}$ .  $[\text{NaCl}] = 300 \text{ mM}$ . Derecha: Ajuste de estos datos con el modelo de complejación 2:1 + 1:1.

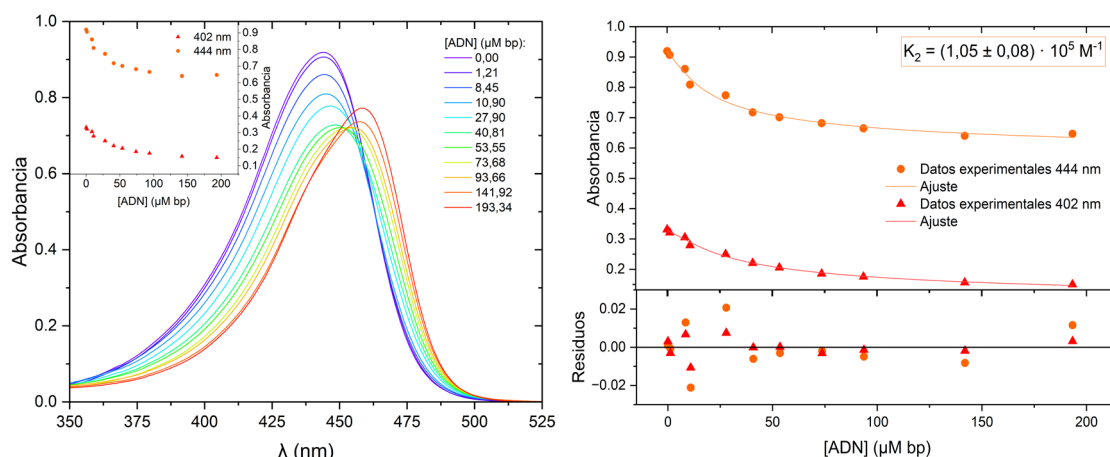


Figura 7.5. Izquierda: espectro de absorción de la proflavina en presencia de ADN y  $MgCl_2$ . En el gráfico insertado se muestran los valores de absorbancia a dos longitudes de onda (444 nm y 402 nm) en función de la concentración de ADN ( $\mu M$  bp).  $[ADN] = 0 - 200 \mu M$  bp.  $[PF] = 30 \mu M$ .  $[MgCl_2] = 10 mM$ . Derecha: Ajuste de estos datos con el modelo de complejación 2:1 + 1:1.

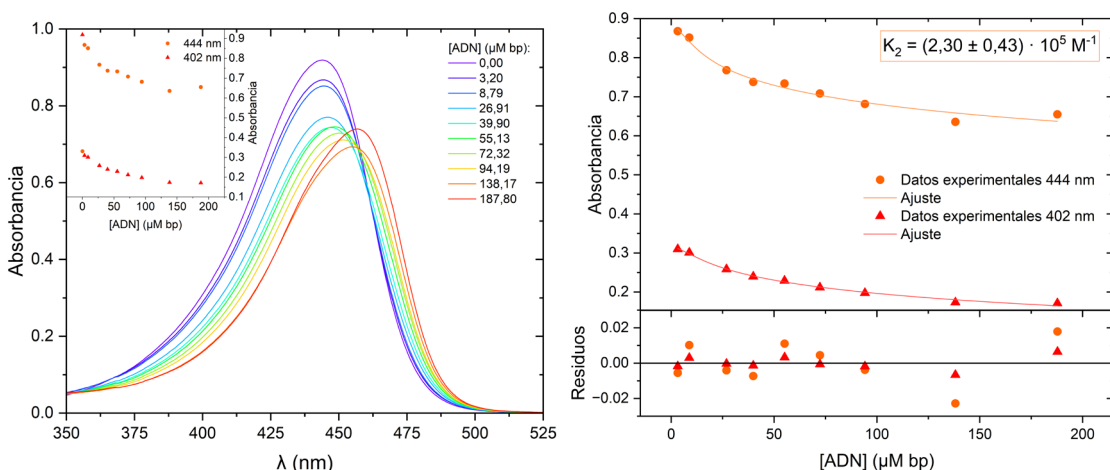


Figura 7.6. Izquierda: espectro de absorción de la proflavina en presencia de ADN y  $MgCl_2$ . En el gráfico insertado se muestran los valores de absorbancia a dos longitudes de onda (444 nm y 402 nm) en función de la concentración de ADN ( $\mu M$  bp).  $[ADN] = 0 - 200 \mu M$  bp.  $[PF] = 30 \mu M$ .  $[MgCl_2] = 50 mM$ . Derecha: Ajuste de estos datos con el modelo de complejación 2:1 + 1:1.

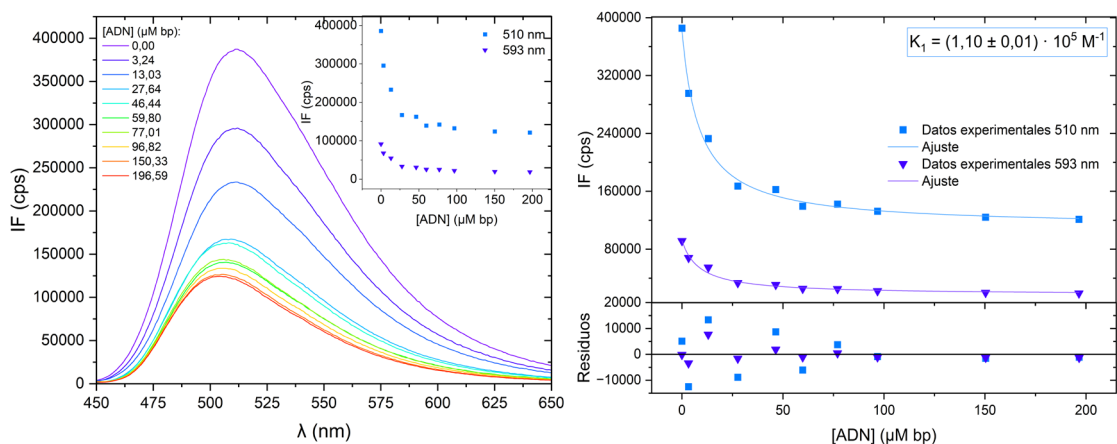


Figura 7.7. Izquierda: espectro de emisión de la proflavina en presencia de ADN y  $NaCl$ . En el gráfico insertado se muestran los valores de intensidad de fluorescencia a dos longitudes de onda (510 nm y 593 nm) en función de la concentración de ADN ( $\mu M$  bp).  $[ADN] = 0 - 200 \mu M$  bp.  $[PF] = 2 \mu M$ .  $[NaCl] = 50 mM$ .  $\lambda_{exc} = 440 nm$ . Derecha: Ajuste de estos datos con el modelo de complejación 1:1.

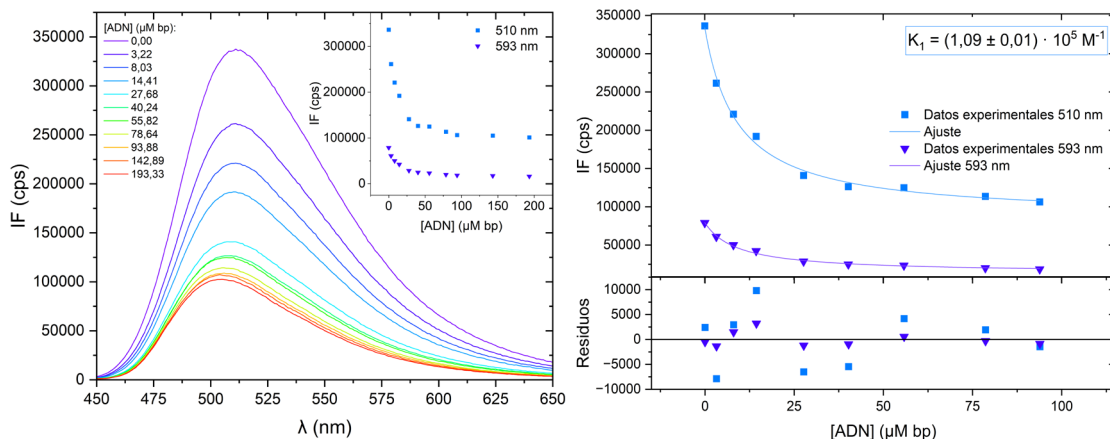


Figura 7.8. Izquierda: espectro de emisión de la proflavina en presencia de ADN y NaCl. En el gráfico insertado se muestran los valores de intensidad de fluorescencia a dos longitudes de onda (510 nm y 593 nm) en función de la concentración de ADN ( $\mu\text{M bp}$ ).  $[\text{ADN}] = 0 - 200 \mu\text{M bp}$ .  $[\text{PF}] = 2 \mu\text{M}$ .  $[\text{NaCl}] = 100 \text{ mM}$ .  $\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$ . Derecha: Ajuste de estos datos con el modelo de complejación 1:1.

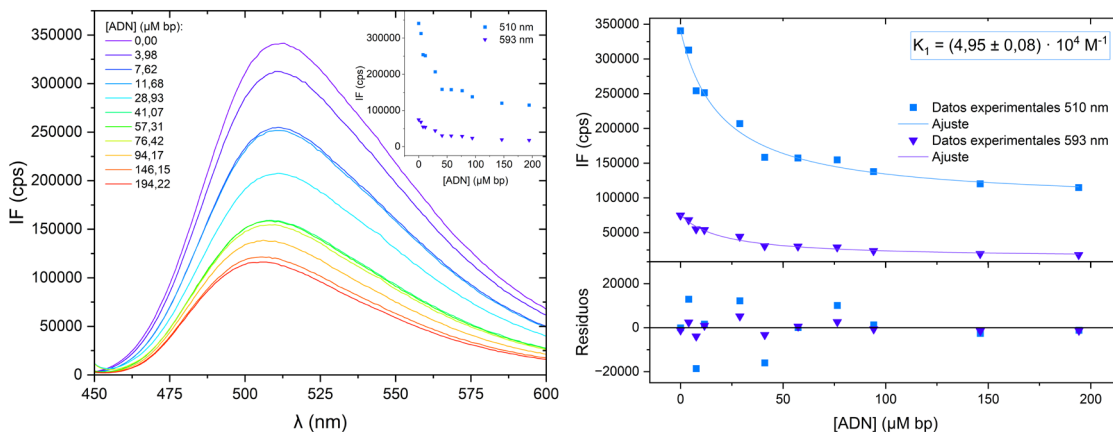


Figura 7.9. Izquierda: espectro de emisión de la proflavina en presencia de ADN y NaCl. En el gráfico insertado se muestran los valores de intensidad de fluorescencia a dos longitudes de onda (510 nm y 593 nm) en función de la concentración de ADN ( $\mu\text{M bp}$ ).  $[\text{ADN}] = 0 - 200 \mu\text{M bp}$ .  $[\text{PF}] = 2 \mu\text{M}$ .  $[\text{NaCl}] = 200 \text{ mM}$ .  $\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$ . Derecha: Ajuste de estos datos con el modelo de complejación 1:1.

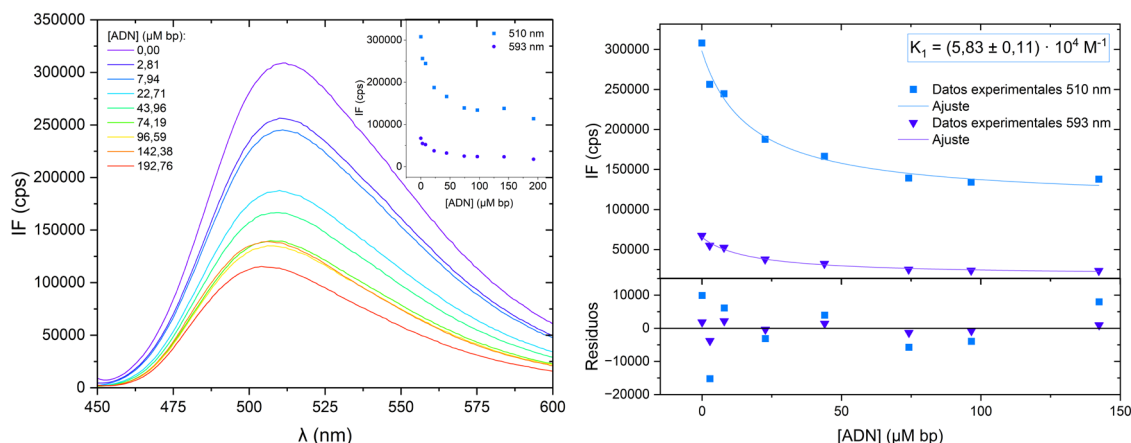


Figura 7.10. Izquierda: espectro de emisión de la proflavina en presencia de ADN y NaCl. En el gráfico insertado se muestran los valores de intensidad de fluorescencia a dos longitudes de onda (510 nm y 593 nm) en función de la concentración de ADN ( $\mu\text{M bp}$ ).  $[\text{ADN}] = 0 - 200 \mu\text{M bp}$ .  $[\text{PF}] = 2 \mu\text{M}$ .  $[\text{NaCl}] = 300 \text{ mM}$ .  $\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$ . Derecha: Ajuste de estos datos con el modelo de complejación 1:1.

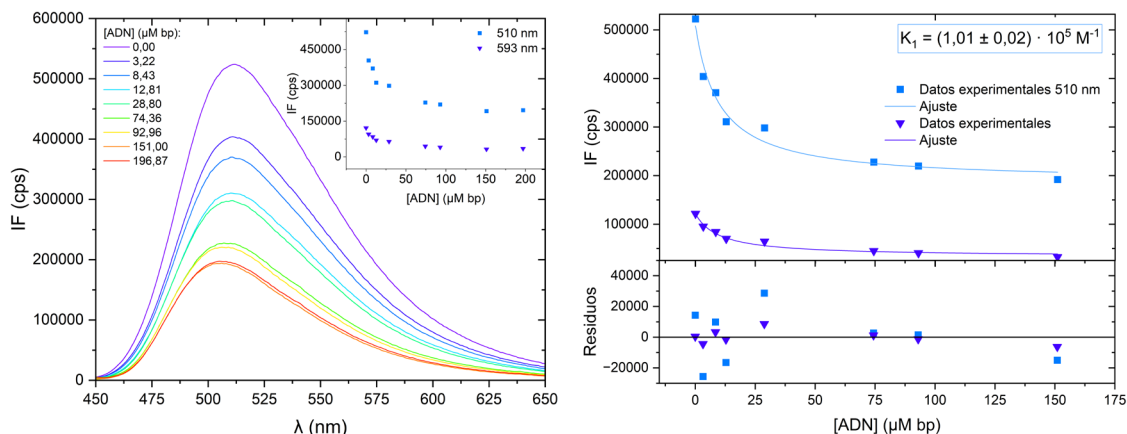


Figura 7.11. Izquierda: espectro de emisión de la proflavina en presencia de ADN y  $MgCl_2$ . En el gráfico insertado se muestran los valores de intensidad de fluorescencia a dos longitudes de onda (510 nm y 593 nm) en función de la concentración de ADN ( $\mu M$  bp).  $[ADN] = 0 - 200 \mu M$  bp.  $[PF] = 2 \mu M$ .  $[MgCl_2] = 10$  mM.  $\lambda_{exc} = 440$  nm. Izquierda: Ajuste de estos datos con el modelo de complejación 1:1.

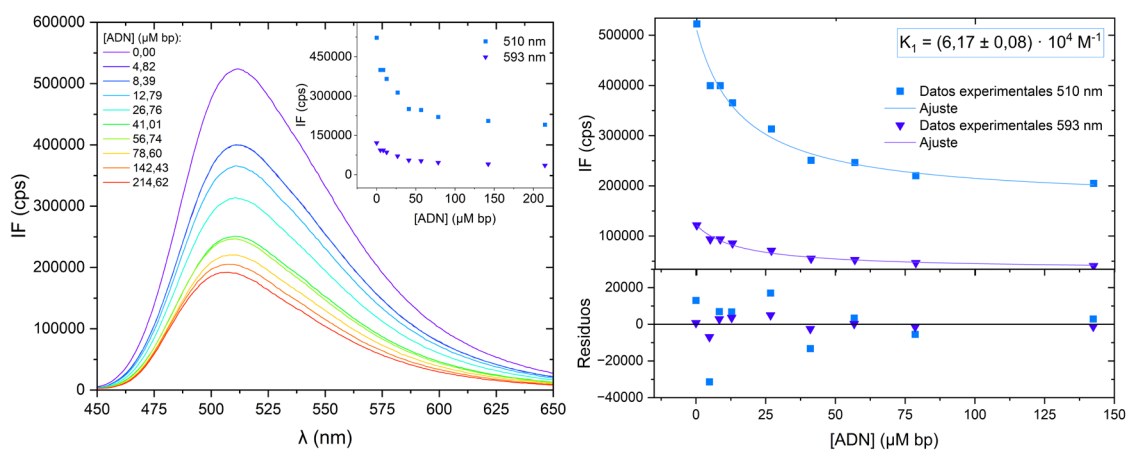


Figura 7.12. Izquierda: espectro de emisión de la proflavina en presencia de ADN y  $MgCl_2$ . En el gráfico insertado se muestran los valores de intensidad de fluorescencia a dos longitudes de onda (510 nm y 593 nm) en función de la concentración de ADN ( $\mu M$  bp).  $[ADN] = 0 - 200 \mu M$  bp.  $[PF] = 2 \mu M$ .  $[MgCl_2] = 50$  mM.  $\lambda_{exc} = 440$  nm. Izquierda: Ajuste de estos datos con el modelo de complejación 1:1.